

## *Staphylococcus aureus* Meticilino-Resistentes, Sensibles a Extractos de *Tabernaemontana catharinense* A.DC.

Adriana GUIDA<sup>1</sup>, Fernando KRAMER<sup>2</sup>, Graciela JORDÁ<sup>1</sup>, Lidia AMER<sup>1</sup>,  
Martha MEDVEDEFF<sup>1</sup> & Severino BARGARDI<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Cátedra de Microbiología General (Bioquímica),

<sup>2</sup> Cátedra. de Farmacotecnia I y II. Módulo de Farmacia y Bioquímica.

Cátedra de Microbiología Gral, Módulo de Farmacia y Bioquímica,

Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones,

Av. M. Moreno 1375, (3300) Posadas, Provincia de Misiones, Argentina

---

**RESUMEN.** Se estudió la actividad antibacteriana de extractos de corteza de *Tabernaemontana catharinense* A.DC. (metanólico, hidroalcohólico 35°- 40°, hexánico, acuoso y en acetato de etilo) frente a cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistentes. Se utilizó para las experiencias la técnica de Kirby- Bauer, impregnándose los discos con 15 µl de extracto, correspondientes a una concentración de 100 g/l. Las 61 cepas ensayadas se obtuvieron de pacientes infectados del Hospital Central Ramón Madariaga y Provincial de Pediatría de la Provincia de Misiones, Argentina. Las 61 cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistentes ensayadas presentaron halos de inhibición frente a los extractos hidroetíflicos de 35°-40° y metanólicos de corteza de *Tabernaemontana catharinense*. Similar resultado arrojó la lectura de los controles *S. aureus* ATCC 25923 y *S. aureus* ATCC 43300.

**SUMMARY.** "Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Sensitive to *Tabernaemontana catharinense* A. DC. Extracts". The antibacterial activity of extracts of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. bark was tested against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. Different extracts were tested: methanolic, hydroalcoholic (35-40°), hexanic, aqueous and ethyl acetate. Paper disks were impregnated with 15 µl of each extract (100 g/l), according to the Kirby-Bauer standardized technique. Sixty one isolated strains, obtained from the Central Hospital Dr. Ramón Madariaga and from the Pediatrics Provincial Hospital of the Province of Misiones, Argentina, were tested against the different extracts. The methanolic and hydroalcoholic extracts showed high activity against all the *Staphylococcus aureus* strains assayed.

---

### INTRODUCCION

Es conocido que las bacterias pertenecientes al género *Staphylococcus* son patógenos importantes en infecciones nosocomiales y de la comunidad, que obligan al uso de antibióticos más costosos y/o más tóxicos, debido a la aparición de cepas resistentes<sup>1,2</sup>. Desde los primeros brotes de infecciones por *Staphylococcus spp.* meticilino-resistentes registrados en los años '60 en hospitales europeos, se ha producido un gran incremento en la aparición de estas cepas<sup>3,4</sup> tanto en países de ese continente<sup>5</sup> como en países asiáticos<sup>6</sup>, africanos<sup>7</sup> y americanos<sup>8</sup>. Datos obtenidos de EE.UU.<sup>3</sup> indican que el 25% de los aislamientos hospitalarios de *Staphylococcus aureus* son meticilino-resistentes.

Nuestro país no escapó a esta situación, si se tienen en cuenta las publicaciones científicas realizadas sobre aislamientos e identificación de estas bacterias llevadas a cabo por investigadores, en distintas provincias argentinas. A título de ejemplo pueden citarse investigaciones en el Hospital de Niños de Buenos Aires<sup>9</sup>, en Mendoza<sup>10</sup> y en Santa Fe<sup>11,12</sup>, entre otras.

