
Evaluación de la Actividad Antibacteriana in vitro de los Extractos de *Caesalpinia spinosa* “tara” y *Eucalyptus* sp. “eucalipto”

Liu B. Humberto *; Lengua V., Luis Alberto *; León M., Gladis *;
La Torre D., Carla *; Huapaya Y., José **; Chauca, José **

RESUMEN

Se evaluó in vitro la actividad antibacteriana de extractos de *Caesalpinia spinosa* "tara" y *Eucalyptus* sp. "eucalipto" utilizando cepas bacterianas Gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*) y Gram negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella* sp. y *Shigella flexneri*). Se utilizó como solvente de extracción una mezcla de alcohol-acetona (1:1) y la actividad biológica de los extractos obtenidos se evaluó mediante la técnica de difusión en disco.

La cáscara del fruto de *Caesalpinia spinosa* y las hojas del *Eucalyptus* sp. mostraron una actividad selectiva sobre las bacterias Gram positivas evaluadas.

Palabras Claves: *Caesalpinia spinosa*, *Eucalyptus* sp., extracto, halo de inhibición, solvente, técnica de difusión en disco, Gram positivo, Gram negativo, antibacteriano, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.

SUMMARY

The antibacterian activity of extract of *Caesalpinia spinosa* and *Eucalyptus* sp. "eucalipto" was valued using bacterial capes gram positives (*Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*) and gram negatives (*Escherichia coli*, *Klebsiella* sp, *Shigella flexneri*).

For the investigation was used as extraction solvent a mixture of alcohol-acetona (1:1), the biological activity of the obtained extracts was valued using the disc diffusion technique.

The fruit peel of *Caesalpinia spinosa* and the leaves of *Eucalyptus* sp show a selective activity over the valued gram positives bacteriums

Key Words: *Caesalpinia spinosa*, *Eucalyptus* sp, extract, inhibition halo, solvent, diffusion disc technique, gram positive, gram negative, antibacterian, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.

INTRODUCCIÓN

Desde tiempos remotos la población del mundo ha recurrido a las plantas con el fin de curarse alguna dolencia. Las plantas medicinales eran veneradas por las virtudes que se les había reconocido, transmitiéndose sus virtudes de generación en generación; nadie buscaba saber porqué o cómo actuaban, pero era un hecho sin respuesta y aparentemente mágico (1). En nuestro país también existe esa costumbre, conocida como Medicina Folklórica o Tradicional.

Elementos vegetales como la cafeína y hierbas como el tarragón tienen propiedades contra virus (2), bacterias (3) y hongos (4). Se encuentran propiedades antivirales interesantes en elementos vegetales poco comunes como cactus, que se han demostrado ser seguros para el ser humano (5).

Numerosos compuestos con actividad antimicrobiana han sido aislados de plantas, de ellos los más importantes corresponden a compuestos fenólicos, quinonas, flavonas, flavonoides, taninos, terpenoides, alcaloides, etc.

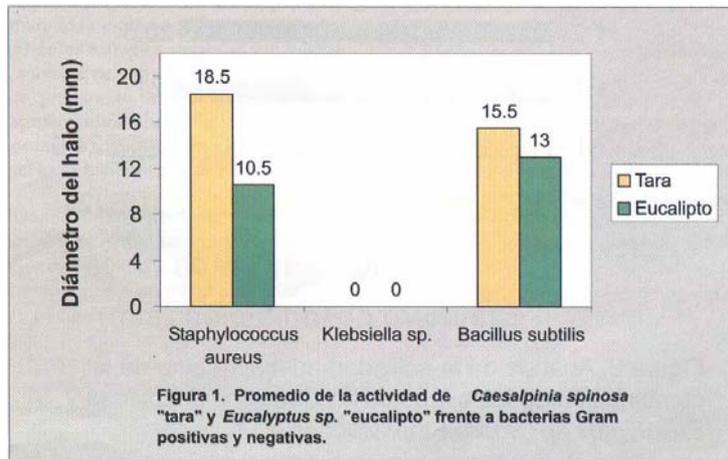
Tradicionalmente la *Caesalpinia spinosa* "tara" y el *Eucalyptus* sp. "eucalipto" han sido usados en el tratamiento de diversas afecciones respiratorias. *Eucalyptus* sp. es una planta perteneciente a

* Alumnos de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad de San Martín de Porres

** Docentes Asesores de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad de San Martín de Porres

la familia Myrtaceae cuyo aceite tiene propiedad antibacteriana como antifúngica, sin embargo la eficacia de aceites de eucalipto y sus extractos son dependientes de su composición química (6).

