

Evaluación de la actividad antibacteriana y antifúngica de la papa madre (*Sinningia warmingii*)

Evaluation of antibacterial and antifungal activity of mother potato (*Sinningia warmingii*)

César F. Díaz Casana¹, Patricia L. Bautista De La Cruz²,
Karina L. Bautista De La Cruz³

Recibido: 18 de junio de 2015
Aceptado: 13 de agosto de 2015

Resumen

En este estudio se evaluó la actividad antibacteriana y antifúngica de los extractos zumo, acuoso y etanólico de *Sinningia warmingii*, empleando el método de Kirby-Bauer y el método de pozos de agar. Los microorganismos de trabajo fueron *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) y *Candida albicans* (ATCC 10231). Los resultados mostraron que

ninguno de los extractos de *Sinningia warmingii* presenta efecto inhibitorio contra los microorganismos estudiados.

Palabras Clave: *Sinningia warmingii*, procesos ginecológicos, actividad antimicrobiana, flavonoides.

Abstract

In this study the antibacterial and antifungal activity of the juice, aqueous and ethanol extracts of *Sinningia warmingii* assessed, using the Kirby-Bauer method and agar well method. The organism used were *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) and *Candida albicans* (ATCC 10231). The results

showed that none of the extracts *Sinningia warmingii* presents inhibitory effect against microorganisms studied.

Key words: *Sinningia warmingii*, gynecological procedures, antimicrobial activity, flavonoids

¹ Médico veterinario, magister (c) c/m en Biología Molecular, docente de la Universidad Privada Antenor Orrego. E_mail: cdiazc4@upao.edu.pe

² Médico cirujano, diplomado en Urgencias Médicas y Ecografía General - EsSalud.

³ Médico cirujano, especialista en Cirugía General - EsSalud.

INTRODUCCIÓN

Las gesneráceas, familia a la que pertenece *Sinningia warmingii*, son plantas propias y componentes importantes de los bosques neotropicales montanos lluviosos y de neblina, pero de escasa presencia en bosques secos. Su distribución se extiende desde México y el Caribe hasta Brasil, Argentina, Chile y las Guayanas, aunque principalmente desde Costa Rica hasta el Perú¹. De los 28 géneros y 150 especies de *Gesneraceae* encontrados en Perú², solo se registra *Sinningia warmingii* en las regiones de Lima, La Libertad y Lambayeque. Probablemente, su distribución se deba a que presenta dormancia durante la estación seca y rebrote en la primera parte de la temporada de lluvias³, a diferencia de la abundancia de especies de *Gesneraceae* encontradas en Huánuco, Loreto, Cuzco, San Martín y Amazonas, donde el clima húmedo es más favorable². Por esta razón, pueden ser relativamente buenos indicadores de la conservación de los bosques húmedos y nublados³. Los pobladores de la provincia de Utcubamba, región Amazonas, sector de Quebrada Seca Alta usan ancestralmente la infusión de “papa madre”, *Sinningia warmingii* (sola o combinada con otras plantas), para el tratamiento de enfermedades ginecológicas de diversa etiología (inflamaciones puerperales, vaginosis bacteriana y micosis)⁴.

La vaginosis bacteriana -antes llamada “vaginitis inespecífica”- es definida como la infección de los tejidos vaginales. Se caracteriza microbiológicamente por la sustitución de la flora normal de *Lactobacillus acidophilus*⁵, con una gran variedad de bacterias como son *Mobiluncus spp*, *Bacteroides spp*, *Prevotella spp*, *Peptostreptococcus spp*, *Fusobacterium*, *Veillonella*, *Mycoplasma hominis*, *Peptococcus spp*, *Ureaplasma urealyticum* y *Streptococcus viridans*^{6,7}, de las cuales la más frecuente es *Gardnerella vaginalis*, que ha llegado a convertirse en un problema de salud pública⁸ por afectar al 50% de mujeres sanas, al 20% de las mujeres gestantes de las cuales el 15% presentan partos prematuros, lo que conlleva a un mayor riesgo de muerte perinatal, acentuada en mujeres con bajos recursos económicos, como es el caso de las pobladoras de la provincia de Utcubamba, las cuales recurren al uso ancestral de plantas medicinales como la “papa madre” (*S. warmingii*) para aliviar sus dolencias.

