



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS



Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de

DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

**“ESTUDIO FITOQUÍMICO DE EXTRACTOS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA
CONTRA *BRUCELLA CANIS* OBTENIDOS A PARTIR DE PLANTAS NATIVAS Y
NATURALIZADAS DE LA PROVINCIA DE LA PAMPA, ARGENTINA”**

AUTORA: M. V. ARDOINO, SILVIA MARINA

DIRECTOR: Dr. TOSO, RICARDO ENRIQUE

CODIRECTOR: Dr. MALIANDI, FLORESTAN SEBASTIAN

LUGAR/ES DE TRABAJO: Centro de Investigación y Desarrollo de
Fármacos (CIDEF). Facultad de Ciencias Veterinarias. UNLPam

MIEMBROS DEL JURADO

Dra. DI LORENZO, CECILIA

Dr. LINZITTO, OSCAR

Dr. STANCHI, NÉSTOR

***Dedico esta Tesis a:
Agustina y Juan***

AGRADECIMIENTOS

Al Director de Tesis Dr. Ricardo Toso

Al CoDirector de Tesis Dr. Florestán S. Maliandi

A la Secretaría de Ciencia, Técnica y Posgrado de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLPam.

A la Mg. Susana Oriani.

A la Dra. Mónica Boeris.

Al Farmacéutico Alejandro Bucciarelli.

A los Ing. Agrónomos Pedro Steibel y Héctor Troiani.

A la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP.

PROLOGO

La brucelosis canina es una enfermedad infecciosa que produce trastornos reproductivos en los caninos, además de ser una zoonosis. El agente etiológico es la *Brucella canis*, un cocobacilo Gram negativo intracelular. Los perros son su único huésped natural. La eliminación de la bacteria en las hembras preñadas se produce a partir del feto, la placenta, los fluidos fetales y la descarga vaginal posterior al aborto. Los machos infectados eliminan brucellas por semen uno o dos meses post infección, y luego intermitentemente por años. La enfermedad es transmitida a los humanos a través de la ingestión, por las mucosas o la piel lesionada.

Los mejores resultados para tratar la enfermedad se logran con combinaciones de antibióticos tales como tetraciclina, doxiciclina, minociclina y estreptomina. Sin embargo la recrudescencia de la infección después de la cesación del tratamiento es común, determinando la recomendación de recurrir al sacrificio de los animales enfermos, sobre todo en los reproductores de los criaderos.

Las características mencionadas de esta enfermedad zoonótica, en particular la dificultad para tratar con éxito a los caninos enfermos con los antimicrobianos que se cuentan en la actualidad, llevaron a pensar en realizar un aporte al descubrimiento de nuevas alternativas farmacológicas. Para concretar esta finalidad, se propuso como objetivo general investigar la presencia de actividad antimicrobiana contra *Brucella canis* en plantas nativas y naturalizadas de la Provincia de La Pampa.

En la medicina moderna las plantas tienen aplicaciones importantes que van mucho más allá de ser una fuente directa de agentes terapéuticos. Actualmente el estudio de la estructura química de los principios activos de plantas utilizadas tradicionalmente, puede servir de modelo para la elaboración de drogas sintéticas. Se han publicado trabajos que incluyen estudios sobre la actividad antimicrobiana que presentan diversos extractos vegetales utilizando distintos solventes, mostrando

resultados alentadores, incluso frente a cepas de microorganismos multirresistentes. La identificación de los grupos químicos responsables del efecto antimicrobiano, tales como flavonoides, alcaloides, ácidos fenólicos, antocianinas y taninos, entre otros, permiten especular sobre el potencial de algunas especies vegetales. Aunque es difícil predecir la utilidad farmacológica de ellos, ya que no existe una buena correlatividad entre el comportamiento *in vitro* e *in vivo*, los miles de compuestos bioactivos que poseen las plantas, aumentan la probabilidad de hallar aquellos que tengan propiedades antimicrobianas novedosas.

Lo expuesto determinó que en este trabajo se avanzaran los ensayos hasta el descubrimiento de plantas con efecto *in vitro* contra *Brucella canis*, realizando estudios fitoquímicos a la/s fracción/es que exhibiera/n los mejores resultados para identificar la presencia de grupos químicos que podrían contener al/los principio/s activo/s responsables del efecto antimicrobiano.

Finalmente, es interesante señalar que las empresas farmacéuticas prefieren enviar a sus botánicos y químicos orgánicos a remotos lugares del mundo para que los curanderos y chamanes les cuenten sus secretos ancestrales, antes que iniciar búsquedas al azar para identificar especies vegetales con propiedades farmacológicas. Esto se debe al elevado costo y escaso porcentaje de éxito que tiene este método. Considerando este hecho, el enorme esfuerzo que significó evaluar al azar un gran número de especies vegetales, ha sido recompensado. Considerando que haber hallado una especie con propiedades antimicrobianas promisorias, representa un aporte a las investigaciones que están orientadas a descubrir nuevas alternativas para el tratamiento de la brucelosis canina.

PUBLICACIONES PARCIALES

- Ardoino, SM, Baruta, DA, Toso, RE: Brucelosis canina causada por *Brucella canis*. Revista Ciencia Veterinaria. Facultad de Ciencias Veterinarias. G. Pico. UNLPam. 2006. 8(1): 36-43.

- Troiani, HO, Oriani, DS, Ardoino SM, Toribio MS, Boeris MA., Toso RE. Banco de extractos vegetales de plantas nativas y naturalizadas de la provincia de La Pampa. Avances de la Farmacobotánica en Latinoamérica (2004 – 2007). 2007.1era. Edición. ISBN: 978-987-05-2933-0. Pag. 61

- Toso RE, Steibel PE, Troiani HO, Oriani DS, Ardoino SM, Toribio MS, Boeris MA. Búsqueda sistematizada de plantas con actividad farmacológica utilizando el Banco de Extractos Vegetales de plantas nativas y naturalizadas de la provincia de La Pampa. Ciencia Veterinaria. 2007. ISSN: 1515-1883 / 8: 25 - 30.

- Toso RE, Toribio MS, Boeris MA, Ardoino SM, Fernández JG, Mengelle P, Oriani DS, Gagliano L.A., Troiani H, Steibel P. Métodos Biotecnológicos Aplicados al Desarrollo de Nuevos Medicamentos. Cuadernos de Ciencia y Técnica. 2008. Año 3 Número 2 pág 20-38 Octubre de 2008. ISSN: 1852-0626 Compiladora: Dra. Mirta Koncurat.

- Ardoino SM, Boeris MA, Baruta DA, Toso R.. Comparación del efecto antimicrobiano de partes aéreas y corteza de *Prosopis flexuosa* var. *depressa* sobre *Brucella canis*. Ciencia Veterinaria. 2012. (14)1:7-13. General Pico - La Pampa, República Argentina. ISSN: 1515-1883.

RESÚMENES PRESENTADOS EN CONGRESOS O JORNADAS

- Oriani DS, Ardoino SM, Toso RE. "Actividad antimicrobiana de extractos metanólicos de plantas nativas y naturalizadas de la Provincia de La Pampa, frente a *Brucella canis*". Argentina. Resúmenes de la Jornada de Ciencia y Técnica 2006. 2006. Universidad Nacional de La Pampa. (versión electrónica).

- Oriani, DS, Ardoino SM, Toso RE. "Plantas de la provincia de La Pampa con actividad antimicrobiana in vitro sobre cepas de *Brucella canis*". Jornada de Ciencia y Técnica 2006. 2006. UNLPam. Santa Rosa, La Pampa. (versión electrónica).

- Troiani HO, Steibel PE, Boeris MA, Ardoino SM, Toribio MS, Toso RE. "Banco de Extractos Vegetales de plantas nativas y naturalizadas de la Provincia de La Pampa". Aplicaciones para estudios farmacognósticos sistematizados. Resúmenes de la jornada de Ciencia y Técnica. 2006. Universidad Nacional de La Pampa. (versión electrónica)

- Oriani S, Ardoino S, Toso R. "Actividad antimicrobiana de extractos metabólicos de plantas nativas y naturalizadas de la Provincia de La Pampa, frente a *Brucella canis*". Congreso SADEBAC 2006- 25 aniversario. IV Actividad Científica Anual de la Sociedad Argentina de Microbiología. Buenos Aires 31 de Octubre y 1 de Noviembre de 2006. (versión electrónica).

- Steibel P, Troiani H, Oriani, D, Ardoino S, Toribio M, Boeris M, Toso R. "Banco de Extractos Vegetales de plantas nativas y naturalizadas de la Provincia de La Pampa". IX Simposio Argentino y XII Simposio Latinoamericano de Farmacobotánica. San Miguel de Tucumán, Tucumán. 2007. Modalidad de la presentación: póster.

- Ardoino SM, Baruta, DA, Oriani DS, Sosa RE, Toso RE. "Actividad antimicrobiana contra *Brucella canis* de extractos de plantas nativas o naturalizadas de la Provincia de La Pampa". Libro de memorias de la VI Jornadas de Ciencia y Técnica 2009. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Pampa. 7 de Agosto de 2009. (Versión electrónica).

- Ardoino SM, Baruta DA, Oriani DS, Toso RE. "Evaluación antimicrobiana de extractos de plantas nativas y naturalizadas de la provincia de La Pampa contra *Brucella canis*". II Reunión de Biotecnología aplicada a plantas medicinales y aromáticas. 2 al 4 de diciembre de 2009. Ministerio de Ciencia y Tecnología de la provincia de Córdoba, REDBIO, subsecretaría del Ceproc, Santa María de Punilla. Córdoba. Poster C 34. 2009. Libro de resúmenes Sección C Productos Naturales, C 34.

- Ardoino SM, Baruta DA, Sosa RE, Brandan JL, Mariani EL, Oriani DS, Toso RE. "Actividad antimicrobiana contra *Brucella canis* de extractos de plantas nativas o naturalizadas de la Provincia de La Pampa". Jornada de Ciencia y Técnica 2010 "La investigación científica: historia y proyección". 2010. - 1a ed. - Santa Rosa. Universidad Nacional de La Pampa. Modalidad Póster.

- Ardoino SM, Baruta D, Brandan JL, Fernández L, Oriani DS, Toso, RE. "Evaluación de la actividad antimicrobiana contra *Brucella canis* de extractos vegetales". X Simposio Argentino y XIII Simposio Latinoamericano de Farmacobotánica. 24 al 26 de noviembre de 2010. Pabellón Argentina - Ciudad Universitaria, Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina. Modalidad de la presentación: Póster.

- Ardoino SM, Baruta DA, Brandan JL, Mariani EL, Sosa R, Oriani DS, Toso RE. "Efecto antimicrobiano de *Solanum Diflorum* sobre *Brucella canis*". VII Jornada de Ciencia y Técnica, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLPam, 12 de Octubre de 2011. General Pico, La Pampa. Modalidad Póster. Publicado en las Memorias de la VII Jornada de Ciencia y Técnica. 2011. ISSN: 1853-9750. Pág. 5.

- Ardoino SM, Baruta DA, Brandan JL, Mariani E, Oriani DS, Sosa R, Ducasse N, Boeris MA, Toso RE. Jornada de Ciencia y Técnica 2012: "Proyectar y comunicar estrategias para la investigación en la UNLPam". General Pico, La Pampa. 2012. ISBN: 978-950-863-178-7. Modalidad: Presentación oral del Proyecto: "Efecto antibacteriano de extractos vegetales de *Prosopis spp.* sobre *Brucella canis*".

- Ardoino SM, Boeris MA, Toso R. "Phytochemical study of *Prosopis flexuosa* dc. var. *depressa* ("alpataco") extract with against *Brucella canis*". RICiFa 2° Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas. Organizada por Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario y Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. Rosario, Argentina, 22 y 23 de Noviembre de 2012.

INDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	1
SUMMARY	3
INTRODUCCION GENERAL	5
BIBLIOGRAFIA GENERAL	10
OBJETIVOS	13

PARTE 1: Determinación del efecto antibacteriano de extractos vegetales contra *Brucella canis*. Comparación de resultados utilizando el método de dilución en placa versus el método de difusión en pocillos.

▪ <i>Introducción</i>	15
▪ <i>Objetivos</i>	18
▪ <i>Materiales y Métodos</i>	19
▪ <i>Resultados</i>	32
▪ <i>Discusión</i>	33
▪ <i>Conclusiones</i>	37
▪ <i>Bibliografía</i>	38

PARTE 2: Determinación del efecto antibacteriano de fracciones obtenidas en Soxhlet. Determinación de concentraciones inhibitorias mínimas

▪ <i>Introducción</i>	41
▪ <i>Objetivos</i>	45
▪ <i>Materiales y Métodos</i>	45
▪ <i>Resultados</i>	48
▪ <i>Discusión</i>	50
▪ <i>Conclusiones</i>	52
▪ <i>Bibliografía</i>	54

PARTE 3: Reacciones de caracterización fitoquímica de *Prosopis flexuosa* var. *depressa*

■ <i>Introducción</i>	57
■ <i>Objetivos</i>	60
■ <i>Materiales y Métodos</i>	60
■ <i>Resultados</i>	68
■ <i>Discusión</i>	71
■ <i>Conclusiones</i>	72
■ <i>Bibliografía</i>	73
CONCLUSIONES FINALES	76

INDICE DE FIGURAS, ESQUEMAS Y TABLAS

INTRODUCCIÓN

Fig. 1: Imagen microscópica de <i>Brucella canis</i> , coloración de Gram (100 x)	5
Fig. 2: Cultivo de <i>Brucella canis</i> en agar Mueller Hinton con agregado de 10% de sangre ovina.	6
Fig. 3: Cultivo de <i>Brucella canis</i> en agar Mueller Hinton con agregado de 10% de sangre ovina.	6
Fig. 4: Reacciones de caracterización de <i>Brucella canis</i> .	6

PARTE 1

Fig. 5: Extractos llevados a sequedad en rotavapor.	27
Fig. 6: Ensayo de inhibición del crecimiento bacteriano mediante la técnica de los pocillos.	31
Fig. 7: Inhibición del crecimiento bacteriano y crecimiento bacteriano normal.	33
Tabla 1: Especies recolectadas en la Provincia de La Pampa (Steibel y col., 2009) para realizar los estudios de efecto antimicrobiano contra <i>Brucella canis</i> .	20
Tabla 2: Evaluación de la actividad antimicrobiana contra <i>Brucella canis</i> de extractos metanólicos de <i>Artemisia verlotiorum</i> , <i>Clematis montevidensis</i> , <i>Mitracarpus megapotamicus</i> , <i>Muehlenbeckia sagittifolia</i> , <i>Polygonum hydropiperoides</i> , <i>Salix babilonica</i> y <i>Thymophylla pentachaeta</i> por el método de difusión en pocillos	32
Esquema 1: Procedimiento de obtención de los Extractos Metanólicos que fueron utilizados en los ensayos.	29

PARTE 2

Fig. 8: Obtención de distintas fracciones de cada planta con Soxhlet. **42**

Tabla 3: Efecto antimicrobiano contra *Brucella canis* de las diferentes fracciones obtenidas en Soxhlet con solventes de polaridad creciente de partes aéreas y corteza de *Prosopis flexuosa* var. *depressa*, partes aéreas de *Schinus fasciculatus*, partes aéreas y corteza de *Prosopis flexuosa* var. *flexuosa*, partes aéreas de *Solanum biflorum*, *Larrea nitida* y *Larrea cuneifolia* **48**

Tabla 4: Concentraciones Inhibitorias Mínimas de las fracciones que mostraron actividad antibacteriana **49**

Esquema 2: Extracción en Soxhlet. **46**

PARTE 3

Fig. 9: Reacción de Shinoda. **69**

Fig. 10: Reacción para determinación de lípidos. **69**

Fig. 11: Reacción con fenol. **70**

Fig. 12: Reacción de Kedde. **70**

Fig. 13: Reacción de Dragendorff. **71**

Fig. 14: Reacción de Ninhidrina. **71**

Tabla 5: Resultados de las reacciones de caracterización realizadas a la fracción metanólica de *Prosopis flexuosa* var. *depressa*. **68**

Esquema 3: Obtención de las fracciones A, B, C y D para realizar reacciones de caracterización de extractos de *Prosopis flexuosa* var. *depressa*. **61**

ABREVIATURAS

AGID	Agar Gel Inmuno Difusión
ANLIS	Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud
CIM	Concentración Inhibitoria Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CSR	Communicable Disease Surveillance and Response
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FDA	Food and Drug Administration
MTT	Bromuro de 3 - (4,5-dimetiltiazol-2-yl) - 2,5 difeniltetrazolio
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Polymerase Chain Reaction
RSAT	Rapid Slide Agglutination Test
SRFA	Santa Rosa Facultad de Agronomía
WHO	World Health Organization

ESTUDIO FITOQUÍMICO DE EXTRACTOS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA CONTRA *BRUCELLA CANIS* OBTENIDOS A PARTIR DE PLANTAS NATIVAS Y NATURALIZADAS DE LA PROVINCIA DE LA PAMPA, ARGENTINA

Palabras claves: brucelosis canina, *Prosopis flexuosa* var. *depressa*, farmacognosia, extractos vegetales, *Brucella canis*

RESUMEN

La brucelosis canina es una enfermedad infecciosa zoonótica causada por *Brucella canis*. La curación es difícil de lograr ya que tiene tendencia a las recidivas, requiriendo del sacrificio de los animales enfermos en los criaderos para eliminar la enfermedad. Los tratamientos están basados en combinaciones de drogas como tetraciclina, doxiciclina, minociclina y estreptomicina. Considerando la ineficacia de las drogas utilizadas en los tratamientos actuales, el objetivo de este trabajo consistió en investigar la posible presencia de efecto inhibitorio sobre *Brucella canis* en extractos vegetales obtenidos de plantas recolectadas en la Provincia de La Pampa. Las características de la enfermedad y el escaso éxito logrado con los tratamientos utilizados actualmente, llevó a pensar que las probabilidades de encontrar una o más plantas efectivas eran escasas. Más aún porque no existían estudios previos ni datos etnofarmacológicos que orientaran la búsqueda. Para aumentar las probabilidades de éxito se comenzó evaluando 164 especies recolectadas en la Provincia de La Pampa. Los trabajos en el laboratorio consistieron en seleccionar el método *in vitro* más adecuado para evaluar el efecto antimicrobiano ya que las variadas propiedades físico químicas y coloración de los extractos impedían la difusión en ágar y dificultaban la lectura de resultados.

