



ARTÍCULO ORIGINAL

Sinergismo antibacteriano de *Petiveria alliacea* sobre bacterias de interés farmacológico

Julio Alfonso Armenta Barrios^{1*}, Jocabel Extocapan Molina¹, Maricela Ávila Soto¹, Yolanda Magdalena García Rodríguez², Francisco Javier Espinoza García²

¹Ingeniería en Agrobiotecnología, Universidad Tecnológica de Gutiérrez Zamora, Veracruz, México

²Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad, Morelia, Michoacán, México.

Fecha de recepción: 28 de junio de 2022; fecha de aceptación del artículo: 13 de julio de 2022.

PALABRAS CLAVE

Sinergismo;
Actividad bactericida;
Petiveria alliacea

Resumen

Con el descubrimiento de la penicilina, el uso de antibióticos de amplio espectro para tratar infecciones causadas por bacterias de interés farmacológico se ha ampliado, lo que ha llevado al uso indiscriminado de antibióticos, así como el cambio morfológico y genético de esas bacterias, lo que ha causado su resistencia contra los antibióticos a los que antes eran susceptibles. La “revolución verde” y el estudio de las propiedades de interés biológico de ciertos compuestos vegetales, así como la relación entre estos y los antibióticos para inhibir el crecimiento bacteriano corresponden a un proceso conocido como sinergismo. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de 3 fracciones del extracto hexánico de *Petiveria alliacea* contra dos cepas microbianas de interés farmacológico *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*. Se llevaron a cabo tres experimentos: el primero la extracción y fraccionamiento de extractos hexánicos los cuales fueron sometidos a ensayos bacterianos; el segundo experimento utilizando las fracciones con resultados favorables del experimento anterior, en el cual se evaluó con el propósito de observar el efecto sinérgico que tienen estas fracciones con antibióticos de amplio espectro; en un tercer experimento, se realizó un análisis químico mediante un cromatógrafo de gases para identificar los compuestos químicos presentes en cada fracción. En conclusión, de las fracciones obtenidas solo tres presentaron actividad antimicrobiana y una presentó sinergismo inhibitorio de mecanismos contradefensivos. Los compuestos fitol, 8-heptadeceno, 7-hexil-docosano, 11-pentil-eicosano y 13-docosnamida de la fracción V del extracto presentan actividad sinérgica y bactericida.

KEYWORDS

Synergism;
Bactericidal activity;
Petiveria alliacea

Abstract

With the discovery of penicillin, the use of broad-spectrum antibiotics to treat infections caused by bacteria of pharmacological interest has been expanded, which has led to the indiscriminate use of antibiotics, as well as the morphological and genetic change of these bacteria, which has caused their resistance against antibiotics to which they were previously susceptible. The “green revolution” and the study of the properties of biological interest of certain plant compounds, as well as the relationship between these and antibiotics to inhibit bacterial growth correspond to a process known as synergism. The objective of this study was to evaluate the effect of 3 fractions of the hexane extract of *Petiveria alliacea* against two microbial strains of pharmacological interest, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. Three experiments were established: the first the extraction and fractionation of hexanic extracts which were subjected to bacterial tests; the second experiment using the fractions with favorable results from the previous experiment, in which it was evaluated with the purpose of observing the synergistic effect that these fractions have with broad-spectrum antibiotics; In a third experiment, a chemical analysis was performed using a gas chromatograph to identify the chemical compounds present in each fraction. In conclusion, of the fractions obtained, only three presented antimicrobial activity and one presented inhibitory synergism of counterdefensive mechanisms. The compounds phytol, 8-heptadecene, 7-hexyl-docosane, 11-pentyl-eicosane and 13-docosenamide of fraction V of the extract show synergistic and bactericidal activity.

Introducción

Un problema de salud mundial, que se encuentra en constante evolución, es la resistencia bacteriana a los antibióticos, que se ha registrado en bacterias Gram negativas y Gram positivas (Quiñonez, 2017).

La resistencia adquirida es una de las más preocupantes entre la comunidad médica responsable del diagnóstico y el tratamiento de infecciones, la cual se presenta en una bacteria inicialmente sensible a los antibióticos que se ve afectada por cambios, por mutaciones o por la adquisición de genes de resistencia durante el fenómeno conocido como transferencia genética lateral, que es un proceso por medio del cual un organismo transfiere material genético a otra célula que no es descendiente (Rodríguez *et al.*, 2014).

