

Inhibición de Crecimiento Bacteriano en Agar de 2 Cepas Bacterianas por un Producto para la Higiene Íntima Femenina de pH Ácido y otro de pH Básico Comparados con Agua Destilada

Hilda Medina,

1 Lic. Gisela Colina Phillips, 2 Rosa Ledo 3

1Doctorado en Ciencias Odontológicas, Facultad de Odontología.

Universidad del Zulia. Calle 65 con Av. 19. Edificio Ciencia y Salud, 4to piso, Apartado 526. Maracaibo, Estado Zulia. 2

Resumen Se realizó un estudio de la inhibición de crecimiento in vitro de cepas de *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus* frente a 2 formulaciones indicadas para la higiene íntima femenina; una de pH ácido (pH 3,83) y otra de pH ligeramente básico (pH 8,0) por el método de difusión con discos. Se utilizó como comparador el agua destilada (pH 7,0). Los resultados demostraron que la exposición in vitro de los microorganismos *S. aureus* y *S. epidermidis* al producto de pH ácido resultó en inhibición de su crecimiento. La formulación de pH ligeramente alcalino, asociado a extracto de bardana (antiséptico), en ambas placas sembradas, resultó con halo de inhibición difuso y presentó colonias bacterianas en su interior. El disco con pH 7,0 no presentó halo de inhibición.

PALABRAS CLAVE: Acido láctico, Extracto de Bardana, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*.

Abstract

BACTERIAL GROWTH INHIBITION TESTED WITH AGAR DISK-DIFFUSION METHOD OF TWO BACTERIAL STRAINS BY TWO PRODUCTS FOR FEMALE GENITAL HYGIENE, ONE OF ACID pH AND ANOTHER ONE WITH SLIGHTLY BASIC pH, COMPARED AGAINST DISTILLED WATER

This study was based on the qualitative evaluation of bacterial growth inhibition of *S. aureus* and *S. epidermidis* by two different products for

female genital hygiene, one with acidic pH (pH 3,83) and another one with slightly basic pH (pH 8,0) compared against distilled water (pH 7,0) by the disk-diffusion method on agar. The results showed that in vitro exposure of the microorganisms *S. aureus* and *S. epidermidis* to the acidic pH resulted in growth inhibition. The slightly alkaline product, associated with the antiseptic burdock extract, resulted in a diffuse inhibition zone with some bacterial colonies within. The disc with pH 7,0 distilled water showed no inhibition zone in any of the two tested bacterial strains.

KEY WORDS: *Lactic acid, Bardana extract, S Epidermis, S aureus.*

Introducción **S**obre la superficie de la piel se describe la presencia de un compuesto de carácter funcional formado por una emulsión epicutánea denominada manto ácido o manto hidrolipídico de la piel que está constituido por una fase acuosa proveniente del agua del sudor que, entre otras cosas, contiene ácido láctico y es excretado por las glándulas sudoríparas y una fase grasosa compuesta por lípidos específicamente ácidos grasos excretados por las glándulas sebáceas. Esta emulsión que impregna las células superficiales de la piel es la responsable de su pH fisiológico y tiene carácter ácido. Este manto hidrolipídico de la piel, es una crema natural, que nos protege de las agresiones externas, impide la proliferación de patógenos y favorece el crecimiento de nuestra flora bacteriana normal. La alteración de este pH ácido puede tener efectos perjudiciales en la piel. El manto ácido fue descrito en 1928 por Marchionini, quien resaltó la relación entre el uso de jabones corrientes con los cambios de acidez de la piel. En el presente se ha establecido que los valores ácidos de 3.8 son bacteriostáticos.¹

Según algunos autores, si medimos la presencia de *Estafilococo aureus* al cambiar el pH de 7 a 5, obtenemos una disminución del conteo de bacterias en los cultivos. En general, las bacterias se desarrollan mejor en un pH neutro. En el caso de la piel, el lavado frecuente con jabón llevará el pH de la superficie hacia el medio alcalino lo que favorece el crecimiento de las bacterias. Toda alteración del valor de pH ácido de la superficie de la piel restringe la multiplicación de la flora microbiana normal, favoreciendo la producción de infecciones por agentes patógenos.¹ La importancia principal de pH en el estrato córneo se ha considerado clásicamente en términos de un mecanismo de defensa contra los microorganismos patógenos.² Estudios recientes han proporcionado nuevos conocimientos sobre la incidencia, causas y

