

Extracto de saponinas de *Microsechium helleri* con efecto antimicrobiano contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*

Labastida Jaimes Diana Laura, Álvarez Rodríguez Carmen, Martínez-García Martha, Nájera Castañeda Bruno, Natividad Martínez Graciela, Trinidad Ramírez Itzel Anayelli

Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores-Iztacala. Avenida de los Barrios No. 1, Colonia Los Reyes Iztacala, Estado de México, CP 54090.

racunam@yahoo.com

Fecha de aceptación: 18 de agosto de 2015

Fecha de publicación: 23 de septiembre de 2015

RESUMEN

Microsechium helleri (nombre común: sanacoche) se usa de manera empírica en algunas regiones de México para el lavado de ropa por lo que probablemente contenga principios activos con propiedades similares a los jabones. En este trabajo se estudió la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de la raíz de *M. helleri* sobre *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. Se realizaron pruebas de inhibición de crecimiento microbiano por el método de difusión en agar (Kirby-Bauer). La presencia de saponinas fue determinada por análisis fitoquímico y prueba hemolítica. Los resultados mostraron que el extracto de *M. helleri* tuvo efecto inhibitorio sobre *P. aeruginosa* y *C. albicans* en las concentraciones de 100 a 400 µg/ml, mientras que en *S. aureus* los halos se presentaron en concentraciones mayores (400-1000 µg/ml). Se concluye que el extracto de saponinas de *M. helleri* posee actividad antibacteriana sobre *P. aeruginosa* y *S. aureus*, y antifúngica contra *C. albicans*. Se resalta la importancia del estudio de esta cucurbitácea como un recurso con potencial fitoterapéutico.

Palabras clave: extracto de saponinas, *M. helleri*, cucurbitácea, β hemólisis.

ABSTRACT

Microsechium helleri (common name: sanacoche) is used of empirical way in some regions of México for the clothes washing reason why probably it contains active principles with properties similar to soaps. In this paper we study the antimicrobial activity of the ethanolic extract by the root of *M. helleri* on *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. Tests of inhibition of microbial growth by the diffusion method were made in agar (Kirby-Bauer). The presence of saponin was determined by phytochemical analysis and hemolytic activity. The results show that the extract of *M. helleri* it only had inhibiting effect on *P. aeruginosa* and *C. albicans* in the concentrations of 100 to 400 µg/ml, whereas *S. aureus* showed inhibition zones at higher concentrations (400-1000 mg/ml). It is concluded that the saponin extract of *M. helleri* had antibacterial activity on *P. aeruginosa* and *S. aureus*, and antifungal effect against *C. albicans*. The importance of studying this cucurbit as a resource with potential phytotherapeutic is highlighted.

Key words: saponin extract, *M. helleri*, cucurbitaceae, β hemolysis.

INTRODUCCIÓN

La superficie cutánea es un conjunto de nichos ambientales que proporcionan calor, humedad y alimento necesario para el crecimiento de múltiples microorganismos que provocan enfermedades infecciosas (Munray *et al.*, 2006). Entre estos microorganismos se encuentran: *P. aeruginosa*, principal causante de enfermedades nosocomiales, como neumonía, infecciones en el tracto urinario, entre otras (Soberón, 2010); *S. aureus*, provoca infecciones cutáneas frecuentes en regiones de clima cálido y húmedo en situaciones de higiene deficiente, en particular en pacientes inmunodeprimidos, esta bacteria puede infectar la piel sana, cuando se presentan lesiones eccematosas precias u otras dermatosis (Macías *et al.*, 2009); *C. albicans* suele infectar la superficie cutánea en partes húmedas, como las zonas interdigitales de las manos y pies, debajo de las mamas, axilas y pliegues de la ingle. Son manifestaciones frecuentes de esta micosis la dermatitis del pañal de los recién nacidos y la infección de las uñas conocida como onicomicosis (Koneman *et al.*, 2006).