Esta resistencia a antibióticos puede ocasionar el fracaso en los tratamientos de enfermedades infecciosas, el aumento en los costos, así como en la tasa de víctimas mortales e incluso llegar a ocasionar epidemias. La resistencia a los antibióticos se ve favorecida por el abuso y el mal uso de los antimicrobianos en medicina humana (Buldain, 2019).

Una alternativa para contrarrestar la resistencia a antibióticos es la explotación de productos naturales para usos medicinales, pues la resistencia antimicrobiana es una amenaza para la salud pública, pero también para la seguridad alimentaria y la inocuidad

de los alimentos, así como para la vida, la producción animal y el desarrollo económico y agrícola (Robles *et al.*, 2019).

Existen diversas investigaciones sobre el potencial de extractos de plantas para combatir los problemas de resistencia a los antibióticos en bacterias. Los extractos de plantas que consisten en mezclas complejas de los principales compuestos y sus metabolitos secundarios, junto con los antibióticos convencionales exhiben posibles efectos sinérgicos (Xi Yap *et al.*, 2014).

Se han utilizado diversas técnicas microbiológicas para demostrar la actividad antimicrobiana de plantas frente a microorganismos patógenos para el hombre. Entre ellas la utilización de extractos vegetales, los cuales son una mezcla compleja, con multitud de compuestos químicos, obtenible por procesos físicos y/o químicos a partir de una fuente natural y utilizable en cualquier campo de la tecnología; en general, los extractos son soluciones diluidas de metabolitos secundarios. (Vélez *et al.*, 2018).

Una muestra de lo antes mencionado es *Petiveria alliacea*, planta endémica de México, Islas del Caribe, Centro y Sudamérica, de tallo recto, poco ramificado de 0.5 a 1 m de alto, con hojas alternas de forma elíptica y de 6 a 19 cm de largo. Sus flores son pequeñas de color blanco y el fruto es una baya cuñiforme que presenta cuatro ganchos doblados hacia abajo. Existen referencias etnográficas de diferentes

países en cuanto a la aplicación de *P. alliacea* en varias enfermedades infecciosas (Ochoa *et al.*, 2013).

Asimismo se han reportado usos como antiinflamatorio, antimicrobiano, antiherpético, analgésico, inmunomodulador, anticancerígeno, hipoglicemiante, para las infecciones cutáneas micóticas y psoriásicas. (López *et al.*, 2020).

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de 3 fracciones del extracto hexánico de *Petiveria alliacea* contra dos cepas microbianas de interés farmacológico *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Material y métodos

El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Tecnológica de Gutiérrez Zamora (UTGZ), Veracruz. y el Laboratorio Ecología Química y Agroecología del Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad (IIES), Morelia, Michoacán.

Obtención del extracto hexánico de *Petiveria alliacea*

El material vegetal utilizado para la obtención del extracto consistió en hojas, tallo y raíz sanas y completamente desarrollados de *Petiveria alliacea*, colectadas en la zona rural de Gutiérrez Zamora, Ver. El material vegetal se lavó con agua corriente por 5 min para eliminar el excedente de polvo y tierra, se eliminó el exceso de humedad y se maceraron 100 g de material vegetal con 450 mL de hexano marca Wöhler grado reactivo durante 15 días en la oscuridad a una temperatura de 16 °C, después de transcurrido este tiempo el extracto obtenido se filtró y se concentró por medio de arrastre de vapor recuperándose el hexano utilizado (Camacho, 2014).

Fraccionamiento del extracto hexánico

El fraccionamiento del extracto hexánico se llevó a cabo mediante el método de cromatografía de columna, para la determinación de la fase móvil se realizó una cromatografía en placa fina de sílica 60F254 (Thickess 0.2 mm) sobre un soporte de lámina de aluminio con relación de Hexano-Acetato de Etilo marca Suprasolv en una proporción de 80:20 (v/v) respectivamente (Silva, 2020).

