



DOI: 10.26820/reciamuc/4.(1).enero.2020.314-324

URL: <https://reciamuc.com/index.php/RECIAMUC/article/view/448>

EDITORIAL: Saberes del Conocimiento

REVISTA: RECIAMUC

ISSN: 2588-0748

TIPO DE INVESTIGACIÓN: Artículo de Revisión

CÓDIGO UNESCO: 2414 Microbiología

PAGINAS: 314-324

Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto hidroalcohólico obtenido de la semilla de lino (*Linum Usitatissimum*), frente a *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) y *Salmonella typhi* (ATCC 9298)

Evaluation of the antimicrobial activity of the hydroalcoholic extract obtained from flax seed (*Linum Usitatissimum*), against *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) and *Salmonella typhi* (ATCC 9298)

Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico obtido de semente de linho (*Linum Usitatissimum*), contra *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) e *Salmonella typhi* (ATCC 9298)

**María Fernanda Vélez León¹; Nelly Cecilia Navarrete Freire²;
Diego Alejandro Morales Villavicencio³**

RECIBIDO: 18/11/2019 **ACEPTADO:** 20/12/2019 **PUBLICADO:** 31/01/2020

1. Magister en Microbiología Mencion Industrial; Química y Farmacéutica; Universidad de Guayaquil; Guayaquil, Ecuador; maría.velezle@ug.edu.ec;  <https://orcid.org/0000-0002-4184-3413>
2. Magister en Microbiología Mencion Biomédica; Química y Farmacéutica; Universidad de Guayaquil; Guayaquil, Ecuador; nelly.navarretef@ug.edu.ec;  <https://orcid.org/0000-0002-6142-841X>
3. Químico y Farmacéutico; Universidad de Guayaquil; Guayaquil, Ecuador; diego2019-18d@outlook.com;  <https://orcid.org/0000-0002-8951-8388>

CORRESPONDENCIA

María Fernanda Vélez León
maría.velezle@ug.edu.ec

Guayaquil, Ecuador

RESUMEN

Mediante este trabajo de investigación se logró evaluar la actividad antimicrobiana del extracto hidroalcohólico obtenido a partir de las semillas de lino (*Linum usitatissimum*), el cual fue evaluado frente a los agente patógenos *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) y *Salmonella typhi* (ATCC 9298). El extracto fue obtenido por maceración, utilizando como solvente agua destilada y alcohol en una proporción 1:1, no sin antes la limpieza y esterilización de materiales y recursos necesarios. Posteriormente se llevó el extracto a las instalaciones del Instituto Nacional de Salud Pública e Investigación (INSPI), en donde se llevó a cabo el análisis para la determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM), comparando cinco concentraciones diferentes de extracto (10 mg/ml, 5 mg/ml, 2,5 mg/ml, 1,25 mg/ml, 0,6 mg/ml) utilizando tubos de dilución con caldo Mueller Hinton. Estos análisis y sus procesos fueron realizados en un ambiente aséptico y en condiciones de incubación de 37 oC por 24 horas. Mediante la presencia o ausencia de turbidez en los tubos luego del periodo de incubación se determinó que la Concentración Inhibitoria Mínima es de 5 mg/ml para ambos microorganismos. Posteriormente mediante un subcultivo de los tubos no turbios se determinó que la concentración bactericida mínima es de 10 mg/ml, así mismo para ambos microorganismos.

Palabras clave: *Linum usitatissimum*, *Salmonella*, Antimicrobiano, Concentración inhibitoria mínima, Concentración Bactericida Mínima

ABSTRACT

This research work aimed to investigate the antimicrobial activity of a hydroalcoholic extract obtained from flax seeds, which was evaluated against the pathogens *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) and *Salmonella typhi* (ATCC 9298). The extract was obtained by maceration, using as a solvent distilled water and alcohol in a 1: 1 ratio after cleaning and sterilization of raw materials and necessary resources. Subsequently, the extract was taken to the facilities of the "Instituto Nacional de Salud Pública e Investigación" (INSPI), where the antimicrobial activity of the same was evaluated by determining the Minimum Inhibitory Concentration and the Minimum Bactericidal Concentration. We compared five different concentrations of extract (10 mg/ml, 5 mg/ml, 2.5 mg/ml, 1.25 mg/ml, and 0.6 mg/ml) using dilution tubes with Mueller Hinton broth. These analyzes and their processes were performed in an aseptic environment and under incubation conditions of 37 oC for 24 hours. By the presence or absence of turbidity in the tubes after the incubation period, it was determined that the Minimum Inhibitory Concentration is 5 mg/ml for both microorganisms. Subsequently, by means of a subculture of the non-turbid tubes, it was determined that the Minimum Bactericidal Concentration is 10 mg/ml, likewise for both microorganisms.

