

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *BEAUTEMPZIA AVICENNIFOLIA* “VICHAYO” FRENTE A CEPAS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, *ESCHERICHIA COLI* Y *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* PRODUCTORAS DE BETA-LACTAMASAS.

Saavedra-Camacho, Johnny Leandro,

Biólogo, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Calle Juan XXIII 391, Lambayeque, Perú. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3842-4314>

Yamunaqué-Castro, Luis Antonio,

Biólogo, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Calle Juan XXIII 391, Lambayeque, Perú. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2985-3464>

Vergara-Espinoza, Martha Arminda,

Bióloga, Doctora en Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Calle Juan XXIII 391, Lambayeque, Perú. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0462-0779>

Fuentes de financiamiento: Autofinanciado.

Conflictos de interés: Se señala no tener conflictos de interés.

Autor correspondiente:

Johnny Leandro Saavedra-Camacho,

email: johnnylsc107@gmail.com,

jsaavedracam@unprg.edu.pe

Recibido: 14/6/2021

Aceptado: 19/5/2022

RESUMEN

El objetivo de la investigación fue determinar la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de *Beautempzia avicennifolia* “vichayo” frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de betalactamasas. Se empleó el método Kirby-Bauer para la formación de halos de inhibición. Se evidenció que *B. avicennifolia* inhibió a *S. aureus* resistente a meticilina y a *S. aureus* ATCC 25923, mientras que las cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* no fueron inhibidas. El promedio de halo inhibitorio fue de 14,4 mm. El extracto etanólico de *B. avicennifolia* “vichayo” tiene actividad antibacteriana *in vitro* frente a las cepas de *S. aureus*, siendo este efecto directamente proporcional a la concentración de dicho extracto.

Palabras clave: Vichayo, Extracto etanólico, *Beautempzia avicennifolia*, Actividad antibacteriana.

IN VITRO ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ETHANOLIC EXTRACT OF *BEAUTEMPZIA AVICENNIFOLIA* “VICHAYO” AGAINST BETA-LACTAMASE-PRODUCING STRAINS OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, *ESCHERICHIA COLI* AND *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

ABSTRACT

The objective of the research was to determine the *in vitro* antibacterial activity of the ethanolic extract of *Beautempzia avicennifolia* “vichayo” against beta-lactamase-producing strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. The Kirby-Bauer method was used for the formation of inhibition halos. It was evidenced that *B. avicennifolia* inhibited methicillin-resistant *S.*

aureus and *S. aureus* ATCC 25923, while *E. coli* and *K. pneumoniae* strains were not inhibited. The average inhibitory halo was 14.4 mm. The ethanolic extract of *B. avicennifolia* "vichayo" has antibacterial activity *in vitro* against *S. aureus* strains, this effect being directly proportional to the concentration of said extract.

Keywords: Vichayo, Ethanolic extract, *Beautempesia avicennifolia*, Antibacterial activity.

INTRODUCCIÓN

La resistencia antimicrobiana ha generado un incremento de la morbilidad y mortalidad a nivel mundial, llegando a cifras de 700 000 muertes anuales y se estima que para el año 2050 serán aproximadamente de 10 millones (1). Este problema ha causado un gran impacto en la economía de los países debido al aumento en el costo del tratamiento, ampliación del tiempo de hospitalización, consumo de material hospitalario y aumento del riesgo en intervenciones quirúrgicas (2).

Entre las bacterias con mayor frecuencia de resistencia a los antimicrobianos se encuentran *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* (3), de la misma manera, en Perú, frecuentemente se aíslan dichas cepas, las cuales poseen un elevado porcentaje de resistencia a los antibióticos betalactámicos (4). Además, en una ciudad de Perú, Lambayeque, existen reportes que demuestran el potencial de riesgo de infecciones intrahospitalarias por estas cepas, así se tiene que la frecuencia de bacterias resistentes en personal de áreas críticas de un hospital de dicha ciudad fue de 33,7% para *E. coli*, 27,7% para *K. pneumoniae* y 8,2% para *S. aureus* (5).