consecuencias de la patogenia los cambios de pH en la piel de pacientes con dermatitis atópica, en particular con respecto a la función barrera de la piel y la colonización con crecimiento y virulencia del *S. aureus*.² Fue establecido en un estudio clínico que el valor promedio del pH natural de la piel es; ⁴⁻⁷ es decir, más bajo de lo que actualmente se supone. Este "manto ácido", conjuntamente con los factores de hidratación crean un ambiente donde reside la flora bacteriana normal, mientras que el crecimiento de la flora transitoria (por ejemplo, bacterias Gram negativas, como *Escherichia coli* y *Pseudomonas* o Gram positivas como el *Staphylococcus aureus* o de la especie *Candida albicans*, es inhibido. También fue demostrado en ese estudio que la dermatitis eccematosa se asocia a un pH de la piel más alcalino que el de la piel sana, así como también con el incremento del número de bacterias de la especie *S. aureus*, cuyas enterotoxinas son capaces de inducir eccema. El crecimiento de *S. aureus* en condiciones de pH ácido (pH 4,7) y en presencia de lactato es fuertemente inhibido.³ Hay amplia evidencia de que varias situaciones patológicas de la piel están asociadas con un pH de la piel elevado. Ejemplos de ello son la dermatitis atópica, la dermatitis de contacto irritante, la ictiosis y el acné.³ Una vez más, los resultados sugieren, que, incluso pequeñas diferencias del orden de una unidad de pH de aumento en la superficie de la piel influye notablemente sobre la flora residente, por lo que es indiscutible que el mismo pH tiene implicaciones importantes sobre la microecología cutánea. También se ha reportado que el *Staphylococcus aureus* muestra un crecimiento óptimo a pH 7,5, mientras que *B. epidermidis* crece rápidamente a partir de pH 5,5 hasta 8,5; lo cual no es el caso con un pH < 5,0.⁴ En los pacientes con dermatitis atópica se observa un aumento de pH de la piel. El *Staphylococcus aureus* es un agente causal importante de infecciones de heridas, celulitis, abscesos, osteomielitis, artritis séptica, endocarditis y septicemia.⁵ Como hemos mencionado anteriormente, el manto ácido de la piel está formado por ácidos grasos libres, productos de degradación, y secreciones de las glándulas sudoríparas que contienen ácido láctico; condición importante para el funcionamiento óptimo de las enzimas que procesan lípidos y aquellas que participan en la queratinización. El pH ácido previene la activación de serinproteasas que degradan corneodesmosomas y generan citoquinas activas primarias que inician la cascada de citoquinas que conduce al proceso inflamatorio.⁶ El manto ácido impide la invasión de patógenos y favorece la adherencia de las bacterias no patógenas al estrato córneo. La colonización por *S. aureus* conduce a la cronicidad y severidad de la dermatitis atópica a través de la inflamación causada por las toxinas bacterianas, e incremento en el daño de la barrera. El daño de la función de la barrera causado por el aumento del pH, con la disminución de ácidos grasos libres y de esfingosina

