

Efecto del ácido gálico y resveratrol sobre el crecimiento de microorganismos probióticos y bacterias patógenas

Effect of gallic acid and resveratrol on the growth of probiotic microorganism and pathogenic bacteria



<https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-polifenoles-aplicacion-farmacia-13078579>

(Paredes y Clemente, 2005).

QFB. Sujey Abigail Niño Herrera¹, Dra. Anna Iliná^{1,2}, Dra. Mónica Lizeth Chávez González^{1,2},
Dr. José Luis Martínez Hernández^{1,2}, Dr. Cristóbal Noé Aguilar González², Dr. Raúl
Rodríguez Herrera², MC. Melissa Flores García¹, Dra. Mayela Govea Salas^{1,2*}

¹Grupo de Nanobiociencia, ²Departamento de Investigación en Alimentos, Facultad de
Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila.

Blvd. V. Carranza e Ing. José Cárdenas V., Col. República, CP 25280, Saltillo, Coahuila,
México.

*Autor de correspondencia: m.govea.salas@uadec.edu.mx

Resumen

El ácido gálico (AG) y resveratrol (RVT) son compuestos polifenólicos ampliamente estudiados debido a su actividad anticancerígena, antimicrobiana, antioxidante y antiviral. En diferentes investigaciones se les ha conferido un potencial para ser empleados como terapias alternativas contra distintas patologías. En el presente estudio, se evaluó el efecto del AG y RVT sobre los microorganismos de la microbiota intestinal (MBI): *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei* y la mezcla de cepas *Lactobacillus delbrueckii*/*Streptococcus thermophilus*, con el fin de conocer su comportamiento de crecimiento en presencia de los polifenoles antes mencionados, además de evaluar el efecto de estos sobre una cepa enteropatógena de *Escherichia coli*. Esto debido a que se pretende obtener el conocimiento necesario para evaluar el posible daño que se pudiera generar hacia los probióticos en caso de que en un futuro se emplee al AG o RVT como una terapia alternativa que se administre de forma oral. Además, de conocer si es posible que ambos compuestos sean utilizados para inhibir a bacterias patógenas y que a su vez no afecten a la MBI.

Palabras clave: ácido gálico, resveratrol, probióticos, microbiota intestinal.

Abstract

Gallic acid (GA) and resveratrol (RVT) are polyphenolic compounds that have been widely studied due to their anticancer, antimicrobial, antioxidant and antiviral activity. In different studies, they have been cataloged as alternative therapies against different pathologies. In this study, the effect of GA and RVT was evaluated on microorganisms of gut microbiota: *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei* y la mezcla de cepas *Lactobacillus delbrueckii*/*Streptococcus thermophilus* to know the growth behavior using the polyphenols afore mentioned and to know their effect on a pathogenic strain of *Escherichia coli*. This due to it is pretend to obtain the necessary information to evaluate possible damage that could generate to probiotics in case that in future GA and RVT can be used as an alternative therapy that is administrated in oral form and to know if both compounds may be used to inhibit pathogenic bacteria and do not affect the gut microbiota.

Keywords: gallic acid, resveratrol, probiotics, gut microbiota.

Introducción

Los polifenoles son compuestos ampliamente biodisponibles en la naturaleza; en las últimas décadas han cobrado un gran interés en estos compuestos debido a las propiedades biológicas que presentan. Ejemplo de estos compuestos son el AG y RVT, ambos pueden encontrarse en diferentes alimentos y bebidas como lo son los frutos rojos, uvas, nueces, vino tinto, té verde, café, entre otros (Dludla y col., 2018; Burns y col., 2002). Tanto el AG como el RVT han tomado gran relevancia puesto que en diferentes estudios se les confiere propiedades biológicas entre las que se encuentran la actividad antioxidante, anticancerígena, antiviral y antimicrobiana (Li y col., 2014). Puesto que estos compuestos se pueden ingerir en la dieta, se les atribuye a ambos, y otros polifenoles la capacidad de modular el crecimiento de la MBI; la interacción recíproca entre los polifenoles y la MBI pueden contribuir a la generación de beneficios en la salud del huésped (Ozidal y col., 2016).

