

ESTUDIO PRELIMINAR DE EFECTOS ANTIMICROBIANOS “IN VITRO” DEL MUSGO *Sphagnum magellanicum* BRID.

PRELIMINARY STUDY ON ANTIMICROBIAL EFFECTS “IN VITRO” OF *Sphagnum magellanicum* BRID.

Pamela Wallach*; Luis López L**, Christel Oberpaur*, Flavia Vacarezza* y Liliana Maier *

* Unidad de Microbiología; Facultad de Medicina Veterinaria y Recursos Naturales; Universidad Santo Tomás.

** Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas; Universidad de Chile.

ABSTRACT

Key words: Moss, antimicrobial, medicinal plants.

Among the current tendencies in the study and use of medicinal plants, efforts are concentrated on the search for complexes that provide new active substances with antimicrobial activity. In the present study evaluations of the antimicrobial activity of *Sphagnum magellanicum* moss were carried out in 4 states: fresh, dried, sterilized and non-sterilized. In order to isolate the active components from the moss, different extractions were prepared using water, ethyl alcohol at 96%, acetone and hexane, and a process of rehydration, in the case of dried moss. The following bacteria and fungi were used as test microorganisms: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Pseudomona aeruginosa*, *Malassezia pachydermatis* and *Candida albicans*. The selection of these microorganisms, was made so that Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria and yeast-like fungi groups would be included. The technique of Kirby-Bauer was used, a standard to measure sensitivity by diffusion in agar. The results showed antimicrobial activity only by Sphagnum moss in the fresh state and without being sterilized, extracted with acetone and hexane. The most sensitive microorganisms to the moss extract were the yeast-like fungi (which presented a greater diameter halo of inhibition), followed by Gram-positive bacteria and finally the Gram-negative bacteria. No effect was observed on *P. aeruginosa*.

RESUMEN

Palabras claves: Musgo, antimicrobiano, plantas medicinales.

Entre las tendencias actuales más generalizadas en el estudio y utilización de plantas medicinales se encuentran los esfuerzos que se realizan en la búsqueda de complejos que proporcionen nuevas sustancias activas con efectividad antimicrobiana.

En el presente estudio se realizaron evaluaciones de la actividad antimicrobiana del musgo *Sphagnum magellanicum* (Pompón) en 4 estados; fresco, disecado, esterilizado y sin esterilizar. Para llegar al principio activo del musgo se realizaron distintas extracciones a partir de agua, alcohol etílico al 96%, acetona y hexano y un proceso de rehidratación con calor, para el caso del musgo disecado. Se emplearon para esta ocasión, como microorganismos de prueba, las siguientes bacterias y hongos: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Pseudomona aeruginosa*, *Malassezia pachydermatis* y *Candida albicans*. La selección de las cepas antes mencionadas se realizó con la intención de tener representantes de los grupos de las bacterias Gram positivas, Gram negativas y hongos levaduriformes. El método utilizado fue la técnica de Kirby-Bauer, que es estándar para la realización de las pruebas de sensibilidad por difusión en agar.

Los resultados obtenidos mostraron actividad antimicrobiana sólo del musgo en estado fresco

*Autor: Correspondencia a Ejército 146; Santiago, Chile. Teléfono 056-023624763; e-mail: lmaier@ust.cl. Este trabajo es parte de una tesis de M.V. guiada por Mg Sc Liliana Maier.

y sin esterilizar, a partir del extracto realizado con acetona y hexano. Los microorganismos más sensibles frente al musgo fueron los hongos levaduriformes (los cuales presentaron un mayor diámetro del halo de inhibición), luego bacterias Gram positivas y en último lugar las Gram negativas. Sobre *P. aeruginosa* no se observó ninguna actividad.

