

## ► Actividad antimicrobiana del extracto crudo de la vaina de *Caesalpinia spinosa* "tara" frente a *Staphylococcus aureus*

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF *Caesalpinia spinosa* "TARA" RAW EXTRACTS AGAINST *Staphylococcus aureus*.

JORGE ARAUJO DÍAZ<sup>1</sup> Y RAMSÉS SALAS ASENCIOS<sup>2</sup>

### RESUMEN

Se ha determinado la actividad antimicrobiana de las vainas maduras de *Caesalpinia spinosa* "tara" contra *Staphylococcus aureus*. El extracto crudo de tara es termoestable y la actividad antimicrobiana permanece hasta el quinto día de prueba, aunque hay una disminución de su actividad después del tercer día. Se halló la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) en la dilución 1/4 de los extractos, independiente del volumen de extracto que se utilizó. La actividad antimicrobiana óptima fue obtenida tomando 1.6 ml de extracto puro (4 MIC) en 20 minutos de incubación. El extracto de tara utilizado solo reduce la población microbiana, por lo que se sugiere que su actividad es bacteriostática y no bactericida.

**Palabras clave:** tara, actividad antimicrobiana, Concentración Mínima Inhibitoria, Concentración Mínima Bactericida

### ABSTRACT

The antimicrobial activity of *Caesalpinia spinosa* "tara" ripe pods has been assessed against *Staphylococcus aureus*. This raw extract is stable at different temperatures and its antimicrobial activity remains until five days of storage, though, there was some depletion at the third day. We assessed the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) in the 1/4 dilution, regardless the volume. The optimal antimicrobial activity was obtained using 1.6 ml of raw extract (without dilution, i.e. 4 MIC) and 20 minutes of incubation. This tara extract only reduced the microbial population, therefore, it is more bacteriostatic than bactericidal.

<sup>1</sup> UNIVERSIDAD NACIONAL FEDERICO VILLARREAL

<sup>2</sup> UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

**Key Words:** tara, antimicrobial activity, Minimal Inhibitory Concentration, Minimal Bactericidal Concentration

## INTRODUCCIÓN

El género *Staphylococcus* pertenece a la familia Micrococcaceae, así como también los géneros *Planococcus*, *Stomatococcus* y *Micrococcus*. Algunas de sus especies son miembros de la flora normal de la piel y mucosa de los humanos, otras de mamíferos y aves. De todas las especies de estafilococos halladas en humanos, solo *S. aureus* produce la enzima coagulasa (por lo que se le denomina como organismo coagulasa-positivo), que lo diferencia de las otras especies. Los estafilococos no invasores y no patógenos, como *S. epidermidis*, tienden a ser negativos a la coagulasa y no hemolíticos y es raro que produzcan supuración, aun cuando pueden infectar prótesis ortopédicas o cardiovasculares (14). Prácticamente todas las personas tienen estafilococos coagulasa-negativos en la superficie de la piel, y es frecuente la colonización transitoria de los pliegues húmedos cutáneos por *S. aureus*. Los estafilococos coagulasa-negativos, así como también *S. aureus*, se encuentran en la orofaringe, el tracto intestinal y el tracto urogenital. El estado de portador transitorio o persistente en los niños mayores y en adultos es más frecuente

en la nasofaringe anterior. Aproximadamente el 15% de los adultos sanos normales son portadores persistentes de *S. aureus* (9). Los estafilococos patógenos causan supuración, formación de abscesos, varias infecciones piógenas e incluso septicemia; casi siempre causan hemólisis, coagulación del plasma y producen varias enzimas y toxinas extracelulares. Las especies asociadas más frecuentemente con infecciones humanas son *Staphylococcus aureus* (el miembro más virulento y mejor conocido del género), *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus saprophyticus* y *Staphylococcus schleiferi*. Las infecciones por *S. aureus* son actualmente un problema de salud pública debido a la emergencia de cepas resistentes a meticilina y otros agentes antibacteriales, sobre todo en el ambiente hospitalario, debido a la alta mortalidad asociada a infecciones sistémicas (13).

La tara es un arbusto de tallo fuerte o árbol de corteza grisácea de 3-5 metros de altura, ramas espinosas y con gran densidad foliar. Posee flores dispuestas en estrechos racimos (corimbos) de color rojizo-amarillo, de 8 a 12 cm de longitud (Figura 1). El fruto es una legumbre sésil de 9 cm de color naranja-rojizo, rico en taninos (Figura 2), formado por una vaina oblonga y esponjosa que contiene hasta 7 semillas ovoides de 8 mm de ancho por 1 cm de largo, de color marrón oscuro cuando están maduros (18).



FIGURA 1. INFLORESCENCIA DE CAESALPINIA SPINOSA "TARA"



FIGURA 2. FRUCTIFICACIÓN DE CAESALPINIA SPINOSA "TARA"

La tara es una especie nativa del Perú ampliamente distribuida en América Latina. Se distribuye entre los 4° y 32° de latitud Sur, abarcando diversas zonas áridas en Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia hasta el norte de Chile. En la vertiente del Pacífico se halla en los flancos occidentales, valles, laderas, riberas de los ríos y lomas entre los 800 y 2800 msnm; mientras que en los valles interandinos de la cuenca del Atlántico se le encuentra entre los 1600 y 2800 msnm, llegando en algunos casos, como en los valles de Apurímac, hasta los 3150 msnm (Figura 3). En la costa como en la sierra también crece cultivada, por ejemplo, en algunas chacras formando cercos vivos para separar los fundos o terrenos vecinos y también para abastecerse de leña o utilizarla en la curtiembre y la tintorería (16).

En los frutos (vainas y semillas) de la tara se encuentran aceites volátiles, ácidos grasos (lípidos), gomas, antocianinas, esteroides, triterpenoides, flavonoides, resinas, taninos, antracenos, hidratos de carbono (fructosa, glucosa, sacarosa), proteínas y vitaminas, además de iones y minerales como calcio, magnesio, hierro, fósforo, sodio, potasio, cloruros, nitratos y sulfatos. En las hojas se pueden identificar glicósidos, mucilagos,



FIGURA 3. DISTRIBUCIÓN DE CAESALPINIA SPINOSA "TARA" EN LOS DEPARTAMENTOS DEL PERÚ.

taninos (en forma de taninos gálicos), antraquinonas (libres en mayor cantidad que combinadas al estado glicosídico), sennósido, agliconas libres, C- glicósidos, aloe-emodina e iso-emodina, esteroides y flavonoides (21). Palacios (16) menciona que el contenido de taninos varía según la localización: en semillas, hay un 0.22% de taninos, en frutos un 35% y en hojas un 12.7%.

La tara tiene algunas aplicaciones medicinales. Sus frutos en infusión se utilizan para gargarismos contra la amigdalitis, y en Colombia se prepara con esta planta una bebida depurativa del colesterol. Bernabé Cobo y Herminio Valdizán, entre otros, han citado múltiples aplicaciones medicinales, de las que se puede mencionar algunas: astringente, produce constricción y sequedad por el ácido tánico que contiene. La infusión de sus hojas se usa para el lavado de heridas y para curar el dolor de garganta por el frío (16). Las flores en infusión se toman para afecciones del estómago; sus frutos macerados se emplean para lavados de heridas, lavados vaginales y como colirio. El polvo que se obtiene de los frutos se aplica para desecar úlceras en la piel. Se emplea como cicatrizante, en especial contra la amigdalitis en forma de gárgaras. La tara es antiescorbútica: el polvo que se obtiene se aplica en la cavidad bucal mediante un pedazo de algodón; es antidisentérica: en ayunas se toma una cucharada de jugo de sus semillas mezcladas en un trozo de pepa de la palta. Especialmente los metabolitos del fruto se integran como parte de medicamentos por sus propiedades cicatrizantes, astringentes, antiinflamatorias, antisépticas, antidiarreicas, antimicóticas, antibacterianas y antiescorbúticas. Es utilizada muy frecuentemente en la medicina tradicional para aliviar malestares de la garganta, sinusitis, infecciones vaginales y micóticas; lavado de los ojos inflamados, heridas y enjuagatorios bucales (dolor de muela); dolor de estómago, diarreas, reumatismo y resfriado (19).

