

Actividad antimicrobiana y toxicidad frente a *Artemia salina* del extracto diclorometánico de raíces de *Morinda royoc* L.

Antimicrobial action and toxicity against *Artemia salina* of the dichlormethane extract from *Morinda royoc* L. roots

Janetsy Borroto,^I Reinaldo Trujillo,^{II} Yael C. de la Torre,^{III} Noemí Waksman,^{IV} Martha Hernández,^V Ricardo Salazar^{VI}

^I Máster en Biotecnología Vegetal. Investigador Agregado. Centro de Bioplantas. Laboratorio Ingeniería Metabólica. Universidad de Ciego de Ávila. Ciego de Ávila, Cuba.

^{II} Doctor en Ciencias Biológicas. Investigador Titular. Centro de Bioplantas. Laboratorio Ingeniería Metabólica. Universidad de Ciego de Ávila, Cuba.

^{III} Máster en Ciencias. Investigador. Departamento Química Analítica. Departamento de Química Analítica, Facultad de Medicina, U.A.N.L. Monterrey, México.

^{IV} Doctor en Química Orgánica. Profesor-Investigador. Jefe del Departamento Química Analítica. Departamento de Química Analítica, Facultad de Medicina, U.A.N.L. Monterrey, México.

^V Doctor en Ciencias Biológicas. Investigador Titular. Centro de Bioplantas. Laboratorio Ingeniería Metabólica. Centro de Bioplantas, Universidad de Ciego de Ávila, Cuba.

^{VI} Doctor en Ciencias. Profesor-Investigador. Departamento de Química Analítica, Facultad de Medicina, U.A.N.L. Monterrey, México.

RESUMEN

Introducción: las plantas son una fuente de diversidad natural por la gran variedad de compuestos que sintetizan. Particularmente las antraquinonas resultan un importante grupo de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana y antioxidante.

Objetivos: evaluar la actividad antimicrobiana del extracto diclorometánico de raíces de *Morinda royoc* L., así como su toxicidad contra *Artemia salina*.

Métodos: la actividad antimicrobiana se determinó utilizando el método de microdilución en placa de 96 pozos. Se evaluó la actividad del extracto frente a 7 aislados clínicos de *Candida* spp. y frente a las bacterias *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, *Staphylococcus aureus* ATCC 12598, *Enterococcus faecales*,

Escherichia coli, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*. La toxicidad del extracto se evaluó mediante el ensayo de letalidad con *A. salina*.

Resultados: el extracto crudo fue activo frente a todas las especies de *Candida* evaluadas. La concentración mínima inhibitoria más baja fue 1,95 µg/mL. El extracto mostró fuerte actividad inhibitoria contra *S. aureus*, *E. faecales*, y *E. coli*. El valor más bajo de concentración mínima inhibitoria obtenido fue 31,25 µg/mL. El extracto presentó una toxicidad moderada hacia *A. salina*.

Conclusiones: los resultados obtenidos demuestran el potencial del extracto diclorometánico de raíces de *M. royoc* L. en el tratamiento de infecciones causadas por bacterias y hongos.

Palabras clave: *Morinda royoc* L., antraquinonas, antimicrobiana, *Artemia salina*.

ABSTRACT

Introduction: plants are a source of natural diversity because of the great variety of compounds that they synthesize. Anthraquinones in particular are an important group of secondary metabolites characterized by their antimicrobial and antioxidant action.

Objectives: to evaluate the antimicrobial action of dichloromethane extract from *Morinda royoc* L. roots as well as its toxicity against *Artemia salina*.

Methods: the antimicrobial action was determined by using the broth microdilution in 96-well plate. The extract action against 7 *Candida spp* clinical isolates and against bacteria such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* ATCC 12598, *Enterococcus faecales*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* was evaluated. The extract toxicity was measured using brine shrimp (*Artemia salina*) lethality test.

Results: the crude extract proved to be active against all the tested *Candida* species. The lowest minimal inhibitory concentration was 1.95 µg/mL. The extract showed strong inhibitory action against *S. aureus*, *E. faecales*, and *E. coli*. The lowest minimal inhibitory concentration was 31.25 µg/mL. The extract presented moderate toxicity against *A. salina*.

Conclusions: the results showed the potentialities of dichloromethane extract from *M. royoc* L. roots for the treatment of bacterial and fungal infections.