Por otro lado, la *Caesalpinia spinosa* "tara" es una planta que pertenece a la familia Caesalpiniaceae.



Este es un arbusto espinoso que produce un fruto tipo legumbre de color anaranjado rojizo y es conocido por producir taninos (7).

Uno de los problemas que actualmente enfrentan los tratamientos médicos es la resistencia bacteriana ocasionada por el uso indiscriminado de antibióticos por lo cual los productos de origen vegetal podrían proporcionar una alternativa frente a este problema. Sin embargo, desde el advenimiento de los antibióticos en la década de los 50, el uso de los derivados de plantas como antimicrobianos ha sido virtualmente inexistente. Esto ha ocasionado un vacío en el conocimiento de las propiedades medicinales de numerosas plantas.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad antibacteriana in vitro de los extractos de *Caesalpinia spinosa* y *Eucalyptus sp.*

MATERIALES Y METODOS

Las cepas bacterianas utilizadas fueron:

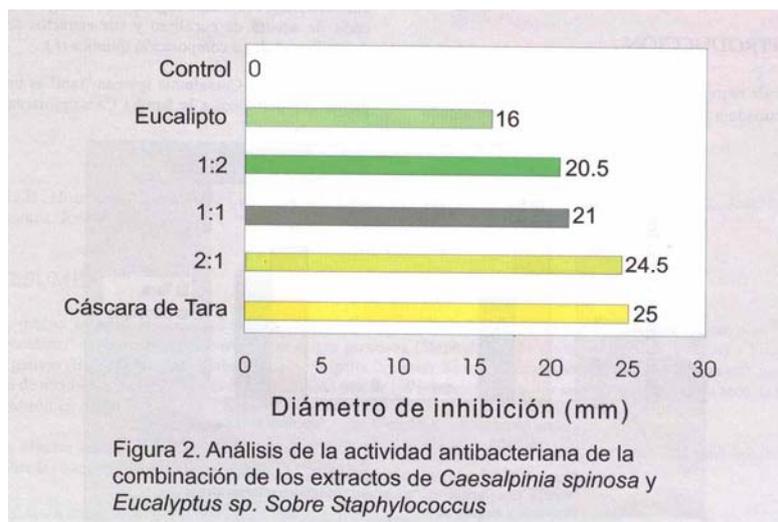
- *Bacillus subtilis* (Instituto Pasteur de Francia y obtenida a través del Laboratorio de Microbiología Experimental del Instituto de Medicina Tropical II Alexander von Humboldt" de la Universidad Peruana Cayetano Heredia)
- *Klebsiella sp.* (Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Universidad de San Martín de Porres)
- *Shigella flexneri*
- *Escherichia coli*
- *Staphylococcus aureus*

Las últimas tres cepas fueron cedidas por el Laboratorio de Microbiología Clínica del Instituto de Medicina Tropical II Alexander von Humboldt" de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Las especies vegetales evaluadas fueron:

- *Caesalpinia spinosa* "tara" (8)
- *Eucalyptus sp.* "eucalipto" (8)

Para la preparación de los extractos vegetales se recolectaron 500 g de vainas de *Caesalpinia spinosa* "tara" (peso seco) y 1000 g de ramas de *Eucalyptus sp.* "eucalipto" (peso húmedo). Para el eucalipto se utilizaron las hojas, las cuales fueron secadas al medio ambiente en un tiempo aproximado de 72 horas.



Se homogenizó el material vegetal usando una licuadora (Sunbeam-Oster), el producto obtenido fue tamizado usando gasas estériles, hasta obtener un polvo muy fino.

El solvente para la extracción de los componentes biológicamente activos se preparó usando cantidades iguales de alcohol y acetona (1:1), el cual fue calentado en baño maría hasta alcanzar su temperatura de ebullición. Un volumen de 100 ml del solvente fue adicionado a lag del homogeneizado vegetal y se agitó vigorosamente por 10 minutos. La extracción prosiguió en reposo a temperatura ambiente y protegida de la luz durante 24 horas (9).

Antes de su utilización los extractos fueron filtrados con papel de filtro (Whatman 0,5) y luego centrifugados a 3000 rpm

Para evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos vegetales, las cepas bacterianas antes de su utilización fueron sembradas previamente en agar Trypticase de Soya (24 horas antes). Luego se picaron de 3 a 5 colonias y se inocularon en tubos conteniendo 3 ml de caldo Trypticase de Soya, incubándose por aproximadamente 2 horas. La densidad bacteriana fue ajustada aproximadamente a 1.5×10^8 bacteria/ml usando el tubo N° 1 de la escala de MacFarland (0,5) (9).

