

Actividad antibacteriana de alcaloides de *Tabernaemontana catharinensis* A.DC.

The antibacterial activity of alkaloids obtained from Tabernaemontana catharinensis A.DC.

GUIDA A¹, DE BATTISTA G², BARGARDI S¹

¹Cátedra de Microbiología General-Bqca

²Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales. Av. Mariano Moreno 1375.cp:3300 Misiones, Argentina.

RESUMEN

Se estudió la actividad antibacteriana de extractos secos metanólicos y fracción alcaloidea obtenidos de la corteza del tronco de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC., por el método de difusión de Kirby-Bauer.

Se detectó actividad frente a *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* metilino resistentes, *Streptococcus faecalis*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus epidermidis*, *Acinetobacter lwoffii*.

PALABRAS CLAVES: Actividad antibacteriana. Alcaloides. *Peschiera australis*. *Tabernaemontana affinis*. *Tabernaemontana catharinensis*.

ABSTRACT

In this work the antibacterial activity of dry methanol extracts and alkaloid fraction, obtained from the root bark of Tabernaemontana catharinensis A. DC. was studied in accordance with the standardized Kirby-Bauer technique. Antibacterial activity was detected against Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Escherichia coli, methicillin-resistant Staphylococcus aureus, Streptococcus faecalis, Salmonella enteritidis, Shigella flexneri, Staphylococcus epidermidis, Acinetobacter lwoffii.

KEY WORDS: Antibacterial activity. Alkaloid. *Peschiera australis*. *Tabernaemontana affinis*, *Tabernaemontana catharinensis*.

INTRODUCCION

Las distintas especies del género *Tabernaemontana* se encuentran distribuidas en el trópico y en regiones subtropicales del mundo. En América se han encontrado 44 especies del género, siendo la *Tabernaemontana catharinensis*, la única conocida en Argentina y Paraguay.¹

Tabernaemontana catharinensis A.DC. (Apocináceas) conocido con el nombre vulgar de "Horquetero" o "Zapiranguí", es un arbusto que puede medir de 1 a 9 metros de altura, con un tronco de 2 a 35 cm de diámetro, de corteza ligeramente rugosa y grisásea.² Se clasifica tam-

INTRODUCTION

The different species of the genus *Tabernaemontana* are to be found distributed in tropical and sub-tropical regions of the world. In America, 44 different species of the genus have been identified. However, in Argentina and Paraguay the only known type is the *Tabernaemontana catharinensis*.¹

Tabernaemontana catharinensis A.DC. (Apocynaceae), known locally by the common name "Horquetero" or "Zapiranguí", is a shrub measuring between 1 and 9 metres in height, with a trunk of between 2 and 35cm in diameter. Its

bién como *Tabernaemontana affinis* y *Peschiera australis*.

Las referencias sobre el uso popular de la planta en la región nordeste de Argentina dan cuenta de su utilización para la desinfección de heridas, infecciones de gargantas, ojos, uñas, gonorrea, también en diarreas y frente a infecciones por parásitos³. Es muy probable que esta acción se deba a alcaloides presentes en el género, ya que estos constituyen la mayoría de los metabolitos secundarios encontrados. Se han aislado más de 250 estructuras de bases diferentes.^{4,5,6}

En trabajos realizados anteriormente por los autores, se ha encontrado que extractos crudos metanólicos y etanólicos de corteza de tronco de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. recolectada en la Provincia de Misiones Argentina, tenían actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*.^{7y8}

En este trabajo se estudió la actividad antibacteriana de extractos secos metanólicos y fracción alcaloidea de corteza de tronco de *Tabernaemontana catharinensis* frente a 12 (doce) cepas, mediante la técnica de Kirby-Bauer estandarizada por la OMS.^{9,10 Y 11}

MATERIALES Y MÉTODOS:

Especie vegetal: Corteza de tronco de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC., obtenida en bosques abiertos de la Provincia de Misiones por el Ing. Fernando Kramer.