Key words: *Morinda royoc* L., anthraquinones, antimicrobial, *Artemia salina*.

INTRODUCCIÓN

Las plantas constituyen una fuente importante de diversidad natural por la multitud de compuestos que ellas sintetizan. Algunos han demostrado ser útiles como terapéuticos para el tratamiento de varias afecciones.¹ Las enfermedades infecciosas constituyen uno de los principales problemas de morbilidad y mortalidad en países en vías de desarrollo. Algunos antibióticos disponibles actualmente tienen efectos secundarios indeseables, son ineficaces contra patógenos nuevos o re-emergentes, y(o) conducen al rápido desarrollo de resistencia.² Debido a las serias

limitaciones de los medicamentos actuales es necesario disponer de nuevos agentes antimicrobianos, preferiblemente con nuevos mecanismos de acción y menores efectos tóxicos.

La especie *Morinda royoc* L., que pertenece a la familia Rubiaceae, es una planta silvestre de manigua costera que está distribuida en toda la isla de Cuba. Esta planta presenta propiedades medicinales informadas por diferentes autores.^{3,4} Actualmente, en Cuba, las raíces de *M. royoc* se utilizan para la elaboración de un producto que tiene acción estimulante, revitalizadora, antiestrés e incrementa la libido. Este producto se obtiene a partir de un extracto alcohólico que se emplea como suplemento dietético y se comercializa como PV-2.³

En investigaciones previas se demostró que los extractos diclorometánicos obtenidos de raíces de campo y de raíces cultivadas *in vitro* de *M. royoc* son ricos en antraquinonas,^{5,6} metabolitos para los cuales se ha descrito que poseen actividad antimicrobiana, anticancerígena, antioxidante y antituberculosis, entre otras.⁷⁻¹⁰ Sin embargo, hasta el momento no se ha realizado la evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos diclorometánicos de raíces de *M. royoc*. El objetivo de la presente investigación fue evaluar la actividad antifúngica y antibacteriana del extracto diclorometánico de raíces de *M. royoc* y su toxicidad preliminar frente a larvas de *A. salina*.

MÉTODOS

Material vegetal

La colecta de raíces de *M. royoc* se realizó en enero de 2009 en la costa norte de la provincia Ciego de Ávila, Cuba. Las raíces se lavaron con agua corriente e inmediatamente se utilizaron para la extracción.

Obtención del extracto

Para la extracción se utilizaron 25 g de raíces a las cuales se adicionaron 250 mL de diclorometano y se mantuvieron en la oscuridad por 72 h. El extracto se filtró y se llevó a sequedad por evaporación a presión reducida con una temperatura controlada de 45 °C. El extracto seco se colocó en frascos ámbar y se mantuvo en refrigeración (4 °C) hasta su uso.

Actividad antifúngica y antibacteriana

La actividad antifúngica y antibacteriana se evaluó por el método de microdilución en placa descrito por el *National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)*.^{11,12} En una placa de 96 pocillos se colocaron en cada uno 100 µL del medio RPMI-1640 (levaduras) o *Müller Hilton* (bacterias). Se añadieron 100 µL de la solución del extracto al primer pocillo y a partir de este primer pocillo se realizaron 5 diluciones seriadas. Por último se agregó a cada pozo 100 µL de la suspensión del microorganismo diluida.

Para realizar el ensayo, el extracto crudo de raíces se diluyó hasta tener una concentración de 4 mg/mL tanto en medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma Aldrich) como en medio *Müller-Hinton (Becton, Dickinson & Company)* para levaduras y bacterias, respectivamente. Se utilizaron 50 µL de dimetil sulfóxido (DMSO) para

disolver el extracto. Se realizaron diluciones seriadas hasta obtener concentraciones entre 1 000 y 0,95 µg/mL.

En todos los ensayos se colocaron controles de esterilidad de medio, control de crecimiento y controles positivos. Para el bioensayo de la actividad antifúngica, se utilizó como control positivo el fluconazol (Diflucan[®]) y para el bioensayo de la actividad antibacteriana se utilizaron: cefalotina (*Keflin Lilly*), oxacilina (*BioChemika*), y vancomicina (*Eli Lilly*). Las concentraciones finales de los controles utilizados resultaron de 250 a 0,488 µg/mL.