El tracto gastrointestinal humano (TGI) se encuentra poblado por una gran variedad de bacterias que forman un ecosistema complejo, a los microorganismos que albergan en él se les conoce como MBI. Entre los microorganismos que la conforman, se encuentran Bacteroidetes (*Porphyromonas*, *Prevotella*), Firmicutes (*Ruminococcus*, *Clostridium* y *Eubacteria*), y Actinobacterias (*Bifidobacterium*); en menor proporción se encuentran los *Lactobacillus* y *Streptococcus* (Azad y col., 2018). La MBI ofrece una variedad de beneficios al huésped, entre los que se encuentran la protección contra agentes patógenos, la regulación de la inmunidad del huésped, el mantenimiento del epitelio intestinal y ritmo normal del peristaltismo (Thursby y Juge, 2017).

Se ha comprobado que existe una relación entre la actividad y composición de la MBI, y la salud o enfermedad en el ser humano. La composición de la MBI se encuentra alterada en algunas patologías como cáncer (particularmente de colon), colitis, diabetes, desordenes inflamatorios e inmunológicos, obesidad, asma, e incluso desordenes psiquiátricos (Suvorov, 2013; Azad y col., 2018). Para modular la composición de la MBI se ha recurrido en diversas investigaciones al empleo de microorganismos, por lo general bacterias ácido-lácticas (BAL), que actúen como probióticos y así tratar de mejorar la condición de una determinada patología. Los probióticos hacen referencia a aquellos microorganismos que confieren beneficios a la salud cuando se administran en las cantidades adecuadas (Sáez y col., 2015). Los principales microorganismos que se utilizan como probióticos (Tabla 1) son los géneros: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* y *Bifidobacterium* (Azad y col., 2018). Particularmente, en el presente estudio se emplearon bacterias del género *Lactobacillus* y *Streptococcus*: *L. brevis*, *L. casei*, y una mezcla de las cepas de *L. delbrueckii*/*S. thermophilus*. Estas bacterias pueden ser encontradas en productos fermentados o como parte de la MBI humana (Feyereisen y col., 2019; Zanni y col., 2017).

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del AG y del RVT sobre las cepas de microorganismos probióticos mencionadas anteriormente y a su vez sobre una cepa enteropatógena de *E. coli*.

Tabla 1. Algunas cepas bacterianas utilizadas como probióticos. (Azad y col., 2018; Kechagia y col., 2013)

<i>Lactobacillus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Leuconostoc</i>
<i>L. brevis</i>	<i>S. lactis</i>	<i>B. brevis</i>	<i>L. mesenteroides</i>
<i>L. casei</i>	<i>S. thermophilus</i>	<i>B. lactis</i>	
<i>L. casei shirota</i>		<i>B. bifidum</i>	
<i>L. delbrueckii</i>			
<i>L. plantarum</i>			

Materiales y métodos

Reactivos

El AG utilizado fue marca Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Por otra parte, el RVT fue adquirido de una fuente comercial mexicana (Ciudad de México, México). Los medios Man Rogosa Sharpe (MRS) y Mueller-Hinton (MH) fueron adquiridos de Laboratorios DIFCO/Becton-Dickinson y Co (MD, EUA).

Evaluación del crecimiento microbiano

La realización de las pruebas microbiológicas se llevó a cabo en una campana de flujo laminar VECO®, modelo BH-c12. Las BAL utilizadas fueron las siguientes: *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus delbrueckii*/*Streptococcus thermophilus*. Las cepas fueron donadas por el Departamento de Biorrefinería y el Departamento de Investigación en Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas de la UAdeC. Aunado a estas, se utilizó una cepa de *E. coli* enteropatógena suministrada por el Departamento de Nanobiociencia de la UAdeC. Las BAL se cultivaron en caldo MRS mientras que *E. coli* en medio MH, tanto las BAL como *E. coli* se cultivaron a 37 °C por 24 horas en una incubadora PolyScience®, modelo 8006. Posteriormente, se realizó un ensayo de evaluación de inhibición por monitoreo de la densidad óptica (DO) en placas de 96 pozos. Las BAL y *E. coli* fueron incubadas en caldo MRS y MH respectivamente, por 24 horas. Cada pozo fue inoculado con 5 µL de cada suspensión bacteriana ajustada previamente a una concentración de $\sim 1.5 \times 10^8$ cel/mL correspondientes a

0.5 escala de McFarland y 195 μ L de cada tratamiento a concentraciones de 62.5, 125, 250, 500, 1000 y 2000 ppm, tanto para AG como RVT. Las placas fueron incubadas a 37 °C por 24, 48 y 72 horas. Las lecturas se realizaron cada 24 horas a 600 nm en un lector de absorbancia de microplaca TECAN sunrise TC.

