

# ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE PLUMBAGO SCANDENS VAR. LINNEO SOBRE CANDIDA ALBICANS AISLADA DE PACIENTES GINECOOBSTÉTRICAS DE UN HOSPITAL DEL NORTE PERUANO

Arroyo-Olivera, María Isabel

Biólogo □ Microbiólogo, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Calle Juan XXIII 391, Lambayeque, Perú. ORCID:

Saavedra-Camacho, Johnny Leandro

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

Llontop-Barandiarán, Gianina

Biólogo □ Microbiólogo, Doctora en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Calle Juan XXIII 391, Lambayeque, Perú. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6607-2267>

Recibido: 07/01/2023

Aceptado: 01/09/2023

## RESUMEN

**Objetivo.** Determinar la actividad antifúngica del extracto etanólico de *Plumbago scandens* L. sobre el crecimiento de *Candida albicans* aislada de pacientes obstétricas. **Material y métodos.** Se realizó un estudio experimental con un diseño de estímulo creciente. La muestra estuvo constituida por seis cepas de hongos de *C. albicans* aisladas de pacientes que presentaron candidiasis y que fueron atendidas en el Servicio de Obstetricia del Hospital Regional Docente Las Mercedes. Se emplearon tres repeticiones para cada una de las tres concentraciones (4, 6 y 8 µg/mL) de extracto etanólico de las raíces de *P. scandens* L. Para obtener dicho efecto se procedió a realizar la prueba de susceptibilidad de *C. albicans* en agar Müller-Hinton. **Resultados.** Se encontró que la longitud del halo del grupo control fue significativamente diferente ( $p < 0,01$ ) de la longitud del halo para las otras tres concentraciones, la longitud promedio del halo para la concentración de 4 µg/uL fue de 3,44 cm, para 6 µg/uL fue de 3,68 cm, y para 8 µg/uL fue de 4,0cm. **Conclusiones.** El extracto etanólico de *Plumbago scandens* var. Linneo presenta efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Candida albicans*.

**Palabras clave:** *Plumbago scandens*, actividad antifúngica, *Candida albicans*

## ANTIFUNGAL ACTIVITY OF THE ETHANOLIC EXTRACT OF PLUMBAGO SCANDENS VAR. LINNAEUS ON CANDIDA ALBICANS ISOLATED FROM GYNECOLOGIC AND OBSTETRIC PATIENTS AT A HOSPITAL IN NORTHERN PERU

### ABSTRACT

**Aim.** To determine the antifungal activity of the ethanolic extract of *Plumbago scandens* L. on the growth of *Candida albicans* isolated from obstetric patients. **Material and methods.** An experimental study with an increasing stimulus design was performed. The sample consisted of six strains of *C. albicans* fungi isolated from patients who presented candidiasis and who were treated at the Obstetrics Service of the Las Mercedes Regional Teaching Hospital. Three repetitions were used for each of the three concentrations (4, 6 and 8 µg/mL) of ethanolic extract from the roots of *P. scandens* L. To obtain this effect, the susceptibility test of *C. albicans* was carried out in Muller-Hinton agar. **Results.** It was found that the halo length of the con-

trol group was significantly different ( $p < 0.01$ ) from the halo length for the other three concentrations, the average halo length for the 4  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  concentration was 3.44 cm., for 6  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  it was 3.68 cm, and for 8  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  it was 4.0 cm. **Conclusions.** The ethanolic extract of *Plumbago scandens var. Linnaeus* presents an inhibitory effect on the growth of *Candida albicans*.

**Keywords:** *Plumbago scandens* L., antifungal activity, *Candida albicans*

## INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas que aquejan a las gestantes es la candidiasis, infección causada por diversas especies de levaduras del género *Candida*. La principal manifestación es la vaginitis caracterizada por irritación con abundante flujo vaginal caseoso que puede ir acompañada de uretritis, disuria, etc. (1), pero las consecuencias más graves incluyen intolerancia alimentaria, distensión abdominal, letargia, hipotermia, dificultad respiratoria, apneas e inestabilidad hemodinámica, sepsis neonatales tardías, parto pre término con bajo peso al nacer y la muerte. Los principales órganos blancos son el tracto genitourinario, globo ocular, sistema nervioso central (SNC), hígado, bazo, corazón, tejido celular subcutáneo, aparato locomotor y pulmón (2).