Keywords: *Linum usitatissimum*, *Salmonella*, antimicrobial, Minimal Inhibitory Concentration, Minimal Bactericidal Concentration.

RESUMO

Este trabalho de pesquisa teve como objetivo investigar a atividade antimicrobiana de um extrato hidroalcoólico obtido a partir de sementes de linho, avaliado em relação aos patógenos *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) e *Salmonella typhi* (ATCC 9298). O extrato foi obtido por maceração, utilizando como solvente água destilada e álcool na proporção de 1: 1 após limpeza e esterilização de matérias-primas e recursos necessários. Posteriormente, o extrato foi levado para as instalações do Instituto Nacional de Saúde Pública e Investigação (INSPI), onde a atividade antimicrobiana do mesmo foi avaliada através da determinação da Concentração Inibitória Mínima e da Concentração Bactericida Mínima. Foram comparadas cinco concentrações diferentes de extrato (10 mg / ml, 5 mg / ml, 2,5 mg / ml, 1,25 mg / ml e 0,6 mg / ml) usando tubos de diluição com caldo Mueller Hinton. Essas análises e seus processos foram realizados em ambiente asséptico e em condições de incubação de 37 oC por 24 horas. Pela presença ou ausência de turbidez nos tubos após o período de incubação, foi determinado que a Concentração Inibitória Mínima é de 5 mg / ml para ambos os microorganismos. Posteriormente, por meio de uma subcultura dos tubos não turvos, foi determinado que a Concentração Bactericida Mínima é de 10 mg / ml, da mesma forma para os dois microorganismos.

Palavras-chave: *Linum usitatissimum*, *Salmonella*, antimicrobiana, Concentração Inibitória Mínima, Concentração Bactericida Mínima.

Introducción

Las investigaciones de las plantas medicinales son una fuente de suma importancia para el descubrimiento de nuevos fármacos que luego se sintetizan, permitiendo así un conocimiento más profundo de los beneficios que estas y sus componentes puedan aportar, lo que conduce a que muchos productos naturales puedan ser reconocidos como fitofármacos, es decir, compuestos que igualan el nivel de los fármacos de síntesis. (Vivot, Sanchez, Cacik, & Sequin, 2012) (Anchundia Delgado, y otros, 2019)

En la actualidad muchas plantas medicinales con actividad antimicrobiana pasan desapercibidas, esto puede deberse a que, si bien son conocidas por las personas, estas no han sido analizadas a profundidad por lo que sus beneficios no han sido completamente dilucidados. (Gallegos-Zurita, 2016)

Actualmente, existe una gran variedad de plantas medicinales que son cultivadas y recolectadas en nuestro país, estas contienen metabolitos secundarios que presentan actividad biológica, sin embargo, a la gran mayoría de las plantas que crecen en el Ecuador, no se les ha podido realizar un análisis de lo más idóneo que permita conocer con mayor seguridad todas las propiedades curativas que presenten. (Azueiro, Jaramillo, San Martín, & D'Armas, 2016) (García de Alba García & Ramírez Hernández, 2012)

Con apoyo de estudios científicos realizados con anterioridad, en este trabajo de investigación se evaluará la actividad antimicrobiana del extracto hidro-alcohólico obtenido a partir de las semillas de lino por método de maceración a diferentes concentraciones frente a agentes patógenos del género *Salmonella*.

Metodología

Tipo de investigación

La investigación a realizar es de tipo experimental, longitudinal y prospectivo. Todo

dato e información que se obtenga será controlado en su totalidad por el estudiante con la finalidad de modificar la variable dependiente mediante la manipulación de las variables independientes.

Lugar de Investigación

Esta investigación será realizada en los laboratorios de la Facultad de Ciencias Químicas y en el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública Dr. Leopoldo Izquieta Pérez (INSPI).

Población y muestras

La muestra a utilizar en esta investigación es la semilla de lino (*Linum usitatissimum*) adquirida directamente en los mercados locales.