El material, clasificado por personal docente del Programa florístico y genética vegetal, fue depositado para su conservación en el Herbario de la Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones.

El material fue secado en el laboratorio y molido a tamaño de 5 a 10 mesh en un molino a cuchillas tipo Wiley, luego envasado en recipientes adecuados, y conservado en lugares secos y frescos, constituyendo la muestra a emplear para las distintas experiencias.

Extractos secos: Se efectuaron extracciones exhaustivas con un extractor tipo soxhlet durante 6 horas, previa maceración por 12 (doce horas). Solvente utilizado metanol. Rendimiento obtenido 16,23%.

bark is slightly rugged in appearance and grayish in colour². It has also been classified as *Tabernaemontana affinis* and *Peschiera australis*.

References have been made to the popular usage of the plant in the North-eastern region of Argentina, where it has been used in the disinfection of wounds, in throat eye and fingernail infections, in gonorrhoea and diarrhoea treatments and against infections caused by parasites³. It is very probable that this antibacterial action is to be attributed to the alkaloids that are present in the genus, given that these constitute the majority of the secondary metabolites found. Over 250 different base structures have been isolated.^{4,5,6}

In previous studies carried out by these authors, crude methanol and ethanol extracts from bark from *Tabernaemontana catharinensis* A. DC., collected in the province of Misiones, Argentina, showed antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*.^{7y8}

In this work, the antibacterial activity of dry methanol extracts and alkaloid fraction from bark from *Tabernaemontana catharinensis* was tested on 12 (twelve) strains, using the Kirby-Bauer technique, as standardised by the WHO.^{9,10 Y 11}

MATERIALS AND METHODS

Vegetable species: *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. bark was obtained from open forests in the Province of Misiones by the Engineer Fernando Kramer.

The material, once classified by teaching staff involved in the Floral and Vegetable Genetics program, was deposited at the herbarium at the Faculty of Exact Chemical and Natural Sciences of the National University of Misiones.

The material was dried in the laboratory, ground to a mesh size of 5 to 10 in a Willey type blade grinder, placed into appropriate containers, stored in a cool dry place, and subsequently used for the following experiments.

Dry extracts: *Exhaustive extractions carried out with a soxhlet type extractor for 6 hours were carried out, after previous soaking for 12 hours. The solvent used was methanol. Yield obtained was 16.23%.*

Extracción de la fracción de alcaloides:

El extracto seco metanólico obtenido, se retomó con HCl al 2% y posteriormente se le realizó una partición con cloroformo. A esta fracción se denominó B1. Al extracto acuoso ácido se lo neutralizó con OHNa al 10 % (pH 7,8). Luego se realizaron particiones con cloroformo y se obtuvo la fracción B-2. Se llevó luego a pH 11,2 y se realizó una nueva extracción con cloroformo - fracción B3.

En cada una de las fracciones se efectuaron los ensayos de caracterización de alcaloides con los reactivos Dragendorff, Mayer, Wagner, Hagger.

Se corroboraron los resultados por cromatografía-espectrometría de masa modelo HPGC-5890 Serie II PLUS con detector HPMSD-5890. La columna utilizada fue una HP-5MS (30m x0,25mm)- crosslinked 5% PH-ME siloxane. Los espectros de masa fueron comparados con los espectros de la biblioteca Wiley 138.

Pruebas de sensibilidad:

Los discos, de 6 mm de diámetro, fueron preparados con papel Whatman N°3. Las fracciones que se utilizaron para la experiencia se prepararon solubilizando el extracto seco con metanol. Se impregnaron los discos para tener una carga correspondiente a 500µg, 1000µg, 2000µg y 4000µg y para la fracción B2 se trabajó con cargas de 500 y 2000µg. Se secaron los discos en estufa a 37°C durante un tiempo variable según la carga. Como control de inactividad del solvente se utilizaron discos impregnados con metanol. Como blanco positivo se utilizaron discos de gentamicina y ampicilina.