Gardnerella vaginalis afecta al 98% de mujeres con vaginosis y afecta hasta el 50% de mujeres sanas, lo que la convierte en el agente causal más frecuente de la vaginosis⁹; encontrándose incluso en exudados vaginales de niñas entre 5 a 10 años y en el 21,1% de mujeres embarazadas¹⁰. El

80% hombres que han tenido contacto sexual con mujeres infectadas¹¹ también ha sido afectado. En países desarrollados, se encuentra vaginosis bacteriana en el 5% de las mujeres asintomáticas y en el 25% de las mujeres con síntomas ginecológicos¹², se ha visto que es más baja (4%) en estudiantes universitarias asintomáticas y máxima (64%) en pacientes con enfermedades de transmisión sexual¹³. El metronidazol generalmente es el medicamento de elección para el tratamiento de vaginosis, debido a su espectro extraordinariamente amplio de actividad antiprotozoica y antimicrobiana, que por su bajo peso molecular alcanza concentraciones terapéuticas en secreciones vaginales, semen, saliva, leche, miometrio, trompas de Falopio¹⁴.

En un trabajo previo informamos que *Sinningia warmingii* muestra alta presencia de glicósidos y compuestos fenólicos (taninos), así como leve presencia de flavonoides, terpenos, esteroides y alcaloides determinados por reacción colorimétrica. Estos resultados fueron concordantes con el screening espectrofotométrico de *Sinningia warmingii*, en el que se observan tres picos, el primero con fuerte absorbancia a 210 nm

$$(\text{Abs: } +2.984; \text{UV } \lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}} \text{ nm } 210.0)$$

que sería correspondiente con la presencia de sesquiterpenlactonas; el segundo y tercer pico con valores de BI=Abs:+0.682,

$$\text{UV } \lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}} \text{ nm } 288.0 \text{ y BI=Abs:+0.647; UV } \lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}} \text{ nm } 327.0$$

muestran concordancia con los patrones de absorbancia UV de isoflavonas – dihidroflavonoles¹⁵.

Habiéndose reportado actividad antiprotozoaria y antiviral en algunas sesquiterpenlactonas¹⁶; actividad fungitóxica en isoflavonas¹⁷; actividad antioxidante en taninos y flavonoides, empleados en el tratamiento de dislipidemia y aterosclerosis, y que también muestran efecto hepatoprotector, radioprotector, antitumoral, antibacteriano y antiinflamatorio¹⁸, que podrían explicar el uso de *Sinningia warmingii* en problemas ginecológicos como flujos vaginales de origen micótico, bacteriano o mixto, en este trabajo evaluamos la actividad antibacteriana y antifúngica del mencionado extracto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Los tubérculos de “papa madre” fueron recolectados en el distrito de Bagua Grande, provincia de Utcubamba, región Amazonas (400msnm, coordenadas geográficas 05° 46' 40" de latitud sur y 78° 25' 46" de longitud oeste), con clima cálido y húmedo (28-29° C). Después de la recolección,

los tubérculos fueron limpiados y trasladados en bolsas de papel al laboratorio de microbiología y biotecnología microbiana (LMBM) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM) - Lima.

