

A

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE *PESCHIERIA AUSTRALIS* (MÜELL) MIERS SOBRE *STAPHYLOCOCCUS* *AUREUS* Y *BACILLUS SUBTILIS*

Bargardi S. / Kramer, F. L. / Medvedeff, M. / Jordá, G. / Guida, A.
Cát. de Microbiología Gral. y Farmacotecnia. FCEQyN. UNaM. Posadas. Misiones.
Argentina. Fax (03752) 427687

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF *PESCHIERIA australis* (Müell) Miers. ON *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* AND *BACILLUS SUBTILIS*

ABSTRACT

Based on written and transmitted popular medicine found in the Guaranitic region of South America, some plants commonly used to treat infections, sickness and poisoning in humans or animals were selected as possible sources of useful drugs for applications in new pharmaceutical products. This paper reports the results obtained from *Peschieria australis* (Müell) Miers. Samples were taken from the Guaraní Department and from around Posadas City in the Province of Misiones (Argentina). Chemical extractions were made using the maceration method and the extracts' antibacterial activity, was determined by the Kirby-Bauer diffusion method.

The results show that a concentration of 100 g/l of *P. australis* bark in ethanol or water/ethanol solutions (70:30 or 60:40) is lethal for positives Gram (*S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* clinical specimens and *B. subtilis*). Extractions in water were innocuous under the experimental conditions.

KEY WORDS: antibacterial activity, vegetal extracts, Medicinal plants, antibacterial vegetal products.

RESUMEN

En la "medicina popular" las infecciones, enfermedades e intoxicaciones humanas y animales son resueltas con tratamientos variados traducidos en éxitos y fracasos rotundos. Con esta sabiduría, se fijaron objetivos, entre otros, trabajar con extractos vegetales para encontrar principios activos que conduzcan a proponer su introducción reglamentaria en nuevos fármacos. Las muestras de *Peschieria australis* (Müell.) Miers, (n.v) "Horquetero" o «Sapiranguí» fueron tomadas del Dpto. Guaraní (Misiones) y alrededores de Posadas (Misiones, Argentina). Una vez transportadas al laboratorio, se realizaron las extracciones de los productos activos, por los métodos de maceración, decocción, Soxhlet. Se ensayó la actividad antibacteriana con la técnica de difusión de Kirby-Bauer, con 15 ul del extracto vegetal.

Los resultados demostraron que con la concentración de 100 g/l de corteza de *Peschieria australis* en metanol, etanol o mezcla agua/etanol (70:30 o 60:40) proporcionaron extrac-

tos activos contra bacterias Gram positivas tales como las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. aureus* de muestras clínicas y *B. subtilis*, e inactivos frente a Gram negativos como *E. coli*, *E. cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*. En las condiciones de prueba, ningún extracto acuoso ha tenido acción.

PALABRAS CLAVES: Actividad antibacteriana, extractos vegetales, plantas misioneras, antibacterianos vegetales.

INTRODUCCIÓN

La inquietud por utilizar los recursos de nuestra hermosa naturaleza provincial [1] en forma criteriosa y científica, llevó a indagar la sabiduría popular sobre el uso de la flora silvestre en la terapia de infecciones, enfermedades e intoxicaciones humanas, para intentar colaborar en la educación sanitaria y ayudar en la conservación de la flora selvática misionera para no acrecentar la destrucción y la eliminación indiscriminada de especies vegetales. Con esta situación sufren las comunidades humanas con escasos recursos de nuestra región, ya que hacen de ellas una “farmacia natural” que se pierde paulatinamente.

Nuestro conocimiento adquirido sobre las enfermedades e infecciones en el hombre se remontan al contacto frecuente de las culturas y las generaciones. La bibliografía sobre las costumbres populares es escasa y la existente es incompleta, fundamentalmente en la cultura regional guaranítica y la nuestra. Sin hacer historia detallada de la sabiduría popular, ya que no es nuestro objetivo, podemos decir al respecto que no es fácil conseguirla, ya que requiere un proyecto y una planificación detallada para conseguir datos que sean importantes para nuestros objetivos: para ello nos remitimos a una de las citas que consideramos de inmenso valor, como la desarrollada por el equipo encabezado por A. M. Gorosito Kramer en el trabajo realizado con dos comunidades guaraníes “Mbya” en el Dpto. Guaraní de la provincia de Misiones [2].