Los diámetros de inhibición fueron medidos en milímetros y todas las fracciones se ensayaron con cada microorganismo por duplicado.

Cepas bacterianas: Se emplearon las siguientes cepas: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Enterobacter cloacae* ATCC 202, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus metilino resistentes* ATCC 43300, *Streptococcus faecalis* ATCC 29232, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Salmonella enteritidis* EB 1874/88, *Shigella flexneri* 2EB 7, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 1220228, *Acinetobacter lwoffii*.

Extraction of the alkaloid fraction:

The dry methanol extract obtained was rehydrated with HCl at 2% and subsequently fractionated with chloroform. This fraction was given the reference B1. The aqueous acidic extract was neutralised with OHNa at 10 % (pH 7.8). Fractioning was subsequently performed using chloroform and the fraction B2 was thus obtained. After raising pH to 11.2, a subsequent extraction with chloroform was performed, and the fraction B3 was thus obtained.

Alkaloid characterisation tests, using Dragendorff, Mayer, Wagner, Hagger reagents, were performed on each of the fractions.

The results were corroborated through chromatography mass spectrometry, model HPGC-5890, Series II PLUS, with a HPMSD-5890 detector. The column used was a HP-5MS (30m x0.25mm)-crosslinked 5% 5% PH-ME siloxane. The mass spectra were compared with the Wiley 138 registry.

Sensitivity tests:

The 6mm diameter disks were prepared with no.3 Whatman paper. The fractions that were used for the experiment were prepared by solubilizing the dry extract with methanol. The disks were impregnated in order to obtain loads of 500µg, 1000µg, 2000µg and 4000µg. In the case of fraction B2, loads of 500 y 2000µg were employed. The disks were oven dried at 37°C for varying time periods, according to the loads concerned. Disks impregnated with methanol only were used as control, in order to test the inactivity of the solvent. Gentamycin and ampicillin disks were used as positive targets.

The inhibition diameters were measured in millimetres and all the fractions were tested with each microorganism in duplicate.

Bacterial strains: The following strains were used: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Enterobacter cloacae* ATCC 202, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus metilino resistentes* ATCC 43300, *Streptococcus faecalis* ATCC 29232, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Salmonella enteritidis* EB 1874/88, *Shigella flexneri* 2EB 7, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 1220228, *Acinetobacter lwoffii*.

RESULTADOS

Los resultados correspondientes a las pruebas de sensibilidad se informan en la tabla N°1. Los ensayos de caracterización realizados a las fracciones se indican en la tabla N°2 y en el gráfico N°1 se presenta el cromatograma obtenido del análisis por cromatografía GC-MS de la fracción B2.

RESULTS

The results of the sensitivity tests are presented in table 1. The characterisation tests carried out on the fractions are shown in table No.2. In graph No. 1, the chromatogram obtained from GC-MS chromatographic analysis of fraction B2 is presented.

TABLA 1. Inhibición de crecimiento de Bacterias Gram positivas y Gram negativas.

MICROORGANISMOS ENSAYADOS	Extracto seco metanólico Carga por disco				Fracción alcaloidea B2		Controles positivos	
	500µg	1000 µg	2000 µg	4000 µg	500 µg	2000 µg	Gentamicina	Ampicilina
<i>S. aureus</i>	8	11	13	15,5	7	11,5	21,5	35
<i>S. aureus</i> Meti R	8	9,5	17	19,5	8	18,5	23,5	17
<i>B. subtilis</i>	10	13	24	25,5	18	24	28	34
<i>Str. faecalis</i>	R	R	14	18,5	7	14	20,5	33
<i>S. epidermidis</i>	9	13	17,5	20	7	19,5	20	23
<i>E. coli</i>	R	R	7,5	10,5	7	10,5	22,5	24
<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	7	7	7	9	R
<i>Ent. cloacae</i>	R	R	R	7	R	7	R	R
<i>Ps. aeruginosa</i>	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>Salm. enteritidis</i>	R	R	7	7,5	R	7,5	24	31
<i>Shig. flexneri</i>	R	R	7,7	13	7	12,5	19,5	10
<i>Acynet. lwoffii</i>	8	12	17,5	22	7	21,5	22,5	24
Blanco de solvente	R	R	R	R	R	R	R	R

Observaciones : diámetro de la zona de inhibición en mm.