En los centros de salud y hospitales del Perú, el tratamiento antimicótico de la candidiasis se realiza con fluconazol, imidazol y nistatina por vía oral o vaginal según la Dirección General de Medicamentos Insumos y Drogas (3), sin embargo, el consumo de estos antimicóticos constituye riesgos para la salud como nefrotoxicidad, hipokalemia, hipomagnesemia y, en grado extremo, insuficiencia renal, mielosupresión y elevación de enzimas hepáticas. La mayoría de las reacciones adversas son dosis dependiente, y reversibles al suspender el tratamiento. Se ha sugerido que existe una menor frecuencia de compromiso renal en la población pediátrica, en especial en los prematuros extremos, lo que se debería a una mayor depuración del compuesto que en los adultos (4).

Por otro lado, en relación al microorganismo un tratamiento prolongado prescrito conduce a la adquisición de resistencia del hongo causante, así se concluyó en el estudio de Candidiasis vulvovaginal de un grupo de mujeres gestantes de Medellín, en el que de los 100 aislamientos obtenidos, el 100% presentó sensibilidad al fluconazol y el 88% presentó sensibilidad al itraconazol; se halló también resistencia al itraconazol en el 9% de los aislamientos de *C. albicans* y el 2,5% de los aislamientos *C. albicans* resultaron sensibles según la dosis a dicho antifúngico (5). Por lo mencionado, la candidiasis se ha convertido en un verdadero problema social muy difícil de curar de manera definitiva, ya que las pacientes, particularmente las que acuden a los consultorios de ginecología y obstetricia, padecen de ataques recurrentes presente o candidiasis vul-

vovaginal recurrente (CVVR), siendo la especie de mayor ataque recurrente *C. albicans*, con 90% (6).

Por otro lado, investigaciones señalan que el aceite esencial de las partes aéreas de *P. scandens* L. extraído por arrastre de vapor y purificado por cromatografía de columna tiene efecto inhibitorio contra cepas de hongos de *C. albicans* de la American Type Culture Collection (ATCC) (7).

Considerando el impacto de *C. albicans* en pacientes obstétricas, el objetivo del estudio fue determinar el efecto inhibitorio *in vitro* del extracto etanólico de *P. scandens* L. sobre *C. albicans* causante de candidiasis en gestantes.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Tipo de investigación

El presente estudio es de tipo experimental y el diseño es de estímulo creciente.

### Población y muestra

La población estuvo constituida por cepas de *C. albicans* aisladas de pacientes que presentaron candidiasis y que fueron atendidas en el Servicio de Obstetricia del Hospital Regional Docente Las Mercedes (HRDLM) y la muestra estuvo constituida por seis unidades de hongos correspondientes a seis "cepas".

### Procedimiento

#### *Elaboración del extracto etanólico*

Siguiendo lo descrito por Cowan, 1999 (9), las raíces de *P. scandens var. L.* frescas se desinfectaron utilizando hipoclorito de sodio al 1%, luego se eliminó el exceso de desinfectante enjuagando con abundante agua destilada estéril, para luego ser sometidas al secado al aire libre en sombra durante cuatro semanas.

Posteriormente, este material seco se trituró en un molino de cuchillas hasta obtener un polvo muy fino, que fue pesado consiguiendo 60 g. que posteriormente fueron macerados en alcohol etanólico por 48 horas, manteniendo una proporción 3:1.

La mezcla de alcohol y el polvo de *P. scandens var. L.*

se dejó reposar por 48 horas, posteriormente fue filtrado en placas de Petri donde reposó durante cinco días, tras los cuales quedó un sedimento pastoso, llamado extracto bruto. Se colectó el sedimento en un vial con una espátula de metal, resultando a 4 g.

#### Reactivación de *C. albicans*

Las cepas de *C. albicans* se sembraron en tubos con caldo Sabouraud glucosado y se incubaron por 24 horas, y se procedió a preparar una suspensión en solución salina, ajustada a la escala del nefelómetro de McFarland (tubo N° 0,5), cuya densidad poblacional es de  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml.

#### Preparación de discos de susceptibilidad

Se empleó papel filtro Whatman N° 41 para obtener los 54 discos de 5 mm de diámetro, usando un perforador, éstos fueron colocados en un frasco de vidrio, luego se esterilizaron en horno a  $180^\circ\text{C}$  por 24 horas. Posteriormente con la ayuda de una pinza esterilizada, los discos se embebieron con el extracto etanólico de *P. scandens* var. L.

