

Actividad antibacteriana y ensayos de toxicidad aguda y subaguda de *Polygonum hidropiperoides*

Antibacterial activity and acute and subacute toxicity assays of *Polygonum hidropiperoides*

Toribio, M.S.¹; Oriani, D.S.²; Pombar, A.S.¹; Toso, R.E.¹; Fernández, J.G.¹

¹Farmacología ²Microbiología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Pampa. Calle 5 y 116. (6360) General Pico. La Pampa. Argentina.

RESUMEN

Se evaluó la presencia de toxicidad y se determinó la concentración inhibitoria mínima de extractos obtenidos a partir de *Polygonum hidropiperoides* sobre cepas bacterianas de colección, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) y de campo, *Streptococcus equi*, *Proteus spp.*, y *Escherichia coli*. Para estudiar la actividad antimicrobiana con el método de dilución en agar se utilizó el extracto metanólico. Los ensayos de toxicidad aguda y subaguda se llevaron a cabo en ratones utilizando una dosis única de 5000 mg/kg y una dosis diaria durante 14 días de 1250 mg/kg de extracto hidroalcohólico, respectivamente. La concentración inhibitoria mínima de extracto metanólico de *Polygonum hidropiperoides* fue de 0,18 mg/ml para *Streptococcus equi*, *Proteus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y de 0,37 mg/ml para *Escherichia coli*. Los ensayos de toxicidad no evidenciaron cambios funcionales u orgánicos en los animales de experimentación. Los resultados obtenidos dan sustento a la investigación de la actividad antimicrobiana *in vivo* para determinar el valor fitoterapéutico de la especie.

Palabras clave: (extractos vegetales), (concentración inhibitoria mínima), (toxicidad)

Correspondencia e-mail: Mirta S. Toribio mirtastoribio@yahoo.com.ar

Recibido: 30-11-2011

Aceptado: 01-10-2012

SUMMARY

The presence of toxicity was evaluated and the minimum inhibitory concentration of extracts from *Polygonum hidropiperoides* in bacterial strains collection of *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) and *Streptococcus equi*, *Proteus spp* and *Escherichia coli* field strains was determined. To study the antimicrobial activity by the agar dilution method, the methanol extract was used. Acute and subacute toxicity assays were carried out in mice using a single dose of 5000 mg/kg and a daily dose for 14 days of 1250 mg/kg of hydroalcoholic extract, respectively. The minimum inhibitory concentration of methanol extract of *Polygonum hidropiperoides* was 0.18 mg/ml for *Streptococcus equi*, *Proteus spp*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and 0.37 mg/ml for *Escherichia coli*. Toxicity assays showed no functional or organic changes in experimental animals. The results obtained give support to the investigation of the antimicrobial activity in vivo to determine the phytotherapeutic value of the species.

Key words: (vegetable extracts), (minimum inhibitory concentration), (toxicity).

INTRODUCCIÓN

La resistencia adquirida a los antimicrobianos es una característica de ciertas cepas, dentro de una especie bacteriana naturalmente sensible, cuyo patrimonio genético ha sido modificado por mutación cromosomal o mediante la adquisición de material genético transferible. La resistencia a varios antibióticos es importante en las cepas de la familia *Enterobacteriaceae* y en otros patógenos como *Bordetella*, *Haemophilus*, *Pasteurella* y *Pseudomonas*, como así también entre las bacterias Gram positivas, particularmente *Staphylococcus aureus*^{4,6,7,11,17}.

Esta situación ha generado interés en la búsqueda de medicamentos con actividad antimicrobiana a partir de fuentes naturales. En los últimos años diversas publicaciones dan cuenta de la presencia de actividad antimicrobiana en compuestos provenientes del reino vegetal, aislándose fenoles, quinonas, taninos, cumarinas, flavonas y alcaloides como responsables de dicha actividad⁵.

Mediante el método de difusión en pocillos, basado en la técnica originalmente descrita por Bauer *et al.* (1966)², se determinó el potencial antimicrobiano de 87 especies vegetales recolectados en la provincia de La Pampa. Entre ellas se seleccionó la especie *Polygonum hidropiperoides* Michaux por demostrar actividad

frente a la mayoría de las cepas bacterianas investigadas^{14,15,16}.

Polygonum hidropiperoides es una planta perenne de 30 a 50 cm de alto, que frecuentemente se la encuentra en charcas, lagunas y arroyos, se la conoce con el nombre vulgar de "lagunilla" y pertenece a la familia Polygonaceae³. Las especies del género *Polygonum* son comercializadas en Brasil con fines medicinales, siendo utilizada ésta en la fabricación de pomadas y supositorios para el tratamiento de las hemorroides⁹.

