

## Extracto alcoholico de hojas de *Caesalpinia paraguariensis* (D. Parodi) Burk. como fuente de principios antimicrobianos contra bacterias patógenas humanas y fitopatógenas

Alcoholic extract from leaves of *Caesalpinia paraguariensis* (D. Parodi) Burk. as source of antimicrobial constituents against human pathogenic and phytopathogenic bacteria

Corzo, A. G.<sup>1</sup>; M. A. Sgariglia<sup>2</sup>; M. A. Vattuone<sup>2</sup>; V. Chifarelli<sup>1</sup>; C. A. Zurita<sup>1</sup> y F. P. Coronel<sup>1</sup>

### RESUMEN

Se evaluó la actividad antibacteriana del extracto alcohólico de hojas de *Caesalpinia paraguariensis* (D. Parodi) Burk., preparado de acuerdo con las indicaciones de la Farmacopea Argentina, VI Ed. Se ensayaron las siguientes cepas bacterianas: Gram (+): *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* F208; Gram (-): *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*, y una cepa fitopatógena: *Pseudomonas corrugata*. La actividad antibacteriana se determinó por el método de macrodilución en medio sólido. La concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima (CBM) se determinaron por el método de microdilución en medio líquido y posterior cultivo en medio sólido, respectivamente. Los valores de CIM y de CBM están expresados en µg de material extraído (ME)/mL de medio de cultivo.

La tintura analizada presentó actividad inhibitoria del crecimiento frente a todas las cepas ensayadas. Los valores de concentración inhibitoria mínima (CIM) encontrados son: 1.707 µg/mL para *S. aureus*; 854 µg/mL para *E. coli* y 427 µg/mL para *E. faecalis*. Para las restantes cepas el efecto inhibidor del crecimiento es tan fuerte, que los valores de CIM para ellas están por debajo de los 854 µg/mL, la concentración más baja ensayada.

El extracto presentó actividad bactericida frente a *E. coli* y *Staphylococcus aureus*. Los valores de CBM encontrados fueron: 6.830 µg/mL para *S. Aureus* y 1.707 µg/mL para *E. coli*. Estos resultados alientan a continuar con estudios destinados a aislar e identificar los principios activos responsables de la actividad antibacteriana encontrada.

**Palabras clave:** *Caesalpinia paraguariensis* (D. Parodi) Burk.; Guayacán; Concentración inhibitoria y bactericida mínima.

### ABSTRACT

The antibacterial activity of the alcoholic extract of leaves of *Caesalpinia paraguariensis* (D. Parodi) Burk. was evaluated once prepared in accordance with the recommendations of the Farmacopea Argentina VI<sup>o</sup> Ed. The following bacterial strains were tested: *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* for the GRAM (+); *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* for the Gram (-); and the phytopathogenic strain *Pseudomonas corrugate*. The antibacterial activity was determined using the macrodilution in solid medium method. The minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericide concentration (MBC) were determined by the micro dilution in liquid medium method and subsequent culture in solid medium, respectively. The MIC and MBC values are given in µg of material extracted/mL of culture.

The tincture showed growth inhibitory activity against all the strain tested. The values for the minimum inhibitory concentration (MIC) found were: 1707 µg/mL for *Staphylococcus aureus*; 854 µg/mL for *Escherichia coli* and 427 µg/mL for *Enterococcus faecalis*. For the remaining strains the growth inhibitory effect is so strong that the value for their MIC are below 854 µg/ml, the lowest concentration tested.

The extract presented antibacterial activity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The values found for MBC were: 6830 µg/mL for *Staphylococcus aureus* and 1707 µg/mL for *Escherichia coli*. These results encourage further studies aimed at isolating and identifying the active constituents responsible for the antibacterial activity found.

**Keywords:** *Caesalpinia paraguariensis* (D. Parodi) Burk.; Guayacán; minimum inhibitory and bactericide concentration.

