

Artículo original

Antagonismo in vitro de extractos etanólicos de *Tabernaemontana* frente a cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*

[In vitro antagonism of ethanolic extracts from *Tabernaemontana* against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* strains]

Cecilia De Fátima Barbarán Urresti¹, Jorge Manases Ríos Ríos², María Elena Bendayán Acosta¹, Gregorio Heredia Quezada³, Alvaro Tresierra-Ayala^{*4}

1. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana. Facultad de Ciencias Biológicas. Campus Universitario Zungarococha, San Juan Bautista, Loreto, Perú. Correos electrónicos: qf.barbaranurresti@gmail.com (C. F. Barbarán), meba14@hotmail.com (M. Bendayán).
2. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP). Facultad de Ingeniería Química. Av. Grau 1072, Iquitos, Loreto, Perú. Correo electrónico: jmanases.riosr@gmail.com (J. M. Ríos).
3. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana. Facultad de Medicina Humana. Calle A. N. Cauper 363, Punchana, Loreto, Perú. Correos electrónicos: goyofox@yahoo.com (G. Heredia)
4. Universidad Científica del Perú (UCP). Av. A. Quiñones km 2,5 (Iquitos), San Juan Bautista, Maynas, Loreto, Perú. Correo electrónico: atresierra@ucp.edu.pe (A. Tresierra-Ayala * Autor para correspondencia).

Resumen

Actualmente varias cepas bacterianas muestran multirresistencia a los antibióticos de uso frecuente. Por ello, es necesario las alternativas, como los fitomedicamentos. Se evaluó el rendimiento, tamizaje fitoquímico y actividad antagónica de extractos etanólicos de cuatro especies de *Tabernaemontana* (*T. macrocalyx* Müll.Arg., *T. heterophylla* Vahl, *T. maxima* Markgr. y *T. markgrafiana* J.F.Macbr.), frente a cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Las muestras botánicas fueron colectadas en el área de Manacamiri, Loreto (Perú). Luego, con métodos estándares se determinaron cualitativamente los metabolitos secundarios presentes. Asimismo, con la técnica de Kirby-Bauer se determinó el efecto antagónico de los extractos frente a cinco cepas de *S. aureus* y *P. aeruginosa*. Los resultados indican que las hojas de *T. maxima* y *T. markgrafiana* mostraron mayor rendimiento de extractos (20,6 y 20,4 %, respectivamente). El tamizaje fitoquímico mostró predominancia de alcaloides y algunos extractos contenían aminas o aminoácidos, flavonas, triterpenos, entre otros compuestos. Sólo los extractos de *T. maxima* y *T. markgrafiana* mostraron actividad antibacteriana in vitro contra las cepas bacterianas evaluadas. En conclusión, los extractos etanólicos de *T. maxima* y *T. markgrafiana* tienen efecto antagónico contra cepas de *S. aureus* y *P. aeruginosa*. Este efecto inhibitorio se puede atribuir a los alcaloides.

Palabras clave: Actividad antagónica, Antibótico, Antimicrobiano, Extractos vegetales, Fitoquímica.

Abstract

In recent years, several bacterial strains have shown multi-resistance to commonly used antibiotics. Therefore, it is necessary to possess different alternatives to these antibiotics, such as phytomedicines. The yield, phytochemical screening, and antagonistic activity of ethanolic extracts from four species of *Tabernaemontana* (*T. macrocalyx* Müll.Arg., *T. heterophylla* Vahl, *T. maxima* Markgr. and *T. markgrafiana* JFMacbr.) were evaluated against strains of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. Botanical samples (leaf, bark and root) were collected in the Manacamiri area, Loreto region. These were processed, dried and then ethanolic extracts were obtained. Further, with standard methods, secondary metabolites were qualitatively determined. Likewise, with the Kirby-Bauer technique was determined the antagonistic effects of the extracts against five strains of *S. aureus* and *P. aeruginosa*. The results indicate that the leaves of *T. maxima* and *T. markgrafiana* produced higher extract yields (20,6 and 20,4 %, respectively). Phytochemical screening displayed a predominance of alkaloids and some extracts contained amines/amino acids, flavones, triterpenes, among other compounds. Only the extracts of *T. maxima* and *T. markgrafiana* demonstrated in vitro antibacterial activity against the bacterial strains evaluated. In conclusion, the ethanolic extracts of *T. maxima* and *T. markgrafiana* have an antagonistic effect against strains of *S. aureus* and *P. aeruginosa*. This inhibitory effect can be attributed to the content of secondary metabolites, such as alkaloids, in these plant extracts.

Keywords: Antagonistic activity, Antimicrobial, Plant extracts, Phytochemistry.

INTRODUCCIÓN

Con la aparición de los antibióticos en la terapéutica médica se hizo patente el problema de la resistencia bacteriana, lo cual era un hecho desconocido hasta ese momento para los seres humanos, pero existente en el mundo microbiano (Jacoby y Archere, 1991). Durante los últimos años, varias cepas bacterianas, como es el caso de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, se han convertido en una gran problemática para la antibioticoterapia, dado que vienen mostrando multirresistencia a los antibióticos de frecuente uso para controlar sus procesos infecciosos. Por ello, gran parte de los estudios tendientes a buscar alternativas, distintas a los antibióticos, utilizan como herramientas biológicas a estas especies bacterianas. La resistencia a los antibióticos se ha convertido en una preocupación mundial, incluso diferentes organizaciones internacionales como la Asamblea Mundial de la Salud y la Organización Mundial de la Salud, vienen proponiendo alternativas de solución frente a este problema, a través de su proyecto "Salud y Medicina Tradicional", el cual busca apostar como método alternativo y seguro, el tratamiento de las enfermedades infecciosas con fitomedicamentos (WHO, 1991; WHO, 1996).