La tara tiene diferente acción antimicrobiana frente a *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *Penicillium sp.* y *Aspergillus sp.*, dependiendo de los pisos ecológicos, y su actividad depende del conjunto de metabolitos presentes en esta planta. El análisis fitoquímico de la tara muestra una diferencia de concentraciones de taninos, péptidos y flavonoides de acuerdo al lugar de procedencia. Asimismo, la actividad antimicrobiana varía dependiendo de la región geográfica de procedencia (12). El objetivo

del presente trabajo es cuantificar la actividad antimicrobiana de extractos de vaina madura de *Caesalpinia spinosa* "tara" frente a *Staphylococcus aureus*.

## MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas de la Universidad Nacional Federico Villarreal, utilizando como material biológico muestras de vainas maduras de *Caesalpinia spinosa* "tara" obtenidas de los alrededores de la ciudad de Cajamarca, y una cepa aislada de *Staphylococcus aureus* cedida por el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Para la obtención del extracto crudo, se procedió utilizando un protocolo modificado según Gegenheimer (8). Se trituraron 5 gr. de tejido vegetal (vainas maduras de "tara", libre de semillas, previamente lavadas con agua destilada estéril) con 10 ml de buffer de homogenizado (Tris-HCl pH 8.0 y 50 Mm, Cloruro de potasio 0.1 M, Glicerol al 5% del volumen total y Beta-Mercaptoetanol al 1% como agente reductor). El homogenizado se filtró utilizando gasa y papel filtro, recuperando el filtrado en un vaso de precipitado y refrigerándose por 7 minutos. El filtrado fue centrifugado a 11500 rpm por 12 minutos a -4°C y el sobrenadante fue recuperado en un nuevo tubo. En el presente trabajo se utilizará la palabra "extracto" para hacer referencia al sobrenadante final descrito en este párrafo.

Para el análisis de población microbiana, se sembró una colonia de *Staphylococcus aureus* en 10 ml de caldo TSB y se incubó a 37°C por 18 horas, luego de las cuales se hicieron 6 diluciones seriadas a la mitad (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64) con volúmenes finales de 5 ml para cada una. Se leyeron dichas diluciones en un espectrofotómetro a 600 nm e inmediatamente se tomaron 0.1 ml de cada dilución, para sembrar por difusión con la ayuda de una espátula de Drigalski en placas Petri con agar TSA. Las placas se incubaron a 37°C por 18 hrs., al cabo de las cuales se realizó el conteo de colonias para cada dilución. El valor final fue expresado como Unidades Formadoras por mililitro (UFC/ml.), según la fórmula:

$$\text{UFC/mL} = \frac{\text{Número de colonias}}{\text{Vol. Sembrado (0.1 mL)}}$$

Con estos resultados se generó una gráfica de absorbancia a 600 nm versus UFC/ml. y se calculó el coeficiente de correlación para determinar el grado de relación que existe entre estas dos variables (4).

Para el análisis de la actividad antimicrobiana del extracto, se utilizó la técnica de difusión en Agar y excavación en Placa. En un tubo con 10 ml de Caldo TSB se sembró una colonia de *Staphylococcus aureus* y se incubó por 16 horas, luego de las cuales se preparó una dilución 1/16 (dilución que corresponde a una concentración bacteriana de  $2 \times 10^7$  UFC/ml). En todas las determinaciones de actividad antimicrobiana se utilizará esta dilución del cultivo microbiano. Se tomaron 2 ml de dicha dilución y se agregó agar TSA fundido hasta llegar a un volumen final de 10 ml. Esta mezcla fue agregada, por inversión, a una placa Petri con agar TSA para lograr un crecimiento bacteriano uniforme ("en césped"). Una vez solidificado el agar, se procedió a efectuar excavaciones (pozos) de 10 mm de diámetro, donde se agregaron 0.5 ml del extracto obtenido y se procedió a incubar a 37°C por 18 horas, leyéndose los resultados como halos de inhibición de crecimiento. Los resultados de la actividad se expresaron en milímetros, midiendo con ayuda de un Vernier el diámetro de los halos de inhibición. Todas las pruebas descritas en el presente trabajo fueron realizadas por triplicado, por lo que en los resultados se presentan las medias de estos valores.

Para el ensayo de Vida Media de Actividad del Extracto, se preparó el extracto tal como se ha explicado y se mantuvo en refrigeración a 4 °C por 5 días, en cada uno de los cuales se tomaron 0.5 ml para comprobar su actividad antimicrobiana por el método de difusión en Agar y excavación en Placa, como ya se ha explicado. De la misma manera, se procedió a determinar la termosensibilidad del extracto, para lo cual el extracto fue sometido al calor, colocándolo en baño maría a 40, 80 y 100 °C por 15 minutos. Además, se repitió este experimento colocando el extracto a una temperatura de 100°C por 15 y 30 minutos.

Para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) se utilizó el método modificado de dilución en caldo (6), trabajándose con la preparación final de *S. aureus* ya descrita anteriormente. Se obtuvo un extracto de "tara", tal como se ha descrito, e inmediatamente se hicieron 5 diluciones (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32). Se realizaron dos ensayos, en uno de los cuales se utilizó 0.1 ml y en el otro 0.15 ml de cada dilución a tubos conteniendo la preparación final (1/16) de *S. aureus* hasta

alcanzar un volumen de 5 ml, incubándose los tubos a 37°C por 18 horas, para luego leer su absorbancia en un espectrofotómetro a una D.O de 600 nm.

Para determinar el volumen adecuado del extracto, se utilizaron 0.3 ml, 0.45 ml, 0.6 ml, 0.75 ml y 0.9 ml de la dilución 1/4 (1 MIC) del extracto, a los cuales se agregaron volúmenes de la preparación final de *S. aureus* hasta alcanzar los 5 ml. A continuación, se tomaron lecturas iniciales en el espectrofotómetro a D.O. de 600 nm, y luego se incubaron los tubos a 37°C por 18 hrs, al cabo de las cuales se tomaron las lecturas finales de absorbancia. Cada tubo preparado estaba acompañado de su control respectivo (TSB + volumen de extracto).

Para determinar la Concentración Mínima Bactericida (MBC), se repartieron 3.4 ml de la preparación final de *S. aureus* en cinco tubos de ensayo, a los cuales se les agregó 1.6 ml de diferentes diluciones del extracto de tara (1/2 MIC, 1 MIC, 2 MIC, 3 MIC y 4 MIC). Se tomaron lecturas iniciales de D.O. a 600 nm, y luego se incubaron los tubos a 37°C por 18 hrs, al cabo de los cuales se tomaron las lecturas finales de absorbancia. Para cada tubo se generó un control respectivo (TSB + extracto), con el mismo tratamiento.

El ensayo bactericida (Killing assay) se realizó con un extracto de tara a una concentración de 4 MIC, preparándose dos frascos con el siguiente contenido:

#### **Frasco 1 (prueba):**

34 ml de preparación final (1/16) de *S. aureus*.

16 ml de extracto de "tara" 4 MIC.

#### **Frasco 2 (control):**

34 ml de caldo TSB.

16 ml de extracto de "tara" 4 MIC.

Ambos frascos fueron incubados a 37°C, realizándose lecturas de D.O. a 600 nm. en intervalos de 20 minutos desde  $T_0$  hasta  $T_5$ . En cada tiempo, se tomaron 0.1 ml. de cada frasco y se sembraron por dispersión en placas de Petri con agar TSA para contabilizar UFC/ml.

## **RESULTADOS**

### *1. Determinación de la población microbiana*

La Figura 4A muestra una gráfica de absorbancia vs. logaritmo del conteo

microbiano (en UFC/ml), observándose un comportamiento lineal hasta aproximadamente el valor de 0.60 de absorbancia, punto en el cual la recta trazada empieza a incrementar la pendiente. Este punto de inflexión corresponde a una población de  $1.582 \times 10^7$  UFC/ml (Figura 4B), concentración equivalente a la dilución 1/16, la cual se tomó en cuenta para efectuar los ensayos de Medición de la

Actividad Bacteriana, Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y Ensayos Bactericidas (Killing assays). La gráfica obtenida se ajusta a un comportamiento semilogarítmico, por lo que se procedió al análisis de correlación, calculándose un coeficiente de regresión  $r$  de 0.90, indicando un alto grado de correlación entre la absorbancia y la concentración bacteriana.