Para utilizar un extracto vegetal en ensayos clínicos es necesario previamente determinar el potencial tóxico del mismo. Aunque varias especies de mamíferos pueden ser utilizados para determinar la toxicidad, los ratones son de elección por su pequeño porte y la consecuente menor cantidad de sustancia utilizada¹³.

El objetivo de este trabajo fue determinar la concentración inhibitoria mínima del extracto metanólico de *Polygonum hidropiperoides* y establecer el nivel de toxicidad de la especie a través de ensayos en ratones. Los resultados permitirán proyectar ensayos de identificación de compuestos y establecer futuros protocolos de eficacia en ensayos *in vivo*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección y secado del material vegetal

La recolección del material vegetal se llevó a cabo en las inmediaciones de la laguna Don Tomás de la ciudad de Santa Rosa, provincia de La Pampa, Argentina y fue secado en estufa con corriente de aire a 50°C. *Polygonum hidropiperoides* fue identificada por el Ing. Agrónomo Pedro Eduardo Steibel y un ejemplar fue depositado en el herbario de la Facultad de Agronomía de la UNLPam (SRFA).

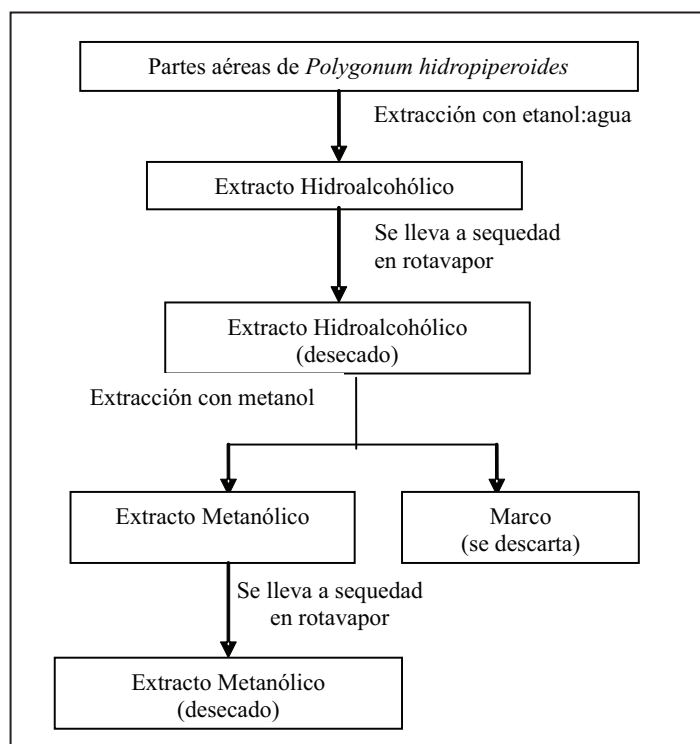
Obtención de los extractos vegetales

Se realizó una extracción hidroalcohólica (1:1 v/v) por maceración con 20 g de partes aéreas desecadas de *Polygonum hidropiperoides*. La fracción obtenida fue sometida a una extracción metanólica (Esquema1).

Determinación de la actividad antimicrobiana

. *Determinación de concentración inhibitoria mínima (CIM) mediante técnica de dilución en agar*. El extracto metanólico obtenido a partir de 20 g de partes aéreas desecadas de *Polygonum hidropiperoides* se llevó a sequedad obteniendo 1,49 g, rendimiento 7,45%. El extracto desecado fue resuspendido con agua destilada estéril hasta un volumen de 10 ml, resultando una concentración de 149 mg/ml. A partir de ésta solución se prepararon diluciones 1/10, 1/20, 1/40, 1/80 y 1/160 y se colocó 1 ml de cada una de ellas en diferentes placas con 9 ml de medio de cultivo agar Müller Hinton. Resultando una concentración final de 1,49 mg, 0,74 mg, 0,37 mg, 0,18 mg y 0,09 mg de extracto seco por ml de agar respectivamente. Se homogenizó y se dejó solidificar. A cada placa se le colocó en 5 puntos separados una descarga de 1 µl de suspensión

Esquema 1. Obtención de extractos hidroalcohólico y metanólico de *Polygonum hidropiperoides*



Nota: los extractos hidroalcohólico y metanólico desecados fueron utilizados en los distintos ensayos.

bacteriana correspondiente a 0.5 de la escala de McFarland de cada una de las bacterias en estudio, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) y las cepas aisladas de muestras clínicas, *Streptococcus equi* (adenitis equina), *Proteus spp* (otitis canina) y *Escherichia coli* (mastitis bovina). Se incubaron durante 24 horas a una temperatura de 35°C y se interpretaron los resultados. Conjuntamente se prepararon, en las mismas condiciones, placas de control de crecimiento sin el agregado del extracto vegetal.

