

Actividad antibacteriana de extractos y fracciones de hojas de *Siparuna sessiliflora* Kunth A. DC. (limoncillo)

Anti-bacterial action of extracts and fractions from *Siparuna sessiliflora* Kunth A. DC (limoncillo)

Guillermo F. Padilla González,^I MSc. Elizabeth Gil Archila^{II}

^I Laboratorios Naturcol S.A. Bogotá, Colombia.

^{II} Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

RESUMEN

Introducción: *Siparuna sessiliflora* Kunth A. DC. es una especie vegetal comúnmente conocida en Colombia como limoncillo, utilizada por parte de varias comunidades indígenas para tratar diferentes problemas de salud. A pesar de contar con diversos registros de usos etnobotánicos, esta especie ha sido poco estudiada desde el punto de vista fitoquímico o de su actividad biológica.

Objetivos: evaluar la actividad antibacteriana de los extractos y las fracciones obtenidos a partir de las hojas de *Siparuna sessiliflora* sobre *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Métodos: el material vegetal fue extraído por maceración en frío con éter de petróleo y etanol 96 %; estos extractos se fraccionaron por métodos cromatográficos y partición líquido/líquido; su actividad antibacteriana se evaluó por el método de difusión en gel por perforación en placa. Posteriormente, se identificaron los principales compuestos responsables de la bioactividad por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

Resultados: se encontró que las fracciones de alcaloides Alk 1 y Alk 2 presentaron actividad frente a *B. subtilis*, *S. aureus* y *E. coli*. Adicionalmente, la subfracción Alk 2A fue la más activa frente a *B. subtilis*. Se identificaron sobre todo alcaloides isoquinolínicos y un derivado del ácido cinámico como posibles compuestos responsables de la bioactividad.

Conclusiones: se reportó la actividad antibacteriana de *S. sessiliflora* frente a bacterias grampositivas y gramnegativas, y se generó nuevo conocimiento sobre su fitoquímica que corrobora su uso tradicional en la cura de cuadros infecciosos.

Palabra clave: actividad antibacteriana, alcaloides isoquinolínicos, *Siparuna sessiliflora*, Siparunaceae.

ABSTRACT

Introduction: *Siparuna sessiliflora* Kunth A. DC. is a plant species popularly known in Colombia as «limoncillo» and used by several indigenous communities for treating different health disorders. Despite the many records of its ethnobotanical uses, this species has been poorly studied from a phytochemical or biological standpoint.

Objectives: to evaluate the antibacterial activity of the extracts and fractions obtained from *Siparuna sessiliflora*'s leaves against *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*.

Methods: the plant material was extracted by cold maceration with petroleum ether and 96% ethanol. Those extracts were fractionated by chromatographic methods and liquid-liquid partitioning; additionally, its antibacterial activity was assessed by gel diffusion. Subsequently, there were identified the main bioactive compounds by gas chromatography-mass spectrometry.

Results: it was found that the alkaloidal fractions Alk 1 and Alk 2 were active against *B. subtilis*, *S. aureus* and *E. coli*. Additionally, the subfraction Alk 2A was the most active against *B. subtilis*. Isoquinoline alkaloids and a cinnamic acid derivative were identified as possible compounds responsible for bioactivity.

Conclusions: the antibacterial activity of *S. sessiliflora* against Gram positive and Gram negative bacteria was reported, so the new knowledge about its phytochemistry endorses its traditional use in the treatment of infections.

Key words: antibacterial activity, Isoquinoline alkaloids, *Siparuna sessiliflora*, Siparunaceae.

INTRODUCCIÓN

El género *Siparuna* (Familia Siparunaceae) comprende un diverso grupo de 235 especies vegetales ampliamente distribuidas en el hemisferio sur, máxime en regiones tropicales de Centro y Suramérica.¹ Este género se caracteriza por biosintetizar compuestos tales como sesquiterpenos, flavonoides y alcaloides isoquinolínicos, sobre todo del tipo aporfinicos;² compuestos a los cuales se les ha identificado importantes actividades biológicas, tales como antibacterianas, antimalaricas y antileishmaniasis, entre otras.³⁻⁵

