



Actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Phyllanthus niruri* sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Antibacterial activity of ethanolic extract of Phyllanthus niruri on Staphylococcus aureus ATCC 25923

Rodríguez Sánchez, Susana Noelia ^{1,a} Goicochea Rios, Evelyn Del Socorro ^{2,b}
Polo Gamboa, Jaime Abelardo ^{1,c} Otiniano García, Milly Esther ^{1,d}

¹ Línea de Investigación: Enfermedades Infecciosas y Transmisibles, Trujillo, Perú.

² Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad César Vallejo. Trujillo, Perú.

³ Departamento de Biología, Universidad César Vallejo. Trujillo, Perú.

⁴ Departamento de Enfermedades Infecciosas, Universidad César Vallejo. Trujillo, Perú.

^a Médica Cirujana

^b Médica Cirujana, Doctora en Educación, Doctora en Gestión Universitaria

^c Microbiólogo, Maestro en Docencia Universitaria

^d Microbióloga, Doctora en Ciencias Biológicas

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *Phyllanthus niruri* contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en un experimento in vitro. Se preparó el extracto a 100mg/mL diluido en cuatro concentraciones: 25%, 50%, 75% y 100%; además del control con oxacilina 1µg. Se utilizaron cepas viables de *Staphylococcus aureus*, con 10 repeticiones por grupo. Se usó el método Kirby-Bauer para medir los halos de inhibición, que se compararon mediante la prueba Kruskal-Wallis. Para la concentración del 25% la media de halos de inhibición fue 27,2±0,789mm; para el 50%, 27,9±0,876mm; para 75%, 28,4±0,699mm; para 100%, 29,9±0,876mm y para oxacilina, 31,2±1,229mm. Con diferencias estadísticamente significativas ($p<0,001$). La comparación intragrupal reveló que el grupo al 100% tuvo mayor efecto que las demás concentraciones ($p<0,05$), pero similar al de oxacilina ($p=0,302$). Se concluye que *Phyllanthus niruri* tiene actividad antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Palabras claves: *Phyllanthus*; *Staphylococcus aureus*; Antibacterianos; Técnicas In Vitro (Source: DeCS BIREME).

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the antibacterial activity of the ethanolic extract of *Phyllanthus niruri* leaves against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 in an in vitro experiment. The extract was prepared at 100mg/mL and diluted in four concentrations: 25%, 50%, 75%, and 100%; in addition to a control with 1µg oxacillin. Viable strains of *Staphylococcus aureus* were used, with 10 repetitions per group. The Kirby-Bauer method was used to measure the inhibition halos, which were compared using the Kruskal-Wallis test. For the 25% concentration, the mean inhibition halos was 27.2±0.789mm; for 50%, it was 27.9±0.876mm; for 75%, 28.4±0.699mm; for 100%, 29.9±0.876mm; and for oxacillin, 31.2±1.229mm. The differences were statistically significant ($p<0.001$). Intragroup comparison revealed that the 100% concentration group had a greater effect than the other concentrations ($p<0.05$), but similar to that of oxacillin ($p=0.302$). It is concluded that *Phyllanthus niruri* has antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Keywords: *Phyllanthus*; *Staphylococcus aureus*; Anti-Bacterial Agents; In Vitro Techniques (Source: MeSH NLM)

Información del artículo

Fecha de recibido

15 de octubre del 2023

Fecha de aprobado

30 de diciembre del 2023

Correspondencia

Rodríguez Sánchez, Susana Noelia
su.noelia26@gmail.com

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener conflicto de interés.

Contribuciones de autoría

SNRS participó en la conceptualización, curación de datos, análisis formal, investigación, metodología y redacción del borrador original. EDSGR, JAPG y MEOG contribuyeron a la supervisión, validación y aportaron en la redacción, revisión y edición del trabajo. Todos los autores colaboraron en la revisión crítica del artículo y aprobaron la versión final.

Financiamiento

Autofinanciado

Citar como:

Rodríguez- Sánchez.
Actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Phyllanthus niruri* sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antibióticos es un grave problema de salud pública a nivel mundial. La flora, con sus propiedades medicinales, ha sido históricamente una fuente valiosa para el desarrollo de fármacos. Gran parte de los medicamentos modernos tienen su origen en la naturaleza, y una proporción importante de estos proviene directamente de plantas [1,2]. En este contexto, el Perú, con su rica biodiversidad, ofrece un vasto repertorio de plantas medicinales con potencial terapéutico, incluyendo propiedades antibacterianas[3].