Debido a enfermedades infecciosas mueren 3.5 millones de niños y niñas menores de 5 años (UNICEF, 2012), ante esta problemática, se han desarrollado alternativas para inhibir el crecimiento de microorganismos en la superficie cutánea. Lavarse las manos con un antiséptico reduce en un 40 % las enfermedades diarreicas y en un 25 % las infecciones respiratorias (Arce y Monje, 2011).

Entre los antisépticos más usados se encuentra el Triclosán, el cual tiene un amplio espectro contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, no obstante, resulta poco eficaz contra *P. aeruginosa* y hongos; además se encuentran los antisépticos derivados de amonio cuaternario que pueden causar dermatitis de contacto e irritación nasal (Arévalo *et al.*, 2000). Por otro lado, éstos productos ocasionalmente presentan efectos secundarios como alergias y en casos extremos cáncer de piel. La creciente demanda de antisépticos comerciales ha provocado que éstos no cumplan los requerimientos necesarios, como disminuir la irritación en la piel (Quevauyillers y Perlemuter, 2004).

Las plantas constituyen una reserva importante de moléculas bioactivas -metabolitos secundarios-, en particular una fuente potencial de agentes anti-infecciosos (Macías *et al.*, 2009). Las saponinas están presentes en una amplia variedad de plantas y han mostrado efectos antimicrobianos efectivos. Extractos metanólicos, acuosos y de etanoato de etilo de *Mukia maderasatana* tuvieron efecto antibacteriano sobre *S. aureus*, en los cuales mediante pruebas fitoquímicas, detectaron saponinas (Banerjee y Thankamani, 2013). Las saponinas de *Sorghum bicolor* presentan actividad antimicrobiana sobre *S. aureus* (Soetan *et al.*, 2006). *Sapindus saponaria* perteneciente a la familia de las cucurbitáceas tiene efectos antifúngicos, tal propiedad fue atribuida a la presencia de saponinas (Tsuzuki *et al.*, 2007).

Dentro de la familia de las cucurbitáceas se encuentra la especie *Microsechium helleri* (nombre común: sanacoche), una planta trepadora, con raíces masivas de aspecto leñoso; frutos ovoides, verdes, comúnmente con diminutas manchas blanquecinas o verde claro u oscuro, usualmente con unas cuantas espinas antrorsas en la base (Lira y Rodríguez, 2006). La distribución reportada para esta planta va desde México hasta Centroamérica (Vibrans, 2009). Los habitantes de estas zonas la consideran una maleza a pesar de haberla usado por generaciones como sustituto de jabón. Recientemente, fueron aisladas las saponinas de *M. helleri* (Hernández *et al.*, 2011). Sin embargo, se desconoce el potencial biotecnológico que presentan estos metabolitos secundarios. En la necesidad de buscar nuevos principios activos con fines farmacéuticos, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto antimicrobiano del extracto de saponinas de *M. helleri* sobre *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *C. albicans*.

METODOLOGÍA

M. helleri se recolectó en la región de Mimiapan, en el municipio de Xonacatlán, estado de México y se identificó en el herbario IZTA. Se pesaron 3 Kg de raíz de la planta y se cortó en fragmentos pequeños.

El material se mantuvo a temperatura ambiente durante tres días. Una vez secos los trozos de la raíz, se molieron en un mortero. El material pulverizado se sumergió en etanol caliente (Domínguez, 1979).

El extracto etanólico de *M. helleri* se concentró en un rotavapor (Büchi R-114, Suiza) a presión reducida a una temperatura de 78 °C, el líquido concentrado se colocó en una campana de extracción de gases por 4 horas para secarlo y eliminar cualquier traza de solvente. Se obtuvieron 3.5 g del extracto crudo, del cual se utilizaron 100 mg para desengrasar con 0.5 mL de benceno y mezclarlo con 0.5 mL de agua destilada (Domínguez, 1979). Esta mezcla se llevó a la microcentrífuga por 5 minutos a 1500 rpm, para separar en fases de acuerdo a la densidad de los solventes y extraer el benceno. La fase acuosa se llevó a la campana de extracción por 3 h para eliminar residuos de benceno; después, la fracción polar se esterilizó por microfiltración al vacío mediante el sistema de filtración Swinnex® Milipore, el filtrado se conservó en tubos Eppendorf® estériles a temperatura ambiente.