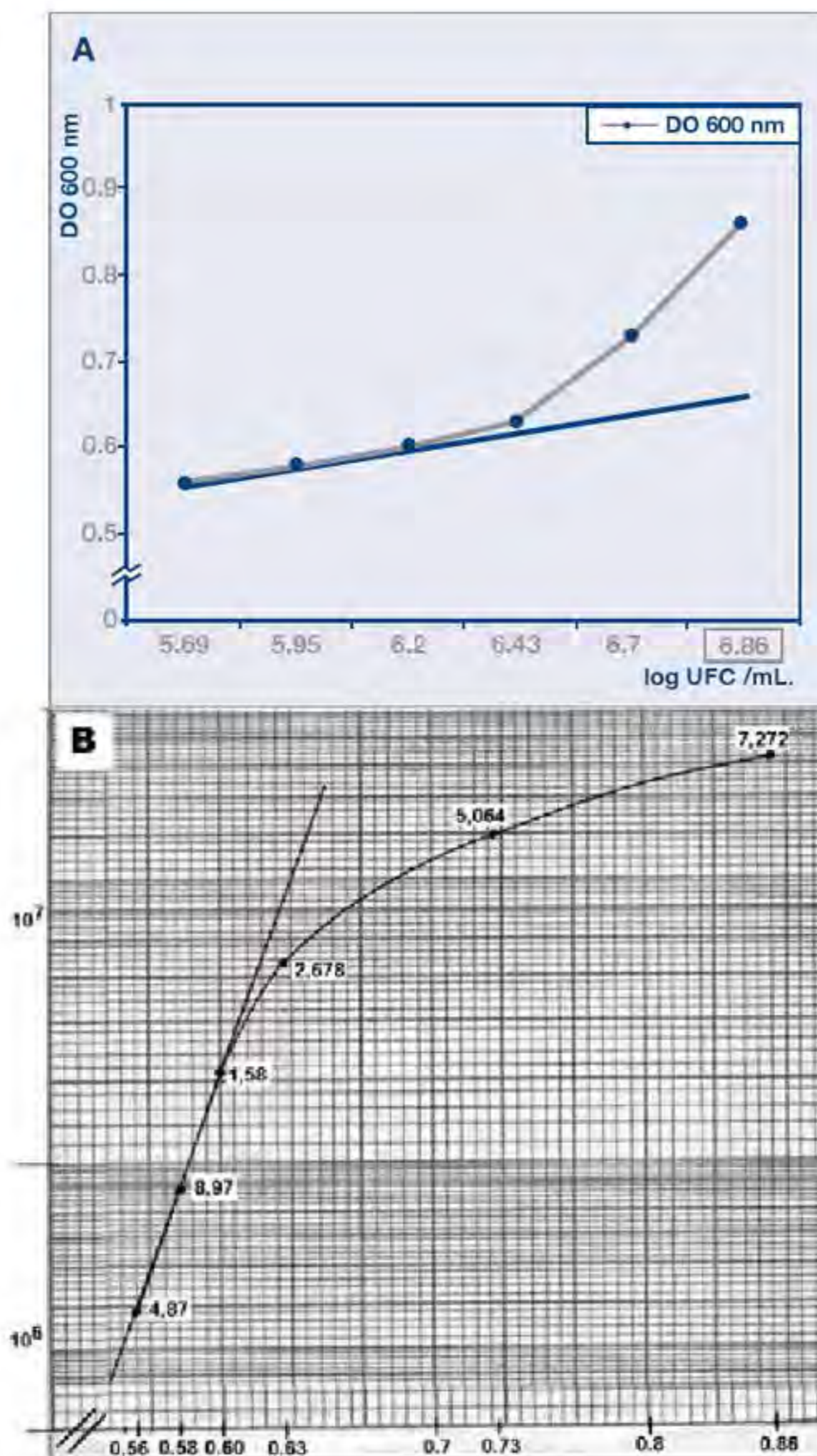


FIGURA 4. DETERMINACIÓN DE LA POBLACIÓN MICROBIANA. A: GRÁFICO LINEAL ABSORBANCIA VS. CONTEO DE COLONIAS. B: GRÁFICO EN PAPEL SEMILOGARÍTMICO

2. Verificación y medición de la actividad antibacteriana

En todos los pozos se observó una actividad antibacteriana positiva bien marcada, halos de inhibición del crecimiento bacteriano muy bien definidos y no se observaron indicios de oxidación del extracto (Figura 5). La Tabla 1 muestra una repetitividad aceptable de la actividad antimicrobiana, evidenciada por el diámetro de los halos de inhibición en cada pozo.



FIGURA 5. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE TARA EVIDENCIADA POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN POZOS.

TABLA 1

DIÁMETRO DE HALOS DE INHIBICIÓN POR TRES REPETICIONES EN CADA PLACA Y EN TRES PLACAS DIFERENTES

POZOS	PLACA 1	PLACA 2	PLACA 3
1	23 mm	23.5 mm	23.5 mm
2	22.5 mm	22.0 mm	23.0 mm
3	22.5 mm	22.5 mm	22.5 mm

3. Vida media de la actividad antimicrobiana del extracto

La actividad antibacteriana positiva siguió manifestándose en todos los pozos de las placas, en los 5 días de prueba, aun cuando el diámetro del halo de inhibición tuvo una mayor tendencia a disminuir a partir del cuarto día (Figura 6).