(precursor de las ceramidas) predispone a la infección y la colonización con *S. aureus*. Tanto la colonización y la infección empeorarán la disfunción de la barrera.⁶ Por otro lado, hay un incremento del número de *Staphylococcus epidermidis*, bacteria habitual en la piel humana, por aumento del pH. Esta bacteria se considera actualmente un patógeno oportunista importante, siendo el agente causal más frecuente de infecciones nosocomiales. En particular, el *S. epidermidis* representa la fuente más común de infecciones en los dispositivos médicos como catéteres, prótesis, marcapasos, implantes mamarios así como en la endocarditis bacteriana.^{7,8,9,10,11} La región de la piel vulvar tiene características especiales; el pH normal de esa zona es ácido. Es un área que presenta humedad, está expuesta a fricción, a presión y existe una alta colonización de bacterias. Estas características únicas de la zona vulvar la hacen propensa a la irritación y a la dermatitis alérgica por contacto. Varios factores pueden aumentar el pH vulvar tales como la oclusión, jabones alcalinos o neutros utilizados para higiene, falta o exceso de higiene, uso de pantiprotectores con superficie de plástico, ropa ajustada y ropa interior sintética. El pH vulvar aumentado o alcalino puede tener muchas consecuencias; puede dañar la barrera de la piel, perturbar la organización de la misma y favorecer procesos infecciosos e inflamatorios. El mantenimiento del pH ácido fisiológico de la piel es un factor crucial para mantener la salud de la zona y evitar procesos patológicos. En Venezuela se están comercializando productos para la higiene íntima femenina entre los cuales encontramos uno de pH ligeramente alcalino que tiene dentro de su composición el extracto de Bardana y otro de pH ácido que está compuesto por ácido láctico. El *Arctium lappa* o Bardana es una planta originaria de Japón y ambientada en Brasil, ampliamente utilizada en la medicina popular en todo el mundo por sus conocidas aplicaciones terapéuticas. El extracto de Bardana, también conocido como extracto de *Arctium Lappa* (Burdock) posee propiedades purificantes, antisépticas, antiinflamatorias, antioxidantes y antifúngicas.^{12,13,14,15} En vista de las consideraciones previas, el presente estudio tiene como fundamento evaluar cualitativamente la inhibición de crecimiento bacteriano de *S. aureus* y *S. epidermidis* por el método de difusión con disco en agar a través de dos productos comercializados en Venezuela para la higiene íntima femenina y a los que hicimos referencia previamente, uno de pH ácido (Lactacyd®) y otro de pH básico que contiene Extracto de Bardana; ambos productos fueron comparados con agua destilada (pH 7) como control.

Materiales y Métodos Se realizaron los procedimientos correspondientes para la preparación, esterilización y vaciado de los medios de cultivo a utilizar en el estudio (caldo infusión cerebro corazón y Agar Mueller Hinton). El caldo infusión cerebro corazón (Brain Heart Infusion Broth). De la compañía Hi Media Laboratories Pvt. LTD, Mumbai, India. **Preparación.** Se procedió a pesar y disolver la base deshidratada en agua destilada, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Una vez disueltos los componentes del medio en el matraz, se repartieron en tubos a razón de 5 mL de solución por tubo, se colocó un tapón y se esterilizó en el autoclave a 15 lb/pulg² por 15 minutos. - Agar BBITM Mueller Hinton II Agar, de Benton, Dickinson and Company. Sparks MD21152, USA. Se pesó y disolvió la base deshidratada en agua destilada de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Para asegurar la completa disolución del agar, el medio se calentó hasta ebullición, al mismo tiempo se sometió a agitación previamente a su esterilización en el autoclave. Se tapó el matraz con tapón de algodón y se cubrió con papel de aluminio para esterilizar en el autoclave a 15 lb/pulg² por 15 minutos. Inmediatamente, después de esterilizar, se enfrió en baño de agua hasta 45-50°C y luego se repartió el medio en placas de Petri estériles y se dejaron en reposo para su solidificación. - Mc Farland. El estándar de Mc Farland se preparó añadiendo 0,5 ml de cloruro de bario al 1% en 99,5 mL de ácido sulfúrico 0,36 N. La comparación de turbidez entre el estándar y el caldo con el microorganismo en estudio se efectuó observándoles contra una cartulina blanca, de líneas negras verticales y paralelas. Si la turbidez de la suspensión era menor, se inoculaba nuevamente, y si la turbidez era mayor se debía diluir con solución fisiológica hasta igualarlas. La concentración bacteriana fue de aproximadamente, 108 microorganismos por mililitro. Para esto, se tocó con un hisopo estéril la superficie de una o varias colonias de cepas bacterianas puras (de la misma especie), luego se sumergió este hisopo en 2 o 3 mL de caldo nutritivo hasta que la turbidez del medio fue equivalente al estándar 0,5 de Mc Farland, cuya turbidez correspondía a la concentración de microorganismos buscada. 2. En una cápsula de Petri se colocaron 12 recortes circulares de papel filtro Wathman No. 2 de 6 mm de diámetro (recortados con una perforadora) y se esterilizaron en el horno a 180 °C durante 2 horas.