La presencia de saponinas se verificó mediante la prueba de espuma y un ensayo de hemólisis. Para éste último, en una placa Petri con medio agar Sangre se colocaron discos estériles de 7 mm de papel filtro Whatman No.1, impregnados con 1 mg/mL de la fracción polar de *M. helleri*, y se incubó a temperatura ambiente por 24 h.

En el ensayo de actividad antimicrobiana *in vitro* se utilizaron *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *C. albicans*. Las bacterias se cultivaron en Agar Nutritivo y la levadura sobre Agar Dextrosa Sabouraud y se incubaron a 37 °C por 24 h. El inóculo 1.5×10^8 UFC/mL se preparó utilizando una muestra de cada microorganismo en solución salina estéril, ajustado al tubo 0.5 de la escala de McFarland.

El extracto de saponinas de la raíz de sanacoche utilizado para *P. aeruginosa* y *C. albicans* se probó en las concentraciones de 100, 200, 300 y 400 µg/ml, en el caso de *S. aureus* fue de 700, 800, 900 y 1000 µg/mL. Para las bacterias se empleó ampicilina (10 µg/mL) como control positivo y nistatina (25 µg/mL) para la levadura.

La sensibilidad de *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *C. albicans* al extracto se evaluó por el método de difusión radial en agar Muller-Hilton, usando discos de 7 mm embebidos con 10 µL del extracto acuoso o su control, por cuatuplicado (Maguna *et al.*, 2006).

Para determinar la significancia entre los halos de inhibición de los tratamientos se aplicó el estadístico de ANOVA y una prueba de LSD con una α de 0.05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se demostró la presencia de saponinas en el extracto de *M. helleri* mediante la prueba de espuma (Figura 1). Previamente, se reportaron dos saponinas en la raíz de esta planta, denominadas glicosidos amole F y G, -triterpenos tipo oleano- (León *et al.*, 1998); además de dos saponinas ácidas poligalácicas (Herrera *et al.*, 2012). Recientemente, a los metabolitos amole F y G se les confieren efectos pesticidas (Hernández *et al.*, 2011).



Figura 1. Obtención de espuma a partir del extracto de *M. helleri*, como prueba fitoquímica de la presencia de saponinas.

El ensayo de hemólisis realizado con la fracción acuosa de *M. helleri*, demostró β hemólisis al presentar halos con un diámetro de 250 mm (Figura 2), lo que sugiere la presencia de saponinas triterpénicas, para las cuales se ha reportado actividad hemolítica de estos compuestos (Francis *et al.*, 2002).



Figura 2. Ensayo hemolítico con la fracción acuosa de *M. helleri* (1 mg/mL) en agar sangre.

Las saponinas están constituidas por unidades de carbohidratos unidas a un aglicón, el cual puede ser de naturaleza triterpenoide o esteroideal (Francis *et al.*, 2002; Haralampidis *et al.*, 2002). La longitud de la cadena de carbohidratos ha demostrado influenciar diferentes cambios en la actividad fisiológica de la saponinas (Kuznetzova *et al.*, 1982), ya que las saponinas esteroidales o triterpénicas con una sola cadena lateral de carbohidratos (monodemosídica) presenta una mayor actividad hemolítica que las saponinas con dos cadenas laterales de carbohidratos (bidesmosídica) (Funkda *et al.*, 1985; Wodelmichael y Wink, 2001). Con el ensayo realizado de hemólisis se comprobó la existencia de saponinas en la fase acuosa.