Phyllanthus niruri, conocida coloquialmente como Chancapiedra, es una especie notable dentro del género *Phyllanthus*, que consta de más de 600 especies investigadas por sus propiedades fitoquímicas y farmacológicas[4]. Esta planta contiene una diversidad de moléculas bioactivas, como lignanos, flavonoides y terpenos. Por otro lado, *Staphylococcus aureus* es una bacteria Gram positiva causante de diversas infecciones graves a nivel mundial [5]. Los antibióticos betalactámicos, como las penicilinas y cefalosporinas, han sido la piedra angular en su tratamiento; sin embargo, la creciente resistencia a estos medicamentos, en particular la oxacilina, plantea un desafío significativo [6]

A pesar de que se ha investigado la actividad antibacteriana de *Phyllanthus niruri*, no se han realizado suficientes estudios específicos que comparen su efecto con el de la oxacilina contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. La necesidad de alternativas a los antibióticos tradicionales es urgente, especialmente ante el aumento de cepas resistentes y la escasez de recursos farmacológicos [7]. Además, el enfoque en medicina alternativa podría ofrecer tratamientos más accesibles y reducir la resistencia bacteriana. Por lo mencionado, el objetivo de esta investigación es determinar y comparar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Phyllanthus niruri* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 con el de la oxacilina, en un estudio in vitro.

METODOLOGÍA

Se realizó un estudio experimental realizado en el laboratorio clínico "San José", ubicado en la ciudad de Trujillo, Perú. Las unidades de análisis fueron las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, se incluyeron solo cultivos viables. El cálculo de tamaño de muestra se calculó en función a la diferencia de medias esperada de 13 y 9mm, considerando una potencia estadística del 80% y nivel de confianza del 95%, lo cual resultó en 10 repeticiones por grupo.

La variable dependiente fue la actividad antibacteriana, medida mediante los halos de inhibición usando el método de Kirby-Bauer. La variable independiente fue el tratamiento aplicado, el cual consistió en el extracto etanólico de *Phyllanthus niruri* a cuatro concentraciones, un grupo a 25% (PN25), otro a 50% (PN50), otro a 75% (PN75) y otro a 100% (PN100); el control positivo fue Oxacilina a 1µg y el negativo con solución fisiológica (SF).

Primero, se cultivaron cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y se procedió a diluir 4 colonias de estas en 3 mL para obtener una turbidez y suspensión conforme a la escala de Mc Farland a 0,5. Esta dilución se sembró en placas Petri conteniendo Agar Muller Hinton, distribuyendo uniformemente 0,1 mL de la dilución de las colonias de *Staphylococcus aureus*. Posteriormente, se colocaron en las placas discos de papel filtro Whatman que habían sido

previamente impregnados con extracto etanólico de *Phyllanthus niruri* en diversas concentraciones, así como discos de amoxicilina a 1 µg y suero fisiológico.

Las placas sembradas se incubaron a una temperatura de 37 °C durante 24 horas. Tras el período de incubación, se revisó cada placa para verificar los halos de inhibición y evaluar la sensibilidad de las bacterias mediante la técnica de Kirby-Bauer [8]. Esta observación incluyó la lectura de los halos de inhibición y la evaluación de la técnica empleada en cada cultivo. Los resultados obtenidos fueron meticulosamente registrados en una tabla, donde se anotaron el número de cada placa, las concentraciones utilizadas y la medida en milímetros de cada halo de inhibición observado tras 24 horas. Estos datos se tabularon posteriormente en una hoja de cálculo Excel. El experimento se llevó a cabo siguiendo los procedimientos de bioseguridad establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) [9], utilizando los equipos de bioseguridad apropiados y aplicando las normas de bioseguridad en todos los procedimientos realizados