Por medio de los informantes se trató de indagar en la comprensión de los códigos que poseen para establecer los parámetros de salud y enfermedad por cuanto difieren de los nuestros. La utilización de las distintas partes de las plantas, el modo de preparación, cuándo recolectarlas, es un conocimiento controlado por el líder espiritual “ñande ru” y su ayudante “Tembigwa’i Añetenguá”, que es el especialista en herbolaria y que se constituyó en informante. Los mbyá se preocupan constantemente por la conservación de la naturaleza, porque cuando se destruye la misma por saqueos irracionales sucumben las reservas de especies medicinales y, juntamente

con ellas, la salud de estas comunidades. Esto, más la pérdida de espacio físico por colonización, producen un profundo, drástico e irreversible golpe a su cultura y a su vida.

Las especies que frecuentemente llamamos plantas forman parte del patrimonio del país, y sin embargo pasan a menudo desapercibidas como recursos económicos y/o científicos.

Según la OMS el 80% de la población mundial recurre a las hierbas para atender sus necesidades primarias de salud, es decir que no solo la población indígena o autóctona utiliza las plantas medicinales sino también todos los estratos sociales y culturales.

Se estima en un 35% o un poco más el consumo en nuestro país, si se considera el incremento debido al ingreso a base de hierbas medicinales que realizan laboratorios extranjeros que son líderes mundiales, y el mercado fitoterápico. Se establece un comercio mundial de plantas de uso medicinal que actualmente asciende a más de 14 millones de dólares.

Un mejor conocimiento de las especies vegetales con aplicación de las mismas permitirá un ahorro de divisas reduciendo la importación, ya sea como droga vegetal o principio activo.

Dentro de los objetivos y finalidades de un proyecto más grande, se tomó la decisión de trabajar con la acción antimicrobiana *in vitro* [3, 4] de manera cualitativa, para trasladarla en otros trabajos a la identificación química de los principios activos, producción de formas farmacéuticas [5] como forma de apoyo a la población en general, profesionales de salud, ecologistas, etc.

La metodología y técnica de procedimientos se basaron principalmente en trabajos de investigación realizados por otros autores [5, 6, 7, 8, 9, 10] y en nuestro conocimiento sobre esta y otras especies vegetales.

La especie para nuestro trabajo fue *Peschieria australis* (Müell. Arg.) Miers que pertenece a la familia Apocináceas. Su nombre ha cambiado varias veces: así, se llamó *Tabernaemontana australis* Muell. Arg., *Tabernaemontana* L. sect. *Peschiera* (A. DC.) Mueller Arg., *Peschiera* A. DC.; la especie tipo es *Peschiera hystris*

(Steud.) A. DC. [11], pero en la actualidad se la designa como *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. [12].

Vulgarmente se la conoce con distintos nombres: “Palo víbora” o “Palo de víbora” [11,13] que aluden a su aplicación en la medicina popular contra mordeduras de serpientes; “Horquetero” por su llamativa disposición en “Y” en la ramificación dicotómica de todas sus ramas; también se la designa en esta zona con los nombres guaraníes de “*Zapiranguí*” o “*Zapiranguí-guazú*”.

La especie es originaria de Brasil, Paraguay y nordeste argentino; en esta última región se distribuye naturalmente en seis provincias: Entre Ríos, Corrientes, Santa Fe, Chaco, Formosa y Misiones, creciendo en bosque abiertos, próxima a los ríos Uruguay y Paraná; florece a fines de primavera y fructifica a mediados del verano. Es un árbol de mediano fuste, cuya altura se encuentra entre 4 a 8 m pudiendo alcanzar hasta 11 m; el diámetro del tronco varía entre 10 a 30 cm, la corteza es lisa, ligeramente rugosa, gris-clara de 5 a 7 mm de espesor.

MATERIALES Y MÉTODOS

I.- Plantas medicinales regionales

a) Muestreo. Se realizó en diferentes épocas del año en las etapas de crecimiento, floración y fructificación, eligiendo al azar algunos sectores del municipio de San Vicente (Dpto. Guaraní, provincia de Misiones) y otros de la capital (Posadas).

Las muestras fueron recolectadas de plantas que tenían una altura próxima a los 4 m, con un tronco de 10 a 15 cm de diámetro y una corteza cercana a los 5 mm de espesor.

Se recolectaron hojas, tallos, corteza, y flores de plantas de la especie *Peschieria australis* (Müell. Arg.) Mier, y se trasladaron al laboratorio para su estudio.

b) Clasificación, estudio fitoquímico, etnobotánico y etnomédico de *Peschieria australis* (Pa). La determinación taxonómica de la especie estuvo a cargo del personal docente del Programa “Estudio florístico y genético vegetal” de la Carrera de Licenciatura en Genética de la Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales (UNaM), quienes conservan la especie en un herbario.

