

Actividad antimicrobiana de extractos alcohólicos de hojas y corteza de *Polylepis australis* Bitter (queñoa)

Antimicrobial activity of leaf and bark ethanol extracts from *Polylepis australis* Bitter (queñoa)

Adriana Daud Thoene^I; Natalia Habib Intersimone^{II}; Alicia Sánchez Riera^{III}

^I Máster en Ciencias Vegetales. Departamento de Biología del Desarrollo, Instituto Superior de Investigaciones Biológicas (INSIBIO) y Universidad Nacional de Tucumán (UNT). Tucumán, Argentina.

^{II} Máster en Administración y Gestión en Servicios y Sistemas de Salud. Departamento de Biología del Desarrollo, INSIBIO y UNT. Tucumán, Argentina.

^{III} Doctora en Bioquímica. Departamento de Biología del Desarrollo, Instituto Superior de Investigaciones Biológicas, INSIBIO y UNT. Tucumán, Argentina.

RESUMEN

Fundamentos: *Polylepis australis* Bitter recibe el nombre vulgar de queñoa o tabaquillo. Sus hojas y corteza son utilizados tradicionalmente para enfermedades infecciosas de vías respiratorias y otras enfermedades en Amaicha del Valle, Tucumán.

Objetivos: evaluar la actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de hojas y corteza secas de *P. australis* frente a *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Métodos: se maceraron hojas o cortezas secas en etanol 70 % por 5 d, se filtraron, secaron y esterizaron. La actividad antimicrobiana se evaluó mediante el método de difusión en placas de agar. Se determinó el efecto del pH, cationes divalentes y temperatura en la actividad antibacteriana. Se establecieron las concentraciones mínimas: inhibitoria (CMI), bacteriostática (CBS) y bactericida (CMB). Se analizó el efecto del extracto etanólico sobre la morfología de *S. aureus* y *P. aeruginosa* por microscopía electrónica de transmisión. Se dilucidó la acción de los extractos sobre integridad estructural y viabilidad bacterianas por fluorescencia.

Resultados: los extractos etanólicos de hojas y corteza secas de *P. australis* mostraron actividad antimicrobiana contra *S. aureus* y *P. aeruginosa*. El extracto etanólico de corteza presentó menos actividad antimicrobiana que el de hojas, el cual resultó bactericida contra *S. aureus* y bacteriostático contra *P. aeruginosa*. El extracto causó alteraciones en la permeabilidad de la membrana citoplasmática en *S. aureus*, pérdida de citosol y muerte celular. El cultivo tratado de *P. aeruginosa*

mostró presencia de *blebs* y vesículas en la membrana externa.

Conclusiones: esta investigación valida el uso popular como antimicrobiano, principalmente de la hoja.

Palabras clave: *Polylepis australis*, antimicrobiano, plantas medicinales.

ABSTRACT

Rationale: *Polylepis australis* Bitter has a popular name that is *queñoa* or *tabaquillo*. Its leaves and bark are traditionally used for infectious diseases in the respiratory pathways and other diseases in Amaicha´s Valley, in Tucumán,.

Objectives: to evaluate the antimicrobial activity of ethanol extracts containing dry leaves and bark from *P. australis* against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*.

Methods: Dry leaves and bark were soaked into 70 % alcohol for 5 days; afterwards, they were filtered, dried and sterilized. Its antimicrobial activity was evaluated by agar plate diffusion method, and the effect of pH, bivalent cations and temperature on the antibacterial activity was determined. Minimal concentrations were set such as inhibitory (MIC), bacteriostatic (BSC) and bactericidal (MBC). The impact of ethanol extract on *S. aureus* and *P. aeruginosa* morphology was analyzed by electronic transmission microscopy. The action of extracts on structural integrity and bacterial viability was elucidated through fluorescence.

