

Efecto inhibitorio, in vitro del extracto etanólico de *Plantago Major* “Llantén” frente a cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* β -hemolíticos

Johana Acosta-Quiroz¹, Carmen Verástegui-Gaona¹,
Sebastian Iglesias-Osores¹, Mario C. Moreno-Mantilla¹,
Virgilio E Failoc-Rojas²



1. Biólogo. Facultad de Biología. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú
2. Médico, estudiante maestría en Ciencias e Investigación Epidemiológicas. Unidad de Investigación para la Generación y Síntesis de Evidencias en Salud, Universidad San Ignacio de Loyola, Lima, Perú

Autor corresponsal: Virgilio E Failoc-Rojas. Dirección: Av Manuel Seoane 1344, La Victoria, Chiclayo. Teléfono: +51 948845837.
Email: virgiliofr@gmail.com

Recibido: 25/2/2019

Aceptado: 14/4/2019

RESUMEN

El objetivo del estudio fue determinar el efecto inhibitorio in vitro del extracto etanólico de *Plantago major* “llantén” sobre cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* β -hemolíticos. Se utilizó el método de difusión para el extracto etanólico, para la formación de halos de inhibición y el método de macrodilución en Caldo para determinar la CMI. Se encontró que *P. major* es sensible para *Staphylococcus aureus* con un promedio del halo de inhibición 14,64 mm y un promedio de 150 mg/ml respecto a la CMI. Mientras que *Streptococcus* β hemolíticos no presentó sensibilidad. *Plantago major* mostró efecto inhibitorio sobre *Staphylococcus aureus*.

Palabras clave: *plantago major*, *staphylococcus aureus*, *streptococcus* β -hemolíticos, extracto etanólico, terapias complementarias (DeCS).

Inhibitory effect, in vitro of the ethanol extract of *Plantago Major* “Llantén” against strains of *Staphylococcus aureus* and β -hemolytic *Streptococcus*

ABSTRACT

The aim of the study was to determine the in vitro inhibitory effect of the ethanol extract of *Plantago major* “llanten” on strains of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus* β -hemolytic. The diffusion method was used for the ethanol extract, for the formation of inhibition halos and the macrodilution method in Caldo to determine the MIC. It was found that *P. major* is sensitive for *Staphylococcus aureus* with an average inhibition halo of 14.64 mm and an average of 150 mg / ml with respect to the MIC. While *Streptococcus*- β -hemolytic did not show sensitivity. *Plantago major* showed an inhibitory effect on *Staphylococcus aureus*.

Keywords: *plantago major*, *staphylococcus aureus*, β -hemolytic streptococcus, ethanol extract, complementary therapies (MeSH).

INTRODUCCIÓN

Los antibióticos son la principal herramienta terapéutica con la que se cuenta para enfrentar patologías infecciosas; no obstante, la resistencia creciente ha generado un problema

de grandes dimensiones y representa en la actualidad un desafío terapéutico(1).

La incidencia de microorganismos resistentes a los antibióticos sigue en aumento, un ejemplo de ello es la resistencia

del Staphylococcus aureus, un agente infeccioso, tanto en el ámbito comunitario como en el hospitalario. Se calcula que los pacientes con infecciones por S. aureus resistente a la meticilina tienen una probabilidad de morir un 64% mayor que los pacientes con infecciones no resistentes, y esto resulta cada vez más difícil de tratar porque los medicamentos son menos eficaces(2,3). Staphylococcus aureus resistente a meticilina hospitalario (SAMR- hosp) tiene factores de riesgo conocidos para su adquisición, que incluyen la hospitalización o cirugías recientes, diálisis y dispositivos vasculares. Sin embargo, se han documentado casos de SAMR en personas de la comunidad, previamente saludables, sin los factores de riesgo establecidos para la adquisición de SAMR-hosp(3).