Resultados y discusiones

En general, los efectos obtenidos fueron dependientes de la concentración, del compuesto utilizado y de la cepa que se evaluó. Esto tiene relación con lo reportado por Collombel y col. (2019) quienes mencionaron que los compuestos polifenólicos pueden activar o inhibir el metabolismo de un microorganismo dependiendo de sus estructuras y concentraciones. Se obtuvieron diferentes resultados para cada una de las cepas probadas. Particularmente, el AG generó un efecto menos tóxico que el RVT en todas las cepas probadas, específicamente en las BAL, el máximo porcentaje de inhibición generado por este compuesto se da en *L. brevis* y corresponde a 18.5 % utilizando AG a 500 ppm, sin embargo, para *L. delbrueckii/S. thermophilus* y *L. casei* los porcentajes máximos de inhibición son de 7.035 y 2.797 % a 1000 y 2000 ppm, respectivamente (Tabla 2). Incluso, en la cepa de *L. delbrueckii/S. thermophilus* el crecimiento fue mayor comparando con el control, utilizando de 62.5 a 500 ppm de AG (Figura 1), esto resulta equiparable a lo reportado por Sabel y col. (2017) quienes obtuvieron una estimulación de diferentes BAL, empleando AG en concentraciones de 250 y 500 ppm. Resultados similares se han encontrado con diferentes especies de BAL, por ejemplo, Vivas y col. (1997) reportaron que, a concentraciones superiores a 200 ppm, el AG podía tener un efecto positivo particularmente sobre el crecimiento, de *L. hilgardii*, pero a concentraciones mayores de 1000 ppm, este compuesto inhibía el crecimiento de la bacteria. Particularmente, en presencia de diferentes concentraciones de AG, *L. casei* mantiene su crecimiento de manera similar al control (Figura 2). El porcentaje de inhibición encontrado solo fue del 2.79 % (Tabla 2) a la máxima concentración probada, en base a esto se pudo determinar que, si bien el AG no genera inhibición, tampoco una estimulación del crecimiento. En otros estudios, donde han utilizado a diferentes polifenoles, ha sido probada su capacidad de estimular el crecimiento de *L. casei* (Chodak y col., 2008), no obstante, depende del polifenol que se emplee y su concentración para inducir dicho efecto. Por otro lado, en el caso de *L. brevis*, el AG apenas generó una inhibición a concentraciones de 62.5 a 250 ppm (Figura 3). Sin embargo, a partir de 500 ppm el AG provocó una inhibición del 18.5 %, lo cual reveló de nuevo que el efecto de los polifenoles sobre las BAL dependerá de la concentración y el microorganismo.

Por otro lado, el RVT en general presentó efectos diferentes que el AG. Particularmente, en el caso de *L. delbrueckii/S. thermophilus* no generó una inhibición a la mínima concentración evaluada, sin embargo, conforme aumenta la concentración aumenta el porcentaje de

inhibición (Figura 1), llegando casi al 50% con una concentración de 500 ppm y alcanzando un 77% con 2000 ppm (Tabla 2), en el cual asemejó al control positivo (ampicilina). En el caso de *L. brevis*, el RVT mantuvo un porcentaje de inhibición alrededor del 50% con las concentraciones de 250 a 1000 ppm. Específicamente en el caso de *L. casei*, el RVT no generó una inhibición que sobrepasara el 6%, incluso en la máxima concentración probada, si bien la inhibición aumentó conforme la concentración, ninguna sobrepasó el 50% a comparación con las otras BAL (Tabla 2).

Tabla 2. Porcentajes de inhibición obtenidos con los tratamientos de las BAL y *E. coli* a las 24 horas de tratamiento.

AG: ácido gálico, RVT: resveratrol, NI: no se observó porcentaje de inhibición.