Preparación de extractos

El extracto acuoso (EA) se obtuvo sometiendo 100 g del tubérculo trozado y sin cáscara a ebullición y agitación constante en 200 mL de agua destilada, concentrándolo por evaporación hasta obtener 100 mL de líquido y dejándolo reposar hasta enfriar. El extracto etanólico (EE) se obtuvo por maceración de 100g del tubérculo en 100 mL de etanol por 15 días a temperatura ambiente, con dos rotaciones diarias de 30 minutos cada una. El extracto zumo (EZ) fue obtenido prensando trozos de tubérculo sin cáscara en un exprimidor de metal. Todos los extractos fueron pasados primero por papel filtro para retirar restos del tubérculo y luego esterilizados con filtros de nitrocelulosa con poro de 0.45µm (MerkMillipore HAWP04700), depositándose finalmente en tubos Falcon estériles, hasta su uso en los ensayos antimicrobianos.

Evaluación de la actividad antimicrobiana

Para probar la actividad antibacteriana y/o antifúngica de los principios activos de *Sinningia warmingii*, se usaron dos métodos: el primero del antibiograma disco placa o método de Kirby-Bauer y el segundo el método de pozos de agar. En ambos casos se utilizó una bacteria gram positiva: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), una bacteria gram negativa: *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 9027) y un hongo *Candida albicans* (ATCC 10231). Los fármacos de referencia trimetoprim sulfá, amikacina y fluconazol fueron usados como controles positivos respectivamente y cada ensayo fue realizado por triplicado.

Preparación del inóculo

Las cepas obtenidas del cepario del LMBM-UNMSM fueron replicadas en caldo TSB para ambas bacterias (*S. aureus*, *P. aeruginosa*) y en caldo saubourea para *Candida albicans*. Todos los caldos fueron llevados a estufa e incubados por 24 horas a 35 ± 2 °C. Posteriormente se fijó la turbidez del medio en 0.5 unidades (108 cel/mL) según el patrón de Mc Farland, finalmente fueron sembrados por hisopado en las placas de agar Mueller-Hinton, medio estandarizado para las pruebas de antibiograma en el LMBM-UNMSM.

Preparación de los discos de difusión

Los discos de papel filtro impregnados en los tres extractos (EA, EE y EZ) de *Sinningia warmingii*

se obtuvieron embebiéndolos durante 12 horas en cada extracto, luego fueron secados en estufa a 37 °C por 2 horas y almacenados en microtubos estériles a temperatura ambiente hasta su uso en las pruebas antimicrobianas correspondientes. En el ensayo con *Candida albicans*, los discos se embebieron en 6 diluciones obtenidas del extracto acuoso inicial, sin formación de ningún halo, por lo que en los ensayos con *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa* solamente se usaron los extractos completos, realizándose en todos los casos ensayos por triplicado.

Método de Kirby-Bauer

La siembra de los microorganismos se realizó por hisopado sobre cada una de las superficies de los agares Mueller-Hinton, verificándose previamente que estos presenten un pH entre 7.2 y 7.4, un grosor de 5mm y no tengan agua en la superficie. Los discos de papel secante impregnados con los extractos y con los fármacos, se aplicaron por triplicado con ligera presión en la superficie del medio previamente inoculado. Las placas se incubaron invertidas a 35 ± 2 °C por 24 horas. Posteriormente se midieron los halos de inhibición incluyendo el diámetro de los discos utilizando el software ImageJ¹⁹.