Se menciona que no sólo *S. aureus* es resistente a la meticilina, sino que este marcador, que durante muchos años era patrimonio de los *S. aureus* y se transmitía de una manera vertical, hoy se presenta en cepas de *S. haemoliticus* y *S. epidermidis*, probablemente por la transmisión horizontal desde *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente (MRSA). Esta situación es de gran

**PALABRAS CLAVE:** Extractos vegetales, Meticilino-resistencia, MRSA, *Staphylococcus aureus*.

**KEY WORDS:** Methicillin-resistance, MRSA, Plant extracts, *Staphylococcus aureus*.

\* Autor a quien dirigir la correspondencia: E-mail: sebarces@escenf.unam.edu.ar

importancia clínica, especialmente cuando las infecciones se presentan asociadas a materiales biomédicos. Probablemente han contribuido a este aumento, en hospitales y en la comunidad ambulatoria, los tratamientos empíricos, la automedicación y la drogadicción, que se constituyeron en agentes de presión selectivos. Las características epidemiológicas de los brotes por MRSA, tanto a nivel hospitalario como en la comunidad ambulatoria<sup>13</sup>, se constituyen en un incentivo para la búsqueda de nuevos fármacos con acción antimicrobiana que provean una solución al problema de la resistencia.

El último Congreso Mundial sobre "Plantas Aromáticas y Medicinales para el Bienestar de la Humanidad", realizado en noviembre de 1997 en Mendoza (Argentina), remarca la importancia del uso terapéutico de las plantas como medicina popular o medicina alternativa en los países en desarrollo, ya que el costo elevado de los medicamentos está fuera del alcance del paciente, donde además representa un enorme aporte económico si se considera que un 25% de las drogas que circulan en el mercado provienen de una fuente vegetal<sup>14</sup>.

De acuerdo con estas perspectivas y en base a estudios realizados en nuestra cátedra sobre acción antimicrobiana de extractos vegetales de plantas misioneras, donde se observó que los extractos de *Tabernaemontana* son activos frente a gérmenes gram positivos, se decidió realizar un trabajo sobre *Staphylococcus aureus* meticilino-resistentes. Para su realización se enfrentaron extractos crudos de polvo de corteza de *Tabernaemontana cathartense* A. DC. en solventes de distinta polaridad con cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistentes. La especie *Tabernaemontana cathartense* A. DC. pertenece a la familia Apocynaceae<sup>15</sup> y crece muy bien en Misiones (Argentina), provincias vecinas y zonas de países limítrofes<sup>16</sup>. Por otra parte esta familia es mundialmente conocida como fuente de alcaloides indólicos con importantes actividades biológicas, tales como la reserpina (hipotensora) y la vincristina y la vinblastina (citostáticas), lo que incrementó nuestro interés en el tema. Particularmente *T. cathartense* posee alcaloides indólicos con actividad antiparasitaria<sup>17</sup>. Además, estos alcaloides figuran como componentes en otras especies de *Tabernaemontana* con actividad antibacteriana<sup>17,18,19</sup>.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cepas

Se utilizaron 61 cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistentes, provenientes de dos

laboratorios de la ciudad de Posadas (Misiones): Laboratorio Central del Hospital R. Madariaga y el Laboratorio del Hospital Provincial de Pediatría, donde fue probada la meticilino-resistencia con discos de oxacilina (1 mg) y con los marcadores tetraciclina, gentamicina, eritromicina y cloranfenicol; todas las cepas dieron halos a oxacilina menor o igual a 12 mm y resistentes a 3 o 4 de estos marcadores, según las Recomendaciones de la Subcomisión de Antimicrobianos de la Sociedad Argentina de Bacteriología Clínica (SADEBAC) de la Asociación Argentina de Microbiología en las pruebas de sensibilidad por el método de difusión.

### Controles

Se emplearon *S. aureus* meticilino-sensible ATCC 25923<sup>18,20</sup> y *S. aureus* meticilino-resistente ATCC 43300.

### Discos

Fueron preparados con papel Wathman N° 1 estéril, de 6 mm de diámetro, embebidos con 15 ml de extracto y secados a 37 °C durante 24 h.

### Prueba de sensibilidad

Se utilizó en la experiencia la técnica por difusión, según el método de Kirby-Bauer<sup>21</sup> estandarizada por la OMS. Se adoptó como criterio de actividad antibacteriana la presencia o ausencia de halo de inhibición, sin medir el diámetro de la zona de inhibición<sup>22</sup>.