S. sessiliflora (Kunth) A. DC. (sin. *Citriosma mollicoma* Mart. ex Tul., *Citriosma radiata* Poepp. ex Endl., *Citrosma dubia* Kunth) conocida comúnmente en Colombia como limoncillo, limón de monte o limón cimarrón, se encuentra distribuida en claros de zonas boscosas, en alturas desde los 50 hasta los 1 700 m sobre el nivel del mar.⁶ Esta especie presenta diversos registros de usos etnobotánicos por parte de comunidades indígenas que habitan en Colombia, Ecuador y Perú, como son los Huitoto, Nukak, Maraña, Quichua y Aguaruna, para tratar problemas de salud como la fiebre y el dolor de cabeza; igualmente, las hojas de esta especie son utilizadas a manera de cataplasma para aliviar el reumatismo y curar infecciones como el herpes o las generadas por picaduras de insectos.⁶

Esta planta a pesar de contar con varios registros de usos etnobotánicos, ha sido muy poco estudiada desde el punto de vista fitoquímico, debido a lo cual, la presente investigación tuvo por objetivo evaluar la actividad antibacteriana que presentan los extractos y las fracciones obtenidas a partir de las hojas de esta especie.

MÉTODOS

Se colectaron 5 000 g de hojas frescas de *S. sessiliflora* en el municipio de Viotá Cundinamarca, Vereda Brasil (Sendero ambiental Mogambo), y un ejemplar de esta especie fue identificado por García N. e incluido en la colección del Herbario de la Pontificia Universidad Javeriana, con el número de colección 013690.

Obtención de extractos y fracciones

El secado de las hojas se llevó a cabo a temperatura ambiente y después fueron pulverizadas en un molino de cuchillas, obteniéndose un peso de 1 025 g. Estas fueron sometidas a maceración en frío con éter de petróleo y con etanol por 72 h continuas, en 3 repetidas ocasiones. Ambos extractos se llevaron a sequedad en un rotoevaporador Büchi R-208 (extracto etanólico 84,5 g y extracto de éter de petróleo 20,5 g) y posteriormente se hizo su floculación y fraccionamiento.

Se tomó 1 g del extracto de éter de petróleo floculado (15,42 g) para su fraccionamiento por cromatografía en columna al vacío, utilizando una fase estacionaria de sílica gel 60H, en una relación de muestra: fase estacionaria de 1:30. Como eluyentes se emplearon éter de petróleo, CH₂Cl₂, AcOEt, EtOH y diferentes combinaciones de estos solventes en proporción 1:1. A partir de ese fraccionamiento se obtuvieron 9 fracciones denominadas F_{1,1} a F_{1,9}, a las cuales se les evaluó su actividad antibacteriana.

El extracto etanólico floculado (52,48 g) fue sometido a un fraccionamiento líquido-líquido continuo con éter de petróleo, CH₂Cl₂, AcOEt y ButOH; se obtuvieron 4 fracciones a las cuales se les evaluó su actividad antibacteriana. Debido a que la fracción de CH₂Cl₂ (10,2 g), fue la más activa, se hizo un subfraccionamiento biodirigido orientado a la extracción de los alcaloides presentes. Este se llevó a cabo disolviendo parte de esta fracción (3 g) en CH₂Cl₂ y en EtOH (7 g). Una vez obtenidas estas subfracciones, se extrajeron los alcaloides mediante partición ácido/base y extracción con solventes. A partir de este fraccionamiento se obtuvieron 2 fracciones de alcaloides Alk 1. (0,218 g) solubles inicialmente en CH₂Cl₂ y Alk 2 (0,480 g) solubles antes en EtOH. A continuación, se evaluó la actividad antibacteriana a estas fracciones.

Finalmente, 100 mg la subfracción Alk 2 fue separada por medio de cromatografía en columna al vacío, utilizando como fase estacionaria sílica gel 60H, en una relación muestra: fase estacionaria de 1:10. Como eluyentes se empleó CH₂Cl₂:MeOH en diferentes proporciones, obteniéndose 4 subfracciones denominadas: Alk 2A (21,4 mg) eluida con CH₂Cl₂:MeOH (9:1); Alk 2B (4,8 mg) con CH₂Cl₂:MeOH (8:2); Alk 2C (37,5 mg) con CH₂Cl₂:MeOH (1:1); y Alk 2D (30,0 mg) con CH₂Cl₂:MeOH (1:9). A estas fracciones se les evaluó su actividad antibacteriana.