Results: Ethanol extract of dry leaves and bark from *P. australis* showed antimicrobial action against *S. aureus* and *P. aeruginosa*. The ethanol extract of bark presented with less antimicrobial activity than the leaf extract that was bactericidal against *S. aureus* and bacteriostatic against *P. aeruginosa*. The studied extract caused alterations in cytoplasmic membrane permeability of *S. aureus*, citosol loss and cell death. The treated *P. aeruginosa* culture showed blebs and vesicles in the outer membrane.

Conclusions: This research study validated the common use of the extract as an antimicrobial agent, mainly leaf extract.

Key words: *Polylepis australis*, antimicrobial agent, medicinal plants.

INTRODUCCIÓN

En la práctica de la medicina moderna es alarmante la generación de resistencia de los microorganismos a distintos antibióticos, esto crea la necesidad de encontrar nuevos compuestos que puedan actuar de forma directa sobre la actividad microbiana o inhibiendo los mecanismos de resistencia de los microorganismos, principalmente aquellos con importancia clínica. Las plantas medicinales representan una fuente muy importante para encontrar esta clase de compuestos.¹

La especie elegida *Polylepis australis* Bitter pertenece a la familia Rosaceae y crece en Tucumán, Jujuy, Salta, Catamarca, Córdoba y San Luis (República Argentina). En Tucumán se encuentra en los bosques de altura por encima de los 2 000 m sobre el nivel del mar y recibe el nombre vulgar de queñoa o tabaquillo. Sus hojas

y corteza son utilizados por los lugareños de Amaicha del Valle, Tucumán, en medicina tradicional sobre todo para enfermedades infecciosas de vías respiratorias y otras enfermedades como hipertensión² y diabetes. Se ha reportado previamente que la corteza de esta especie está constituida por una compleja mezcla de ácidos triterpénicos,³ lo cual sugiere que poseen actividad antiinflamatoria pero sin validación científica.

El propósito del presente trabajo fue evaluar la actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de hojas y corteza de *P. australis* frente a los microorganismos *Staphylococcus aureus* (grampositivo) y *Pseudomonas aeruginosa* (gramnegativo), patógenos humanos de importancia clínica.

MÉTODOS

Material vegetal

El material vegetal elegido para este estudio consiste en hojas y corteza de *Polylepis australis* Bitter (queñoa). El espécimen fue identificado por técnicas morfológicas, anatómicas, histológicas y comparado con especímenes del herbario *Miguel Lillo* de Tucumán (Ref. N° 590509).

Para este trabajo se eligió el método de maceración en alcohol porque es la forma usual de preparación del extracto entre los lugareños de Amaicha del Valle. Para la preparación de los extractos alcohólicos (etanol 70 %) se tomaron separadamente 20 g de hojas y corteza secas y se dejaron reposar 5 d en 100 mL de solvente al abrigo de la luz. Después fueron filtrados a través de un papel de filtro Wathman N° 1, evaporados a sequedad en estufa a 37 °C y esterilizados con radiación ultravioleta por 24 h, se comprobó la esterilidad mediante la siembra en agar Müller-Hilton.

Se obtuvo un residuo de 0,66 g para corteza (3,32 %) y de 2,19 g para la hoja (10,95 %).

Actividad antibacteriana

Microorganismos

La actividad antimicrobiana de los extractos alcohólicos de hoja y corteza secas de *P. australis* fue probada tomando como modelo de cepa grampositivo, *Staphylococcus aureus* (resistente a meticilina) y de gramnegativo *Pseudomonas aeruginosa*.

Las bacterias fueron aisladas por la sección de Bacteriología del Instituto de Microbiología «Dr. L. Verna», Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán y mantenidas en Müller Hilton (MH) agar.

Para la preparación de los inóculos fueron subcultivadas en un medio infusión cerebro-corazón (BHI) a 37 °C durante 8 h. Se preparó una suspensión de 1 a 2 x 10⁶ UFC/mL cuya densidad óptica igual a 1 fue medida a 550 nm, en un espectrofotómetro *Spectronic 601*.

