

Artículo Original

Evaluación de la actividad antibacteriana y efecto citotóxico de extractos obtenidos de la especie *Vismia guianensis* (Aubl.) Pers. (Hypericaceae).

Antibacterial activity and cytotoxic effect assessment of extracts obtained from *Vismia guianensis* (Aubl.) Pers. (Hypericaceae).

Nuñez Richard¹, Rojas Janne^{1*}, Lucena María², Roa Ana³, Meléndez Pablo⁴.

¹Grupo de Investigación "Biomoléculas Orgánicas", Instituto de Investigaciones Facultad de Farmacia y Bioanálisis.

²Departamento de Bioanálisis Clínico. ³Departamento de Microbiología y Parasitología. ⁴Herbario MERF. Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida - República Bolivariana de Venezuela.

Recibido enero 2013 - Aceptado diciembre 2013

RESUMEN

En el presente estudio se demostró el potencial antibacteriano de amplio espectro que presentan las fracciones obtenidas con solventes entre mediana y alta polaridad de la especie *Vismia guianensis*, observándose inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), con valores de concentración inhibitoria mínima (CIM) entre 1 y 10 mg/mL. El análisis de citotoxicidad mostró que a la concentración de 250 µg/mL no se alteran las células derivadas de riñón de embrión de mono Rhesus (MA-104 ATCC N° CRL-2378), por lo que se consideran útiles como posibles agentes antibacterianos.

PALABRAS CLAVE

Actividad antibacteriana, citotoxicidad, *Vismia guianensis*, Hypericaceae, extractos.

ABSTRACT

In the present study the wide range of antibacterial activity present in fractions obtained from *Vismia guianensis* with medium to high polarity solvents was probed, exhibiting growth inhibition on *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), with minimum inhibitory concentration (MIC) values

between 1 to 10 mg/mL. Cytotoxic analysis showed that a concentration of 250 µg/mL, cells derived from monkey Rhesus (MA-104 ATCC N° CRL-2378) embryo kidney, did not show any alteration, considering these samples as possible antibacterial agents.

KEY WORDS

Antibacterial activity, cytotoxicity, *Vismia guianensis*, Hypericaceae, extracts.

INTRODUCCIÓN

La Familia Hypericaceae comprende unos 50 géneros y 1200 especies. Son en su mayoría árboles y arbustos, aunque incluye también plantas trepadoras y epifitas. Su distribución es cosmopolita, aunque centrada en los trópicos [1]. El género *Vismia* comprende cerca de 21 especies, reportándose hasta el momento 9 en Venezuela, las cuales se encuentran ampliamente distribuidas en todo el territorio [2]. Por su parte, la especie *Vismia guianensis* (Aubl.) Pers. se localiza principalmente en los estados Bolívar, Amazonas (Puerto Ayacucho), Portuguesa y Sucre [2,3]. En la medicina tradicional esta especie ha sido utilizada como laxante, antipirético, antirreumático y para tratar algunas infecciones de transmisión sexual [4-7]. En investigaciones previas se ha descrito que el látex y los extractos de hojas, frutos y tallos de *V. guianensis* presentan diversas bioactividades: cicatrizante [8], citotóxica frente a líneas celulares cancerosas de pulmón, colon y sistema nervioso central [9], antioxidante [10], anticancerosa [11],

*Correspondencia al autor: janner@ula.ve

y antimalárica [12]. Por otra parte, en estudios de las propiedades antimicrobianas del extracto etanólico de *V. guianensis* recolectada en Brasil, se evidenció actividad frente a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mitis* y antifúngica contra *Candida* [13]. Asimismo, los extractos metanólicos de las hojas, corteza y raíces de la especie *V. guianensis* que crece en Camerún, África, mostraron actividad antibacteriana frente a *Mycobacterium smegmatis* y *Mycobacterium tuberculosis*. Los resultados sugirieron a los autores el potencial de estos extractos en la obtención de compuestos como agentes quimioterapéuticos para el tratamiento de la tuberculosis [14].