II.- Obtención de Extractos Vegetales

Para obtener extractos de Pa, se emplearon métodos conocidos [5], y también modificados como se indica en todos los casos.

1.- Materiales

a) Muestras. Estas consistieron en tallos (T), hojas secas (H) y verdes (Hv), corteza verde (Cv) y secada, (C) de tronco y corteza de raíz (Cr) de Pa.

b) Solventes. Se utilizó agua destilada, alcohol etílico, mezclas hidroalcohólicas con graduaciones entre 10 y 80 grados alcohólicos (v/v), metanol, acetato de etilo, hexano (Tabla N°1).

2.- Método de procesamiento

a) Secado. Se realizó en dos etapas, una a temperatura ambiente a la sombra y en lugar seco durante 8 días, y otra a 40°C por 48 hs. en estufa para completar el secado.

b) Separación de H, T y C. Luego del secado, se separaron las hojas de los tallos de la planta. La (C) se extrajo directamente del árbol en pie. La Cv y las Hv se procesaron en su estado natural.

c) Molienda. Al término del secado, se sometió a una molienda con un molino a cuchillas y posterior tamizado para homogeneizar, conservándose a temperatura ambiente hasta su empleo en la preparación de extractos. A este polvo se llamó droga (D).

d) Extracciones. Para obtener los extractos se pesó la cantidad equivalente a 100 gramos de D por litro, y se sometió a métodos extractivos de decocción, maceración y Soxhlet [5]. Se emplearon distintos solventes, tiempos, y temperaturas, como se indican en la Tabla N°1.

e) Extractos para ensayos antibacterianos. Para utilizar los extractos crudos obtenidos en la etapa anterior, se realizó un prefiltrado de la solución obtenida a través de papel de filtro Watman N°1 estéril, y luego por filtro esterilizante de 0,22 µm y posteriormente a un Baño María de 65°C por 5 minutos para los extractos acuosos, y se conservaron en heladera a 4°C. El extracto así obtenido y conservado quedó listo para su empleo. En todos los casos se realizó control de esterilidad de extractos y discos.

III.- Acción Antibacteriana

Materiales y Métodos

Materiales

a) Muestras. Se emplearon 51 extractos de Pa.

b) Cepas. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* cepa de muestra clínica, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Enterobacter cloacae* ATCC 202, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Klebsiella pneumoniae* de muestra clínica.

c) Técnica: Prueba de Sensibilidad de Kirby-Bauer [3] estandarizado por la OMS [4].

c.1) Discos de Prueba. Fueron preparados con papel Whatman N°1 estéril de 6 mm de diámetro, embebidos con 15 µl de extracto y luego secados a 37°C durante 24 horas.

Tabla 1: Métodos de extracción y actividad antimicrobiana de extractos crudos de *P. australis* Müell. Miers.