Inicialmente, la planta de *Phyllanthus niruri* fue legitimada por el Herbarium Truxillense de la Universidad Nacional de Trujillo. Para la obtención del extracto etanólico, se inició con la pulverización de las hojas de *Phyllanthus niruri* hasta obtener 20 gramos de polvo, medida que se verificó utilizando una balanza electrónica. Este polvo fue luego colocado en matraces, añadiendo 10 gramos de polvo a 100 mililitros de agua destilada en cada uno de ellos. Posteriormente, el contenido de los matraces se sometió a un proceso de maceración en etanol durante 72 horas a una concentración de 100 mg/mL. Tras este período, se procedió a centrifugar la mezcla a 50°C durante 10 minutos para separar las fases sólida y líquida. El extracto resultante se refrigeró a una temperatura de 4°C hasta su utilización. La preparación de las diluciones del extracto se realizó utilizando dimetilsulfoxido (DMSO) como solvente. Para la concentración del 100%, se utilizó 100 microlitros del extracto etanólico de *Phyllanthus niruri* en una proporción de 1:1 con el DMSO. Para obtener las concentraciones del 75%, 50% y 25%, se emplearon proporciones de 3:4, 1:2 y 1:4, respectivamente, ajustando la cantidad de extracto y DMSO de acuerdo a estas proporciones.

Para el análisis estadístico, se empleó el software SPSS versión 25, para realizar la comparación de los valores de los halos de inhibición de cada grupo usando la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con un nivel de confianza del 95%, dada la distribución no normal de la muestra evaluada con la prueba de Shapiro-Wilk.

En la realización del estudio se respetaron los criterios para la protección de la biodiversidad estipulados en la Ley Forestal y de Fauna Silvestre, Ley N° 29763, especificados en su artículo 24. Este cumplimiento ético asegura la integridad y la responsabilidad ambiental del estudio.

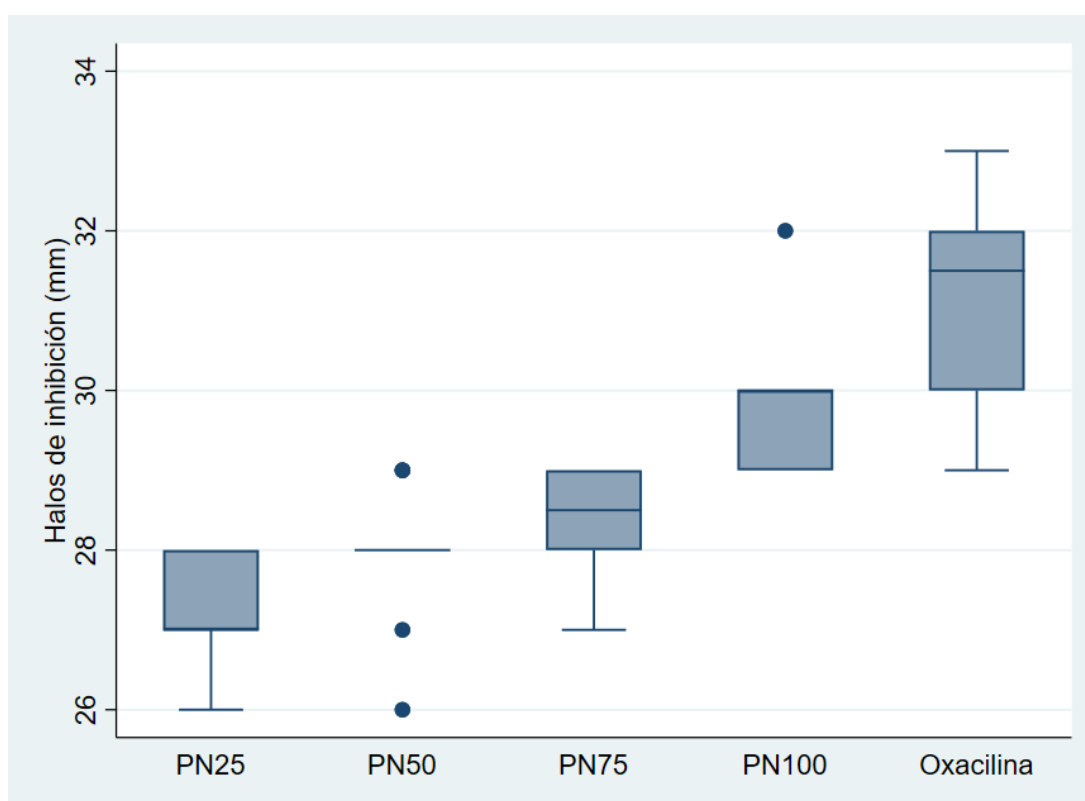
METODOLOGÍA

En la Tabla 1, se observa que las medias de los halos de inhibición de *Staphylococcus aureus* aumentan con la concentración del extracto Etanólico de *Phyllanthus niruri*, variando de 27,2 mm (±0,789) para 25% a 29,9 mm (±0,876) para 100%. El grupo de Oxacilina a 1 µg muestra una media ligeramente superior de 31,2 mm (±1,229) (Figura 1). La aplicación de la prueba de Kruskal-Wallis para comparar los valores de cada grupo reveló diferencias estadísticamente significativas entre los cuatro grupos evaluados ($p < 0,001$).