Modificaciones en la técnica de Kirby Bauer permitieron seleccionar cinco especies vegetales. Posteriormente, utilizando Soxhlet y solventes de distinta polaridad se obtuvieron fracciones que fueron evaluadas en medios sólidos para determinar la CIM, seleccionando finalmente por su mayor acción antimicrobiana la fracción metanólica de *Prosopis flexuosa* var. *depressa*. Estudios fitoquímicos determinaron la presencia de saponinas, proteínas, lípidos, hidratos de carbono, flavonoides, taninos, sesquiterpenos y alcaloides. Los cuatro últimos mencionados fueron reportados por exhibir propiedades antimicrobianas. Estos resultados permiten pensar que la fracción metanólica de partes aéreas de *Prosopis flexuosa* var. *depressa* podría contener compuestos promisorios para emplear en el futuro en el tratamiento de la brucelosis canina.

**PHYTOCHEMICAL STUDY OF EXTRACTS WITH ANTIMICROBIAL
ACTIVITY AGAINST *BRUCELLA CANIS* OBTAINED FROM NATURALIZED AND
NATIVE PLANTS OF LA PAMPA, ARGENTINA**

Keywords: Canine Brucellosis, *Prosopis flexuosa* var. *depressa*, pharmacognosy, plants extracts, *Brucella canis*

SUMMARY

Canine brucellosis is a zoonotic infectious disease caused by *Brucella canis*. The cure is difficult to achieve because it has a tendency to relapse, requiring the slaughter of sick animals in hatcheries to eliminate the disease. Treatments are based on drugs combinations, such as tetracycline, doxycycline, minocycline and streptomycin. Considering the ineffectiveness of the drugs used in current treatments, the aim of this work was to investigate the possible presence of *Brucella canis* inhibitory effect on plants extracts from herbage collected in La Pampa Province. The characteristics of the disease and the low success achieved with updated treatments led to think that the odds of finding one or more effective plants was limited. More so because there were no previous studies or ethnopharmacologic information that would guide the search. To increase the chances of success we began evaluating 164 species collected in La Pampa Province. The laboratory work consisted in selecting the most suitable method in vitro to evaluate the antimicrobial effect as the varied chemical and physical properties and extract coloration impeded the agar diffusion and difficulties the reading results. Changes in the Kirby Bauer technique allowed selecting five plant species. Later on, using Soxhlet and different polarity solvents fractions were obtained that were evaluated on solid media to

determine the CIM selecting finally by the higher antimicrobial action methanolic fraction of *Prosopis flexuosa var. depressa*. Phytochemical studies determined the presence of saponins, proteins, lipids, carbohydrates, flavonoids, tannins, alkaloids and sesquiterpenes. The last four mentioned were reported because they exhibit antimicrobial properties. These results lead us to believe that the methanol fraction of aerial parts of *Prosopis flexuosa var. depressa* could contain promising compounds for the use in future for the treatment of canine brucellosis.

INTRODUCCIÓN GENERAL

La brucelosis canina causada por *Brucella canis* es una enfermedad infecciosa que causa problemas reproductivos, principalmente en los criaderos y además es una zoonosis (Center for Food Security & Public Health, 2009). El manejo de los perros infectados en los criaderos demanda mayor tiempo al personal, la curación es difícil de lograr y aumenta los costos operativos (Shin y Carmichael, 1999).

El agente etiológico *Brucella canis* es un cocobacilo Gram negativo intracelular (Figura 1).

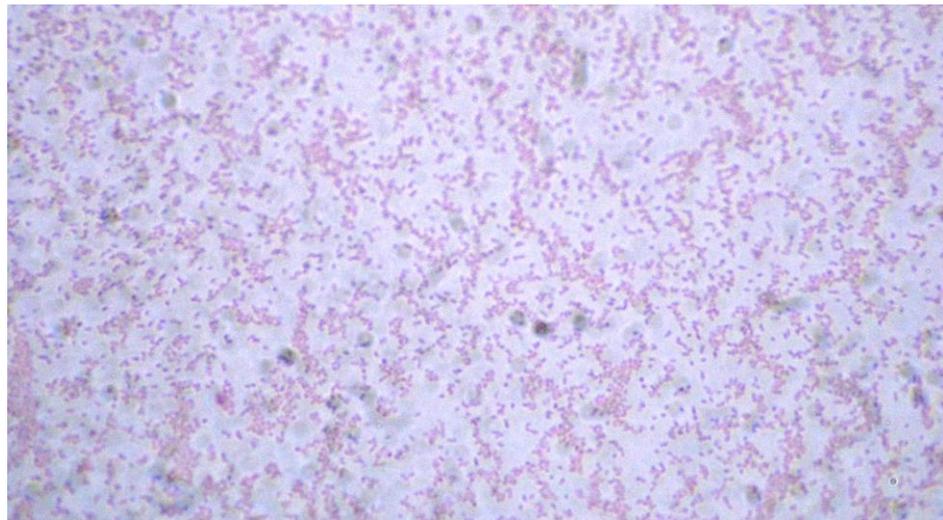


Fig. 1: Imagen microscópica de *Brucella canis*, coloración de Gram (100 x).

Los perros son su único huésped natural. Posee numerosos antígenos somáticos en común con otras especies del género *Brucella*, además de las que le confiere la naturaleza mucoide de la pared celular. Se desarrolla en aerobiosis en medios enriquecidos con sangre ovina. El crecimiento de las colonias se produce 48

a 72 horas después de la siembra a una temperatura de incubación de 37°C. Las colonias son pequeñas, de 1 a 5 mm, translúcidas y mucoides (Figuras 2 y 3).



Fig. 2



Fig. 3

Fig. 2 y 3: Cultivo de *Brucella canis* en agar Mueller Hinton con agregado de 10% de sangre ovina.

Brucella canis no requiere CO₂ para su desarrollo, no produce H₂S, produce ureasa, reduce los nitratos y es citrato negativo (Figura 4).



Fig. 4: Reacciones de caracterización de *Brucella canis*. 1: Nitrato positivo, 2: Urea positivo, 3: Citrato negativo.

La cepa internacional de referencia es la RM6-66 (Flores Castro y Carmichael, 1981).

La eliminación de la bacteria en la hembra preñada se produce a partir del feto, la placenta, los fluidos fetales y la descarga vaginal posterior al aborto. En la hembra no preñada en las descargas vaginales normales, sobre todo en el estro y también por la leche. Los machos infectados eliminan brucellas por semen uno o dos meses post infección, y luego intermitentemente por años (Borie y col., 2002). El microorganismo ingresa principalmente por ingestión, vía genital, oronasal y mucosa conjuntival. La enfermedad llega a los humanos a través de ingestión, o por mucosas o piel lesionada (Center for Food Security & Public Health, 2009)

La sintomatología es principalmente reproductiva (Shin y Carmichael, 1999). Los machos presentan epididimitis, dermatitis escrotal e infertilidad (Briseño González y col., 2004). Las lesiones incluyen degeneración testicular, discoespondilitis, artritis, azoospermia, dificultad para eyacular, baja concentración y baja motilidad espermática y eyaculado sanguinolento (Shin y Carmichael, 1999; Borie y col., 2002; Briseño Gonzalez y col., 2004; Miranda y col., 2005).

En las hembras el síntoma más prominente es el aborto después de los 45-55 días de gestación en el 75% de los casos. Ocasionalmente ocurre muerte embrionaria temprana y reabsorción (Shin y Carmichael, 1999).

El diagnóstico se realiza mediante pruebas serológicas: aglutinación rápida en placa o RSAT, inmunodifusión en gel de agar (AGID) y ELISA. También por hemocultivo o PCR para confirmar el diagnóstico (Shin y Carmichael, 1999; Center for Food Security & Public Health, 2009)

Los resultados más alentadores al aplicar tratamientos con antimicrobianos se obtuvieron con combinaciones de drogas tales como tetraciclina, doxiciclina, minociclina y estreptomicina (Shin y Carmichael, 1999; Hollet, 2006). Sin embargo la recrudescencia de la infección después de la cesación del tratamiento es común. Las mejores tasas de eliminación de la enfermedad en los criaderos se han obtenido mediante el sacrificio de los animales enfermos. Esta es la recomendación, sobre todo en reproductores de criaderos (Shin y Carmichael, 1999; Center for Food Security & Public Health, 2009).

En la medicina moderna las plantas tienen aplicaciones importantes que van mucho más allá de ser fuente directa de agentes terapéuticos. Actualmente el estudio de la estructura química de los principios activos de plantas utilizadas en la medicina folclórica puede servir de modelo para la elaboración de drogas sintéticas (Bermúdez y col., 2005). Se han publicado trabajos que incluyen estudios sobre la actividad antimicrobiana que presentan diversos extractos vegetales utilizando distintos solventes mostrando resultados alentadores, incluso frente a cepas de microorganismos multirresistentes (Khan y col., 2010; Salvat y col., 2004; Zampini y col., 2007). La identificación de los grupos químicos responsables del efecto antimicrobiano, tales como flavonoides, alcaloides, ácidos fenólicos, antocianinas y taninos, entre otros permiten especular sobre el potencial de algunas especies vegetales (Cisowska y col., 2011; Ozcelik y col., 2011). Aunque es difícil predecir la utilidad farmacológica de ellos, ya que no existe una buena correlatividad entre el comportamiento *in vitro* e *in vivo*, los miles de compuestos bioactivos que poseen las plantas hace que se contemple la posibilidad de hallar aquellos que la tengan.

Debe tenerse en cuenta para considerar seriamente esta especulación que más del 35 % de los medicamentos que se utilizan en la actualidad provienen de las plantas.

Teniendo en cuenta lo expuesto, se comenzó a investigar la posible presencia de actividad antimicrobiana contra *Brucella canis* en plantas recolectadas en la Provincia de La Pampa.

El objetivo del presente trabajo consistió en determinar el efecto inhibitorio sobre *Brucella canis* de extractos vegetales obtenidos de plantas recolectadas en la Provincia de La Pampa, seleccionando las especies vegetales con actividad antimicrobiana significativa y señalando los grupos químicos con potencial efecto mostrado en reportes contra otros microorganismos.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

1. Bermudez A, Oliveira-Miranda MA, Velazquez D. La Investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: Una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. *INCI* [online]. 2005, vol.30, n.8 [citado 2012-06-28], pp. 453-459. Disponible en: <http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442005000800005&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0378-1844.
2. Borie C, Cepeda R., Villarroel M, De Los Reyes M. Descripción de características reproductivas en tres perros seropositivos a *Brucella canis*. 2002. Arch. Med. Vet. 2002. 34:111-116.
3. Briseño González H, Páramo Ramírez RM, Flores Castro R, Suárez Güemes F. Problemas reproductivos en perros machos infectados con *Brucella canis*. 2004 Vet. Méx. 2004 35:121-128.
4. Center for Food Security & Public Health. Iowa State University. 2009. Canine Brucellosis: *Brucella canis*. http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/brucellosis_canis.pdf. Consultado el 20 mayo de 2010.
5. Cisowska A, Wojnicz D, Hendrich AB. Anthocyanins as antimicrobial agents of natural plant origin. Nat. Prod. Commun. 2011 6(1):149-56.

6. Hollet RB. Canine brucellosis: outbreaks and compliance. *Theriogenology*. 2006 66:575–587.
7. Khan R, Zakir M, Afaq S; Latif A, Khan A. Activity of solvent extracts of *Prosopis spicigera*, *Zingiber officinale* and *Trachyspermum ammi* against multidrug resistant bacterial and fungal Straits. *J. Infect. Dev. Ctries*. 2010. 4(5):292-300.
8. Miranda A, Cejas M, Báez E. *Brucella canis* en el perro: sintomatología más frecuente y relación con el diagnóstico de laboratorio. XXVI Sesión de Comunicaciones Científicas 2005. 85 Aniversario. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Nordeste. Presentación de Posters. Pág 66-67.
9. Ozçelik B, Kartal M, Orhan I. Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. *Pharm. Biol*. 2011 49(4):396-402.
10. Salvat A, Antonacci L, Fortunato R, Suarez E, Godoy H. Antimicrobial activity in methanolic extracts of several plant species from northern Argentina. *Phytomedicine*. 2004. 11(2-3):230-4.
11. Shin S, Carmichael L. Brucellosis canina causada por *Brucella canis*. En: *Recent Advances in Canine Infectious Diseases*. Carmichael, L. 1999. Ed. International Veterinary Information Service (www.ivis.org), Ithaca, New York,

USA. Traducido por C. Di Lorenzo y C. Gobello, Fac. De Ciencias Veterinarias, UNLP, Argentina. Documento on line: A0101.1199.ES. Consultado 20 de mayo de 2010.

12. Zampini I, Cudmani N, Isla M. Actividad antimicrobiana de plantas medicinales argentinas sobre bacterias antibiótico-resistentes. Acta Bioquím. Clín. Latinoam. 2007.41 (3): 385-93.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Realizar ensayos para determinar la presencia de efecto inhibitorio *in vitro* contra *Brucella canis* en plantas nativas y naturalizadas de la Provincia de La Pampa.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Comparar la actividad antimicrobiana contra *Brucella canis* de extractos vegetales de plantas nativas y naturalizadas de la Provincia de La Pampa.
- Seleccionar entre el método de difusión en pocillos y el método de dilución en placa cuál es el más adecuado para evaluar extractos vegetales con variadas propiedades físico químicas.
- Seleccionar la/s planta/s que muestre/n mayor efecto antimicrobiano contra *Brucella canis*.
- Obtener fracciones de extractos de *Schinus fasciculatus*, *Solanum biflorum*, *Larrea nitida*, *Prosopis flexuosa var. depressa*, *Prosopis flexuosa var. flexuosa* y *Larrea cuneifolia* con solventes de polaridad creciente.
- Emplear el método de dilución seriada para determinar la Concentración Inhibitoria Mínima de cada una de las fracciones de extracto obtenidas.
- Seleccionar las fracciones con efecto antimicrobiano sobre *Brucella canis*.

- Realizar estudios fitoquímicos a partes aéreas de *Prosopis flexuosa* var. *depressa*.
- Señalar, utilizando referencias bibliográficas, grupos químicos que podrían contener compuestos con actividad antimicrobiana y que podrían ser objeto de estudios posteriores para orientar ensayos tendientes a aislar e identificar el o los principio/s activo/s responsables de la actividad contra *Brucella canis*.