INTRODUCCIÓN

La sociedad actual cada día demanda productos con menor contenido de aditivos y sustancias químicas, ya que algunos de éstos son sospechosos de poseer cierto grado de toxicidad (Nychas, 1995). La ventaja de los medicamentos naturales de origen vegetal, radica en que los principios activos existentes en las plantas, además de ser más complejos que los sintéticos, actúan de manera combinada, resultando más difícil para los gérmenes patógenos desarrollar resistencia frente a estas drogas. Es por esto que en todo el mundo se vienen desarrollando estudios encaminados a encontrar especies tanto del reino vegetal como animal que contengan principios de interés para la industria farmacológica (Toledo *et al.*, 1990). Esto también es aplicable a otras industrias como la alimentaria, donde es posible obtener un incremento de la vida útil de los alimentos, por ejemplo, sin la introducción de aditivos.

Sphagnum magellanicum Brid. es un musgo que pertenece a la división Bryophyta. Dentro de las diversas cualidades que se le han descrito a este musgo, destacan entre otras su poder de absorción y retención de agua, características que se aprovechan para fines industriales y agrícolas (Schofield, 1985). Se utiliza como agente de filtración, tratamiento de aguas servidas y para el control de derrames de petróleo en el mar, dado su capacidad filtrante y poder absorbente. En forma deshidratada se utiliza como absorbente de aceites, combustibles derivados del petróleo y como descontaminante de metales pesados, pesticidas y otros productos (Crignola y Ordoñez, 2002). Existen antecedentes históricos del uso de musgos *Sphagnum* en la recuperación de

heridas aplicadas a soldados durante la segunda guerra mundial con muy buenos resultados, anticipándose a los tratamientos con penicilina (Hauser, 1996).

Las briófitas corresponden a plantas que carecen de sistema vascular, debido a ello se encuentran principalmente en áreas de luz escasa y humedad. (Martínez *et al.*, 1997, Díaz *et al.*, 2005). La mayoría son plantas herbáceas pequeñas, que crecen muy cerca unas de otras formando cojines sobre rocas y suelo, o sobre troncos y hojas de los bosques (Schofield, 1985).

La recolección en Chile se concentra entre las regiones IX a XII, donde se presenta el clima que hace propicio su desarrollo, "templado frío", con una temperatura promedio de 10°C (Whinam y Buxton, 1997). Los musgos no poseen las mismas barreras anatómicas que las plantas vasculares, por lo que se ha sugerido que la acumulación de ciertos compuestos, como los flavonoides, ejercen un rol fundamental en su defensa y adaptación a condiciones causantes de estrés oxidativo. Esta capacidad de actuar como antioxidante natural le confiere a este musgo una gran aplicación en el campo de los alimentos, la industria, la medicina, la cosmética, entre otros (Aubad *et al.*, 2007).

El mercado del musgo chileno ha mostrado un constante crecimiento durante los últimos diez años (Orueta, 2007). Sin embargo no ha existido hasta la fecha una reglamentación ni orden jurídico suficiente, que permitan una extracción sustentable en el tiempo para este valioso recurso natural (Oberpaur, 2008).

A fin de aportar mayores antecedentes de las posibles aplicaciones de este musgo, en el presente trabajo se investiga el comportamiento de extractos vegetales obtenidos a partir del

musgo *S. magellanicum*, planta de la familia Sphagnaceae, conocido vulgarmente como "pompón", frente a tres cepas de bacterias Gram positivas, tres Gram negativas y dos especies de hongos levaduriformes, con el objetivo de visualizar una futura utilización para la formulación de un fármaco natural u otras múltiples aplicaciones en la industria médica, alimentaria, farmacéutica, u otras.

El objetivo a investigar fue determinar posibles efectos antimicrobianos "in vitro" del musgo *S. magellanicum* en distintos estados: Fresco y desecado, esterilizado y sin esterilizar, sobre bacterias Gram positivas, Gram negativas y hongos levaduriformes.

MATERIALES Y MÉTODO

Musgo *S. magellanicum* (mezcla de varias plantas de 5 kg. aprox.) al estado fresco y deshidratado procedente de un pantano en el sector Metri, Carretera Austral Km 27, Puerto Montt.