<sup>1</sup> Laboratorio de Química de la Madera y Productos Forestales, Instituto de Tecnología de la Madera, Facultad de Ciencias Forestales, Universidad Nacional de Santiago del Estero. Av. Belgrano (s) 1912. 4200 Santiago del Estero, Argentina. E-mail: acorzo@unse.edu.ar

<sup>2</sup> Cátedra de Fitoquímica, Instituto de Estudios Vegetales "Dr. Antonio R. Sampietro", Facultad de Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán. Ayacucho 471. 4000 San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina. E-mail: mvattuone@fbqf.unt.edu.ar

## 1. INTRODUCCION

La región del Chaco semiárido de nuestro país, a la cual pertenece la provincia de Santiago del Estero, cuenta con numerosas especies arbóreas cuyo aprovechamiento forestal se limita en la actualidad a la explotación de su madera, para la cual se utiliza solamente un 30% del árbol en pie y el resto se desperdicia al ser abandonado en el monte. Simultáneamente encontramos otras que, al no ser maderables, sólo sirven de alimento al ganado autóctono o se usan como fuente de energía en forma de carbón, desperdiciando en ambos casos un enorme volumen y variedad de productos cuya explotación comercial sería potencialmente rentable. Estos productos son los que surgen de los numerosos usos alternativos de los bosques, entre los cuales cabe destacar el aprovechamiento de numerosas especies usadas popularmente con fines medicinales

Varios estudios se realizaron en nuestro país, referidos a diversos aspectos relacionados con las plantas medicinales, a saber: conservación, cultivo y cosecha (Sorlino *et al.*, 1997); catálogos de usos y caracteres etnobotánicos (Roic *et al.*, 1997); estudios de laboratorio con el objeto de verificar sus propiedades medicinales y de identificar los principios activos responsables de las mismas.

Con respecto al último aspecto mencionado, cabe destacar el trabajo de verificación de la actividad antibacteriana, así como la actividad antiviral, de trece especies vegetales de la provincia de Córdoba. Como resultado del mismo se detectó que algunas de ellas presentaron considerable actividad antibacteriana (Demo *et al.*, 1997), otras, una aceptable actividad antiviral y algunas, incluso, actuaron sobre ambos tipos de microorganismos (Zanón *et al.*, 1997). También en la Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia de la Universidad Nacional de Tucumán se estudió la actividad antimicrobiana de varias especies medicinales de nuestro país con resultados alentadores (Amani *et al.*, 1998); (Arias *et al.*, 2004); (Ordóñez *et al.*, 2003); (Quiroga *et al.*, 2004).

En la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Catamarca, se lograron identificar y aislar los flavonoides, metabolitos secundarios considerados importantes marcadores quimiotaxonómicos, de *Aloysia gratissima* var. *gratissima* (Saadi *et al.*, 1997).

En la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Buenos Aires se estudió la capacidad de depuración de radicales hidroxilo y peroxilo (responsables de la peroxidación de los lípidos que causa serios daños a las membranas celulares) de la “Sangre de Drago”, una goma viscosa de color rojo obtenida de la corteza de *Croton lechleri* Muell.-Arg (Euphorbiaceae) sobre homogeneizados de hígado de rata. Por medio de los ensayos realizados se determinó que la actividad antioxidante del liofilizado de esta sustancia depende de la dosis usada (Desmarchelier *et al.*, 1999).

También se estudió la actividad sobre el virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV 1) de los extractos de cuatro plantas argentinas: *Gamochaeta simplicaulis* Cabr.1, *Achyrocline flaccida* Wein.D.C.2, *Eupatorium buniifolium* H.et A.3, y *Phyllanthus sellowianus* Muell. Arg. Los resultados obtenidos indicaron que los extractos de *A. flaccida* y de *P. sellowianus* son suficientemente atractivos como para ser usados en combinación con las quimioterapias tradicionales (Oksana *et al.*, 1999).

Estudios realizados en la provincia de Santiago del Estero determinaron que existen 83 especies pertenecientes a la flora local que son utilizadas en medicina popular, habiéndose especificado, además, las afecciones tratadas con las mismas y las formas o preparados empleados en cada caso (Roic *et al.*, 1997).

Entre tales especies se encuentra el “guayacán”, *Caesalpinia paraguariensis* (D. Parodi) Burk. cuya área de dispersión corresponde al Distrito Chaqueño Occidental, en las partes más húmedas, en la Provincia de las Yungas, y también en la Provincia del Monte. Su copa es extendida y globosa y su porte se modifica según el lugar del hábitat. En algunos casos puede

alcanzar hasta 18 m de altura. Sus hojas son de tipo compuestas bipinadas y su follaje es tenue, de color verde y ferrugíneo en el momento de la brotación (Giménez y Moglia, 2003). Se usa la decocción de sus frutos molidos (adicionados, ocasionalmente, de hojas o corteza) para la tos y el resfrío. Con el mismo fin se emplea la decocción de las semillas molidas. La decocción de hojas y corteza se usa para tratar el reumatismo, en forma de baños. La infusión de sus frutos se usa para calmar dolores estomacales (Roic *et al.*, 1997). Sin especificar la parte empleada, ni la forma de preparación, se emplea también para disipar coágulos de sangre producidos por golpes, como abortivo, etc. (Martínez Croveto, 1981). También se hace referencia al uso medicinal de la corteza y frutos de esta especie (Toursarkissian, 1980).