Por otro lado, entre los años 2008 y 2010, se registraron aproximadamente 500 especies de plantas del norte de Perú que son utilizadas por los pobladores en medicina tradicional, atribuyéndoles diferentes usos y beneficios, asimismo podrían ser fuente de nuevos antimicrobianos (6). Una de ellas es *Beautempesia avicennifolia* "vichayo", especie que se encuentra distribuida a lo largo de la costa norte de Perú (7). Tradicionalmente se usa como cataplasma o en infusiones para tratar infecciones respiratorias y renales (8,9).

Las hojas de vichayo contienen esteroides, taninos, flavonoides, lignanos, aminoácidos, alcaloides y lípidos totales como metabolitos secundarios (10), además de que en el extracto etanólico de dichas hojas se han identificado metabolitos como, taninos, alcaloides, flavonoides, catequinas, resinas, antocianidinas, aminoácidos y triterpenos (9), que tendrían impacto al momento de inhibir el crecimiento de microorganismos.

Por tal motivo, se realizó este estudio que tuvo como objetivo determinar actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de *B. avicennifolia* "vichayo" frente a cepas de *S. aureus*, *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de betalactamasas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio y diseño

Es un estudio de tipo experimental y el diseño de contras-tación de hipótesis aplicado fue el de estímulo creciente. A las cepas bacterianas de *S. aureus*, *E. coli* y *K. pneumo-niae* productoras de betalactamasas se aplicó el extracto etanólico de *B. avicennifolia* "vichayo" a diferentes concen-traciones, que formaron parte del grupo experimental. Se utilizaron cuatro cepas de *S. aureus*, *E. coli* y *K. pneumo-niae*, que fueron enfrentadas a cinco concentraciones de extracto etanólico de *B. avicennifolia* "vichayo", conside-rando tres repeticiones por cada cepa, obteniendo un total de 180 unidades experimentales.

Material vegetal

El material recolectado para el estudio fueron hojas de *Beautempesia avicennifolia* "vichayo" obtenidas en uno de los fundos de la Universidad Nacional "Pedro Ruiz Gallo" (UNPRG) - Lambayeque (Figura 1).



Figura 1. *Beautempesia avicennifolia*

Material microbiológico

Las cepas bacterianas utilizadas para el estudio fueron aisladas de muestras del tracto respiratorio y urinario provenientes del Laboratorio de Bacteriología del Hospital Regional Lambayeque (HRL). Además se utilizó una cepa

ATCC por cada especie bacteriana para asegurar la viabilidad de la investigación.

Obtención del extracto etanólico

Se seleccionaron hojas sin rastros de afectación por virus u hongos y que no estuvieran atacadas por insectos. Se realizaron lavados con agua potable, para luego someterlas a desinfección con hipoclorito de sodio al 5%, eliminando el desinfectante con tres enjuagues con agua destilada esterilizada (11,12). Después se eliminó la presencia de humedad proveniente del lavado utilizando papel absorbente esterilizado, luego se extendieron homogéneamente sobre papel secante bajo sombra a temperatura ambiente por un tiempo aproximado de tres semanas asegurando la eliminación total del exceso de agua (9). Una vez secas las hojas se procedió a triturarlas para luego pesar 125 gr y después se colocaron dentro de un recipiente de vidrio de un litro de capacidad. Las hojas secas trituradas se sometieron a maceración en medio litro de etanol al 70° por una semana evitando contacto con luz solar. Pasado ese tiempo, se filtró utilizando un embudo de vidrio y papel filtro. El filtrado se depositó sobre placas de Petri de 20 cm de diámetro, y se colocó en estufa a 37 °C, para la evaporación del alcohol donde finalmente se calculó el peso del extracto obtenido (13,14).

Preparación de las diluciones del extracto etanólico de *Beautempsia avicennifolia* "vichayo"

Se obtuvieron 20 gr de extracto, al cual se le agregó alcohol al 40% hasta enrasar los 20 ml en una probeta graduada y así se produjo una solución stock de 1000 mg/ml. Partiendo de esta, se logró obtener concentraciones de 200 mg/ml, 400 mg/ml, 600mg/ml, 800 mg/ml y 1000 mg/ml y el control negativo fue alcohol al 40%.