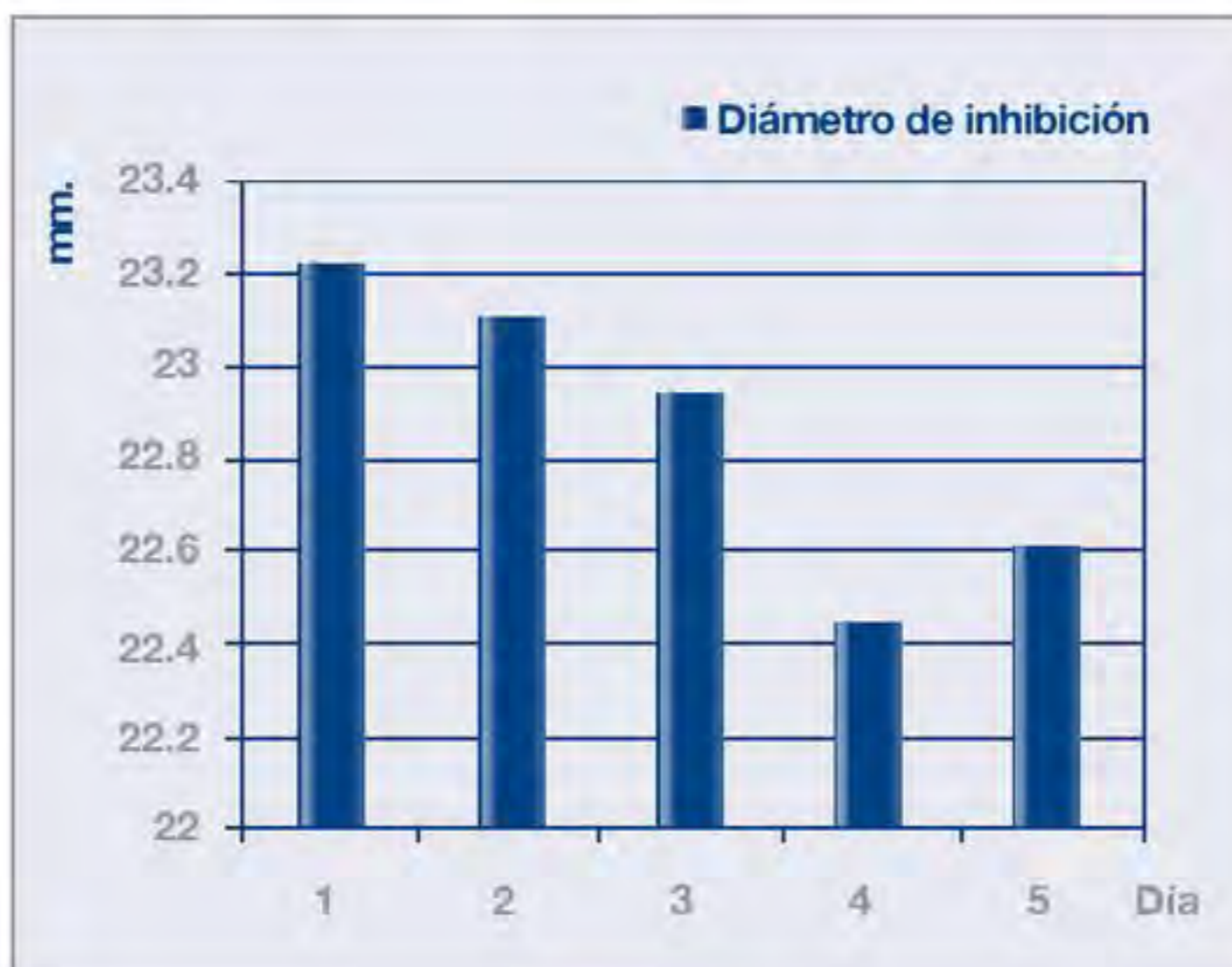


FIGURA 6. DIÁMETRO DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN EN DIFERENTES DÍAS DESPUÉS DE LA PREPARACIÓN DEL EXTRACTO DE TARA.

#### 4. Termosensibilidad del extracto

Los extractos presentaron actividad antibacteriana positiva con halos de inhibición de crecimiento muy bien definidos. La Figura 7 muestra los halos obtenidos cuando el extracto fue tratado con diferentes temperaturas. Se puede observar que el diámetro de los halos

prácticamente se mantiene constante. Los controles no presentaron ningún tipo de actividad. La Tabla 2 muestra los diámetros de los halos de inhibición cuando el extracto fue incubado a 100°C por 15 y 30 minutos, observándose valores aproximadamente iguales, lo que indicaría presencia de compuestos termoestables.

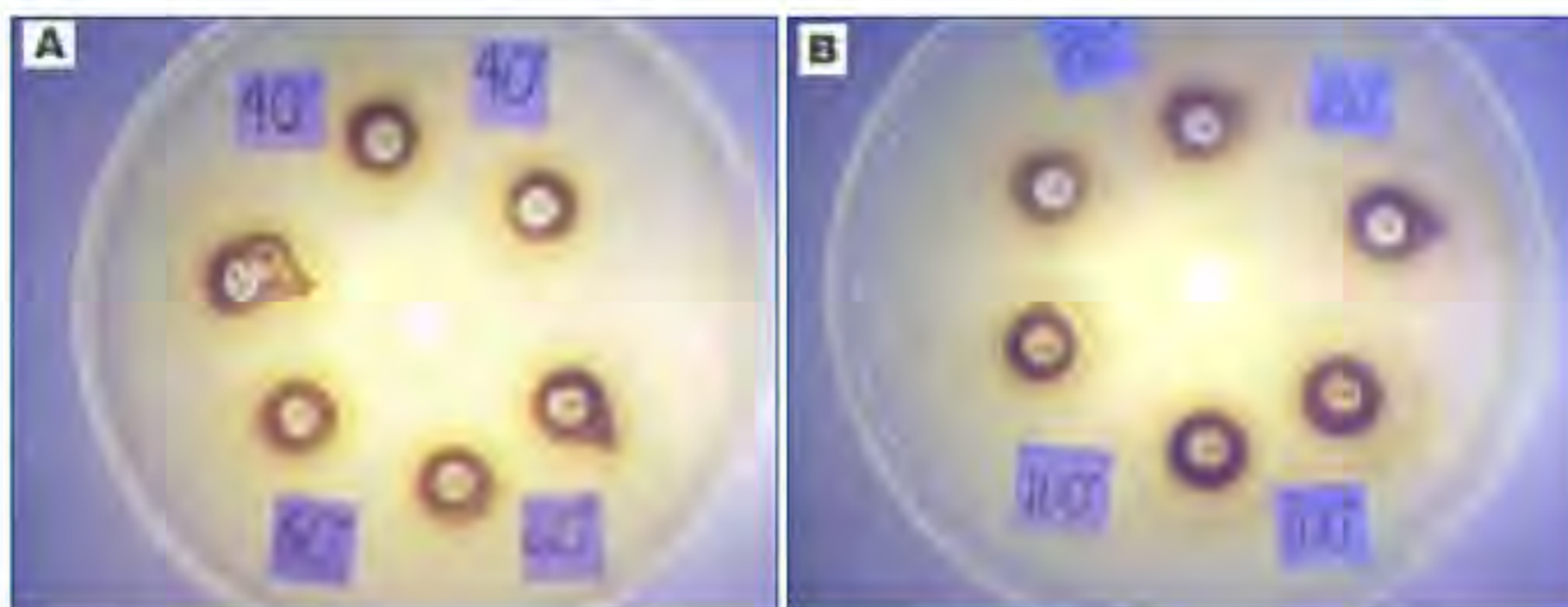


FIGURA 7. HALOS DE INHIBICIÓN PRODUCIDOS POR EXTRACTOS DE TARA INCUBADOS A DIFERENTES TEMPERATURAS.

TABLA 2

TERMOSENSIBILIDAD DEL EXTRACTO DE TARA A DOS DIFERENTES TIEMPOS DE EXPOSICIÓN

15 MINUTOS 100°C		30 MINUTOS 100°C	
POZOS	DIÁMETRO	POZOS	DIÁMETRO
1	22.0 mm	1	23.0 mm
2	21.5 mm	2	22.0 mm
3	23.0 mm	3	23.5 mm

#### 5. Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)

En la Figura 8 se observa una gráfica decreciente con un cambio brusco en la pendiente de la curva entre la dilución 1/32 (representada por el punto 0.03125) y la dilución próxima inmediata 1/16 (representada por el punto 0.0625) donde la absorbancia fue de 0.550. La tendencia de la curva a partir del punto mencionado sigue siendo decreciente pero en menor grado, siendo la diferencia de los valores de absorbancia cada vez menores conforme aumenta la concentración de la dilución del extracto. La inflexión llegó al máximo punto en la dilución 0.25, sea cuando se usaron 0.1 ó 0.15 ml del extracto, y luego de este punto la gráfica tuvo tendencia lineal hasta la máxima concentración. Por esta razón se consideró a la dilución 0.25 (1/4) como la Concentración Mínima Inhibitoria. El análisis



por el método de Chi cuadrado no mostró diferencias significativas entre los valores de absorbancia observados con respecto a los valores ajustados ( $P > 0.5$ ), mientras que las diferencias fueron altamente significativas cuando se compararon los valores de absorbancia observados con la absorbancia del cultivo 1/16 y con la absorbancia del cultivo 1/16 tratado con extracto puro ( $P < 0.001$ ).