Hasta el momento, las saponinas estudiadas se aislaron de plantas provenientes del Estado de Oaxaca, por lo que este es el primer reporte de la presencia de saponinas en sancoche del Estado de México. Esto reviste importancia ya que estas dos regiones del país presentan condiciones bioclimáticas diferentes, de acuerdo con Szakiel *et al.* (2011), el contenido de este metabolito secundario en las plantas es variable y puede estar influenciado por el medio ambiente. Los geoclimas locales, el cambio estacional y las condiciones externas tales como la luz, la temperatura, la humedad y la fertilidad del suelo, así como, las técnicas de cultivo afectan tanto la composición en cantidad y calidad de las saponinas. Tal variación impacta sustancialmente en las propiedades de los metabolitos sintetizados por

las plantas tanto silvestres y/o cultivadas para aplicaciones farmacéuticas, nutricionales e industriales (Szakiel *et al.*, 2011).

El extracto de saponinas de *M. helleri* en concentraciones de 100 a 400 $\mu\text{g/ml}$ generó halos de inhibición de 1 a 2.5 cm en *P. aeruginosa* (Fig. 3); los halos obtenidos con el antibiótico fueron de tamaño similar a los tratamientos. La inhibición del crecimiento bacteriano aumenta en relación a la concentración del extracto hasta los 300 $\mu\text{g/ml}$, en donde se observa la mayor efecto.

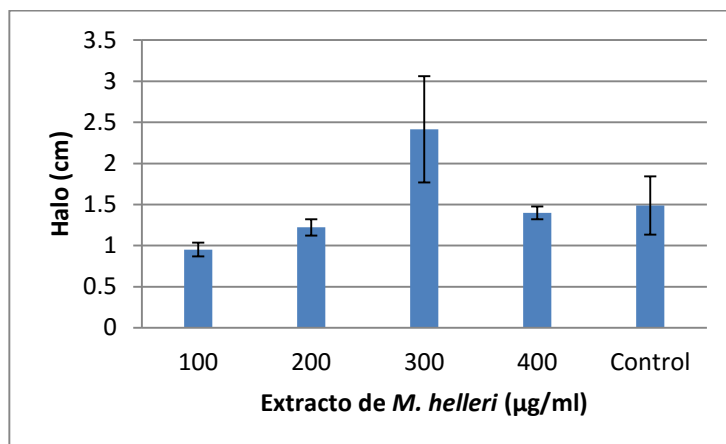


Figura 3. Actividad inhibitoria del extracto de saponinas de *M. helleri* sobre *P. aureginosa*. Como control se empleo ampicilina (10 $\mu\text{g/ml}$). Cada valor representa el promedio de una $n=4$ con su D. E.

La inhibición del crecimiento de *S. aureus* requirió concentraciones mayores a las empleadas en *P. aureginosa* 700 a 1000 $\mu\text{g/ml}$ del extracto de saponinas de *M. helleri* para generar halos de 1.2 a 1.7 cm (Figura 4), por lo que se puede decir que este organismo fue menos sensible al tratamiento.

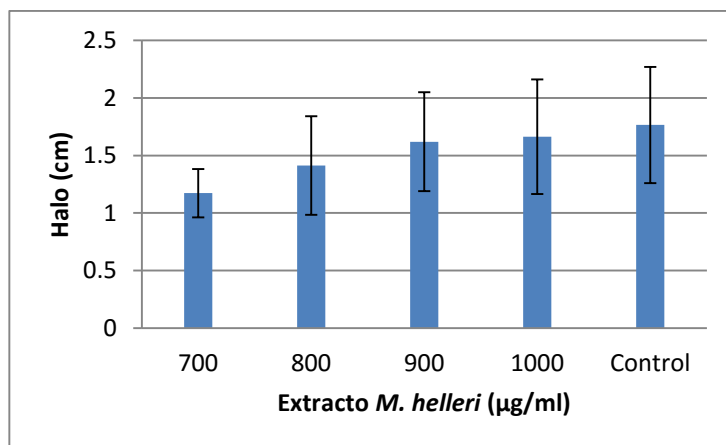


Figura 4. Actividad inhibitoria de extracto de saponinas de *M. helleri* sobre *S. aureus*. Como control se empleo ampicilina (10 $\mu\text{g/ml}$). Cada valor representa el promedio de una $n=4$ con su D. E.