Todas las cepas tanto de levaduras como de bacterias las proporcionó el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la UANL, México. Se utilizaron 7 aislados clínicos de las levaduras: *Candida albicans* No. 501, *Candida albicans* No. 53, *Candida albicans* No. 498, *Candida tropicalis* No. 166, *Candida glabrata* No. 84, *Candida krusei* No. 168, *Candida parasilosis* No. 96. Además se utilizaron 7 cepas de bacterias: *Staphylococcus aureus resistente a meticilina*, *Staphylococcus aureus ATCC 12598* *Enterococcus faecales*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*. Para la preparación de los inóculos se obtuvieron cultivos jóvenes de las cepas de bacterias y levaduras en el medio sólido de Müller-Hinton y papa dextrosa *Sabouroud* (*Becton, Dickinson and Company*), respectivamente. Las placas se incubaron a 37 °C por 24 h. Para las levaduras se preparó una suspensión de cada una de las cepas a 0,5 de *McFarland* y se realizaron diluciones 1:100 y 1:20 en medio RPMI-1640. Para las bacterias se preparó una suspensión de cada una de las cepas a 0,5 en la escala de *McFarland* y se realizó una dilución 1:50 con medio líquido *Müller Hilton*.

Evaluación de la toxicidad del extracto mediante el ensayo de letalidad con Artemia salina

Se valoró la actividad tóxica *in vitro* del extracto mediante el ensayo de letalidad con *Artemia salina*.¹³ Se evaluaron 3 concentraciones del extracto: en un vaso de precipitado, con un volumen total de 10 mL de agua de mar artificial se colocaron 10 larvas de *A. salina* y el extracto a concentración final de 1 000, 100 y 10 µg/mL. Después de 24 h de contacto, se contaron las larvas que sobrevivieron. La toxicidad se expresó en porcentaje de mortalidad y se interpretó: 0-10 % no tóxico, 11-50 % moderadamente tóxico, 51-90 % altamente tóxico y 100 % extremadamente tóxico. Los ensayos se realizaron por triplicado. Los porcentajes de mortalidad se llevaron a gráficos en función de la concentración utilizada y la línea de tendencia potencial fue obtenida. A partir de la ecuación de la gráfica se calculó la concentración que es letal para 50 % de la población expuesta (CL₅₀).

RESULTADOS

La actividad antifúngica del extracto de raíces de *M. royoc* se muestra en la tabla 1. El extracto mostró fuerte actividad a bajas concentraciones (1,95-15,6 µg/mL), contra las levaduras utilizadas. El fluconazol que se utilizó como control positivo de inhibición del crecimiento; mostró valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) entre 31,25 µg/mL (101,8 µM) para *C. glabrata* (HU84) y 0,5 µg/mL (1,6 µM) para *C. albicans* (HU501). Por el contrario, el extracto inhibió el crecimiento de las levaduras ensayadas con valores de CMI de 15,6 µg/mL, en la mayoría de los casos. La cepa más susceptible fue *C. glabrata* con CMI de 1,95 µg/mL, la cual resultó menor que la obtenida con el fluconazol (31,25 µg/mL) (tabla 1).

Tabla 1. Actividad antifúngica del extracto diclorometánico de raíces de *Morinda royoc* comparado con fluconazol como control

Microorganismo	CMI ($\mu\text{g/mL}$)	
	Extracto	Fluconazol
<i>Candida albicans</i> 501	15,6	0,488
<i>Candida albicans</i> 53	15,6	15,63
<i>Candida albicans</i> 498	15,6	1,95
<i>Candida tropicalis</i>	15,6	1,95
<i>Candida glabrata</i>	1,95	31,25
<i>Candida krusei</i>	15,6	3,9
<i>Candida parasilosis</i>	15,6	0,975

CMI: concentración mínima inhibitoria.

La actividad antibacteriana del extracto se muestra en la [tabla 2](#). De los resultados obtenidos se puede notar que las bacterias grampositivas: *S. aureus* resistente a oxacillina, *S. aureus* ATCC 12598 y *E. faecales*, resultaron las más sensibles con valores de CMI entre 31,25 y 62,5 $\mu\text{g/mL}$. El extracto no fue activo contra *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*, incluso a la concentración más alta de 1 000 $\mu\text{g/mL}$, solo fue activo contra la bacteria gramnegativa *E. coli* con valores de CMI de 250 $\mu\text{g/mL}$.