#### Prueba de susceptibilidad de *C. albicans*

En placas de Petri previamente esterilizadas se sirvieron 10 ml. de agar Müller Hinton II modificado (MHm), se dejó solidificar y se realizó el control de esterilización llevándolas a incubación a  $37^\circ\text{C}$  por 24 horas. Luego se introdujo el hisopo esterilizado dentro del inóculo estandarizado, eliminando el exceso por rotación firme contra la pared interna del tubo. El inóculo se sembró superficialmente por estría en tres direcciones diferentes, con el fin de cubrir toda la superficie del agar, después se dejó secar durante cinco minutos y se colocó el disco impregnado con el extracto etanólico de *P. scandens* var. L. en el centro de la placa.

Posteriormente se llevaron las placas a incubación a  $37^\circ\text{C}$  por 24 horas. Transcurrido el tiempo se midieron los halos de inhibición (mm), registrando la medida para cada una de las cepas.

Se realizaron tres repeticiones por cada cepa y cada concentración.

#### Análisis de datos

El presente trabajo correspondió al diseño de contrastación de hipótesis de estímulo creciente o grados de manipulación de la variable en este caso, un grupo control con ausencia de estímulo, y seis grupos experimentales con tres concentraciones de estímulo (8). Los datos fueron organizados en tablas y procesados mediante el software estadístico Statistica versión 12. En la matriz de datos no fueron considerados los datos del grupo control.

Para contrastar la hipótesis estadística los datos obtenidos fueron transformados (raíz cuadrada por tratarse de

datos obtenidos por conteo) y sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) para determinar diferencias estadísticamente significativas entre los tres tratamientos ( $\mu_0$ ;  $\mu_4$ ;  $\mu_6$ ;  $\mu_8$ ). La hipótesis contrastada fue:  $H_0: \mu_0 = \mu_4 = \mu_6 = \mu_8$  vs  $H_1: \mu_i \neq \mu_j$ . Es decir, se contrastó el hecho de que las medias de los tratamientos son iguales frente a la alternativa de que al menos dos de ellas son diferentes debido al extracto. Para evaluar el efecto inhibitorio del extracto sobre las cepas de *C. albicans* se empleó ANOVA y la prueba complementaria de Tukey se empleó un nivel de significancia del 0,05.

#### RESULTADOS

Se demostró el efecto inhibitorio del extracto etanólico de *P. scandens* var. L. sobre *C. albicans* aislada de pacientes obstétricas (Figura 1), determinándose que el mayor efecto se observó con la cepa 3, con la concentración de  $8 \mu\text{g}/\text{uL}$  y con tamaño de halo de inhibición de 4,6 cm.

Por otra parte, el menor efecto se observó con la cepa 1, con la concentración de  $4 \mu\text{g}/\text{mL}$  y con tamaño de halo de inhibición de 3,03 cm (Tabla I).

La longitud del halo del grupo control fue significativamente diferente ( $p < 0,01$ ) de la longitud del halo de las otras tres concentraciones de extracto de *P. scandens* var. L. para cada una de las seis cepas de *C. albicans*.

Además, para todas las cepas, la longitud promedio del halo para la concentración de  $4 \mu\text{g}/\text{mL}$  fue de 3,44 cm, para  $6 \mu\text{g}/\text{mL}$  fue de 3,68 cm, y para  $8 \mu\text{g}/\text{mL}$  fue de 4,0cm.

Asimismo, cuando se compararon las longitudes del halo de crecimiento entre las seis cepas para las concentraciones de 4, 6 y  $8 \mu\text{g}/\text{mL}$  de extracto etanólico de *P. scandens* var. L., se encontró que algunos grupos fueron diferentes entre sí, según la concentración de extracto comparado.

Mediante la prueba de ANOVA se encontraron diferencias significativas tanto para las concentraciones del extracto etanólico como en las cepas de *C. albicans* (Tabla II). Adicionalmente se usó la prueba post hoc Tukey. Para ambas pruebas se empleó un nivel de significancia del 0,05 e intervalo de confianza del 95%, donde los halos de inhibición promedio por concentración de extracto fueron significativamente diferentes (Tabla III), mientras que, los halos inhibitorios mostrados por cada una de las cepas, evidenciaron que hubo diferencias significativas entre grupos de cepas de *C. albicans* (Tabla IV).