Estandarización del inóculo bacteriano

Las cepas refrigeradas fueron reactivadas en el medio Brain Heart Infusion (BHI), luego se sembraron en Agar sangre. Una a dos colonias se homogeneizaron en 3 ml de solución salina fisiológica estéril, estandarizándose la turbidez a la del tubo N° 0,5 del Nefelómetro de McFarland (15).

Preparación de los sensibilizadores

Se prepararon discos de papel filtro de 6 mm de diámetro y se colocaron en un matraz para ser autoclavados. Luego se depositaron 20 ul de cada concentración de extracto de *B. avicennifolia*, obteniendo en ellos la concentración final de 4, 8, 12, 16 y 20 mg/disco. El control negativo fue constituido por discos embebidos en alcohol al 40%.

Prueba de sensibilidad bacteriana según el método de Kirby Bauer (16)

Para esta prueba se utilizaron placas Petri estériles a las cuales se les colocaron 25 ml de agar Müller - Hinton, realizando el respectivo control de esterilización. Transcurrido ese tiempo, se procedió a sembrar los inóculos bacterianos sobre el agar para luego colocar los discos conteniendo extracto etanólico de *B. avicennifolia* "vichayo". Los medios de cultivo sembrados se sometieron a incubación a 35 °C por 18 horas. Finalmente, con ayuda de una regla milimetrada se tomó la medida de los halos de inhibición de crecimiento.

Análisis estadístico de los datos

Los datos se procesaron en Microsoft Excel 2019 y analizaron en el software estadístico INFOSAT v2019. A fin de establecer si la actividad antibacteriana del extracto etanólico de vichayo es igual en todas las cepas bacterianas y a todas las concentraciones, se realizó el análisis de varianza (ANOVA).

RESULTADOS

Los resultados obtenidos demostraron que el extracto etanólico de *B. avicennifolia* "vichayo" no tuvo efecto sobre las cepas de Gram negativas en estudio, pero si inhibió el crecimiento y desarrollo de las cepas de *S. aureus* resistentes a metilicina (SARM) aisladas de muestras clínicas. En este caso, la actividad antibacteriana fue directamente proporcional a la concentración del producto, siendo el promedio de halo de inhibición de 14,4 mm (Tabla 1). Además, el ANOVA demostró que existen diferencias estadísticas significativas en la actividad antibacteriana del extracto etanólico según las cepas de *S. aureus*, las concentraciones del producto y la interacción entre ambos (Tabla 2). De tal manera que los resultados permitieron observar que las variables tipo de cepa y concentración influyeron significativamente en la efectividad del extracto etanólico de *B. avicennifolia* "vichayo" sobre la susceptibilidad de *S. aureus*.

DISCUSIÓN

En el presente estudio se determinó que el extracto etanólico de *Beautempsia avicennifolia* "vichayo" tuvo actividad antibacteriana sobre las bacterias Gram positivas pero no sobre Gram negativas, esto coincide con lo informado por Carrión-Zavaleta et al., (2018), quienes utilizaron extractos etanólicos de hojas de vichayo y bacterias Gram positivas y Gram negativas. En dicha investigación, el producto solamente tuvo efecto sobre bacterias Gram positivas (17). Esto sugiere que un factor determinante de la

Tabla 1. Promedios de halos de inhibición de las cepas de *S. aureus* por efecto del extracto etanólico de *B. avicennifolia* "vichayo"

| Concentración de extracto (mg/disco) | Halos de inhibición en las cepas de <i>S. aureus</i> (mm) | | | | |
|--------------------------------------|---|-------|-------|------------|----------|
| | SA1 | SA2 | SA3 | ATCC 25923 | Promedio |
| 4 | 10 | 9,33 | 10,33 | 9,67 | 9,83 |
| 8 | 13 | 12,33 | 13,67 | 12,33 | 12,83 |
| 12 | 16,67 | 14,33 | 15,67 | 14,33 | 15,25 |
| 16 | 18,33 | 15,33 | 17,67 | 15,33 | 16,67 |
| 20 | 19 | 16,67 | 18,33 | 15,67 | 17,42 |