Cepas microbianas ATCC y de campo de Bacterias Gram positivas: *Staphylococcus aureus* Rosenbach atcc 25.923, *Streptococcus agalactiae* Lehmann y Neumann atcc 49.619, *Bacillus cereus* Frankland y Frankland atcc 10.876, Gram negativas: *Salmonella enteritidis* atcc 1833-99, *Escherichia coli* (Migula) Castellani y Chalmers atcc 25.922, *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula atcc 27.853, y Hongos levaduriformes: *Malassezia pachydermatis* (aislado clínico) y *Candida albicans* (Robin) Berkhout (aislado clínico).

1. Solventes: Asociación de 400mL de metanol, 1.100mL de acetona y 2.200mL de hexano. Equipos y Material fungible común de laboratorio.

Método: Se realizó de acuerdo a lo efectuado por Durán *et al.*, (2000) y Rangel *et al.*, (2001) modificado, aplicado al musgo *S. magellanicum*.

Extracción desde musgo seco. Una parte de las muestras de musgo fue sometida a esterilización en autoclave a 120°C por 15 minutos a 1 ½ atmósfera de presión. Las restantes muestras no se esterilizaron.

Para la obtención del extracto, las muestras de musgo se dispusieron en un recipiente con agua destilada, se calentó a 60°C en un calefactor

durante cuatro horas, para luego ser filtrado. A esta mezcla se le agregó sulfato de sodio al 5% para separar la humedad. Se llevó a un embudo de decantación para separar los pigmentos del resto de las impurezas. El contenido se llevó al rotavapor, a temperatura de 40°C por aproximadamente 30 minutos, hasta evaporar todos los solventes. Así se obtuvo la sustancia, con la que se impregnaron los sensidiscos.

Extracción desde musgo fresco. El musgo fue lavado con abundante agua potable corriente, separando además todas las impurezas y posteriormente se enjuagó con agua destilada. Luego se dejó estilar en un colador para eliminar el excedente de agua, y se dejó remojando dos minutos en metanol. Para mejorar su acción se dejó cinco minutos en la campana de extracción de filtro de carbón activado.

Para realizar la extracción del pigmento se molieron 200g del musgo en un mortero y se agregó 1.100mL de acetona y 2.200mL de hexano.

La solución obtenida se separó de las hojas mediante un filtrado con algodón. A esta mezcla se le agregó sulfato de sodio para separar la humedad. Lo obtenido se llevó a un embudo de decantación. El contenido se sometió a rotavapor a una temperatura de 40°C por aproximadamente 30 minutos, hasta evaporar todos los solventes, obteniéndose así finalmente, la solución con la que se impregnaron los sensidiscos.

La solución final se mantuvo refrigerada y protegida de la luz en botellas forradas con papel aluminio por un período máximo de una semana. **Antibiograma.** Se preparó un inóculo de acuerdo a un estándar de turbidez BaSO₄, correspondiente a un estándar 0,5 Mc Farland o su equivalente óptico (10⁶ UFC/mL⁻¹). Éste inóculo contuvo un cultivo bacteriano de 24 horas de incubación, que se sembró en medio Muller Hinton a 37°C, el que fue transferido a las placas en no más de 15 minutos desde que fue estandarizado.

Los antibióticos ensayados en bacterias Gram positivas fueron amoxicilina (10 ug) y cefradina (30ug), en Gram negativas se utilizó sulfa trimetoprim (25ug) y neomicina (30 ug) y en los hongos miconazol (15 mcg) y nistatina (5 mcg). A las 24 horas de incubación se realizó la lectura de las placas. Todos los ensayos se realizaron en triplicado. La variable en este estudio fue descrita en términos de Promedio, Desviación Estándar