Tabla 2. Actividad antibacteriana del extracto diclorometánico de raíces de *Morinda royoc* comparado con los antibióticos comerciales cefalotina, oxacillina y vancomicina

Microorganismo	CMI ($\mu\text{g/mL}$)			
	Extracto	Cefalotina	Oxacillina	Vancomicina
<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a oxacillina	31,25	62,5	125	1,95
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12598	62,5	0,488	0,488	0,488
<i>Enterococcus faecales</i>	31,25	31,25	31,25	1,95
<i>Escherichia coli</i>	250	1	0,487	> 250
<i>Acinetobacter baumannii</i>	> 1 000	62,5	> 250	> 250
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	> 1 000	> 250	> 250	> 250
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	> 1 000	62,5	> 250	> 250

CMI: concentración mínima inhibitoria.

En el bioensayo de actividad antibacteriana se utilizaron 3 medicamentos diferentes como controles positivos. La cepa *S. aureus* resistente a oxacillina fue resistente a oxacillina (CMI 125 $\mu\text{g/mL}$ o 283,2 μM) y cefalotina (CMI 62,5 $\mu\text{g/mL}$ o 149,4 μM),

pero fue susceptible a vancomicina (CMI 1,9 µg/mL o 1,3 µM). La vancomicina fue el mejor medicamento contra todas las bacterias grampositivas.

El bioensayo de letalidad con *A. salina* demostró que la toxicidad del extracto de raíces de *M. royoc* es dependiente de la concentración, es decir, no fue tóxico a concentraciones menores que 10 µg/mL; sin embargo, mostró una toxicidad moderada a concentraciones entre 100 y 1 000 µg/mL, la CL₅₀ fue 395,4 µg/mL (fig.).

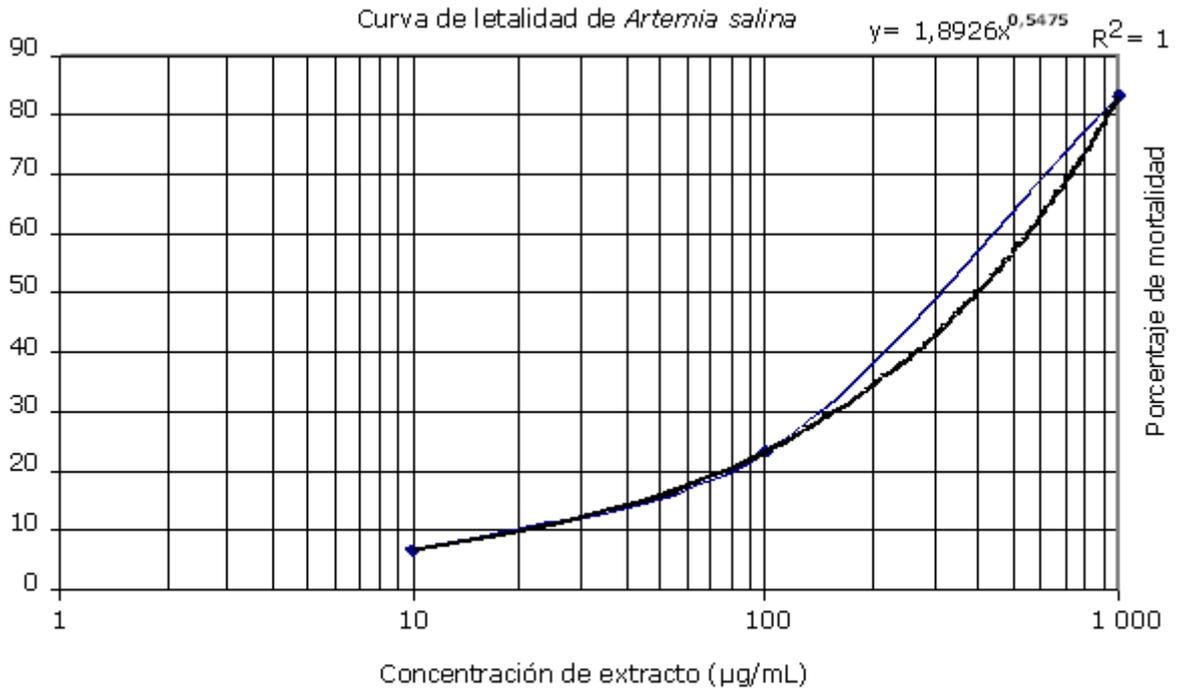


Fig. Curva de letalidad de *Artemia salina* expuesta a diversas concentraciones del extracto de raíces de *Morinda royoc*.