Es importante mencionar que, desde la antigüedad, el hombre ha utilizado plantas como fuente para la elaboración de medicamentos, ya sea en fármacos o preparaciones tradicionales, con la finalidad de controlar la prevalencia de ciertas enfermedades infecciosas, vencer los problemas de resistencia a los microorganismos y evitar los efectos colaterales que poseen los antimicrobianos (Ali-Shayeh et al., 1998; De Los Ríos et al., 1999; Sanabria et al., 1998). En la actualidad, más del 80 % de la población mundial utiliza plantas como su fuente primaria de agentes medicinales, obteniendo resultados más que favorables. Probablemente, esto se deba a que las plantas medicinales y sus derivados presentan principios activos que les confieren una complejidad de propiedades medicinales, entre ellas la acción antimicrobiana. Por tal motivo algunas especies son consideradas

como alternativa para el tratamiento efectivo de las enfermedades infecciosas (Palomino y Uribe, 2007; Reynel et al., 2003).

La Amazonía es reconocida como una región megabiodiversa, poseedora de una riqueza florística, en la que existen especies nativas de *Tabernaemontana* utilizadas tradicionalmente por sus potenciales propiedades medicinales. Sin embargo, pese a ello, pocos estudios han sido realizados en torno a esta temática, de allí que, investigaciones relacionadas con la evaluación de su actividad antimicrobiana de los extractos vegetales, constituiría un gran aporte para la ciencia, más aún si se incluyen en dichos estudios plantas nativas de la región y así, conocer su eficacia y su potencial como fuentes de nuevas drogas, y así descubrir nuevos compuestos que sean más eficaces, de menor toxicidad y con un bajo costo comparados con los antibióticos usados actualmente en la práctica clínica (Sangama y Espinoza, 2009). Por lo cual, los objetivos de la presente investigación fueron: 1) Evaluar el rendimiento de los extractos de cuatro especies de *Tabernaemontana* (*T. macrocalyx*, *T. heterophylla*, *T. maxima* y *T. markgrafiana*). 2) Determinar los diversos metabolitos secundarios en las especies de *Tabernaemontana* y 3) Evaluar la actividad antibacteriana de los extractos de las hojas, corteza y raíz de las cuatro especies del género *Tabernaemontana* frente a aislados intrahospitalarios de *P. aeruginosa* y *S. aureus*.

MATERIALES Y MÉTODO

Área de estudio

Las muestras botánicas (hoja, corteza y raíz) de *T. macrocalyx*, *T. heterophylla*, *T. maxima* y *T. markgrafiana* fueron colectadas en la localidad de Manacamiri, la cual se ubicada en la margen derecha del río Nanay, Distrito Punchana, Provincia Maynas, Departamento Loreto, Perú, en las coordenadas geográficas UTM 690474 E, 9588909 S; Zona UTM 18; a 87 msnm (Figura 1). Las cepas bacterianas fueron aisladas de equipos de cómputo del Hospital de Apoyo Iquitos (HAI), ubicado en la ciudad de Iquitos, Loreto, Perú.

