

# Actividad antibacteriana de nanopartículas de plata a partir de hojas de *Leea coccinea* sobre *Staphylococcus aureus*



<https://cu-id.com/2248/v45e04>

## Antibacterial activity of silver nanoparticles from *Leea coccinea* leaves on *Staphylococcus aureus*

<sup>1</sup>Annie Rubio Ortega<sup>1\*</sup>, <sup>2</sup>Mailyn Pérez Llanes<sup>2</sup>, <sup>3</sup>Michel Báez Árias<sup>3</sup>, <sup>4</sup>Susel San Nicolás de la Noval<sup>4</sup>,  
<sup>5</sup>Adrián González Travieso<sup>4</sup>, <sup>6</sup>Dany Naranjo Feliciano<sup>3</sup>, <sup>5</sup>Yaneisy Flores Armas<sup>5</sup>, <sup>6</sup>Brayan Aguiar Mendoza<sup>6</sup>,  
<sup>6</sup>Oriela Pino Pérez<sup>1</sup>, <sup>6</sup>Ivette Espinosa Castaño<sup>3</sup>, <sup>6</sup>María C. Travieso Novelles<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Ecología Química, Grupo Plagas Agrícolas, Dirección Sanidad Vegetal del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba

<sup>2</sup>Laboratorio de Microbiología de Control de la Calidad del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba

<sup>3</sup>Departamento de Microbiología del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba

<sup>4</sup>Grupo Farmacéutico del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba

<sup>5</sup>Laboratorio de Ensayos para el Control de la Calidad e Inocuidad de los Alimentos (CENLAC). Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba

<sup>6</sup>Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de La Habana, La Habana, Cuba

**RESUMEN:** Las infecciones ocasionadas por *Staphylococcus aureus* constituyen una problemática para la salud animal y humana. El objetivo de este trabajo fue determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) de nanopartículas de plata (NpAg) obtenidas por síntesis verde con extracto de hojas de *Leea coccinea* sobre cepas de *Staphylococcus aureus* y aislados resistentes a meticilina. Se evaluaron tres lotes de NpAg de *Leea coccinea* sobre dos cepas *S. aureus* y dos aislados resistentes a meticilina, por el método de diluciones seriadas, para la determinación de CMI y CMB. Las NpAg de *Leea coccinea* mostraron actividad antibacteriana sobre las cepas y los aislados resistentes de *S. aureus*, con valores de CMI para los tres lotes que coincidieron en su mayoría en 0,03 mg/mL para todas las cepas y los aislados. En los valores de CMB en los tres lotes concordaron y se observaron diferencias entre los valores para los aislados resistentes (0,485 mg/mL) y las cepas (0,12 mg/mL). Estos resultados demuestran la actividad antibacteriana de las NpAg de *Leea coccinea* sobre este patógeno, destacan sus potencialidades como alternativa ante la resistencia a antibióticos y crean las bases para otros estudios con vista a una futura aplicación como antibacteriano.

**Palabras clave:** nanopartículas de plata, *Leea coccinea*, *Staphylococcus aureus*.

**ABSTRACT:** Infections caused by *Staphylococcus aureus* represent a problem for animal and human health. This work was aimed to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of silver nanoparticles (NpAg) obtained by green synthesis with *Leea coccinea* leaf extract on *Staphylococcus aureus* strains and methicillin resistant isolates. Three batches of NpAg from *Leea coccinea* were evaluated on two *S. aureus* strains and two methicillin resistant isolates, by the serial dilution method, for MIC and MBC determination. NpAg from *Leea coccinea* showed antibacterial activity against resistant strains and isolates of *S. aureus*, with MIC values for the three batches mostly coinciding at 0.03 mg/mL for all the strains and isolates. MBC values in the three batches agreed and differences were observed between the values for resistant isolates (0.485 mg/mL) and strains (0.12 mg/mL). These results demonstrate the antibacterial activity of NpAg from *Leea coccinea* on this pathogen, demonstrating its potential as an alternative to antibiotic resistance and creating the basis for further studies for its application as an antibacterial agent.

**Keywords:** silver nanoparticles, *Leea coccinea*, *Staphylococcus aureus*.

*Staphylococcus aureus* es una bacteria oportunista, Gram positiva, que forma parte de la microbiota de la piel en los animales y el hombre (1). Esta es incluida en el grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* sp.), grupo de patógenos bacterianos más importantes implicados en infecciones, que comprometen la calidad y la vida

del hospedero, y que, además, se caracterizan por el desarrollo de multirresistencia a antibióticos (2). La resistencia a antibióticos constituye una problemática de prioridad para la FAO, OMS, OMSA y para el Programa de Naciones Unidas del Medioambiente (3). Debido a la resistencia de *Staphylococcus aureus* a meticilina o vancomicina, este es incluido en la lista de patógenos de la OMS con alta prioridad para investigación y desarrollo de nuevos antimicrobianos (4).