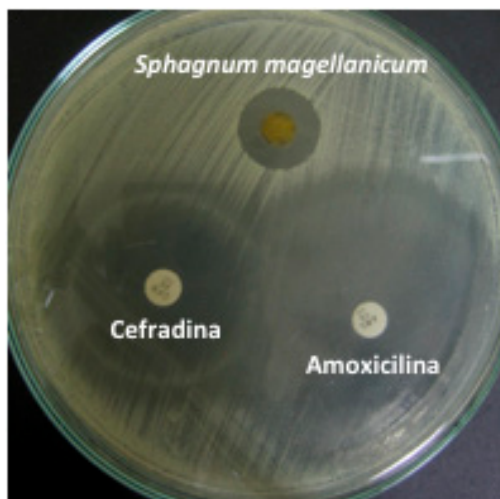


Figura 1. Efecto antibacteriano sobre *S. aureus*
Figure 1. Antimicrobial effect on *S. aureus*

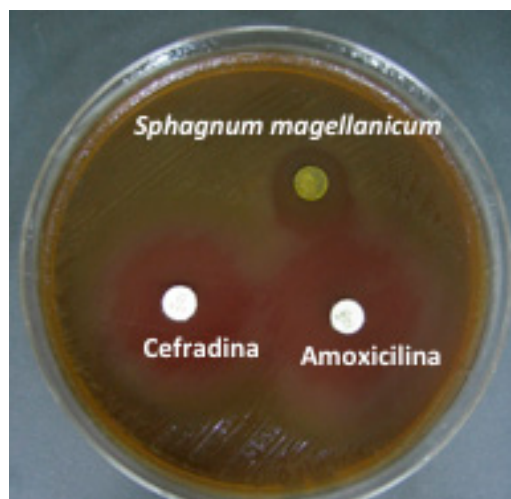


Figura 2. Efecto antibacteriano sobre *S. agalactiae*
Figure 2. Antimicrobial effect on *S. agalactiae*

y Coeficiente de Variación, según especie de las bacterias y el tipo de microorganismo. La diferencia entre los promedios se determinó mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La extracción desde musgo disecado, tanto esterilizado como sin esterilizar, no mostró actividad antimicrobiana bajo las condiciones ensayadas. Esto podría explicarse debido a que es altamente probable que los componentes con acción antimicrobiana presentes en el musgo, sean termolábiles.

Resultados obtenidos del extracto a partir de musgo fresco

Al igual que en el caso del musgo disecado, las extracciones realizadas con agua y metanol no mostraron actividades antimicrobianas. Sin embargo al utilizar extractos obtenidos mediante acetona y hexano, se obtuvo halos de inhibición. Ambos solventes se probaron separadamente sobre los cultivos bacterianos y fúngicos (controles) sin observarse ningún efecto inhibitor.

En el Cuadro 1 se observa que para *S. aureus* el extracto obtenido de *S. magellanicum* resulta comparable al efecto inhibitor ejercido por el

Cuadro 1. Respuesta antimicrobiana del extracto de musgo *S. magellanicum* sobre bacterias Gram positivas.

Table 1. Antimicrobial response of *S. magellanicum* moss extract on Gram positive bacteria.

Ensayo	<i>S. aureus</i> (mm)	<i>S. agalactiae</i> (mm)	<i>B. cereus</i> (mm)
Amoxicilina	48,00±2,64a	24,33±0,57a	6,67±0,57b
Cefradina	34,33±0,57ab	24,66±0,57a	22,33±2,08 a
<i>Sphagnum magellanicum</i>	13,33±2,08 b	16,66±0,57b	8,67±0,57b

Letras iguales en las columnas indican ausencia de diferencia significativa según Tukey ($p \leq 0,05$).