PARTE 1

DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DE EXTRACTOS VEGETALES CONTRA *BRUCELLA CANIS*. COMPARACIÓN DE RESULTADOS UTILIZANDO EL MÉTODO DE DILUCIÓN EN PLACA VERSUS EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN POCILLOS

INTRODUCCIÓN

En los últimos 50 años las investigaciones sobre la actividad antimicrobiana de los extractos vegetales han tenido un importante incremento. Los estudios se basan en conocimientos obtenidos de la medicina tradicional, screenings al azar de las plantas que crecen en determinadas regiones, bioensayos orientados a determinar la actividad sobre un microorganismo específico y aislamiento e identificación de los metabolitos secundarios responsables de la actividad antimicrobiana (Ríos y Recio, 2005).

Los métodos tradicionales que se emplean para evaluar la actividad antimicrobiana permiten valorar nuevos agentes antimicrobianos (Cona, 2002). Estos mismos métodos pueden utilizarse para determinar la actividad contra determinados microorganismos de extractos vegetales.

La susceptibilidad antimicrobiana se evalúa utilizando antibiogramas. El método estándar emplea los discos de Kirby Bauer, descrito por primera vez en 1966 (Bauer y col., 1966). Este método es ampliamente usado y está totalmente aceptado por la comunidad científica. Con el correr del tiempo se han realizado

diferentes estudios con la finalidad de facilitar la lectura de los resultados, introduciendo modificaciones en la forma de iluminar las placas o medir los halos de inhibición (Barry y col., 1979). El método es el recomendado por organismos de referencia tales como la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), quienes de manera rutinaria publican los protocolos para el desarrollo de estas pruebas, los cuales son seguidos en todo el mundo (Ministerio de Salud, 2001; OMS, 2003; CLSI, 2013).

En los manuales se describen diferentes maneras de desarrollar los antibiogramas para estos organismos, como técnicas de difusión y de dilución. La actividad antimicrobiana de los extractos vegetales se evalúa empleando estos métodos y sus modificaciones, introducidas por distintos autores para tratar de superar inconvenientes surgidos en esta práctica en especial. Por ejemplo, las características físico químicas propias de cada extracto vegetal en particular.

Los métodos descritos para la evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos vegetales incluyen la difusión en discos (Nostro y col., 2000; Boyanova y col., 2005), difusión en pocillos (Boyanova y col., 2005), dilución en agar (Valsaraj y col., 1997; Boyanova y col., 2005; Gende y col., 2008; Corzo y col., 2009) y dilución en medios líquidos (Gende y col., 2008).

Para la realización de los métodos de difusión en discos y en pocillos y para el de dilución en agar, el medio de elección es el agar Mueller Hinton. Recomendado para estas pruebas por la OMS, FDA y CLSI, debido a su alta reproducibilidad, el

bajo contenido de sustancias inhibidoras y a que la mayoría de los microorganismos presentan un buen crecimiento (Smail, 2000; Cona, 2002). Además, es el único validado por el CLSI para pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos (OMS, 2003). En el caso de *Brucella canis* se adiciona a este medio un 10% de sangre ovina para satisfacer los requerimientos de este microorganismo.

Para ajustar la densidad del inóculo para estas pruebas de sensibilidad se utilizó un estándar de turbidez de BaSO₄ equivalente a un estándar de McFarland de 0.5. Como cepa de referencia en este trabajo de tesis se empleó *Brucella canis* RM6/66, ya que es la cepa internacional de referencia.

La siembra del inóculo bacteriano se realiza por rayado con tórula sobre toda la superficie, rayando dos o tres veces y rotando la placa aproximadamente 60° cada vez, para distribuir en forma pareja el inóculo (Smail, 2000; Cona, 2002; OMS, 2003).

Los discos de agente antimicrobiano, utilizados como control deben colocarse en la placa no más de 15 minutos post-inoculación, con pinza estéril, haciendo suave presión sobre el agar. El antimicrobiano empleado como control es la minociclina, compuesto que ha demostrado en ensayos de Concentración Inhibitoria Mínima ser el más activo contra *Brucella canis* (Mateu-de-Antonio y Martín, 1995).

La interpretación de los resultados de las pruebas de inhibición en disco o en pocillo se basa en la comparación de la zona de inhibición del extracto con la

producida por el antibiótico testigo. Para la interpretación de la zona de inhibición del antibiótico testigo se consideran las tablas de CLSI actualizadas (Smail, 2000).

Las pruebas de evaluación de la actividad antimicrobiana por dilución en medio sólido implican la incorporación del agente antimicrobiano a evaluar. En el caso de extractos vegetales se incorpora en el agar, y posteriormente se realiza la siembra. Este método también permite trabajar con diluciones y sus resultados se consideran lo suficientemente confiables para la determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (OIE, 2008). Los resultados surgen de la observación directa de presencia o ausencia de crecimiento bacteriano (Corzo y col., 2009).

El material vegetal debe ser procesado hasta obtener un producto que se pueda utilizar en alguno de los métodos mencionados anteriormente. Se describen procesos de obtención de extractos vegetales, tales como infusiones, decocciones y tinturas de acuerdo a las normas de la Farmacopea Argentina (Corzo y col., 2009). Otros autores citan la extracción con solventes de polaridad creciente (Nostro y col., 2000), la extracción con etanol seguida de secado y liofilización (Valsaraj y col., 1997) y la extracción con metanol (Jyothi y Seshagiri, 2012).

OBJETIVOS

- Comparar la actividad antimicrobiana contra *Brucella canis* de extractos vegetales de plantas nativas y naturalizadas de la Provincia de La Pampa.

- Seleccionar entre el método de difusión en pocillos y el método de dilución en placa el más adecuado para evaluar extractos vegetales con variadas propiedades físico químicas.
- Seleccionar la/s planta/s que muestre/n mayor efecto antimicrobiano para realizar estudios fitoquímicos que determinen la presencia grupos químicos bioactivos contra *Brucella canis*.
- Señalar, utilizando referencias bibliográficas, grupos químicos que podrían contener compuestos con actividad antimicrobiana y que podrían ser objeto de estudios posteriores para orientar ensayos tendientes a aislar e identificar el o los principio/s activo/s responsables de la actividad contra *Brucella canis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección y acondicionamiento del material vegetal

Se realizaron expediciones en distintas épocas del año para recolectar partes aéreas de 164 plantas nativas y naturalizadas que crecen en forma espontánea en la Provincia de La Pampa (Tabla 1). El material vegetal fue identificado por los Ing. Agrónomos Pedro Eduardo Steibel y Héctor Troiani, docentes de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de La Pampa. Un ejemplar de cada planta fue depositado en el Herbario de la Facultad de Agronomía (SRFA).

Las muestras recolectadas fueron secadas en estufa por corriente de aire a 45 °C y examinadas para verificar que estuvieran libres de contaminantes. Fueron conservadas en bolsas individuales hasta el momento de preparar los extractos.

Tabla 1: especies recolectadas en la Provincia de La Pampa (Steibel y col., 2009) para realizar los estudios de efecto antimicrobiano contra *Brucella canis*.

Nombre Científico	Nombre Vulgar	Familia
<i>Acaena myriophylla</i>	Cadillo	Rosaceae
<i>Acantholippia seriphioides</i>	Tomillo	Verbenaceae
<i>Acmella decumbens</i>	Nim-Nim	Asteraceae
<i>Acroptilon repens</i>	Abrepuño perenne	Asteraceae
<i>Ailanthus altissima</i>	Árbol del cielo	Simaroubaceae
<i>Allenrolfea patagonica</i>	Jume - Jumecito - Jume negro	Chenopodiaceae
<i>Aloysia gratissima</i>	Azahar del monte-Usillo	Verbenaceae
<i>Aloysia polistachya</i>	Té del burro	Verbenaceae
<i>Alternanthera philoxeroides</i>	Lagunilla	Amaranthaceae
<i>Alternanthera pungens</i>	Yerba del pollo	Amaranthaceae
<i>Amaranthus quitensis</i>	Yuyo colorado	Amaranthaceae
<i>Amaranthus standleyanus</i>	Yuyo colorado	Amaranthaceae
<i>Anredera cordifolia</i>	Brotal-Enredadera de papa	Basellaceae
<i>Anthemis cotula</i>	Manzanilla - Manzanilla amarga	Asteraceae
<i>Araujia hortorum</i>	Tasi	Apocynaceae
<i>Artemisia verlotiorum</i>	Yuyo de San Vicente, Ajenjo	Asteraceae
<i>Artemisia annua</i>	Altamisa anual	Asteraceae
<i>Arundo donax</i>	Caña de Castilla-Caña hueca	Poaceae
<i>Atriplex lampa</i>	Zampa	Chenopodiaceae
<i>Atriplex undulada</i>	Zampa crespá	Chenopodiaceae
<i>Baccharis articulata</i>	Carquejilla	Asteraceae
<i>Baccharis crispa</i>	Carqueja	Asteraceae
<i>Baccharis darwinii</i>	Chilquilla	Asteraceae

Nombre Científico	Nombre Vulgar	Familia
<i>Baccharis pingraea</i>	Chilquilla	Asteraceae
<i>Baccharis salicifolia</i>	Chilca Blanca	Asteraceae
<i>Baccharis spartioides</i>	Pichana	Asteraceae
<i>Bauhinia forficata</i>	Pata de vaca	Fabaceae
<i>Berberis ruscifolia</i>	Espina amarilla-Quebrachillo	Berberidaceae
<i>Bidens subalternans</i>	Saetilla, Amor seco	Asteraceae
<i>Caesalpinia gilliesii</i>	Barba de chivo	Fabaceae
<i>Capparis atamisquea</i>	Atamisque	Capparaceae
<i>Capsella bursa pastoris</i>	Bolsita del pastor	Brassicaceae
<i>Centaurea solstitialis</i>	Abrepuño amarillo	Asteraceae
<i>Cercidium praecox</i>	Brea-Chañar brea	Fabaceae
<i>Cestrum parqui</i>	Palqui-Duraznillo negro	Solanaceae
<i>Chaptalia sinuata</i>	Lengua de vaca - Yerba de San Juan	Asteraceae
<i>Chenopodium album</i>	Quinoa, Yuyo blanco, Yuyo colorado	Chenopodiaceae
<i>Chenopodium ambrosioides</i>	Hierba hedionda, Paico macho, Payco	Chenopodiaceae
<i>Chenopodium multifidon</i>	Paico, Paico hembra	Chenopodiaceae
<i>Cichorium intybus</i>	Achicoria – Radicheta	Asteraceae
<i>Clematis montevidensis</i>	Barba de viejo	Ranunculaceae
<i>Commelina erecta</i>	Flor de Santa Lucía	Commelinaceae
<i>Condalia microphylla</i>	Pimpillin - Piquillin - Yuá paraguay	Rhamnaceae
<i>Conyza albida</i>	Yerba carnícera-Rama negra	Asteraceae
<i>Conyza bonariensis</i>	Mata negra - Yuyo moro - Vira vira - Rama negra	Asteraceae
<i>Cortaderia selloana</i>	Cortadera, Yerba de las pampas	Poaceae
<i>Cucurbita maxima</i>	Zapallo	Cucurbitaceae
<i>Cyclolepis genistoides</i>	Matorro - Palo azul	Asteraceae

Nombre Científico	Nombre Vulgar	Familia
<i>Cyperus rotundus</i>	Junco - Pírí íbabó íacabaé	Cyperaceae
<i>Datura ferox</i>	Chamico	Solanaceae
<i>Discaria americana</i>	Brusquilla	Rhamnaceae
<i>Eleusine indica</i>	Gramma carraspera	Poaceae
<i>Elionurus muticus</i>	Espartillo amargo	Poaceae
<i>Ephedra ochreatea</i>	Solupe	Ephedraceae
<i>Ephedra triandra</i>	Tramontana	Ephedraceae
<i>Equisetum giganteum</i>	Cabayú rugúai - Cola de caballo	Equisetaceae
<i>Eragrostis pilosa</i>	Pasto ilusión	Poaceae
<i>Eruca vesicaria</i>	Rúcula – Roqueta	Brassicaceae
<i>Eryngium paniculatum</i>	Cardoncillo – Chupalla	Apiaceae
<i>Erythrina crista-galli</i>	Ceibo – Seibo	Fabaceae
<i>Eucalyptus cinerea</i>	Eucalipto dólar-Eucalipto medicinal	Myrtaceae
<i>Euphorbia helioscopia</i>	Lechetrezna, Tornagallos	Euphorbiaceae
<i>Euphorbia schickendantzii</i>	Pichoa	Euphorbiaceae
<i>Flaveria bidentis</i>	Contrayerba	Asteraceae
<i>Foeniculum vulgare</i>	Hinojo silvestre	Apiaceae
<i>Gamochoaeta coarctata</i>	Vira-vira	Asteraceae
<i>Geoffroea decorticans</i>	Chañar	Fabaceae
<i>Geranium molle</i>	Geranio silvestre	Geraniaceae
<i>Glandularia crithmifolia</i>	Bichicho - Té de burro	Verbenaceae
<i>Glycyrrhiza astragalina</i>	Orozu - Locancia - Culensillo – Triaca – Regaliz silvestre	Fabaceae
<i>Gnaphalium gaudichaudianum</i>	Caá Guazú - Marcelita - Vira Vira	Asteraceae
<i>Gomphrena martiana</i>	Amaranto globoso	Amaranthaceae

Nombre Científico	Nombre Vulgar	Familia
<i>Grindelia chilensis</i>	Botón de oro	Asteraceae
<i>Hedeoma multiflora</i>	Mentita	Lamiaceae
<i>Heliotropium curassavicum</i>	Cola de gama	Boraginaceae
<i>Hydrocotyle bonariensis</i>	Redondita de agua-Oreja de negro Acaricobá – Perejil del agua – Verdolaga Palustre	Apiaceae
<i>Ibicella lutea</i>	Cuernos del diablo	Martyniaceae
<i>Jodina rhombifolia</i>	Quebracho flojo	Santalaceae
<i>Larrea cuneifolia</i>	Jarilla macho	Zygophyllaceae
<i>Larrea divaricata</i>	Jarilla	Zygophyllaceae
<i>Larrea nítida</i>	Jarilla crespá	Zygophyllaceae
<i>Limonium brasiliense</i>	Guaycururú	Plumbaginaceae
<i>Lippia turbinata</i>	Poleo	Verbenaceae
<i>Malvella leprosa</i>	Malvisco amarillo	Malvaceae
<i>Morus alba</i>	Morera blanca	Moraceae
<i>Margyricarpus pinnatus</i>	Perilla	Rosaceae
<i>Marrubium vulgare</i>	Malvarrubia, Yuyo del sapo	Lamiaceae
<i>Maytenus vitis idaea</i>	Carne gorda-Chaplán	Celastraceae
<i>Melia azedarach</i>	Paraíso, Cinamomo	Meliaceae
<i>Melilotus Albus</i>	Trébol de olor blanco	Fabaceae
<i>Mirabilis jalapa</i>	Dondiego de noche	Nyctaginaceae
<i>Mitracarpus megapotamicus</i>	Peladilla	Rubiaceae
<i>Monnina dictyocarpa</i>	Quelén	Polygalaceae
<i>Monttea aphylla</i>	Ala - Ala de loro - Mata de sebo	Plantaginaceae
<i>Morrenia odorata</i>	Tasi	Asclepiadaceae
<i>Muehlenbeckia sagittifolia</i>	Zarzaparrilla colorada	Polygonaceae

Nombre Científico	Nombre Vulgar	Familia
<i>Nicotiana glauca</i>	Palán palán	Solanaceae
<i>Oenothera grandiflora</i>	Don Diego de noche	Onagraceae
<i>Parietaria debilis</i>	Caá piquí-Yuyo fresco	Urticaceae
<i>Parkinsonia aculeata</i>	Cina-cina	Fabaceae
<i>Parthenium hysterophorus</i>	Artemisia - Sandiárogûé mirí	Asteraceae
<i>Pasiflora caerulea</i>	Granadilla - Mburucuyá - Pasionaria	Passifloraceae
<i>Phragmites australis</i>	Carrizo	Poaceae
<i>Phyla canescens</i>	Yerba del pajarito	Verbenaceae
<i>Physalis viscosa</i>	Camambú - Kaité mirí	Solanaceae
<i>Pitraea cuneato-ovata</i>	Papilla	Verbenaceae
<i>Plantago lanceolata</i>	Llantén, Siete venas	Plantaginaceae
<i>Pluchea sagittalis</i>	Yuyo lucero-Lucera	Asteraceae
<i>Polygonum aviculare</i>	Cien nudos - Sanguinaria siete sangrías – Poligonum	Polygonaceae
<i>Polygonum hydropiperoides</i>	Poligonum	Polygonaceae
<i>Polygonum lapathifolium</i>	Pimienta de agua	Polygonaceae
<i>Portulaca grandiflora</i>	Flor de seda – Verdolaga	Portulacaceae
<i>Prosopis alata</i>	Alpataco	Fabaceae
<i>Prosopis flexuosa</i> var. <i>depressa</i>	Alpataco	Fabaceae
<i>Prosopis flexuosa</i> var. <i>flexuosa</i>	Algarrobo	Fabaceae
<i>Prosopis strombulifera</i>	Retortuño	Fabaceae
<i>Rhynchosia senna</i>	Sen del zorro; Porotillo	Fabaceae
<i>Rosa rubiginosa</i>	Rosa mosqueta	Rosaceae
<i>Rumex crispus</i>	Lengua de vaca – Romasa	Polygonaceae
<i>Ruta chalepensis</i>	Ruda	Rutaceae