TABLE 1. Growth Inhibition of Gram positive and Gram negative Bacteria.

MICROORGANISMS Tested	Dry Methanol extract Load per disk				alkaloid Fraction B2		Positive Controls	
	500µg	1000 µg	2000 µg	4000 µg	500 µg	2000 µg	Gentamycine	Ampiciline
<i>S. aureus</i>	8	11	13	15.5	7	11.5	21.5	35
<i>S. aureus</i> Meti R	8	9.5	17	19.5	8	18.5	23.5	17
<i>B. subtilis</i>	10	13	24	25.5	18	24	28	34
<i>Str. faecalis</i>	R	R	14	18.5	7	14	20.5	33
<i>S. epidermidis</i>	9	13	17.5	20	7	19.5	20	23
<i>E. coli</i>	R	R	7.5	10.5	7	10.5	22.5	24
<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	7	7	7	9	R
<i>Ent. cloacae</i>	R	R	R	7	R	7	R	R
<i>Ps. aeruginosa</i>	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>Salm. enteritidis</i>	R	R	7	7.5	R	7.5	24	31
<i>Shig. flexneri</i>	R	R	7.7	13	7	12.5	19.5	10
<i>Acynet. lwoffii</i>	8	12	17.5	22	7	21.5	22.5	24
Blanco de solvente	R	R	R	R	R	R	R	R

Observations : diameter of the area of inhibition in mm.

Tabla 2: Ensayos de caracterización fracciones.

Reactivos	B1	B2	B3
Dragendorff	+++	+++++	+++
Mayer	++	+++	++
Hagger	-/+	+	-
Wagner	+	++	+

Observaciones: Tubo de ensayo: 1 cm de diámetro. +++++: 1cm de altura el precipitado, +++++: 0,8 cm, +++: 0,4 cm, +: 0,1 cm, +/-: turbidez

Table 2: Fraction characterisation tests.

Reactivos	B1	B2	B3
Dragendorff	+++	+++++	+++
Mayer	++	+++	++
Hagger	-/+	+	-
Wagner	+	++	+

Observations: Test tube: 1 cm de diameter. +++++: 1cm in height of precipitate, +++++: 0.8 cm, +++: 0.4 cm, +: 0.1 cm, +/-: Blurriness