\*Autor de correspondencia: Annie Rubio Ortega. E-mail: [annie@censa.edu.cu](mailto:annie@censa.edu.cu)

Recibido: 16/03/2023

Aceptado: 05/06/2023

En Cuba, tanto para la salud animal como humana, se necesitan de alternativas a antibióticos que permitan controlar las infecciones ocasionadas por *S. aureus*. La suspensión de nanopartículas de plata (NpAg) obtenidas por síntesis verde con extracto de hojas de *Leea coccinea* posee actividad antibacteriana sobre *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* (5), bacteria fitopatógena Gram negativa, sin embargo, se desconoce las potencialidades de esta suspensión sobre bacterias Gram positivas patógenas de animales y humanos como *S. aureus*. Extender el estudio de actividad antibacteriana de esta suspensión de nanopartículas sobre *S. aureus*, permite ampliar su espectro de acción, elemento de relevancia para el desarrollo futuro de un antibacteriano competitivo en el mercado de la industria farmacéutica. El objetivo de este trabajo fue determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) de nanopartículas de plata (NpAg) obtenidas por síntesis verde con extracto de hojas de *Leea coccinea* sobre cepas de *Staphylococcus aureus* y aislados resistentes a meticilina.

Se utilizaron tres lotes (Lote 1, Lote 2, Lote 3) de suspensión de NpAg de *Leea coccinea*, donados por el laboratorio de Ecología Química del CENSA, con la finalidad de evaluar el comportamiento de la actividad antibacteriana ante un proceso de síntesis de NpAg de *Leea coccinea*, donde los extractos provenían de tres colectas diferentes. Las NpAg de *Leea coccinea* se sintetizaron mediante la bio-reducción catiónica a partir de los extractos acuosos de hojas frescas de *Leea coccinea* como fuentes de compuestos reductores y la solución de nitrato de plata (Merck) como la solución precursora del catión  $Ag^+$  (5).

Se utilizaron dos cepas de referencia *S. aureus* (ATCC 25923 y ATCC 6538) y dos aislados de *S. aureus* (Cuba8 y Cuba28) con multiresistencia a antibióticos, procedentes de muestras de piel de cerdos que pertenecen a la colección del Laboratorio de Bacteriología Animal del CENSA. Ambos aislados poseen genes de resistencia a  $\beta$ -lactámicos (incluyendo a la meticilina) y a aminoglucósidos. Además, el aislado Cuba28 presenta genes de resistencia a macrólidos, estreptograminas y quinolonas (6).

La actividad antimicrobiana de los tres lotes de suspensión de NpAg de *Leea coccinea* sobre las cepas y aislados de *S. aureus*, se determinó por el método de diluciones seriadas (7). A partir de cultivos en medio agar nutriente (AN, Biocen) incubados durante 24 h a 36 °C, se prepararon suspensiones bacterianas de las cepas y los aislados de *S. aureus* a  $10^8$  UFC/mL, en solución salina estéril (SS) al 0,85% de NaCl (Merck), a 0,5 McFarland. Se aplicó 100  $\mu$ L de cada suspensión en medio caldo nutriente (CN, Biocen) para una concentración de  $10^6$  UFC/mL. La concentración de inóculo en el medio CN se verificó por conteo de colonias viables expresada en unidades formadoras de colonia (UFC/mL) en placas de AN.

Se distribuyó 1 mL por tubo de medio con cada una de las suspensiones bacterianas. Se adicionó 1 mL de cada lote de suspensión de NpAg de *Leea coccinea* en el rango de concentraciones de 0,97 a 0,015 mg/mL. El ensayo se realizó por triplicado y se incluyeron los siguientes controles: medio de cultivo (CN), medio de cultivo con la suspensión de NpAg de *Leea coccinea* a 0,97 mg/mL y medio inoculado con la suspensión de *S. aureus*. Todos los tubos se incubaron a 36 °C con agitación a 17,8 rad/s.

Se identificó la CMI y la CMB. La CMI se estableció como la mínima concentración a la que la suspensión de NpAg de *Leea coccinea* inhibió el crecimiento visible de *S. aureus* en medio líquido (CN) después de 24 h de incubación. Para la CMB se tomó una asada de cada tubo y se sembró en una placa de medio AN, que se incubaron a 36 °C por 24 h. Se estableció la CMB como la concentración más baja de la suspensión de NpAg de *Leea coccinea* que resultó en un subcultivo negativo en medio sólido (AN). Este ensayo se repitió en tres experimentos independientes.