Ensayo de inhibición del crecimiento

La actividad antimicrobiana se evaluó mediante el método de difusión en placas de agar. Se usó como control positivo cloranfenicol (30 µg/mL), antibiótico de amplio espectro y como control negativo etanol 70 %. También se hizo un control adicional de los microorganismos sin cloranfenicol, sin etanol y sin extractos.

Las placas se incubaron a 37 °C durante 18 h. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado. La acción antimicrobiana de los extractos fue determinada mediante la medición del diámetro del halo de inhibición en milímetros y en distintas direcciones (0°, 45°, 90°, 135°, 180°).

Efecto del pH, cationes divalentes y temperatura en la actividad antibacteriana

Para determinar el efecto de diferentes pH sobre los extractos de hoja y corteza, se cultivaron las células bacterianas 1×10^6 UFC/mL con 50 µL de los diferentes extractos por 1 h a 37 °C en presencia de 75 µL de los *buffers* siguientes: citrato de sodio 10 mM pH 5,0; fosfato de sodio 10 mM pH 7,5 o pH 8,0 complementados con 10 mM de cloruro de sodio (NaCl). Se incubó a 37 °C por 1 h agitando cada 15 min.

Para determinar el efecto de los cationes divalentes Ca^{2+} y Mg^{2+} sobre la actividad antibacteriana de los extractos, las bacterias fueron incubadas con extracto etanólico, 10 mM de *buffer* fosfato sódico (pH 7,5) con 100 mM de Na Cl y 0,5 mM de cloruro de magnesio (MgCl_2) o 0,5 mM de cloruro de calcio (CaCl_2), o ambos.

Para determinar el efecto de la temperatura sobre la actividad antibacteriana 75 µL de los extractos fueron incubados a diferentes temperaturas: 37, 70 y 100 °C. Las muestras fueron reconstituidas y probada la actividad.

Al finalizar cada uno de los diferentes tratamientos (pH, cationes divalentes y temperatura) las muestras fueron sembradas en placas de agar (MH) e incubadas a 37 °C durante 18 h. Al cabo de este período se procedió al recuento de colonias.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), concentración mínima bacteriostática (CBS) y concentración mínima bactericida (CMB)

Con la finalidad de obtener una estimación cuantitativa de la susceptibilidad bacteriana, se determinó la CMI, por el método de dilución en caldo. Se realizaron controles positivo (cloranfenicol) y negativo (alcohol 70 %).

Tras la inoculación, los tubos con *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* (2 µL) (DO 550=1) fueron incubados a 37 °C durante 18 h, se observó la turbidez que indica el crecimiento del microorganismo. La concentración correspondiente al tubo que no presentó turbidez (crecimiento) se consideró como CMI.

Para poder calcular la CBS se tomó una alícuota de cada uno de los tubos con extracto donde no hubo crecimiento y se inocularon en distintas placas de agar. Luego de la incubación a 37 °C durante 18 h, si se observa desarrollo de colonias significa que el antimicrobiano ejerce una acción bacteriostática. Si por el contrario, no se observa crecimiento el antimicrobiano es bactericida.

Morfología

Para analizar el efecto antimicrobiano del extracto etanólico sobre la morfología de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, se llevaron a cabo técnicas de microscopía electrónica de transmisión de acuerdo con *Shigeharu*.⁴ Las bacterias,

en una concentración de 1×10^6 CFU/mL, fueron incubadas por 18 h a 37 °C en *buffer* Tris HCl 20 mM, pH 7,4, que contenía 0,15 M NaCl, 1 mM CaCl₂ y 1 mM MnCl₂, en presencia del extracto etanólico (100 mg/mL).