Pruebas antibacterianas

Los microorganismos utilizados para la determinación de la actividad antibacteriana, procedieron de cepas control de acuerdo con la clasificación de la *American Type Culture Collection* (ATCC). Para el presente estudio se utilizaron: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6535) y *Bacillus subtilis* (ATCC 6638), *Escherichia coli* (ATCC 8739) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027).

En la evaluación de la actividad antibacteriana se empleó el método de difusión en gel por perforación en placa, usando como medio de crecimiento Agar *Müller Hinton*. Como control positivo se utilizó el antibiótico gentamicina (*Schering-Plough*), en una concentración de 3 mg/mL y como control de crecimiento negativo se usó dimetilsulfóxido (DMSO), solvente en el cual se disolvieron las fracciones.

La preparación del inóculo bacteriano se llevó a cabo en tubos de ensayo con 10 mL de caldo *Müller Hinton*, haciendo la suspensión de las bacterias en estos, hasta alcanzar una concentración de 0,5 en la escala de *Mac-Farland*. Se sembraron 50 µL de cada una de las fracciones de la planta disueltas en DMSO, en concentraciones de 20 y 40 mg/mL.

Determinación de compuestos activos

Una vez identificadas las fracciones que presentaron la mayor actividad antibacteriana, se hizo la determinación de los posibles compuestos responsables de esa actividad, por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Esta se llevó a cabo en un equipo *Agilent Technologies 6850* series II, acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies MSD 5975B*, equipado con un puerto de inyección *split/splitless* (260 °C, relación de *split* 15:1), y un inyector automático *Agilent 6850* series.

Se utilizó una columna capilar TR-50MS de 30 m x 0,25 mm (d.i.) x 0,25 µm (df), con fase estacionaria 50 % fenilpolisilfenilenesiloxano. La programación de temperatura del horno fue de 80 °C (1 min), luego se incrementó hasta 320 °C (2 min) @ 10 °C/min. Los espectros de masa se obtuvieron por impacto de electrones (EI); 70eV. Gas de arrastre helio (99,995 %, Aga Fano, S.A), con flujo constante de 1 mL/min.

Los espectros de masas y corrientes iónicas reconstruidas (TIC) fueron adquiridos usando un analizador cuadrupolar, por medio de barrido automático de frecuencia (*full scan*). El reconocimiento de los componentes presentes en las fracciones se realizó sobre la base de la comparación de espectros de masas adquiridos, confrontados con los reportados en la base de datos *Willey*.⁷

RESULTADOS

Pruebas antibacterianas

Las fracciones F_{1,1} a F_{1,9} (extracto de éter de petróleo) y éter de petróleo, CH₂Cl₂, AcOEt y ButOH (extracto etanólico), sometidas pruebas de actividad antibacteriana en concentraciones de 20 y 40 mg/mL, evidenciaron que únicamente F_{1,6} (21 mg), F_{1,7} (16 mg), F_{1,9} (19 mg), éter de petróleo (1,2 g) y CH₂Cl₂ (10,2 g), resultaron activas inicialmente solo contra *B. subtilis*. La fracción que presentó la mayor actividad fue la de CH₂Cl₂, con un porcentaje de inhibición de 46,7 % a 20 mg/mL.

Sin embargo, al subfraccionar esta fracción en Alk 1 (0,218 g) y Alk 2 (0,480 g) y evaluar su actividad antibacteriana, se encontró que a una concentración de 20 mg/mL estas no solo lograron inhibir mayormente el crecimiento de *B. subtilis* (73,3 y 66,7 % respectivamente), sino que también presentaron actividad positiva frente a *S. aureus* y *E. coli* (tabla 1).

Tabla 1. Diámetro y porcentaje de los halos de inhibición de las fracciones Alk 1 y Alk 2 a una concentración de 20 mg/mL frente a *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*

Fracción	<i>Bacillus subtilis</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Escherichia coli</i>	
	Halo de inhibición (mm)	% de inhibición	Halo de inhibición (mm)	% de inhibición	Halo de inhibición (mm)	% de inhibición
Alk 1	22	73,3	19	67,9	15	53,6
Alk 2	20	66,7	17	60,7	12	42,9
Control positivo	30	100,0	28	100,0	28	100,0
Control negativo	0	0,0	0	0	0	0

Finalmente, las pruebas antibacterianas hechas a las subfracciones Alk 2A, Alk 2B, Alk 2C y Alk 2D, en concentraciones de 10, 5 y 2,5 mg/mL frente a *B. subtilis*, permitieron identificar a la fracción Alk 2A como la mas activa, con un porcentaje de inhibición de 73,3 % a una concentración de 10 mg/mL (tabla 2), el cual correspondió con el porcentaje de inhibición más alto presentado por las fracciones evaluadas. Así mismo, se encontró que a una concentración incluso menor que la del control positivo, esta fracción logró inhibir el crecimiento bacteriano en más de 50 % (tabla 2).