Se empacó una columna con 50 g de sílica de gránulo medio con tamaño de 200 µm marca Sigma-Aldrich, el volumen utilizado del extracto hexánico fue

de 4 mL (Elizondo, 2020) de la cual se obtuvieron siete fracciones.

Ensayos antibacterianos

En la evaluación de la actividad sinérgica de las fracciones, se utilizaron sensidiscos de antibióticos de amplio espectro: Imipenem (Im/10mg Becton Dickinson), Cloranfenicol (Cl/30mg Becton Dickinson) y Vancomicina (Va/30mg Becton Dickinson) con cepas multirresistentes de *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* donadas por el Hospital Infantil “Eva Sámano de López Mateos”. Los antibiogramas se realizaron por el método de difusión de disco (Montero *et al.*, 2018), para esto se preparó un inóculo con una concentración de 0.5 en escala McFarland correspondiente a 1.5×10^8 UFC/mL, la siembra de las bacterias se realizó en cajas petri con agar Mueller Hinton (BD BIOXONTM) con una concentración 38 g/L con la ayuda de hisopos estériles por la técnica de estriado en tres direcciones. En los tratamientos del antibiótico con el extracto, primero se colocó el sensidisco y encima de este el disco impregnado con 5 µL del extracto. Las placas fueron incubadas a 37 ± 2 °C durante 24 horas antes de su lectura. En la tabla 1 se presentan los tratamientos utilizados por cada fracción.

Tabla 1. Tratamientos utilizados para evaluación antibacteriana

Tratamientos	Descripción
T1	Antibiótico
T2	Antibiótico + Extracto
T3	Extracto
T4	Solvente (Hexano)
T5	Disco estéril

Análisis químico de las fracciones

El análisis químico de las fracciones obtenidas de *P. alliacea* se llevó a cabo mediante un cromatógrafo de gases marca Agilent 6890, acoplado a un detector selectivo de masas (MSD) Agilent Technologies 5973 Network, con sistema de análisis de datos HP MS ChemStation y una Biblioteca de espectros NIST 2.0., en donde se inyectó 1 µL de cada fracción en modo Split, con relación 20:1 a 250 °C en una columna capilar HP5 de 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm con fase estacionaria apolar de 5 %

fenil-poli(metilsiloxano). La temperatura del horno se programó a 150 °C durante 3 min con una rampa de calentamiento de 5 °C/min hasta 278 °C, como gas acarreador se empleó helio a un flujo de 1 mL/min. La corrida total duro 50 min (Technologies, 2016)

Resultados

Obtención y fraccionamiento del extracto hexánico

Se obtuvo el extracto hexánico de *P. alliacea* mediante el método de maceración en oscuridad, el cual fue concentrado por el método de arrastre de vapor para eliminar la mayor cantidad de hexano posible, obteniendo 55 mL con una concentración de 25 mg/mL.

El extracto de *P. alliacea* obtenido se fraccionó por cromatografía en columna, de la cual se obtuvieron siete fracciones las cuales fueron sometidas a ensayos bacterianos para probar el efecto bactericida y comprobar si presentan efecto sinérgico.

Efectividad de actividad antibacteriana y sinérgica

Se evaluó la actividad antibacteriana de cada fracción obtenida de manera cualitativa y cuantitativa por el método de difusión de disco contra 2 bacterias de interés farmacológico (*K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*); todos los ensayos fueron realizados por triplicado para poder obtener resultados confiables.

Los resultados de la evaluación cualitativa de los ensayos bacterianos de las fracciones se pueden observar en el cuadro 2, se presentan solamente las fracciones que presentaron resultados favorables de inhibición.

Tabla 2. Fracciones del extracto *P. alliacea* con antibióticos que presentaron inhibición contra *K. Pneumoneae* y *P. Aeruginosa*.