Cabe mencionar que uno de los problemas que se presentan con frecuencia en los centros hospitalarios es la aparición de procesos infecciosos causados por microorganismos de diversos géneros, particularmente *Staphylococcus* y *Enterococcus*, y la dificultad para tratar dichas afecciones debido al desarrollo de resistencia por parte de los mismos frente a los antibióticos usados convencionalmente. Con respecto a ello, Sgariglia *et al.* (2006) determinó que los extractos acuoso y alcohólico, preparados con ritidoma (corteza) de Guayacán, presentan una potente actividad antibacteriana frente a cepas estandar y cepas aisladas de afecciones de piel humana, resistentes a antibióticos sintéticos, particularmente amoxicilina y ciprofloxacina.

El objetivo del presente trabajo fue investigar la actividad antibacteriana del extracto alcohólico de las hojas de *Caesalpinia paraguariensis*, guayacán, frente a algunas cepas Gram (+), otras Gram (-) y una cepa fitopatógena, así como determinar las concentraciones de extracto que inhiben el desarrollo (CIM) y aquellas que producen la muerte (CBM) de dichos microorganismos, a fin de evaluar si el extracto estudiado podría emplearse como fuente de principios biológicamente activos, útiles en el tratamiento de las afecciones causadas por las cepas bacterianas empleadas en el presente trabajo.

## 2. MATERIALES Y METODOS

### 2.1. Material Vegetal

Las muestras de hojas de *Caesalpinia paraguariensis* se obtuvieron del Jardín Botánico de la Facultad de Ciencias Forestales, ubicado en la rivera del Río Dulce en Santiago del Estero, ciudad capital, Argentina. Las mismas se sometieron a secado en estufa de atmósfera controlada durante cinco días a una temperatura de 50°C. A continuación se pasaron a través de un molino de cuchillas y, finalmente, se tamizaron con tamiz de malla 20. El material molido así obtenido se almacenó a 5°C y al abrigo de la luz.

### 2.2. Preparación del extracto etanólico

Se procedió según lo establecido por la Farmacopea Argentina, VI<sup>a</sup> Ed.: 5 g de muestra se sometieron a extracción con 100 mL de etanol de 96° durante cinco días, al abrigo de la luz y con agitación periódica. Al cabo de esos cinco días se filtraron por papel Whatman N°1 y se maceraron por tres días más, en iguales condiciones. Finalmente se volvieron a filtrar y se ajustó el volumen a 100 mL con etanol. Este extracto se concentró en evaporador rotatorio a 40°C hasta sequedad. El rendimiento de la extracción fue de 27,31%, en base húmeda y 44,31% en base seca. El residuo sólido se redisolvió con la menor cantidad de alcohol de 96° necesaria para obtener una solución transparente. La concentración final del extracto fue de 54,61 mg/mL.

### 2.3. Cepas bacterianas

Se trabajó con las siguientes cepas aisladas de heridas de piel por Norma Cudmani, en el Hospital N. Avellaneda, SIPROSA, San Miguel de Tucumán, las que se conservan en el cepario del Instituto de Estudios Vegetales (IEV) “Dr. Antonio R. Sampietro”, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán, Argentina.

#### **Cepas Gram (-):**

- *Escherichia coli* (301).
- *Proteus mirabilis* (304).
- *Pseudomonas aeruginosa* (305).
- *Klebsiella pneumoniae* (310).

#### **Cepas fitopatógenas:**

- *Pseudomonas corrugata*.

#### **Cepas Gram (+):**

- *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213).
- *Enterococcus faecalis* (IEV208).

### 2.4. Determinación de la actividad inhibitoria del crecimiento bacteriano

Se efectuó aplicando el método de macrodilución en medio sólido (agar), de acuerdo con lo recomendado por el “National Committee for Clinical Laboratory Standards” (NCCLS, 2001).