### Extractos

Se trabajó con distintos tipos de extractos obtenidos por maceración: a) Extracto Hidroalcohólico (HAE) de 35° y 40° alcohólicos, macerado durante 72 h a 25 °C con mezcla de agua destilada estéril y etanol de 96° (Porta, tipo comercial) para obtener la graduación alcohólica deseada; b) Extracto metanólico, obtenido por maceración durante 72 h a 25 °C con metanol (Merck, p.a.); c) Extracto con acetato de etilo (Merck, p.a.), obtenido por maceración durante 72 h a 25 °C; d) Extracto acuoso obtenido por extracción con Soxhlet a ebullición (105°-110 °C) durante 20 h a presión atmosférica, hasta agotamiento; e) Extracto con hexano (Merck, p.a.), obtenido por maceración durante 72 h a 25 °C; f) Extracto hidroalcohólico 35°-40° sobre droga previamente extraída con hexano, secada y macerada luego 72 h a 25°C; g) Extracto hidroalcohólico 35°-40° sobre droga previamente extraída con acetato de etilo, secada y macerada 72 h a 25 °C. En todos los casos se mezclaron y agitaron con frecuencia 100 g de polvo de corteza

de tronco de *Tabernaemontana cathartense* con un litro de cada solvente de extracción.

## RESULTADOS

Las 61 cepas de *Staphylococcus aureus* metilino-resistentes ensayadas presentaron halos de inhibición frente a los extractos hidroetílicos de 35°-40° y metanólicos de corteza de *Tabernaemontana cathartense*. Similar resultado arrojó la lectura de los controles *S. aureus* ATCC 25923 y *S. aureus* ATCC 43300.

Los extractos obtenidos con solventes como el hexano, acetato de etilo y agua por agotamiento con Soxhlet no tuvieron actividad inhibitoria sobre las cepas de *Staphylococcus spp* metilino-resistentes ensayados. Los extractos obtenidos en una segunda maceración del polvo desecado de la primera extracción no demostraron actividad sobre las cepas ensayadas, aún cuando se empleó solución hidroetílica 35°-40° y metanol.

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos con los extractos de corteza de *Tabernaemontana cathartense* sobre *Staphylococcus aureus* metilino-resistentes, pusieron en evidencia una bioactividad muy importante para estos agentes patógenos, ya que los halos de inhibición observados superaron los 13 mm de diámetro en el extracto hidroetílico 35°-40° y los 16 mm en el extracto metanólico.

La diferencia de sensibilidad observada por las mismas cepas frente a estos dos tipos de extractos puede deberse a varios factores tales como: a) en las condiciones de prueba, el solvente de extracción tendría que poseer una polaridad intermedia a la de los dos solventes solos, y ubicado próximo a la que corresponde a la mezcla hidroetílica, debido a que ensayos realizados (aún no publicados) con el mismo método de maceración en igualdad de condiciones con los dos solventes agua y etanol por separados no demostraron actividad o bien será necesario prolongar más el tiempo de extracción o cambiar el método; b) eventualmente puede haber más interferentes en el extracto hidroetílico que en el metanólico, y suministra una menor concentración de principios activos; c) puede tratarse de compuestos en estados moleculares diferentes como han demostrado otros autores en la especie *Tabernaemontana pachystipon* Stapf<sup>19</sup>; d) diferencia de solubilidad de los principios activos en uno u otro solvente. El metanol, en la extracción metanólica, tendría dos actividades

que se contraponen, por un lado nos facilitaría conocer y/o separar aquellos compuestos que pudieran tener actividad antibacteriana o bien facilitar la actividad antibacteriana "per se".

La aplicación etnomédica de los extractos hidroalcohólicos es suficiente para tratamientos de afecciones de la piel debidas a agentes infecciosos comunes, ya que evitan la toxicidad del metanol, aunque es factible realizar un cambio a un solvente inocuo isotónico.