Se han llevado a cabo diversos estudios para aislar e identificar los componentes químicos del género *Vismia*, reportándose antraquinonas, antronas, antranoides prenilados, benzofenonas, flavonoides, xantonas, cumarinas, terpenos y lignanos como los principalmente aislados [15]. En la presente investigación se evaluó la actividad antibacteriana y citotóxica de los extractos de la especie *V. guianensis* obtenidos con solventes de diferentes polaridades, con el propósito de determinar su potencial como agente antibacteriano y establecer la polaridad de los posibles compuestos activos presentes en los extractos.

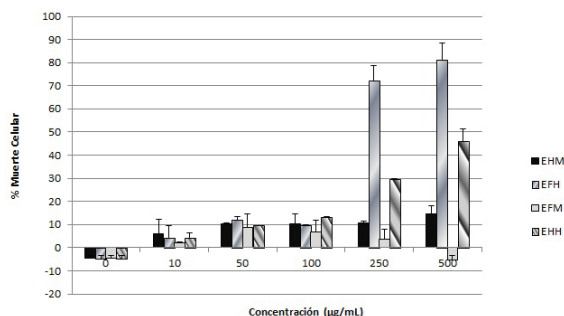
MATERIALES Y MÉTODOS

Material botánico. Las hojas y flores de *V. guianensis* (Aubl) Pers. se colectaron en el mes de Junio del año 2009, en el Jardín Botánico de la UNILLEZ a 9°, 2', 37'' latitud Norte con 68°, 44', 56'' longitud Oeste, con una altitud de 183 msnm, ubicado en Guanare, estado Portuguesa, República Bolivariana de Venezuela. La especie botánica fue determinada por el Prof. Pablo Meléndez y un espécimen de comprobación se depositó, bajo el número de registro 592, en el Herbario (MERF) de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes.

Extracción por maceración del material vegetal molido y seco. Las hojas y flores de la especie en estudio se secaron a 40 °C en una estufa durante 72 h. Una vez secas se molieron y se determinó su peso (1254 g de hojas y 220 g de flores). El material molido y seco se sometió a extracción por maceración (hojas y flores por separado), usando para la primera extracción hexano y luego metanol. Cada extracto fue filtrado y concentrado a sequedad en un rotavapor a presión reducida a una temperatura máxima de 65 °C. Los extractos concentrados fueron pesados y

rotulados: extracto de las hojas con hexano (EHH, 122 g), extracto de las hojas con metanol (EHM, 126 g), extracto de las flores con hexano (EFH, 16 g) y extracto de las flores con metanol (EFM, 45 g).

Fraccionamiento de los extractos concentrados usando diferentes solventes en polaridad creciente. De los extractos concentrados (EHH, EHM, EFH, EFM), se escogió por su baja citotoxicidad en células MA-104 (Figura 1) el EHM, para ser sometido a fraccionamiento empleando la técnica de cromatografía en columna (fase estacionaria silicagel 60, 70-230 mesh, marca Sharloud) usando diferentes solventes en polaridad creciente como fase móvil. La elución se inició con hexano al 100 % (3 L), seguido por mezclas de hexano/diclorometano en proporción 1:1 (4 L), diclorometano 100 % (6 L), diclorometano/acetato de etilo, 1:1 (6 L), acetato de etilo 100 % (5 L), acetato de etilo/metanol, 1:1 (6 L) y metanol 100 % (4 L). Todas las fracciones obtenidas fueron analizadas por cromatografía en capa fina, uniéndose aquellas que tenían un perfil cromatográfico similar, quedando rotuladas de la siguiente manera: EHHH (las fracciones obtenidas con hexano); EHHMD (las obtenidas con mezclas de hexano y diclorometano); EHMD (obtenidas con diclorometano); EHMDA (obtenidas con mezclas de diclorometano y acetato de etilo); EHMA (obtenidas con acetato de etilo); EHMAM (obtenidas con acetato de etilo y metanol); EHM (obtenidas con metanol). Las fracciones reunidas se concentraron en un rotavapor a presión reducida a una temperatura inferior a 65 °C, rotuladas en frascos color ámbar y guardadas a 4 °C hasta la realización de los análisis.



EHM: extracto de las hojas con metanol; EFM: extracto de las flores con metanol; EHH: extracto de las hojas con hexano; EFH: extracto de las flores con hexano.