Tabla 2. Análisis de Varianza (ANOVA) de los halos de inhibición (mm) generados en las cepas de *S. aureus* por efecto del extracto etanólico de *B. avicennifolia* a diferentes concentraciones

| FV | SC | GL | CM | F | p-valor |
|----------------------------|--------|----|--------|--------|---------|
| Modelo | 513,25 | 19 | 27,01 | 70,47 | <0,0001 |
| Tipo de Cepa | 40,85 | 3 | 13,62 | 35,52 | <0,0001 |
| Concentración | 456,17 | 4 | 114,04 | 297,50 | <0,0001 |
| Tipo de Cepa*Concentración | 16,23 | 12 | 1,35 | 3,53 | <0,0001 |
| Error | 15,33 | 40 | 0,38 | | |
| Total | 528,58 | 59 | | | |

SC: Suma de Cuadrados, GL: Grados de Libertad, CM: Cuadrado Medio, F: Test, P: Probabilidad

sensibilidad de las bacterias a los extractos etanólicos es la naturaleza química de su pared celular, que en el caso de las bacterias Gram positivas consta principalmente de peptidoglucano y ácidos teicoicos que le confieren el carácter hidrosoluble a la estructura, facilitando la difusión de los metabolitos, a diferencia de las bacterias Gram negativas cuya pared celular posee membrana externa fosfolipídica y proteica que limita el transporte de diversas sustancias. Esto se evidencia en otros estudios en los que trabajaron con raíces de *Capparis zeylanica* donde no inhibió crecimiento de *E. coli* (18). Se valoran también los principios activos que posee el extracto ya que en un estudio realizado por Vidaurre et al., (2007), mencionan que el extracto etanólico de hojas de vichayo contiene taninos, alcaloides, resinas, flavonoides, triterpenos, catequinas y antocianidinas cuyos efectos en las bacterias pueden ser leves o letales (9).

Otro compuesto con actividad antimicrobiana obtenido de vichayo es el aceite esencial; los resultados no son coincidentes con lo reportado por Camacho, (2012); debido a que el extracto etanólico de vichayo contiene una serie de compuestos con determinada actividad biológica que no inhiben el crecimiento de las bacterias Gram negativas, mientras que el aceite esencial obtenido por dicho autor posee mentol en más de la mitad de su composición, y,

como se sabe, este metabolito contiene compuestos volátiles que difunden con mayor facilidad a través de los fosfolípidos de las membranas celulares y otros elementos a los cuales desnaturalizan, siendo esto letal para las bacterias (8). Cabe destacar que en otro estudio donde utilizaron las partes aéreas de *C. spinosa* para la extracción de aceite esencial, no identificaron mentol en su composición (19), lo cual sugiere que los extractos y los aceites esenciales de vichayo poseen una calidad óptima de metabolitos, comparado con otras especies de su misma familia.

CONCLUSIONES

El extracto etanólico de *Beautempsia avicennifolia* "vichayo" tiene actividad antibacteriana *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus* pero no frente a *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Parlamento Europeo. Informe sobre el Plan de Acción europeo "Una sola salud" para luchar contra la resistencia a los antimicrobianos [Internet]. Estrasburgo, Francia; 2018. Available from: http://www.europarl.europa.eu/doceo/document/A-8-2018-0257_ES.html#title1