El efecto del extracto de saponinas de *M. helleri* sobre *C. albicans* fue similar al observado para *P. aeruginosa* en cuanto a la concentración y al tamaño del halo. En esta levadura se observó una relación proporcional entre la concentración del extracto y la inhibición del crecimiento (Figura 5).

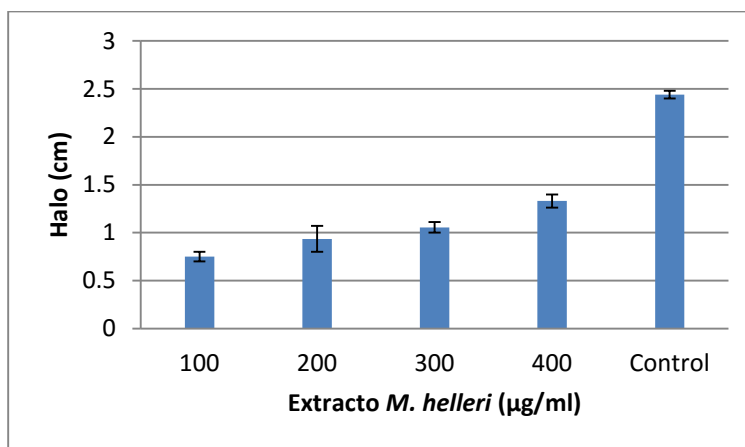


Figura 5. Actividad inhibitoria del extracto de saponinas de *M. helleri* sobre *C. albicans*. Como control se empleo nistatina (25 µg/ml). Cada valor representa el promedio de una $n=4$ con su D. E.

En el presente trabajo, el extracto de *M. helleri* evidenció actividad antimicrobiana con mayor efecto sobre *P. aeruginosa* y *C. albicans*. A saponinas de diferentes cucurbitáceas procedentes de San Luis Potosí y Zacatecas, México se les atribuyó actividad antibacteriana sobre *P. aeruginosa* y *S. aureus* (Macías *et al.*, 2009). En contraste, otra investigación reporta que saponinas de la corteza de *Inga marginata* Willd presentaron actividad nula sobre *S. aureus* (Calle *et al.*, 1998). Las saponinas acetiladas de *Sapindus saponaria* (Sapindaceae) mostraron actividad sobre las mismas bacterias y la levadura *C. albicans* (Lemos *et al.*, 1991, Ahmand y Beg, 2001). Además, las saponinas extraídas del pericarpo seco de la misma planta, revelaron actividades antifúngicas contra otras *Candidas* no *albicans* que presentan resistencia a medicamentos sistémicos antifúngicos (Tsuzuki *et al.*, 2007).

El hecho de que *S. aureus* fuera menos sensible al efecto del extracto de *M. helleri* pudiera atribuirse a las características estructurales de la pared celular propias de cada bacteria. Las Gram positivas presentan una gruesa pared de peptidoglicano, mientras que las bacterias Gram negativas, tienen una membrana externa rica en lípidos y carbohidratos, lo cual la hace impermeable a sustancias hidrofílicas (Vignoli y Seija, 2008). En particular, se ha reportado que la saponina glicosido amole F de *M. helleri* mostró efecto antimicrobiano sobre *S. epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae* y *C. albicans*. La otra saponina presente en el sanacoche, el glicosido amole G, tuvo efecto solamente sobre *C. albicans* (Herrera *et al.*, 2012).