Otro de los patógenos bacterianos más importantes y que también está generando resistencia a los antibióticos es Streptococcus β hemolíticos Grupo A, un coco grampositivo que puede encontrarse en las vías respiratorias superiores y en la superficie cutánea en pacientes sanos, y es la causa bacteriana más frecuente de faringitis aguda, también origina distintas infecciones sistémicas. En un estudio realizado en México se determinó la susceptibilidad antimicrobiana de Streptococcus pyogenes y se encontró que todas las cepas fueron sensible a los B lactámicos y clindamicina y el 16% de las cepas fueron resistentes a los macrólidos(4,5).

Las plantas medicinales son utilizadas desde tiempos remotos para tratar diversas enfermedades, como el Plantago major "llantén", que es básicamente astringente, es decir que contrae los tejidos orgánicos, constituyendo un buen antiinflamatorio, antidiarreico, etc. Posee también propiedades medicinales hemostáticas ya que incrementa la coagulación de la sangre en las heridas, evitando hemorragias(6). Las hojas frescas contienen las propiedades desinfectantes y favorecer la cicatrización. Una hoja fresca, una vez lavada, al ser aplicada sobre una herida, ayuda a detener el flujo de la sangre, cicatrizarla y prevenir el riesgo de infección. Las investigaciones realizadas sobre P. major han revelado la presencia de mucílagos, pectinas, flavonoides, taninos, un glucósido cromogénico iridoide denominado aucubósido (aucubina) y otro glucósido llamado catalpol. Tanto las hojas como las flores y el tallo poseen el glucósido aucubina. La aucubigenina es el principio activo de mayor relevancia; proviene de sustancias inactivas como polímeros de este compuesto y de la aucubina(7). En el proceso de catabolismo de esta sustancia, por hidrólisis, se forma un aldehído que actúa como bactericida, ya que desnaturaliza las proteínas de ciertos microorganismos(8). Por todo ello, podría ser una alternativa a los antibióticos ya que es de gran utilidad, de bajo costo y sim-

ple accesibilidad; convirtiéndose en una promoción de estilos de vida saludables a fin de mejorar las condiciones de salud.

Por esta razón se realiza este estudio, que tiene como objetivos determinar el efecto antibacteriano, in vitro del extracto etanólico de Plantago major "llantén", a concentraciones de 100 mg/ml, 200 mg/ml, 300 mg/ml, 500 mg/ml, 600 mg/ml y 800 mg/ml, frente a cepas de Staphylococcus aureus y Streptococcus β - hemolíticos y determinar la Concentración Mínima Inhibitoria del extracto etanólico de Plantago major "llantén" sobre cepas de Staphylococcus aureus y Streptococcus β - hemolíticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio y diseño

Se aplicó el diseño experimental de estímulo creciente. Los grupos experimentales son las cepas bacterianas Staphylococcus aureus y Streptococcus β hemolíticos, a los cuales se aplicó como estudio los extractos etanólicos de Plantago major "llantén", a diferentes concentraciones. Se utilizaron 5 cepas de Staphylococcus aureus y 5 cepas de Streptococcus β hemolíticos provenientes del cepario de Laboratorio de Microbiología Humana de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo-Lambayeque, que fueron enfrentadas a 6 concentraciones de 100 mg/ml, 200 mg/ml, 300 mg/l, 500 mg/ml, 600 mg/ml y 800 mg/ml de extracto etanólico de Plantago major "llantén", y tres el número de repeticiones, obteniendo un total de 180 unidades experimentales/especie.

Material vegetal

El material botánico recolectado para el presente estudio fueron las hojas de Plantago major "llantén", las cuales se obtuvieron del Biohuerto Ecológico San Martín-Lambayeque.

Preparación del extracto

Tratamiento de las hojas y obtención del extracto etanólico de Plantago major "llantén".