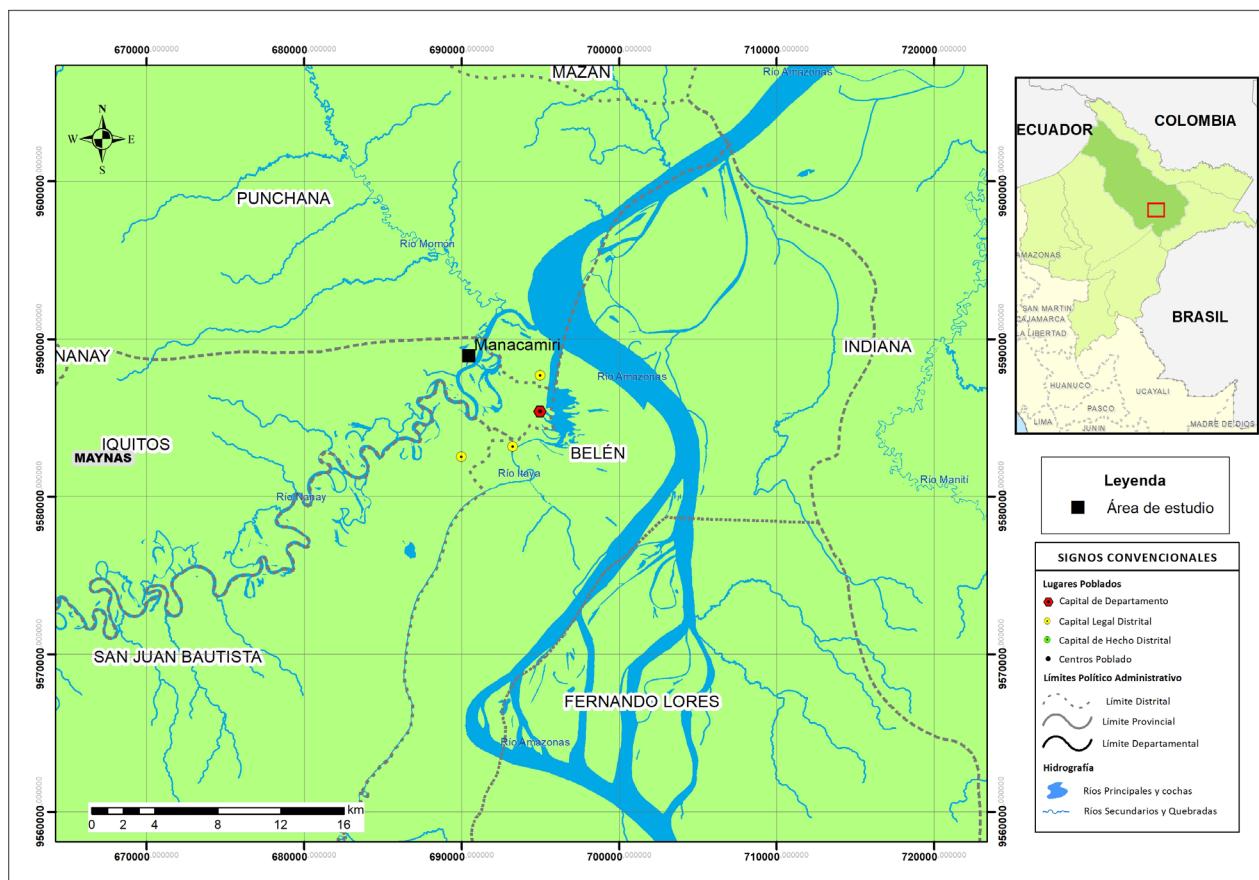


Figura 1. Mapa de ubicación de la localidad de Manacamiri (Loreto, Perú), donde se colectaron las muestras botánicas.

Identificación de especies botánicas

Las exicatas de las muestras botánicas colectadas fueron depositadas e identificadas en el Herbario Amazonense de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana. Para la identificación se emplearon publicaciones científicas (Vásquez, 1997 y Ribeiro *et al.*, 1999) y validaron con las exicatas existentes en el Herbario.

Obtención de los extractos etanólicos

Las hojas, cortezas y raíces fueron seleccionadas, cortadas en trozos pequeños y secadas a temperatura ambiente (21°C – 25°C). Posteriormente, se realizó la molienda de cada muestra vegetal. Se pesó 40 g de cada una de las muestras vegetales; se maceraron con etanol destilado en un envase de vidrio durante 48 h, posteriormente el macerado fue filtrado. Los extractos etanólicos se concentraron en un rotavapor a 60°C y a una presión de 690 mm de Hg. La extracción se realizó hasta agotamiento, los productos obtenidos se colocaron en placas de Petri y se dejaron enfriar a temperatura

ambiente. Posteriormente se pesó y calculó el porcentaje de rendimiento de cada extracto. Se colocó en un vial, previamente rotulado, para su conservación. Para el cálculo del porcentaje de rendimiento de cada extracto se empleó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Rendimiento} = Pf / Pi \times 100$$

Donde:

Pf = peso final y Pi = peso inicial

Tamizaje fitoquímico

Los metabolitos primarios y secundarios se determinaron cualitativamente según los protocolos descritos por Kuklisnyk (2000) y Osorio (2009). Para más información ver Tabla 1.

Evaluación de la actividad antibacteriana

Se realizó según el método de difusión en disco de Bauer *et al.* (1966). Los ensayos se hicieron por triplicado frente a cinco cepas de *Staphylo-*

coccus aureus y cinco cepas de *Pseudomonas aeruginosa* que fueron previamente aisladas del equipo de cómputo del centro hospitalario mencionado líneas arriba (INS, 2002; Gamazo et al., 2005).

Para preparar la solución stock (1 mg/μl) de cada extracto vegetal, se pesó 400 mg del extracto y se disolvió en 400 μl de agua destilada estéril. Luego, 15 μl de estos extractos se impregnaron en discos estériles de papel filtro Whatman Nº 3, preparados manualmente con un perforador convencional. Estos se secaron a 37 °C protegidos de la luz por 24 h. Se empleó como control, discos de sensibilidad con tetraciclina (para *S. aureus*) y cefepima (para *P. aeruginosa*).

Ajuste y aplicación del inóculo

Se sembraron los microorganismos en Caldo Trypticasa de Soya (TS) e incubaron a 37 °C por 18 a 24 h. Luego, se repicaron en placas de agar TS e incubaron a 37 °C por 18 a 24 h, para obtener cultivos jóvenes. Después, se prepararon las suspensiones bacterianas en suero fisiológico al 0,8 %, ajustándose la turbidez al tubo 0,5 de la escala de Mc Farland (~1,5 x 10⁸ bacterias/ml). Se puso 0,1 ml de la suspensión bacteriana y dispersó en la superficie de una placa con agar Mueller Hinton. Se dejó secar la placa a temperatura ambiente por 3 a 5 min.

Aplicación de los discos

Los discos impregnados con los extractos vegetales y los discos controles se pusieron sobre la superficie del agar separados por una distancia mínima de 25 mm. Se incubaron las placas en posición invertida a 37° C por 18 a 24 h. Transcurrido dicho periodo, se registró la actividad en función a la presencia o ausencia de un halo alrededor de cada disco.

Análisis de los datos

Los datos fueron analizados midiendo el rendimiento de los extractos obtenidos de las especies vegetales estudiadas y considerando la formación de los respectivos halos sobre las cepas de *P. aeruginosa* y *S. aureus*.

RESULTADOS

El mayor porcentaje de rendimiento de los extractos se obtuvo de las hojas de las diferentes especies de *Tabernaemontana*, cuyos rangos de peso estuvieron entre los 6,08 g a 8,23 g. En *T. macrocalyx* se obtuvo un rendimiento del 15,2 %; en *T. heterophylla* del 16,8 %; en *T. maxima* fue del 20,6 % y en *T. markgrafiana* el rendimiento fue del 20,4 % (Tabla 2).

Los extractos contenían principalmente alcaloides; aminas y aminoácidos en *T. macrocalyx* (corteza y raíz), y *T. markgrafiana* (corteza); flavonas en *T. heterophylla* (corteza); leucoantocianinas en *T. macrocalyx* (corteza); y triterpenos en *T. macrocalyx* (raíz), *T. markgrafiana* (corteza). En mediana concentración estuvieron presentes los glúcidos, triterpenos y esteroles, pero las cumarinas y taninos estuvieron en bajas concentraciones. En ninguno de los extractos se detectaron flavonoles, flavononas, catéquicos y antraquinonas (Tabla 3).