Usando un hisopo estéril se inocularon placas de agar Muller-Hinton con cada cepa evaluada. Simultáneamente se prepararon discos de papel de f11tro (Whatman 351) estériles a los cuales se les adicionó 15 ml de los extractos vegetales y el mismo volumen del solvente de extracción (blanco o testigo). Una vez preparados los discos se dejaron reposar por aproximadamente 5 minutos para permitir la evaporación del solvente de extracción. Todas las pruebas se hicieron por duplicado.

Después, utilizando pinzas estériles se colocaron los discos en la superficie de la placa con el suficiente espacio entre los discos para que los halos de inhibición no se superpongan y permitan una adecuada medición. Las placas fueron incubadas a 37° C por 22 horas. Luego de ello fueron examinadas para determinar la formación de halos de inhibición. El diámetro de cada halo de inhibición se midió usando una regla milimetrada (+/- 0,5 mm). Siendo estas registradas mediante una cámara digital Olympus a 1,3 Megapixels.

RESULTADOS

En la evaluación del extracto de tara usando el fruto (vaina) completo, se observó actividad inhibitoria sobre cepas Gram positivas. Los componentes del fruto relacionados con dicha actividad corresponden exclusivamente a la cáscara de la vaina, donde la pepa no muestra actividad inhibitoria.

También se demostró una inhibición efectiva por extracto *Eucalyptus sp.* para *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, pero no para *K.1ebsiella* *Escherichia coli* y *Shigella flexneri*.

Comparando los promedios de halos de inhibición, podemos observar un efecto inhibitorio mayor de la *Caesalpinia spinosa* sobre el *Eucaplyptus sp.* (figura 1).

No se obtuvo halo de inhibición en el control en ninguno de los ensayos realizados.

El análisis de varianza de dos vías del efecto de *Caesalpinia spinosa* indica que los extractos de esta planta tienen una actividad diferencial sobre cepas Gram positivas estadísticamente significativa ($p < 0,001$), de la misma manera los componentes de esta planta han diferido en actividad ($p < 0,001$).

Cuando se comparó la actividad de *Caesalpinia spinosa* (cáscara) frente a *Eucalyptus* sp. no se detectaron diferencias significativas entre ambos ($p = 0,075$). Sin embargo, sí se detectó una actividad estadísticamente significativa frente a las cepas evaluadas.

Los extractos no mostraron actividad frente a las bacterias Gram negativas (*E. Coli*, *Shigella flexneri* y *Klebsiella* sp.). La combinación de los extractos de *Caesalpinia spinosa* y *Eucalyptus* sp. no mostraron efecto antagónico frente a las cepas de *Staphylococcus aureus*. Sin embargo, los halos de inhibición en *S. aureus* de la cáscara de *Caesalpinia spinosa* fueron mayores que los de *Eucalyptus* sp. Además, se evidencia una relación entre los diámetros de los halos de inhibición y el contenido de tara de las mezclas evaluadas (figura 2).

Todos los extractos de solventes orgánicos obtenidos fueron traslúcidos, poco viscosos y de un pH promedio de 5,5.

DISCUSION

Nuestra población viene empleando diversos preparados a base de Plantas con fines medicinales, para tratar distintas infecciones, sin conocer a plenitud su efectividad. Solo un verdadero estudio analítico podrá corroborar o desvirtuar aquellas creencias.

El estudio realizado demostró efecto antimicrobiano significativo por la *Caesalpinia spinosa* "tara" y *Eucalyptus* sp. "eucalipto" para bacterias Gram positivas.

En caso de la *Caesalpinia spinosa* "tara"; solo el extracto obtenido de la cáscara de la *Caesalpinia spinosa*, tenía efecto inhibitorio mas no la pepa, que mostró un efecto inhibitorio nulo. Siendo este un aporte significativo para aquellas fórmulas tradicionales que utilizan el fruto completo de la tara.

El uso de la técnica de difusión en disco permite un análisis preliminar eficaz para demostrar efectos antimicrobianos de extractos de materias vegetales.

El uso de cepas bacterianas tanto Gram positivas como Gram negativas permitió una idea representativa del efecto inhibitorio sobre dichos microorganismos. Demostrándose un efecto preferencial por las Gram positivas, debiéndose aún probar su efecto en un mayor número de cepas bacterianas.