Ensayos de toxicidad

El diseño experimental cumplió lo establecido en la guía para el cuidado y uso de los animales de experimentación según el *Canadian Council Animal Care*¹⁰ y fue aprobado por el comité de ética de investigación en ciencias biológicas de la institución.

Los ensayos de toxicidad aguda y subaguda se realizaron en ratones (*Mus musculus*), los que se recibieron en el laboratorio 7 días antes del ensayo, y desde ese momento hasta el final de los mismos, todos los animales recibieron alimento balanceado comercial y agua *ad libitum*.

Toxicidad aguda. Se utilizaron 50 ratones machos y hembras distribuidos en cinco grupos homogéneos de 10 animales cada uno. Todos los animales se dejaron en ayuno de alimento sólido 5 horas previas a la experiencia y recibieron agua *ad libitum*. El grupo control no recibió tratamiento alguno. Los grupos tratados fueron administrados con una dosis oral única del extracto hidroalcohólico desecado de *Polygonum hidropiperoides*, reconstituido con agua destilada, administrándose un volumen final de 0,1 ml/10 g, mediante sonda bucoesofágica. El esquema posológico fue el siguiente; Grupo 1: 625 mg/kg, Grupo 2: 1.250 mg/kg, Grupo 3: 2.500 mg/kg y Grupo 4: 5.000 mg/kg. Los ratones fueron observados a los 30, 60, 120, 240 y 360 minutos pos administración del extracto y durante los 14 días siguientes cada 24 h con el fin de evaluar el carácter reversible o irreversible de

los efectos¹³. Al finalizar el estudio se sacrificaron los animales del Grupo 4 por dislocación cervical e inmediatamente se realizó la necropsia para la extracción de los órganos a estudiar: estómago, intestino delgado, hígado y riñón. Se realizó una evaluación macro y microscópica de los mismos.

Toxicidad subaguda. Se formaron tres grupos de ratones, cada grupo compuesto de igual número de machos y hembra. El grupo control de 10 animales fue administrado con el vehículo. El grupo tratado y satélite de 20 y 10 animales, se administró diariamente con una dosis de 1.250 mg/kg de peso corporal de extracto hidroalcohólico seco de *Polygonum hidropiperoides* restituído con agua destilada, administrándose un volumen final de 0,1 ml/10 g durante 14 días¹³. En todos los animales la vía utilizada fue la oral mediante sonda bucoesofágica. A todos los grupos se les realizó control del consumo de alimento y del estado general diariamente, registrándose el peso al inicio y al final del ensayo. Las observaciones clínicas se hicieron dos veces al día durante todo el experimento para detectar posibles alteraciones de los animales. Al término del tratamiento se tomaron muestras de sangre mediante punción intracardiaca, previa anestesia con ketamina/acepromacina (Anestesia Veterinaria®, Holliday) por vía intraperitoneal, para exámenes de hematología (conteo de glóbulos rojos y leucocitos, determinación de la concentración de hemoglobina y hematocrito) y química sanguínea (determinación de niveles de aspartato aminotransaminasa (AST), alanina transaminasa (ALT), fosfatasa alcalina (FAL), creatinina y urea). Posteriormente se realizó la necropsia de los animales y el examen anatomopatológico e histopatológico de hígado, riñón, estómago e intestino. Se registró el peso de los siguientes órganos: hígado, pulmón, corazón y riñón. El grupo satélite se observó durante 14 días posteriores de concluida la administración del extracto para detectar signos clínicos de aparición tardía o la recuperación de los posibles efectos tóxicos. Los análisis estadísticos se hicieron mediante el test T de Student, con un nivel de significancia $P < 0.05$.

RESULTADOS

Actividad antimicrobiana

Concentración inhibitoria mínima. De las diluciones ensayadas, la mínima concentración del extracto metanólico de *Polygonum hidropiperoides* que inhibió el desarrollo fue de 1/80 (0,18 mg/ml) para *Streptococcus equi*, *Proteus spp*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y de 1/40 (0,37 mg/ml) para *Escherichia coli* (Tabla1).

Toxicidad aguda

En los ensayos de toxicidad aguda no se observaron cambios en la conducta, signos clínicos de toxicidad, ni muertes en el 100% de los animales tratados. El análisis macroscópico de los órganos estudiados no reportó ningún dato de interés, siendo su aspecto normal. En el estudio microscópico no se encontraron lesiones que pudieran sugerir toxicidad en los animales medicados con la dosis máxima administrada, 5.000 mg/kg.