Frac-ción	Antibiótico	<i>K. Pneumo-neae</i>	<i>P. Aeru-ginosa</i>
III	Imipenem	-	+
	Cloranfenicol	+	-
	Vancomicina	-	-
IV	Imipenem	-	+
	Cloranfenicol	+	-
	Vancomicina	-	-
V	Imipenem	+	+
	Cloranfenicol	+	+
	Vancomicina	+	+

+ = Presenta inhibición - = No presenta inhibición

La evaluación cuantitativa de los ensayos bacterianos de las fracciones con actividad antimicrobiana se realizaron midiendo el diámetro del halo de inhibición (en mm) que se genera alrededor del disco impregnado con el antibiótico y en acción sinérgica con la fracción del extracto a evaluar, los resultados se pueden observar en la figura 1 para *K. pneumoniae* y la figura 2 para *P. aeruginosa* donde Im: Imipenem, Cl: Cloranfenicol, Va: Vancomicina y Ext: Extracto hexánico de la fracción evaluada, adicionalmente, se añaden las barras de desviación estándar en cada gráfica para corroborar si los tratamientos son estadísticamente diferentes.

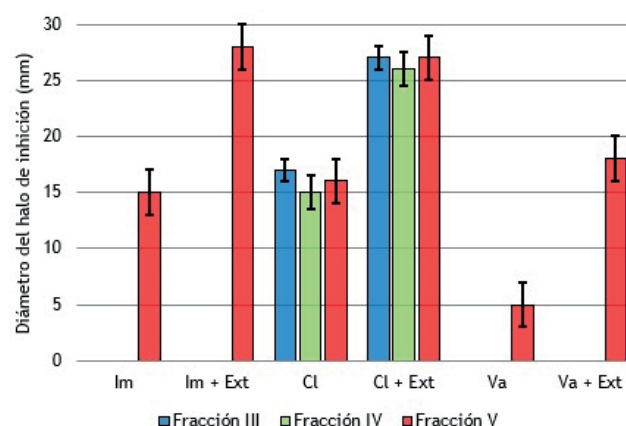


Figura 1: Análisis cuantitativo de actividad antimicrobiana de las fracciones de *P. alliacea* evaluado contra *K. pneumoniae*

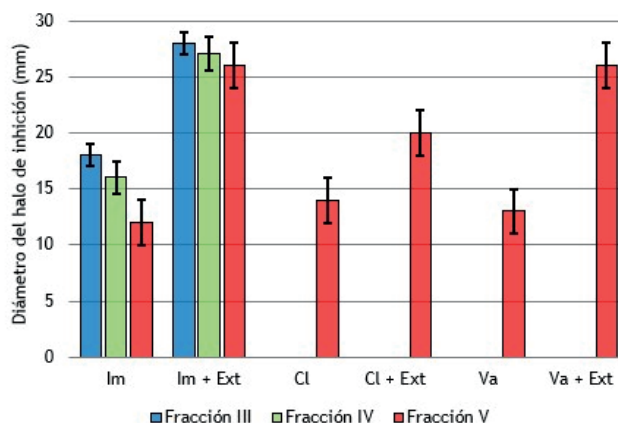


Figura 2: Análisis cuantitativo de actividad antimicrobiana de las fracciones de *P. alliacea* evaluado contra *P. aeruginosa*

Los bioensayos mostrados en las gráficas anteriores presentan actividad inhibitoria mayor cuando se utiliza el antibiótico y la fracción hexánica extracto al mismo tiempo, lo que señala una reacción sinérgica que potencia el efecto inhibitorio en estos.

Fraccionamiento químico de la fracción con actividad antibacteriana y sinérgica

La fracción que mostró mayor inhibición para las bacterias *K. pneumoneae* y *P. aeruginosa* fue la número V, por lo cual se realizó un análisis químico mediante cromatografía de gases masas (CGM) para elucidar los compuestos químicos que presentan actividad antibacteriana.

El cromatograma de presenta en la figura 3 donde se muestran los picos de los compuestos de la fracción V que representan mayor abundancia.