La viabilidad de las larvas en el grupo control (sin extracto) fue de 100 % y no se observaron alteraciones en su motilidad (tabla 3).

Tabla 3. Porcentaje de mortalidad del extracto diclorometánico de *Morinda royoc* frente a larvas de *Artemia salina*

	Concentración (µg/mL)	Total	Vivas	Muertas	% superviviencia	% mortalidad
Control	0	30	30	0	100	0
Extractos	10	30	28	2	93,3	6,7
	100	30	23	7	76,6	23,4
	1 000	30	5	25	16,6	83,4

DISCUSIÓN

Clínicamente se desea tener un medicamento (extracto o compuesto) con potencial para inhibir el crecimiento de varias cepas de *Candida*, porque varias especies de este género pueden provocar candidiasis; la cual se conoce es la cuarta de las infecciones sistémicas más comunes y en la mayoría de los casos es causada por *C. albicans* (50-60 %), *C. glabrata* (15-20 %), *C. parapsilosis* (10-20 %), *C. tropicalis* (6-12 %), y *C. krusei* (1-3 %).¹⁴ En este contexto, es muy interesante que el extracto crudo mostró una excelente actividad contra aislados clínicos de las especies causantes de candidiasis. Su tratamiento a menudo requiere la combinación de estos agentes, sin embargo, se ha observado resistencia y efectos adversos en el tratamiento con estos antifúngicos.¹⁵

En un estudio sobre actividad anticándidas de extractos de plantas medicinales canadienses se informó que valores por debajo de 1 000 µg/mL de CMI deben aceptarse como extractos con fuerte potencial antifúngico. Los autores informan CMI de 800 µg/mL para *Epilobium augustifolium* contra *C. albicans* ATCC 90028.¹⁶ Teniendo en cuenta este planteamiento, el extracto de raíces de *M. royoc* tiene un fuerte potencial para utilizarse como antifúngico.

Varios autores informan que las bacterias grampositivas son más susceptibles que las gramnegativas;^{17,18} lo cual coincide con los resultados obtenidos para el extracto de raíces de *M. royoc*. La pared celular de las bacterias grampositivas es menos compleja y carecen de una filtración efectiva contra grandes moléculas, debido al tamaño de los poros en su envoltura celular, son menos selectivas.¹⁹ En este contexto, el extracto de raíces transformadas de *Maytenus senegalensis* mostraron actividad solo frente a las bacterias grampositivas *Bacillus subtilis* y *S. aureus* y no fue activo frente a las bacterias gramnegativas *E. coli* y *K. pneumoniae*.²⁰

El método para la evaluación de la letalidad en *A. salina* es considerado un instrumento útil para la evaluación preliminar de toxicidad. Por la simplicidad del procedimiento se utiliza para el monitoreo de toxicidad en extractos de planta, así como en fraccionamientos biodirigidos.¹³ El extracto diclorometánico de raíces de *M. royoc* resultó moderadamente tóxico contra *A. salina* con un CL₅₀ de 395,4 µg/mL, aunque experimentos de citotoxicidad son necesarios para comprobarlo.

Los resultados obtenidos demuestran el potencial de este extracto en el tratamiento de infecciones causadas por bacterias y hongos que afectan al hombre. Es necesario realizar otros estudios para evaluar la toxicidad del extracto en animales experimentales y establecer su seguridad para proponer su uso como agente antimicrobiano.

AGRADECIMIENTOS

Apoyo financiero o de otra naturaleza que sustenta el trabajo

Proyecto CITMA nacional No. 266: Producción de metabolitos secundarios (antraquinonas [AQs]) a través de la aplicación de las técnicas de cultivo en células y tejidos en *Morinda royoc* L. y *Morinda citrifolia* L.