La extracción acuosa hasta agotamiento realizada con Soxhlet si bien no resultó efectiva, probablemente sea debido a la acción continua de la temperatura de 105°-110 °C y al choque térmico producido al término de cada "sifonada", que modificaría las moléculas bioactivas, o al agua como solvente, todo lo cual nos conduce a la necesidad de estudiar y realizar más experiencias.

La extracción con otros solventes no polares como el hexano y de mediana polaridad como el acetato de etilo tampoco fueron efectivas, debido quizás al bajo poder de extracción o a la insolubilidad de las moléculas activas en los mismos. En otras especies del género *Tabernaemontana* algunos investigadores<sup>23,24</sup> manifiestan que existe una marcada actividad antibacteriana de sus extractos, tanto para bacterias gram positivas como gram negativas, consignando que dicha actividad también está localizada en la corteza de la raíz.

De acuerdo a la bibliografía existente sobre el tema, se conoce que mayoría de las especies del género *Tabernaemontana* poseen numerosos alcaloides<sup>27,28,29</sup> en concentraciones variables y que en su mayoría son derivados indólicos<sup>17,18,25</sup>, cuya actividad biológica específica aún no ha sido totalmente determinada. Por otra parte los metabolitos provenientes de microcultivos de *Tabernaemontana*<sup>27</sup> corroboran también esta presencia bioactiva.

Teniendo en cuenta nuestros resultados y experiencias químicas realizadas en HPLC en realización se puede adelantar que dentro de la gran cantidad de compuestos presentes en estos extractos crudos, ya sean etílicos o metanólicos, se encontraron uno o más de ellos que pueden enfrentar con éxito a la resistencia de *Staphylococcus aureus* metilino-resistentes.

## CONCLUSIONES

1. Es posible utilizar un producto natural de la zona para inhibir el desarrollo de *Staphylococcus aureus*.
2. Se deben profundizar y continuar los estu-

dios con este objetivo para combatir la resistencia antimicrobiana a gérmenes presentes tanto en el ámbito hospitalario como en el ambulatorio, previo aislamiento de principios activos, comprobar si posee o no efecto genotóxico e inocuidad en células y animales de prueba.

3. En las condiciones de prueba, los extractos metanólicos de la corteza de *Tabernaemontana catharinense* A.DC. son más activos que los hidroetílicos 35°-40°. No se descarta la posibilidad que actúen mejor a otras concentraciones aún con otros solventes extractivos.

4. Pueden encontrarse uno o más principios activos que actúen sobre cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistentes con mejor actividad.