Se trabajó con diluciones del extracto alcohólico de las hojas del guayacán, de concentraciones comprendidas entre 27.310 µg/mL y 854 µg/mL. Para ello se empleó etanol de 96°. Se mezcló 1 mL de cada una de estas diluciones con 9 mL de medio Mueller – Hinton (MH), adicionado con agar al 2 % a 40-45 °C (fundido). La mezcla así formada se agitó y colocó en tantas cajas de Petri como concentraciones a ensayar. Con esto, el rango final de concentraciones de trabajo fue desde 2.731 µg/mL de medio de cultivo hasta 85,4 µg/mL de medio de cultivo. A continuación se inoculó cada caja con 2 µL de suspensión, conteniendo  $2 \times 10^4$  ufc/mL, de cada una de las cepas bacterianas antes citadas. Se prepararon dos controles: uno de crecimiento y el otro con medio MH agar sin inocular para control de esterilidad del mismo. Las cajas fueron incubadas aeróbicamente por 18 a 24 h a 37°C.

Se tomó como valor estimado de la concentración inhibitoria mínima (CIM) a la concentración más baja del extracto, que no presentó desarrollo de crecimiento bacteriano visible a simple vista, luego de 18 a 24 h de incubación a 37°C.

Para confirmar los valores de CIM estimados por medio de este ensayo, o encontrar los correctos, se procedió a realizar la determinación que se detalla a continuación.

### 2.5. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

Se aplicó el método de microdilución en medio Mueller-Hinton caldo, utilizando policubetas de 96 pocillos (o celdillas), según lo recomendado por la NCCLS.

Basándose en los resultados obtenidos en la determinación anterior se trabajó con aquellas cepas para las cuales se logró obtener una clara aproximación del valor de la CIM. Ellas fueron: *E. coli*, *S. aureus* y *E. faecali*. Se incluyeron controles de viabilidad.

- a) Preparación de las diluciones del extracto: se procedió como en la determinación anterior pero, en este caso, se usó dimetilsulfóxido al 2 % como solvente y se trabajó con una concentración adicional del extracto en estudio: 427 µg/mL.
- b) Preparación del inóculo bacteriano: se preparó, para cada bacteria a ensayar, un tubo de ensayos conteniendo 10 mL de medio MH caldo al cual se le adicionó 1µL de solución de MgCl<sub>2</sub> (con 10 mg/mL de Mg<sup>++</sup>) y 1µL de solución de CaCl<sub>2</sub> (con 10 mg/mL de Ca<sup>++</sup>). A continuación se le agregaron 50 µL (5 x10<sup>6</sup> ufc/mL) de la suspensión bacteriana correspondiente
- c) Procedimiento: se adicionaron 50 µL de cada dilución en los pocillos correspondientes a cada cepa. A continuación se agregaron 50 µL de suspensión de cada cepa (5x10<sup>6</sup> ufc/mL) en las diluciones correspondientes. La determinación, para cada dilución, se hizo por cuadruplicado. También se realizó el correspondiente control de crecimiento para cada bacteria. La policubeta fue incubada aeróbicamente, durante 18 a 24 h a 37°C.

Se tomó como concentración inhibitoria mínima (CIM) a la menor concentración del extracto en la cual no se observó crecimiento bacteriano a simple vista, luego de 18 a 24 h de incubación a 37°C.

## 2.6. Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM)

Se continuó trabajando con las cepas para las cuales se determinó el valor de la CIM a través del ensayo anterior: la micro dilución en medio sólido.

La determinación se llevó a cabo por duplicado para cada bacteria. Para ello se prepararon dos cajas de Petri estériles con 10 mL de medio MH agar cada una. Se dividió cada placa en tantos sectores como concentraciones a ensayar.

De uno de los pocillos de la policubeta, correspondiente a alguna de las concentraciones seleccionadas, se tomó una alícuota de 25µL y se la sembró por estriado en el sector de la placa correspondiente a la misma, con el objeto de determinar si el extracto presentó actividad bactericida a esa concentración o si la actividad fue solo bacteriostática. Este procedimiento se repitió con el resto de las concentraciones elegidas para esa cepa.

Con las otras cepas se trabajó de la misma manera, en las cajas destinadas a ellas. Finalmente se llevaron todas a incubar de 18 a 24 h a 37°C.