Beca de posgrado ofertadas por la subsecretaría de Educación Superior e Investigación de la Secretaría de Educación de México.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kolewe ME, Gaurav V, Roberts SC. Pharmaceutically Active Natural Product Synthesis and Supply via Plant Cell Culture Technology. *Mol Pharmaceutics*. 2008;5(2): 243-56.
2. White TC, Marr KA, Bowden R. Factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clinical, Cellular, and Molecular. Clinical Microbiology Reviews*. 1998;11(2): 382-402.
3. Scull I, Cabrera MY, Cabrera I. Suplemento alimenticio de origen natural y su procesamiento de obtención. Instituto politécnico "Villenas Revolución" La Habana. Cuba Patente N° CU22628 A1 2000.
4. Hernández J, Volpato G. Herbal mixtures in the traditional medicine of Eastern Cuba. *J Ethnopharmacol*. 2004;90(2):293-316.
5. Rivas M. Determinación de compuestos fenólicos en plantas de *Morinda royoc* L.: Actividad antioxidante [Tesis de Maestría]. Centro de Bioplantitas, Universidad de Ciego de Ávila, Cuba; 2006.
6. Borroto J, Coll J, Rivas M, Blanco M, Concepción O, Tandrón YA, et al. Anthraquinones from *in vitro* root culture of *Morinda royoc* L. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 2008;94(2): 181-7.
7. Mishra BB, Kishore N, Tiwari VK, Singh DD, Tripathi V, Hidalgo JA, Vazquez JA. A novel antifungal anthraquinone from seeds of *Aegle marmelos* Correa (family Rutaceae). *Fitoterapia*. 2010;81(2):104-7.
8. Kamiya K, Hamabe W, Tokuyama S, Hirano K, Satake T, Kumamoto-Yonezawa Y, et al. Inhibitory effect of anthraquinones isolated from the Noni (*Morinda citrifolia*) root on animal A-, B- and Y-families of DNA polymerases and human cancer cell proliferation. *Food Chemistry*. 2010;118(3): 725-30.
9. Galindo F, Kabir N, Gavrilovic J, Russell DA. Spectroscopic studies of 1,2-diaminoanthraquinone (DAQ) as a fluorescent probe for the imaging of nitric oxide in living cells. *Photochem Photobiol Sci*. 2008;7(1):126-30.
10. Kanokmedhakul K, Kanokmedhakul S, Phatchana R. Biological activity of Anthraquinones and Triterpenoids from *Prismatomeris fragrans*. *J Ethnopharmacol*. 2005;100(3): 284-8.
11. Wayne PA. National for Committee Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast, approved standard 2002a; NCCLS document M27-A.
12. Wayne PA. National for Committee Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. In 12th informational Supplement M100S12. 2002b; NCCLS document M100S12.
13. Carballo JL, Hernández-Inda ZL, Pérez P, García-Grávalos MD. A comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnology*. 2002;2:17-21.

14. Hidalgo JA, Vazquez JA. Candidiasis, emedicine from WebMD, 2008 [cited Sep 2010]. Available in: <http://emedicine.medscape.com/article/213853-overview>
15. Carrillo-Muñoz AJ, Giusiano G, Ezkurra PA, Quindós G. Antifungal agents. Mode of action in yeast cells. Rev Española Quimioterapia. 2006; 19(2): 130-9.
16. Carmeli Y, Troillet N, Eliopoulos GM, Samore MH. Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. Antimicrobial Agents Chemotherapy. 1999; 43(6): 1379-82.
17. Krolicka A, Szpitter A, Gilgenast E, Romanik G, Kaminski M, Lojkowska E. Stimulation of antibacterial naphthoquinones and flavonoids accumulation in carnivorous plants grown *in vitro* by addition of elicitors. Enzyme Microbial Technology. 2008; 42(3): 216-21.
18. Chouna JP, Nkeng-Efouet PA, Lenta BN, Devkota KP, Neumann B, Stammler HG; et al. Antibacterial endiandric acid derivatives from *Beilschmiedia anacardioides*. Phytochemistry. 2009; 70(5): 684-8.
19. Gould D, Booker C. Applied Microbiology for Nurses. Aardvark Editorial, Mcndham, Suffolk, London 2000. pp: 75-94.
20. Jain N, Light M, van Staden J. Antibacterial activity of hairy-root cultures of *Maytenus senegalensis*. South African J Botany. 2008; 74(1): 163-6.

Recibido: 9 de marzo de 2010.

Aprobado: 30 de diciembre de 2010

Janetsy Borroto Blanco. Centro de Bioplantas, Universidad de Ciego de Ávila. Carretera a Morón, Km 9. CP 69450. Ciego de Ávila, Cuba. Correo electrónico: jborroto@bioplantass.cu