Nombre Científico	Nombre Vulgar	Familia
<i>Salix alba</i>	Sauce blanco	Salicaceae
<i>Salix babilónica</i>	Sauce llorón	Salicaceae
<i>Salix fragilis</i>	Sauce mimbre - Mimbre negro	Salicaceae
<i>Salix humboldtiana</i>	Sarandi – Sauce	Salicaceae
<i>Salpichroa origanifolia</i>	Uvita del campo, Huevo de gallo	Solanaceae
<i>Salsola kali</i>	Cardo ruso	Chenopodiaceae
<i>Sarcocornia perennis</i>	Lanzarote	Chenopodiaceae
<i>Schinus freira</i>	Aguará ibá guazú-Aguaribay	Anacardiaceae
<i>Schinus fasciculatus</i>	Molle	Anacardiaceae
<i>Schinus johnstonii</i>	Molle blanco	Anacardiaceae
<i>Schizachyrium condensatum</i>	Paja de techar	Poaceae
<i>Schoenoplectus californicus</i>	Junco de laguna	Cyperaceae
<i>Schkurhia pinnata</i>	Matapulgas	Asteraceae
<i>Senecio filaginoides</i>	Mata mora	Asteraceae
<i>Senecio pinnatus</i>	Flor amarilla	Asteraceae
<i>Senna aphylla</i>	Pichana - Retamilla - Escoba dura – Cabello de indio	Fabaceae
<i>Solanum diflorum</i>	Tomatillo	Solanaceae
<i>Solanum elaeagnifolium</i>	Revienta caballos	Solanaceae
<i>Solidago chilensis</i>	Vara de oro, Romerillo amarillo	Asteraceae
<i>Sonchus oleraceus</i>	Cerraja	Asteraceae
<i>Sphaeralcea crispa</i>	Malvisco	Malvaceae
<i>Sphaeralcea mendocina</i>	Malvisco	Malvaceae
<i>Sphaeralcea bonariensis</i>	Malvisco	Malvaceae
<i>Stellaria pallida</i>	Capiquí	Caryophyllaceae
<i>Suaeda divaricata</i>	Vidriera	Chenopodiaceae

Nombre Científico	Nombre Vulgar	Familia
<i>Tamarix gallica</i>	Tamarisco	Tamaricaceae
<i>Taraxacum officinale</i>	Amargón-Diente de león - Achicoria	Asteraceae
<i>Tessaria absinthioides</i>	Pájaro bobo	Asteraceae
<i>Thelesperma megapotamicum</i>	Té Pampa	Asteraceae
<i>Thymophylla pentachaeta</i>	Yerba amarilla	Asteraceae
<i>Tribulus terrestris</i>	Roseta francesa	Zygophyllaceae
<i>Trichocline sinuata</i>	Arnica del campo	Asteraceae
<i>Typha dominguensis</i>	Totora	Typhaceae
<i>Typha latifolia</i>	Totora	Typhaceae
<i>Urtica urens</i>	Ortiga chica – Pyno	Urticaceae
<i>Verbascum thapsus</i>	Oreja de cordero - Tabaco indio – Caballo del diablo - Paño	Scrophulariaceae
<i>Verbena bonariensis</i>	Berbena yaba – Taperibá mir	Verbenaceae
<i>Verbena litorales</i>	Verbena del litoral-Yerba del acero	Verbenaceae
<i>Verbesina encelioides</i>	Girasolcito - Mirasolito de campo	Asteraceae
<i>Vinca major</i>	Vinca	Apocynaceae
<i>Viola odorata</i>	Violeta	Violaceae
<i>Xanthium cavanillesii</i>	Abrojo grande	Asteraceae
<i>Xanthium spinosum</i>	Abrojo-Cepa caballo – Clonqui	Asteraceae
<i>Zea mays</i>	Maíz	Poaceae

Obtención de Extractos Metanólicos

Se maceraron 20 g de partes aéreas trituradas de la planta en 100 mL de una solución etanol : agua (1:1, v/v) durante 24 h (3x). Los Extractos Hidroalcohólicos se juntaron y fueron llevados a sequedad en rotavapor a una temperatura de 70°C. Los extractos secos se retomaron con 200 mL de metanol (3X). Se juntaron los extractos y llevaron a sequedad en rotavapor a 70°C obteniendo los Extractos Metanólicos Desecados (Figura 5). Estos extractos desecados se conservaron a – 20°C hasta el momento de realizar los ensayos.

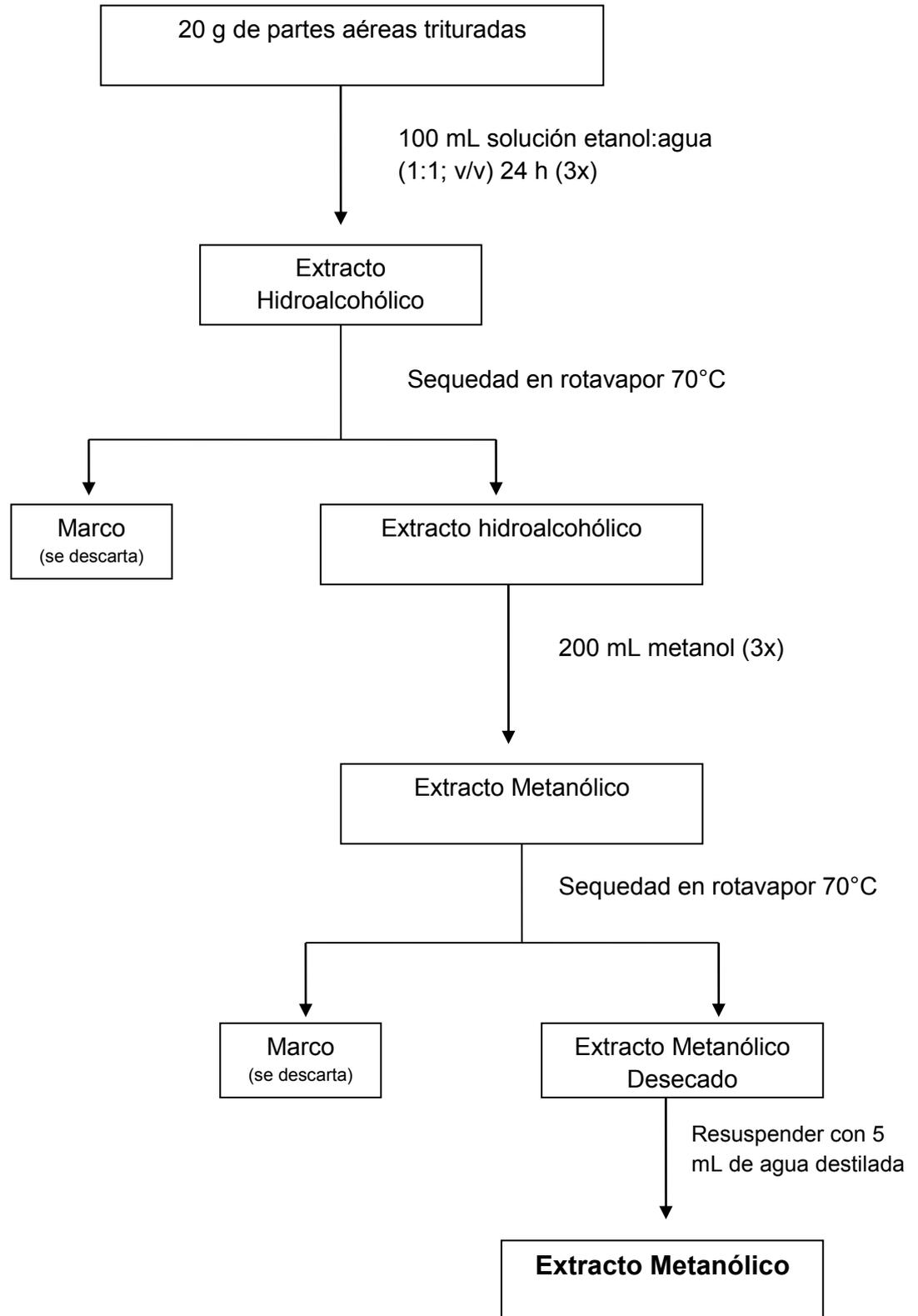


Fig 5: Extractos llevados a sequedad en rotavapor. Nota: la innovación que se muestra en esta Figura consiste en el adaptador para desecar en frasco ampolla de 50 mL alícuotas correspondientes al extracto hidroalcohólico proveniente de 20 g de partes aéreas secas de cada planta. Estos extractos fueron resuspendidos en metanol y desecados utilizando el mismo adaptador en frasco ampollas de 10 mL para obtener el Extracto Metanólico Desechado.

Antes de los ensayos, los Extractos Metanólicos Desecados correspondientes al extracto obtenido a partir de 4 g de partes aéreas secas se resuspendieron en un volumen total de 5 mL de agua destilada estéril obteniendo el Extracto Metanólico (Esquema 1).

Obtención de la cepa de referencia

La cepa de *Brucella canis* RM6/66 utilizada para la determinación del efecto antibacteriano fue provista por el Sector Brucelosis del Área de Bacteriología del Instituto de Patobiología del INTA-CICVyA-Castelar.



Esquema 1: Procedimiento de obtención de los Extractos Metanólicos que fueron utilizados en los ensayos.

Evaluación del efecto antimicrobiano contra *Brucella canis* por el método de difusión en pocillos.

La actividad antimicrobiana se evaluó empleando el método de Kirby Bauer (OMS, 2003) modificada. La modificación consistió en reemplazar los discos de papel por pocillos perforados en el agar en los cuales se depositó el Extracto Metanólico a ensayar, de acuerdo a la metodología descrita por Ahmad (1998).

Los medios de cultivo fueron preparados colocando 20 mL de agar Mueller Hinton (Britania B02-137-05) en placas de Petri de 100 mm de diámetro. Las placas fueron sembradas con una suspensión bacteriana de *Brucella canis* en solución fisiológica estéril correspondiente a 0,5 en la escala de Mc Farland (OMS, 2003). En cada placa de agar se perforaron 6 pocillos periféricos de 6 mm de diámetro. En cada pocillo se colocaron 60 μ L de cada Extracto Metanólico a ensayar. En la parte central de la placa se colocó un disco de 30 μ g de minociclina (Britania B1139727) como control (Figura 6). Las placas fueron incubadas en estufa a 37°C durante 48 h y se realizó la lectura de los halos de inhibición midiendo el diámetro, incluyendo el pocillo. Se hicieron cuatro repeticiones de cada ensayo.

Evaluación del efecto antimicrobiano por el método de dilución en placa

Las pruebas de actividad antimicrobiana se realizaron sobre placas de Petri de 60 mm de diámetro con 10 mL de agar Mueller Hinton (Britania B02-137-05) con sangre ovina al 10% a la que se le adicionaron 100 μ L de extracto por placa obteniendo una concentración del extracto en la placa de 1/100. Cada placa se sembró con una suspensión bacteriana de *Brucella canis* en solución fisiológica estéril correspondiente al 0,5 en la escala de McFarland. Además se sembraron dos

placas control sin extracto para verificar crecimiento y dos placas control con disco de antibiótico minociclina 30 μ g (Britania B1139727) para verificar inhibición del crecimiento. Se incubó en estufa a 37°C durante 48 horas y se realizó la lectura de la presencia o no de crecimiento bacteriano en las placas. En las placas en que se observó inhibición del crecimiento se realizó una ansada y tinción a fin de verificar la ausencia de crecimiento bacteriano. Se realizaron cuatro repeticiones de cada extracto.



Fig. 6: Ensayo de inhibición del crecimiento bacteriano mediante la técnica de los pocillos. Los extractos marcados como 81 y 14, que corresponden a las especies *Mitracarpus megapotamicus* y *Salix babilonica* respectivamente, muestran halos de inhibición similares al de la minociclina.

RESULTADOS

En la evaluación de la actividad antimicrobiana contra *Brucella canis* de los extractos por el método de difusión en pocillos se observaron halos de inhibición comparables a los obtenidos por la minociclina con los siguientes extractos: *Artemisia verlotiorum*, *Clematis montevidensis*, *Mitracarpus megapotamicus*, *Muehlenbeckia sagittifolia*, *Polygonum hydropiperoides*, *Salix babilonica* y *Thymophylla pentachaeta* (Tabla 2).

TABLA 2: Evaluación de la actividad antimicrobiana contra *Brucella canis* de extractos metanólicos de *Artemisia verlotiorum*, *Clematis montevidensis*, *Mitracarpus megapotamicus*, *Muehlenbeckia sagittifolia*, *Polygonum hydropiperoides*, *Salix babilonica* y *Thymophylla pentachaeta* por el método de difusión en pocillos

Especie vegetal	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	Media ± DS
<i>Artemisia verlotiorum</i>	34	20	24	25	25,75 ± 5.90 ns
<i>Clematis montevidensis</i>	20	20	18	24	20,5 ± 2.51 ns
<i>Mitracarpus megapotamicus</i>	25	20	24	30	24,75 ± 4.11 ns
<i>Muehlenbeckia sagittifolia</i>	22	16	22	30	22,5 ± 5.74 ns
<i>Polygonum hydropiperoides</i>	24	20	24	28	24 ± 3.26 ns
<i>Salix babilónica</i>	20	18	20	24	20,5 ± 2.51 ns
<i>Thymophylla pentachaeta</i>	24	20	25	24	23,25 ± 2.21 ns
Minociclina	34	25	23	23	26,25 ± 5.25

Ref: Ensayo 1 – 4: número de repeticiones por cada extracto. Los números expresan los halos de inhibición en mm de las especies vegetales que igualaron o superaron una media de 20 mm Test “t” de Student: ($p \leq 0,05$, $n=4$) Ref. ns: no significativo.

En los ensayos para evaluar la actividad antimicrobiana contra *Brucella canis* por el método de dilución en agar, los Extractos Metanólicos que produjeron inhibición total del crecimiento bacteriano en las cuatro repeticiones fueron los correspondientes a las especies vegetales: *Schinus fasciculatus* (Figura 7), *Solanum biflorum*, *Larrea nítida*, *Prosopis flexuosa* var. *depressa*, *Prosopis flexuosa* var. *flexuosa* y *Larrea cuneifolia*. Los Extractos Metanólicos que permitieron un crecimiento bacteriano incompleto, fueron los correspondientes a las siguientes especies vegetales: *Clematis montevidensis*, *Salix babilonica*, *Euphorbia peplus*, *Poligonum hydropiperoides*, *Mitracarpus megapotamicus*, *Oenothera grandifolia*, *Ailanthus altissima* y *Tamarix gallica*.

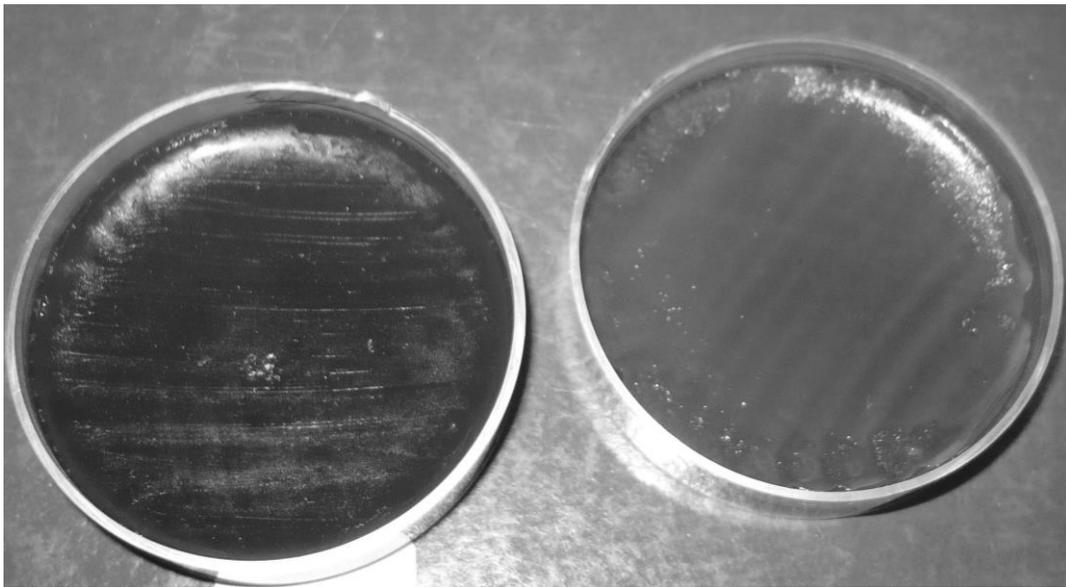


Fig. 7: inhibición del crecimiento bacteriano a la izquierda, correspondiente a *Schinus fasciculatus*, y crecimiento bacteriano normal a la derecha.