Los controles fueron cloranfenicol en una concentración de 100 µg/mL (control positivo) y etanol 70 % (control negativo), procesados en las mismas condiciones experimentales. Después de la incubación, las bacterias fueron lavadas 2 veces con una solución de NaCl 0,85 % e incubadas durante 1 h en solución salina con 2 mg/mL de *Horseradish peroxidase* (HRP) (Sigma). Las muestras fueron fijadas con *buffer* fosfato sódico-glutaraldehído 2,7 %, (pH 7,4), que contenía 0,01 M de CaCl₂ o 0,22 mM sucrosa y posteriormente en una solución de tetróxido de osmio 1 %. Secciones ultrafinas fueron contrastadas con acetato de uranilo y citrato. Las muestras fueron incluidas en resinas y fotografiadas con microscopio electrónico de transmisión (TEM) Zeiss EM.

Ensayo de la actividad antibacteriana por Sytox Green

Con el propósito de dilucidar la acción de compuestos antibacterianos que afecten la integridad estructural y la viabilidad de las células bacterianas, se usó la técnica del colorante fluorescente *Sytox Green*.⁵ Para ello, suspensiones de 100 µL de *Staphylococcus aureus* que contenían 1 o 2×10^6 CFU/mL (DO 550=1) fueron coloreadas con 3 µL de *Sytox Green* preparado en dimetilsulfóxido (50 µM), en presencia de 100 mg del extracto etanólico e incubado durante 1 h a 37 °C en tubos eppendorf estériles y observadas en un microscopio *Nikon Fluophot*. El colorante *Sytox Green* fue excitado mediante una lámpara de mercurio de alta precisión a 420-490 nm.

RESULTADOS

El extracto alcohólico de las hojas de *P. australis* exhibe actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* formando un halo de inhibición de 8-11 mm de diámetro y contra *Pseudomonas aeruginosa* de 6-9 mm de diámetro ([fig. 1](#)). El extracto etanólico de corteza tiene una eficacia antimicrobiana significativamente menor. Las bacterias analizadas fueron sensibles al cloranfenicol, el cual mostró un mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento bacteriano respecto a los extractos etanólicos. La sensibilidad de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* frente al cloranfenicol (30 µg/mL) fue evidenciada por la formación de halos entre 22-23 mm de diámetro, respectivamente. No se evidenció inhibición del crecimiento en el control negativo (etanol 70 %).

La actividad antibacteriana de extractos de hojas y corteza de queñoa fue determinada a diferentes pH (5,0; 7,5; 8,0), resultó óptima a pH 7,5.

La presencia de cationes divalentes como Ca²⁺ o Mg²⁺ (0,5 mM), o ambos, en el medio de cultivo no altera el crecimiento de las bacterias ensayadas.

Los resultados evidenciaron que la temperatura no afecta la actividad de los extractos. El control negativo se realizó en placas sembradas con las bacterias ensayadas pero sin el extracto a analizar, y se obtuvo un incontable número de colonias.

Los resultados en las distintas condiciones experimentales demostraron que el extracto de hojas evidencia una actividad antimicrobiana significativamente mayor

que el de corteza, por lo cual los estudios posteriores se llevaron a cabo con el extracto de hojas.

Los resultados mostraron que la CMI para *Staphylococcus aureus* fue de 1,25 mg/mL y para *Pseudomonas aeruginosa* de 2,5 mg/mL. Por técnicas de subcultivos se determinaron la CBS y CMB. Para *Staphylococcus aureus* la CBS coincide con la CMI y la CMB fue de 2,5 mg/mL; es decir, el doble de la CMI. Para *Pseudomonas aeruginosa* la CBS fue igual a la CMI, no se observó acción bactericida en las condiciones experimentales ensayadas.