Fig. 1. Efecto citotóxico de los extractos obtenidos con solventes de diferentes polaridades de la especie *Vismia guianensis* sobre células MA-104.

Evaluación de la actividad citotóxica. La línea celular derivada de riñón de embrión de mono Rhesus

(MA-104 ATCC N° CRL-2378) fue usada para evaluar la citotoxicidad. Las células fueron cultivadas y mantenidas en frascos Falcon® de 25 mL en medio Mínimo Esencial Eagle's (MEM) suplementado con 10 % de suero fetal de bovino (SFB) inactivado y una mezcla de antibióticos [penicilina® (100.000 UI/L), anfotericina B® (2,5 mg/L) y gentamicina® (40 mg/L)]. Los cultivos se incubaron en condiciones estables de temperatura (37 °C), en una atmósfera húmeda con 5 % de CO₂, hasta obtener cultivos en monocapas confluentes (5 días).

El efecto de los extractos sobre la viabilidad celular se determinó mediante el método descrito por Cory y col. [16] y la casa comercial Promega Corporation [17]. Los ensayos de citotoxicidad se realizaron sobre 200.000 células (inóculo inicial por mL/pozo), las cuales se cultivaron en placas de 96 pozos con el medio indicado anteriormente hasta obtener monocapas confluentes. El medio de cultivo fue retirado y se depositaron 150 µL de los extractos a diferentes concentraciones, entre 10 a 500 µg/mL, preparados en medio MEM a partir de una solución patrón de 100 mg/mL en dimetilsulfóxido (DMSO). Como blanco control se utilizaron pozos que contenían solo medio de cultivo. Después de 24 horas de incubación en las condiciones estándar se retiró el medio y las monocapas celulares se lavaron con buffer fosfato salino.

Posteriormente, se adicionó la mezcla del reactivo de detección MTS/PMS diluido en medio de cultivo celular según las indicaciones del fabricante [17], a todos los pozos, tanto de las células tratadas como las de control. Se realizó una medida de absorbancia en un lector para placas de ELISA con la finalidad de determinar el valor basal y se incubó nuevamente a 37 °C durante 2 horas. Transcurrido este tiempo se determinó la absorbancia del Formazán, un producto de la bioreducción del sustrato MTS-PMS por parte de enzimas deshidrogenasas mitocondriales de células metabólicamente activas. El extracto se consideró citotóxico a partir de la concentración en la cual es capaz de inducir el 20 % de muerte celular. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. La absorbancia generada como ruido por efecto de los reactivos (pozos control con reactivos) se dedujo de la absorbancia generada por las células expuestas.

Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos usando el método de difusión en agar con discos de papel.

Cepas usadas en el ensayo. *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis*

(ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) y *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357)

Método de difusión en agar con discos de papel.

Este ensayo fue realizado de acuerdo al método descrito por Rondón y col. [18], con las siguientes modificaciones: se utilizaron discos de papel de filtro (12 mm de diámetro y 1 mm de espesor) previamente impregnados con 20 µL de cada extracto, cuya concentración inicial fue de 20 mg/mL. Se usaron los antibióticos; Amikacina® (30 µg), Ampicilina® (10 µg) y Eritromicina® (15 µg) como controles positivos para chequear la sensibilidad de las bacterias frente a los antibióticos de uso común. El análisis de concentración inhibitoria mínima (CIM) se realizó únicamente con los microorganismos que mostraron zonas de inhibición y fue determinada por dilución de cada extracto en los rangos comprendidos entre 20 y 1 mg/mL en DMSO, colocando 20 µL de cada dilución en un disco de papel. Los valores de CIM se definieron como la concentración más baja que inhibió el crecimiento bacteriano [19]. Como control negativo se usó un disco impregnado con DMSO para descartar posible actividad del solvente contra las bacterias ensayadas. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de la actividad citotóxica. Los extractos EHH, EFH, EHM y EFM fueron sometidos a pruebas de citotoxicidad en células MA-104, observándose que EHH y EFH mostraron ser citotóxicos a partir de 250 µg/mL induciendo muerte celular mayor al 20 %, mientras que los extractos EHM y EFM no presentaron toxicidad a la máxima concentración evaluada de 500 µg/mL (Figura 1). De acuerdo a estos resultados se decidió fraccionar el extracto EHM en solventes de diferentes polaridades obteniéndose las sub-fracciones EHHM (8 g), EHMHD (10 g), EHMD (18 g), EHMDA (20 g), EHMA (21 g), EHMAM (24 g) y EHMM (18 g).