DISCUSIÓN

Como ya se ha mencionado anteriormente existen una variedad de pruebas para determinar la actividad antimicrobiana de distintos compuestos, generalmente utilizados para evaluar antibióticos. El factor clave de ellos radica en que a través de la estandarización y homologación de las diferentes metodologías es posible repetir, comparar y validar los resultados obtenidos (OIE, 2008).

La técnica original de Kirby Bauer que utiliza discos de papel, fue reemplazada por el método de difusión de pocillos (Ahmad y col., 1998). En este caso se modificó el tamaño de los pocillos a 6 mm para que cada uno pudiera alojar 60 μ L de cada extracto, y se utilizó Agar Mueller Hinton con sangre ovina al 10%, el cual es más adecuado para el cultivo de *Brucella canis*.

Se observó que algunos extractos permitían determinar claramente hasta que punto del agar difundían, mientras que en otros, la coloración de los mismos dificultaba la lectura. También se observó que algunos extractos no difundían, hecho que hacía dudar de la interpretación de los resultados al no poder distinguir entre efecto inhibitorio negativo con una escasa o nula difusión.

El método Kirby Bauer permite las interpretaciones de resultados mediante la comparación con una tabla patrón debido a que son conocidas y controladas las variables que influyen sobre el mismo. Por ejemplo, la concentración de la droga en el disco, la sensibilidad de la bacteria, la composición y volumen del medio, el tiempo y la temperatura de incubación, el coeficiente de difusión de la droga en el agar y la concentración del inóculo bacteriano (Bauer y col., 1966). Con la metodología aplicada en estos ensayos fue posible controlar las variables referidas al medio de cultivo, las condiciones de incubación y el inóculo bacteriano, en tanto que resultan

desconocidas algunas propiedades del extracto, como por ejemplo, el coeficiente de difusión.

En el caso de utilizar los métodos de pocillos o discos surgen cuestiones a tener en cuenta en el momento de medir e interpretar la zona de inhibición. En el caso de *Brucella canis*, donde se adiciona sangre al medio de cultivo y las colonias son muy pequeñas, la medición debe hacerse con luz reflejada, sobre la superficie de la placa, sin la tapa. La medición se hace con regla tomando el diámetro del halo, incluyendo el pocillo o el disco (Barry y col., 1979). Otras dificultades para la lectura surgen de la propia naturaleza de los extractos, como por ejemplo su coloración o turbidez, lo que dificulta la interpretación de los resultados.

Esta situación generó interrogantes acerca de la influencia de la composición química del extracto sobre la difusión en el agar, ya que podría interferir en la interpretación del tamaño del halo. Esta circunstancia podría llevar a conclusiones erróneas, ocasionado el descarte de algún extracto que produjera inhibición, pero que fuera enmascarada por un coeficiente de difusión bajo. Para minimizar este efecto se decidió seleccionar los Extractos Metanólicos que produjeron un halo o una media de inhibición igual o mayor a 20 mm, aún cuando el producido por la minociclina usada como droga testigo, fuera de 26,25 mm (Tabla 2).

Utilizando este criterio de aceptación para los extractos, se observaron discrepancias en los resultados al realizar los ensayos de inhibición de la actividad antimicrobiana mediante la técnica de dilución en agar.

De los extractos ensayados por el método de difusión en pocillos tanto *Schinus fasciculatus* como *Solanum biflorum* no habían desarrollado halo de

inhibición comparable al de la minociclina. Tampoco habían demostrado resultados promisorios las especies correspondientes a los géneros *Larrea* y *Prosopis* que sí lo hicieron mediante dilución en placa. De las especies vegetales que produjeron una inhibición leve del crecimiento mediante el método de dilución en agar, *Ailanthus altissiana* y *Oenothera grandiflora* no habían producido halos de inhibición de interés en la prueba de los pocillos. Los extractos correspondientes a *Clematis montevidensis*, *Mitracarpus megapotamicum*, *Poligonum hydropiperioides* y *Salix babilonica* que habían producido halos de inhibición comparables a los de la minociclina en el método de difusión en pocillos, no lograron una inhibición completa en la prueba de difusión. Finalmente, los extractos correspondientes a *Artemisa verlotiorum*, *Conyza albiola*, *Melia azederach*, *Muehlenbeckia sagitifolia*, *Solidago chilensis* y *Thymophyla pentacheata* que habían producido halos de inhibición en el método de difusión en pocillos no mostraron inhibición en el método de la dilución en placa.

Estas discrepancias entre los resultados obtenidos por diferentes métodos para evaluar la actividad antimicrobiana de un mismo extracto, también fueron observados por otros autores (Boyanova, 2005). En algunos casos debieron utilizar métodos de dilución en placa para confirmar resultados de dilución en caldo que aparecían enmascarados por la coloración propia de los extractos (Gende y col., 2008).

CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos por el método de difusión en pocillos y el método de dilución en agar no fueron totalmente coincidentes.
- Esta discrepancia en los resultados parecería deberse a factores propios de cada extracto vegetal, los cuales influyen en la difusión de los mismos en el agar, enmascarando los resultados microbiológicos.
- La dilución del extracto directamente en el medio Mueller Hinton, todavía líquido, facilita la dispersión del mismo en todo el volumen y elimina o disminuye los problemas de difusión del extracto en el agar solidificado.
- Teniendo en cuenta que la confirmación del efecto antimicrobiano se realiza empleando la prueba de dilución seriada, se consideró que aquellos extractos que no habían logrado una inhibición completa en la prueba de dilución no lo harían en la siguiente, continuando los ensayos sólo con las que lograron inhibición completa: *Schinus fasciculatus*, *Solanum biflorum*, *Larrea nitida*, *Prosopis flexuosa* var. *depressa*, *Prosopis flexuosa* var. *flexuosa* y *Larrea cuneifolia*.

BIBLIOGRAFIA

1. Ahmad I, Mehmood Z, Mohamad F. Screening of some medicinal plants for their antimicrobial properties. *J Ethnopharmacol.* 1998. 62(2):183-93
2. Barry AL, Coyle MB, Thornsberry C, Gerlach EH, Hawkinson RW. Methods of measuring zones of inhibition with the Bauer-Kirby disk susceptibility test. *J Clin Microbiol.* 1979. 10(6):885-9.
3. Bauer, AW; Kirby WMM; Sherris, JC, Turk M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am. J. Clin. Pathol.* 1966. 45:493-496.
4. Boyanova L, Gergova G, Nikolov R, Dereian S, Lazarova E, Katsarov N, Mitov I, Kraste Z. Activity of Bulgarian propolis against 94 *Helicobacter pylori* strains in vitro by agar-well diffusion, agar dilution and disc diffusion methods. *J. Med. Microbiol.* 2005. 54:481–483
5. Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty Third informational supplement M100-S23. 2013.
6. Cona E. Condiciones para un buen estudio de susceptibilidad mediante test de difusión en agar. *Rev. Chil. Infectol.* 2002.19 Supl.2:77-81.
7. Corzo A, Bravo E, Serrano F, Vattuone M. Actividad antibacteriana de extractos de hojas de *Prosopis alba*, Griseb, frente a cepas patógenas humanas y fitopatógenas. *Quebracho.* 2009. 17:106-114.
8. Gende L, Principal J, Di Maggi M, Palacios S, Fritz R, Eguaras M. Extracto de *Melia azedarach* y aceites esenciales de *Cinnamomun zeylanicum*, *Mentha*

- piperita* y *Lavandula officinalis* como control de *Paenibacillus larvae*. *Zootecnia Trop.* 2008. 26: 151-156.
9. Jyothi KS, Seshagiri M. In-vitro activity of saponins of *Bauhinia purpurea*, *Madhuca longifolia*, *Celastrus paniculatus* and *Semecarpus anacardium* on selected oral pathogens. *J. Dent. (Tehran)*. 2012. 9(4):216-23. Epub 2012 Dec 31.
 10. Mateu-de-Antonio EM, Martín M. In vitro efficacy of several antimicrobial combinations against *Brucella canis* and *Brucella melitensis* strains isolated from dogs. *Vet. Microbiol.* 1995. 45:1-10.
 11. Ministerio de Salud. Subsecretaría de Investigación y Tecnología. ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. Departamento de Bacteriología. Servicio Antimicrobianos. Manual de procedimientos para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos en bacterias aisladas de humano. Buenos Aires, Argentina. 2001.
 12. Nostro A, Germanò M, D'angelo V, Marino A, Cannatelli M. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Lett. Appl. Microbiol.* 2000. 30:379-84.
 13. Organización Mundial de Sanidad Animal. OIE Manual de la OIE sobre Animales Terrestres. Capítulo 1.1.6 Métodos de Laboratorio para los ensayos de sensibilidad de las bacterias frente a los antimicrobianos. 2008. 1-12.

14. Organización Mundial de la Salud (OMS). Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos WHO/CDS/CSR/RMD/2003.6 2003. 226-231.
15. Ríos J, Recio M. Medicinal plants and antimicrobial activity. J Ethnopharmacol. 2005. 100:80-4.
16. Smail F. Antibiotic susceptibility and resistance testing: an overview. Can. J. Gastroenterol. 2000. 14:871-5.
17. Steibel P, Toso R, Troiani N. Plantas medicinales de la Región Pampeana. 1° Ed. Santa Fe, Argentina. Fondo Editor Dr. Edgardo S. Allignani, 2009. Pp. 69 – 162.
18. Valsaraj R, Pushpangadan P, Smitt U, Adsersen A, Nyman U. Antimicrobial screening of selected medicinal plants from India. J. Ethnopharmacol. 1997. 58:75-83.

PARTE 2

**DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DE FRACCIONES
OBTENIDAS EN SOXHLET. DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN
INHIBITORIA MÍNIMA**

INTRODUCCIÓN

La extracción de muestras sólidas por solventes es una técnica muy antigua que permite separar compuestos de interés mediante la diferente solubilidad de las mismas, utilizando solventes de bajo punto de ebullición. Los métodos clásicos de extracción se valen de la maceración, una correcta elección de los solventes y la adición de calor o agitación para aumentar la solubilidad de los compuestos. El equipo de extracción sólido-líquido (Figura 8) debe su nombre a Franz Von Soxhlet, quien desarrolló el extractor convencional con el que se lleva adelante la técnica (Luque de Castro y Priego-Capote, 2009).

La extracción sólido-líquido se utiliza para extraer un producto de su fuente natural, en este caso en particular, una planta. Se fundamenta en elegir un solvente que arrastre los compuestos deseados y selectivamente deje los sólidos no deseados sin disolver. El Soxhlet se ha utilizado en la extracción de principios activos de las plantas desde hace muchos años debido a que es una técnica que no requiere gran entrenamiento del operador ni inversiones y resulta eficiente. Numerosos estudios para aislar los principios activos en diferentes especies vegetales se inician con éste método de preparación de muestras, las cuales luego son sometidas a otros ensayos que no es posible realizar con una muestra en estado sólido. Un ejemplo son los estudios efectuados sobre la actividad antifúngica

y antibacteriana de *Melia azedarach*, *Syzygium aromaticum* y *Cinnamomun zeylanicum* (Padrón Márquez y col., 2003). Estos autores comenzaron sus trabajos realizando extracción con Soxhlet y luego emplearon cromatografía en capa fina.

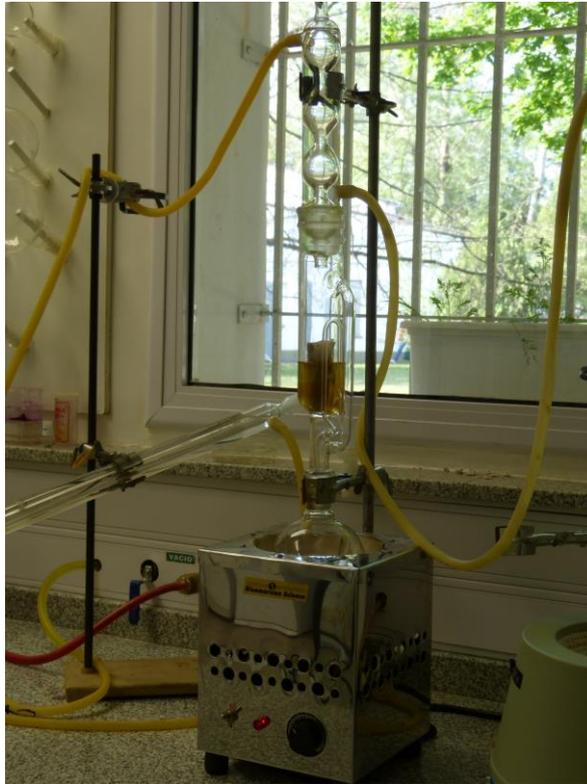


Fig. 8: Extracción en Soxhlet.

Otros ejemplos que pueden mencionarse son los estudios llevados a cabo por Nazif Aziz y col., (2013) que comenzaron con extracciones en Soxhlet empleando tres solventes: hexano, diclorometano y metanol para solubilizar los principios activos de *Alpinia conchigera* que finalmente analizaron por resonancia magnética nuclear Aiswarya y col., (2010), utilizaron la extracción en Soxhlet como paso previo a la cromatografía en capa fina para aislamiento e identificación de esteroidales de *Argyreia speciosa*.

También debe resaltarse que el método de extracción en Soxhlet permite obtener extractos vegetales que pueden utilizarse una vez secados y resuspendidos en solventes estériles para evaluar su actividad antimicrobiana. Estudios de extractos de *Diplosteghium tolimense* (Avila y col., 2006) y *Sonneratia alba* (Saad y col., 2012) fueron realizados por este método. Este tipo de extracción también se aplicó a *Lippia organoides* previo a la evaluación de su efecto antimicrobiano (Henao y col., 2009), y para obtener el perfil de quercetina y flavonoides en *Achyrocline satureoides* (Díaz y Heinzen, 2006).

La determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) permite conocer la concentración más baja del extracto vegetal que inhibe el crecimiento de un microorganismo, en este caso de *Brucella canis*. La determinación de la CIM puede realizarse por diluciones en medio líquido o sólido. La dilución en medio sólido implica la incorporación de concentraciones variadas del agente antimicrobiano a ensayar en un medio solidificado con agar, utilizando diluciones seriadas y la aplicación de un inóculo bacteriano en la superficie de la placa que contiene el agar (OIE, 2008).

Este método de determinación de la CIM en medio sólido ha sido utilizado en forma extendida para evaluar la actividad antimicrobiana de numerosos extractos vegetales contra diversos agentes infecciosos. Pueden mencionarse estudios de los efectos antibacterianos realizados en extractos de *Zuccagnia punctata* contra *Streptococcus pneumoniae* (Zampini y col., 2012), *Retama raetam* contra *Pseudomona aeruginosa* y *Escherichia coli* (Edziri y col., 2012).

En otros ensayos se ha preferido utilizar el método de dilución en medios líquidos, por ejemplo para determinar la CIM de *Alpinia conchigera* contra *Staphylococcus aureus* (Nazif Aziz, y col., 2013), *Albizia adiantifolia* contra *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella tiphy* (Dieu Tamokou y col., 2012), *Sonneratia caseolaris* Linn. contra *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* (Yompakdee y col., 2012), y *Urtica dioica* contra 28 tipos de bacterias diferentes (Modarresi-Chahardehi y col., 2102).

En otro caso, para evaluar la CIM de *Sonneratia alba* contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Escherichia coli* se utilizó una primera determinación en medio líquido y posteriormente se confirmó con otra en medio sólido (Saad y col., 2012).

También se han utilizado discos impregnados con diferentes concentraciones de extractos colocados sobre el agar, por ejemplo para determinar la la CIM de *Allium sativum* contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Klebsiella neumoniae* (Meriga y col., 2012).