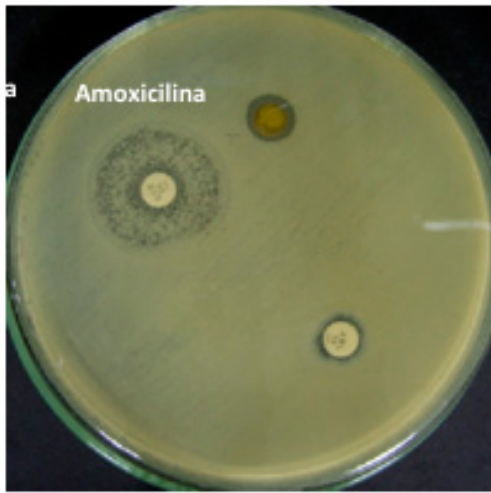


Figure 3. Efecto antibacteriano sobre *B. cereus*
Figure 3. Antimicrobial effect on *B. cereus*

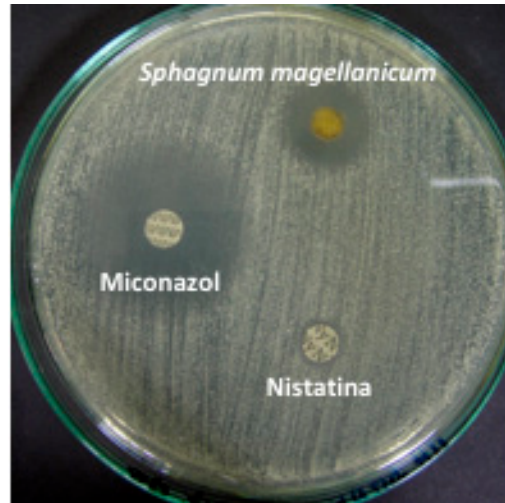


Figura 4. Efecto del extracto sobre *C. albicans*
Figure 4. Effect of the extract on *C. albicans*.

antibiótico cefradina. En *S. agalactiae* el efecto de los antibióticos es superior al mostrado por el extracto. En cambio en *B. cereus* el efecto inhibitor del extracto sobre el microorganismo es similar al ejercido por amoxicilina. (Ver Figuras 1,2 y 3)

Existen varios estudios realizados a partir de plantas, que demuestran actividad antibacteriana contra *S. aureus*, lo que concuerda con los resultados de este ensayo efectuado con el musgo *S. magellanicum*. Dentro de estos estudios se puede mencionar que los extractos etanólicos, acetónicos y acuosos de Chilca blanca (*Baccharis nitida* (Ruiz & Pav.) Pers) también mostraron actividad antimicrobiana contra *S. aureus* (Rangel *et al*, 2001). Del mismo modo los extractos orgánicos y acuosos de tilo (*Justicia pectorales* Jacq.), según Vera (2007) también evidenciaron halos de inhibición al ser ensayados frente a *S. aureus*.

El halo producido por el musgo *S. magellanicum* en *B. cereus* fue menor que el generado frente a Cefradina, sin embargo, el halo originado por *S. magellanicum* presentó una mayor nitidez que el anterior (ver figura 3), esto evidencia que no existieron colonias resistentes a la acción antimicrobiana contenida en el musgo.

En trabajos previos realizados con otros tipos de musgos se demuestra que algunas especies de musgos presentan actividad antimicrobiana

contra algunas bacterias, dentro de estas se menciona *B. cereus* (Singh *et al.*, 2006).

En el Cuadro 2 se evidencia que el extracto de musgo tiene un efecto inhibitor reducido para el caso de bacterias Gram negativas, observándose una respuesta menor, en comparación con las bacterias Gram positivas.

La acción más potente presentada por el extracto del musgo en bacterias Gram positivas en comparación a las Gram negativas, puede

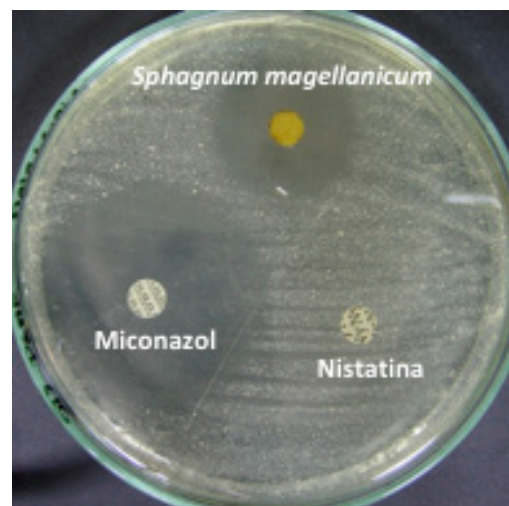


Figura 5. Efecto del extracto sobre *M. pachydermatis*
Figure 5. Effect of the extract on *M. pachydermatis*