En cuanto a los efectos antagónicos de los extractos vegetales se evidencia que *T. maxima* presentó la mayor cantidad de extractos con halos inhibitorios. Así, los extractos de hojas de esta especie produjeron halos de inhibición (diámetro (\emptyset) de 8,0 a 14,3 mm) en las cinco cepas de la bacteria. También, los extractos de corteza presentaron halos inhibitorios (\emptyset de 9,0 a 11,0 mm) en cuatro cepas. Finalmente, los extractos de hojas sólo inhibieron a una cepa bacteriana (Tabla 3). Respecto a los extractos etanólicos de *T. macrocalyx*, solo los extractos de la corteza inhibieron (\emptyset de los halos de inhibición de 7,0 a 8,0 mm.) a las cinco cepas de *P. aeruginosa*. Asimismo, de los extractos obtenidos de *T. markgrafiana*, sólo el extracto de la raíz generó halos inhibitorios (\emptyset de 8,3 a 9,7 mm) contra tres cepas bacterianas (Tabla 3).

También, se observó que los extractos de hojas, corteza y raíz de *T. maxima* y *T. markgrafiana* generaron halos inhibitorios (\emptyset de 17,7 a 25,3 mm y \emptyset de 15,0 a 27,3 mm, respectivamente; Figura 2) contra las cinco cepas de *S. aureus* (Tabla 4). Por otro lado, los extractos de corteza

Tabla 1. Metodología para la determinación de los metabolitos primarios y secundarios de especies vegetales de acuerdo al procedimiento de Kuklinsky (2000) y Osorio (2009).

Tipos de compuestos	Grupo Fitoquímico	Reactivos	Procedimiento	Resultados	
Compuestos de metabolismo primario	Glúcidos	Alfa naftol al 10 %, H ₂ SO ₄	0,5 mL de extracto acuoso se le añade 2 gotas de una solución al 10 % de α-naftol en etanol y 0,5 mL de H ₂ SO ₄ c, resbalando por las paredes.	(+) la formación de un anillo de color violeta en la interfase	
	Grasas y mucílagos	Etanol al 96 %	Se adiciona un exceso de alcohol a 96 % a 0,5 mL de extracto acuoso.	La formación de un precipitado floculento confirma su presencia.	
	Lípidos y ceras	(Sudán III)	1 mL del extracto hexánico se evapora hasta sequedad en presencia de la disolución de sudán III	(+) La aparición de gotas oleosas de color rojo oscuro.	
	Aminas y aminoácidos	Ninhidrina, Etanol.	A 1mL de extracto etanólico se le adiciona 1 mL de ninhidrina al 5 % en etanol, se calienta de 5 a 10 minutos en baño maría.	La aparición de un color azul violeta indica la presencia de aminas.	
Compuestos fenólicos	Cumarinas	Volátiles	KOH	Se calienta 1 mL de la solución etanólica en baño maría, cubriendo con un trozo de papel filtro previamente impregnado con una solución de KOH diluida	
		Fijas	KOH	Se siembra dos puntos en un papel filtro del extracto etanólico, a uno de ellos se lo agrega KOH diluido	(+) La fluorescencia azulada del papel filtro a la luz UV de punto que contiene la muestra.
	Flavonoides	Flavonas	HCL (c) y Cinta de Mg		(+) Color anaranjado
		Flavononas	HCL (c) y Cinta de Mg	A 1 mL de extracto etanólico se le adiciona II ó III gotas de HCl (c) y un fragmento de cinta de Mg.	(+) Color rojo
		Flavanoles	HCL (c) y Cinta de Mg		(+) Color rojo azulado
		F y Xantonas	HCL (c) y Cinta de Mg		(+) Color violeta
	Antocianinas			A 1mL del extracto acuoso, se adiciona 2 mL de HCl al 37 %, se calienta en baño maría durante 30 minutos, se enfriá y se le añade alcohol isoamílico, agitando vigorosamente.	La aparición de un color rojo en la fase alcohólica confirma la existencia de antocianinas.
				Se calienta 1 mL de extracto etanólico en presencia de HCl (c)	(+) La aparición de un color rojo o naranja
	Pirogálicos			1 mL de extracto etanólico se le añade unas gotas de HCl (c) y 1 mL de formaldehido, hervir durante varios minutos.	(+) La presencia de un precipitado
				La solución se filtra y se añade FeCl ₃ al 1 %	(+) La formación de un color azul
	Taninos			1 mL de extracto clorofórmico se le añade 1 mL de NaOH 1N agitar para que se mezcle.	(+) si la fase acuosa se torna de color rojizo

Tipos de compuestos	Grupo Fitoquímico	Reactivos	Procedimiento	Resultados
Terpenos y esteroídes	Triterpenos	Anhídrido H ₂ SO ₄ (c)	acético,	A 1mL de extracto acuoso, se añade 1 mL de anhídrido acético y 0,5 mL de H ₂ SO ₄ (c), dejándolo caer por la pared del tubo. A 1 mL de extracto acuoso, se añade 1 mL de anhídrido acético y 0,5 mL de H ₂ SO ₄ (c), dejándolo caer por la pared del tubo.
	Esteroles	Anhídrido H ₂ SO ₄ (c)	acético,	(+) La formación de una coloración verdosa en la fase superior.
	Saponinas	Agua caliente		Preparar una sol. al 10 % de extracto en agua hirviendo, agitar por 1 minuto cuando esta fría (+) La persistencia de 1cm de espuma después de 30 min.
Alcaloides	Bouchardat	KI, yodo metálico		(+) Precipitado rojo ladrillo
	Mayer	MgCl ₂ , KI		(+) Precipitado blanco amarillento
	Hager	Ácido pícrico al 1 %		(+) Precipitado amarillo limón
	Dragendroff	Subnitrato de bismuto, HNO ₃ , KI		(+) Precipitado castaño rojizo

Tabla 2. Porcentaje de rendimiento de los extractos obtenidos de *Tabernaemontana*, Iquitos, Perú.

