

Identificación preliminar de algunos constituyentes del tallo de *Paullinia fuscescens* (Sapindaceae) y actividad biológica

Diamela Castillo¹, José G. Lanza^{1,2*} y Oscar Crescente¹

1) Laboratorio de Productos Naturales. Departamento de Química, Escuela de Ciencias, Núcleo de Sucre, Universidad de Oriente. Estado Sucre, Venezuela.

2) Laboratorio de Comportamiento y Manejo de Plagas, Universidad Simón Bolívar. Valle de Sartenejas, Venezuela

(*) joseglanza82@gmail.com

Recibido: 28/02/2010

Aceptado: 07/04/2010

Resumen

A partir del extracto metanólico del tallo de *Paullinia fuscescens* se obtuvo la subfracción α , la cual presentó una marcada actividad antibacteriana contra especies de tipo Gram positivas y Gram negativas, además de un marcado efecto citotóxico frente al crustáceo *Artemia salina* sp. A partir de esta subfracción se logró separar e identificar una mezcla de compuestos mediante CG/EM. Los compuestos identificados fueron el 7-hexadeceno, 1,2,2-trimetil-1-(*p*-toluil)-ciclopentano y los ácidos tetradecanoico y hexadecanoico con sus respectivos ésteres metílicos. La actividad biológica presentada por el extracto crudo y la subfracción aislada, podría estar asociada con la presencia de los compuestos identificados en este estudio.

Palabras clave: *Paullinia fuscescens*; CG/EM; citotoxicidad; antibacteriano

Abstract

A subfraction α was obtained from stem methanol extract of *Paullinia fuscescens*, which presented a strong antibacterial activity against Gram positive and Gram negative species besides a strong cytotoxic effect against the crustacean *Artemia salina* sp.. From this subfraction was separate and identify a mixture of compounds by GC/MS. The compounds identified were 7-hexadecene, 1,2,2-Trimethyl-1-(*p*-tolyl)-cyclopentane and tetradecanoic and hexadecanoic acids with their methyl esters. The biological activity by the crude extract and isolated subfraction might be associated with the presence of the compounds identified in this study.

Keywords: *Paullinia fuscescens*; GC/MS; cytotoxicity; antibacterial

Introducción

La investigación científica enfocada hacia la detección y caracterización de sustancias producidas por diferentes especies vegetales se ha desarrollado en las últimas décadas en diversos campos de aplicación como: medicina y farmacia (anticancerígenos, antibióticos), control y monitoreo de plagas (insecticidas), industria cosmética (esencias, colorantes), entre otras. Todos estos productos, a veces muy difíciles de sintetizar en laboratorios, se agrupan bajo el nombre de metabolitos secundarios^{1,2,3}. Son muchas las familias de especies vegetales que se perfilan como fuente de tales sustancias, entre ellas se encuentra la Sapindaceae. Las plantas pertenecientes a este grupo se caracterizan por ser árboles que poseen hojas alternas, folíolos enteros hasta dentados, flores pequeñas,

hermafroditas y bisexuales. En esta familia, se encuentra el género *Paullinia*, y otras plantas trepadoras donde se ha reportado el aislamiento y caracterización de diferentes constituyentes químicos con una marcada actividad de tipo biológica².

Dentro de las especies de *Paullinia* se encuentra *Paullinia cupana*, distribuida desde México hasta Brasil, incluyendo Las Antillas. Esta especie, posee actividad de tipo biológica, siendo utilizada: como veneno para peces, en la prevención de ciertos problemas cardíacos y en el tratamiento de problemas gástricos. Además, su composición química es valiosa, ya que en estudios de caracterización estructural realizados a esta especie se lograron identificar varios alcaloides, entre los cuales encontramos la teobromina y la teofilina^{4,5,6}.