Con el objeto de poner en evidencia el efecto antimicrobiano del extracto sobre la morfología de los microorganismos, se utilizaron técnicas de microscopía electrónica de transmisión usando como marcador peroxidasa (fig. 2). Los controles no tratados de ambas bacterias no evidenciaron modificaciones en su morfología, en cambio el análisis de numerosas secciones de células bacterianas tratadas reveló que el extracto etanólico de hojas produce alteraciones en la estructura celular, tanto de *Staphylococcus aureus* como de *Pseudomonas aeruginosa*. En *Staphylococcus aureus* se observó un aumento en la turgencia de la bacteria y la desintegración de la superficie celular, que podría llevar a la muerte. La marca típica de peroxidasa se observó en el citoplasma celular; lo cual permitiría sugerir que el extracto lleva a una alteración al nivel de la pared (fig. 2 B). En *Pseudomonas aeruginosa* se observó la presencia de *blebs* y pequeñas vesículas que se desprenden de la superficie celular. Los *blebs* pueden verse como expansiones de la membrana externa (fig. 2 E1, E2).

El etanol 70 % (control negativo) no produjo modificaciones en las bacterias (fig. 2 A y D). En cambio el cloranfenicol (control positivo) en dosis de 100 µg/mL que asegura la muerte celular, provocó la desintegración total de las bacterias marcadas intensamente con peroxidasa (fig. 2 C y F).

Con la finalidad de confirmar la acción bactericida del extracto etanólico sobre cepas de *Staphylococcus aureus* se usaron técnicas de fluorescencia con el colorante *Sytox Green* (fig. 3). Este colorante tiene la particularidad de unirse a los ácidos nucleicos de aquellos microorganismos en los que la permeabilidad de membrana se encuentra alterada por la acción del antibacteriano. Los resultados mostraron que las bacterias que sufren alteraciones en sus membranas se diferencian fácilmente de aquellas con membranas intactas, cuando se observan con el microscopio de epifluorescencia. La cepa de *Staphylococcus aureus* tratada con el extracto presentó una intensa marca fluorescente (fig. 3 B). Al contrario, los microorganismos usados como control negativo no mostraron marcación fluorescente significativa (fig. 3 A).

No se llevó a cabo el ensayo con *Peudomonas aeruginosa* porque el extracto tiene actividad bacteriostática a las dosis ensayadas.

DISCUSIÓN

El propósito de este trabajo fue estudiar la actividad antimicrobiana de hojas y corteza de *Polylepis australis* con el fin de validar científicamente las propiedades terapéuticas de esta planta utilizada en la medicina popular de la zona de los valles Calchaquíes.

Mediante técnicas de difusión en agar, se demostró que el extracto etanólico presenta actividad antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, lo cual evidencia que el etanol 70 % es un solvente eficaz para la extracción de productos antimicrobianos en concordancia con lo demostrado por Romero y otros.⁶ Muchos de los compuestos con actividad antibiótica identificados en las plantas son sustancias aromáticas o moléculas orgánicas saturadas, para los cuales el etanol es un solvente ideal.¹ Es relevante el hecho de que en la medicina indígena es una práctica común el uso de preparaciones con alcohol o aguardiente.

El extracto etanólico mostró actividad contra *Staphylococcus aureus* cepa seleccionada porque es uno de los microorganismos patógenos humanos más importantes; resulta muy común en infecciones nosocomiales muy difíciles de erradicar. La cepa usada en este estudio es meticilina resistente por causa de la presencia de proteínas ligantes de penicilina (PBP) de alto peso molecular, lo que lleva a tener muy baja afinidad por los antibióticos β lactámicos normalmente de primera elección. Los resultados obtenidos son importantes dado que podría tener un uso potencial en infecciones causadas por este microorganismo. Resultados similares se han obtenido con otros extractos de plantas.⁷ El extracto etanólico evidenció propiedades inhibitorias significativamente menores contra *Pseudomonas aeruginosa*. La resistencia de las bacterias gramnegativas se debe a que la membrana externa de estas actúa como barrera para muchas sustancias, incluidos los antibióticos.⁸

Los resultados mostraron que el extracto alcohólico de hojas de *P. australis* tiene actividad antimicrobiana con concentraciones mínimas inhibitorias menores para *Staphylococcus aureus*. Esto podría deberse a que la pared bacteriana de las grampositivas tiene una estructura simple constituida por un monocomplejo fácilmente hidrolizable, que contiene una alta proporción de muranilpéptidos (hasta 90 %). Al contrario, las gramnegativas presentan una compleja estructura de su pared celular constituida solo por 5 a 10 % de muranilpéptidos, lo cual llevaría a obtener una CMI mayor que demuestra con ello la menor sensibilidad al extracto.