Fase experimental Para este análisis se obtuvieron 2 cepas puras de bacterias (CVCM - Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos. Instituto de Biología Experimental. Facultad de Ciencias. UCV. Caracas, Venezuela.): - *Staphylococcus epidermidis* CVCM 637 (ATCC 14990) - *Staphylococcus aureus* Subsp. Aureus CVCM

389 (Bioanálisis -53-123-A). Estas cepas puras fueron inoculadas en tubos con 5 mL de caldo infusión cerebro corazón y luego fueron incubadas por 24 horas, a 37° C. Posteriormente, para obtener colonias aisladas la muestra se extendió sobre la superficie de Agar Mueller Hinton utilizando el asa de platino esterilizada con la llama del mechero, de forma que al final de dicha siembra, la cantidad de inóculo se esperaba fuera lo suficientemente baja como para que se depositasen células aisladas y distanciadas en la superficie del agar, a partir de las cuales surgieran colonias separadas, tras incubar por 24h a 37°C.

Posteriormente, se resembraron las cepas en tubos con 5 mL de caldo infusión cerebro corazón y se incubaron por 24 horas a 37° C. La comparación de turbidez entre el estándar McFarland y el caldo con el microorganismo en estudio se efectuó mirándolas contra una cartulina blanca de líneas negras verticales y paralelas. Si la turbidez era mayor, se diluía con solución fisiológica hasta igualarlas. Para que los resultados obtenidos de la activación bacteriana fueran representativos y confiables, cada siembra se realizó por duplicado. Una vez logrado esto, se sumergió un hisopo estéril y seco en la suspensión bacteriana y se eliminó el exceso de líquido haciendo rotar el hisopo contra la pared interna del tubo. Se inoculó con ésta la superficie de una placa de agar Mueller-Hinton a temperatura ambiente. Este procedimiento se repitió de manera de obtener un total de 4 placas inoculadas; 2 placas para cada cepa con la adición de los tres discos, con las soluciones del estudio y el disco control en cada placa. Luego, en cada disco de papel de filtro Whatman se colocaron 1000 microlitros de su correspondiente producto, se esperaron unos minutos a que se absorbiera completamente por el disco y se procedió a colocarlo en el respectivo cultivo. Los discos fueron colocados manualmente utilizando una pinza (esterilizada mediante flameado con alcohol) y presionando suavemente sobre la superficie de agar con la punta de la pinza, para asegurar un contacto uniforme con el agar, cuidando de no moverlos una vez colocados en su lugar y a una distancia adecuada entre ellos para evitar errores en la visualización de los halos correspondientes. Se identificaron las zonas de los discos según pH como ácida con la letra A, básica con la letra B y neutra con la letra N. Se colocaron las cápsulas de Petri en la incubadora por 24 horas a 37 °C. Luego del período de incubación, se observaron los halos de inhibición y se midieron utilizando una regla milimetrada.

Resultados Luego de 24 horas, se evaluaron las placas y se observaron zonas de inhibición de crecimiento bacteriano (Tabla 1, Tabla 2, Figuras 1, 2 y 3). Los diámetros de estas zonas se midieron cuidadosamente por la parte posterior de la placa con una regla milimetrada. Los halos de inhibición observados tanto para

Staphylococcus aureus como para *Staphylococcus epidermidis* alrededor de los discos impregnados con producto de pH ácido (Lactacyd) fueron transparentes y de bordes nítidos. Los halos de inhibición observados para las cepas de *Staphylococcus aureus* y de *Staphylococcus epidermidis* con el disco impregnado con producto de pH ligeramente alcalino (extracto de bardana) presentó características difusas con bordes borrosos y colonias dentro del halo, indicando la presencia de subpoblación de bacterias resistentes, por lo que hubo que medir el halo tomando en consideración la aparición de estas colonias.

El disco control de pH 7 no mostró halo de inhibición para ninguna de las dos cepas bacterianas.

Conclusiones En el presente estudio, los halos de inhibición encontrados alrededor de los discos con pH ácido tuvieron una magnitud importante, con efecto inhibitorio de crecimiento bacteriano. Los halos de inhibición observados para las cepas de *Staphylococcus aureus* y de *Staphylococcus epidermidis* con el disco impregnado con el producto de pH ligeramente alcalino (extracto de bardana) presentaron colonias dentro del mismo, representando una subpoblación de bacterias resistentes. Esas bacterias resistentes si están en la piel pudieran ser responsables, en un momento dado, de patologías más severas. Es importante resaltar que el *Staphylococcus aureus* muestra un crecimiento óptimo a pH 7,5, y el *B. epidermidis* crece rápidamente a partir de pH 5,5 a 8,5, lo que no es el caso con un pH de 5,0 así que, cuando comparamos la placa con disco contentivo de extracto de bardana en una solución ligeramente alcalina con la del disco de pH 7, podemos inferir que la inhibición bacteriana de la subpoblación sensible, posiblemente sea debida al efecto antiséptico del extracto de bardana.