Otra especie interesante de este género, por sus reportes de actividad insecticida, es *Paullinia fuscescens*, además sus antecedentes la perfilan como una fuente rica de metabolitos secundarios o principios activos^{4,6}. Es por ello que se decidió realizar esta investigación, ya que a través del aislamiento y caracterización (total o parcial), de los compuestos químicos con posible actividad biológica, presentes en esta especie, se podrían generar reportes que ayuden a la solución de diversos problemas de salud que aquejan a las sociedades modernas.

Metodología

Muestreo y tratamiento del material vegetal

Paullinia fuscescens (Figura 1) fue colectada en el estado Sucre, Venezuela. Su identificación se realizó en el herbario IRBR del Departamento de Biología, Núcleo de Sucre, de la Universidad de Oriente. Posteriormente, fueron separados los tallos de los demás órganos de la planta (hojas y flores). Los tallos se deshidrataron a temperatura ambiente y a la sombra, para luego ser pulverizados en un molino eléctrico, y extraídos exhaustivamente con metanol. La mezcla de solvente y material vegetal fue filtrada y concentrada a presión

reducida a una temperatura de 37°C para obtener así el Extracto Metanólico de los Tallos (EMT).

Pruebas de actividad biológica

Actividad antibacteriana. La actividad antibacteriana de *Paullinia fuscescens*, se determinó por medio del método de susceptibilidad antimicrobiano o método de difusión en discos, que consiste en probar la eficacia de un posible agente antibacteriano en medio de cultivo Agar Müller Hinton, el cual es servido en placas de Petri e inoculado con suspensiones bacterianas (1×10^8 bacterias/ml) preparadas por comparación con un patrón comercial Mc. Farland 0,5. En nuestro caso, discos de papel de filtro Whatman N° 3, de 5mm de diámetro, fueron impregnados con 10µl de la muestra proveniente del extracto crudo y la fracción proveniente de los tallos, para finalmente ser colocados sobre las cápsulas inoculadas. Las placas se preincubaron a 5°C durante 12h, para permitir la difusión de la muestra en el medio de cultivo. Posteriormente, se incubaron a 37°C durante 24h, para permitir el crecimiento bacteriano. Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a medir la inhibición del crecimiento bacteriano en mm, de diámetro del halo de inhibición observado alrededor del disco^{8,9,10}.



Figura 1: *Paullinia fuscescens*⁷.

Toxicidad. El grado de toxicidad se determinó preparando una solución patrón a partir de 50mg del extracto crudo y la fracción proveniente de los tallos en 0,5ml de

dimetilsulfóxido (DMSO), luego se agregaron 4,5ml de agua destilada. A partir de esta solución se prepararon disoluciones sucesivas (1000, 100, 10, 1, 0,1 y 0,01µg/ml)

con agua de mar bifiltrada. Se agregó a cada solución 10 nauplios del crustáceo *Artemia salina* sp. eclosionados con 24h de anticipación. Por cada concentración se realizaron 4 réplicas, además de un control con igual número de réplicas. A las 24 h se determinó la mortandad de los organismos y con estos datos, se calculó la concentración letal media (CL₅₀) con la ayuda de un programa estadístico de computación^{11,12}.

Fraccionamiento cromatográfico

El extracto proveniente de los tallos de la planta, se fraccionó mediante cromatografía de columna por gravedad usando sílica gel 70-230 mesh en una proporción de 1:20, masa muestra a masa de sílica. Las subfracciones obtenidas en este proceso fueron separadas nuevamente por cromatografía de columna y cromatografía de capa fina preparativa (CCFP) hasta la obtención de Fa. Para CCFP se utilizaron placas cromatográficas de vidrio (20x20cm²) cubiertas con una capa de sílica gel de 60 mesh, con un espesor de 1,0mm. El revelado se realizó con luz UV.

Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

Se utilizó un cromatógrafo de gases marca Hewlett Packard modelo 5890, el cual estaba acoplado a un detector selectivo de masas de la misma marca modelo 5971 A. Se utilizó una columna de metil-silicona de 25m de longitud. La temperatura del inyector fue de 280°C, siendo la temperatura inicial del horno de 70°C y la final de 310°C. La rapidez de calentamiento fue de 6°C/min. El gas de arrastre utilizado fue Helio. Los espectros de masas fueron obtenidos bajo el modo de barrido y comparados con los de una base datos comercial Wiley 138 L.

Resultados y discusión

Actividad biológica de la subfracción Fa, proveniente del EMT

El EMT fue sometido a cuatro procesos de fraccionamientos cromatográficos biodirigidos, Obteniendo así la subfracción α (Fa) que presentó una marcada actividad antibacteriana, frente a *E. coli*, *S. aureus*, *S.typhimurium* y *B. cereus*. Esto resulta interesante porque manifiesta abiertamente que existe uno o varios compuestos causantes de tal efecto, además demuestra lo que bibliográficamente se conoce de las plantas de esta familia, es decir, que ellas poseen compuestos capaces de inhibir el crecimiento de bacterias tanto Gram negativas como Gram positivas y así abarcar una amplio espectro de acción, pudiéndose, con estas características, considerar al extracto o la fracción, como un agente antibacteriano efectivo. Por otra parte, si comparamos tamaño de los diámetros de los halos de

inhibición (Tabla 1) de EMT con los de Fa, se aprecia que estos aumentaron significativamente después del proceso de fraccionamiento, lo que supone un posible efecto antagonista, que se manifiesta cuando el conjunto de todas las sustancias químicas que conforman el EMT, contrarrestan el efecto individual (o parcialmente individual) de cada compuestos que conforma la fracción.

Tabla 1: Comparación del efecto antibacteriano entre EMT y Fa

	Microorganismo	Diámetro del halo de inhibición (mm)
EMT	<i>Escherichia coli</i>	7
	<i>Staphylococcus aureus</i>	6
	<i>Salmonella typhimurium</i>	7
	<i>Bacillus cereus</i>	7
Fa	<i>Escherichia coli</i>	12
	<i>Staphylococcus aureus</i>	12
	<i>Salmonella typhimurium</i>	12
	<i>Bacillus cereus</i>	15

Fa también presentó un valor de CL₅₀ de 4,79 μ g/ml; lo que indica que contiene un alto potencial citotóxico. Una sustancia puede ser considerada como citotóxica, cuando su CL₅₀ es $\leq 30\mu$ g/ml. Esta prueba posee una correlación positiva frente a las células cancerígenas 9KB, es decir, se podría estar hablando de la posible presencia de compuestos antitumorales y/o anticancerígenos^{11, 12}.

Separación e identificación de los constituyentes químicos de Fa provenientes del EMT

Al realizarle el análisis de CG/EM Fa, se evidencia una mezcla de distintos compuestos, de los cuales se lograron identificar con una certeza del 99%. Los compuestos identificados fueron el 7-hexadeceno, 1,2,2-trimel-1-(p-toluil)-ciclopentano, éster metílico del ácido tetradecanoico, éster metílico del ácido hexadecanoico y los respectivos ácidos libres de estos dos últimos. En la Figura 2 se muestra el cromatograma de gases de Fa y en la Tabla 2, se muestran los porcentajes de área y los tiempos de retención de cada uno de los compuestos identificados. El mecanismo de la actividad antimicrobiana de los ácidos grasos es debido a la inhibición del transporte de membrana, lo que resulta en una carencia nutricional de las células. Algunos autores sugieren que los ácidos grasos son los inhibidores más efectivos de bacterias Gram positivas, reportando entre ellos los ácidos tetradecanoico y hexadecanoico como inhibidores efectivos de estas bacterias¹³. Estos ácidos grasos se encuentran presentes en *Paullinia fuscescens*, según los análisis de identificación. Los ácidos grasos al igual que sus ésteres metílicos,

podrían ser los responsables de la actividad antibacteriana mostrada al comienzo y durante todo el fraccionamiento biodirigido realizado. No se puede atribuir el marcado efecto biológico (actividad antibacteriana y citotóxica) que posee *Paullinia fuscescens* a un compuesto en particular sin antes evaluar el efecto de estos compuestos por separado. Además fueron identificados un hidrocarburo insaturado y derivado del ciclopentano, de los cuales se desconoce su aporte a la actividad biológica que poseen las especies vegetales del género en estudio. Este tipo de reportes permite la posibilidad de establecer con seguridad cual es el principio activo responsable de tales efectos.