Las microfotografías de *Staphylococcus aureus* tratado con el extracto de hojas mostró la desintegración de la superficie celular, esto sugiere alteraciones en la permeabilidad de la membrana plasmática con pérdida de citosol y finalmente la muerte celular. Este hecho se produciría por la incorporación de agua desde el espacio exterior al no existir la resistencia de la membrana celular, porque la presión osmótica del citosol es muy superior a la del medio extracelular. Este efecto es el producto de una serie de eventos poco conocidos que conducen a la bacteriólisis.

Por otra parte, la acción bactericida sobre *Staphylococcus aureus* se confirmó mediante la técnica de fluorescencia con *Sytox Green*; se observó que las células de dicha bacteria se colorean intensamente, lo cual significa alteraciones en la pared celular.

Por otro lado, las microfotografías de *Pseudomonas aeruginosa* tratadas con extracto muestran cambios estructurales, se observó la presencia de *blebs* y vesículas en la membrana externa, sin una aparente destrucción total. La correlación entre dichos efectos y la CBS sugiere un efecto bacteriostático del extracto producido por la disrupción de la membrana.

Estudios fitoquímicos en hojas y corteza de *P. australis* demostraron la presencia de ácidos triterpénicos,³ lo que podría contribuir a la acción antimicrobiana. Sin embargo, el mecanismo de acción de los terpenos no está del todo dilucidado, pero se especula que estarían involucrados en la disrupción de la membrana.¹

Posteriores estudios fitoquímicos son requeridos para determinar cuáles compuestos son responsables de este efecto antimicrobiano. Por otra parte otras investigaciones farmacológicas deben ser llevadas a cabo para evaluar posibles efectos adversos, interacciones y contraindicaciones.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev. 1999;12:564-82.
2. Daud A, Habib N, Sánchez Riera A. Actividad diurética de extractos acuosos de *Polylepis australis* Bitter (queñoa). Rev Cubana Plant Med. 2007;12(4).
3. Lampasona ME. Constituyentes micromoleculares de especies vegetales con potencial actividad farmacológica: *Lippia integrifolia*, *Artemisia annua*, *Ophryasporus charua* y *Polylepis australis* [Tesis Doctoral]. Vol. 15. Tucumán: Universidad Nacional de Tucumán; 2001. ISSN 1514-7932.
4. Shigeharu K. Enzymes responsible for the bactericidal effect in extracts of vitelline and fertilization envelopes of rainbow trouts eggs. Zygotes. 2000;8:257-65.
5. Roth BL, Poot M, Yue ST, Millard PJ. Bacterial viability and antibiotic susceptibility testing with Sytox green nucleic acid stain. App Environm Microbiol. 1997;63:2421-31.
6. Romero CD, Chopin SF, Buck G, Martinez E, García M, Bixby L. Antibacterial properties of common herbal remedies of the southwest. J Ethnopharmacol. 2005;99:253-7.
7. Sato Y, Suzaki S, Nishikawa T, Kihara M, Shibata H, Higuti T. Phytochemical flavones isolated from *Scutellaria barbata* antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Ethnopharmacol. 2000;72:484-8.
8. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbiology: An Introduction. San Francisco: Benjamín Cummings; 2001. p. 88.

Recibido: 15 de junio de 2008.

Aprobado: 8 de agosto de 2008.