Las concentraciones a analizar se eligieron con el siguiente criterio: la correspondiente a la CIM, una concentración menor a ésta y las tres concentraciones mayores en las cuales se observó inhibición. Por lo tanto se trabajó con las siguientes concentraciones para cada bacteria:

- Para *S. aureus*: 13.660 µg/mL; 6.830 µg/mL; 3.415 µg/mL; 1.707 µg/mL y 854 µg/mL.
- Para *E. coli*: 6.830 µg/mL; 3.415 µg/mL; 1.707 µg/mL; 854 µg/mL y 427 µg/mL.
- Para *E. faecalis*: 3.415 µg/mL; 1.707 µg/mL; 854 µg/mL; 427 µg/mL; 213 µg/mL.

Los valores de las CIMs corresponden a la cuarta concentración ensayada en cada caso.

Para evaluar los resultados de esta determinación se contaron las colonias desarrolladas (UFL) en cada una de las diluciones ensayadas y se adoptó el siguiente criterio:

- $0 \leq n^\circ$  de UFL < 100: la dilución del extracto tiene actividad bactericida.
- $n^\circ$  de UFL > 100: la dilución no tiene actividad bactericida.

Se tomó como concentración bactericida mínima (CBM) a la menor concentración de extracto en la cual no se observó crecimiento bacteriano a simple vista, luego de 18 a 24 h de incubación a 37°C.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Determinación de la Actividad Inhibitoria del Crecimiento Bacteriano

Las cajas de Petri adicionadas con las diluciones del extracto etanólico se compararon con los controles de crecimiento, que fueron positivos para todas las cepas, y se observó que no hubo crecimiento apreciable a simple vista de las especies sembradas, en las concentraciones 2.731  $\mu\text{g/mL}$  y 1.366  $\mu\text{g/mL}$ . A partir de la concentración de 683  $\mu\text{g/mL}$ , en adelante, se observó crecimiento de la especie *Enterococcus faecalis*. En la concentración 170,7  $\mu\text{g/mL}$  se desarrolló la especie *Staphylococcus aureus*. Por último, para la concentración 85,4  $\mu\text{g/mL}$ , se notó el crecimiento de *Escherichia coli*. La Tabla 1 muestra estos resultados.

**Tabla 1.** Capacidad inhibitoria del crecimiento bacteriano

Bacterias	Control		Concentraciones ( $\mu\text{g}$ de material extraído (ME)/mL de medio de cultivo)													
	1	2	2.731		1.366		683		341,5		170,7		85,4			
<b>Gram (-)</b>	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2		
1. <i>Escherichia coli</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
2. <i>Proteus mirabilis</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3. <i>Pseudomonas auruginosa</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Fitopatógenas</b>																
5. <i>Pseudomonas corrugata</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Gram (+)</b>																
6. <i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
7. <i>Enterococcus faecalis</i>	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(1) original, (2) duplicado, (+) indica crecimiento y (-) ausencia de crecimiento

Cabe aclarar que para realizar este ensayo hubo que diluir 10 veces cada concentración del extracto (NCCLS, 2.001) y que los objetivos del mismo son detectar si el extracto presenta actividad inhibitoria del crecimiento, así como obtener una estimación aproximada del valor de la CIM, cuyo valor exacto se determina mediante el ensayo de microdilución.

Estos resultados indican que el extracto alcohólico de las hojas de *Caesalpinia paraguariensis* (guayacán) presentó una potente actividad inhibitoria del crecimiento bacteriano frente a las cepas *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y

*Pseudomonas corrugata*, ya que no se desarrollaron, aun en las concentraciones más bajas, y frente a *E. coli*, ya que se desarrolló recién en la última concentración. El extracto también mostró una muy buena actividad inhibitoria para la cepa *Staphylococcus aureus*, para la cual la concentración inhibitoria mínima (CIM) se encontraría alrededor de la concentración 3.415 µg ME/mL. Finalmente, el extracto no fue tan activo contra *Enterococcus faecalis*, cuya CIM estaría alrededor de la concentración 13.660 µg ME/mL.

Estos resultados, sumados a los obtenidos por Sgariglia et al. (2006) para ritidoma de guayacán, brindan una base científica suficiente para proponer a esta especie como una promisoría fuente potencial de principios bioactivos, con finalidades medicinales o como preservantes de alimentos y/o medicamentos.