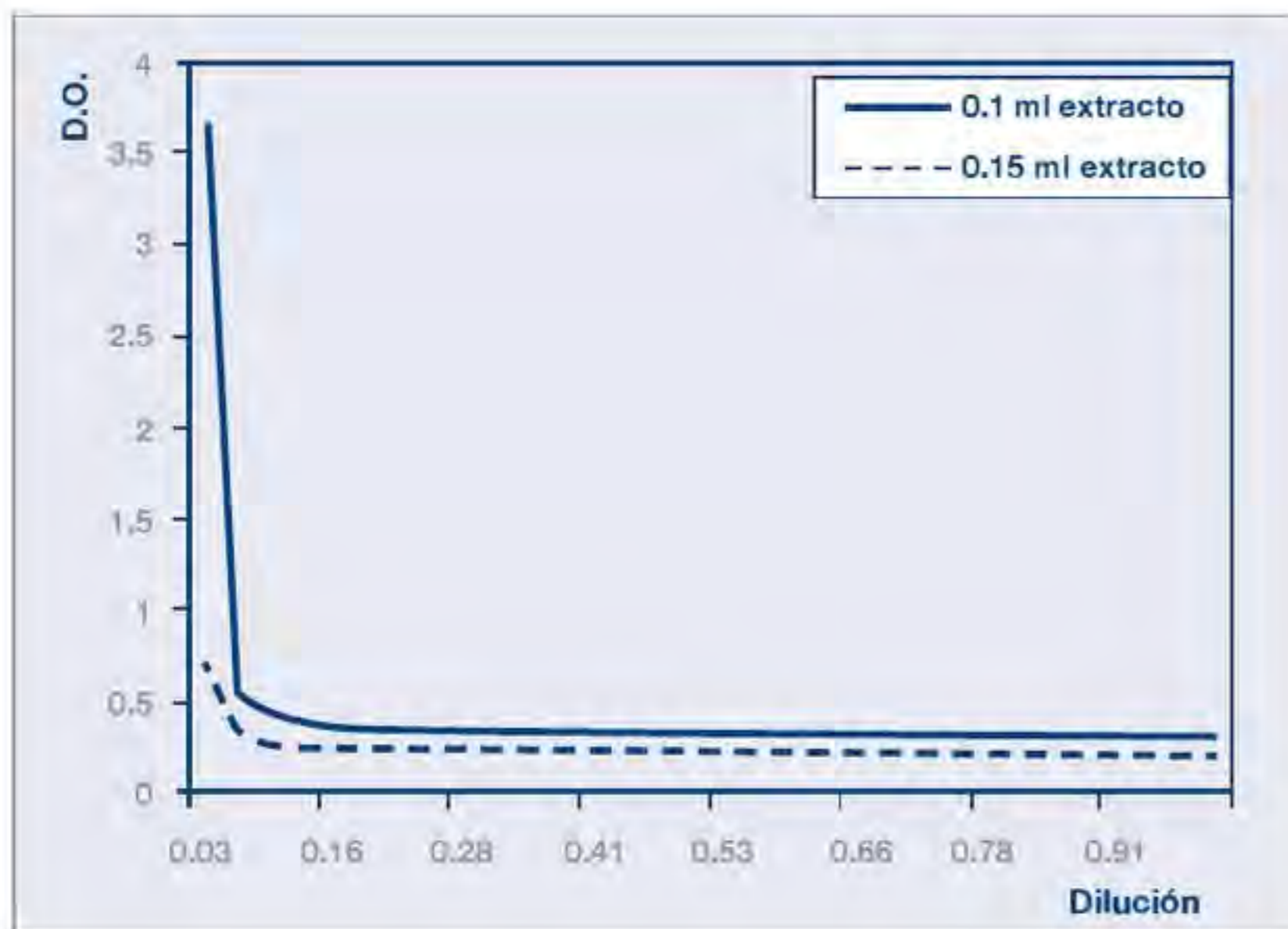


FIGURA 8. DETERMINACIÓN DE LA MÍNIMA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA (MIC) UTILIZANDO 0.1 Y 0.15 ML DE EXTRACTO.

6. Ensayo para encontrar el volumen adecuado

En la figura 9 se puede notar que a medida que aumentaba el volumen del extracto, la densidad óptica del extracto disminuyó, lo que significa una mayor actividad antimicrobiana. Sin embargo, a partir de los 1.6 ml ya no se pudo notar un mayor decaimiento de la curva. Con el análisis por el método de  $\chi^2$  se determinaron diferencias altamente significativas al comparar los valores de absorbancia observados con los valores de absorbancia del cultivo y las del cultivo tratado con extracto puro ( $P < 0.01$ ).

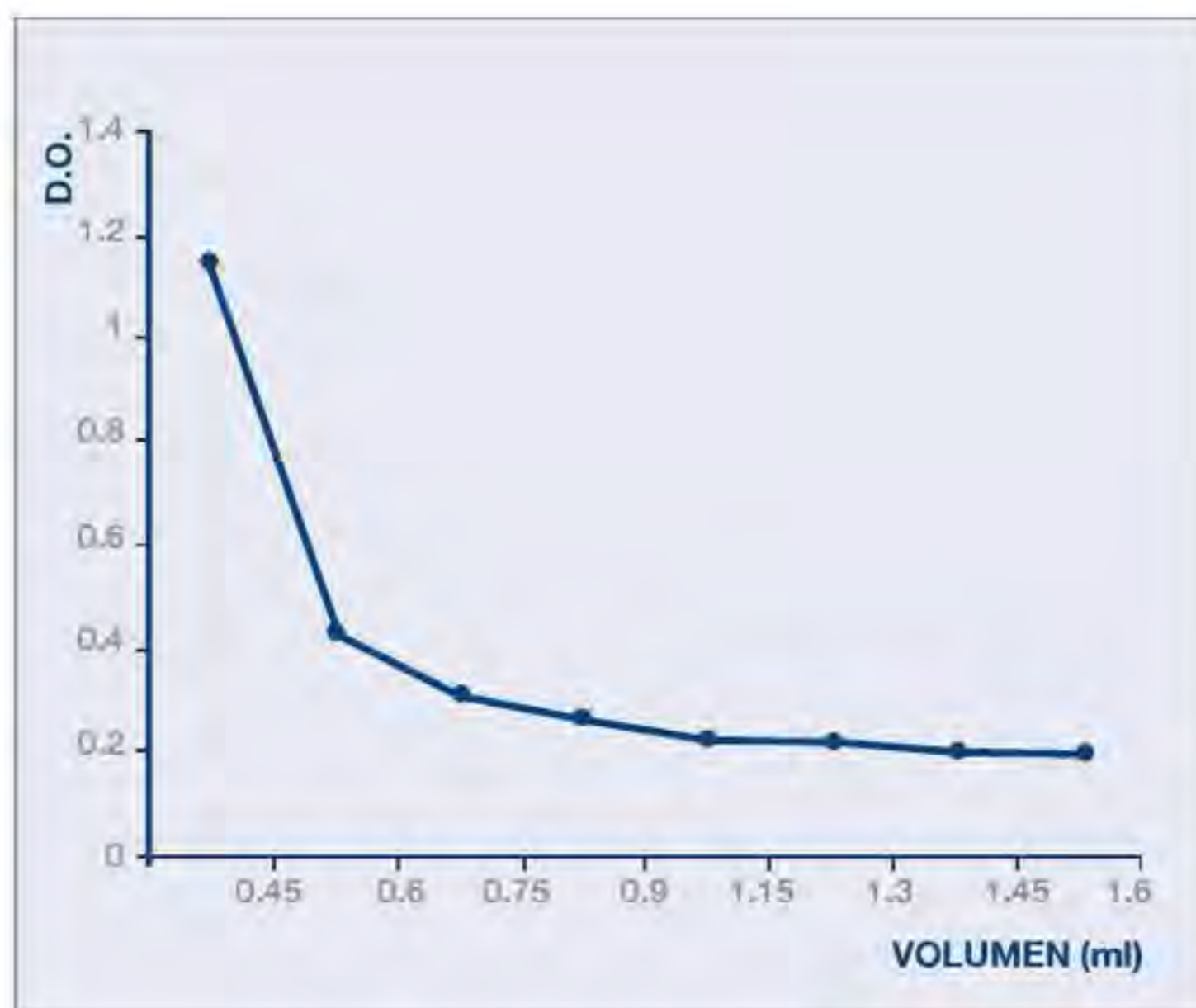
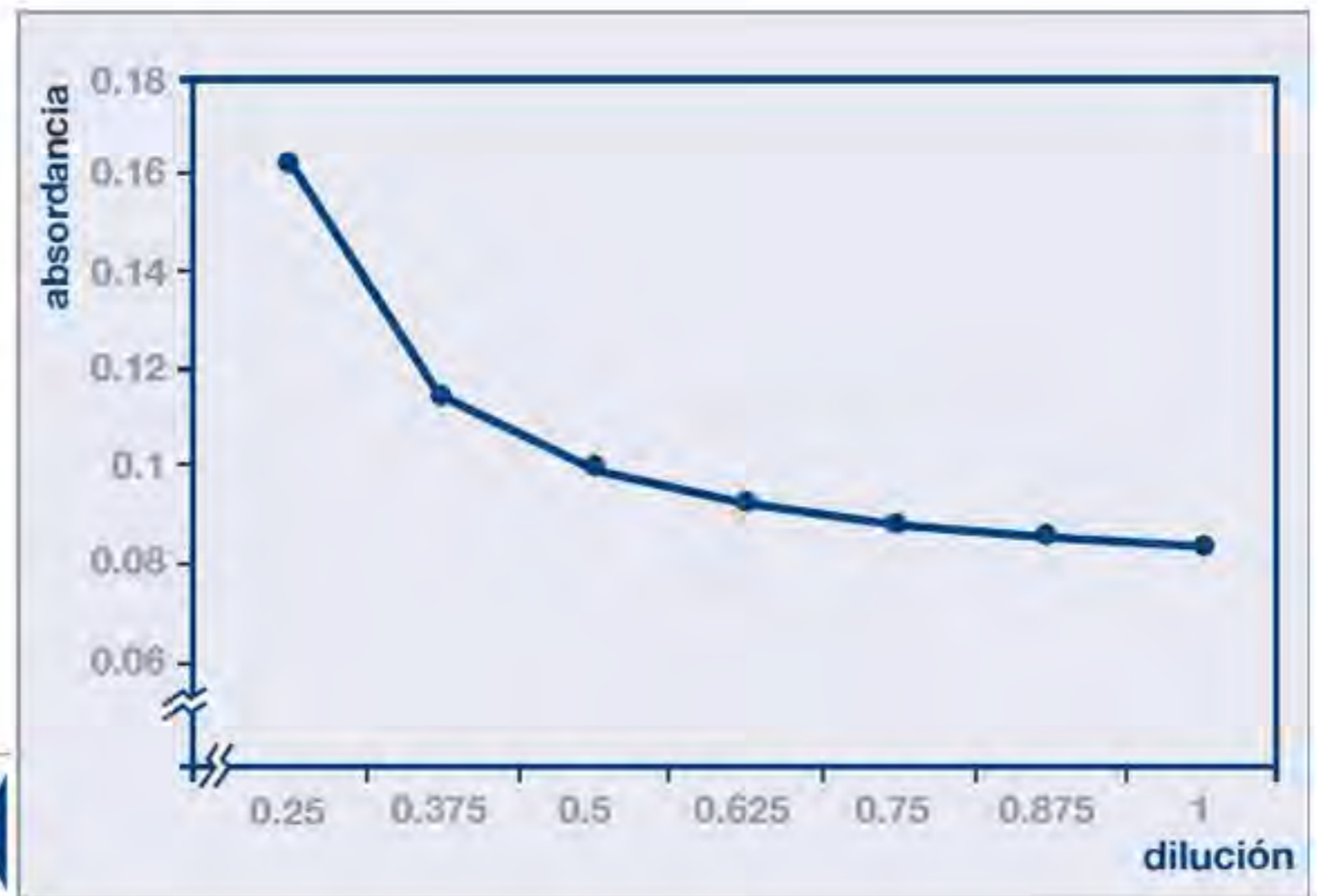