M. C. *Adriana Daud Thoene*. Departamento de Biología del Desarrollo, Instituto Superior de Investigaciones Biológicas (INSIBIO) y Universidad Nacional de Tucumán (UNT). Chacabuco 461, 4000- San Miguel de Tucumán, Tucumán,

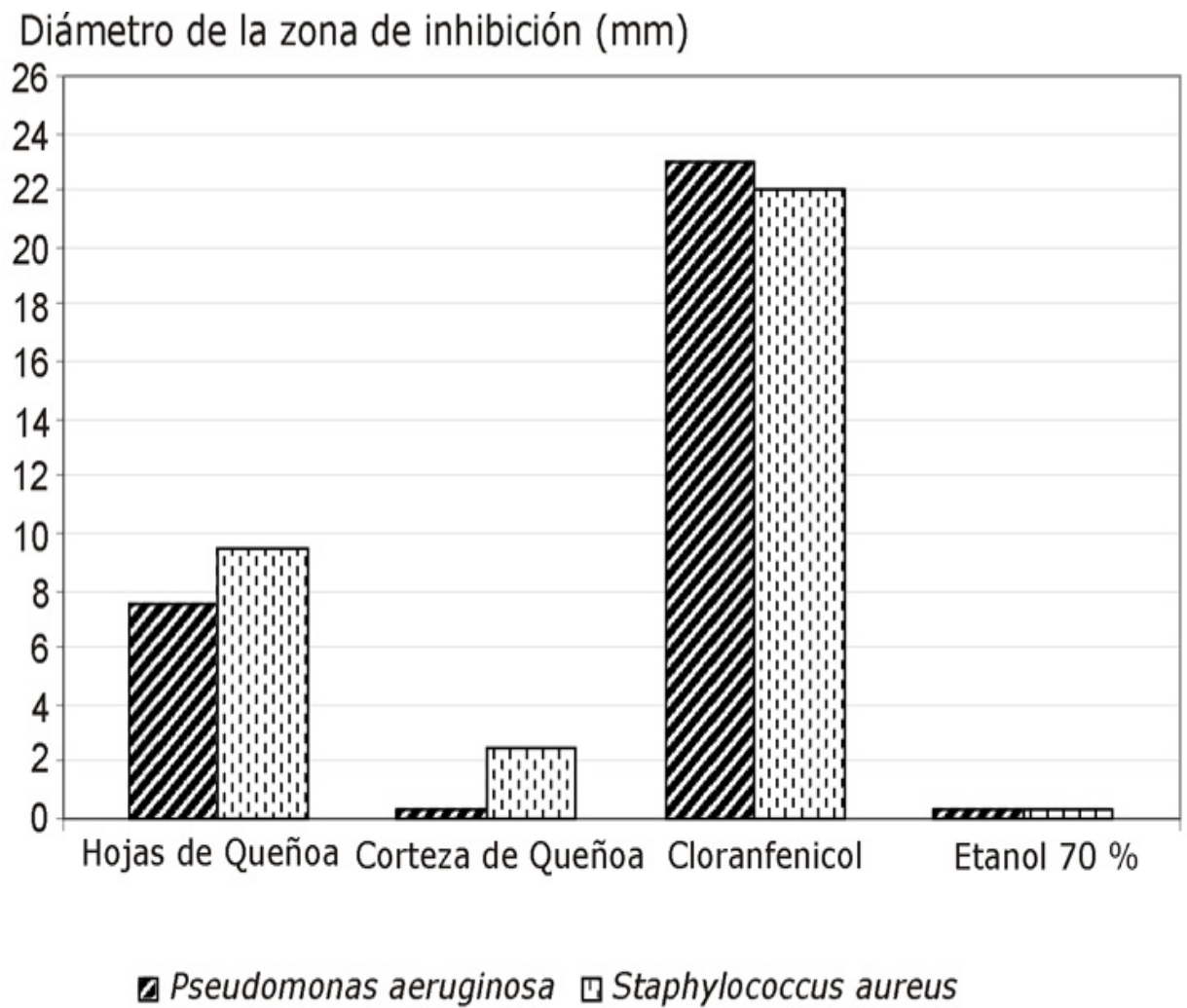


Fig. 1. Actividad antibacteriana.