Especie	Parte de la planta	Peso del extracto (g)	% de rendimiento
<i>Tabernaemontana macrocalyx</i>	Hoja	6,0800	15,2
	Corteza	1,1813	3,0
	Raíz	1,1379	2,8
<i>Tabernaemontana heterophylla</i>	Hoja	6,7076	16,8
	Corteza	1,9708	4,9
	Raíz	1,4297	3,6
<i>Tabernaemontana maxima</i>	Hoja	8,2361	20,6
	Corteza	5,0726	12,7
	Raíz	3,2928	8,2
<i>Tabernaemontana markgrafiana</i>	Hoja	8,1566	20,4
	Corteza	5,4331	13,6
	Raíz	3,6493	9,1

y raíz de *T. heterophylla* generaron halos inhibitorios con rangos de diámetro de entre 15,7 a 25,3 mm. Finalmente, de los extractos de *T. macrocalyx*, solo los extractos de raíz fueron inhibitorios con Ø de los halos de inhibición de 12,0 a 19,7 mm (Tabla 4).

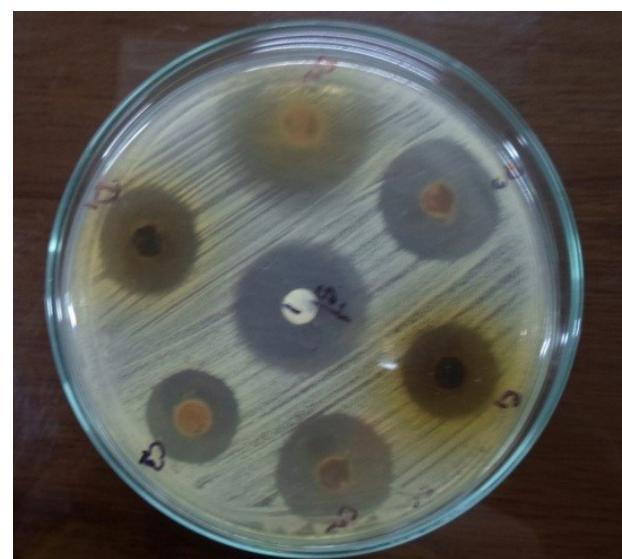
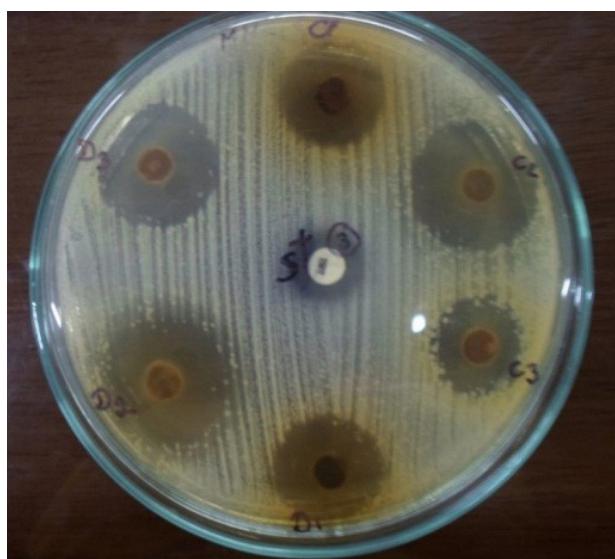


Figura 2. Actividad de los extractos de hojas, corteza y raíz de *Tabernaemontana maxima* y *Tabernaemontana markgrafiana* frente a las cepas 1 y 3 de *Staphylococcus aureus*.

Tabla 3. Resultados del tamizaje fitoquímico de las especies de *Tabernaemontana* en estudio. Contenido: (+) Poco; (++) Medio; (+++) Abundante y (-) Negativo.

Tipo de compuestos	<i>Tabernaemontana macrocalyx</i>			<i>Tabernaemontana heterophylla</i>			<i>Tabernaemontana maxima</i>			<i>Tabernaemontana markgrafiana</i>		
	Hoja	Cort.	Raíz	Hoja	Cort.	Raíz	Hoja	Cort.	Raíz	Hoja	Cort.	Raíz
	-	+	++	++	+	++	++	++	++	+	+	++
Compuestos de metabolismo primario	Glúcidos	-	+	++	++	+	++	++	++	+	+	++
	Grasas y Mucílagos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	Lípidos y Ceras	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	Aminas y Aminoácidos	+	+++	+++	-	+	++	+	++	+	-	+++
Compuestos fenólicos	Cumarinas	Volátiles	++	+	++	+	-	-	-	-	+	+
		Fijas	-	-	-	-	-	++	++	+	-	+
	Flavonoides	Flavonas	-	+	+	-	+++	-	-	++	-	+
		Flavonoles	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Flavononas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Antocianinas	Antocianinas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Leucoantocianinas	-	+++	-	-	-	+	-	-	-	-
		Taninos	++	++	-	+	-	++	-	-	-	-
	Antraquinonas	Pirogálicos	++	++	-	+	-	++	-	-	-	-
		Catéquicos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Terpenos y esteroides	Antraquinonas			-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Triterpenos			-	+	+++	++	++	++	++	++	+++
	Esteroles			-	-	-	++	-	++	-	++	-
	Saponinas			++	-	-	-	++	-	-	+	-
Alcaloides	Dragendorff			+	++	+++	+	++	+++	++	+++	++

Tabla 4. Diámetros de los halos de inhibición del crecimiento (mm) de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* por actividad de los extractos vegetales de *Tabernaemontana*, Iquitos, Perú.