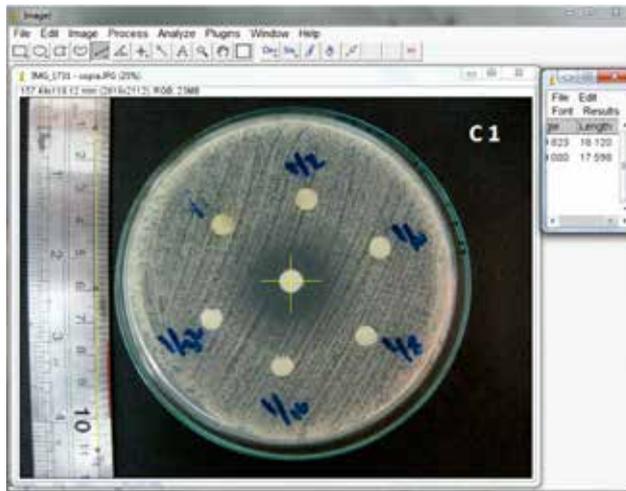
Método de pozos de agar

La inoculación de los microorganismos en las placas con agar Mueller-Hinton fue similar a la descrita en el método de Kirby-Bauer, realizándose los pozos sobre la superficie de los agares con ayuda de un sacabocados estéril de 6 mm de diámetro, y en cada uno de ellos se vertieron 25 µL de cada uno de los extractos, utilizándose discos impregnados con los fármacos como controles positivos. Posteriormente se incubaron y leyeron las placas de igual forma que el método de Kirby-Bauer²⁰.

RESULTADOS

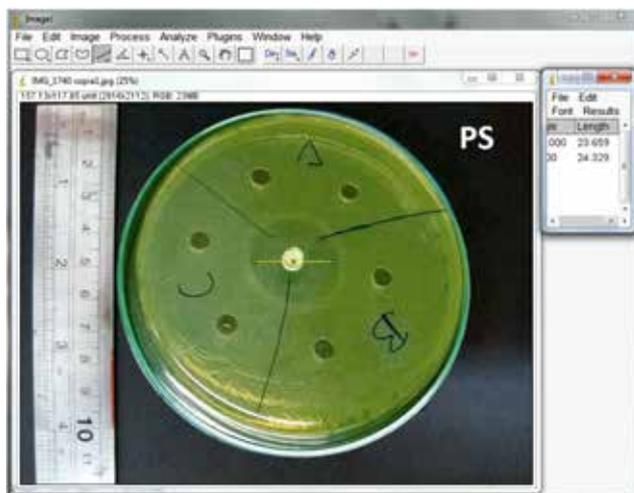
En todos los casos los extractos de *Sinningia warmingii* no mostraron efecto inhibitorio. Los controles positivos mostraron halos de inhibición de 17.5 a 18.9 mm para el fluconazol, 23.6 a 24.5 mm para la amikacina y 16.5 a 18.7 mm para el trimetoprim sulfá, como se muestra en las imágenes 01, 02 y 03.

Figura N° 01: Ensayo con método de Kirby-Bauer en cultivo de *Candida albicans*.



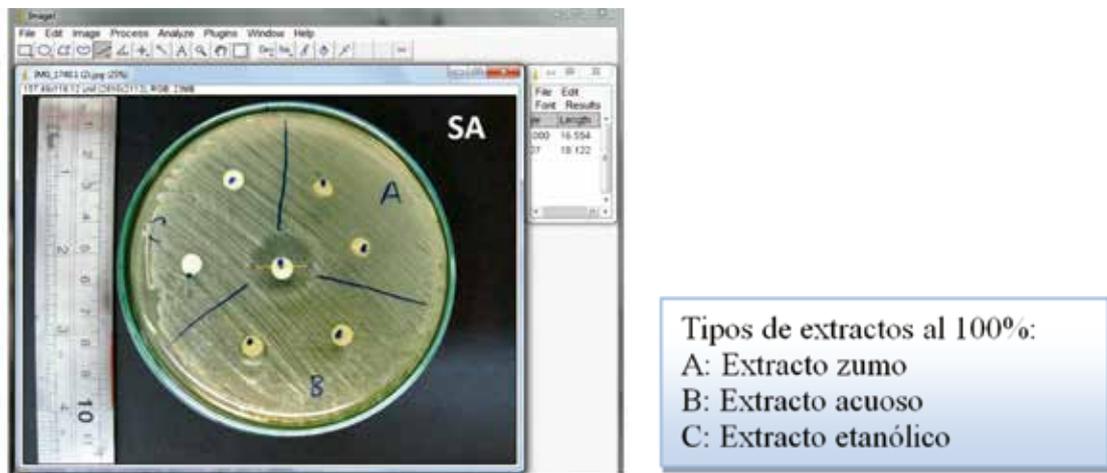
Diluciones del extracto acuoso:
1: Extracto inicial 100%
1/2: Extracto al 50%
1/4: Extracto al 25%
1/8: Extracto al 12.5%
1/16: Extracto al 6.25%
1/32: Extracto al 3.125%

Figura N° 02: Ensayo con método de pozos de agar en cultivo de *Pseudomona aeruginosa*.