La utilización de solventes orgánicos (como alcohol y acetona) tienen la ventaja de preservar mejor los extractos e inhibir el crecimiento de bacterias, hongos y otros, además de desnaturalizar las enzimas que pueden degradar los compuestos biológicamente activos. En el caso de los extractos usando como solvente agua, estos dieron muestras viscosas y gelatinosas las cuales se hicieron difíciles de procesar (dados estos factores, no podrían difundirse adecuadamente en el agar, y los resultados obtenidos serían inconcluyentes). La bibliografía revisada solo informó efecto antimicrobiano de aquellos extractos obtenidos por agua destilada y procesados por métodos muy especializados, considerándose los principios activos analizados en este estudio algo novedoso, sin ningún estudio profundo anterior (10).

En el caso de la pepa de tara, mostró propiedad de gel, la cual podría ser útil para la industria.

Se buscó un efecto sinérgico o antagónico entre *Caesalpinia spinosa* "tara" y *Eucalyptus* sp. "eucalipto" en donde sólo se muestra un efecto no antagónico e ineficaz para bacterias Gram negativas.

Se postula que los principios activos de *Caesalpinia spinosa* "tara" y *Eucalyptus* sp. "eucalipto" podrían servir como agentes terapéuticos contra diversas patologías infecciosas.

Sin embargo, sería importante evaluar estos extractos mediante técnicas cuantitativas, como la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los productos, de mayor precisión para determinar la concentración de los extractos (11).

La cromatografía de alta resolución podría separar también ciertos colorantes observados en nuestros extractos y proceder a identificar plenamente el principio activo estudiado.

CONCLUSIONES

- La combinación de solventes alcohol acetona resultó efectiva para la extracción de los principios activos antimicrobianos de *Caesalpinia spinosa* y *Eucalyptus* sp.
- La cáscara de *Caesalpinia spinosa* demuestra una buena acción inhibitoria sobre *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*.
- Por el contrario la pepa de *Caesalpinia spinosa* no muestra efecto inhibitorio sobre las mismas bacterias. Las hojas de *Eucalyptus* sp. demostraron también una buena efectividad en las cepas mencionadas.
- No se mostró ningún efecto antimicrobiano sobre Gram negativas.
- Las mezclas en diferentes proporciones de estos productos mostraron un efecto no antagónico.
- La cáscara de *Caesalpinia spinosa* mostró un efecto inhibitorio mayor sobre las hojas de *Eucalyptus* sp.

BIBLIOGRAFIA

1. Lock de Ugaz, Olga; Investigación Fitoquímica: Métodos en el estudio de Productos Naturales; Pontificia Universidad Católica del Perú; Fondo Editorial; página 211; 1988.
2. Wild, R., et al.; The complete book of natural and medicinal cures; Rodale Press, Inc.; Emmaus, Pa.; 1994.
3. Thomson, W A. R., et al.; Medicines from the Earth; McGraw-Hill Book Co.; Maidenhead, United Kingdom; 1978.
4. Duke, J A; Handbook of medicinal herbs; CRC Press, Inc.; Boca Raton, Fla; 1985.
5. Ahmad, A, J Davies, S. Randall, and G. R. B. Skinner; Antiviral properties of extract of *Opuntia streptacantha*; Antiviral Res.; 30:75-85; 1996.
6. Treating Livestock With Medicinal Plants: Beneficial or Toxic?; www.ansci.cornell.edu/plants/medicinal/eucalyp.htm
7. Kuntze; *Caesalpinia Spinosa* (MaL); www.buscaplantas.com/Caesalpiniaspinosa.htm.
8. Rutter, R.; Catálogo de Plantas Útiles de la Amazonía Peruana; Ministerio de Educación, Instituto Lingüístico; 349 páginas; 1990.
9. Berry, J; Rodriguez, E.; Microbiology Assays in Chemical Prospecting; <http://linstruct1.cit.cornell.edu/courses/biochemprosp/>.
10. Roy, AK.; Kumari, v.; Aflatoxin and citrinin in seeds of some medicinal plants under storage; Lisse, Netherlands: Swets & Zeitlinger; International Journal of Pharmacognosy; v. 29 (1): p.62-65; 1991 February
11. Alderman, D.; Smith, P.; Smith, P.; Towards a set of Standard Reference Methods for Antimicrobial Agent Susceptibility Testing of Bacteria Associated with Fish Diseases; Department of Microbiology, National University of Ireland, Galway; <http://www.nuigalway.ie/mic/eusus/index.html>