#### DISCUSIÓN

El extracto tiene efecto inhibitorio del crecimiento de *C. albicans*. Se encontró diferencia significativa entre el crecimiento de *C. albicans* de los controles y de todos los experimentales, con un halo de inhibición de hasta 48 mm. en la cepa 3 con la concentración de  $8 \mu\text{g}/\text{mL}$ . Este efecto es

**Tabla I.** Promedio de tamaño de halo de inhibición de las cepas de *C. albicans* aisladas de pacientes obstétricas de un hospital de Chiclayo, 2019

Cepas de <i>C. albicans</i>	Extracto etanólico de <i>P. scandens</i> (ug/uL)	Promedio (mm)
Cepa 1	4	30,3
	6	32,0
	8	34,0
Cepa 2	4	34,3
	6	38,0
	8	40,0
Cepa 3	4	39,3
	6	42,0
	8	46,0
Cepa 4	4	32,0
	6	35,0
	8	40,0
Cepa 5	4	40,0
	6	41,0
	8	44,0
Cepa 6	4	30,7
	6	32,0
	8	35,0

Mediante la prueba de ANOVA se encontraron diferencias significativas tanto en las concentraciones del extracto etanólico como en las cepas de *C. albicans* (Tabla II).

**Tabla II.** Análisis de varianza (ANOVA) del efecto inhibitorio in vitro del extracto etanólico de *P. scandens* var. Linneo frente a *C. albicans*.

Fuente de Variación	SC	gl	CM	F	p-valor
Extracto	2.802	2	1.401	33.47	<b>0.000</b>
Cepa	8.933	5	1.787	42.69	<b>0.000</b>
Extracto*cepa	0.216	10	0.022	0.52	0.867
Error	1.507	36	0.042		

SC: Suma de cuadrados; gl: Grados de libertad; CM: Cuadrado medio; F: Test

**Tabla III.** Prueba de Tukey para comparar el halo de inhibición entre las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *P. scandens* var. L.

Extracto (µg/mL)	Halo (mm)	
4	34,4	a
6	36,8	b
8	40,0	c

**Tabla IV.** Prueba de Tukey para comparar el halo de inhibición entre las seis cepas de *C. albicans*.

Cepa	Halo (mm)		
C1	32,2	a	
C6	32,8	a	b
C4	35,4	b	c
C2	37,4		c
C5	41,9		d
C3	42,7		d

similar al demostrado en una investigación desarrollada en la Universidad de Arizona utilizando extracto etanólico de *P. scandens*, procedente de diferentes ciudades de Estados Unidos como Arizona, California, Nevada, Texas y Utah con una concentración del extracto 2,000 µg/mL; sin embargo, el extracto se obtuvo a partir de hojas, las que se ha demostrado tienen menor contenido de plumbagina que las raíces y tallos (10).

La plumbagina ha demostrado actividad antifúngica, el 1,4-naftoquinona está implicado de una manera que altera la composición de la membrana de células de *C. albicans*, dando lugar a un cambio en la permeabilidad de la membrana y la interrupción de su integridad física, causando la fuga del contenido celular, así se demostró mediante la técnica de difusión en disco, se utilizaron discos de 5 mm, cada uno con 5 mL de solución de 10 mg/mL de naftoquinona disuelto en sulfóxido de dimetilo (DMSO). Se incubaron por 48 horas para medir la actividad antifúngica a 37 °C. Los resultados se registraron mediante la medición del diámetro de las zonas de inhibición completa, incluyendo el diámetro del disco, resultando halos de hasta 20 mm, discos que contienen fluconazol (25 mg/disco) se utilizaron como control y DMSO como control en blanco (11). En Brasil, usando el extracto clorofórmico de raíces de *P. scandens* recolectadas del campus de una universidad en Río de Janeiro, demostraron una actividad antimicrobiana sobre *C. albicans* a una concentración de 0,78 mg/mL. Asimismo, *P. scandens* también ha demostrado actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* (12) y *Mycobacterium tuberculosis* multidrogoresistente (MDR) a isoniácida y rifampicina (13).

Se han encontrado diferencias en el efecto inhibitorio de las diferentes cepas. En el caso de la cepa 3, fue aislada de una paciente que presentó anteriormente candidiasis y en ese momento se encontraba en su segundo trimestre de gestación, mientras que la cepa 5 provino de una gestante que acudió anteriormente a consulta ginecológica y de quien no hay registro de que hubiera presentado candidiasis. Por otro lado, las cepas 2, 4 y 6 fueron solamente de pacientes con diagnóstico confirmado de candidiasis y la cepa más resistente al efecto del extracto fue la cepa 1, la cual provino de una paciente con candidiasis crónica, y tratada con Clotrimazol 500 mg por vía vaginal en dosis única; en una segunda oportunidad se trató con óvulo de Tinidazol 150mg, pero sin culminar ningún tratamiento en el periodo establecido. Por otra parte, la población fue procedente únicamente del servicio de obstetricia, gestantes con diferentes episodios de candidiasis en su vida pre gestacional y gestacional.