Técnicas a emplear

La muestra será procesada en los laboratorios de la Facultad de Ciencias Químicas. Se clasificarán las semillas aparentemente de mejor condición, se las secará previamente antes de realizar la extracción por el método de maceración. Se filtra y se almacena en frascos de vidrio. Posterior a la obtención del extracto, se sembrarán los extractos obtenidos en agar chocolate para comprobar su esterilidad.

Una vez verificada su esterilidad se trabajarán los extractos obtenidos en las instalaciones del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública Dr. Leopoldo Izquieta Pérez (INSPI), donde se procederá a evaluar la actividad antimicrobiana de cada dilución del extracto mediante el método Concentración Inhibitoria Mínima (CIM).

Técnica procedimental

Obtención del extracto

Un kilogramo de semillas de lino (*Linum usitatissimum*) fue adquirido en un local comercial ubicado en la ciudad de Portoviejo

Se seleccionaron las semillas que se encontraban en mejor condición. Se pesó 5 g

de semillas y se las coloco en un vaso de esterilizado para su almacenamiento. Posterior a esto se le adiciono 250 ml de solvente (125 ml de agua destilada y 125 ml de alcohol) y se lo dejo en maceración por 20 días.

La concentración del extracto se obtiene mediante la siguiente ecuación

Concentración de extracto = Mg de soluto (semillas) /ml solvente

Microorganismos

Las cepas de Salmonella typhimurium (ATCC 14028) y Salmonella typhi (ATCC 9298) fueron donadas por el Instituto Nacional de Salud Pública e Investigación Dr. Leopoldo Izquieta Pérez. Para su reactivación, las cepas fueron incubadas en agar sangre a 35 °C durante 24 horas.

Pruebas Bioquímicas

Como ensayo preliminar y de confirmación, se realizó, a cada cepa, las siguientes pruebas bioquímicas con su respectivo tipo de siembra.

Tabla 1. Pruebas Bioquímicas

Prueba	Tipo de siembra
Citrato	Estría (Pico de flauta)
Lisina	Picadura y estría
Kliger	Picadura y estría (Pico de flauta)
Urea	En estría
SIM	Picadura

Fuente: Los autores 2020

Concentración inhibitoria mínima

Dilución del extracto

Se parte desde la concentración inicial 20 mg/ml. Este es el tubo # 1. Se toman en total 7 tubos que contengan 5 ml de caldo Mueller Hinton suplementado con cationes (excepto el tubo #1 que contendrá solo 5 ml del extracto). Se adiciona 5 ml del extracto en el tubo # 2. Se homogeniza y se adiciona 5 ml de la solución del tubo # 2 al tubo # 3. Se repite este proceso hasta completar el tubo # 7 el cual es utilizado como descarte.