Los estudios para determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* contra *Brucella canis* descrita en la Parte 1, permitieron seleccionar a *Schinus fasciculatus*, *Solanum biflorum*, *Larrea nitida*, *Prosopis flexuosa var. depressa*, *Prosopis flexuosa var. flexuosa* y *Larrea cuneifolia*, Los trabajos que se describen en esta Parte 2, permitieron determinar la CIM de distintas fracciones obtenidas con diferentes solventes utilizando el método de extracción en Soxhlet con el objetivo de realizar estudios fitoquímicos en las fracciones con actividad antimicrobiana sobre

Brucella canis para determinar la presencia de grupos químicos. Los resultados permitirán sugerir como posibles responsables del efecto antimicrobiano aquellos grupos químicos con actividad reconocida.

OBJETIVOS

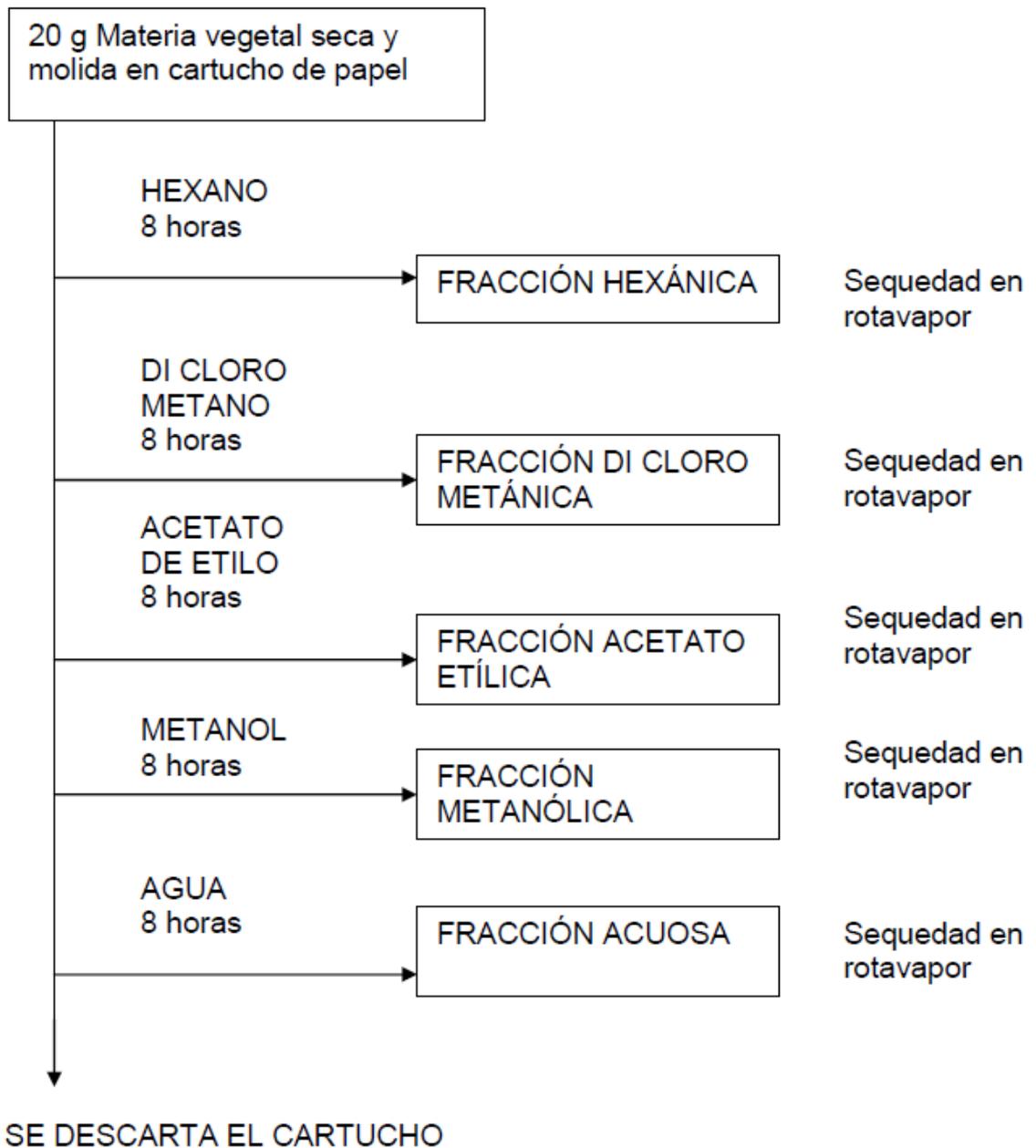
- Obtener fracciones de extractos de *Schinus fasciculatus*, *Solanum biflorum*, *Larrea nitida*, *Prosopis flexuosa* var. *depressa*, *Prosopis flexuosa* var. *flexuosa* y *Larrea cuneifolia* con solventes de polaridad creciente.
- Emplear el método de dilución seriada para determinar la Concentración Inhibitoria Mínima de cada una de las fracciones de extractos obtenidas.
- Seleccionar las fracciones con efecto antimicrobiano sobre *Brucella canis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de los extractos en Soxhlet:

El material vegetal se obtuvo a partir de partes aéreas de *Schinus fasciculatus*, *Solanum biflorum*, *Larrea nitida*, *Larrea cuneifolia*, *Prosopis flexuosa* var. *flexuosa*, *Prosopis flexuosa* var. *depressa* y de corteza de *Prosopis flexuosa* var. *flexuosa*. Para procesar cada especie se tomaron 20 g de material vegetal seco molido, el cuál se colocó en un cartucho de papel de filtro en el Soxhlet. Se realizaron extracciones sucesivas durante 8 horas para cada solvente, empleando solventes de polaridad creciente: hexano, diclorometano, acetato de etilo, metanol y agua. El volumen final de cada solvente fue llevado a sequedad en rotavapor a

presión reducida y el residuo se almacenó a -20°C hasta su empleo para determinar la actividad antimicrobiana (Esquema 2). Para la realización de las pruebas de actividad antimicrobiana los extractos se descongelaron a temperatura ambiente y resuspendieron en 1 mL de agua destilada estéril.



Esquema 2: Obtención de distintas fracciones de cada planta con Soxhlet.

Pruebas de actividad antimicrobiana:

Preparación de las placas: se emplearon placas de Petri de 60 mm de diámetro conteniendo un medio de cultivo compuesto por 10 mL de agar Müller Hinton con 10 % de sangre ovina al cual se le adicionó 100 µl de la fracción del extracto vegetal a evaluar, obtenido por extracción en Soxhlet. Cada placa se sembró con una solución de *Brucella canis* RM 6/66 con una concentración equivalente al 0,5 de la escala de Mc Farland. Las placas se incubaron a 37°C durante 72 horas y se procedió a la lectura. Se llevaron a cabo 3 repeticiones para cada extracto en días sucesivos.

Concentración Inhibitoria Mínima:

Preparación de las placas: se utilizaron placas de 60 mm en las cuales se colocaron 9 mL del medio de cultivo compuesto por agar Müller Hinton con 10% de sangre ovina, agregando a cada una 1 mL de cada dilución de extracto vegetal.

Preparación de las diluciones de los extractos:

Tubo N° 1: 9 mL de agua destilada + 1 mL de extracto. Dilución obtenida: 1/10.

Tubo N° 2: 5 mL de agua destilada + 5 mL del contenido del Tubo 1. Dilución obtenida: 1/20.

Tubo N° 3: 5 mL de agua destilada + 5 mL del contenido del Tubo 2. Dilución obtenida: 1/40

Tubo N° 4: 5 mL de agua destilada + 5 mL del contenido del Tubo 3. Dilución obtenida: 1/80

Nota: este procedimiento se repitió para cada fracción obtenida por extracción en Soxhlet con hexano, diclorometano, acetato de etilo, metanol y agua de *Schinus fasciculatus*, *Solanum biflorum*, *Larrea nitida*, *Prosopis flexuosa* var. *depressa*, *Prosopis flexuosa* var. *flexuosa* y *Larrea cuneifolia*.

Las placas se sembraron con una solución de *Brucella canis* RM 6/66 equivalente al 0,5 de la escala de Mc Farland. Se incubaron durante 72 horas a 37°C y se procedió a la lectura.

Se realizaron tres repeticiones para cada dilución en días sucesivos

RESULTADOS

En la Tabla 3 se muestran los resultados de las distintas fracciones.

Tabla 3: Efecto antimicrobiano contra *Brucella canis* de las diferentes fracciones obtenidas en Soxhlet con solventes de polaridad creciente de partes aéreas y corteza de *Prosopis flexuosa* var. *depressa*, partes aéreas de *Schinus fasciculatus*, partes aéreas y corteza de *Prosopis flexuosa* var. *flexuosa*, partes aéreas de *Solanum biflorum*, *Larrea nitida* y *Larrea cuneifolia*

Solvente Especie Vegetal	HEXANO	DICLORO METANO	ACETATO DE ETILO	METANOL	AGUA
<i>Prosopis flexuosa</i> var. <i>depressa</i> parte aérea	C	C	C	I	C
	C	I (leve)	C	I	C
	C	I (leve)	C	I	C
<i>Prosopis flexuosa</i> var. <i>depressa</i> corteza	C	C	C	I	C
	C	C	C	I	C
	C	C	C	I	C
<i>Schinus fasciculatus</i> parte aérea	C	C	C	C	C
	C	C	C	C	C
	C	C	C	C	C
<i>Prosopis flexuosa</i> var. <i>flexuosa</i> parte aérea	C	C	C	I (leve)	C
	C	C	C	I	C
	C	C	C	I	C
<i>Prosopis flexuosa</i> var. <i>flexuosa</i> corteza	C	C	I	C	C
	C	C	I (leve)	C	C
	C	C	C	C	C
<i>Solanum biflorum</i> parte aérea	C	C	C	I	I (leve)
	C	C	C	C	C
	C	C	C	C	C
<i>Larrea nitida</i> parte aérea	C	I*	C	I (leve)	C
	C	I (leve)	I (leve)	I (leve)	C
	C	C	C	C	C
<i>Larrea cuneifolia</i> parte aérea	C	C	C	C	C
	C	C	I	C	C
	C	C	C	I	C
Control	C	C	C	C	C
	C	C	C	C	C
	C	C	C	C	C

Ref. I: Inhibición del crecimiento bacteriano, I*: no difundió, C: Crecimiento bacteriano, I (leve): no se observó crecimiento macroscópicamente, pero al realizar coloración y examen microscópico se evidenció crecimiento de bacterias.

Para determinar las CIM se seleccionaron las fracciones que produjeron inhibición en al menos dos de las tres repeticiones.

Los resultados de las CIM de las fracciones que mostraron actividad antibacteriana se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4: Concentraciones Inhibitorias Mínimas de las fracciones que mostraron actividad antibacteriana

Título de Dilución Especie Vegetal	1/10	1/20	1/40	1/80
<i>Prosopis flexuosa</i> var. <i>depressa</i> parte (metanólico)	I	I	I	C
<i>Prosopis flexuosa</i> var. <i>flexuosa</i> parte aérea (metanólico)	C	C	C	C
<i>Prosopis flexuosa</i> var. <i>depressa</i> corteza (acetato de etilo)	C	C	C	C
Larrea nítida (metanólico)	C	C	C	C

Ref. I: Inhibición del crecimiento bacteriano. **C:** Crecimiento bacteriano. **(metanólico), (acetato de etilo):** indican el solvente de extracción utilizado en el Soxhlet para obtener la fracción a ensayar.

DISCUSIÓN

El criterio para seleccionar las fracciones, consistió en utilizar para las pruebas de CIM los extractos que mostraron efecto al menos en dos de las tres repeticiones (Tabla 3). De este modo, como puede observarse en la Tabla 4, se redujo el número de ensayos para obtener la fracción de mayor actividad *in vitro*. Con respecto al método empleado para determinar la CIM puede señalarse que los medios líquidos, o sólidos con pocillos o discos de papel presentan desventajas cuando se intenta evaluar extractos vegetales. Teniendo en cuenta que las pruebas en medios líquidos se basan en la presencia o ausencia de turbidez, no se consideraron las más apropiadas, ya que algunas de las fracciones a evaluar presentaban coloración o turbidez propia al reconstituirlas. Incluso algunos autores que utilizaron medios líquidos luego reconfirmaron los resultados por otros métodos. Así, Nazif Aziz y col. (2013), quienes evaluaron un extracto de *Alpinia conchigera* utilizaron posteriormente el método colorimétrico que emplea el reactivo MTT para determinar fehacientemente la ausencia de crecimiento bacteriano. Dieu Tamokou y col (2012), quienes comprobaron la CIM de extracto y fracción de acetato de etilo de *Albizia Adianthifolia* utilizaron también primero la técnica en medio líquido, pero la reconfirmaron realizando la Concentración Bactericida Mínima en agar. Procedimientos confirmatorios similares utilizaron Saad y col., (2012) para *Sonneratia alba*.

En los ensayos realizados en este trabajo se determinó que el empleo del método de determinación de la CIM en medio sólido es el más adecuado teniendo en cuenta que se obtuvieron buenos resultados en los ensayos previos para hacer

el screening con los extractos metanólicos. Esta metodología permitió solucionar los problemas de difusión. Además, considerando que la morfología de las colonias de *Brucella canis*, que suele provocar dudas con respecto a su crecimiento estas se pueden despejar por medio de un simple raspado de la de la superficie del agar, colocación en portaobjetos, posterior tinción y observación al microscopio.

El método de CIM en discos ensayado por Meriga y col., (2012) no fue considerado adecuado en este caso por la misma razón que se descartó el método de los pocillos: la falta de información para comparar la difusibilidad de cada fracción.

Con respecto al efecto inhibitor de *Prosopis flexuosa* var. *depressa* radicó claramente en el extracto metanólico tanto para la parte aérea como para la corteza, en tanto que la primera mostró también alguna leve actividad en la fracción correspondiente al diclorometano.

En el caso de partes aéreas de *Prosopis flexuosa* var. *flexuosa* el efecto antimicrobiano se expresó en el extracto metanólico, en tanto que en la corteza el efecto antimicrobiano tuvo una expresión leve en la fracción correspondiente al acetato de etilo.

Schinus fasciculatus no mostró una clara actividad inhibitoria en ninguna de las fracciones, por lo que se especuló que el efecto observado en el screening se debió a la combinación de compuestos que habían quedado en diferentes fracciones y que por separado no evidenciaron efecto antimicrobiano. Una situación similar ocurrió con *Solanum biflorum*.

Larrea nitida y *Larrea cuneifolia* mostraron resultados no coincidentes entre una y otra repetición del ensayo. Se atribuyen estos resultados no coincidentes entre las repeticiones mostradas en la Tabla 4, a que posiblemente el efecto mostrado en la Tabla 3 se debió a la mayor concentración empleada en este ensayo. De esta manera se continuó el ensayo de las CIM incluyendo los extractos metanólicos de *Prosopis flexuosa* var. *flexuosa* parte aérea, de parte aérea y corteza de *Prosopis flexuosa* var. *depressa*, y de parte aérea de *Larrea nitida*.

CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos en los ensayos de CIM permiten concluir que las diluciones 1/10, 1/20 y 1/40 de la fracción metanólica de *Prosopis flexuosa* var. *depressa*, son capaces de inhibir el crecimiento bacteriano de *Brucella canis* en medios sólidos.
- Teniendo en cuenta que no se encontró una fracción responsable del efecto antimicrobiano para *Schinus fasciculatus* no fue posible realizar las pruebas de CIM para esta especie vegetal, por lo que se la retiró del ensayo.
- Con respecto a las demás especies vegetales y de acuerdo con los estándares de selección impuestos arbitrariamente para estos ensayos, se descartó a *Larrea cuneifolia* y *Solanum biflorum* por no inhibir al menos en dos repeticiones el crecimiento de *Brucella canis*.

- En concordancia con lo expuesto anteriormente, se decidió continuar los estudios fitoquímicos con la fracción metanólica del extracto hidroalcohólico de partes aéreas de *Prosopis flexuosa* var. *depressa*.