Tipos de extractos al 100%:
A: Extracto zumo
B: Extracto acuoso
C: Extracto etanólico

Figura N° 03: Ensayo con método de Kirby-Bauer en cultivo de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538).



DISCUSIÓN

En el presente trabajo observamos que los extractos zumo, acuoso y etanólico de *Sinningia warmingii* no generan halos de inhibición en los ensayos de sensibilidad antimicrobiana utilizando las metodologías de Kirby&Bauer y de pozos de agar en cultivos de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* y *Candida albicans*. Puesto que los flavonoides tienen una amplia y variada actividad farmacológica como dilatadores de las coronarias, espasmolítica, hepatoprotectora, estrogénica, diurética, fungitóxica¹⁷, actividad antioxidante, efecto hepatoprotector, radioprotector, antitumoral, antibacteriano, antiinflamatorio¹⁸, antiviral²¹, antiprotozoaria¹⁶, anticancerígena²²; y habiéndose demostrado en este estudio que no presentan actividad antibacteriana, tampoco actividad antifúngica, consideramos que los metabolitos secundarios que posee *Sinningia warmingii* podrían ejercer un efecto activador de algún mecanismo bioquímico de tipo antiinflamatorio, antitumoral y/o antioxidante. Esto puede explicar las propiedades curativas que los pobladores del nororiente peruano le confieren frente a enfermedades ginecológicas de diversa etiología. Tanto este tema como la determinación de su estructura química serán materia de trabajos sucesivos.

CONCLUSIONES

Se ha demostrado que los extractos zumo, acuoso y etanólico de *Sinningia warmingii* no presentan efecto antibacteriano, tampoco antifúngico en los ensayos de sensibilidad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 9027) y *Candida albicans* (ATCC 10231), realizados empleando el método de Kirby-Bauer y de pozos de agar.

AGRADECIMIENTO

A la Dra. Susana Gutierrez - Responsable del laboratorio de microbiología y biotecnología microbiana-UNMSM y su equipo de investigación- por permitirme el acceso a su laboratorio y orientación durante el desarrollo de los ensayos antimicrobianos.

A la Sra. Dalila Zamora por su desinteresado apoyo en la recolección de las muestras.