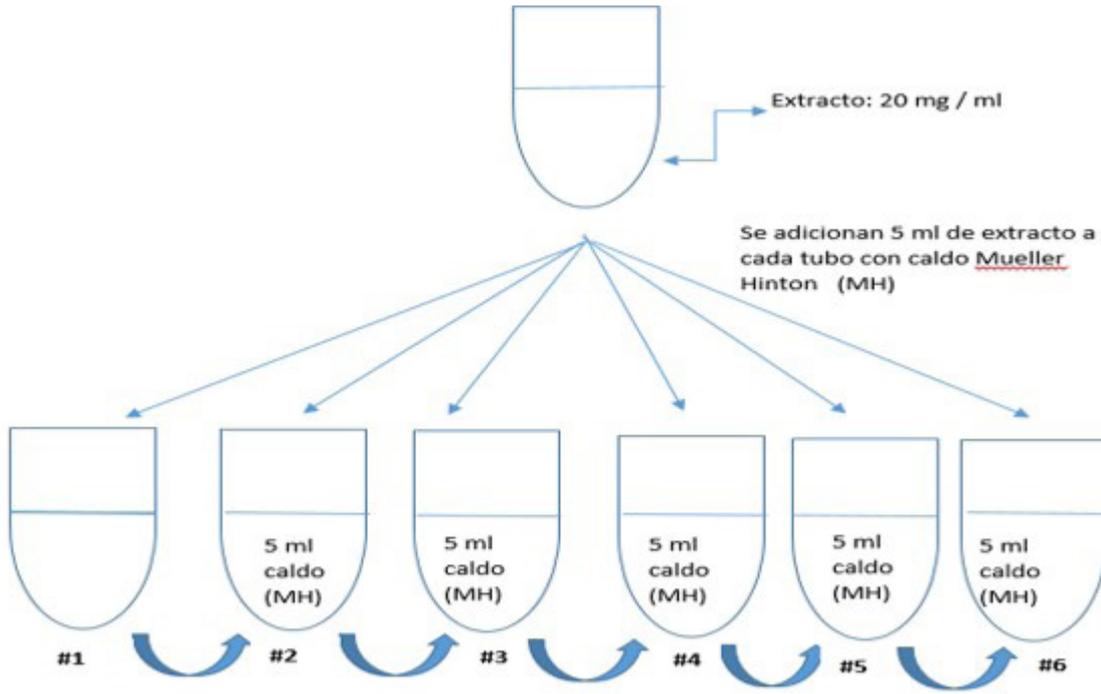


Figura 1. Esquema de dilución del extracto

Fuente: Los autores 2020

Tubo	Concentración
# 1	20 mg/ml
# 2	10 mg/ml
# 3	5 mg/ml
# 4	2,5 mg/ml
# 5	1,25 mg/ml
# 6	0,6 mg/ml

Preparación de la solución McFarland

En un tubo de Kahn (10 x 13 mm) por cada cepa, colocar solución salina, posteriormente inocular con un hisopo la cepa, agitando y homogeneizando, se ajusta la esca-

la 0,5 de McFarland con ayuda del equipo Densimat.

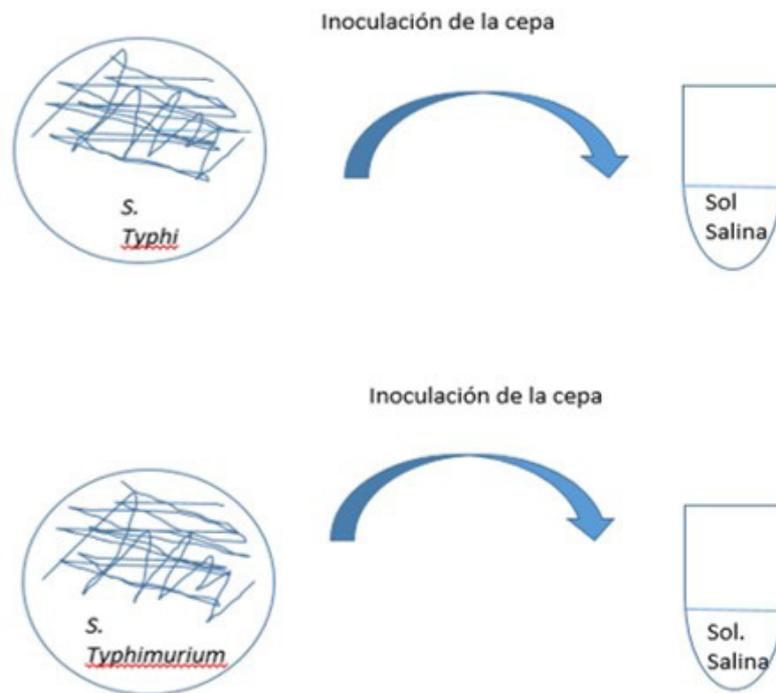


Figura 2. Preparación de la solución McFarland

Fuente: Los autores 2020

Preparación de la solución bacteriana

Se utiliza un tubo (20x15 mm) por cada cepa a analizar. En cada tubo adicionar 5 ml de caldo Mueller Hinton. Se descartan 100 ul con la ayuda de una pipeta automática. Inmediatamente se le adiciona 100 ul de Solución Mcfarland preparada en el anterior proceso. Se mezcla y homogeniza

Dilución del microorganismo

Se selección 8 tubos de Kahn (10 x13 mm)

por cada cepa que se vaya a analizar.

En cada tubo se añade 1 ml de solución bacteriana y 1 ml de concentración de extracto diferente (6 concentraciones). Además se preparan dos tubos adicionales. Uno de control de crecimiento que contiene solución bacteriana y uno de control de esterilidad que contiene únicamente caldo nutritivo.