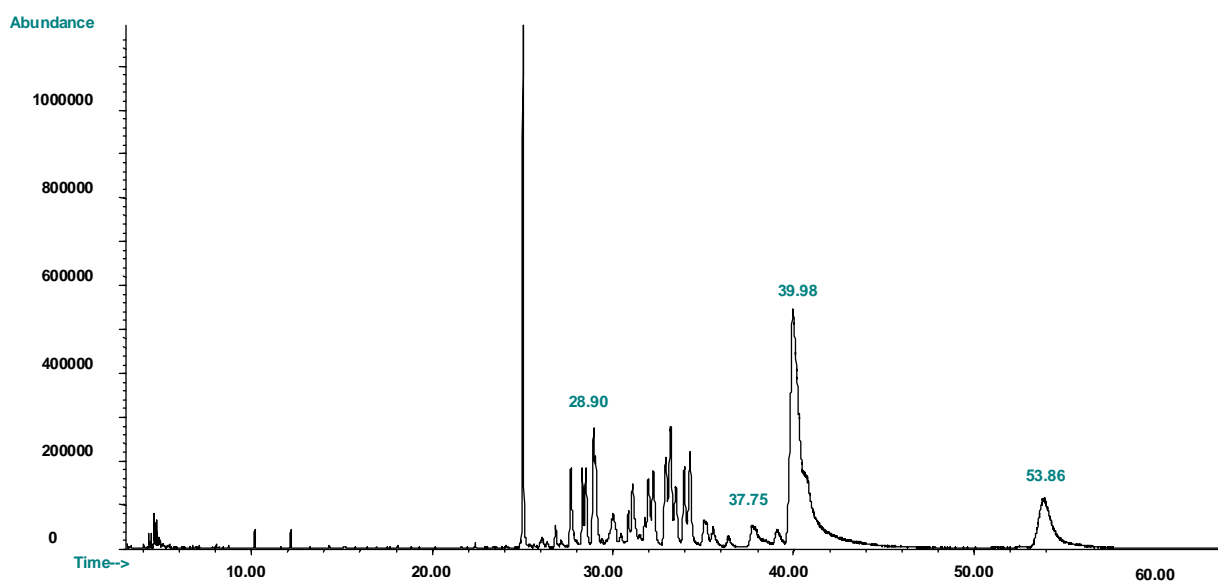


GRÁFICO 1: Cromatograma de la fracción B-2.

GRAPH 1: Chromatogram of the fraction B-2.

1. 28.88 – Coronaridine (18-Ibogamine Carboxilato de Metilo) - CAS: 467-77-6
2. 37.72 – 12-Metoxi-Ibogamine - CAS: 83-74-9
3. 39.84 – 12-Metil, 18-Acido Ibogamine Carboxílico - CAS: 510-22-5
4. 53.80 – Voachalotine (1-Metil, 17-Hidroxi, 16-Sarpagan Carboxilato de Metilo) - CAS: 664-22-5

1. 28.88 - Coronaridine (18-Ibogamine Methyl Carboxylate) - CAS: 467-77-6
2. 37.72 - 12-Methoxy-Ibogamine - CAS: 83-74-9
3. 39.84 - 12-Methyl, - Ibogamine 18-Carboxylic Acid- CAS: 510-22-5
4. 53.80 - Voachalotine (1-Methyl, 17-Hydroxy, 16-Sarpagan Methyl Carboxylate) - CAS: 664-22-5

DISCUSIÓN /CONCLUSIONES:

En la búsqueda de separar componentes con propiedades antibacterianas, se obtuvieron tres fracciones del extracto seco metanólico (muestra), en base a diferencias en solubilidades y pH.

El seguimiento químico efectuado por cromatografía GC-MASA indicó la presencia de los mismos alcaloides en cada una de las fracciones (B1, B2 y B3) con la metodología propuesta. Por tal motivo se realizaron las experiencias con la fracción B2 que fue la que se obtuvo con mayor rendimiento en alcaloides.

En las mismas condiciones de prueba los extractos y la fracción alcaloidea demostraron actividad más importante frente a bacterias Gram positivas. Sería de interés trabajar con cargas superiores por disco para las bacterias Gram negativas que no fueron francamente inhibidas y que podrían tener distinto comportamiento en otras condiciones de prueba.

La actividad antibacteriana está relacionada a compuestos alcaloideos presentes en la especie de acuerdo a los resultados obtenidos por cromatografía GC-MASA e investigaciones efectuadas por otros grupos de investigación con otras especies del género. Se prosigue el estudio a los efectos de poder identificar el /o los alcaloides responsables de la actividad antibacteriana.

Los resultados obtenidos con las bacterias Gram negativas alientan la continuidad de su estudio en virtud de la multiresistencia ofrecida por éstas.

Este trabajo de investigación tiene el propósito de contribuir al conocimiento del potencial medicinal de la flora autóctona de la región (Misiones –Argentina).

AGRADECIMIENTOS

— Al Centro de Investigación y de Desarrollo Tecnológico de la Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales.

— Al Laboratorio Central de la Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales por los análisis cromatográficos efectuados.

DISCUSSION/CONCLUSIONS:

In an attempt to separate components with antibacterial properties, three fractions from dry methanol extraction (sample) were obtained, on the basis of differences in solubility and pH.