Muestra (extracto, antibiótico)	Pseudomonas aeruginosa										
	Cepa 1		Cepa 2		Cepa 3		Cepa 4		Cepa 5		
	N	Media + D. Est.	N	Media + D. Est.	N	Media + D. Est.	N	Media + D. Est.	N	Media + D. Est.	
<i>Tabernaemontana macrocalyx</i>	Hojas	3	0,0 + 0,0	3	0,0 + 0,0	3	0,0 + 0,0	3	0,0 + 0,0	3	0,0 + 0,0
	Corteza	3	8,0 + 1,0	3	7 + 0,0	3	7,7 + 1,2	3	7,0 + 0,0	3	7,0 + 0,0
	Raíz	3	0,0 + 0,0	3	0,0 + 0,0	3	0,0 + 0,0	3	0,0 + 0,0	3	0,0 + 0,0
<i>Tabernaemontana heterophylla</i>	Hojas	3	0,0 + 0,0	3	0,0 + 0,0	3	0,0 + 0,0	3	0,0 + 0,0	3	0,0 + 0,0
	Corteza	3	9,0 + 0,0	3	0,0 + 0,0	3	0,0 + 0,0	3	0,0 + 0,0	3	0,0 + 0,0
	Raíz	3	0,0 + 0,0	3	0,0 + 0,0	3	0,0 + 0,0	3	0,0 + 0,0	3	0,0 + 0,0
<i>Tabernaemontana maxima</i>	Hojas	3	14,3 + 0,6	3	10,3 + 1,2	3	8,0 + 1,0	3	8,0 + 1,7	3	7,0 + 0,0
	Corteza	3	11,0 + 1,0	3	9,3 + 0,6	3	9,0 + 0,0	3	9,7 + 1,2	3	0,0 + 0,0
	Raíz	3	9,0 + 0,0	3	0,0 + 0,0	3	0,0 + 0,0	3	8,3 + 1,2	3	0,0 + 0,0
<i>Tabernaemontana markgrafiana</i>	Hojas	3	0,0 + 0,0	3	0,0 + 0,0	3	0,0 + 0,0	3	0,0 + 0,0	3	0,0 + 0,0
	Corteza	3	0,0 + 0,0	3	0,0 + 0,0	3	0,0 + 0,0	3	0,0 + 0,0	3	0,0 + 0,0
	Raíz	3	9,7 + 0,6	3	0,0 + 0,0	3	9,5 + 0,5	3	8,3 + 0,6	3	0,0 + 0,0
Cefepime	Antibiótico	3	33,7 + 1,5	3	32,3 + 1,5	3	33,7 + 1,5	3	28,7 + 2,5	3	32,3 + 0,6

Tabla 5. Diámetros de los halos de inhibición del crecimiento (mm) de las cepas de *Staphylococcus aureus* por actividad de los extractos vegetales de *Tabernaemontana*, Iquitos, Perú.

Muestra (extracto, antibiótico)	Staphylococcus aureus										
	Cepa 1		Cepa 2		Cepa 3		Cepa 4		Cepa 5		
	N	Media + D. Est.	N	Media + D. Est.	N	Media + D. Est.	N	Media + D. Est.	N	Media + D. Est.	
<i>Tabernaemontana macrocalyx</i>	Hojas	3	0,0 + 0,0	3	9,0 + 0,0	3	0,0 + 0,0	3	9,3 + 2,1	3	0,0 + 0,0
	Corteza	3	7,0 + 0,0	3	10,3 + 1,5	3	0,0 + 0,0	3	11,3 + 1,2	3	0,0 + 0,0
	Raíz	3	12,0 + 1,0	3	13,3 + 2,9	3	13,3 + 2,9	3	19,7 + 0,6	3	12,7 + 2,1
<i>Tabernaemontana heterophylla</i>	Hojas	3	0,0 + 0,0	3	0,0 + 0,0	3	0,0 + 0,0	3	0,0 + 0,0	3	0,0 + 0,0
	Corteza	3	16,7 + 0,6	3	16,3 + 3,1	3	15,7 + 0,6	3	22,3 + 0,6	3	17,3 + 1,5
	Raíz	3	19,3 + 1,2	3	19,0 + 2,6	3	19,3 + 0,6	3	24,7 + 0,6	3	21,3 + 1,2
<i>Tabernaemontana maxima</i>	Hojas	3	14,7 + 4,0	3	21,7 + 0,6	3	14,7 + 5,0	3	17,3 + 0,6	3	15,7 + 0,6
	Corteza	3	22,0 + 2,3	3	25,3 + 0,6	3	23,3 + 4,2	3	23,0 + 0,0	3	23,0 + 1,7
	Raíz	3	15,7 + 0,6	3	17,7 + 2,5	3	21,7 + 0,6	3	18,0 + 1,0	3	17,0 + 0,0
<i>Tabernaemontana markgrafiana</i>	Hojas	3	15,0 + 2,0	3	17,3 + 1,2	3	19,3 + 1,5	3	18,3 + 1,5	3	17,0 + 1,0
	Corteza	3	23,3 + 3,1	3	26,7 + 2,5	3	19,7 + 1,2	3	25,0 + 7,2	3	27,3 + 2,1
	Raíz	3	19,0 + 2,6	3	23,3 + 0,6	3	24,7 + 1,2	3	20,7 + 2,3	3	21,3 + 2,1
Tetraciclina	Antibiótico	3	23,3 + 0,6	3	27,0 + 1,7	3	11,7 + 0,6	3	27,7 + 1,5	3	25,0 + 1,0

Tabla 6. Porcentaje de actividad de los extractos de *Tabernaemontana* frente a las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, Iquitos, Perú.