Los halos de inhibición observados en los medios de cultivos marcados como A para las 2 cepas utilizadas en el presente estudio se consideran indicativos de inhibición de crecimiento inducido por el pH ácido, por lo que se puede concluir que el pH ácido tiene poder inhibitorio sobre el crecimiento de estas bacterias, potencialmente patógenas, a nivel de la piel. Si la piel mantiene su pH ácido, se mantiene equilibrada la flora normal lo cual va a proporcionar mayor prevención sobre la aparición de patologías bacterianas. Con base en los hallazgos del presente estudio, es posible concluir que el producto de pH ácido, que contiene como ingrediente activo ácido láctico, protege contra la proliferación de bacterias potencialmente patógenas sobre la superficie de la piel.

Tabla 1

PRESENCIA DE HALOS DE INHIBICIÓN							
Cepas	Lactacyd Zona A		Halos de inhibición				
			E. Bardana Zona B		Agua Zona N		
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	x		X (Difuso)				x
<i>Staphylococcus aureus</i>	x		X (Difuso)				x

Tabla 2

MEDICIÓN DE HALOS DE INHIBICIÓN			
Cepas	Halos de inhibición en mm		
	Lactacyd Zona A	E. Bardana Zona B	Agua Zona N
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	20 mm	6 mm	0 mm
<i>Staphylococcus aureus</i>	16 mm	6 mm	0 mm