Extracto Nº	Método	Droga	Solventes	Tiempo de extracción	Variable	Resultados sensibilidad						
						1	2	3	4	5	6	
A	48	DECOC.	C	AGUA	20min	Droga	S	S	R	R	R	R
	49	DECOC.	T	AGUA	20min		R	R	R	R	R	R
	50	DECOC.	H	AGUA	20min		R	R	R	R	R	R
	16	DECOC.	TH	AGUA	20min		R	R	R	R	R	R
B	2	M	H	AGUA	48hs	Droga	R	R	R	R	R	R
	12	M	C	AGUA	48hs		R	R	R	R	R	R
	13	M	TH	AGUA	48hs		R	R	R	R	R	R
	14	M	H	AGUA	48hs		R	R	R	R	R	R
C	18	M	H	HAE35	72 hs	Solvente	R	R	R	R	R	R
	41	M	H	AE95	72 hs		R	R	R	R	R	R
D	44	M	Hv	AE95	72hs + 2Rf*	Droga	R	R	R	R	R	R
	39	M	T	AE95	72hs + 2Rf**		R	R	R	R	R	R
	43	M	CV	AE95	72hs + 2R		S	S	R	R	R	R
E	42	M	CV	METANOL	72 hs + 2Rf**	Solvente	S	S	R	R	R	R
	43	M	CV	AE95	72 hs + 2Rf**		S	S	R	R	R	R
F	3	M	H	AE100	24hs	Solvente	R	R	R	R	R	R
	4	M	H	HAE80	24hs		R	R	R	R	R	R
	5	M	H	HAE60	24hs		R	R	R	R	R	R
G	8	M	C	HAE40	72hs	Solvente	S	S	R	R	R	R
	6	M	C	HAE35	72hs		S	S	R	R	R	R
	7	M	C	HAE30	72hs		S	S	R	R	R	R
	9	M	C	HAE35	72hs		S	S	R	R	R	R
	21	M	C	HAE35	72hs		S	S	R	R	R	R
	24	M	C	HAE35	72hs		S	S	R	R	R	R
	25	M	C	HAE35	72hs		S	S	R	R	R	R
H	8	M	C	HAE40	72hs	Solvente	S	R	R	R	R	R
	15	M	C	AE100	72hs		S	R	R	R	R	R
	7	M	C	HAE30	72hs		S	S	R	R	R	R
I	10	M	C	HAE20	48hs	Solvente	R	R	R	R	R	R
	11	M	C	HAE10	48 hs		R	R	R	R	R	R
J	19	M	C	METANOL	72hs	Droga	S	S	R	R	R	R
	20	M	TH	METANOL	72hs		R	R	R	R	R	R
	29	M	H	METANOL	72hs		R	R	R	R	R	R
	34	M	H	METANOL	72hs		R	R	R	R	R	R
	40	M	H	METANOL	72hs		R	R	R	R	R	R
	26	M	C	METANOL	72hs		S	S	R	R	R	R
	37	M	C	METANOL	72hs		S	S	R	R	R	R
	35	M	C	METANOL	72hs		S	S	R	R	R	R
	30	M	CR	METANOL	72hs		S	S	R	R	R	R
	38	M	T	METANOL	72hs		R	R	R	R	R	R
K	22	M	C	HEXANO	72hs	Solvente	R	R	R	R	R	R
	23	M	C	Ac. ETILO	72hs		R	R	R	R	R	R
L	45	SOXHLET	H	METANOL	12 hs+ 6hs*	Droga	S	S	R	R	R	R
	46	SOXHLET	T	METANOL	12 hs+ 6hs*		R	R	R	R	R	R
	47	SOXHLET	C	METANOL	12 hs+ 6hs*		S	S	R	R	R	R
	51	SOXHLET	C	METANOL	12 hs+ 6hs*		S	S	R	R	R	R

Referencias: * 12 hs de maceración previa seguidas de 6 hs de extracción con soxhlet. / ** 72 hs de maceración, seguidas de 2 hs de reflujo a 60 °C / 1= S.aureus; 2= B. subtilis; 3=E.coli; 4= E.cloacae; 5= Klebsiella pneumoniae; 6= Pseudomonas aeruginosa

c.2) Control de Discos. Similares a los anteriores impregnados con 15 ul con agua destilada estéril.

Para el trabajo se tuvo como norma definir la actividad (S) o la inactividad (R) por la presencia o ausencia de halo de inhibición respectivamente.

RESULTADOS

Se obtuvieron los resultados que a continuación se indican.

A.- Los extractos de corteza Cv, Cr y C.

1.- Dentro de las bacterias aeróbicas ensayadas, estos extractos presentaron actividad antimicrobiana sobre bacterias Gram positivas y no sobre bacterias Gram negativas.

2.- Esta actividad dio resultados satisfactorios cuando se usaron extractos obtenidos con solventes como metanol, etanol, y mezclas hidroalcohólicas de 30°, 40° y 100° alcohólicos.

3.- No tuvieron efecto inhibitorio cuando la obtención de los extractos se realizó por decocción y maceración con solventes como el agua, o mezclas hidroalcohólicas de baja graduación.

B.- Los extractos de (H), (T), (TH) obtenidos por maceración con solventes hexano, acetato de etilo, etanol, metanol y agua en las condiciones de prueba, no tuvieron actividad antibacteriana alguna.

C.- Los extractos de H con actividad antibacteriana solamente ocurrieron cuando se usó el método de Soxhlet y como solvente el metanol según los ensayos realizados.

DISCUSIÓN

La falta de actividad antibacteriana de los extractos acuosos se debería a la escasa solubilidad de los principios activos en agua y en mezclas hidroalcohólicas de baja graduación. Podría explicarse del mismo modo cuando se utilizaron solventes no polares como el hexano y el acetato de etilo. Por ello, uno de los factores a tener en cuenta sería la polaridad de los solventes.