Tabla 1. Comparación de las medias y desviaciones estándar de los halos de inhibición de crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC

25923 de los grupos de tratamiento					
Concentración de Phyllanthus niruri*	Repeti- ciones	Media (mm) (IC 95%)	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
25%	10	27,2 (26,64- 27,76)	0,789	26	28
50%	10	27,9 (27,27- 28,53)	0,876	26	29
75%	10	28,4 (27,9- 28,9)	0,699	27	29
100%	10	29,9 (29,27- 30,53)	0,876	29	32
Oxacilina	10	31,2 (30,32- 32,08)	1,229	29	33

* Extracto etanólico de *Phyllanthus niruri*



PN25: Extracto etanólico de *Phyllanthus niruri* al 25%. PN50: Extracto etanólico de *Phyllanthus niruri* al 50%. PN75: Extracto etanólico de *Phyllanthus niruri* al 75%. PN100: Extracto etanólico de *Phyllanthus niruri* al 100%. Oxacilina: Oxacilina a 1 ug

Figura 1. Gráfico de cajas y bigotes de los halos de inhibición de crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 de cada grupo de tratamiento

Tabla 2. Comparación de cada grupo de tratamiento respecto a las medias de inhibición de halo (mm) de crecimiento de

Staphylococcus aureus ATCC 25923

Comparación de grupos	Diferencia de medias	Desviación estándar	Valor de p
PN25-PN50	-0,7	-1,088	0,277
PN25-PN75	-1,2	-1,901	0,057
PN25-PN100	-2,7	-4,210	<0,001
PN25-Oxacilina	-3,4	-5,243	<0,001
PN50-PN75	-0,5	-,814	0,416
PN50-PN100	-2,0	-3,122	0,002
PN50-Oxacilina	-2,7	-4,155	<0,001
PN75-PN100	-1,5	-2,308	0,021
PN75-Oxacilina	-2,1	-3,341	0,001
PN100-Oxacilina	-0,7	-1,033	0,302

PN25: Extracto etanólico de *Phyllanthus niruri* al 25%. PN50: Extracto etanólico de *Phyllanthus niruri* al 50%. PN75: Extracto etanólico de *Phyllanthus niruri* al 75%. PN100: Extracto etanólico de *Phyllanthus niruri* al 100%. Oxacilina: Oxacilina a 1 ug

En la Tabla 2 podemos observar que las diferencias en las medias de inhibición de halo de crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 varían significativamente entre los grupos de tratamiento. Las comparaciones más notables son entre el grupo PN25 y los demás, especialmente PN100 y Oxacilina, donde las diferencias de medias son -2.7 mm ($p < 0.001$) y -3.4 mm ($p < 0.001$), respectivamente. Además, la comparación entre PN50 y Oxacilina muestra una diferencia significativa de -2.7 mm ($p < 0.001$), indicando un aumento en la eficacia con concentraciones más altas del extracto y la Oxacilina. No hubo diferencias significativas entre el grupo PN100 y Oxacilina.

DISCUSIÓN

El Este estudio reveló que todas las concentraciones del extracto etanólico de *Phyllanthus niruri* mostraron actividad antibacteriana, a un nivel que podría ser considerado como bactericida, superando los estándares del Clinical and Laboratory Standards Institute (>19 mm) [10]. Los resultados de la concentración al 100% excedió los resultados de Obiagwu et al. [11], quienes informaron halos de inhibición de 16 mm en *Staphylococcus aureus* con un extracto al 400%, inferiores a los 40 mm de gentamicina, su control positivo. De manera similar, Uchechi et al [12] encontraron que este extracto produjo halos de 14 mm, comparables a los 14,5 mm de la penicilina, su control positivo.