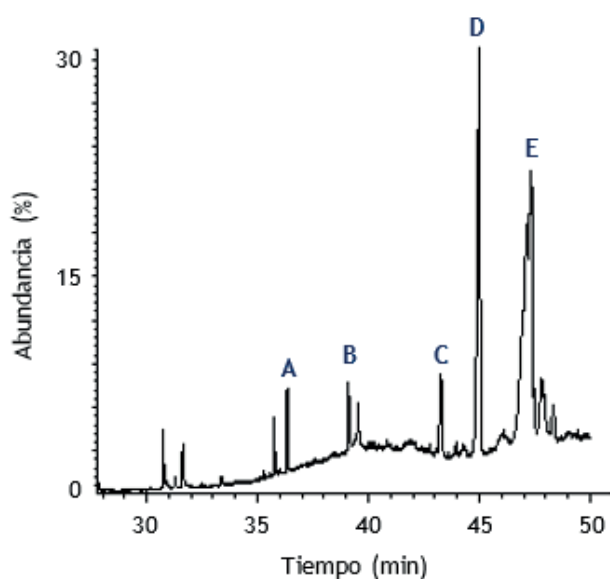


Figura 3: Cromatograma de la fracción hexánica V de *P. alliacea*

Utilizando el sistema de análisis de datos HP MS ChemStation y una Biblioteca de espectros NIST 2.0 se pudieron obtener las estructuras y nombres de los compuestos químicos principales de la fracción V mostrados en la gráfica anterior, los cuales son; A) Fitol, B) 8-Heptadeceno, C) 7-Hexil-Docosano, D) 11-Pentil-Eicosano y E) 13-Docosenamida.

Discusión

Como resultado del fraccionamiento del extracto de *Petiveria alliacea* se obtuvieron siete fracciones, de las cuales solo tres presentaron actividad inhibitoria, estas fueron la fracción III, IV y V, sin embargo, no todas mostraron una sinergia con el antibiótico.

La fracción V presenta gran sinergismo ya que contiene compuestos activos como:

El fitol lo cual concuerda con lo reportado por (Mendonça en 2020) donde este compuesto redujo la formación de biopelículas de bacterias analizadas

que exhiben una mayor actividad que los controles positivos probados (estreptomicina y ampicilina), además también redujo efectivamente la movilidad y patogenicidad de *P. aeruginosa*.

El efecto del 8-heptadeceno concuerda con lo reportado por (Elmosallamy *et al.*, 2021) donde se comprobó la actividad antimicrobiana de este compuesto mostrando una zona de inhibición característica frente a seis patógenos clínicos incluyendo *Pseudomonas aeruginosa*, en comparación con los medicamentos estándar Gentamicina y Vancomicina.

El efecto de inhibición del 7-hexil-docosano concuerda con lo reportado por (Susikumar *et al.*, 2021) donde se evaluó la actividad antibacteriana de este compuesto de manera cualitativa y cuantitativamente por la presencia o ausencia de zonas de inhibición, diámetros de zona, valores MIC y MBC frente a microorganismos de interés farmacológico, exhibiendo una interesante actividad antibacteriana contra *P. aeruginosa*.

(Alikhanova *et al.*, 2021) evaluaron la efectividad de aceites esenciales de *Zosima absinthifolia* ricos en 11-pentil-eicosano realizado una serie de estudios sobre la actividad antioxidante, antiinflamatoria, antibacteriana y citotóxica de este compuesto, lo que concuerda con la efectividad obtenida en nuestros resultados.

En el efecto de la 13-docosenamida concuerda con lo reportado por (Pérez, 2019) donde han presentado propiedades antiinflamatorias, antitumorales, leishmanicidas y antimaláricas.

Los compuestos anteriormente mencionados pueden ser considerados con efecto sinérgico, ya que coadyuvan al proceso de inhibición de mecanismos contradefensivos contra antibióticos de amplio espectro como el Imipenem, el cloranfenicol y la vancomicina.

Conclusiones

Con fundamento en los resultados obtenidos se puede afirmar que la planta *Petiveria alliacea* contiene compuestos activos, los cuales fungen como inhibidores de mecanismos contradefensivos formados por las bacterias evaluadas, lo que conduce a la inhibición de la resistencia bacteriana adquirida lo cual podría tener un impacto positivo en la industria farmacéutica.

Contribución de los autores

JAAB, diseño del trabajo, análisis estadístico y redacción.

JEM, diseño del trabajo y revisión.

MAS, diseño del trabajo y redacción.

YMGR, diseño del trabajo, pruebas químicas, revisión.

FJEG, diseño del trabajo y revisión.

Financiamiento

Ninguno.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Presentaciones previas

Ninguna.