### 3.2. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

El control de crecimiento fue positivo para todas las cepas. Para la especie *S. aureus* se observó desarrollo de crecimiento en la concentración 854 µg ME/mL de medio de cultivo. Por lo tanto, la CIM para esta cepa es el valor de la concentración inmediata anterior: 1.707 µg ME/mL de medio de cultivo. En el caso de *E. coli*, el desarrollo de crecimiento se produjo en la concentración 427 µg ME/mL de medio de cultivo, en función de lo cual el valor de la CIM es 854 µg ME/mL de medio de cultivo. Por último, se observó crecimiento de *E. faecalis* en la concentración 213 µg/mL, por lo que el valor de su CIM corresponde a la concentración 427 µg/mL. Estos resultados se representan en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) para tres cepas bacterianas

Cepa	c. crecim.	Concentraciones (µg de material extraído (ME)/mL de medio de cultivo)						
		13.660	6.830	3415	1.707	854	427	213
1	+	-	-	-	-	-	-	+
	+	-	-	-	-	-	-	+
	+	-	-	-	-	-	-	+
	+	-	-	-	-	-	-	+
2	+	-	-	-	-	+	+	+
	+	-	-	-	-	+	+	+
	+	-	-	-	-	+	+	+
	+	-	-	-	-	+	+	+
3	+	-	-	-	-	-	+	+
	+	-	-	-	-	-	+	+
	+	-	-	-	-	-	+	+
	+	-	-	-	-	-	+	+

1: *E. faecalis*; 2: *S. aureus*; 3 *E. coli*; (+) indica crecimiento bacteriano, y (-) indica ausencia de crecimiento.

Sobre la base de estos resultados, los valores de la concentración inhibitoria mínima, para las cepas bacterianas estudiadas, son los siguientes:

- CIM para *Staphylococcus aureus*: 1.707 µg ME/ mL de medio de cultivo
- CIM para *Escherichia coli*: 854 µg ME/mL de medio de cultivo.
- CIM para *Enterococcus faecalis*: 427 µg ME/mL de medio de cultivo

### 3.3. Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM)

*E. faecalis* se desarrolló en todas las diluciones ensayadas. Por lo tanto, el extracto no es bactericida para esta cepa. *S. aureus* presentó crecimiento para las concentraciones 3.415 µg/mL; 1.707 µg/mL y 854 µg/mL, observándose la ausencia del mismo para 13.660 µg/mL y 6.830 µg/mL; Mientras que *E. coli* se desarrolló para 854 µg/mL y 427 µg/mL y hubo ausencia de crecimiento para el resto de las concentraciones ensayadas (6.830 µg/mL; 3.415 µg/mL y 1.707 µg/mL).

Estos resultados indican que, para *Staphylococcus aureus*, el valor de la CBM corresponde a la concentración 6.830 µg/mL y para *Escherichia coli* la CBM corresponde a la concentración 1.707 µg/mL. No se encontró, de manera concluyente, el valor de la CBM para *Enterococcus faecalis*.

En la Tabla 3 se pueden observar los valores de las Concentraciones Inhibitorias y Bactericidas Mínimas encontradas.

**Tabla 3.** Concentraciones Inhibitorias y Bactericidas Mínimas

Cepa	Concentraciones (µg ME/mL de medio de cultivo)	
	CIM	CBM
<b>Gram (-)</b>		
1. <i>Escherichia coli</i> .	854	1.707
2. <i>Proteus mirabilis</i> .	< 854	< 854
3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	< 854	< 854
4. <i>Klebsiella pneumoniae</i> .	< 854	< 854
<b>Gram (+)</b>		
5. <i>Staphylococcus aureus</i>	1.707	6.830
6. <i>Enterococcus faecalis</i>	427	N.B.
<b>Fitopatógenas</b>		
7. <i>Pseudomonas corrugata</i> .	< 854	< 854

N.B.: no es bactericida

Se destacan en negritas los valores encontrados experimentalmente. Los demás valores son estimados.

En la Tabla 3 se observa que, para las bacterias para las cuales se logró determinar el valor de la CBM, la misma equivale al doble, o más, del correspondiente valor de CIM, relación que se presenta en la generalidad de los casos (Soberón *et al.*, 2006). Cabe resaltar que cuanto más bajos son los valores de CIM y de CBM mayor es la efectividad del extracto frente a la cepa bacteriana en cuestión.