Se seleccionaron las hojas aleatoriamente para su posterior secado por 5 días en estufa, una vez secas se procedió a triturar y en un frasco de vidrio al que se le agregó etanol 96° para su posterior maceración durante 7 días. Pasado los 7 días se procedió al filtrado, el cual se colocó en una cápsula de porcelana en estufa, haciendo que se evapore para obtener el extracto seco etanólico que luego se pesó.

Preparación de las concentraciones del extracto etanólico de Plantago major "llantén".

Se usaron 5 g de extracto etanólico, al cual se agregó 5

ml de alcohol al 40% (proporción 1:1) y así se obtuvo la solución madre con una concentración de 1000 mg/ml. Partiendo de la solución madre se realizaron las respectivas diluciones para obtener concentraciones de 100 mg/ml, 200 mg/ml, 300 mg/ml, 500 mg/ml, 600 mg/ml y 800 mg/ml y el control fue alcohol 40%.

Prueba de susceptibilidad bacteriana según el método de difusión

Para esta prueba se usaron placas de Petri estériles a las cuales se les colocaron 10 ml de agar Müller-Hinton, se realizó control de esterilización, se colocó los discos conteniendo el extracto etanólico de Plantago mayor "llantén" descritos anteriormente en las placas Petri. Posteriormente son incubadas a 37°C por 24 horas. Transcurrido el tiempo se midió los diámetros de las zonas de inhibición completa (incluyendo el diámetro del disco), usando una regla.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria

La determinación de la concentración mínima inhibitoria para las cepas de Staphylococcus aureus se realizó siguiendo las recomendaciones del método de macrodilución en tubo según Norma Técnica Peruana N° 30 del INS. El punto final se define a simple vista por la falta de turbidez del medio, para ello se comparó cada tubo con el tubo control del crecimiento.

Preparación de los discos de sensibilidad

Para la preparación de los discos de sensibilidad se utilizó papel filtro Whatman N° 1 del cual se obtuvieron discos de 5 mm de diámetro. Los discos se colocaron dentro de un frasco de vidrio para su esterilización en autoclave, se secaron en horno a 80°C por 24 horas, posteriormente en los discos se colocaron 20ul de cada una de las concentraciones del extracto P. mayor "llantén", y se dejó en reposo por 5 minutos para luego realizar la prueba de susceptibilidad.

Análisis estadístico

Se usó la prueba estadística de Análisis de Varianza (ANOVA) para contrastar las medias de los promedios de los halos de inhibición para las cepas de Staphylococcus aureus a diferentes concentraciones del extracto etanólico de Plantago mayor "llantén". Los análisis estadísticos fueron realizados mediante el paquete estadístico IBM SPSS versión 23.0.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el desarrollo experimental del presente trabajo demostraron que el crecimiento de las

cepas de Staphylococcus aureus fue inhibido por el extracto etanólico de Plantago mayor "llantén".

Considerando la concentración inicial (1,5x10⁸ UFC/ml) de Staphylococcus aureus expuestos a la acción del extracto etanólico de Plantago mayor, los resultados de la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de Plantago mayor frente a cepas bacterianas de Staphylococcus aureus fueron los siguientes:

En todas las cepas de Streptococcus β hemolíticos se observó la resistencia frente al extracto de Plantago mayor.

En todas las muestras se encontró actividad de Plantago mayor frente a Staphylococcus aureus.

En el crecimiento de las cepas de Staphylococcus aureus que fueron inhibidos por el extracto etanólico de Plantago mayor "llantén", se observó que hubo mayor halo de inhibición de crecimiento conforme se incrementaban las concentraciones del principio activo (100 mg/ml, 200 mg/ml, 300 mg/ml, 500 mg/ml, 600 mg/ml y 800 mg/ml), siendo la concentración de 800 mg/ml la que mostró mayor halo de inhibición (14,64 mm). En la especie Streptococcus β -hemolíticos no presentó sensibilidad al extracto etanólico de Plantago mayor "llantén"

Al realizar el Análisis de varianza (ANOVA) de la susceptibilidad de Staphylococcus aureus a diferentes concentraciones del extracto etanólico de Plantago mayor, se infiere que las variables concentración y cepa e interacción concentración cepa presentan diferencias estadísticas (Tabla 2). De tal manera que los resultados permitieron observar que las variables cepa y concentración, influyeron significativamente en la efectividad del extracto etanólico de Plantago mayor sobre la susceptibilidad de Staphylococcus aureus.