El mecanismo de la actividad antimicrobiana de los ácidos grasos es debido a la inhibición del transporte de membrana, lo que resulta en una carencia nutricional de las células. Algunos autores sugieren que los ácidos grasos son los inhibidores más efectivos de bacterias Gram

positivas, reportando entre ellos los ácidos tetradecanoico y hexadecanoico como inhibidores efectivos de estas bacterias¹³. Estos ácidos grasos se encuentran presentes en *Paullinia fuscescens*, según los análisis de identificación. Los ácidos grasos al igual que sus ésteres metílicos, podrían ser los responsables de la actividad antibacteriana mostrada al comienzo y durante todo el fraccionamiento biodirigido realizado. No se puede atribuir el marcado efecto biológico (actividad antibacteriana y citotóxica) que posee *Paullinia fuscescens* a un compuesto en particular sin antes evaluar el efecto de estos compuestos por separado. Además fueron identificados un hidrocarburo insaturado y derivado del ciclopentano, de los cuales se desconoce su aporte a la actividad biológica que poseen las especies vegetales del género en estudio. Este tipo de reportes permite la posibilidad de establecer con seguridad cual es el principio activo responsable de tales efectos.

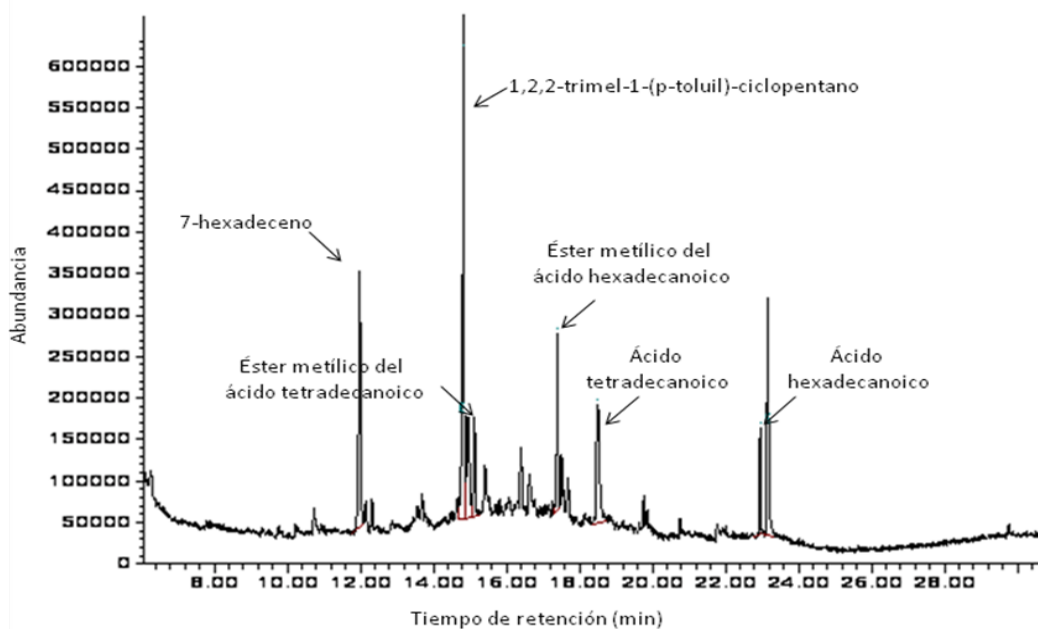


Figura 2: Cromatograma de gases de F α

Tabla 2: Compuestos identificados en el cromatograma de gases de F α

Compuesto Identificado	Tiempo de retención (min)	% Área
7-hexadeceno	11,99	16,39
1,2,2-trimel-1-(p-toluil)-ciclopentano	14,83	25,17
Éster metílico del ácido tetradecanoico	15,14	9,70
Éster metílico del ácido hexadecanoico	17,41	8,90
Ácido tetradecanoico	18,51	10,16
Ácido hexadecanoico	23,16	15,92