El principal mecanismo sugerido para la actividad antifúngica de las saponinas es por su interacción con los esteroides de la membrana. Por otro lado, para las dos saponinas poligalácias de *M. helleri* se reportó por primera ocasión la actividad citotóxica contra *Saccharomyces cerevisiae* a través de la inhibición de la topoisomerasa II (Herrera *et al.*, 2012), esto explicaría parte del mecanismo de la actividad antimicótica de estos compuestos.

CONCLUSIONES

El extracto etanólico de *M. helleri* colectado en el Estado de México demostró la presencia de saponinas con actividad β hemolítica. Este extracto reveló efecto antibacteriano sobre *P. aeruginosa* y *S. aureus*, para este último, se requirió una mayor concentración (700-1000 $\mu\text{g/mL}$). En cambio, para la actividad antimicótica de éstas saponinas sobre *C. albicans* solo se utilizó la concentración (100-400 $\mu\text{g/mL}$), con estos resultados es posible ofrecer una alternativa del uso antiséptico de las saponinas ya que son capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos que frecuentemente se desarrollan en la superficie cutánea.

Por otro lado, el hecho de que algunas saponinas descritas para *M. helleri* exhiban citotoxicidad, atribuida a la inhibición de la topoisomerasa II, destaca la importancia de este estudio, sobre una cucurbitacea de la región central de México como un recurso con potencial para el desarrollo de nuevos fármacos anticancerígenos.

REFERENCIAS

- Ahmad I., Beg A. Z. (2001). Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. *J. Ethnopharmacol.*, 74: 113-123.
- Arce, E. L., Monge, N. J. (2011). Reporte sobre lavado de manos y enfermedades relacionadas en usuarios de los baños públicos de una universidad costarricense. *Enfermería en Costa Rica*, 32: 19-23.
- Arévalo J., Arribas J., Hernández M., Lizán M., Herruzo R. (2000). Guía de utilización de antisépticos. Recuperado el 22/febrero/2014, de <http://www.vet.unicen.edu.ar/html/Departamentos/Samp/Microbiologia/Guia%20para%20la%20utilizaci%20de%20antisepticos%20en%20PDF.pdf>
- Banerjee M., Thankamani V. (2013). Antimicrobial activity of plant *Mukia maderasatana*. *I. J. Pharm. Pharm. Scien. India*, 5: 199-202.
- Calle A. J., Pinzón S. R., Ospina L. F., Avellaneda T. L. A. (1998). Actividad biológica de las saponinas de la corteza de *Inga marginata* Willd. *Rev. Colom. Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 27: 17-19.
- Domínguez X. (1979). Métodos de investigación fitoquímica. Limusa, p. 149-155.
- Fondo de la Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF). (2012). Estado Mundial de la Infancia. Consultado en Recuperado el 18 de febrero del 2014 en http://www.unicef.org/mexico/spanish/SOWC_2012_Main_Report_LoRes_PDF_SP_03132012.pdf
- Francis G., Kerem Z., Makkar H. Backer K. (2002). The biological action of saponins in animal systems. *Brit. J. Nut.*, 88: 587-605.
- Fukuda K., Utsumi H., Shoji J., Hamada, A. (1985). Saponins can cause the agglutination of phospholipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*, 820: 199-206.
- Haralampidis K., Trojanowska M., Osbourn A. (2002). Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 75: 31-49.
- Hernández, C. B., González-Coloma A., Orozco-Valencia Á. U., Ramírez-Mares M. V., Andrés-Yeves M. F., Joseph-Nathan P. (2011). Bioactive saponins from *Microsechium helleri* and *Sicyos bulbosus*. *Phytochemistry*, 72: 743-751.
- Herrera, M.M., Ramírez, M.M.V., Burgueño, T.E., Cedillo, P. E., Mirón, E. C., Hernández, C.B. (2012). Screening of antitopoisomerase, antioxidant, and antimicrobial activities of selected triterpenes and saponins. *Rev. Latinoamer. Quím.*, 40: 165-177.