Cepa	[ppm]											
	62.5		125		250		500		1000		2000	
	AG	RVT	AG	RVT	AG	RVT	AG	RVT	AG	RVT	AG	RVT
<i>L. delbrueckii/S. thermophilus</i>	NI		NI	15.40	NI	16.65	NI	45.71	7.04	27.10	29.90	77.09
<i>L. casei</i>	0.52	1.18	0.17	3.82	NI	5.72	NI	5.59	NI	NI	2.80	5.97
<i>L. brevis</i>	0.85	5.11	1.52	13.86	3.66	53.07	18.54	46.16	42.63	55.21	22.36	67.94
<i>E. coli</i>	27.69	31.95	30.52	34.26	25.22	38.21	24.08	44.83	19.70	57.33	32.79	58.19

Por otro lado, al evaluar la cepa de *E. coli*, el AG inhibió el crecimiento en todas las concentraciones utilizadas siendo la de mayor acción la concentración de 2000 ppm, no obstante, el efecto de la concentración no sigue una tendencia conforme al crecimiento, ya que a pesar de ser la concentración de 2000 ppm la que inhibió más el crecimiento, la de 62.5 ppm fue la que le siguió. Por su parte, el efecto del RVT sobre el crecimiento *E. coli* dependió de la concentración utilizada. Todas las concentraciones probadas de RVT generaron cierto grado de inhibición, no obstante, las que generaron más fueron las de 1000 y 2000 ppm, siendo estas muy similares entre sí (Figura 4). Los resultados obtenidos con RVT son semejantes a los reportados por otros autores, tal es el caso de García y col. (2011) quienes reportaron que los flavonoles y estilbenos (incluyendo el RVT) generaban una potente actividad inhibitoria sobre algunas cepas de BAL. De igual manera Sabel y col. (2017) obtuvieron una actividad antimicrobiana elevada contra algunas BAL utilizando RVT a 250, 500 y 1000 ppm.

Por otra parte, es conocido que tanto el AG como el RVT poseen actividad antimicrobiana contra diferentes tipos de microorganismos. En el presente estudio, ambos compuestos generaron cierto porcentaje de inhibición contra una cepa enteropatógena de *E. coli* (Figura 4). En general, en ambos casos el porcentaje de inhibición es superior al 20%. Particularmente en el caso del tratamiento con AG, se obtuvieron porcentajes de inhibición desde la mínima concentración probada, el máximo porcentaje (32.79 %) se obtuvo con AG a 2000 ppm (Tabla 2). Esto sugiere que para alcanzar una dosis letal media (DL_{50}) se necesitaría emplear el AG a una concentración más elevada de 2000 ppm, lo cual concuerda con lo reportado por Borges y col. (2013) quienes obtuvieron una concentración mínima inhibitoria (MIC) de 1500 $\mu\text{g/mL}$ (equivalente a 1500 ppm) de AG sobre una cepa de *E. coli*. Por otro lado, el RVT generó porcentajes de inhibición más elevados a comparación del AG, los cuales van desde 30 al 58%. Así mismo se logró obtener la DL_{50} que tuvo un valor de 614 ppm. Esto sugiere que RVT actuó como un notable agente antimicrobiano. En otras investigaciones ha sido probado el efecto de este compuesto sobre *E. coli*, Paulo y col. (2010) en su estudio determinaron que la MIC de RVT sobre *E. coli* era superior a 400 $\mu\text{g/mL}$, así mismo, atribuyeron la capacidad antimicrobiana de dicho compuesto al hecho de su interferencia en el ciclo celular de la bacteria, no obstante, otros autores como Hwang y Lim (2015) le atribuyeron al RVT la capacidad de generar daño al DNA. En general, de acuerdo con los resultados obtenidos, se pudo determinar que tanto el AG como el RVT son moléculas prometedoras bactericidas debido a los diferentes efectos que llegan a generar sobre un determinado microorganismo. No obstante, estos efectos están relacionados con la concentración. Por un lado, se especula que el AG, actuó modulando el crecimiento de probióticos, al estimular el crecimiento de uno de estos y mantener el crecimiento de otro sin inhibirlo o estimularlo. A su vez, el AG fue capaz de generar inhibición sobre un microorganismo patógeno. Asumiendo que tanto probióticos como patógenos se pueden encontrar en la MBI, se sugiere que el AG puede actuar de manera sinérgica con los probióticos para lograr la inhibición de patógenos, esto se debe a que los probióticos son capaces de inhibir a microorganismos patógenos puesto que son capaces de producir bacteriocinas (Gillor y col., 2008).