Tabla 2. Diámetro y porcentaje de los halos de inhibición de las fracciones Alk 2A, Alk 2B, Alk 2C y Alk 2D a concentraciones de 10, 5 y 2,5 mg/mL frente a *Bacillus subtilis*

Fracción	Concentración mg/mL	<i>Bacillus subtilis</i>	
		Diámetro halo de inhibición (mm)	% de inhibición
Alk 2A	10	22	73,3
	5	18	60,0
	2,5	16	53,3
Alk 2B	10	20	66,7
	5	16	53,3
	2,5	15	50,0
Alk 2C	10	18	60,0
	5	14	46,7
	2,5	12	40,0
Alk 2D	10	10	33,3
	5	0	0,0
	2,5	0	0,0
Control positivo 3,0		30	100,0
Control negativo		0	0,0

Determinación de compuestos activos

El análisis cromatográfico de las fracciones Alk 2A, Alk 2B, Alk 2C y Alk 2D, permitió identificar como principales picos cromatográficos diferentes alcaloides de tipo isoquinolínico, al igual que otros compuestos como es indicado en la tabla 3.

Tabla 3. Principales picos cromatográficos, porcentaje de área y porcentaje de coincidencia de las fracciones Alk 2A, Alk 2B, Alk 2C y Alk 2D

Fracción	Principales picos cromatográficos	% área	% coincidencia
Alk 2A	Corlumine	40,4	83
	4-Methoxy-2-methylcinnamic acid	15,6	78
Alk 2B	Assimilobine	27,8	94
	4-Methoxy-2-methylcinnamic acid	17,2	78
	5-Methyl-1-phenyl-dihydro-1H-phosphole oxide	14,2	80
Alk 2C	3,4-Dihydroisoquinolin-7-ol, 1-benzyl-6-methoxy	35,6	76
	1,7-Dimethyl-4,4a,5,6-tetrahydropyrido-1H-[1,2-b]pyridazin-2(3H)-one	6,5	72
Alk 2D	Assimilobine	29,1	98
	Corlumine	7,3	86
	1-(3-Fluoro-4-methoxyphenyl)imidazole	24,5	72

DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio evidencian la actividad antibacteriana de *S. sessiliflora*, la cual puede ser atribuida a los alcaloides aislados a partir de las hojas de esa planta. Estos resultados aportan nuevo conocimiento a la fitoquímica de esta especie, al reportar alcaloides isoquinolínicos, los cuales son compuestos característicos del género *Siparuna*, y la familia Siparunaceae es rica en estos compuestos del tipo aporfinicos.^{2,4}

Los alcaloides isoquinolínicos están dotados de diferentes actividades biológicas dentro de las cuales se destacan importantes actividades antimicrobianas, principalmente contra bacterias grampositivas.⁷ Sin embargo, se ha encontrado que algunos de estos alcaloides presentan también una menor actividad contra algunas bacterias gramnegativas,⁸ lo cual corrobora los resultados, porque en las pruebas antibacterianas se encontró menor susceptibilidad por parte de bacterias gramnegativas.

Según estudios realizados a otra especie del género *Siparuna* (*S. guianensis*), se encontró que el extracto metanólico presentó actividad antimicrobiana frente a *Streptococcus faecalis*, *Mycobacterium phlei*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*.³ Adicionalmente, se ha encontrado que el extracto etanólico total de *Siparuna echinata*, presenta actividad antibacteriana de 50 % sobre *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Proteus vulgaris*.⁹ Esto ratifica en cierta medida los resultados, teniendo en cuenta la proximidad taxonómica de las especies evaluadas.