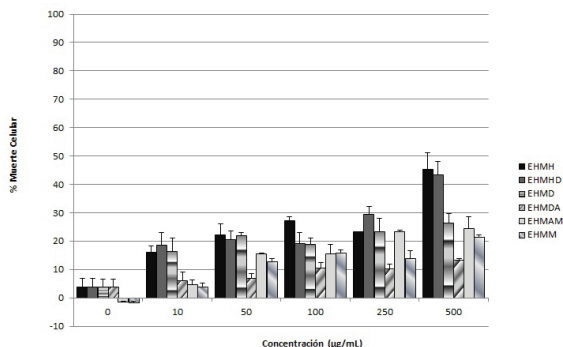
Análisis de la actividad antibacteriana. Solo los extractos EHMDA y EHMM presentaron inhibición del crecimiento bacteriano (Tabla 1), con resultados similares entre ambos extractos, es decir fueron activos contra todas las bacterias probadas, con halos de inhibición entre 13 mm y 35 mm de diámetro y los valores de CIM oscilaron entre 1 mg/mL y 20 mg/mL.

TABLA 1
Actividad antibacteriana de los extractos obtenidos de la especie *Vismia guianensis*

Microorganismos	*Zonas de inhibición (mm)										CIM (mg/mL)	
	Extractos de <i>V. guianensis</i> (20 mg/mL)							Control Positivo			4	7
	1	2	3	4	5	6	7	Amk	Amp	Eri		
<i>S. aureus</i> ATCC (25923)	-	-	-	17	-	-	17	-	-	37	10	15
<i>E. faecalis</i> ATCC (29212)	-	-	-	14	-	-	23	-	28	-	10	20
<i>E. coli</i> ATCC (25922)	-	-	-	23	-	-	13	29	-	-	1	1
<i>K. pneumoniae</i> ATCC (23357)	-	-	-	15	-	-	15	30	-	-	1	1,5
<i>P. aeruginosa</i> ATCC (27853)	-	-	-	13	-	-	35	29	-	-	10	20

Amk: amikacina® (30 µg); Amp: ampicilina® (10 µg); Eri: eritromicina® (15 µg); *Zonas de inhibición (mm); diámetro del disco de papel 12 mm; CIM: concentración inhibitoria mínima (rango de concentración: 1-20 mg/mL); 1: EHMH; 2: EHMHD; 3: EHMD; 4: EHMDA; 5: EHMA; 6: EHMAM; 7: EHMM.

El análisis de la Figura 2 muestra que las fracciones EHMDA y EHMM fueron las únicas que no presentaron citotoxicidad a la concentración de 250 µg/mL por lo que se pueden considerar útiles como posibles agentes antibacterianos.



Ext: extracto; EHMH: fracciones obtenidas con hexano; EHMHD: fracciones obtenidas con mezclas de hexano y diclorometano; EHMD: obtenidas con diclorometano; EHMDA: obtenidas con mezclas de diclorometano y acetato de etilo; EHMA: obtenidas con acetato de etilo; EHMAM: obtenidas con acetato de etilo y metanol; EHMM: obtenidas con metanol.

Fig. 2. Efecto citotóxico de las fracciones obtenidas del extracto metanólico de las hojas de la especie *Vismia guianensis* sobre células MA-104.

Con respecto a los extractos EHMDA y EHMM, presentan de mediana a alta polaridad ya que fueron obtenidos con mezclas de diclorometano (D), acetato de etilo (A) y metanol (M). Al relacionar la polaridad de los extractos con la actividad antibacteriana observada en el presente estudio, la misma se podría atribuir a los metabolitos secundarios aislados de las diversas especies del género *Vismia* como los de

núcleo antrona, antraquinona, xantona, antranoides penilados, benzofenona, cumarina y terpenos [5,20] los cuales presentan de mediana a elevada polaridad dependiendo del número de grupos polares presentes en las moléculas y a los cuales se les ha descrito actividad antibacteriana [13,15].