Figura 1

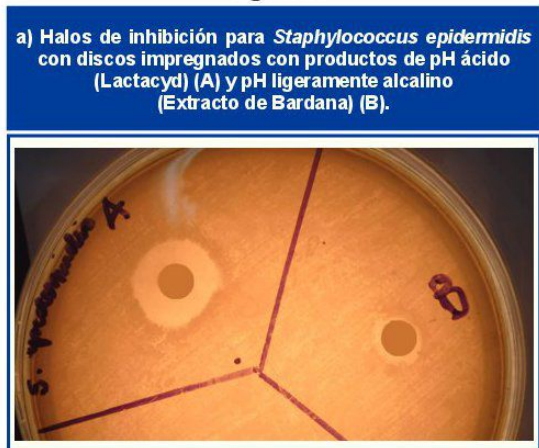


Figura 2

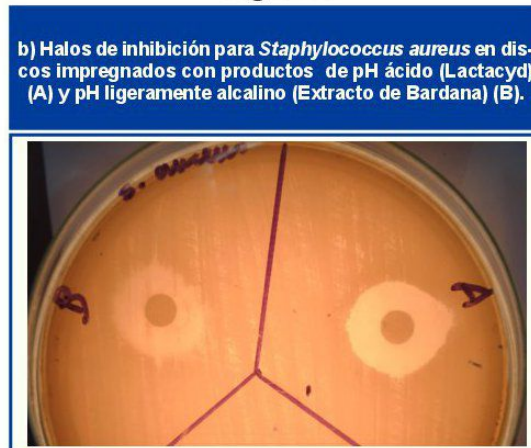
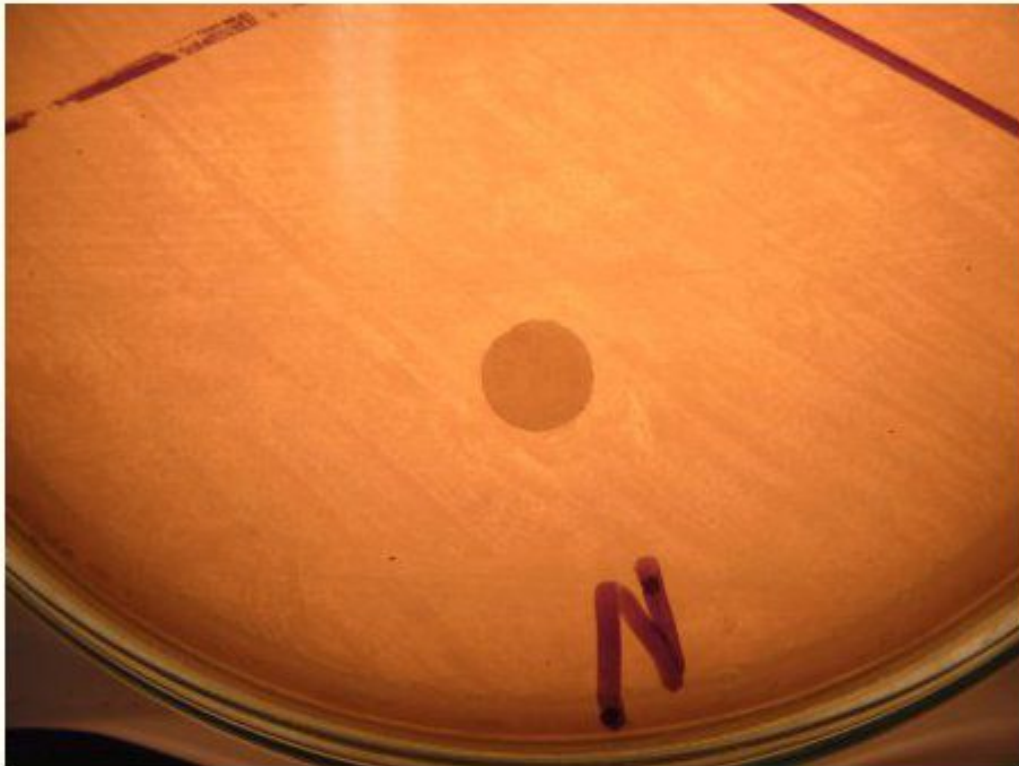


Figura 3

c) Halos de inhibición para ambas cepas con disco de pH neutro (agua)



Referencias

1. Maria Cecilia Orlandi. Piel sana y manto ácido. *Folia Dermatol (Peru)*. 2004;15:121-124.
2. Frank Rippke et al. Stratum Corneum pH in Atopic Dermatitis Skin Barrier Impact on Function and Colonization with *Staphylococcus Aureus*. *Am J Clin Dermatol*. 2004;5:217-223.
3. H. Lambers et al. Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. *Intern J Cosmetic Sci*. 2006;28:359-370.
4. MH. Schmid et al. The Concept of the Acid Mantle of the Skin: Its Relevance for the Choice of Skin Cleansers. *Dermatology*. 1995;191:276-280.
5. B Lynn Johnston et al. *Staphylococcus aureus*: The persistent Pathogen. *Can J Infect Dis Vol 14 N0 6 November/December 2003*.
6. Fatema Thawer. Skin barrier function and atopic eczema. *Curr Allergy Clin Immunol*. 2011;24:34-38.
7. Petter Cordero Y. Infecciones bacterianas de piel. *Derm Venez*. 1993; 31 (Supl. 1): 47-63.
8. Aragon-Sanchez et al. Clinical significance of the isolation of *Staphylococcus epidermidis* from bone biopsy in diabetic foot osteomyelitis. *Diab Foot & Ankle*. 2010;1:5418.
9. Lessandra Michelim et al. Pathogenicity factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus epidermidis* associated with nosocomial infections occurring in intensive care units. *Brazil J Microb*. 2005; 36:17-23
10. Michael Otto. *Staphylococcus epidermidis* – the “accidental” pathogen. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7:555-567.
11. Maureen T. McCann et al. *Staphylococcus epidermidis* device-related infections: pathogenesis and clinical management. *J Pharm Pharmacol*. 2008;60:1551-1571.
12. Sandra Gómez et al. Biocide activity of natural extracts against microorganisms affecting archives. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromáticas*. 2008;7:207-210.
13. Marjorie Murphy Cowan. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiol Rev*. 1999;27:564-582.
14. Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). Assessment report on *Arctium lappa L., radix*. EMA/HMPC/246764/2009. 16 September 2010.
15. Juliana Vianna PEREIRA et al. Antimicrobial Activity of *Arctium lappa* Constituents Against Microorganisms Commonly Found in Endodontic Infections. *Braz Dent J*. 2005;16:192-196.