Referencias

1. Alikhanova N., Novruzov E. and Zeynalova S. 2021. Chemical composition of the essential oil extracted from the aerial parts of *Zosima absinthifolia* Link. The Institute of Botany, ANAS, Baku, Azerbaijan. Plant & Fungal Research 4: 56-60
2. Buldain D. 2019. Estudio de la eficacia in vitro de combinaciones de antimicrobianos con aceite esencial de *Melaleuca armillaris* Sm. frente a *Staphylococcus aureus* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).
3. Camacho O. 2014. Contribución a la estandarización del proceso de obtención de un extracto de hojas de *Petiveria alliacea* L. (anamú) a escala de laboratorio. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia Bogotá, Colombia.
4. Elizondo J. 2020. Evaluación, identificación y caracterización de fracciones con actividad antiparasitaria de *Argemone mexicana* (L) y *Kalanchoe daigremontiana* (Hamet & H. Perrier). Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Nuevo León.
5. Elmosallamy A., Eltawil N., Ibrahim S. y Hussein S. 2021. Phenolic Profile: Antimicrobial Activity and Antioxidant Capacity of *Colocasia esculenta* (L.) Schott. Egyptian Journal of Chemistry, 64: 2165-2172.
6. García M., Coto T., Ocampo R., and Pazos L. 2006. Subchronic and acute preclinic toxicity and some pharmacological effects of the water extract from leaves of *Petiveria alliacea* (Phytolaccaceae). Biología Tropical, 54: 1323-1326.
7. Gibbons, S. 2007. Phytochemicals for bacterial resistance strengths weaknesses and opportunities. Planta Med, 74: 594-602.
8. López, A., López, D., Inga, E. y Granda, M. 2020. Anamú: mitos y realidades. Boletín Informativo CEI, 7: 119-121.
9. Mendonça, G. 2020. O potencial terapêutico do fitol: uma revisão bibliográfica. Universidade Federal de Campina Grande centro de Educação e Saúde Unidade Acadêmica de Saúde.
10. Montero M., Vayas L., Avilés D., Pazmiño P. y Erazo V. 2018. Evaluación de dos métodos para medir la sensibilidad de inhibición de crecimiento de la cepa certificada de *Staphylococcus aureus*. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, 29: 1543-1547.
11. Ochoa A., Marín J., Rivero D. y Aguilera E. 2013. Caracterización física, físico-química y química de extractos totales de hojas frescas de *Petiveria alliacea* L. con acción antimicrobiana. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, 44: 52-59.
12. Pérez A. 2019. Caracterización fitoquímica y evaluación del efecto tripanocida de extractos obtenidos de *Croton leptostachyus* sobre *Trypanosoma cruzi*. Pontificia Universidad Javeriana Facultad De Ciencias. Bogotá D.C.
13. Quiñones, D. 2017. Resistencia antimicrobiana: evolución y perspectivas actuales ante el enfoque "Una salud". Rev Cubana Med, 69: 29-34.
14. Rodríguez, E., León, G., Petersen, S., 2014. La evolución de la resistencia bacteriana en México. Biomédica, 34: 181-190.
15. Robles M., Sánchez G. y Patiño R. 2019. Sinergia entre las plantas medicinales y la nanotecnología. Universitarios Potosinos, 239: 22-27
16. Silva L. 2020. Búsqueda de inhibidores naturales de UPR para el control de hongos fitopatógenos, Tesis Doctoral, Centro de Investigación Científica de Yucatán.
17. Susikumar S., Nartunai G., y Ilavarasan R. 2021. GC-MS Analysis of n-hexane Extract of Roots of *Aerva lanata* (Linn) Juss. ex. Schult. Research Journal of Pharmacy and Technology, 14: 2479-2482
18. Technologies, A. (2016). Obtenido de https://www.agilent.com/cs/library/datasheets/public/5991-5345_LR.pdf.
19. Vélez, R., Jaramillo, C. y Vélez, E. 2018. Metabolitos secundarios, actividad antimicrobiana y letalidad de las hojas de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) y *Melissa officinalis* (toronjil). FACSALUD-UNEMI, 2(2), 31-39.
20. Xi Yap, P., Chin, B., Cai, H., and Erin, S. 2014. Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. The Open Microbiology Journal.