Por otra parte, el RVT puede actuar como un antimicrobiano natural y por ende tiene potencial para aplicaciones terapéuticas. Esto es relevante debido a que conforme pasan los años, la resistencia a antibióticos sigue en aumento, y el desarrollo y búsqueda de compuestos con potencial antimicrobiano son necesarios para contrarrestar la aparición de microorganismos resistentes. Sin embargo, son necesarios más estudios para evaluar el potencial terapéutico del RVT (o cualquier otro compuesto natural) solo y en combinación con antibióticos actuales disponibles (Coppo y Marchese, 2014).

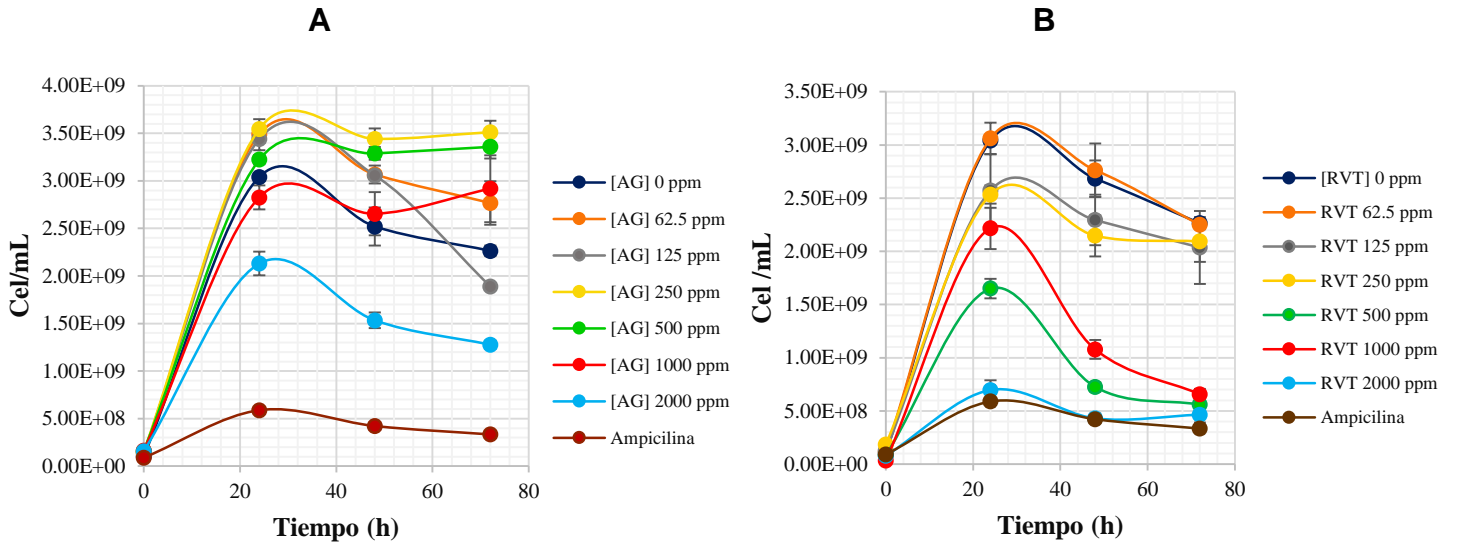


Figura 1. Efecto del AG (A) y RVT (B) sobre *L. delbrueckii/S. thermophilus*.