Resulta interesante comparar los valores de CIM y de CBM obtenidos para este extracto, con los de algunos antibióticos sintéticos, usados convencionalmente para tratar las afecciones causadas por las bacterias estudiadas en este trabajo. Para tal fin se tomaron los valores de CIM y de CBM obtenidos por Soberón *et al.* (2006) para varios antibióticos comerciales. Los resultados se muestran en la Tabla 4.



**Tabla 4.** Comparación de los valores de CIM y de CBM del extracto alcohólico de hojas de guayacán con los de antibióticos comerciales

Cepas Gram (-)	Ext alc. de guayacán	CIM/CBM (valores en µg/mL)				
		Ampicilina	Cefotaxina	Imipenem	Oxacilina	Vancomicina
<i>E.coli</i>	854/1.707	-----	>640/>640	8/16	-----	-----
<i>Proteus mirabilis</i>	<854/<854	-----	°320/320	16/32	-----	-----
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<854/<854	-----	>640/>640	320/640	-----	-----
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<854/<854	-----	>640/>640	8/16	-----	-----
-----						
Cepas Gram (+)						
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.707/6.830	-----	16/32	-----	8/16	-----
<i>Enterococcus faecalis</i>	427/N.B.	>640/>640	-----	-----	-----	20/160

N.B.: no es bactericida

Como se puede ver en la Tabla 4, los valores para el extracto etanólico de partes aéreas de guayacán son más altos que los correspondientes a algunos de los antibióticos sintéticos usados convencionalmente. No obstante, en el caso de cefotaxina, tales valores no se encuentran tan alejados unos de otros.

Estos resultados son congruentes con los obtenidos por Sgariglia *et al.* (2006) para el extracto etanólico de corteza de guayacán cuyas CIMs, frente a las cepas empleadas en el presente trabajo, fueron mayores que las de los antibióticos de amplio espectro tomados como referencia en ese caso: amoxicilina y ciprofloxacina.

A pesar de ello, este extracto no pierde su atractivo como posible fuente de principios activos, si se considera que se trabajó con un extracto crudo constituido por numerosos compuestos con reconocida actividad biológica a saber: ácidos fenólicos, quinonas, catequinas, flavonas, flavonoides y flavonoles, taninos, antocianinas, etc. (Sgariglia *et al.*, 2006). En cambio, en el caso de los antibióticos sintéticos, se trata de compuestos puros.

Esto alienta a sugerir estudios más profundos dirigidos a aislar e identificar los compuestos bioactivos de este extracto, responsables de las actividades antimicrobianas observadas en el presente trabajo.

#### 4. CONCLUSIONES

1. El extracto alcohólico de las hojas de *Caesalpinia paraguariensis* (Guayacán), presenta actividad inhibitoria del crecimiento bacteriano frente a todas las cepas bacterianas estudiadas.
2. Esta actividad es potente, particularmente frente a las especies *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas corrugada*, tanto que los valores de CIM para esas cepas, son menores que 854 µg ME/ mL, la concentración más baja ensayada.

3. Las concentraciones mínimas del extracto necesarias para producir la inhibición del crecimiento (CIM) de las otras cepas, expresadas en µg de material extraído (ME)/mL de medio de cultivo, son las siguientes:
  - Para *Staphylococcus aureus*: 1.707
  - Para *Escherichia coli*: 854
  - Para *Enterococcus faecalis*: 427
4. El extracto presenta actividad bactericida frente a las cepas *E. Coli* y *Staphylococcus aureus*.
5. Las concentraciones de extracto necesarias para producir la muerte bacteriana (CBM), expresadas en µg de material extraído (ME)/mL de medio de cultivo, son las siguientes:
  - Para *Staphylococcus aureus*: 6.830
  - Para *Escherichia coli*: 1.707
6. Para las cepas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Escherichia coli* los valores de CIM y CBM de este extracto crudo son mayores que los de algunos de los antibióticos comerciales usados para tratar las afecciones causadas por las mismas.
7. El extracto etanólico de *Caesalpinia paraguariensis* (D. Parodi) Burk. podría ser usado como fuente de principios bioactivos con fines medicinales, o como preservante de alimentos o medicamentos, contra las cepas bacterianas empleadas en el presente trabajo, una vez realizados estudios más profundos que aseguren su inocuidad para el consumo humano.