Dentro de los posibles compuestos responsables de la bioactividad encontrados en las hojas de *S. sessiliflora*, se destaca la asimilobina, la cual es un alcaloide aporfinico que ha sido aislado también en las hojas de *Siparuna apiosyce*, *Siparuna griseo-flavescens* y *Siparuna tonduziana*.¹⁰ Este compuesto presenta comprobada actividad bactericida contra algunas bacterias grampositivas.¹¹

Cabe resaltar que en las fracciones que presentaron la mayor bioactividad (Alk 2A y Alk 2B), se determinó también la presencia de un derivado del ácido cinámico, el

cual ha sido reportado previamente en la corteza de *S. apiosyce*.² Adicionalmente, estudios científicos han demostrado que el ácido cinámico presenta actividad bactericida contra *E. coli*.¹² Debido a esto, es posible que exista algún tipo de sinergismo entre este compuesto y los alcaloides de la planta, teniendo en cuenta que estas fueron las fracciones que presentaron mayor actividad. Sin embargo, es necesaria la realización de estudios científicos a fin de validar esta hipótesis.

Los resultados obtenidos además de reportar la actividad antibacteriana de las hojas de *S. sessiliflora* frente a bacterias grampositivas y gramnegativas, generan nuevo conocimiento sobre su fitoquímica, y corroboran su uso tradicional en la cura de cuadros infecciosos. También revelan la viabilidad de investigaciones futuras encaminadas hacia el aislamiento de compuestos presentes en esta especie, en busca de nuevas alternativas terapéuticas basadas en productos naturales.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Pontificia Universidad Javeriana por su apoyo económico (investigación financiada por el departamento de química de la Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia) y al doctor Enrique Acero por la proporción del material vegetal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Trópicos [base de datos en Internet]. Missouri Botanical Garden [citado 10 Jul 2010]. Disponible en: <http://www.tropicos.org/Name/40000742>
2. Leitão GG, Simas NK, Soares SSV, De Brito AP, Claros BMG, Brito TBM, et al. Chemistry and pharmacology of Monimiaceae: a special focus on *Siparuna* and *Mollinedia*. J Ethnopharmacol. 1999;65:87-102.
3. Lopez A, Hudson JB, Towers GHN. Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. J Ethnopharmacol. 2001;77:189-96.
4. Fisher DCH, De Amorim NC, Bachiega D, Salerno C, Nogueira F, Bonotto SV, et al. *In vitro* screening for antiplasmodial activity of isoquinoline alkaloids from Brazilian plant species. Acta Trop. 2004;92:261-6.
5. Valadeau C, Pabon A, Deharo E, Albán J, Esteves Y, Lores FA, et al. Medicinal plants from the Yanasha (Peru): Evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts. J Ethnopharmacol. 2009;123:413-22.
6. Renner S, Hausner G. Siparunaceae. Flora Neotropica Monograph 95. New York: The New York Botanical Garden; 2005.
7. Iwasa K, Moriyasu M, Tachibana Y, Kim H, Wataya Y, Wiegrebe W, et al. Simple isoquinoline and benzylisoquinoline alkaloids as potential antimicrobial, antimalarial, cytotoxic, and anti-HIV agents. Bioorg Med Chem. 2001;11:2871-84.
8. Tsai I, Liu Y, Lu S. Screening of isoquinoline alkaloids and their derivatives for antibacterial and antifungal activities. Kaohsiung J Med Sci. 1989;5(3):132-45.

9. Gupta M. Plantas Medicinales Iberoamericanas. Bogotá: Convenio Andrés Bello, Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología CYTED; 2008.
10. Fisher DCH, Gonçalves MI, Oliveira F, Alvarenga MA. Constitutens from *Siparuna apiosyce*. Fitoterapia. 1999;70:322-3.
11. Simeón A. Alcaloides de la corteza del tronco de *Annona cherimolia* [Tesis] Valencia: Departamento de Farmacología y Farmacotecnia, Universidad de Valencia; 1988.
12. Nascimento GGF, Locatelli J, Freitas PC, Silva GL. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on Antibiotic-Resistant Bacteria. Braz J Microbiology. 2000;31:247-56.

Recibido: 7 de junio de 2011.

Aprobado: 30 de octubre de 2011.

Guillermo F. Padilla González. Laboratorios Naturcol S.A., Control de Calidad. Bogotá, Colombia. Calle 17 No 68D- 60. Teléf.: (57)14110232. Corro electrónico: federico.padilla@naturcol.com