2. Organización Mundial de la Salud [OMS]. Resistencia a los antimicrobianos [Internet]. 15 de Febrero. 2018 [cited 2019 Jan 30]. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antimicrobianos>
3. WHO. Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS) Report. Geneva, World Health Organization. Who. 2019.
4. Instituto Nacional de Salud [INS]. Informe de la resistencia antimicrobiana en bacterias de origen hospitalario [Internet]. Lima; 2012. Available from: http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/4/jer/cnsp_resanti_informesdevigilancia/INFORME_RESISTENCIA_ANTIMICROBIANA_2012.pdf
5. Aguilar F, Aguilar S, Cubas D, Coaguila L, Fernández D, Moreno M, et al. Portadores de bacterias multirresistentes de importancia clínica en áreas críticas (UCI-UCIN) de un hospital al norte del Perú. *Horiz Med (Barcelona)* [Internet]. 2016;16(3):50-7. Available from: http://usmp.edu.pe/medicina/medicina/horizonte/2016_3/Art7_Vol16_N3.pdf
6. Bussmann RW, Sharon D. Plantas medicinales de los andes y la amazonía - La Flora mágica y medicinal del Norte del Perú [Internet]. Trujillo; 2015. 300 p. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/283355334>
7. Fernández A, Rodríguez E. Etnobotánica del Perú Pre-Hispano. 1° Edición. Etnobotanica Del Perú Pre-Hispano. Trujillo, Perú; 2007. 256 p.
8. Camacho M. Caracterización estructural de metabolitos secundarios de *Capparis ovalifolia* [Internet]. Pontificia Universidad Católica del Perú; 2012. Available from: http://tesis.pucp.edu.pe/repositorio/bitstream/handle/123456789/6834/ORDOÑEZ_PATRICIA_LUGO_YESSENIA_ESTRUCTURAS_MADERA_APLICADAS.pdf?sequence=1&isAllowed=y
9. Vidaurre M, Querevalú L, De Los Ríos E, Ruiz S. Características farmacognósticas de las hojas de *Capparis avicennifolia*. *Rev Médica Vallejiana*. 2007;4(2):121-31.
10. Villarreal VE. Análisis anatómico e histoquímico de las hojas de *Capparis avicennifolia* Kunth. Universidad Nacional de Trujillo; 2011.
11. Ciudad C. Producción de compuestos secundarios como alternativa de cultivos tradicionales. *An la Univ Chile* [Internet]. 2000;6(11). Available from: <https://anales.uchile.cl/index.php/ANUC/article/view/2511/2409>
12. Lagunas O. Estudio Fármaco - Botánico de *Desmodium molliculum* [Internet]. 2005 [cited 2020 Mar 4]. Available from: <https://www.botanical-online.com/plantas-medicinales/manapuya-3-tratamiento-post-cosecha>
13. Gonzalez A. Obtencion de aceites esenciales y extractos etanolicos de plantas del Amazonas. Universidad Nacional de Colombia; 2004.
14. Romero JE, Villegas ES. Efecto inhibitorio *in vitro* de extractos etanólicos de la cáscara de *Punica granatum* "granada" y *Syzygium aromaticum* "clavo de olor" sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholerae*. Universidad nacional Pedro Ruiz Gallo; 2017.
15. DIFCO. The Difco Manual [Internet]. 11th Editi. Maryland, USA: Difco Laboratories; 1998. Available from: <http://www.pyiephyomaung.yolasite.com/resources/DifcoManualofMicrobiologicalCultureMedia11thEdition.pdf>
16. Instituto Nacional de Salud [INS]. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión [Internet]. 30th ed. Lima: Ministerio de Salud; 2002. 67 p. Available from: http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/manual_sensibilidad_2.pdf
17. Carrión-Zavaleta TE, Armas-Mantilla LN, Ramírez-Vega SL, Suárez-Rebaza LA, Ganoza-Yupanqui ML. Concentración mínima inhibitoria y bactericida de hojas de *Capparis avicennifolia* Kunth. In: VI Congreso Latinoamericano de Plantas Medicinales [Internet]. Trujillo, Perú; 2018. p. 7-15. Available from: <http://solaplamed.org/wp-content/uploads/2019/03/MPC-2-1-2-2019-6-15.pdf>
18. Haque M, Haque M, Rahman M, Khondkar P, Rahman M. Actividades citotóxicas y antibacterianas de las raíces de *Capparis zeylanica* Linn. *Ars Pharm*. 2008;49:31-7.
19. Bakr RO, El Bishbishy MH. Profile of bioactive compounds of *Capparis spinosa* var. *Aegyptiaca* growing in Egypt. *Rev Bras Farmacogn* [Internet]. 2016;26(4): 514-20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2016.04.001>