**Agradecimientos.** Al CIDET (Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico) de la Fac. de Cs. Ex. Qcas. y Nat. de la Univ. Nac. de Mnes. Arg. Programa Nac. De Incentivo Decreto 2427/93. A las Dras. Sandra L. Grenón, Viviana Villalba y Marta Vergara por la colaboración con las cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistentes, el ATCC 43300 y parte de la bibliografía, respectivamente.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Catalano, M., A.M. Romeo & L.B. Ochoa (1989) *Rev. Arg. Microbiol.* **21**: 111-9
- Wichelhaus, T.A., J. Schulze, K.P. Hunfeld, V. Schäfer & V. Brade (1997) *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **16**: 893-7
- Chambers, H.F. (1997) *Clin. Microbiol. Rev.* **10**: 781-91
- Kluytmans, J., A. Van Belkum & H. Verbrugh (1997) *Clin. Microbiol. Rev.* **10**: 505-20
- Corbella, X., M.A. Domínguez, M. Pujol, J. Ayats, M. Sendra, R. Pallares, J. Ariza & F. Guidiol (1997) *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **16**: 351-7
- Tassios, P.T., A.C. Vatopoulos, A. Xanthaki, E. Mainas, R.V. Goering & N.J. Legakis (1997) *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **16**: 170-3
- Nur, Y.A., M.F.Q. Van den Bergh, M.A. Yusuf, A. van Belkum & H.A. Verbrugh (1997) *Int. J. Infect. Dis.* **1**: 186-91
- Zurita, J., O. Guzmán, L. Bravo & G. Maggi (1991) XI Congr. Latinoamer. Microbiol. & VI Congr. Arg. Microbiol., Bs Aires, B 47
- Ellis, A., A. Procopio, A.V. Pizzo, M. González Gombán, A. Awad, C. Enfedaque, P. D'alia, M. Vázquez, S. Chodos, A. Durante & L. Galanternik (1995) VII Congr. Arg. Microbiol., Bs. Aires, A 20
- Sagua, M., M. Montbrun, G. Redondo, M. Benito & S. Curi (1995) VII Congr. Arg. Microbiol., Bs. Aires, L2
- Méndez, E., C. Mayoral, A. Nagel, S. Morano, A. Mollerach & J. Girolamo (1995) VII Congr. Arg. Microbiol., Bs. Aires, L3
- Bogado, I., R. Mari, G. Ebner & E. Sutich (1995) VII Congr. Arg. Microbiol., Bs. Aires, L 4
- Linneman, C.C., P. Moore, J.L. Staneck & M.A. Pfaller (1991) *Amer. J. Med.* **238**: S-244
- Kramer Gorosito, A.M. (1993) "Plantas medicinales usadas por los Mbya (Guaraníes). Dpto. Guaraní. Misiones" Informe de Cierre de campo. Subproyecto Clasificaciones y prácticas aborígenes. Ecosur 93, págs. 1-7, 2-25. Posadas. Misiones. Agosto/93
- Hernández Rojas, N.M. & A. Cuellar (1976) *Rev. Cub. Farm.* **10**: 175-89
- Burkart, A. (1979) "Flora Ilustrada de Entre Ríos (Argentina) parte V: Dicolitiledóneas Metaclamídeas (Gamopetalas). A: Primulales a Plantaginales". Colección Científica del I.N.T.A. Tomo V, págs. 96-8. Buenos Aires
- Pereira, S., D.A. Dias, S.C. Franca, S.V. Sampaio, M.P.A. Toldo & S. Albuquerque (1999) *Acta Horticul.* **501**: 165-9
- Pereira, S., D.A. Dias, S.C. Franca & S.V. Sampaio (1999) *Acta Horticul.* **501**: 171-6
- van Beek, T.A., F.L.C. Kuijlaars, P.H.A.M. Thomassen, R. Verpoorte & A. Baerheim Svendsen (1984) *Phytochemistry* **23**: 1771-8
- Kampf, G., K. Weist, S. Swidsinski, M. Kegel & H. Rűden (1997) *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **16**: 301-7
- Serie de Informes Técnicos Nº 610 (1977) Comité de Expertos de la OMS en Patrones Biológicos. OMS. Ginebra. págs. 106-42
- Machado, J.O., dos Santos, E. & A.F. Lefébre Vampré (1988) *Rev. Ciénc. Farm. Sao Paulo* **10**: 55-62
- Gutkind, G.O., V. Martino, N. Graña, J.D. Coussio & R.A. de Torres (1981) *Fitoterapia* **52**: 213-7
- Balows, A. (1976) "Prueba de Susceptibilidad a los Antibióticos". Ed. Méd. Panam. S.A. Bs. Aires. Págs. 16-25
- Araujo, A.R.; C. Kascheres, F. Fujiwara & A.J. Marsaioli (1984) *Phytochemistry* **23**: 2359-63
- van Der Heijden, R., P.J. Lamping, P.P. Out, R. Wijnsma & R. Verpoorte (1987) *J. Chromatogr.* **396**: 287-95
- Braga, R.M. & F.de A.M. Reis (1987) *Phytochemistry* **26**: 833-6
- Leewemberg, A.J.M. (1996) "A revision of *Tabernaemontana*". The new world species and stemadenia: Royal Botanic Garden Kew, UK
- van Beek, T.A., R. Verpoorte & A. Baerheim Svendsen (1984) *J. Chromatogr.* **298**: 289- 307