FIGURA 9. EFECTO DEL VOLUMEN DEL EXTRACTO SOBRE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE TARA.

### 7. Ensayo de Concentración Mínima Bactericida

La Figura 10 muestra que la actividad antimicrobiana se hace progresivamente mayor a medida que la concentración del extracto aumentaba, llegando a una máxima actividad cuando el extracto no se diluyó (en este caso, el extracto puro representa a 4 MIC).

FIGURA 10. ENSAYO DE LA MÍNIMA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA



### 8. Ensayo Bactericida (killing assay)

Cuando se grafica la actividad antimicrobiana (o densidad óptica) en función del tiempo de exposición al extracto (Figura 11A), se observa que los valores de absorbancia decayeron fuertemente en los primeros 20 minutos de acción (incubación) del extracto, luego de los cuales las diferencias fueron casi imperceptibles. La figura 11B presenta el mismo comportamiento, aunque en este caso lo que se está graficando es el cambio en el tamaño de la población microbiana en función del tiempo, confirmando que la mayor actividad antimicrobiana se logró a los 20 minutos.

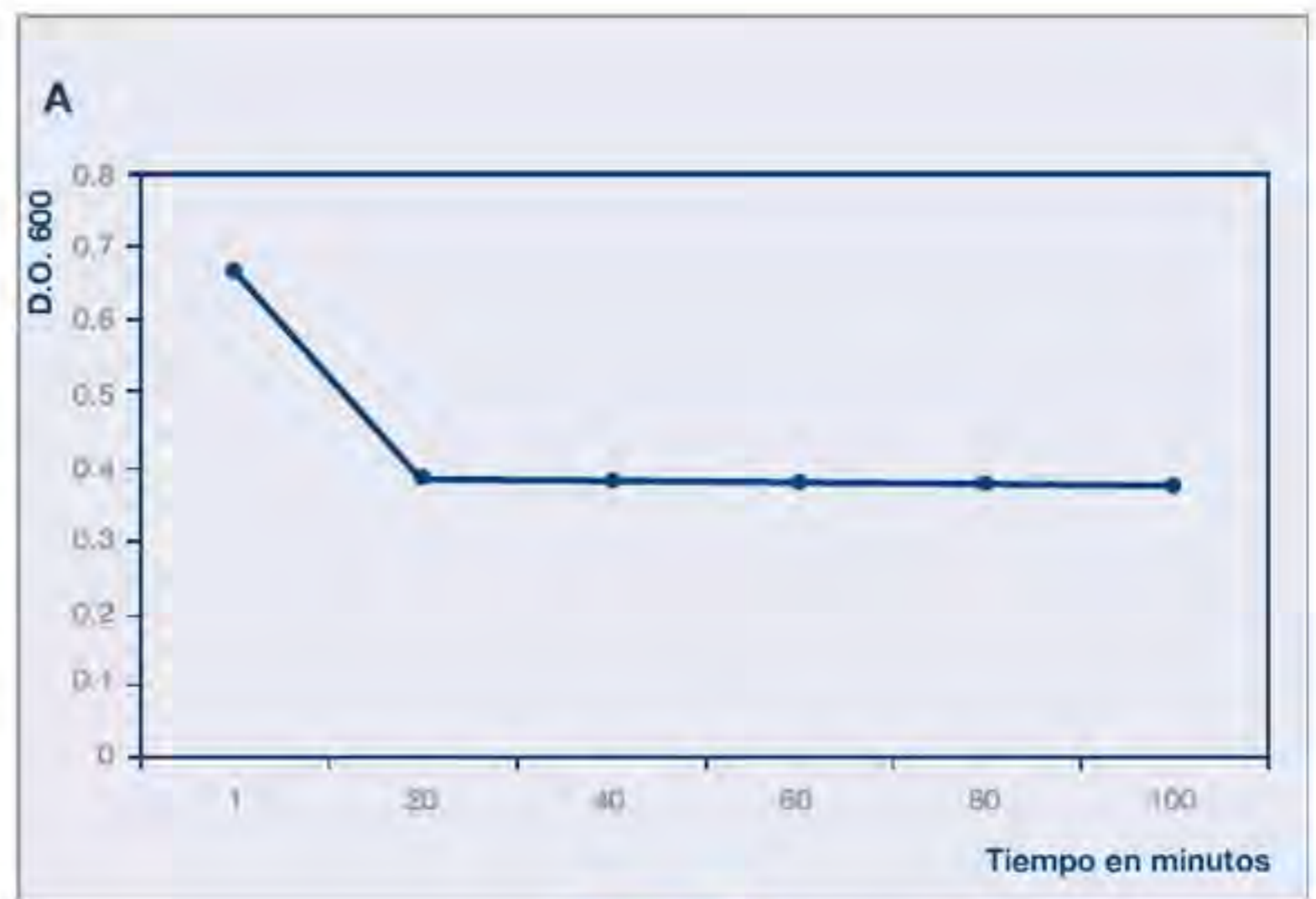


FIGURA 11. ENSAYO BACTERICIDA (KILLING ASSAY) CON EXTRACTOS DE TARA.