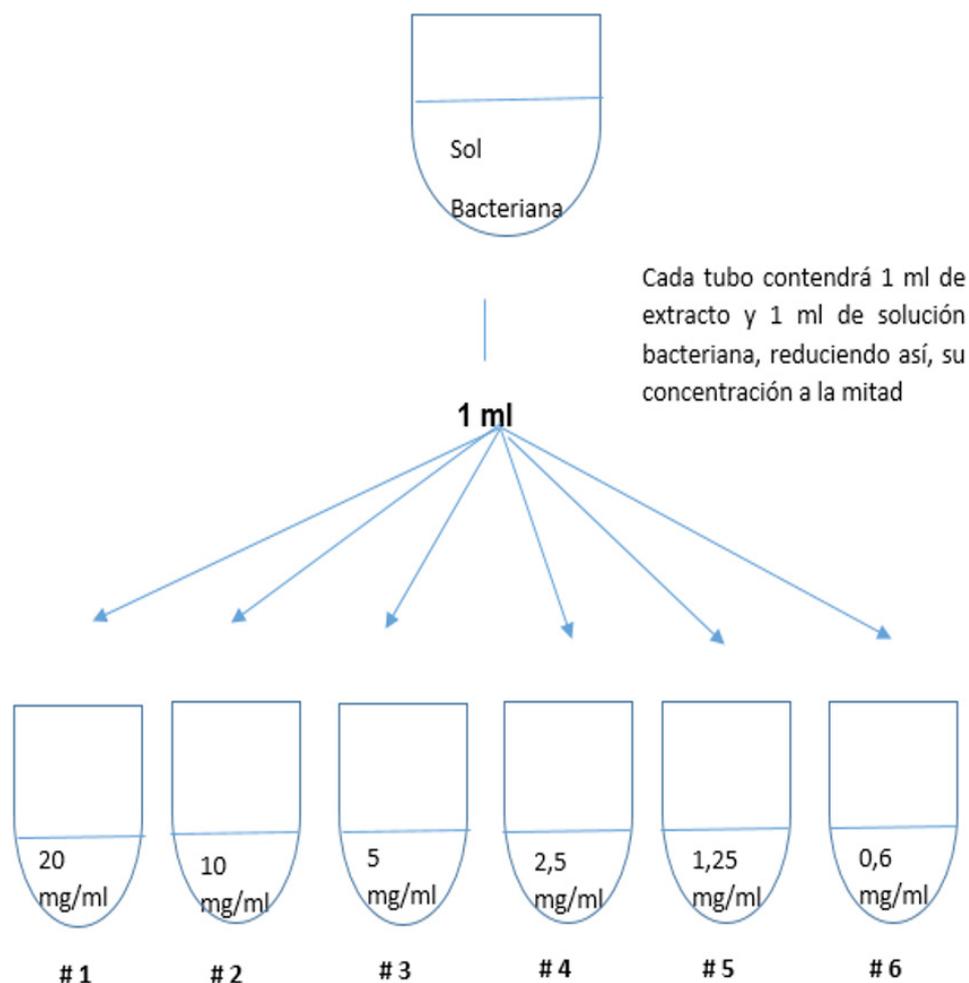


Figura 3. Esquema de dilución del microorganismo

Fuente: Los autores 2020

Tabla 3. Concentraciones a utilizar del extracto diluido

Tubo	Concentración final
# 1	10 mg /ml
# 2	5 mg /ml
# 3	2,5 mg/ ml
# 4	1,25 mg / ml
# 5	0,6 mg / ml
# 6	0,3 mg /ml

Fuente: Los autores 2020

Se procede a incubar en estufa de aire a 35 - 37 °C durante 24 horas.

Interpretación de la CIM

Luego de una incubación de 24 horas se observa la turbidez en los tubos, indicando de esta manera desarrollo bacteriano. Los microorganismos crecieron en el control de crecimiento (positivo) y en todos los otros tubos en los que no esté presente suficiente agente antimicrobiano como para inhibir su desarrollo. La concentración de antibiótico que presentó ausencia de crecimiento, detectada por falta de turbidez (igualando al control de esterilidad), es lo que se designa como Concentración Inhibitoria Mínima (CIM).

Concentración bactericida mínima

Se subcultiva por 24 horas a 35 - 37 °C en agar sangre 0,1 ml de dilución de cada tubo que no haya presentado turbidez (Concentraciones 10, 5 y 2,5 mg/ml). Se determinan las UFC por recuento de colonias.

Resultados

De acuerdo a la literatura. Los resultados de

las pruebas Bioquímicas fueron los esperados para ambas bacterias.