Conclusiones

- a. La actividad antibacteriana presentada por el extracto de los tallos de *Paullinia fuscescens* y la fracción proveniente de los mismos, puede ser conferida a la presencia de los ácidos grasos con sus respectivos ésteres metílicos, los cuales han sido reportados en la literatura como los principales inhibidores de bacterias de tipo Gram positivas.
- b. La fracción F α , presentó una CL₅₀, que le asocia las características de un posible agente citotóxico. Este efecto puede estar ligado a la acción individual de alguno de sus constituyentes, o al efecto sinérgico entre algunos de ellos. Es necesario el aislamiento y/o síntesis de cada uno de los compuestos y probarlos en forma separada o mediante combinaciones de los mismos, para corroborar a quien es atribuible dicha propiedad.
- c. Este estudio representa el primer reporte de actividad biológica con análisis de la composición química preliminar de *Paullinia fuscescens*, sentando bases para realizar investigaciones más profundas enfocadas hacia el análisis de la actividad citotóxica y antibacteriana de cada compuesto, que permitan conocer y/o comprobar realmente cuál es el principio activo que produce dichos efectos.

Referencias

1. A Albornoz. Productos naturales: Sustancias y drogas extraídas de las plantas. Universidad Central de Venezuela, Caracas (1980).
2. X Domínguez. Métodos de investigación fitoquímica. Editorial Limusa, México (1973).
3. G Mareggiani. Manejo de insectos plaga mediante sustancias semioquímicas de origen vegetal. **Manejo Integrado de plagas y agroecología**, **60**, 22-30 (2001).
4. D Ávila. Estudio Fitoquímico de Algunas Especies de Plantas Venezolanas. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela (1991).
5. E Kuskoski, F Roseane, A García, A Troncoso. Chemical and pharmacological properties of the fruit Guaraná (*Paullinia cupana*). **Vitae**, **12(2)**, 45-52 (2005).
6. D Castillo. Aislamiento, Caracterización y Actividad Biológica de algunos constituyentes de *Paullinia fuscescens* MKB. Tesis de Licenciatura. Departamento de Química. Universidad de Oriente. Núcleo de Sucre, Venezuela (2006).
7. Smithsonian Tropical Research Institute. http://striweb.si.edu/esp/tesp/plant_pictures/i_sp2540.mx.jpg Consultado:28/02/2010)
8. J Kabara, D Swieczkowski, A Conley, T Truant. Fatty acid and derivatives of antimicrobial agents. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, **2**, 23 (1972).
9. E Koneman, S Allen, V Dowell, W Janda, H Sommer, W Winn. Diagnóstico microbiológico. Segunda edición. Editorial Médica Americana, Buenos Aires (1990).
10. A Bauer, W Kirby, J Sherris, Antibiotic susceptibility single disk method. **American J. Clinical Pathology**, **45**, 493 (1966).
11. B Meyer, N Ferrigni, J Putnam, L Jacobsen, D Nicols, J McLaughlin. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Médica**, **45**, 31-34 (1982).
12. S Moreno, O Crescente, S Ortiz, M Quintero M. Composición química y actividad tóxica del aceite esencial de *Simsia pubescens* Triana. **Interciencia**, **30(10)**, 744-747 (2006).
13. E Freese. Mechanisms of growth inhibition by lipophilic acids. En: The Pharmacological effect of lipids. J.J. Kabara (ed) Am. Oil. Chem. Soc. Champaign, III (1978).