DISCUSIÓN

Se consideró que, si los extractos mostraban un MIC inferior a 100 μ g/ml, la actividad antimicrobiana era buena. De 100 a 300 μ g/ml la actividad antimicrobiana fue moderada.

Se conoce que la efectividad antibacteriana de una especie de planta particular varía según el área geográfica de la planta, la parte de la planta y el método de extracción (9). El presente estudio demuestra resultados preliminares de investigaciones sobre la utilidad antimicrobiana del extracto etanólico de Plantago mayor "llantén". Presentó efecto inhibitorio sobre Staphylococcus aureus, siendo la concentración de 800 mg/ml la que mostró mayor halo de inhibición (14.64 mm).

Concordando con los estudios realizados por Crisanto y Reaño en el 2016, quienes llevaron a cabo una investigación

Tabla N°1: Promedio del halo de inhibición (mm) de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* β -hemolíticos por el efecto del extracto etanólico de *Plantago mayor* "llantén".

Concentración del Extracto (mg/ml)	Halos de inhibición por especies	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus</i> β -hemolíticos
100	5.57	No presentó
200	7.41	No presentó
300	10.87	No presentó
500	12.37	No presentó
600	13.35	No presentó
800	14.64	No presentó

Tabla N°2: Análisis de varianza de los promedios de los halos de inhibición para las cepas de *Staphylococcus aureus* a diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Plantago mayor* "llantén".

	SC	GL	CM	F	p
Concentración (K)	937.839	5	187.567	94.837	
Cepa (C)	327.589	4	81.897	41.408	
Concentración*Cepa	122.855	20	6.143	3.106	<0,001
Total	1506.949	89			

SC: Suma de Cuadrados GL: Grados de Libertad
CM: Cuadrados medios p: Probabilidad

donde comprobaron el efecto inhibitorio del extracto etanólico de las hojas de *Plantago mayor* "llantén" sobre *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* obteniendo diámetros de zona de inhibición de 20.3 mm y 20 mm frente a *Staphylococcus aureus* a una concentración de 12 mg/ml y 6 mg/ml respectivamente(10). Esto puede deberse a la similitud de los estudios en los métodos de extracción, y porque el efecto inhibitorio del extracto etanólico del *Plantago mayor* es fuerte frente a *Staphylococcus aureus*. Sin embargo, era necesario aportar alguna evidencia adicional que confirme estos hallazgos, pues se encontró en un estudio brasilero *Plantago mayor*, que este es débilmente antimicrobiano en *S. aureus* con una concentración mínima inhibitoria de 1000 μ g/ml; lo que difiere un poco de nuestro estudio donde las cepas más resistente de este estudio que fueron la cepa 1 y 2 del presente estudio que son las más resistentes con una concentración mínima inhibitoria de 200 μ g/ml(11). Esto tal vez se debió a los métodos de extracción y a la diferencia entre las regiones, lo que puede debilitar (por la forma de cultivar) las propiedades intrínsecas de las plantas. Aun así observamos que *Plantago mayor* tiene actividad antimicrobiana.

En un estudio del efecto antimicrobiano del extracto acetonico de *Plantago mayor*, presentó efecto inhibitorio sobre *Staphylococcus aureus* con un valor MIC de 200 mg/ml; comparándose con la cepa 1 y 2 del presente estudio que son las más resistentes, mientras que las cepas 4 y 5 son las más sensible. Esto podría deberse a los cuadros infecciosos de donde procedieron y a la terapia antibacteriana a la que pudieron haber sido expuestas(12).