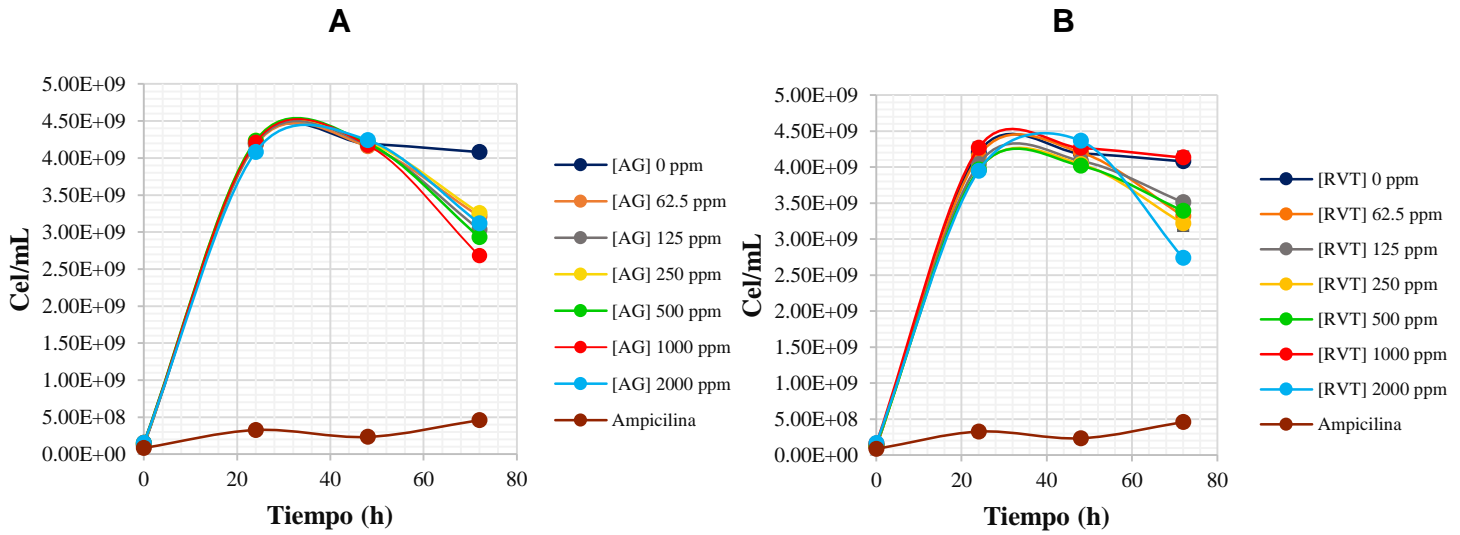


Figura 2. Efecto del AG (A) y RVT (B) sobre *L. casei*.