Cuadro 2. Respuesta antimicrobiana del extracto de musgo *S. magellanicum* sobre bacterias Gram negativas.**Table 2. Antimicrobial response of *S. magellanicum* moss extract on Gram negative bacteria.**

Ensayo	<i>E. coli</i> (mm)	<i>S. enteritidis</i> (mm)	<i>P.aeruginosa</i> (mm)
Sulfatrimetoprim	26,33± 0,58a	26,33± 2,31a	0,00 ± 0,00 b
Neomicina	18,67± 0,58b	23,67± 1,15a	14,67 ± 0,58a
<i>Sphagnum</i> <i>magellanicum</i>	8,67± 2,31c	7,67±1,53b	0,00±0,00b

Letras iguales en las columnas indican ausencia de diferencia significativa según Tukey ($p < 0,05$).

probablemente explicarse por algún efecto sobre el péptidoglicano que conforma la pared de estos microorganismos. En tal caso su actividad podría asemejarse a la de los antibióticos betalactámicos. En general, los resultados del presente estudio se asemejan bastante a los informados por Montenegro *et al*, (2009), con excepción de la respuesta evidenciada frente a cepas de *S. aureus* en donde no observaron efectos inhibitorios sobre este agente.

Como se observa en el Cuadro 3 los mayores halos de inhibición fueron obtenidos sobre ambos tipos de hongos levaduriformes. (Ver Figuras 4 y 5). Tanto *Candida* como *Malassezia* presentaron un halo de mayor diámetro al ser expuestas a miconazol, a diferencia de la respuesta obtenida frente a nistatina donde la actividad fue mínima.

Estos resultados demuestran que existe un evidente efecto antifúngico del extracto del musgo *S. magellanicum* en estado fresco, sobre hongos levaduriformes, aún mayor que sobre las bacterias Gram positivas.

Esta investigación, además entrega importantes antecedentes metodológicos, para preservar dicha condición, abriendo una esperanza para futuros estudios más acabados, tendientes a la identificación de los probables compuestos fenólicos, responsables específicos de esta respuesta farmacológica.

En este estudio el musgo *S. magellanicum* mostró un mayor poder antibacteriano contra bacterias Gram positivas que contra Gram negativas (si se comparan los promedios del Cuadro N°1 y N°2), lo que coincide con los

Cuadro 3. Respuesta antimicrobiana del extracto de musgo *S. magellanicum* sobre hongos levaduriformes.**Table 3. Antimicrobial response of *S. magellanicum* moss extract on yeast-like fungi.**

Ensayo	<i>C. albicans</i> (mm)	<i>M.pachidermatis</i> (mm)
Miconazol	28,67± 1,15a	40,00± 0,00a
Nistatina	5,00± 0,00 c	0,00± 0,00c
<i>Sphagnum</i> <i>magellanicum</i>	24,00± 0,00 b	24,67± 0,58b

Letras iguales en las columnas indican ausencia de diferencia significativa según Tukey ($p < 0,05$).

resultados en el estudio realizado por Kang *et al.*, (2006).

CONCLUSIONES

Se observaron fuertes evidencias de efectos antimicrobianos "in vitro" del musgo *Sphagnum magellanicum*.

El extracto de *Sphagnum magellanicum* demostró mejores efectos antimicrobianos sobre hongos levaduriformes, luego sobre bacterias Gram positivas y finalmente sobre Gram negativas.

Sólo se obtuvieron resultados positivos a partir de extractos de musgo en estado fresco y sin esterilización.