Los tres lotes de la suspensión de NpAg de *Leea coccinea* inhibieron el crecimiento de las cepas y los aislados de *S. aureus* (Tabla 1). Los valores de CMI de los tres lotes coinciden en 0,03 mg/mL, excepto para el Lote 3 sobre el aislado multiresistente Cuba8 (0,12 mg/mL). En las CMB, los tres lotes concuerdan en 0,12 mg/mL para las cepas de referencia y 0,485 mg/mL para los aislados multiresistentes.

Los resultados demuestran la reproducibilidad de la síntesis de la suspensión de NpAg de *Leea coccinea*, al mantener homogeneidad entre lotes y resaltan la acción de estas nanoestructuras híbridas sobre aislados dotados genéticamente con herramientas para la resistencia a diferentes grupos de antibacterianos, aunque para lograr esta actividad requirió cuatro veces el valor a la obtenida para las cepas de referencia.

El valor de CMI de la suspensión de NpAg de *Leea coccinea* se encuentra en el rango informado en la literatura para suspensiones de NpAg de extractos vegetales sobre *S. aureus* (0,02 - 0,250 mg/mL) (2). Los valores de CMB de suspensiones de NpAg de extractos vegetales sobre *S. aureus* suelen estar en el rango entre 0,04 - 0,2 mg/mL (2), rango que incluye el valor de CMB de la suspensión de NpAg de *Leea coccinea* sobre las cepas de referencia. Sin embargo, para alcanzar este efecto bactericida con la suspensión de NpAg de *Leea coccinea*, en los aislados multiresistentes, se necesita un valor superior de CMB en las suspensiones de NpAg de extractos de *Leea coccinea*, al informado por la literatura, lo que está en concordancia con una mayor dotación genética de estos aislados que le permite subsistir en condiciones adversas. No obstante, los valores de CMI y CMB pueden variar: en función: I) de la nanopartícula (condiciones edafoclimáticas en las que se cultivaron las plantas, parte de la planta seleccionada para el extracto, tamaño de partícula, carga superficial, forma de la estructura, pH, entre otras) y

**Tabla 1.** Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) en mg/mL de tres lotes de la suspensión de NpAg de *Leea coccinea* sobre cepas y los aislados de *S. aureus*. / *Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) in mg/mL of three batches of the suspension of NpAg from Leea coccinea on S. aureus strains and isolates.*

NpAg de <i>Leea coccinea</i>	CMI y CMB (mg/mL)	<i>Staphylococcus aureus</i>			
		ATCC 25923	ATCC 6538	Cuba8	Cuba28
Lote 1	CMI	0,03	0,03	0,03	0,03
	CMB	0,12	0,12	0,485	0,485
Lote 2	CMI	0,03	0,03	0,03	0,03
	CMB	0,12	0,12	0,485	0,485
Lote 3	CMI	0,03	0,03	0,12	0,03
	CMB	0,12	0,12	0,485	0,485

II) en correspondencia con las características genéticas (intrínsecas y adquiridas) del patógeno que le permitan subsistir en el medio, incluyendo el desarrollo de resistencia a compuestos (8).

En la determinación de la actividad antibacteriana de NpAg sobre *S. aureus*, diferentes autores refieren el uso indistinto de los métodos de difusión de agar y/o por diluciones seriadas (2). Sin embargo, ante la difusión limitada de las NpAg en el medio agarizado, el método de difusión en agar no permite una visualización real de la actividad antibacteriana. Para la evaluación de NpAg de *Leea coccinea* sobre *S. aureus* se utilizó el método de diluciones seriadas que permite una mayor dispersión de esta suspensión coloidal en el medio de cultivo y se aplicó incubación con agitación para garantizar el contacto de las NpAg con el patógeno.

La actividad antibacteriana de las NpAg se asocia fundamentalmente al metal  $Ag^0$ , elemento con el que se vinculan sus principales modos de acción. Las NpAg poseen múltiples modos de acción sobre *S. aureus* que incluyen desde la adhesión directa, con cambios en la permeabilidad de la membrana, interacción con componentes celulares que comprometen los procesos metabólicos; formación de poros en la membrana, con alteraciones en la estructura celular; generación de exceso de especies reactivas del oxígeno, con daño oxidativo irreversible; y obstrucción de las señales de transducción vitales (1). Por otra parte, los componentes de las NpAg procedentes de los extractos vegetales pueden desencadenar sinergia con el metal, con mayor efecto antibacteriano u otros modos de acción; prevenir la aglomeración de NpAg y reducir la toxicidad del metal (9). Estos elementos en su conjunto hacen de estas sustancias híbridas una alternativa para combatir la resistencia antimicrobiana (RAM).