En el estudio realizado, se observó una diferencia significativa en la media de los halos de inhibición de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ($p<0,05$), lo que indica que la concentración del extracto etanólico de *Phyllanthus niruri* tiene un impacto notable en su efectividad bactericida. Se encontró que la máxima concentración de *Phyllanthus niruri* (100%) produjo el halo de inhibición más grande, aunque este no superó al generado por la Oxacilina. Estos resultados respaldan la presencia de un efecto bactericida del extracto etanólico de *Phyllanthus niruri*, en línea con las investigaciones de Obiagwu et al[11] y Uchechi et al[12]. En particular, Uchechi et al. informaron que los halos de inhibición de *Staphylococcus aureus* generados por los extractos acuoso y etanólico de *Phyllanthus niruri* fueron de 11 mm y 14 mm respectivamente, lo que sugiere

una efectividad moderada en comparación con otros antibacterianos como las aminopenicilinas.

Las investigaciones relacionadas a la eficacia de *Phyllanthus niruri* como agente bactericida y también antifúngico, han sugerido que su rica composición de compuestos bioactivos podría ser, en gran parte, responsable. Entre estos, se incluyen terpenoides, alcaloides, flavonoides, saponinas, taninos, glicósidos cardíacos y esteroides. Estos componentes trabajan conjuntamente para proporcionar un efecto protector contra infecciones, no solo frente a *Staphylococcus aureus*, sino también frente a bacterias como *Escherichia coli*, evidenciado tanto in vitro como in vivo. Además, su seguridad ha sido confirmada por la ausencia de efectos negativos en órganos cruciales como el hígado y los riñones. Sin embargo, se recomienda realizar más investigaciones para determinar la toxicidad a largo plazo de *Phyllanthus niruri*, destacando así la necesidad de un estudio más profundo para comprender completamente su potencial terapéutico y seguridad [13,14]. Los estudios indican un potente efecto bactericida del extracto etanólico de *Phyllanthus niruri* peruano contra *Staphylococcus aureus*, superior a los resultados obtenidos en otras regiones [11,12,15]. Esta variación podría deberse a diferencias en la concentración de metabolitos influenciadas por factores ambientales como el clima, el suelo, la luz, etc. Debi U et al. [16] concluyeron que el ambiente de crecimiento afecta significativamente la actividad antibacteriana de *Phyllanthus niruri*. En Perú, esta planta se halla en regiones como Cusco, Loreto, San Martín, Cajamarca y en gran parte de la Amazonía, entre los 500 y 3,000 metros sobre el nivel del mar [17]

Phyllanthus niruri es ampliamente utilizada por comunidades rurales en las regiones costeras, de sierra y selva del Perú como un tratamiento empírico para diversas dolencias. Su uso es motivado por ser una alternativa de bajo costo y por las dificultades o limitaciones en el acceso a medicamentos convencionales. Para millones, estas terapias basadas en la flora representan la única opción de atención sanitaria disponible, siendo accesibles y económicas frente al creciente costo de la atención médica y los fármacos, y respaldadas por la cultura y tradición [18]. Esta realidad subraya la importancia de *Phyllanthus niruri* como un punto de partida vital para futuras investigaciones científicas.

Las limitaciones de este estudio incluyen principalmente su alcance y aplicabilidad. Realizado en un entorno particular, sus resultados pueden no ser generalizables a otras cepas bacterianas. La metodología dependió de la efectividad del extracto etanólico de *Phyllanthus niruri* en condiciones de laboratorio, lo que podría diferir en aplicaciones clínicas reales. Sin embargo, resalta la importancia de los ejemplares de *Phyllanthus niruri* en la región de La Libertad.

Se concluye que el extracto etanólico de *Phyllanthus niruri* tiene actividad antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; sin embargo, este efecto no fue mayor al de oxacilina a 1 µg.