## CONCLUSIONES

El extracto etanólico de *Plumbago scandens* var. *Linneo* presenta efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Candida albicans*, lo cual demuestra que dicha especie

vegetal representa una alternativa natural al tratamiento de infecciones provocadas por el mencionado patógeno, por lo que, una extracción y caracterización de los principios activos de *P. scandens* var. *Linneo* sería muy útil en la continuación de las investigaciones además de realizar los ensayos *in vivo* para determinar su nivel de toxicidad.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Díaz A. Factores epidemiológicos relacionados con la candidiasis vulvovaginal y propuesta para disminuir su impacto en gestantes de los distritos de Inkawasi y Monsefú. Lambayeque Perú, 2017-2018. [Internet]. Tesis Para Optar el Grado Académico de Doctor en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo; 2019. Disponible en: <https://repositorio.unprg.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12893/3652/BC- TES-TMP-2459.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
2. Fridkin SK, Kaufman D, Edwards JR, Shetty S, Horan T. Changing incidence of *Candida* bloodstream infections among NICU patients in the United States: 1995-2004. *Pediatrics* [Internet]. 2006;117(5):1680-7. Disponible en: <https://doi.org/10.1542/peds.2005-1996>
3. Ministerio de Salud (MINSA). Resolución Directoral N° 2251-2018-DIGEMID/DPF/MINSA [Internet]. Lima, Perú; 2018. Disponible en: [https://www.digemid.minsa.gob.pe/UpLoad/UpLoaded/PDF/Alertas/2018/MODIFICACIONES\\_06-18.pdf](https://www.digemid.minsa.gob.pe/UpLoad/UpLoaded/PDF/Alertas/2018/MODIFICACIONES_06-18.pdf)
4. Izquierdo G, Santolaya ME. Candidiasis invasoras en recién nacidos: diagnóstico, tratamiento y prevención. *Rev Chil Infectología* [Internet]. 2014;31(1):73-83. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182014000100011>
5. Duque CM, Uribe OL, Soto AF, Alarcón J. Candidiasis vulvovaginal en un grupo mujeres gestantes de Medellín. *Infectio* [Internet]. 2009;13(1):14-20. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v13n1/v13n1a03.pdf>
6. Pineda-Murrillo J, Cortés-Figueroa AA, Uribarren-Berrueta T del NJ, Castañón-Olivares LR. Candidosis vaginal. Revisión de la literatura y situación de México y otros países latinoamericanos. *Rev Méd Risaralda* [Internet]. 2017;23(1):38-44. Disponible en: <https://doi.org/10.22517/25395203.9139>
7. Morocho-Yaguana LA, Carrión-Lluguín AM, Cambizaca-Mora G del P, Riascos-Jaramillo HD. Actividad antimicótica del aceite esencial de *Plumbago scandens* L.(Plumbaginaceae). *CEDAMAZ* [Internet]. 2021;11(1):6-12. Disponible en: <https://revistas.unl.edu.ec/index.php/cedamaz/article/view/1030/777>
8. Hernández R, Fernández C, Baptista P. Metodología de la Investigación [Internet]. 6° Edición. México D.F.: McGraw-Hill; 2014. 634 p. Disponible en: <https://www.uca.ac.cr/wp-content/uploads/2017/10/Investigacion.pdf>

9. Cowan MM. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 1999;12(4):564-82. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/CMR.12.4.564>
10. Hoffmann JJ, Timmermann BN, Mclaughlin SP, Punnapayak H. Potential antimicrobial activity of plants from the southwestern United States. *Int J Pharmacog* [Internet]. 1993;31(2):101-15. Disponible en: <https://doi.org/10.3109/13880209309082926>
11. López LI, Leyva E, García RF. Las naftoquinonas: más que pigmentos naturales. *Rev Mex Ciencias Farm* [Internet]. 2011;42(1):6-17. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmcf/v42n1/v42n1a2.pdf>
12. De Paiva SR, Figueiredo MR, Aragão TV, Coelho Kaplan MA. Antimicrobial Activity in Vitro of Plumbagin Isolated from Plumbago Species. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2003;98(7):959-61. Disponible en: <https://doi.org/10.1590/s0074-02762003000700017>
13. Moncada N, Farcio M, Rojas C, Trevisan D, Horna O, Pereira J, et al. Actividad biológica de *Plumbago scandens* L. sobre cepas multidrogoresistente de *Mycobacterium tuberculosis*. *Boletín Latinoam y del Caribe Plantas Med y Aromáticas* [Internet]. 2011;10(3):233-45. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/856/85618379007.pdf>