BIBLIOGRAFIA

1. Aiswarya G, Gupta R, Kambhoja S. Isolation of 28-pentyl-3-galloyl-betulinic acid and 11-hydroxy friedelane from the plant *Argyreia speciosa*. 2010. Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci. (1) 3:213-221.
2. Ávila L, Baquero E, Viña A, Murillo E. Actividad antibacteriana de *Diplostephium tolimense* Cuatrec. (Asteraceae) frente a *Staphylococcus aureus*. 2006. Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica 13 (1): 55-60.
3. Díaz C, Heinzen H. Variaciones en el Perfil de Flavonoides y en la Cantidad de Quercetina Libre en Diferentes Extractos de *Achyrocline satureoides*. 2006. Acta Farm. Bonaerense 25 (4): 574-7
4. Dieu Tamokou J, Simo Mpetga D, Lungu P, Tene M, Tane P, Kuate R. Antioxidant and antimicrobial activities of ethyl acetate extract, fractions and compounds from stem bark of *Albizia adianthifolia* (Mimosoideae). 2012. BMC Complementary and Alternative Medicine 2012, 12:99. <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/12/99>.
5. Edziri H, Mastouri M, Mahjoub M, Mighri Z, Mahjoub A, Verschaeve L. Antibacterial, Antifungal and Cytotoxic Activities of Two Flavonoids from *Retama raetam* Flowers. 2012. Molecules 17: 7284-7293.

6. Henao J, Muñoz L, Ríos V.E, Padilla L, Giraldo G. G. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de la planta *Lippia origanoides* h.b.k. Cultivada en el departamento del Quindío. 2009. Rev. Invest. Univ. Quindío (19): 159- 164.
7. Luque de Castro M, Priego-Capote F. Soxhlet extraction: Past and present panacea. 2010. J. Chromatogr. A, 1217:2383–2389
8. Meriga B, Mopuri R, MuraliKrshna T. Insecticidal, antimicrobial and antioxidant activities of bulb extracts of *Allium sativum*. 2012. Asian. Pac. J Trop. Med. 2012. 391:395.
9. Modarresi-Chahardehi A, Ibrahim D, Fariza-Sulaiman S, Mousavi L. Screening antimicrobial activity of various extracts of *Urtica dioica*. 2012. Rev Biol Trop. 60(4):1567-76.
10. Nazif Aziz A, Ibrahim H, Rosmy Syamsir D, Mohtar M. Antimicrobial compounds from *Alpinia conchigera*. 2013. J Ethnopharmacol.145:798-802.
11. Organización Mundial de Sanidad Animal. OIE Manual de la OIE sobre Animales Terrestres. Capítulo 1.1.6 Métodos de Laboratorio para los ensayos de sensibilidad de las bacterias frente a los antimicrobianos. 2008; 1-12.

12. Padrón Márquez B, Oranday Cárdenas A, Rivas Morales C, Verde Star M. 2003. Identificación de compuestos de *Melia azedarach*, *Syzygium aromaticum* y *Cinnamomum zeylanicum* con efecto inhibitorio sobre bacterias y hongos. *Ciencia UANL* 6 (3):333-338.
13. Saad S, Taher M, Susanti D, Qaralleh H, Awang A. In vitro antimicrobial activity of mangrove plant *Sonneratia alba*. 2012. *Asian Pac J Trop Biomed* 2(6): 427-429.
14. Yompakdee C, Thunyaharn S, Phaechamud T. Bactericidal Activity of Methanol Extracts of Crabapple Mangrove Tree (*Sonneratia caseolaris* Linn.) Against Multi-Drug Resistant Pathogens. 2012. *Indian J Pharm Sci.* 74(3): 230–236.
15. Zampinia I, Villenaa J, Salvaa S, Herreraa M., Islã M, Alvareza, S. Potentiality of standardized extract and isolated flavonoids from *Zuccagnia punctata* for the treatment of respiratory infections by *Streptococcus pneumoniae*: In vitro and in vivo studies. 2012. *J. Ethnopharmacol.* 140:287– 292

PARTE 3

REACCIONES DE CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA DE *PROSOPIS*

FLEXUOSA VAR. *DEPRESSA*

INTRODUCCIÓN

Prosopis flexuosa var. *depressa* pertenece al género *Prosopis*, familia Fabaceae, subfamilia Mimosideae. Las especies de este género se encuentran ampliamente distribuidas en regiones áridas y semiáridas de América, África y occidente de Asia (Álvarez y Villagra, 2009). Para *Prosopis flexuosa* se describen tres variedades: una arbórea (var. *flexuosa*), denominada vulgarmente “Algarrobo” o “Algarrobo dulce” y dos arbustivas (var. *depressa* y var. *fruticosa*). A la variedad *depressa* se la suele denominar vulgarmente “Alpataco dulce”, “Algarrobo Alpataco” y “Alpataco”. *Prosopis flexuosa* DC. var. *depressa* F. A. Roig Roig, (Steibel y Troiani, 1999), denominada “travtrau” en lengua ranquel (Steibel, 1997) es un arbusto de hasta 2 metros de altura, con las ramas basales enterradas y grandes espinas de hasta 80 mm. Llega a tener un diámetro de hasta 12 metros debido a que las ramas enterradas emiten ramas verticales que a su vez emiten otras horizontales (Steibel y Troiani, 1999). Puede desarrollarse en ambientes de extrema aridez y bajas temperaturas (Roig, 1987). Se la encuentra principalmente en el oeste de la Provincia de La Pampa. Después de los incendios rebrota rápidamente con vigor. Se la encuentra en las áreas marginales de los bosques de *Prosopis flexuosa* var. *flexuosa*, en el monte, en las barrancas del Río Colorado, en el caldenal y en las mesetas basálticas del sudoeste. Se la utiliza para leña y como recurso forrajero en las áreas más áridas del sudoeste (Steibel y Troiani, 1999).

En el metabolismo de las plantas hay una variedad de moléculas orgánicas que no tienen una función directa en procesos específicos como respiración, fotosíntesis o transporte de nutrientes. Se denominan metabolitos secundarios (Ávalos García y Pérez-Urria Carril, 2009). Estos metabolitos secundarios son compuestos sintetizados por las plantas como defensa ante agentes peligrosos, como patógenos o la presencia de animales herbívoros o bien para atraer insectos polinizadores. Se agrupan en tres grupos químicos principales, de acuerdo a las rutas mediante las cuales son sintetizados: compuestos nitrogenados, terpenoides y compuestos fenólicos (Brusotti y col., 2013). Los metabolitos secundarios no están presentes todos por igual en todas las especies vegetales, ya que no se sintetizan en forma generalizada, su producción suele estar acotada a un grupo taxonómico en particular (Pérez Alonso y Jiménez, 2011). Hay además variedad estructural dentro de un mismo grupo de metabolitos secundarios, originadas por distintas reacciones químicas, lo que lleva a que aparezcan diferentes concentraciones de los mismos entre especies, entre individuos de una población y hasta entre distintos órganos de una planta (Sepúlveda Jiménez y col., 2003)

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios cuya acción en las plantas es la defensa de las mismas ante patógenos vegetales, animales herbívoros y distintos factores de stress medioambientales (Singh y col., 2003; Daglia, 2012). De acuerdo a su estructura química se los puede dividir en flavonoides y no flavonoides. A los flavonoides se los divide en flavonoles, flavonas, flavanonas, antocianinas, flavanoles e isoflavonas. En el grupo de los no flavonoides los más importantes son el ácido fenólico, los estilbenos y los lignanos. De los compuestos fenólicos estudiados, los que más atención han recibido han sido flavan-3-ol,

flavonol y taninos, los cuales han demostrado a través de numerosos estudios su actividad antimicrobiana contra diversos agentes: *Vibrio cholerae*, *Streptococcus mutans*, *Campilobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Helicobacter pylori*, *Staphilococcus aureus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Actinomyces naeslundii*, *Chlamydia pneumoniae* (Daglia, 2012), *Bacteroides fragilis*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae*, entre otros (Singh y col., 2003). El mecanismo de acción antibacteriana de los polifenoles incluye la generación de peróxido de hidrógeno y la alteración de la membrana microbiana (Ferrazzano y col., 2011). Dentro de los flavonoides han demostrado tener actividad antimicrobiana contra *Chlamydia pneumoniae* ramnetina, miricetina, morina, y quercetina (Daglia, 2012)

Los terpenoides incluyen como compuestos de interés a los aceites esenciales, las saponinas y cardenólidos (Ávalos García y Pérez-Urria Carril, 2009). Los sesquiterpenos tales como la risitina y lubimina, presentes en *Solanum tuberosum*, el capsidiol de *Capsicum annum* y el 2,7-dihidroxicadaleno de *Gossypium hirsutum* tienen actividad antimicrobiana (Sepúlveda Jiménez y col., 2003).

Los compuestos nitrogenados incluyen a los alcaloides y glucósidos cianogenéticos. Estos últimos son los metabolitos secundarios considerados más importantes en cuanto a sus funciones de defensa de las plantas (Pérez Alonso y Jiménez, 2011). Estudios realizados con alcaloides presentes en extractos de *Prosopis juliflora* han demostrado el efecto antimicrobiano de éstos sobre *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa* y *Salmonella choleraesuis* (dos Santos y col., 2013). El

efecto antimicrobiano de los alcaloides radica en su capacidad de detener la síntesis de proteínas, inducir la apoptosis e inhibir las enzimas del metabolismo de los carbohidratos (Sepúlveda Jiménez y col., 2003).

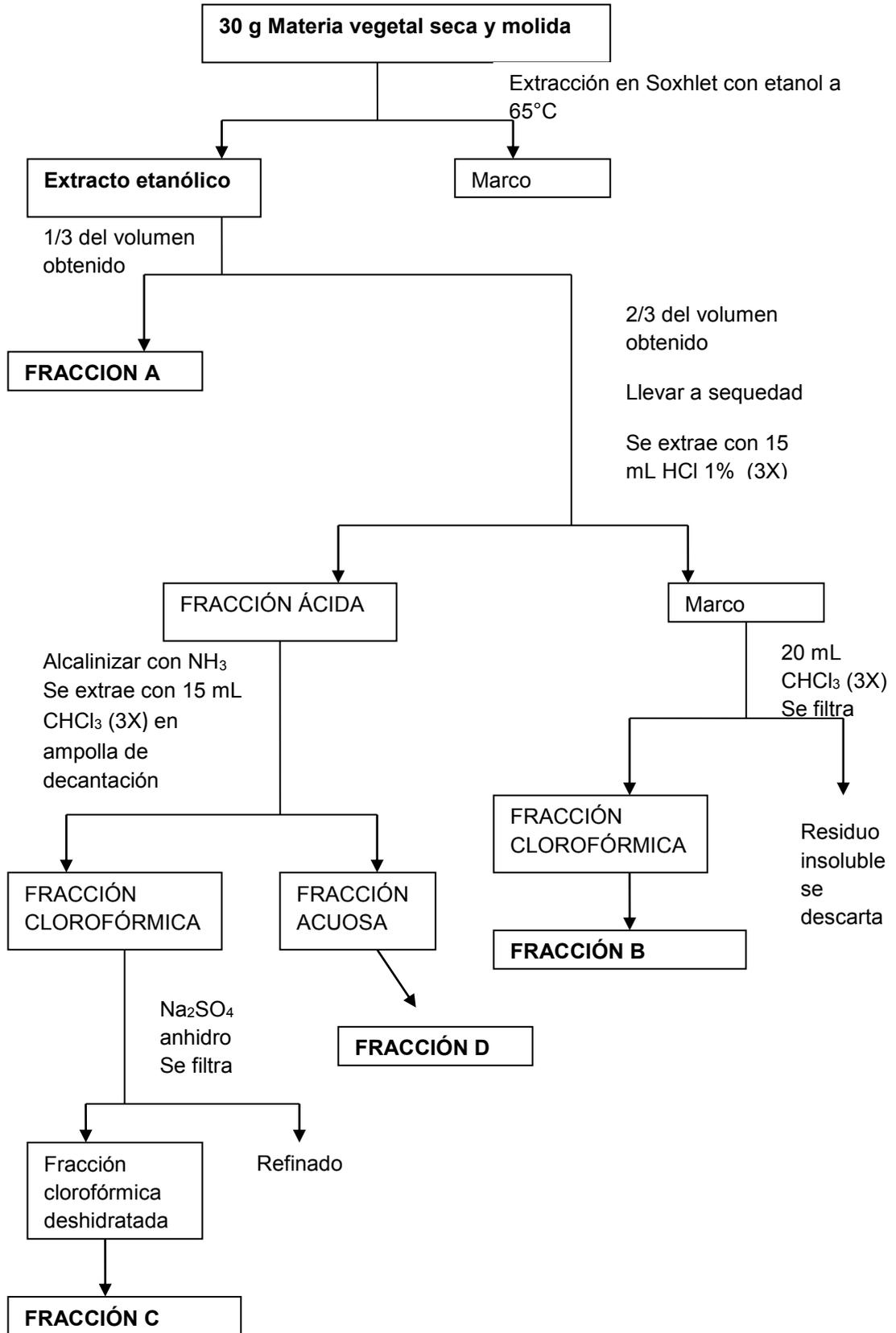
Con el objetivo de determinar los grupos químicos presentes en un extracto se realiza una marcha fitoquímica. Este procedimiento incluye una serie de métodos de detección de los diferentes grupos químicos de la especie vegetal a estudiar basados en extracciones con solventes y la posterior aplicación de pruebas de coloración para determinar la posible presencia de alcaloides, flavonoides, taninos, saponinas y otros. (Lock de Ugaz, 2001).

OBJETIVOS

- Realizar estudios fitoquímicos a partes aéreas de *Prosopis flexuosa* var. *depressa*.
- Informar la presencia de grupos químicos en la/s fracción/es con antecedentes antimicrobianos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las reacciones de caracterización de partes aéreas de *Prosopis flexuosa* var. *depressa* se llevaron a cabo siguiendo el protocolo indicado en el Esquema 3.



Esquema 3: Obtención de las fracciones A, B, C y D para realizar reacciones de caracterización de extractos de *Prosopis flexuosa* var. *depressa*.

FRACCIÓN A

Flavonoides

Reacción de Shinoda

Se tomaron 0,5 mL de la Fracción A y agregó una granalla de Zn o Mg más 0,2 mL de ácido clorhídrico concentrado. Se esperó la disolución de la granalla. Se agregó 0,2 mL de alcohol amílico y luego 2 mL de agua destilada. Se observó la aparición de coloración. marrón, pardo rojiza o rosada en la fase orgánica. La aparición de una tonalidad desde rosado tenue hasta guinda indica la presencia de flavonoides.

Taninos y OH fenólicos

Reacción de FeCl₃

Se llevó a seco 3 mL de la Fracción A calentando a Baño María (se puede hacer directamente sin llevar a seco). El residuo seco se disolvió en 1 mL de agua destilada y se le agregaron 3 gotas de FeCl₃ al 1% acuoso. Se observó la aparición de coloración. La aparición de coloración varía de acuerdo a la cantidad y posición de los oxhidrilos fenólicos presentes: amarilla indica la presencia de 1 -OH, verde grisácea 2 -OH adyacentes y azul negro 3 -OH adyacentes.

Reacción con gelatina

Se llevó a seco otros 3 mL de la Fracción A calentando a Baño María (se puede hacer directamente sin llevar a seco). El residuo seco se disolvió en 1 mL de agua destilada y se le agregaron 10 gotas de una solución acuosa de gelatina al 2% (preparada con agua tibia) (si no precipitara agregar unas gotas de solución ácida de

cloruro de sodio). Se observó la aparición de turbidez. La aparición de turbidez hasta precipitado abundante indica la presencia de taninos.

Lípidos

Se sembraron unas gotas de la Fracción A en papel de filtro, dejar secar. Se expuso a vapores de I_2 . Se observó la aparición de coloración. La presencia de coloración marrón-naranja indica la presencia de lípidos.

Hidratos de carbono

Reacción con fenol

Se adicionaron 0,5 mL de una solución acuosa de fenol al 5% a 2 mL de la Fracción A (o MeOH *Prosopis sp*) seca y retomada con agua y, sobre la superficie, se agregaron 2,5 mL de H_2SO_4 concentrado. Se observó la aparición de coloración. . La presencia de color naranja-pardo indica la presencia de azúcares.

FRACCIÓN B

Núcleos esteroidales y triterpenos

Reacción de Liebermann-Burchard

Se mezclaron 1,8 mL de anhídrido acético con 0,2 mL de ácido sulfúrico concentrado en medio anhidro. Se tomaron 0,2 mL de la fracción B y agregaron 0,2 mL del reactivo de Liebermann-Burchard. Se observó una coloración verde oscura que, al poco tiempo del agregado del reactivo, pasa a negra. La formación de colores azul-verdoso indica la presencia de grupo esteroide; la coloración rosada a púrpura evidencia grupo triterpénico.