CONCLUSIONES

Se concluye que el extracto etanólico de *Phyllanthus niruri* tiene actividad antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; sin embargo, este efecto no fue mayor al de oxacilina a 1 µg.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Chopra B, Dhingra AK. Natural products: A lead for drug discovery and development. *Phytother Res*. 2021;35(9):4660–702. doi:10.1002/ptr.7099
- Seidel V. Plant-Derived Chemicals: A Source of Inspiration for New Drugs. *Plants (Basel)*. 2020;9(11):1562. doi:10.3390/plants9111562
- Condori Rodríguez IM, Benique Carrión L. Evaluación de la Actividad Antimicótica de los Aceites Esenciales de Plantas Aromáticas. Universidad Andina Néstor Cáceres Velásquez; 2019 [citado el 31 de diciembre de 2023]. Disponible en: <http://repositorio.uancv.edu.pe/handle/UANCV/2684>
- Satya A, Narendra K, M. S. *Phyllanthus niruri*: A Review on its Ethno Botanical, Phytochemical and Pharmacological Profile. *Journal of pharmacy research*. 2012;5(9):4681–91.
- Cheung GYC, Bae JS, Otto M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*. 2021;12(1):547–69. doi:10.1080/21505594.2021.1878688
- Brunton LL, Knollman BC. Goodman & Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica, 14e [Internet]. McGraw Hill Medical. McGraw Hill Medical; 2023 [citado el 31 de diciembre de 2023]. Disponible en: <https://accessmedicina.mhmedical.com/book.aspx?bookID=3218>
- Pancu DF, Scurtu A, Macasoi IG, Marti D, Mioc M, Soica C, et al. Antibiotics: Conventional Therapy and Natural Compounds with Antibacterial Activity—A Pharmacotoxicological Screening. *Antibiotics*. 2021;10(4):401. doi:10.3390/antibiotics10040401
- Yin D, Guo Y, Li M, Wu W, Tang J, Liu Y, et al. Performance of VITEK 2, E-test, Kirby–Bauer disk diffusion, and modified Kirby–Bauer disk diffusion compared to reference broth microdilution for testing tigecycline susceptibility of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* and *A. baumannii* in a multicenter study in China. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2021;40(6):1149–54. doi:10.1007/s10096-020-04123-z
- World Health Organization. Manual de bioseguridad en el laboratorio. 4ta edición. World Health Organization; 2023. 125 p.
- Avery Goodwin, Matthew A. Wikler. Development of In Vitro Susceptibility Test Methods, Breakpoints, and Quality Control Parameters [Internet]. Sexta. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2023 [citado el 1 de julio de 2023]. 126 p. Disponible en: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m23/>
- Obiagwu IN, Okechalu OB, Njoku MO. Studies on Antibacterial Effect of The Leaves Of *Phyllanthus Niruri* on Some Enteric Pathogens. *Nigerian Journal of Biotechnology*. 2014;23:22–7.
- Uchechi N. E, Njoku U. N. Antibacterial Effect of *Phyllanthus niruri* (Chanca Piedra) on Three Enteropathogens in Man. *International Journal of Molecular Medicine and Advance Sciences*. 2006;2(2):184–9.
- Bagalkotkar G, Sagineedu SR, Saad MS, Stanslas J. Phytochemicals from *Phyllanthus niruri* Linn. and their pharmacological properties: a review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2006;58(12):1559–70. doi:10.1211/jpp.58.12.0001
- Oyekanmi BA, Osho IB, Kolawole JC. Antimicrobial, phytochemical and pharmacological properties of *Phyllanthus niruri* linn. *Research Journal of Health Sciences*. 2023;11(2):108–18. doi:10.4314/rejhs.v11i2.4
- Adeyinka Ajibade V, Oluwakemi Oluwasusi V, Foluso Ibiyemi M, Ajenifuja F. Antibacterial Activity of Saponin Extracted from *Phyllanthus niruri* on Meth. *Journal of Complementary and Alternative Medical Research*. 2019;1(7):1–9. doi:10.9734/JOCAMR/2019/v7i130092
- Uma Devi, Been Lawrence. Antibacterial Activity of *Phyllanthus niruri* growing near mobile towers. *Biosci Disc*. 2014;5(2):221–6.
- Huamantupa I, Cuba M, Urrunaga R, Paz E, Ananya N, Callalli M, et al. Riqueza, uso y origen de plantas medicinales expendidas en los mercados de la ciudad del Cusco. *Revista Peruana de Biología*. 2011;18(3):283–92.
- Organización Mundial de la Salud. Estrategia Mundial de la OMS sobre Medicina Tradicional [Internet]. EB152(18). 2023 [citado el 1 de junio de 2023]. Disponible en: [https://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/EB152/B152\(18\)-sp.pdf](https://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/EB152/B152(18)-sp.pdf)