Chemical monitoring, carried out with Chromatography GC-Mass, indicated the presence of the same alkaloids in each of the fractions (B1, B2 and B3), using the methodology proposed. For this reason, the experiments were carried out with the fraction B2, due to the fact that this fraction gave a higher yield of alkaloids.

Under identical test conditions, the extracts and alkaloid fraction demonstrated a greater degree of activity against Gram positive bacteria. In the case of Gram negative bacteria, which were quite frankly not inhibited, but could show different behaviour under different experimental conditions, it would be of interest to work with disks carrying a greater sample load.

As demonstrated by the results obtained from Chromatography GC-Mass, as well as studies carried out on other species of the genus by other research groups, antibacterial activity is attributable to the alkaloid compounds present. This study should be continued, so as to be able to identify the alkaloid/alkaloids that are responsible for antibacterial activity.

The results obtained for Gram negative bacteria provide the impetus for continued study, given that these bacteria appear to present a form of multi-resistance to antibacterial activity.

This research was carried out with the aim of contributing to the knowledge of the potential medicinal properties of the autochthonous flora of the region (Misiones –Argentina).

ACKNOWLEDGEMENTS

— To the Centre for Research and Technological Development at the Faculty of Exact Chemical and Natural Sciences.

— To the Central Laboratory at the Faculty of Exact Chemical and Natural Sciences for the chromatographic analyses carried out.

BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAPHY

1. Pereira P.S.; Dias D.A.; Franca S.C.; Sampaio S.V.; Indole Alkaloids from *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. Acta Horticult, 1999.501:171-6
2. Burkart A., "Flora ilustrada de Entre Ríos (Argentina). Colección científ. de INTA. Buenos Aires, (1979).Tomo V: 96-98.
3. Van Beek T.A.; Deelder A.M.; Verpoorte R.; Baerheim Svendsen A.; "Antimicrobial, Antiamoebic and Antiviral screening of some *Tabernaemontana* species", *Planta Med.* 1.984 Apr,50(2):180-5
4. Van Der Heijden R.; Hermans Lokkerbol A.; Verpoorte R.; Baerheim Svendsen A.; "Pharmacognostical studies of *Tabernaemontana* species. XX Ion- pair droplet counter-current chromatography of indole alkaloids from suspension cultures", *J. Chromatogr.* 1987.396:410-415.
5. Teris A.van Beek and Marian A. J.T. van Gessel ; Alkaloids of *Tabernaemontana Species*, Alkaloids: Chemical and Biological perspectives Ed. John Wiley and Sons inc 1988.Vol6,2:75-85.
6. V. Munoz,C, Moretti, M.Sauvain, et al " Isolation of Bis-Indole alkaloids with antileishmanial and antibacterial activities from *Peschiera van heurkii*. *Planta Med.* 1994.60:455-459.
7. Bargardi S, Kramer F, Medvedeff,M, Jordá G y Guida A. Actividad antibacteriana de *Peschiera australis*(Muell) Miers sobre *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*. *Revista de Ciencia y Tecnología,UnaM* 2001.Año4/Nº4ª.
8. Guida A,Kramer F,Jordá G,Amer L,Medvedeff M y Bargardi S. *Staphylococcus aureus* Meticilino-resistentes,sensibles a Extractos de *Tabernaemontana catharinensis* A.DC. *Acta Farm. Bonaerense* 2001. 20(3):205-8
9. Bauer A. W., Kirby W.M.M.,Sherris,J.C.,Turck,M.,1966.Antimicrobial Investigations.*Am.J.Clin.Pathol.*45:493-496.
10. Balows,A. Prueba de Susceptibilidad a los Antibióticos. Ed. Méd. Panam. S.A. Bs. As.1976.2:16-25.
11. Serie de Informes Técnicos Nº 610 "Comité de expertos de la OMS en patrones biológicos. OMS Ginebra 1977. 102:142.