Especie	Parte de la Planta	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>		
		Nº cepas evaluadas	Nº de cepas con halo de inhibición	% de cepas con halo de inhibición	Nº cepas evaluadas	Nº de cepas con halo de inhibición	% de cepas con halo de inhibición
<i>Tabernaemontana macrocalyx</i>	Hojas	5	0	0,0	5	2	40,0
	Corteza	5	5	100,0	5	3	60,0
	Raíz	5	0	0,0	5	5	100,0
<i>Tabernaemontana heterophylla</i>	Hojas	5	0	0,0	5	0	0,0
	Corteza	5	1	20,0	5	5	100,0
	Raíz	5	0	0,0	5	5	100,0
<i>Tabernaemontana maxima</i>	Hojas	5	5	100,0	5	5	100,0
	Corteza	5	4	80,0	5	5	100,0
	Raíz	5	2	40,0	5	5	100,0
<i>Tabernaemontana markgrafiana</i>	Hojas	5	0	0,0	5	5	100,0
	Corteza	5	0	0,0	5	5	100,0
	Raíz	5	3	60,0	5	5	100,0

DISCUSIÓN

Se evaluó los efectos antagónicos de los extractos etanólicos obtenidos de las hojas, corteza y raíz de cuatro especies del género *Tabernaemontana* (*T. macrocalyx*, *T. heterophylla*, *T. máxima* y *T. markgrafiana*) frente a aislados intrahospitalarios de *P. aeruginosa* y *S. aureus*.

El tamizaje fitoquímico mostró que las especies del género *Tabernaemontana* analizadas en este estudio son ricas en alcaloides (Tabla 3). Según Pratchayasakul *et al.* (2008) los alcaloides indólicos (laconofilina, la coronaridina, la difforleminina, tabernulosine, vincadifina, tabernaemontanina, voacangina y 11-methoxy-N-metil dihidropericlidivina) predominan en las especies de este género. También, Pallant (2010) y Nielsen *et al.* (1994) concuerdan que los alcaloides indólicos son los principales componentes de los extractos de la raíz de *T. elegans* y *T. markgrafiana*. Además, en este estudio se ha demostrado la presencia de carbohidratos en la mayoría de los extractos (Tabla 3), coincidiendo con lo reportado por Duru y Mbata (2010) para la especie *T. pachysiphon*. Se observó también la presencia de metabolitos como cumarinas, flavonas, taninos pirogálicos, triperpenos, esteroles y saponinas, aunque en menores cantidades.

dades; estos resultados coinciden con los reportados por López y Tulumba (2011) para las especies *T. macrocalyx* y *T. heterophylla*. Finalmente, Ruttoh *et al.* (2009) indican que los diversos alcaloides, flavonoides, cumarinas, taninos y saponinas de *T. stapfiana* son las posibles sustancias antimicrobianas.

Los resultados también nos indican que aparentemente los extractos vegetales empleados fueron más activos frente a las cepas de *S. aureus* que frente a las cepas de *P. aeruginosa* (Tabla 5), especialmente aquellos que fueron obtenidos de las hojas, cortezas y raíces de *T. maxima* y *T. markgrafiana*, ya que estos mostraron 100% de actividad frente a todas las cepas de *S. aureus*. Tomando en consideración que las cepas bacterianas utilizadas en este estudio, al ser procedentes de un centro hospitalario, muchas de ellas podrían ser multidrogoresistentes, por lo que se podría pensar que los extractos de estas dos especies vegetales constituirían sustitutos a los antibióticos, especialmente cuando los antibióticos sean ineficaces en el tratamiento de infecciones estafilocócicas. Al respecto, estos resultados tienen similitud con lo registrado por Ruttoh *et al.* (2009), quienes muestran que los extractos metanólicos del tallo y la

corteza de la raíz de *T. stapfiana* inhiben a una cepa multidrogorresistente de *S. aureus*.

Con respecto a la actividad de los extractos vegetales de *Tabernaemontana* frente a las cepas de *P. aeruginosa*, se puede afirmar que solo los extractos de corteza de *T. macrocalyx* y hojas de *T. maxima* fueron activos frente a la totalidad de cepas de esta especie bacteriana. Por otro lado, cabe mencionar que *T. heterophylla* casi no mostró actividad contra ninguna de las cepas bacterianas estudiadas de *P. aeruginosa*, ya que los extractos de sus hojas, y raíz fueron ineficaces contra dichas bacterias, solo el extracto de corteza mostró actividad sobre una sola cepa de esta bacteria (Tabla 5).

Diversos investigadores como Murphy (1999), Mendoza *et al.* (1997), han responsabilizado a diversos metabolitos (aminas y aminoácidos, triterpenos, cumarinas fijas, alcaloides, etc.), como los poseedores de actividad antimicrobiana. Con el propósito de determinar la presencia de algún metabolito de los extractos vegetales al que se podría atribuir la actividad antibacteriana de *T. maxima* y *T. markgrafiana*, se realizó un análisis exhaustivo a los resultados del tamizaje fitoquímico de los extractos etanólicos de dichas especies (Tabla 3), se aprecia que *T. maxima*, a nivel de sus hojas, corteza y raíz, posee cumarinas fijas; del mismo modo, *T. markgrafiana*, a nivel de sus hojas, posee saponinas, mientras que a nivel de su corteza y raíz, posee aminas y aminoácidos, metabolitos que estuvieron ausentes en las hojas de *T. heterophylla*. Esto podría explicar el fenómeno por el cual los extractos de *T. maxima* y *T. markgrafiana* poseían actividad frente a todas las cepas de *S. aureus* y gran parte de *T. maxima* sobre algunas cepas de *P. aeruginosa*, situación que no sucedía con *T. heterophylla*, la cual, tal como se mencionó anteriormente el extracto de sus hojas no poseía actividad frente a las especies bacterianas estudiadas.