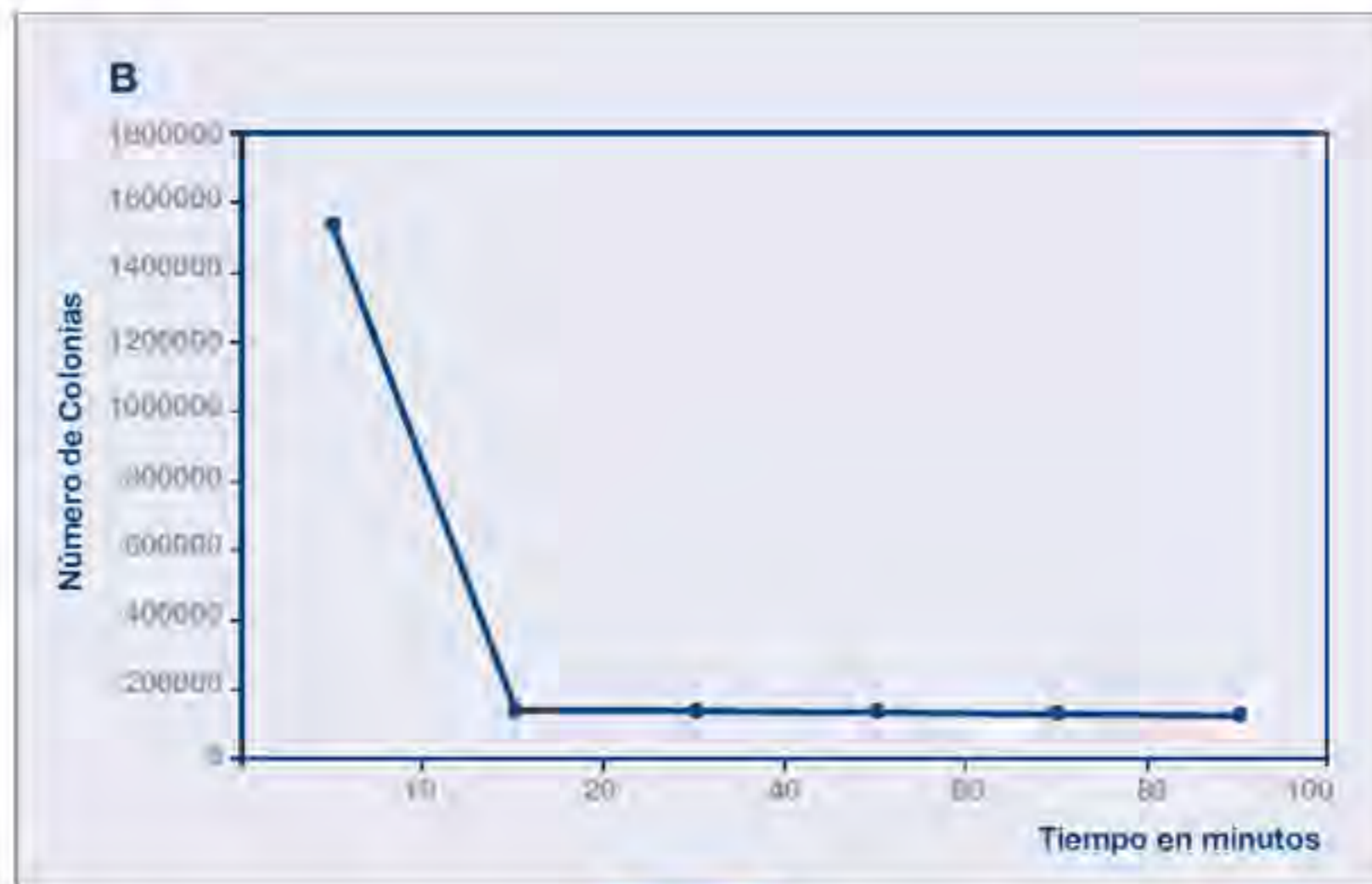


FIGURA 11. ENSAYO BACTERICIDA (KILLING ASSAY) CON EXTRACTOS DE TARA.

## DISCUSIÓN

El presente trabajo analiza de manera cuantitativa la actividad antimicrobiana de extractos de vainas maduras de tara frente a un cultivo de *Staphylococcus aureus*. La posibilidad de cuantificar la actividad antimicrobiana puede permitir el análisis sistemático de extractos para lograr validar en futuros trabajos su uso como método alternativo terapéutico frente a los medicamentos tradicionales. Existen muchas referencias bibliográficas que estudian la actividad antimicrobiana de extractos de plantas utilizando el método de excavación en placas, midiendo el diámetro del halo de inhibición. En esta metodología se debe tener en cuenta que el gradiente de concentración del extracto es inversamente proporcional a la distancia de la fuente y también depende del volumen de la sustancia en cada pozo. Por otro lado, el crecimiento de microorganismos depende de la población inicial y de la velocidad de crecimiento del mismo, por eso se recomienda usar un cultivo microbiano que se encuentre en la parte superior de la fase logarítmica de su curva de crecimiento. Con respecto a la estandarización del inóculo microbiano, para una prueba de susceptibilidad se utiliza un estándar de turbidez equivalente

al tubo con concentración 0.5 de la escala de Mac Farland o su equivalente óptico (la absorbancia a 625 nm debe estar entre 0.08 a 0.10) que a su vez equivale a  $1 \times 10^6$  UFC/ml (1,5). En vista de que la exactitud puede verse afectada por diferencias en la calidad de visión del experimentador, creemos que es más recomendable verificar la población microbiana o la densidad del estándar de la escala de Mac Farland usando un espectrofotómetro para obtener datos numéricos fijos de absorbancia.

Los ensayos realizados en cuanto a la vida media del extracto de tara y su estabilidad con respecto a la temperatura, los resultados obtenidos muestran una actividad relativamente estable por tres días y a diferentes temperaturas, incluso a  $100^\circ\text{C}$  por 30 minutos, lo cual estaría sugiriendo que el principio antimicrobiano no tiene naturaleza proteica, sino que esta actividad podría deberse a su elevado contenido de taninos y/o de flavonoides (5). Fuertes y col. (7) analizaron la actividad antimicrobiana y antifúngica de extractos de *Lupinus ballianus*, mostrando que la actividad antimicrobiana la poseían flavonoides y alcaloides, mientras que la actividad antifúngica se debía a los alcaloides.

Los ensayos de susceptibilidad antimicrobiana basados solo en la presencia o ausencia de una zona de inhibición sin importar el tamaño, no son representativos. Estos resultados se hacen confiables cuando se correlacionan las medidas del diámetro de la zona de inhibición con la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) que se define como la menor concentración de un antibiótico o sustancia que inhibe el desarrollo de las bacterias en un medio sólido. Otro término usado ha sido el de Concentración Mínima Bactericida (MBC), que se refiere a la menor concentración de un antibiótico o sustancia que mata totalmente a la bacteria en estudio. Los datos del MIC y de la MBC indicados en el presente trabajo se obtuvieron a través del método espectrofotométrico, puesto que se buscó una mayor objetividad en la obtención de los resultados, más que exactitud, debido a que Pfaller y col. (17), al comparar tres métodos de determinación del MIC usando un amplio rango de especies de hongos filamentosos (microdilución en caldo tradicional con diferentes tipos de lectura: el Visual, Visual después de agitación y el Espectrofotométrico), encontraron en todos los casos un grado de correlación muy alto, sugiriendo incluso que la agitación en la lectura visual y el método espectrofotométrico no mejoraban los resultados obtenidos con el método visual convencional. Ota y col. (15) también analizaron la actividad antimicrobiana del propóleo en la cavidad bucal, cuantificando sus valores en términos de absorbancia gracias al uso de un espectrofotómetro. En el presente trabajo, la determinación de la actividad antimicrobiana mediante espectrofotometría nos proporciona valores numéricos más exactos que los obtenidos por el método visual, midiendo diámetros de halos de inhibición, lo que ayudó en la precisión de los ensayos realizados, tal como se puede corroborar con la elevada correlación obtenida entre UFC/ml. y los valores de absorbancia obtenidos, calculándose un coeficiente de regresión  $r$  de 0.90.