Al comparar los resultados de la actividad antibacteriana de la presente investigación con los reportados por Pereira y col. 2011, en su estudio realizado con el extracto etanólico de *V. guianensis*, especie colectada en Belem-Brasil, los mismos se correlacionan en cuanto a la inhibición del desarrollo de *S. aureus* con variación en la CIM (31,25 mg/mL especie de Brazil y 10-15 mg/mL especie colectada en Venezuela), siendo la especie venezolana más activa contra este importante patógeno humano. Los resultados difieren en la actividad contra las bacterias Gram negativas, ya que solo los extractos de la especie venezolana inhibieron el desarrollo de *E. coli* y *P. aeruginosa*, con valores de CIM de 1 mg/mL y 20 mg/mL, respectivamente. Esta diferencia que se observa en la actividad antibacteriana en ambos estudios aun cuando se trata de la misma especie, puede deberse a varios factores, entre ellos: el clima, humedad, tipo de suelo, altitud, condiciones geográficas, entre otros, los cuales pueden afectar la biosíntesis de los metabolitos secundarios presentes en la planta [21,22].

Existen también reportes de ensayos de actividad antibacteriana realizados a otras especies del género *Vismia*, como el extracto etanólico de *V. baccifera* var. *dealbata* el cual mostró actividad contra *S. aureus* y *E. faecalis* a la concentración de 190 mg/mL [23]. Por otro lado, los extractos de las hojas, corteza y raíces de *V. guineensis* presentaron actividad contra *M. smegmatis* y *M. tuberculosis* mostrando valores de CIM entre 78,12 y 312,5 µg/mL; en el mismo estudio reportaron que esos extractos también presentaron actividad contra *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Shigella flexneri*, *E. faecalis*, *S. aureus* y *Bacillus megaterium* a concentraciones comprendidas entre 39,00 y 312,56 µg/mL [14]. Como puede observarse en los estudios con las especies *V. guianensis* (especie colectada en Brasil) [13] y *V. baccifera* [23], los valores de CIM encontrados siguen siendo superiores a los mostrados para la especie objeto del presente estudio por lo que se considera que los compuestos presentes en los extractos EHMDA y EHMM pueden ser útiles como posibles agentes antibacterianos.

CONCLUSIONES

La evaluación de la actividad antibacteriana mostró

que las fracciones EHMM y EHMDA, obtenidas con metanol y la mezcla diclorometano/acetato de etilo en proporción 1:1, respectivamente, fueron activas contra las bacterias grampositivas y gramnegativas: *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *E. faecalis*; lo que demuestra que la especie en estudio presenta un amplio espectro antibacteriano en ensayos realizados *in vitro*. Por otro lado, estas fracciones no presentaron citotoxicidad sobre células derivadas de riñón de embrión de mono Rhesus (MA-104) a la concentración de 250 µg/mL por lo que se consideran útiles como posibles agentes antibacterianos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Sadaquat A, Goundar R, Sotheeswaran S, Beaulieu C, Spino C. Benzophenones of *Garcinia pseudoguttifera* (Clusiaceae). *Phytochemistry*. 2000; 53: 281-284.

[2] Aristeguieta L. Familias y Géneros de los árboles de Venezuela. Edición especial. Caracas (Venezuela): Instituto Botánico; 1973. p 40-45.

[3] Ewan J. The South American species of *Vismia* (Guttiferae). Contribution from de National Herbarium. U S Nat Museum. 1962; 35 (5): 293-361.

[4] Albuquerque U, Monteiro J, Ramos M, Cavalcanti E. Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil. *J Ethnopharmacol*. 2007; 110: 76-91.

[5] Jiménez O, Meneses E, García C, Durango D. Caracterización de las propiedades y estabilidad del color de soluciones de los antranoides prenilados Ferruginina A y γ -hidroxiferruginina A. *Rev Colomb Quím*. 2007; 36 (2): 227-242.