De forma general, contar con opciones diferentes a los antibióticos actuales, en el tratamiento de las infecciones provocadas por *S. aureus*, son una prioridad para los sistemas sanitarios. Esto se resalta cuando se enfrentan tratamientos frente a patógenos con patrones de resistencia o/y multiresistencia a dichos antibióticos. Otra aplicación de las NpAg de extractos vegetales es la unión con antibióticos (10) o con péptidos (1) en combinaciones con efecto sinérgico de

actividad antibacteriana ante el fenómeno de la RAM por *S. aureus*.

Los resultados de la actividad antibacteriana de la suspensión de NpAg de *Leea coccinea* sobre cepas y aislados multirresistentes de *S. aureus*, sugieren continuar con las investigaciones in vivo, en modelos de animales experimentales, para el futuro desarrollo de un producto antibacteriano. Además, se requieren de estudios posteriores encaminados a optimizar la estabilidad y desagregación de las nanoestructuras en el medio acuoso y sus posibles modos de acción.

## CONCLUSIONES

Las NpAg de hojas de *Leea coccinea* poseen actividad antibacteriana sobre cepas y aislados multirresistentes de *S. aureus*, por lo que pueden ser considerados como un candidato para el futuro desarrollo de un producto antibacteriano destinado al control y tratamiento de las infecciones provocadas por este patógeno.

## REFERENCIAS

- Adhwa Masimen M, Harun N, Maulidiani M, Wan Ismail W. Overcoming Methicillin-Resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) using antimicrobial peptides-silver nanoparticles. *Antibiotics*. 2022;11(951): 1-16. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11070951>.
- Swolana D, Wojtyczka RD. Activity of silver nanoparticles against *Staphylococcus* spp. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(8). <https://doi.org/10.3390/ijms23084298>.
- FAO, UNEP, WHO, WOA. One Health Joint Plan of Action (2022-2026). Working together for the health of humans, animals, plants and the environment. Rome. 2022. <https://doi.org/10.4060/cc2289en>.
- Taconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*. 2017;18(3): 318-327. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3).

5. Novelles T, Travieso C, Ortega AR, Pita BA, López MC, Pérez LD, et al. Biosynthesis of fluorescent silver nanoparticles from *Leea coccinea* leaves and their antibacterial potentialities against *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli*. *Bioresources and Bioprocessing*. 2021;8(3). <https://doi.org/10.1186/s40643-020-00354-2>.
6. Baez M, Collaud A, Espinosa I, Perreten V. MRSA USA300, USA300-LV and ST5-IV in pigs, Cuba. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2017;49(2): 259-261. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.12.001>.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically-M07*. CLSI. 11th ed. 2018; 1-60. <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m07>.
8. Mohammadlou M, Maghsoudi H, Jafarizadeh-Malmiri H. A review on green silver nanoparticles based on plants: Synthesis, potential applications and eco-friendly approach. *International Food Research Journal*. 2016;23(2): 446-463. [http://ifrj.upm.edu.my/23\(02\)2016/\(2\).pdf](http://ifrj.upm.edu.my/23(02)2016/(2).pdf)
9. Roy A, Bulut O, Some S, Mandal AK, Yilmaz MD. Green synthesis of silver nanoparticles: Biomolecule-nanoparticle organizations targeting antimicrobial activity. *RSC Advances*. 2019;9(5): 2673-2702. <https://doi.org/10.1039/c8ra08982e>.
10. Nandhini P, Kumar P, Mickymaray S, Alothaim AS, Somasundaram J, Rajan M. Recent developments in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) treatment: A review. *Antibiotics*. 2022;11(5): 1-21. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11050606>.

**Conflicto de intereses:** Los autores de este trabajo declaran no presentar conflicto de intereses.

**Contribución de los autores:** Conceptualización: **María del Carmen Travieso Novelles, Annie Rubio Ortega e Ivette Espinosa Castaño**. Investigación y curación de datos: **Mailyn Pérez Llanes, Susel San Nicolás de la Noval y Brayán Aguiar Mendoza**. Análisis formal: **Annie Rubio Ortega, Michel Báez Árias, Adrián González Travieso Yaneisy Flores Armas**. Validación y supervisión: **Michel Báez Árias, Dany Naranjo Feliciano y Oriela Pino Pérez**. Escritura - borrador original: **Annie Rubio Ortega**. Redacción: revisión y edición: **María del Carmen Travieso Novelles, Oriela Pino Pérez, Michel Báez Árias e Ivette Espinosa Castaño**. **Administración de proyecto, recursos: María del Carmen Travieso Novelles**. Todos los autores revisaron y aprobaron la versión final del documento.

Este artículo se encuentra bajo licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional \(CC BY-NC 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)