BIBLIOGRAFIA

- AUBAD, P.; ROJANO, B.; LOBO, T. 2007. Actividad Antioxidante en Musgos. *Scientia Et Technica* 33:23-26.
- CRIGNOLA, P.; ORDOÑEZ, A. 2002. Perspectivas de Utilización de los Depósitos de Turba de la Isla de Chiloé, Décima Región de Los Lagos, Chile. Servicio Nacional de Geología y Minerología. Simposio Internacional de Geología Ambiental para planificación del uso del territorio, pp 35-39.
- DIAZ, F.; LARRAIN, J.; ZEGERS, G. 2005. Antecedentes sobre la Importancia de las Turberas y el Pompón en la Isla de Chiloé. Fundación Senda Darwin, 33p.
- DURAN, M.; MORENO, A. M. 2000. Evaluación de Algunas Mezclas de Solventes en la Extracción de Carotenoides del Pericarpio de Tamarindo. *Ciencia y Tecnología Alimentaria* 3(1):34-38.
- HAUSER, A. 1996. Los depósitos de turba en Chile y sus perspectivas de utilización. *Revista Geológica de Chile* 23(2): 217-231.
- KANG, S.J.; KIM, S.H.; LIU, P.; JOVEL, E.; TOWERS, G.H.N. 2006. Antibacterial Activities of Some Mosses Including *Hylocomium splendens* from South Western British Columbia. *Fitoterapia* 156-158;373-376.
- MARTINEZ, M.J.; MOLINA, N.; BAUCOURT, E. 1997. Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de *Psidium guajava* L. (guayaba). *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 2:12-14.
- MONTENEGRO, G.; PORTALUPPI M.; SALAS F.; DIAZ M. 2009. Biological properties of the Chilean native moss *Sphagnum magellanicum*. *Biol. Res* 42: 233-237.
- NYCHAS, G.J.E. 1995. Natural Antimicrobials from Plants. In Gould, G.W. (ed) *New methods of food preservation*. New Methods of Food Preservation. London, Chapman & Hall. pp. 59-89.
- OSBERPAUR, C. 2008. Resumen de resultados. Prospección y difusión tecnológica para la extracción sustentable de musgo (*Sphagnum sp*) en Chile. Proyecto PDT 207-6569 Innova Chile, 44p.
- ORUETA, E.A. 2007. Análisis de Mercado del Musgo Chileno. Tesis Ing. Agr. Santiago, Chile, Universidad Santo Tomás, Escuela de Agronomía. 88 p.
- RANGEL, D., GARCIA, I., VELASCO, J., BUITRAGO, D.; VELAZCO, E. 2001. Actividad Antimicrobiana de los Extractos Etanólico, Acetónico y Acuoso de *Baccharis nitida* (Ruiz et Pavon) Pers. *Revista de la Facultad de Farmacia* 42:43-46
- SCHOFIELD, W.B. 1985. *Introduction to Bryology*. Nueva York, Mcmillan Publishing Company. 431p.
- SINGH, M.; RAWAT, A.K.S.; GOVINDARAJAN, R. 2006. Antimicrobial Activity of some Indian Mosses. *Phytotaxonomy* 6:26-30
- TOLEDO, M.; OVIES, D.; LÓPEZ, J.M.; CROMBET, H.; DIAZ, R. 1990. Plantas Medicinales y Otras técnicas de Uso práctico para la Medicina Veterinaria Cubana. Instituto de Medicina Veterinaria 39p.
- VERA, J.R.; PASTRANA, P.F.; FERNANDEZ, K.; VIÑA, A. 2007. Actividad Antimicrobiana In Vitro de Volátiles de *Lippia alba* y Extractos Orgánicos y Acuoso de *Justicia pectoralis* Cultivada en Diferentes Pisos Térmicos del Departamento del Tolima. *Scientia et Technica*. 33: 345-348.
- WHINAM, J.; BUXTON, R. 1997. *Sphagnum* peatlands of Australasia: an assessment of harvesting sustainability. *Biological Conservation* 82:21-29