El ensayo bactericida (Killing assay) consiste en determinar la capacidad bactericida de un determinado agente con respecto al tiempo. En el presente trabajo, el ensayo se realizó según Friedrich y col. (6), teniendo en cuenta el volumen adecuado y la Concentración Mínima Bactericida (4 MIC) previamente encontrados. Estos autores realizaron un ensayo similar para determinar la actividad bactericida contra *E. coli* de péptidos y

antibióticos, utilizando concentraciones de 4 veces sus valores respectivos de MIC.

En conclusión, los resultados presentados en el presente trabajo muestran una marcada actividad antimicrobiana de los extractos de la vaina madura de tara contra *Staphylococcus aureus*, aunque no se logró determinar una verdadera Mínima Concentración Bactericida debido a que incluso el extracto puro (4 MIC) no logró matar a todas las bacterias pero disminuyó ostensiblemente su población aproximadamente a los 20 minutos. Estos resultados sugieren que los extractos de tara tienen una actividad más bacteriostática que bactericida, disminuyendo la población microbiana pero no eliminándola por completo, lo cual podría limitar su posible uso terapéutico. Una actividad antimicrobiana relativamente limitada de la tara ha sido descrita también por Kloucek y col. (10) en un estudio de comparación de extractos etanólicos de nueve plantas utilizadas tradicionalmente en el distrito de Callería, aunque este resultado podría estar relacionado a las conclusiones de los trabajos de López y col. (12), quienes mencionan que la actividad antimicrobiana de la tara varía según la procedencia geográfica. Palacios (16) indicó que no se debería utilizar tara o sus extractos en caso de infecciones bacterianas, ni menos consumirla junto con medicamentos u otras plantas que contengan alcaloides ni suplementos minerales, ya que los taninos de la tara pueden precipitarlos impidiendo su absorción. Liu y col. (11) encontraron actividad antimicrobiana significativa solo en la cáscara de la vaina y no en la semilla, por lo que pusieron en duda la efectividad de los preparados utilizando el fruto completo de la tara. Sin embargo, los resultados de López y col. (12) y los nuestros (3) muestran una gran actividad bacteriana, la cual no debería desperdiciarse en el tratamiento, por ejemplo, de infecciones cutáneas a través de emplastos, mientras que no se hagan mayores estudios sobre su actividad bactericida en el interior del cuerpo, así como trabajos que esclarezcan qué procesos de absorción y excreción utilizaría el organismo y la probabilidad de que estos extractos generen toxicidad (2). Shibata y col. (20) mostraron una gran actividad sinérgica entre antibióticos betalactámicos y alquilgalatos purificados a partir de las vainas secas de tara, frente a cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilicina, lo que podría sugerir un uso de extractos o compuestos purificados de tara potenciando la actividad antimicrobiana de antibióticos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alanís, A.D. (2006) Evaluación de la actividad antibacteriana de algunas plantas medicinales usadas en la medicina tradicional mexicana, contra enterobacterias causantes de diarrea y disentería: estudio farmacológico y químico del pericarpio de *Punica granatum* L. (Granado). Tesis de Doctorado en Ciencias e Investigación en Medicina. México: Instituto Politécnico Nacional.
2. Añanca, E.R. (2009) Efecto antibacteriano in vitro del extracto acuoso de vainas de *Caesalpinia spinosa* (tara) en cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*. Tesis para Título de Químico Farmacéutico. Universidad Nacional Jorge Basadre, Tacna.
3. Araujo, J.; Córdova, B.; Rodríguez, M.; Salas, R. (2004) Cuantificación de la actividad antimicrobiana de *Caesalpinia spinosa* contra *Staphylococcus aureus*. Resúmenes del III Congreso Peruano de Plantas Medicinales y Fitoterapia.
4. Daniel, W. (1996) Bioestadística: base para el análisis de las Ciencias de la Salud. México: Ed. UTEHA;
5. Escobar, L.E.; Chávez, M. (2008) Efecto in vitro de diferentes concentraciones de extracto alcohólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze, sobre la viabilidad de *Corynebacterium diphtheriae*. Rev. Med. Vallejiana 2008; 5(1): 28-37.
6. Friedrich, C.; Scott, M.; Karunaratne, N.; Yan, H.; Hancock, R. (1999) Salt-resistant alpha-helical cationic antimicrobial peptides. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. July: p. 1542-1548.
7. Fuertes, C.; Roque, M.; Tristan, M. (1997) Flavonoides y alcaloides de *Lupinus ballianus* con actividad antibacteriana y antifúngica. Instituto de Microbiología. UNMSM;
8. Gegenheimer, P. Preparation of extracts from plants. Methods in Enzymology, vol. 182: p. 174-194.
9. Jawetz, E.; Melnick, J.; Adelberg, E.; Brooks, G.; Butel, J.; Ornston, N. (1999) Microbiología médica. Capítulo 14. 16ª Edición. México: Editorial El Manual Moderno; p. 241-248.
10. Kloucek P, Polesny Z, Svobodova B, Vlkova E, Kokoska L. (2005) Antibacterial screening of some peruvian medicinal plants used in Calleria District. J. Ethnopharmacol. 99 (2): 309-312.
11. Liu, H.; Lengua, L.; León, G.; La Torre, C.; Jorge, M.; Huapaya, J.; Chauca, J. (2002) Evaluación de la actividad antibacteriana in vitro de los extractos de *Caesalpinia spinosa* "tara" y el *Eucalyptus sp.* "Eucalipto". Horizonte Médico Volumen 2 (1-2).
12. Lopez, C.; Garro, V; Yrel, V.; Gallardo, T. (1998) Acción antimicrobiana de *Caesalpinia* (Molina) Kuntze o tara, de diferentes regiones del Perú. Ciencia e Investigación 1 (1).
13. Mamani, E.; Luján, D.; Pajuelo, G. (2006) Perfil de sensibilidad y resistencia de *Staphylococcus aureus*. Experiencia en el Hospital Nacional Hipólito Unanue. An. Fac. Med. 67(2): 120-124.
14. Murray, P.; Kobayashi, G.; Faller, M.; Rosenthal, K. (1999) Microbiología Médica. Capítulo 19. 2ª Edición. Washington: Editorial Edide; p. 166-179.

15. Ota, C.; Muzetti, P.; Schimidit, C.; Tsunezi, M. (1998) Actividade da própolis sobre bacterias isoladas da cavidade bucal. LECTA, Bragança Paulista 16(1): 73-77.
16. Palacios, J. (1997) Plantas medicinales nativas del Perú. 2da. Edición. Lima: CONCYTEC; p. 248-250.
17. Pfaller, M.A.; MessEr, S.A.; Coffmann, S. (1995) Comparison of visual and spectrophotometric methods of MIC endpoint determinations by using broth microdilution methods to test five antifungal agents, including the new triazole D0870. Journal of Clinical Microbiology 33(5): 1094-1097.
18. Pretell, J.; Ocaña, D.; Jon, R. y Barahona, E. (1985) Apuntes sobre algunas especies forestales nativas de la sierra peruana. Lima. Edición Proyecto FAO/Holanda/Infor.; 103-107.
19. Rodriguez, M. (1998) Estudio de la biodiversidad cuenca del Cotahuasi. La Unión - Arequipa. Flora Medicinal. Publicación de Asociación Especializada para el Desarrollo (AEDES). La Unión - Arequipa: Akuarella Impresiones y Editores; p. 108-110.
20. Shibata, H.; Kondo, K; Katsuyama, R.; Kawazoe, K.; Sato, Y.; Murakami, K.; Takaishi, Y.; Arakaki, N.; Higuti, T. (2005) Alkyl gallates, intensifiers of beta-lactam susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 49(2): 549-555.
21. Villar, M. y Villavicencio, O. (2001) Manual de fitoterapia. Lima: EsSalud - OPS; p. 300-302.

E-MAIL: JARAQUIDIAZ@HOTMAIL.COM  
E-MAIL: RAMSES\_SALAS@YAHOO.COM

RECEPCIÓN:  
01 DE JULIO DE 2009

ACEPTACIÓN:  
24 DE JULIO DE 2009