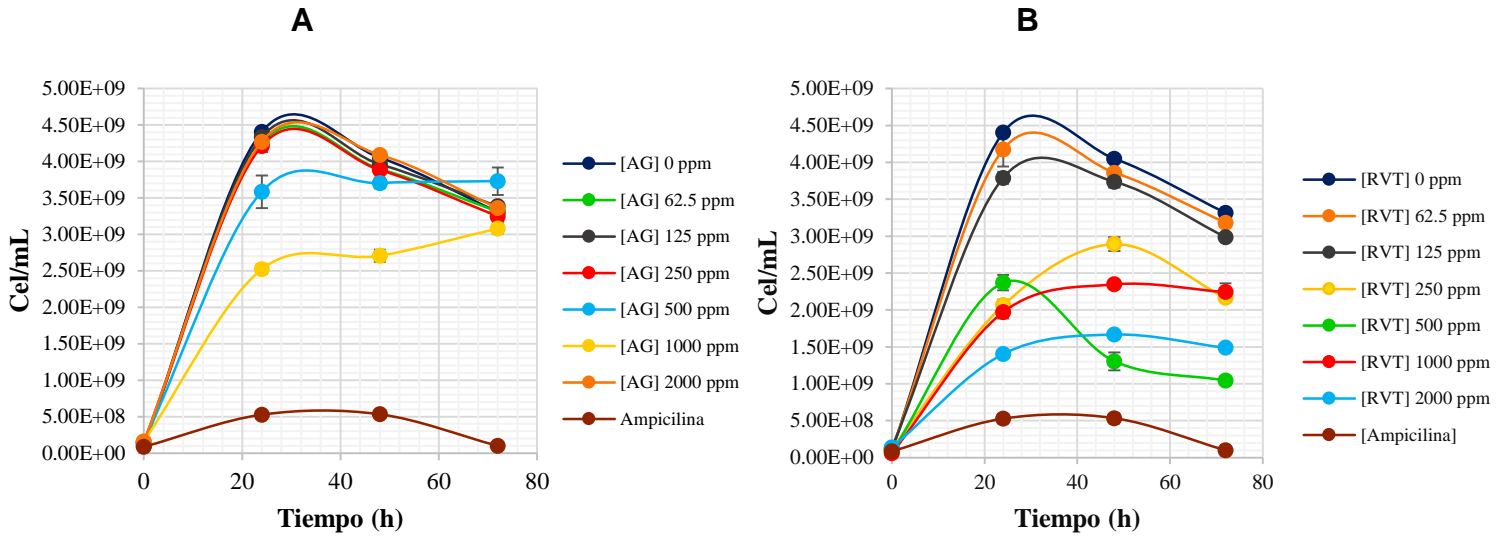
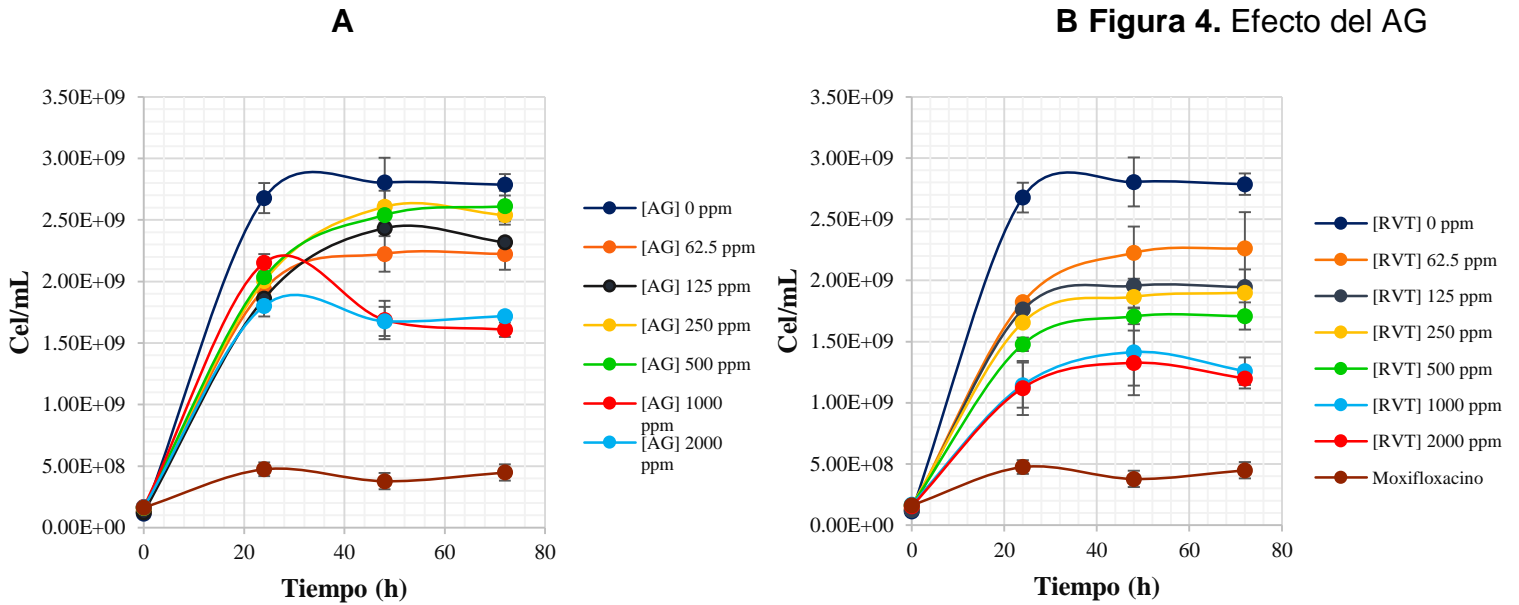


Figura 3. Efecto del AG (A) y RVT (B) sobre *L. brevis*.



(A) y RVT (B) sobre *E. coli* enteropatógena.

Conclusiones

Se demostró que el efecto del AG y RVT sobre los probióticos evaluados, dependerá de la concentración y del microorganismo a evaluar. En general, el compuesto que menos afectó a los probióticos fue el AG. El cual, dependiendo de la concentración puede estimular o mantener el crecimiento de algunos probióticos. De igual forma, se demostró que tanto el AG como el RVT poseen actividad antimicrobiana contra una cepa enteropatógena de *E. coli*, lo cual indica que ambos compuestos tienen potencial para aplicaciones terapéuticas futuras.