Toxicidad subaguda

En ninguno de los animales se observaron signos clínicos que pudieran asociarse a efectos tóxicos sistémicos, registrándose un 100% de supervivencia. Tanto machos como hembras aumentaron de peso corporal durante la experiencia, no existiendo diferencias entre

ratones tratados y controles ($P>0,05$). En el estudio de las manifestaciones de toxicidad del extracto vegetal a través de la evaluación de los parámetros hematológicos (conteo de glóbulos rojos, leucocitos, hemoglobina y hematocrito) no hubo diferencias entre grupos ($P>0,05$). Las enzimas, aspartato aminotransaminasa (AST), alanina transaminasa (ALT) y fosfatasa alcalina (FAL), analizadas en las muestras de sangre son indicadores de hepatopatías, afecciones de corazón y músculo esquelético. Los resultados no muestran un aumento de las mismas, ni tampoco se presenta aumento de urea o creatinina, indicadores de funcionamiento renal. Los resultados obtenidos en todos los casos estuvieron cercanos a los del grupo control, coincidiendo con la evaluación histopatológica de hígado, riñón, estómago e intestino donde no se presentaron lesiones compatibles con alteraciones patológicas, ni diferencias en el peso de los órganos nobles entre tratados y testigos ($P>0,05$).

DISCUSIÓN

La técnica de dilución en agar es la más adecuada para determinar la actividad antibacteriana de compuestos de polaridad desconocida¹². Los valores de CIM determinados en este trabajo deben ser interpretados teniendo en cuenta que no representan un valor absoluto. El valor real de la CIM podría estar ubicado

Tabla 1: Concentración inhibitoria mínima del extracto metanólico de *Polygonum hidropiperoides* expresada en mg/ml.

Microorganismos	1,49 (mg/ml)	0,74 (mg/ml)	0,37 (mg/ml)	0,18 (mg/ml)	0,09 (mg/ml)
<i>Streptococcus equi</i> *	s/d	s/d	s/d	s/d	d
<i>Proteus spp</i> *	s/d	s/d	s/d	s/d	d
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	s/d	s/d	s/d	s/d	d
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	s/d	s/d	s/d	s/d	d
<i>Escherichia coli</i> *	s/d	s/d	s/d	d	d

s/d: sin desarrollo bacteriano. d: desarrollo bacteriano. Las diluciones expresadas en mg/ml se calcularon a partir del rendimiento del extracto metanólico (7,45%) proveniente de 20 g de partes aéreas de *Polygonum hidropiperoides*. * aisladas de muestras clínicas

entre la menor y la mayor concentración que inhibió el crecimiento bacteriano. Jacome *et al.* (2004)⁸ mediante cromatografía en capa delgada detectaron la presencia de esteroides y triterpenos, cumarinas, flavonoides, polifenoles, taninos y saponinas en *Polygonum hydropiperoides*. La mayoría de estos grupos químicos son reconocidos como los responsables de la actividad antibacteriana de diversas especies vegetales⁵.

El test de toxicidad agudo y subagudo no produjo mortalidad de los animales bajo las condiciones experimentales ensayadas. Tampoco se presentaron signos clínicos y/o subclínicos de toxicidad. La ganancia de peso obtenida, así como también el consumo de alimento diario, que fue el esperado para la especie y edad de los animales, denota bienestar de los mismos¹. El protocolo de trabajo utilizado es empleado frecuentemente por diversos autores para determinar la dosis letal cincuenta (DL₅₀) de los extractos vegetales, considerando como poco tóxicos, aquéllos que no lo son a dosis superiores a 2.000 mg/kg¹⁸. El empleo del extracto hidroalcohólico para los ensayos de toxicidad permitió evaluar en un solo ensayo la ausencia de toxicidad de esta especie vegetal, ya que el extracto metanólico se obtuvo a partir del hidroalcohólico.

CONCLUSIONES

El extracto metanólico tiene actividad antimicrobiana contra cepas de *Streptococcus equi*, *Proteus spp*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Escherichia coli*.

La administración de extracto hidroalcohólico de *Polygonum hidropiperoides* en modelos de toxicidad aguda y subaguda, utilizando ratones como animales de experimentación, no produce alteraciones anatomopatológicas ni daños histopatológicos.