Los resultados obtenidos demuestran la susceptibilidad de *Staphylococcus aureus* frente al extracto etanólico de *Plantago mayor* contribuyendo en la investigación de nuevas alternativas para nuevos tratamientos con la finalidad de validar el uso de plantas medicinales.

El uso terapéutico de plantas medicinales, como alternativas de las medicinas farmacéuticas, se aplica desde la antigüedad para curar o aliviar las enfermedades. Sin embargo, no existe todavía la suficiente evidencia científica que consolide a la medicina tradicional dentro de los sistemas de salud. El abuso indiscriminado de los antibióticos puede generar resistencia, cuando se expone una cepa bacteriana a un antibiótico de forma innecesaria.

CONCLUSIONES

Se concluye que extracto etanólico de *Plantago mayor* "llantén" tiene actividad antimicrobiana buena y moderada frente a *Staphylococcus aureus*, pero nula actividad antimicrobiana ante *Streptococcus* β hemolíticos.

Conflicto de interés: Los autores declaran no tener conflicto de interés.



Plantago Mayor



Hola de Llantén Mayor

BIBLIOGRAFÍA

1. Medina A, Machado M, Machado J. Resistencia a antibióticos, una crisis global. *Rev medica risaralda*. 2015;21(1):1.
2. García-Apac C. Staphylococcus aureus meticilino resistente adquirido en la comunidad. *Acta Médica Peruana*. 2011;28(3):159–62.
3. Centro CDS. Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos. *Rev Panam Salud Pública*. 2007;10(4):284–93.
4. Alarcón OC, Ordenes PMC, Denegri MM, Zúñiga J. Infecciones invasoras por Streptococcus b hemolítico Grupo A. *Rev Chil pediatría*. 2009;77(5):487–91.
5. Rodríguez RS, Calderón-Jaimes E, Gómez-Barreto D, Espinosa-de Los Monteros LE. Características de la resistencia antimicrobiana de una colección clínica de Streptococcus pyogenes. *Salud Pública Mex*. 2000;42(3):226–9.
6. Adom MB, Taher M, Mutalabisin MF, Amri MS, Abdul Kudos MB, Wan Sulaiman MWA, et al. Chemical constituents and medical benefits of Plantago major. Vol. 96, *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2017; 348–60.
7. Velasco-Lezama R, Román-Ramos R, Tapia-Aguilar R, Pérez-Gutiérrez MS, Vega-Avila E. Effect of Plantago major on cell proliferation in vitro. *J Ethnopharmacol*. 2005;103(1):36–42.
8. Blanco B, Saborio A, Garro G. Descripción anatómica , propiedades medicinales y uso potencial de Plantago major (Llantén mayor). *Tecnol en Marcha*. 2008;21(2):17–24.
9. Metiner K, Özkan O, Ak S. Antibacterial Effects of Ethanol and Acetone Extract of Plantago major L. on Gram Positive and Gram Negative Bacteria. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. 2012;18(3):503–5.
10. Crisanto-Ahuite A, Reaño-Rojas CD. Evaluación de la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de las hojas de Plantago major (Llantén) frente a Pseudomonas aeruginosa y Staphylococcus aureus, por el método de difusión de disco y macrodilución [Internet]. Universidad Nacional de la Amazonia Peruana; 2016 [cited 2019 Feb 20]. Available from: <http://repositorio.unapikitos.edu.pe/handle/UNAP/3877>
11. Nakamura CV, Sanches NR, Pessini GL, Dias Filho BP, Holecz FB, Cortez DAG. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;97(7):1027–31.
12. Özkan O, Metiner K, AKS. Antibacterial Effects of Ethanol and Acetone Extract of Plantago major L. on Gram Positive and Gram Negative Bacteria. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. 2012.