Hay diferente distribución de los principios activos en las distintas partes de la planta, que podríamos establecer así: mayor concentración en corteza de tronco y raíz, las hojas poseen una baja concentración y ninguna en los tallos sin corteza.

Con respecto a la bioactividad de las hojas, se podría modificar la carga 15 ul de los discos con el extracto y en su lugar emplear 25 ul, 50 ul, 100 ul, etc., para que se pueda observar actividad; pero creemos que además hay otros factores que actuarían combinados, estos es, métodos de extracción y concentración de extractos.

Respecto a la presencia del extracto en solución, cabe también adecuar los extractos llevándolos a extractos secos y concentrarlos adecuadamente para ensayarlo.

CONCLUSIONES

La especie ensayada *Peschieria australis* (Müell.), nv. "Horquetero" o "Sapiranguí" demostró principios que son biológicamente activos como antibacterianos, no descartándose otra actividad.

La actividad antibacteriana, en las condiciones de prueba, se observó en las bacterias Gram positivas aerobias, esto es *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* de muestras clínicas y *B. subtilis*.

Con las bacterias Gram negativas, *E. coli* ATCC 35218, *E. cloacae* ATCC 202, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Klebsiella pneumoniae* de muestra clínica no resultaron activos.

La corteza de raíz y de tronco de *Peschieria australis* (Müell.) tuvo mejor actividad antibacteriana.

Los solventes que dieron mejores resultados fueron metanol y soluciones hidroalcohólicas de 30°, 40° y 100° según condiciones de ensayos.

Como método de extracción el Soxhlet resultó el más apropiado cuando la concentración del principio bioactivo era baja. ●

REFERENCIAS

1. **Sawchuk**, Basilio y otros. *Manual para la agricultura en la Pcia. de Misiones. Plantas Medicinales*. Ed. GTZ. Set. 1981.
2. **Martínez Craveto**, Raúl. *Plantas utilizadas en medicina popular en el noroeste de Corrientes*. Fundación Miguel Lillo. Tuc. p. 86. 1981.
3. **Balows**, Albert. *Prueba de susceptibilidad a los Antibióticos*. Cap. 2. p. 16-25. Ed. Méd. Panam. S.A. 1976.
4. **Serie de Informes Técnicos N° 610 Comité de Expertos de la OMS en Patrones Biológicos. OMS. Ginebra, p. 106-142. 1977.**
5. **Helman**, José. *Farmacotecnia. Teoría y Práctica*. T. III. Cap. 3. Ed. Continental. México. 1980.
6. **Gutkind**, O. G.; **Martino**, V.; **Graña**, N.; **Coussio**, J. D.; **de Torres**, R. A. *Screening of South American Plants for Biological Activities. I. Antibacterial and Antifungal Activity*. Fitoterapia-Vol. LII-N°5: p. 213-218. 1981.
7. **Chirife**, J; **Núñez**, L; **Ballesteros**, S. A. **Bonzzini**, J. P.; **Herzage**, L.; **D'Aquino**, M. *Estudios sobre la acción bactericida del aceite de clavo de olor dispersado*

en una solución concentrada de azúcar. Rev. Arg. de Microb. Vol. 24. Nº1: p. 32-39. Buenos Aires. 1992.

8. Mongelli, E; Desmarchelier, C; Coussio, J.; Ciaccia, G. *Actividad antibacteriana e interacción con ADN de plantas medicinales de la Amazonia peruana.* Rev. Arg. de Microb. Vol. 27: p. 199-203. 1995.

9. Machado J. Octávio; **dos Santos**, Edanir; **Lefèvre**, F. V. *Ana. Atividade antibacteriana de extratos de Bidens pilosa L.* Rev. Ciénc. Farm. 10: 55-62. Sao Paulo. Brasil. 1988.

10. Leeuwenberg A. J. M. *A Revision of Tabernaemontana.* The New World Species and

Stemadenia; Royal Botanic Garden Kew. IBONE. Corrientes. Argentina. 1996.

11. Comunicación personal de la prof. Manuela Rodríguez. C. de Lic. en Genética. UNaM.

12. Burkart, Arturo, *Flora Ilustrada de Entre Ríos (Argentina) parte V: Dicotiledóneas Metaclamideas (Gamopétalas). A: Primulales a Plantaginales.* Colección Científica del I.N.T.A. Tomo V. p. 96-98. Buenos Aires. 1979.

13. Marzocca, Angel. *Las plantas cultivadas en la República Argentina. Apocináceas.* Rev. Minist. de Agric. y Gan. Vol. IX. Fasc. 163. pág. 34-35. 1952.