Bibliografía

- Azad, M. A. K., Sarker, M., Li, T., & Yin, J. (2018). Probiotic Species in the Modulation of Gut Microbiota: An Overview. *BioMed Research International*, 2018, 1–8.
- Burns, J., Yokota, T., Ashihara, H., Lean, J. & Crozier, A. (2002). Plant Foods and Herbal Sources of Resveratrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(11), 3337–3340.
- Chodak, A., Tarko, T., & Mateusz, S. (2008). The effect of antioxidants on *Lactobacillus casei* cultures. *Tecnologia Alimentaria*, 7(4), 39–52.
- Collombel, I., Campos, F., & Hogg, T. (2018). Changes in the Composition of the Lactic Acid Bacteria Behavior and the Diversity of *Oenococcus oeni* Isolated from Red Wines Supplemented with Selected Grape Phenolic Compounds. *Fermentation*, 5(1), 1.
- Coppo, E., & Marchese, A. (2014). Antibacterial Activity of Polyphenols. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 15(4), 380–390.
- Dludla, V., Nkambule, B., Jack, B., Mkandla, Z., Mutize, T., Silvestri, S. & Mazibuko-Mbeje, E. (2018). Inflammation and Oxidative Stress in an Obese State and the Protective Effects of Gallic Acid. *Nutrients*, 11(1), 23.
- Feyereisen, M., Mahony, J., Kelleher, P., Roberts, R. J., O'Sullivan, T., Geertman, A., & Van Sinderen, D. (2019). Comparative genome analysis of the *Lactobacillus brevis* species. *BMC Genomics*, 20(1), 416–431.
- Gillor, O., Etzion, A., & Riley, M. A. (2008). The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Applied microbiology and biotechnology*, 81(4), 591–606.
- Kechagia, M., Basoulis, D., Konstantopoulou, S., Dimitriadi, D., Gyftopoulou, K., Skarmoutsou, N., & Fakiri, E. M. (2013). Health Benefits of Probiotics: A Review. *ISRN Nutrition*, 2013, 1–7.
- Li, A.-N., Li, S., Zhang, Y.-J., Xu, X.-R., Chen, Y.-M. & Li, H.-B. (2014). Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients*, 6(12), 6020–6047.

Moldovan, B., Luminița, D., Achim, M., Clichici, S. & Filip A. (2016). A green approach to phytomediated synthesis of silver nanoparticles using *Sambucus nigra* L. fruits extract and their antioxidant activity. *Journal of Molecular Liquids*. 221: 271–278.

Paredes, S.F., Clemente, A.F. (2005). Polifenoles de aplicación en farmacia. Vol. 24. Núm. 8, 85-94.

Ozidal, T., Sela, D. A., Xiao, J., Boyacioglu, D., Chen, F., & Capanoglu, E. (2016). The Reciprocal Interactions between Polyphenols and Gut Microbiota and Effects on Bioaccessibility. *Nutrients*, 8(2), 78.

Sabel, A., Bredefel, S., Schlander, M., & Claus, H. (2017). Wine Phenolic Compounds: Antimicrobial Properties against Yeasts, Lactic Acid and Acetic Acid Bacteria. *Beverages*, 3(4), 29.

Saez, M., Gomez, C., Plaza, J. & Gil, A. (2015). The role of probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria in the prevention and treatment of inflammatory bowel disease and other related diseases: a systematic review of randomized human clinical trials. *BioMed research international*, 2015.

Suvorov, A. (2013). Gut Microbiota, Probiotics, and Human Health. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, 32(3), 81–91.

Thursby, E., & Juge, N. (2017). Introduction to the human gut microbiota. *Biochemical Journal*, 474(11), 1823–1836.

Vivas, N., Lonvaud-Funel, A. & Glories, Y. (1997). Effect of phenolic acids and anthocyanins on growth, viability and malolactic activity of a lactic acid bacterium. *Food Microbiology*. 14, 291-300.

Zanni, E., Schifano, E., Motta, S., Sciubba, F., Palleschi, C., Mauri, P. & Miccheli, A. (2017). Combination of Metabolomic and Proteomic Analysis Revealed Different Features among *Lactobacillus delbrueckii* Subspecies *bulgaricus* and *lactis* Strains While In Vivo Testing in the Model Organism *Caenorhabditis elegans* Highlighted Probiotic Properties. *Frontiers in microbiology*, 8, 1206-1218.