La ausencia de toxicidad y la presencia de actividad antimicrobiana *in vitro* permitirá realizar ensayos en modelos de infección experimental *in vivo* para determinar el posible valor fitoterapéutico de los extractos obtenidos de *Polygonum hidropiperoides*

BIBLIOGRAFÍA

1. Arencibia Arrebola, DF; Rosario Fernández, LA.; Suárez Fernández, YE.; Soroa Millán, Y. Consideraciones importantes acerca de la cuarentena de ratas y ratones como biomodelos experimentales en toxicología. Revisión. *Vet Arg. Vol. XXVII*. 2010; 271.
2. Bauer, AW.; Hirby, WMM.; Sherris, JC.; Truck, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*. 1996; 45:493-6.
3. Cabrera, AL.; Zardini, EM. *Manual de la flora de los alrededores de Buenos Aires*. Editorial Acme. Buenos Aires. Argentina. 1993:240.
4. Denamiel, G.; Llorente, P.; Carabella, M.; Rebuelto, M.; Gentilini, E. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus spp.* isolated from bovine mastitis in Argentina. *J Vet Med*. 2005; 52(3):125-8.
5. Domingo, D.; López Brea, M. Plantas con acción antimicrobiana. *Rev Esp Quimioterap*. 2003; 16(4):385-93.
6. Ganiere, JP; Medaille, C.; Mangio, C. Antimicrobial drug susceptibility of *Staphylococcus intermedius* clinical isolates from canine pyoderma. *J Vet Med*. 2005; 52(1): 25-31.
7. Gentilini, E.; Denamiel, G.; Llorente, P.; Godaly, S.; Rebuelto, M.; De Gregorio, O. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Argentina. *Journal of Dairy Science* 2000; 83(6):1224-7.
8. Jacome, RLRP.; Lopes, DES.; Recio, RA.; Macedo, JF.; Oliveira, AB. Caracterização farmacognóstica de *Polygonum hydropiperoides* Michaux e *P. spectabile* (Mart.) (*Polygonaceae*). *Rev Bras Farmacog*. 2004; 14(1):21-7.
9. Lima Cardoso, CA.; Honda, NK.; Dias, ES. Avaliação do perfil cromatográfico em espécies de *Polygonum* e amostras comercializadas como "erva de bicho". *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 2006; 16 (2):236-45.
10. Olfert, ED.; Cross, BM.; McWilliam, A. Guide to the Care and use of experimental animals. *Canadian Council on Animal Care*. 1993:1.

11. Prescott, JF. Resistencia a fármacos antimicrobianos y su epidemiología. En: *Terapéutica antimicrobiana en medicina veterinaria*. Prescott, JF.; Baggott, JD.; Walker, RD. Editorial Intermédica. Argentina. 2002: 22-42.
12. Ramírez, LS.; Marín Castaño, D. Methodologies for evaluating the *in vitro* antibacterial activity of natural compounds of plant origin. *Scientia et Technica XV*. 2009; 42:263-7.
13. Souza Brito, A. *Manual de ensayos toxicológicos in vivo*. Campinas. Universidad de Campinas. Brasil. 1994:15-30.
14. Toribio, MS.; Oriani, DS.; Toso, RE.; Fernández, JG.; Tortone, CA. Extractos vegetales con actividad antimicrobiana frente a bacterias gram negativo. XVII Jornadas Argentinas y XII Jornadas Latinoamericanas de Fármaco-Toxicología Veterinaria. 2007. General Pico, La Pampa. Argentina.
15. Toribio, MS.; Oriani, DS.; Toso, RE.; Fernández, JG.; Tortone, CA. Microorganismos gram positivos sensibles a extractos metanólicos provenientes de la flora de la Provincia de La Pampa. XVII Jornadas Argentinas y XII Jornadas Latinoamericanas de Fármaco-Toxicología Veterinaria. 2007. General Pico, La Pampa. Argentina.
16. Toribio, MS.; Oriani, SD.; Toso, RE.; Tortone, CA.; Fernández, JG. *Staphylococcus aureus* sensible a extractos metanólicos obtenidos de plantas nativas de la provincia de La Pampa, Argentina. *Ciencia Veterinaria* 2009; 11(1):14-8.
17. Wildermuth, BE.; Griffin, CE.; Rosenkrantz, WS.; Boord, MJ. Susceptibility of Pseudomonas isolates from the ears and skin of dogs to enrofloxacin, marbofloxacin, and ciprofloxacin. *J Am Anim Hosp Assoc*. 2007; 43(6):337-41.
18. Zanetti GD.; Manfron MP.; Hoelzel SC.; Pagliarin VP.; Morel, AF. Toxicidade aguda e atividade antibacteriana dos extratos de *Tropaeolum majus* L. *Acta Farmacéutica Bonaerense* 2003; 22(2):159-62.