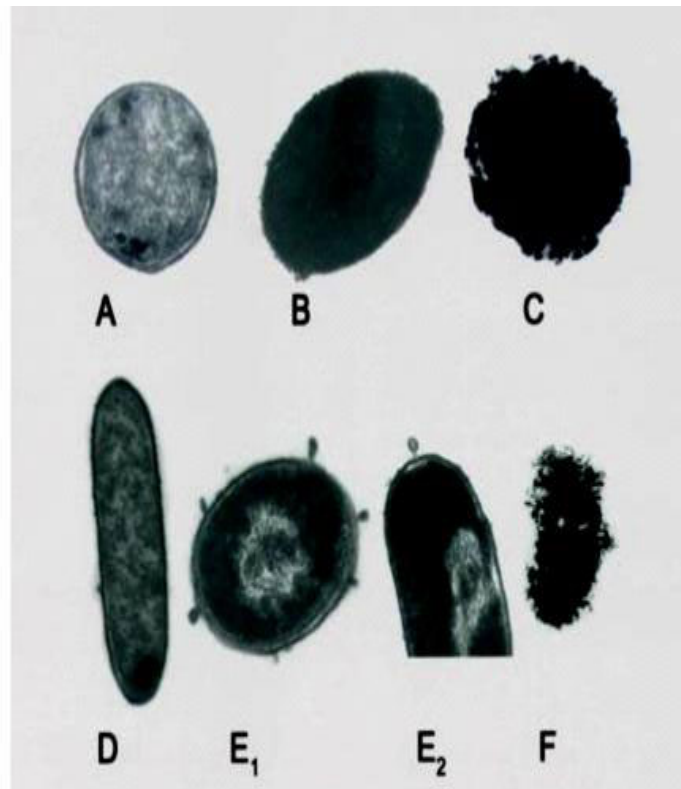


Fig. 2. Microscopía electrónica de transmisión de *Staphylococcus aureus* (arriba), *Pseudomonas aeruginosa* (abajo) A-D: etanol 70 % (control negativo) (x 33 000), B-E1-E2: tratado con extracto alcohólico de hojas de *Polylepis australis* (x 33 000) (x82 000), C-F cloranfenicol (control positivo) (x 33 000).

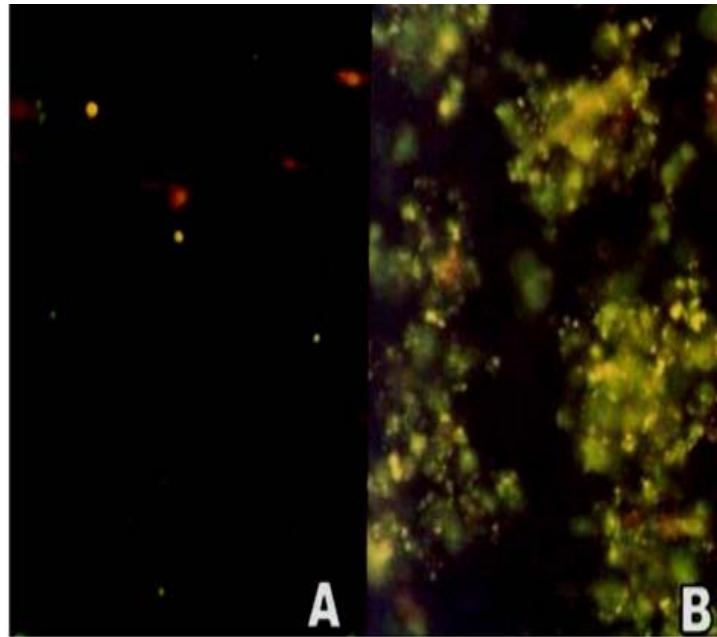


Fig. 3. A: *Staphylococcus aureus* tratado con etanol 70 % (control negativo) y marcado con el colorante Sytox Green, B: *Staphylococcus aureus* tratado con extracto etanólico y marcado con el colorante Sytox Green.