- Koneman E. W., Winn W. C., Allen S. D., Procop W. G., Woods L. G., Janda M. G., Schreckenberger P. C. (2006). *Diagnóstico Microbiológico*. 6a ed. Panamericana. p. 1171.
- Kuznetsova T. A., Anisimov M. M., Popov A. M., Baranova S. I., Afiyatullof Sh. Sh., Kapustina I. I., Antonov A. S., Elyakov G. B. (1982). A comparative study in in vitro of physiological activity of triterpene glycosides of echinoderm type. *Comp. Biochem. Physiol. C.*, 73: 41-3.
- Lemos T. L. G., Mendes A. L., Sousa M. P. (1992). New saponin from *Sapindus saponaria*. *Fitoterapia*, 6: 515-517.
- León I., Enríquez R. G., McLean S., Reynolds W. F., Yu M. (1998). Isolation and identification by 2D NMR of two new complex saponins from *Microsechium helleri*. *Magn. Reson. Chem.*, 36: S111-S117.
- Lira R., Rodríguez-Arévalo I. (2006). Catálogo de la familia Cucurbitaceae de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Informe final SNIB-CONABIO proyecto DS002. México. Recuperado el 13 de mayo del 2015, de <http://www.conabio.gob.mx/institucion/proyectos/resultados/CatIDS002.pdf>
- Macías K., Juárez V., Cárdenas N., Aguirre J., Jasso Y. (2009). Evaluación de plantas tradicionalmente utilizadas en la desinfección de heridas. *Rev. Mex. Ciencias Farmac.*, 40: 5-10.
- Maguna F. P., Romero A. M., Garro O. A., Okulik N. B. (2006). Actividad antimicrobiana de un grupo de Terpenoides. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Facultad de Agroindustrias. Argentina* Recuperado el 10 de febrero de 2014 de <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt2006/08-Exactas/2006-E-057.pdf>
- Munray P., Rosenthal K., Pfaller M. (2006). *Microbiología médica*. 5 ed. Elsevier. Madrid. p. 87.
- Quevauyillers J., Perlemuter L. (2004). *Diccionario de enfermería. Enciclopedia practica*. Barcelona. pp. 92-93.
- Soberón G. (2010). *Pseudomonas aeruginosa*. Instituto de Biotecnología, UNAM. Recuperado el 25 de febrero del 2014 de <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap3/>
- Soetan K. O., Oyekunle M. A., Aiyelaagbe O. O., Faffunso M. A. (2006). Evaluation of the antimicrobial activity of saponins extract of *Shorgum bicolor* L. Monch: *African J. Biotech.*, 5: 2405-2407.
- Szakiel A., Packowski C., Henry M. (2011). Influence of environmental abiotic factor on the content of saponins in plants. *Phytochem. Rev.* 10: 471-491.
- Tsuzuki J. K., Svidzinski T. I. E., Shinobu C. S., Silva L. F. A., Rodrigues- Filho, E., Cortez D. A. G., Ferreira I. C. P. (2007). Antifungal activity of the extracts and saponins from *Sapindus saponaria* L. *Anais da Acad. Brasileira de Ciências*, 79: 577-583.
- Vibrans H. (2009). Malezas de México. Curcubitacea *Microsechium helleri*. México. Recuperado el 10 de febrero de 2014 de <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/cucurbitaceae/microsechium-helleri/fichas/ficha.htm>
- Vignoli R., Seija V. (2008). Principales mecanismos de resistencia antibiótica. Recuperado el 13 de abril del 2015, de <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/Principalesmecanismosderesistenciaantibiotica.pdf>
- Woldemichael G., Wink M. (2001). Identification and biological activities of triterpenoid saponins from *Chenopodium quinoa*. *J. Agric. Food Chem.*, 49: 2327-2332.