REFERENCIAS

1. SKOG LE. 1979. Gesneriaceae, in R.E. Woodson, Jr. and R.W. Schery and Collaborators (eds.) Flora of Panama, Part IX. Ann. Missouri Bot. Gard. 65 (3[1978]): 783 - 998.
2. KVIST LP, SKOG LE, AMAYA-MÁRQUEZ M y SALINAS I. 2005. Las Gesneriaceas de Perú. Arnaldoa, 12 (1-2):16-40.
3. KVIST LP, CLARK J & DUNN R. 2004. Biological extinction in western Ecuador exemplified by the plant family Gesneriaceae. Lyonia 6(2): 128-151.
4. BAUTISTA P. 2010. Comunicación personal.
5. TAYLOR F. 2004. Vaginal flora morphotypic profiles and assessment of bacterial vaginosis in women at risk for HIV infection. Infect Dis ObstetGynecol; 12: 121-6.
6. VERA PG. 2003. Vaginosis bacteriana. RevMed Chile; 4: 63-9.
7. MENDOZA GA, SÁNCHEZ VJ, SÁNCHEZ PI. 2001. Frecuencia de vaginosis producida por Gardnerellavaginalis y su asociación con otros patógenos causantes de infección genital en la mujer. GinecObstetMex; 69: 272-6.
8. ADAD SJ, VAZ DE LIMA R, SAWAN ZTE. 2001. Frequency of Tricomonasvaginalis, Candida sp and Gardnerrellavaginalis in cervical vaginal smears in four different decades. São Paulo, Med J; 119: 200-5.
9. KLOUMAN E, MANONGI R, KLEPP KI. 2005. Selfreported and observed female genital cutting in rural Tanzania: associated demographic factors, HIV and sexually transmitted infections. Trop Med Inter Health; 10: 105.
10. VELARDE JE & ESTRADA RE. 2003. Sexually transmitted infections associated with vulvovaginal symptoms in adolescents denying sexual activity. Salud Pública Mex; 45: 641-6.
11. KUZNETSOV DD, COREY O'CR., BENSON D. 2002. Gardnerellavaginalis: A Prevalent and Potentially Serious Uropathogen in Men. Infect Urol; 15: 8-11.
12. MEAD PB. 1993. Epidemiology of bacterial vaginosis. Am J ObstetGynecol; 169:446-9
13. BISWAS MK .1993. Vaginosis bacteriana. Clínicas Obstétricas y Ginecológicas; 1:165-174
14. MARTÍNEZ TA & OVALLE SA. 2004. Biotipos y susceptibilidad antimicrobiana de Gardnerellavaginalis. Rev ChilObstetGinecol; 69: 441-5.
15. DÍAZ CF, BAUTISTA PL, BAUTISTA KL, JURADO B, PLACENCIA M & CHIMOY PJ. 2012. Análisis fitoquímico preliminar de la papa madre (*Sinningiawarmingii*). Rev. Pueblo Continente; 23(2): 345-350.
16. LAURELLA LC, FRANK FM, SARQUIZ A, ALONSO MR, GIBERTI G, CAVALLARO L, CATALÁN CA, CAZORLA SI, MALCHIODI E, MARTINO VS & SÜLSEN VP. 2012. In Vitro Evaluation of Antiprotozoal and Antiviral Activities of Extracts from Argentinean Mikania Species. TheScientificWorldJournal. Volume. Article ID 121253 doi:10.1100/2012/121253
17. LOCK DE UGAZ O. 1994. Investigación Fitoquímica: Métodos en el estudio de productos naturales. Segunda Edición. Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú. Pp 300.

18. JINDAL A, SOYAL D, SHARMA A & GOYAL PK. 2009. Protective effect of an extract of *Emblica officinalis* against radiation-induced damage in mice. *Integr Cancer Ther.* 8:98–105. [PubMed:19223372]
19. ROSSI C, ARIAS G, LOZANO N. 2002. Evaluación antimicrobiana y fitoquímica de *Lepechinia meyeri* Walp “Salvia”. *Ciencia e Investigación* 5: 1 - 6.
20. BUZZINI P, PIERONI A. 2003. Antimicrobial activity of extracts of *Clematis vitalba* towards pathogenic yeast and yeast-like microorganisms. *Fitoterapia* 74: 397 – 400.
21. BUT PPH, HE ZD & MA SC. 2009. “Antiviral constituents against respiratory viruses from *Mikania micrantha*,” *Journal of Natural Products*, vol. 72, no. 5, pp. 925–928.
22. YOUN UJ, PARK EJ, KONDRATYUK TP, SIMMONS CJ, BORRIS RP, TANAMATAYARAT P, WONGWIWATTHANANUKIT S, TOYAMA O, SONGSAK T, PEZZUTO JM&CHANG LC. 2012. Anti-inflammatory sesquiterpenelactones from the flower of *Vernonia cinerea*. *Bioorg Med Chem Lett.* 1;22(17):5559-62. Epub 2012 Jul 15.