Antraquinonas

Reacción de Borntraeger directa

Se agitó suavemente 3 mL de la Fracción B con 5 mL de NaOH al 5% y observó la coloración. La presencia de fase acuosa rojiza, o amarilla con fluorescencia roja indica la presencia de antraquinonas.

FRACCIÓN C

Alcaloides

Reacción de Dragendorff

Se disolvieron 8 gramos de subnitrito de bismuto en 20 mL de HNO₃ al 30%. Se volcó esta solución sobre otra que contenía 22,7 g de KI en 20 mL de agua. Se dejó en reposo y separó el KNO₃ decantado, se diluyó a 100 mL. El reactivo así preparado se utilizó para identificar alcaloides. Para la reacción se tomaron 0,2 mL de la Fracción C, se llevaron a sequedad, se retomaron con 2 mL de HCl 1% y se agregaron 2 gotas del reactivo. La aparición de un precipitado color pardo-naranja indica la presencia de alcaloides.

Cardenólidos

Reacción de Kedde

Solución I: ácido 3,5 dinitrobenzoico al 2% en metanol.

Solución II: KOH al 5,7% en agua destilada.

Sobre papel de filtro, a 1 gota de la Fracción C (llevada previamente a seco y retomada con alcohol), se le agregó 0,1 mL del Reactivo (preparado con volúmenes iguales de las soluciones I y II). Conviene hacer un blanco reemplazando el Reactivo de Kedde por la solución II para descartar colores producidos en medio alcalino por

otras sustancias. Se observó la aparición de coloración. La aparición de coloración púrpura o violeta persistente indica la presencia de cardenólidos.

Estructuras esteroidales

Se procedió como se describió en la Fracción B.

Leucoantocianidinas

Reacción de Rosenheim

Se llevaron a seco 2 mL de la Fracción C y se retomaron con ese mismo volumen de HCl al 1% en agua. Se le agregó 1 mL de HCl concentrado, se mezcló y se calentó en baño María durante 10 minutos. Se enfrió, se le agregó un pequeño volumen de alcohol amílico, y se agitó suavemente. Se observó el color de la fase amílica. La aparición de coloración desde carmesí hasta rosa pálido indica la presencia de leucoantocianidinas.

FRACCIÓN D

Compuestos fenólicos

Reacción de FeCl₃

Se tomó 1 mL de la Fracción D y se le agregaron 3 gotas de FeCl₃ al 1% acuoso. Se observó la aparición de coloración. La aparición de coloración varía de acuerdo a la cantidad y posición de los oxhidrilos fenólicos presentes: amarilla indica la presencia de 1 -OH, verde grisácea 2 -OH adyacentes y azul negro 3 -OH adyacentes.

Proteínas y péptidos

Reacción de Biuret

Se tomaron 2 mL de la Fracción D y se le agregaron 2 mL del reactivo de Biuret. El mismo se preparó mezclando partes iguales de una solución acuosa de CuSO_4 al 0,25 % (0,25 g en 100 mL de agua caliente) y una solución acuosa de NaOH al 10%.

Si el color no se presenta inmediatamente, dejar reposar de 10 a 15 minutos. Se observó la aparición de coloración. La aparición de coloración violeta-púrpura o violeta-rosada indica la presencia de péptidos y/o proteínas.

REACCIONES DIRECTAS

Saponinas

Poder afrógeno

Se calentaron en baño María 0,5 g de droga seca y pulverizada con 8 mL de agua destilada durante 30 minutos. Luego se filtró en caliente. Se tomó 1 mL de esta solución y se colocó en un tubo de hemólisis. Se tapó y agitó fuertemente durante 15 segundos. Se midió la espuma producida a los 0, a los 5 y a los 15 minutos.

Poder emulsificante

Se añadió 1 mL de cloroformo a 1 mL de la muestra. Se agitó y se procedió de igual manera en otro tubo, sustituyendo la muestra por agua. Se compararon los resultados en ambos tubos.

Proteínas- aminogrupos

Reacción de Ninhidrina (sobre papel)

A 1 g de extracto se le agregaron 50 mL de agua, se calentó a ebullición durante 2 minutos y se filtró en caliente. Se concentró a 5 mL. Sobre papel de filtro se colocó 1 gota de solución y dejó secar. Se agregó una gota de solución etanólica de Ninhidrina al 2%. En paralelo se realizó un blanco de reactivo, y un testigo utilizando alanina (punta de espátula) en etanol al 50% (al que también se le agregó sobre la gota seca 1 gota del reactivo). Se calentó en estufa 110-120 °C. Se observó la aparición de coloración. La aparición de una mancha azul-violeta de igual, menor o mayor intensidad que el testigo (blanco) indica la presencia de proteínas y/o aminogrupos.

RESULTADOS

Tabla 5: Resultados de las reacciones de caracterización realizadas a la fracción metanólica de *Prosopis flexuosa* var. *depressa*.

<i>Prosopis Flexuosa</i> var. <i>depressa</i> (parte aérea)	
Fracción A	
Flavonoides (Shinoda)	Positivo tonalidad rosa (Fig. 9)
Oxidrilos Fenólicos (Cloruro Férrico)	Positivo tonalidad verde grisácea
Taninos Reacción de la gelatina	Turbidez leve
Lípidos	Positivo (Fig. 10)
Hidratos de carbono (fenol)	Positivo coloración naranja (Fig. 11)
Fracción B	
Esteroidales y triterpenos (Liebermann-Burchard)	Positivo
Antraquinonas (Bortraenger)	Negativo
Fracción C	
Alcaloides (Draguendorff)	Positivo (Fig. 12)
Cardenólidos (Kedde)	Dudoso sin coloración persistente (Fig. 13)
Leucoantocianidinas (Rosenheim)	Negativo
Fracción C	
Proteínas y péptidos (Biuret)	Negativo
Reacciones directas	
Saponinas (poder afrógeno)	Positivo
Saponinas (poder emulsificante)	Positivo
Proteínas- aminogrupos (nihidrina)	Positivo coloración azul oscuro (Fig. 14)



Fig. 9: Reacción de Shinoda. La tonalidad rosada indica la presencia de flavonoides.

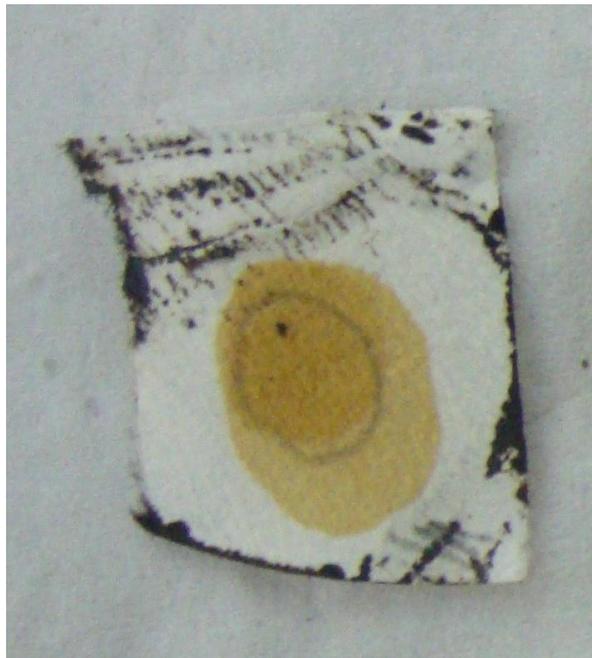


Fig. 10: Reacción para determinación de lípidos. La coloración marrón-anaranjada indica la presencia de lípidos.



Fig. 11: Reacción con fenol. La coloración pardo naranja indica la presencia de hidratos de carbono.

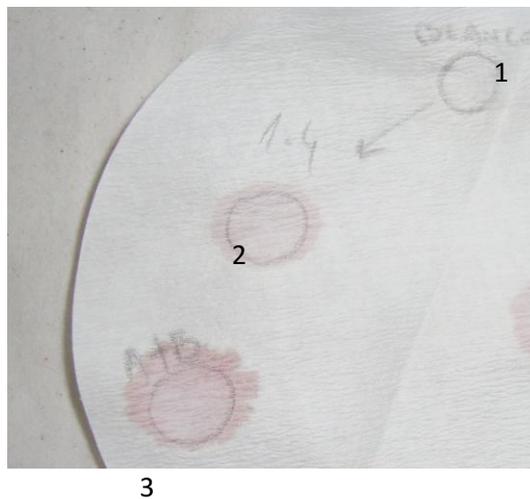


Fig. 12: Reacción de Kedde. 1: Blanco (Solución II), 2: Extracto, 3: Reactivo (Solución I+II). La coloración lila de poca persistencia indica un resultado dudoso sobre la presencia de cardenóidos.

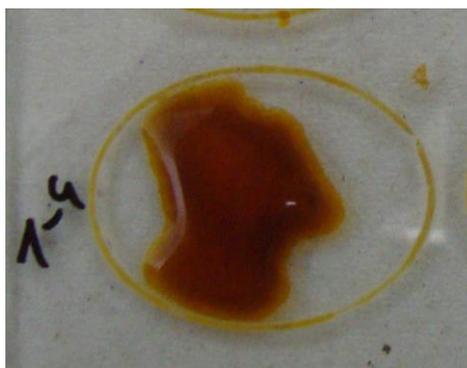


Fig. 13: Reacción de Dragendorff. El precipitado pardo naranja indica la presencia de alcaloides.

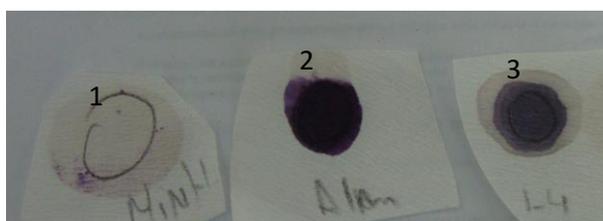


Fig. 14: Reacción de Ninhidrina. 1: Blanco de Ninhidrina, 2: Blanco de Alanina, 3: Extracto. La coloración azul oscura indica la presencia de aminogrupos.

DISCUSIÓN

El resultado positivo a la reacción de Cloruro Férrico en la determinación de taninos indica la presencia de dos grupos -OH fenólicos adyacentes. La reacción de la gelatina con turbidez leve implica que la cantidad de taninos presente en la muestra no es abundante.

De los compuestos hallados en la marcha fitoquímica preliminar tienen reconocida acción antimicrobiana los flavonoides, los taninos, algunos sesquiterpenos en particular y los alcaloides (Sepúlveda Jiménez y col., 2003).

Si bien los flavonoides han demostrado acción antibacteriana sobre todo frente a bacterias Gram positivas, Daglia (2012) cita resultados de efecto antimicrobiano expresado por flavonoides tales como ramnetina, miricetina, morina y quercetina contra *Chlamydia Pneumoniae*, la cual es una bacteria Gram negativa de vida intracelular como *Brucella canis*.

En cuanto a los alcaloides existen descripciones de efecto antibacteriano de alcaloides presentes en chauchas y hojas de *Prosopis juliflora*. En este caso, la identificación de los mismos se hizo también a través de la reacción de Dragendorff. El efecto antibacteriano se describe para bacterias Gram positivas y Gram negativas, y se identifica a los alcaloides presentes como juliprosopine, prosoflorine y juliprosine (dos Santos y col., 2013).

CONCLUSIONES

- Las reacciones de Dragendorff y Shinoda evidenciaron la posible presencia de alcaloides y flavonoides.
- Estos grupos químicos están conformados por un gran número de compuestos, algunos de ellos con actividad antimicrobiana comprobada contra otros microorganismos.
- Estos antecedentes permiten señalar a estos grupos de compuestos como promisorios para continuar futuros estudios con la finalidad de relacionarlos con el efecto antimicrobiano contra *Brucella canis* hallados en este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Álvarez, J.A.; Villagra, P.E.. *Prosopis flexuosa* DC. (Fabaceae, Mimosoideae). Kurtziana 2009. 35(1):47-61.
2. Ávalos García A, Pérez-Urria Carril E. Metabolismo secundario de plantas. 2009. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. 2 (3): 119-145.
3. Brusotti G, Cesari I, Dentamaro A, Caccialanza G, Massolini G. Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: The role of analysis in the ethnopharmacological approach. 2013. J. Pharm. Biomed. Anal., <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2013.03.007>
4. Daglia M. Polyphenols as antimicrobial agents. 2012. Current opinion on Biotechnology 23:174-178.
5. dos Santos E, Pereira M L, da Silva C, Souza-Neta L, Geris R, Martins D, Santana A, Barbosa L, Silva H, Freitas G, Figueiredo M, de Oliveira F, Batista R. Antibacterial activity of the alkaloid-enriched extract from *Prosopis juliflora* pods and its influence on in vitro ruminal digestion. 2013. Int. J. Mol. Sci 14:8496-8516.

6. Ferrazzano GF, Amato I, Ingenito A, Zarrelli A, Pinto G, Pollio A. Plant Polyphenols and their anti-cariogenic properties: a review. 2011. *Molecules* 16:1486-1507.
7. Lock de Ugaz O. Cap. 4: Análisis fotoquímico y metabolitos secundarios. En: *Manual de Fitoterapia*. Revisoras: Villar López M, Mesa Ramos M, Pimentel O G. 2001. Organización Panamericana de la Salud. EsSalud. Lima; Perú. ISBN 9972-785-34-3. OPS/PER/01,11. 41-43.
8. Pérez-Alonso N, Jiménez E. Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*. 2011. *Biotecnología Vegetal* Vol. 11, No. 4: 195 – 211
9. Roig, F. A. Arboles y arbustos en *Prosopis flexuosa* y *P. alpataco* (*Leguminosae*). *Parodiána* 1987. 5 (1):49-64.
10. Sepúlveda Jiménez, G, Porta Ducoing, H, Rocha Sosa, M. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. 2003. *Revista Mexicana de Fitopatología, A.C.* 21 (003):355-363.
11. Steibel, P. E.. Nombres y Usos de las Plantas Aplicados por los Indios Ranqueles de La Pampa (Argentina), 1997. *Rev. Fac. Agronomía. U.N.L.Pam.* 9 (2): 1-40.

12. Steibel; P.E.; Troiani, H.O. El género *Prosopis* (Leguminosae) en la Provincia de La Pampa (República Argentina). 1999. Rev. Fac. Agronomía. UNLPam 10(2):25-48.

13. Singh B, Bhat TK, Singh B. Potential therapeutic applications of some antinutritional plant secondary metabolites. 2003. J. Agric. Food Chem. 51: 5579-5597.

CONCLUSIONES FINALES

- La evaluación del efecto antimicrobiano de los extractos vegetales sobre *Brucella canis* en medio Mueller Hinton con sangre ovina utilizando el método de los pocillos mostró resultados no coincidentes en comparación con el método de dilución en agar debido a factores intrínsecos de cada extracto vegetal.
- La evaluación del efecto antimicrobiano de los extractos vegetales sobre *Brucella canis* por el método de dilución en agar ofreció resultados confiables, logrando una aparente solución a los inconvenientes evidenciados en el método de los pocillos.
- Utilizando el método de dilución en agar se seleccionaron 6 de las 164 especies vegetales analizadas, con efecto antibacteriano sobre *Brucella canis*: *Schinus fasciculatus*, *Solanum biflorum*, *Larrea nitida*, *Prosopis flexuosa var. depressa*, *Prosopis flexuosa var. flexuosa* y *Larrea cuneifolia*.
- Los resultados obtenidos en los ensayos de Concentración Inhibitoria Mínima permiten concluir que las diluciones 1/10, 1/20 y 1/40 de la fracción

metanólica de *Prosopis flexuosa* var. *depressa* fueron capaces de inhibir el crecimiento de *Brucella canis* en medios sólidos.

- *Schinus fasciculatus* y *Prosopis flexuosa* var. *flexuosa* no mantuvieron en las pruebas de Concentración Inhibitoria Mínima el efecto antibacteriano en una fracción en particular.
- *Larrea cuneifolia* y *Solanum biflorum* no mantuvieron resultados consistentes a lo largo de las repeticiones, por lo que no se puede concluir con seguridad sobre su efecto antibacteriano con el método de diluciones seriadas en agar.
- La fracción metanólica de *Prosopis flexuosa* var. *depressa* inhibió el crecimiento en cultivos in vitro de *Brucella canis*.
- Estudios fitoquímicos revelaron la presencia en la fracción metanólica de *Prosopis flexuosa* var. *depressa* de flavonoides, alcaloides, terpenoides y saponinas. Compuestos pertenecientes a estos grupos químicos han evidenciado actividad antimicrobiana sobre otros microorganismos.