## 5. BIBLIOGRAFÍA.

- Amani, S. M.; M. I. Isla; M. Poch; M. A. Vattuone; N. Cudmani; A. R. Sampietro. 1998. "Antimicrobial activity assay in some argentine medicinal plants". Acta Horticultura. 502, 2.
- Arias, M. E.; J. D. Gómez; N. M. Cudmani; M. A. Vattuone; M. I. Isla. 2004. "Antibacterial activity of ethanolic and aqueous extracts of *Acacia aroma* Gill. ex Hook et Arn." Life sciences 75, 191-202.
- Demo, M. S.; F. S. Ceratti; L. I. Sabini; S. M. Zanón; S. B. Sutil; M. Grosso; S. R. Ferreyra; B. A. Ramos. 1997. "Relevamiento de Plantas Medicinales del Sur de la Provincia de Córdoba con Actividad Antimicrobiana". Actas del Tercer Encuentro Regional del NOA de Plantas Medicinales, Santiago del Estero.
- Desmarchelier, C; S. M. Barros y col. 1999. "Protective Effects of Sangre de Drago from Croton Lechleri Muell. - Arg. On Spontaneous Lipid Peroxidation". Publicación Especial N° 240. ISBN 0-85404-793-X. The Royal Society of Chemistry of Cambridge, U.K .
- Farmacopea Nacional Argentina. "Codees Medicamentarius Argentino", 6th edn. 1978. Editorial Codex S.A. Buenos Aires, Argentina.
- Giménez, A. M. y J. G. Moglia. 2003. "Árboles del Chaco Argentino. Guía para el Reconocimiento Dendrológico". Ed. El Liberal, S.R.L., Santiago del Estero, Argentina. 307 p.
- Martínez Croveto, R. 1981. "Plantas Utilizadas en Medicina en el NO de Corrientes". Tucumán. Fundación Miguel Lillo, Miscelánea N° 69.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. "Performance standards for antimicrobial susceptibility testing". 11<sup>th</sup> International Supplement; MS100-S11. Wayne, PA: NCCLS.
- Oksana, H; A. Broussalis; J. Coussio. 1999. "Argentine Plant Extracts Active Against Polymerase and Ribonuclease H Activities of HIV-1 Reverse Transcriptase". Phytoteraphy Research 13,

206-209.

- Ordóñez, A. A. L.; J. D. Gómez; N. M. Cudmani; M. A. Vattuone; M. I. Isla. 2003. "Antibacterial activity of nine extracts of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz". *Microbial Ecology in Health and Disease* 15, 33-39.
- Quiroga, E. N.; A. R. Sampietro; M. A. Vattuone. 2004. "In vitro fungitoxic activity of *Larrea divaricata* CAV extracts". *Letters of Applied Microbiology* 39, 7-12.
- Roic L. D.; E. del V. Carrizo; M. O. Palacio. 1997. "Plantas de la Flora Santiagueña y su Uso en la Medicina Popular". *Actas del Tercer Encuentro Regional del NOA de Plantas Medicinales, Santiago del Estero*.
- Saadi, L.; M. J. de Jiménez, y col.. 1997. "Estudio Químico de *Aloysia gratissima* var. *gratisima*". *Actas del Tercer Encuentro Regional del NOA de Plantas Medicinales, Santiago del Estero*.
- Sgariglia, M. A.; J. R. Soberón; E. N. Quiroga; D. A. Sampietro; M. A. Vattuone. 2006. "Evaluation of the antibacterial activity of different extractive forms of guayacán ritidome". *Molecular Medicine Chemistry*. 11,21-23
- Soberón, J. R.; M. A. Sgariglia; D. A. Sampietro; E. N. Quiroga; M. A. Vattuone. 2006. "Antibacterial activity of plant extracts from northwestern Argentina". *Journal of Applied Microbiology*. 102: 1.450 – 1.461.
- Sorlino, D.; L. Windauer; N. Gómez. 1997. "Evaluación de la Cosecha de Capítulos de Cardo Mariano (*Sylibum marianum*) Sembrado en Diferentes Fechas". *Actas del Tercer Encuentro Regional del NOA de Plantas Medicinales, Santiago del Estero*.
- Toursarkissian, M. 1980. "Plantas Medicinales de la Argentina, sus Nombres Botánicos, Vulgares, Usos y Distribución Geográfica". *Hemisferio Sur*. Buenos Aires.
- Zanón, S. M.; F. S. Ceratti y col. 1997. "Plantas Medicinales de Córdoba con Actividad Antiviral". *Actas del Tercer Encuentro Regional del NOA de Plantas Medicinales, Santiago del Estero*.