[6] Magassouba FB, Diallo A, Kouyaté M, Mara F, Mara O, Bangoura O, et al. Ethnobotanical survey and antibacterial activity of some plants used in Guinean traditional medicine. *J Ethnopharmacol*. 2007; 114: 44-53.

[7] Ruyschaert S, Van Andel T, Van de Putte K, Van Damme P. Bathe the baby to make it strong and healthy: plant use and child care among Saramaccan Maroons in Suriname. *J Ethnopharmacol*. 2009; 121(1): 148-170.

[8] Bonte F, Meybeck, A. Composición cosmética o farmacéutica, particularmente dermatológica que contiene un extracto de *Vismia*. Oficina Española de patentes y marcas N° 2102818. Madrid (España). 1997.

[9] Suffredini I, Paciencia M, Varela A, Younes R. *In vitro* cytotoxic activity of Brazilian plant extracts against human lung colon and CNS solid cancers and leukemia. *Fitoterapia*. 2007; 78: 223-226.

[10] Álvarez E, Jiménez O, Posada C, Rojano B, Gil J, García C, et al. Actividad antioxidante y contenido fenólico de los extractos provenientes de las bayas de dos especies del género *Vismia* (Guttiferae). *VITAE*. 2008; 15 (1): 165-172. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-40042008000100020&lng=en&nrm=iso>. ISSN 0121-4004.

[11] Monacelli B, Pasqua G, Cuteri A, Vitali A. *In vitro* plants regeneration of *Vismia guianensis* through organogenesis. *Plant Cell, Tiss Organ Cult*. 1999; 58(2): 81-85.

[12] Ménan H, Banzouzi J, Hocquette A, Péliissier Y, Koné M, Mallié M, et al. Antiplasmodial activity and cytotoxicity of plants used in west african traditional medicine for the treatment of malaria. *J Ethnopharmacol*. 2006; 105: 131-136.

[13] Pereira S, Silva R, Ribeiro R, Ramos W, Vasconcelos F, Santos J, et al. Phytochemical evaluation and antimicrobial activity of ethanolic extract of *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy. *IJPSR*. 2011; 2(12): 3224-3229.

[14] Mbaveng A, Kuete V, Nguemaving J, Beng V, Nkengfack A, Meyer J, et al. Antimicrobial activity of the extracts and compounds obtained from *Vismia guineensis* (Guttiferae). *Asian J Traditional Medicines*. 2008; 3(6): 211-223.

[15] Vizcaya M, Morales A, Rojas J, Nuñez R. Revisión bibliográfica sobre la composición química y actividades farmacológicas del género *Vismia* (Guttiferae). *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat*. 2012; 11 (1): 11-34.

[16] Cory AH, Owen TC, Barltrop JA, Cory JG. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Comm*. 1991; 3(7): 207-212.

[17] Promega Corporation. Cell proliferation assay technical, Madison, Wisconsin, USA. 1978; Bulletin N° 169.

[18] Rondón M, Velasco J, Morales A, Rojas J, Carmona J, Gualtieri M, et al. Composition and antibacterial activity of the essential oil of *Salvia leucantha* Cav. cultivated in Venezuela Andes. *Rev Lat Quím*. 2005; 33: 40-44.

[19] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twentieth informational supplement. CLSI. 2010; 35 (15): 1-17.

[20] Mbwambo ZH, Apers S, Moshi MJ, Kapingu MC, Van Miert S, Claeys M, et al. Anthranoid compounds with antiprotozoal activity from *Vismia orientalis*. *Planta Med*. 2004; 70(8):

706-710.

[21] Deinum B, Van Es AJH, Van Soest PJ. Climate, nitrogen and grass. The influence of light intensity temperature and nitrogen on *in vivo* digestibility of grass and the prediction of these effects from some chemical procedures. Neth J Agric Sci. 1968; 16: 217-233.

[22] Salisbury F, Ross C. Fisiología vegetal. 4^{ta} Ed. México: Editorial Iberoamericana S.A.;1994. p 759.

[23] Salas F, Velasco J, Rojas J, Morales A. Antibacterial activity of the crude extract and constituents of *Vismia baccifera* var. *dealbata* (Guttiferae) collected in Venezuela. Nat Prod Commun. 2007; 2 (2): 185-188.