Para *S. Typhi*:

Prueba del Citrato: Negativo

Prueba de Hierro Triple Azúcar: Glucosa fermentada con producción de H₂S

Prueba de Lisina: Positivo

Prueba de Urea: Negativo

Prueba del Indol: Negativo

Desprendimiento de gas y motilidad: Positivo

Para *S. typhimurium*

Prueba del Citrato: Positivo

Prueba de Hierro Triple Azúcar: Glucosa fermentada con producción de H₂S

Prueba de Lisina: Positivo

Prueba de Urea: Negativo

Prueba del Indol: Negativo

Desprendimiento de gas y motilidad: Positivo

Tabla 4. Resultados de las Pruebas Bioquímicas

PRUEBAS BIOQUIMICAS								
Cepa	Citrato	KIA	Lis ^a	Urea	H ₂ S	Gas	Mot ^b	Indol
<i>S typhi</i>	-	K/A	+	-	+	+	+	-
<i>S typhimurium</i>	+	K/A	+	-	+	+	+	-

Lis^a = Lisina, Mot^b = Motilidad

Fuente: Los autores 2020

La Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) se determinó mediante la observación de la presencia o ausencia de turbidez en los tubos de dilución que contenían los microorganismos en conjunto con el extracto de semillas de lino a diferentes concentraciones. Se halló que tanto para *S. typhi* y *S. typhi-*

typhimurium, la Concentración Inhibitoria Mínima es de 5 mg / ml ya que el tubo con esta concentración estaba transparente, a diferencia de los tubos de siguiente concentración (2,5 mg/ml) que presentaban turbidez a simple observación.

La Concentración Bactericida mínima se

determinó mediante subcultivo de los tubos que no presentaron turbidez, obteniendo como resultado para ambos microorganismos un desarrollo de 0 UFC/ml para la con-

centración de 10 mg / ml, determinando así esta concentración como la CBM.

Tabla 5. Resultados de CIM y CMB de *S. typhimurium*

<i>Salmonella typhi</i>	
Concentración inhibitoria mínima	
(CIM)	5 mg/ml
Concentración bactericida mínima	
(CBM)	10 mg/ml

Fuente: Los autores 2020

Tabla 6. Resultados de CIM y CMB de *S. typhimurium*

<i>Salmonella typhimurium</i>	
Concentración inhibitoria mínima	
(CIM)	5 mg/ml
Concentración bactericida mínima	
(CBM)	10 mg/ml

Fuente: Los autores 2020

Tabla 7. Contaje de colonias de *S. typhi* y *S. Typhimurium*

CONTAJE DE COLONIAS			
<i>Salmonella typhi</i>		<i>Salmonella typhimurium</i>	
Dilución	Resultado	Dilución	Resultado
10 mg/ml	0 UFC	10 mg/ml	0 UFC
5 mg/ml	6000 UFC/ml	5 mg/ml	17000 UFC / ml
2,5 mg/ml	Incontable	2,5 mg/ml	32000 UFC / ml

Fuente: Los autores 2020

Discusión

De los resultados obtenidos, se puede concluir que el extracto hidroalcohólico con el que se trabajó, presenta efecto antimicrobiano frente a bacterias Gram negativas, tales como las de este estudio en que se emplearon las cepas de *S. typhi* y *S. typhimurium*, en concentraciones de 5 mg/ml y 10 mg/ml. Esto es comparable con dos estudios realizados previamente, uno de ellos en el año 2013, realizado por Gaafar y colaboradores, y publicado en Egipto por el International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research. Este estudio consistió en la evaluación antimicrobiana de los extractos de las semillas de lino, observándose un efecto antimicrobiano más potente frente a las bacterias Gram negativas tales como (*E. coli* y *P. aeruginosa*) en comparación con Bacterias Gram positivas como por ejemplo (*B. subtilis* y *St. aureus*). Esto concuerda con las observaciones en nuestro trabajo de investigación, aunque con otros miembros de la misma familia de las Enterobacteriaceae (Gaafar, Salama, Askar, El-Hariri, & Bakry, 2013).