A modo de recomendación, mencionamos lo siguiente: 1) Se sugiere realizar mayores estudios en los que se considere determinar la concentración mínima inhibitoria y concentración

mínima bactericida de estos extractos a fin de conocer a mayor detalle su eficacia. 2) Realizar la prueba de actividad antibacteriana frente a otras especies de importancia clínica. 3) Continuar la investigación de las especies de género *Tabernaemontana* y la familia Apocynaceae, con la finalidad de incrementar el conocimiento sobre su actividad antimicrobiana y 4) Determinar la composición química de las sustancias naturales de las especies vegetales de *Tabernaemontana* a fin de precisar a los metabolitos responsables del efecto antibacteriano.

CONCLUSIÓN

Los extractos etanólicos obtenidos de las hojas, cortezas y raíces de las cuatro especies de *Tabernaemontana* mostraron diferencias marcadas en cuanto a su rendimiento, contenido de metabolitos secundarios y efecto antagonista frente a cepas de *P. aeruginosa* y *S. aureus*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ali-Shayeh, M., Yaghmour, R., Faidi, Y., Salem, K., Al-Nuri, M. (1998) Antimicrobial Activity of 20 Plants used in Folkloric Medicine in the Palestinian Area. *Journal of Ethnopharmacology*. 60: 265-271.
- Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C., Turck, M. (1966) Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. *American Journal of Clinical Pathology* 45(4):493-496.
- De Los Ríos, C., Hidalgo, D., Quintero, M., Márquez, G., Crescente, O. (1999) Estudio preliminar in vitro de la actividad biológica de Chromolaenavoglii (Robinson) H. Huber. *Revista de la Facultad de Farmacia*. 36:22-5.
- Duru, C., Mbata, T. (2010) The antimicrobial activities and phytochemical screening of ethanolic leaf extracts of Hedranthera barteri Hook and *Tabernaemontana pachysiphon* Stapf. *Journal of Developmental Biology and Tissue Engineering* 2: 1-4

- Gamazo, C., Lopez-Goñi, I., Díaz, R. (2005) *Manual práctico de microbiología*. Editorial Manson. 3º Edición. España. 230 p.
- Instituto Nacional de Salud (2002) *Manual de Procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión*. Serie de Normas Técnicas Nº 30 Perú. 3: 13-19.
- Jacoby, G., Archere, G. (1991) New mechanism of bacterial resistance to antimicrobial agents. *The New England Journal of Medicine*, 324: 601-612.
- Kuklinsky, C. (2000) "Farmacognosia". Ediciones Omega S.A. Barcelona-España.
- Lopez, J., Tulumba, P. (2011) *Evaluación de la Actividad Antimalárica in Vitro de 50 Extractos de Especies Vegetales de la Amazonía Peruana por Citometría de Flujo-LIP-NAA-2011*. (Tesis de Pre-grado). Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana.
- Mendoza, L., Wilkens, M., Urzua, A. (1997) Antimicrobial study of the resinous exudates and of diterpenoids and flavonoids isolated from some Chilean *Pseudognaphalium* (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 58:85–88.
- Murphy, M. (1999) Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 12: 564.
- Nielsen, H., Hazell, A., Hazell, R., Ghia, F., Torssei, K. (1994) Indole alkaloids and terpenoids from *Tabernaemontana markgrafiana*. *Phytochemistry*, 37; 1729 – 1735
- Osorio, E. (2009) *Aspectos básicos de Farmacognosia*. Universidad de Antioquia. Facultad de Química Farmacéutica. 83: 41-62.
- Pallant, C. (2010) Bioactivity of the alkaloidal fraction of *Tabernaemontana elegans* (Stapf.). A dissertation submitted in fulfillment of the requirements for the degree Magister Scientiae in Pharmacology. University of Pretoria. 112 p.
- Palomino, M., Uribe, C. (2007) *Determinación de la Actividad Antimicrobiana In Vitro de los Extractos Etanólico e Hidroalcohólico de las semillas de Carica papaya L.* Universidad Nacional "San Luis Gonzaga" de Ica, Facultad De Farmacia Y Bioquímica. Ica-Perú.
- Pratchayasakul, W., Pongchaidecha, A., Chattipakorn, N., Chattipakorn, S. (2008) Ethnobotany & Ethnopharmacology of *Tabernaemontana divaricata*. *Indian Journal of Medical Research*. 127: 317-335
- Reynel, C., Pennington, R., Pennington, T., Flores, C., Daza, A. (2003) *Árboles útiles de la Amazonía Peruana*.
- Ribeiro, J., Hopkins, M., Vicentini, A., Sothers, C., Costa, M., Brito, J., et al. (1999) Flora da Reserva Ducke. *Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central*. Midas Printing. INPA. Manaus-Brasil. 799 págs
- Ruttoh, E., Tarus, P., Bii, C., Machocho, A., Karimie, L., Okemo, P. (2009) Antibacterial Activity of *Tabernaemontana stapfiana* Britten (Apocynaceae) Extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 6: 186–194.
- Sanabria, A., Mendoza, A., Moreno, A. (1998) Actividad microbiana in vitro de angiospermas colombianas. *Revista Colombiana de Ciencias Químico - Farmacéuticas* 27: 47-51.
- Sangama, D., Espinoza, G. (2009) "Evaluación de la actividad biológica in vitro de extractos y fracciones de nueve especies vegetales de la Amazonía Peruana sobre formas parasitarias de *Plasmodium*, *Leishmania* y *Trypanosoma*". (Tesis de Pre-grado). Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana.
- Vásquez, R. (1997) *Flórula de las Reservas Biológicas de Iquitos, Perú*. Missouri Botanical Garden Press. St. Louis-USA. 1046 págs.
- WHO. (1996) "Traditional Medicine" Fact Sheet Nº 134, September 1996
- WHO. (1991) WHO Policy System Eighty-Seventh Session EB87.R24 Traditional Medicine and Modern Health Care. Geneva. January 14-25.

Conflictos de Interés

Los autores declaramos no tener ningún conflicto de interés.