Otra investigación comparable, es la realizada en el año 2011 en Pakistán en el Instituto de Biotecnología e Ingeniería Genética, por Bahkt y colaboradores, publicado en el African Journal of Biotechnology; el cual

consistía en el estudio de la actividad antimicrobiana por el método de difusión en disco del extracto de lino frente a diferentes solventes. En ese estudio se demostró la actividad antimicrobiana partir de las semillas de lino (*Linum usitatissimum*) utilizando diferentes solventes (acetato de etilo, hexano, butanol y agua destilada) frente a siete bacterias. En ese trabajo, los resultados fueron expresados en porcentajes revelando un 56 % de actividad antimicrobiana utilizando butanol y acetato de etilo como solventes frente a *Staphylococcus aureus*. Así mismo los extractos de butanol y acetato de etilo inhibieron el crecimiento de *Bacillus cereus* un 64 % y 44 % respectivamente. Los datos indicaron además que los extractos acuosos de las muestras redujeron el crecimiento en un 79% frente a *S. Typhi*. Confirmando esas observaciones, en nuestro estudio obtuvimos actividad antimicrobiana frente a las mismas especies *S. typhi* y *S. typhimurium* aunque a otras concentraciones (Bahkt, y otros, 2011)

Conclusiones

Se logró evaluar la actividad antimicrobiana de un extracto hidroalcohólico obtenido a partir de semillas de lino (*Linum usitatissimum*) empleando la técnica de dilución en caldo frente a dos agentes patógenos del género *Salmonella* (*typhi* y *typhimurium*).

Ambas cepas de salmonella presentaron sensibilidad frente al extracto, obteniendo como resultado una Concentración inhibitoria mínima obtenida de 5 mg/ml tanto para *S. typhi* como para *S. typhimurium*.

La Concentración bactericida mínima obtenida mediante recuento de UFC/ml fue de 10 mg/ml para ambos microorganismos.

Recomendaciones

Se recomienda realizar más estudios similares utilizando la semilla de *Linum usitatissimum* pero empleando solventes con diferentes polaridades, diferentes concentraciones de extractos, evaluando sus efectos antimicrobianos frente a hongos y levaduras.

También se debería realizar la determinación del o los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana de las semillas de *Linum usitatissimum* utilizando métodos cromatográficos como por ejemplo cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

Bibliografía

Anchundia Delgado, F., Bonilla Díaz, L., Chamorro Benavides, L., Castro Zambrano, J., Duran González, J., Falcones Centeno, M., . . . Quinde Herrera, M. (2019). PLANTAS MEDICINALES Y FITOMEDICAMENTOS. Quito, Ecuador: MAWIL. doi:10.26820/plantas-medicinales-y-fitomedicamentos

Azuero, A., Jaramillo, C., San Martin, D., & D'Armas, H. (2016). Análisis del efecto antimicrobiano de doce plantas medicinales de uso ancestral en Ecuador. *Ciencia UNEMI*, IX(20), 11-18.

Gallegos-Zurita, M. (2016). Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. *Anales de la Facultad de Medicina*, 77(4), 327-332. Obtenido de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832016000400002

García de Alba García, J., & Ramírez Hernández, B. (2012). Conocimiento y uso de las plantas medicinales en la zona metropolitana de Guadalajara. *Desacatos*, 39(1), 29-44. Obtenido de <http://www.scielo.org.mx/pdf/desacatos/n39/n39a3.pdf>

Vivot, E., Sanchez, C., Cacik, F., & Sequin, C. (2012). Actividad antibacteriana en plantas medicinales de la flora Entre Rios (Argentina). *Ciencia docencia y tecnologia*, XXIII(45), 165-185.

CITAR ESTE ARTICULO:

Vélez León, M., Navarrete Freire, N., & Morales Villavicencio, D. (2020). Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto hidroalcohólico obtenido de la semilla de lino (*Linum Usitatissimum*), frente a *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) y *Salmonella typhi* (ATCC 9298). *RECIAMUC*, 4(1), 314-324. doi:10.26820/reciamuc/4.(1).enero.2020.314-324



RECONOCIMIENTO-NOCOMERCIAL-COMPARTIRIGUAL
CC BY-NC-SA

ESTA LICENCIA PERMITE A OTROS ENTREMELZAR, AJUSTAR Y CONSTRUIR A PARTIR DE SU OBRA CON FINES NO COMERCIALES, SIEMPRE Y CUANDO LE RECONOZCAN LA AUTORÍA Y SUS NUEVAS CREACIONES ESTÉN BAJO UNA LICENCIA CON LOS MISMOS TÉRMINOS.