

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS
EXTRACTOS Y FRACCIONES DE LAS HOJAS DE *Siparuna sessiliflora*
(KUNTH IN HUMB. & BONPL.) A. DC.**

GUILLERMO FEDERICO PADILLA GONZÁLEZ

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE BIOLOGIA

BOGOTÁ D.C.

2010

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS
EXTRACTOS Y FRACCIONES DE LAS HOJAS DE *Siparuna sessiliflora*
(KUNTH IN HUMB. & BONPL.) A. DC.**

GUILLERMO FEDERICO PADILLA GONZÁLEZ

APROBADO

INGRID SCHULER, PhD

**Decano Académico
Facultad de Ciencias**

ANDREA FORERO

Directora Carrea de Biología

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS
EXTRACTOS Y FRACCIONES DE LAS HOJAS DE *Siparuna sessiliflora*
(KUNTH IN HUMB. & BONPL.) A. DC.**

GUILLERMO FEDERICO PADILLA GONZÁLEZ

APROBADO

ELIZABETH GIL ARCHILA, Msc

Directora

ALBA NOHEMI TELLEZ, PhD

Jurado

NOTA DE ADVERTENCIA

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

Artículo 23 de la Resolución Número 13 de julio de 1946.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
Resumen	1
Introducción	1
Planteamiento del Problema	2
Pregunta de Investigación	2
1. Marco Teórico	2
1.1 Las plantas y su uso en la Medicina Tradicional	2
1.2 Potencial de las plantas para la generación de nuevos fármacos	3
1.4 El género <i>Siparuna</i> y sus actividades farmacológicas	3
1.5 Análisis Ciencimétrico del género <i>Siparuna</i>	4
1.6 <i>Siparuna sessiliflora</i> y su posible potencial farmacológico	7
2. Objetivos	7
2.1 Objetivo General	7
2.2 Objetivos Específicos	7
3. Metodología	7
3.1 Recolección, identificación y preparación del material vegetal	9
3.2 Extracción y Fraccionamiento	9
3.2.1 Extracción con Petrol y Etanol	9
3.2.2 Floculación de los extractos Etanólico y de Petrol	9
3.2.3 Fraccionamiento del Extracto Etanólico	9
3.2.4 Fraccionamiento del Extracto de Petrol	9
3.3 Determinación de la Actividad Antibacteriana	10
3.3.1 Método de Difusión en Gel	10
3.3.2 Método de Bioautografía	11
3.4 Posibles compuestos Activos	11
3.4.1 Pruebas químicas	11
3.4.2 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas	12
4. Resultados y Discusión	13
4.1 Obtención de extractos y fracciones	13
4.1.1 Obtención de los extractos de Petrol y Etanol	13
4.1.2 Obtención de fracciones del extracto de Petrol	13
4.1.3 Obtención de fracciones del extracto de Etanol	14
4.2 Pruebas Químicas Preliminares	14
4.3 Determinación de la Actividad Antibacteriana	15
4.3.1 Fraccionamiento biodirigido y actividad antibacteriana	17
4.3.2 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria	20
4.4 Identificación de los Posibles Compuestos Activos	22
4.4.1 Pruebas químicas	22
4.4.3 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas	23

5. Conclusiones	25
6. Recomendaciones	25
Bibliografía	26
Anexo I. Resultados de las pruebas antibacterianas de las fracciones activas	29
Anexo II. Cromatogramas de las fracciones activas y tabla de compuestos.	33

RELACIÓN DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Publicaciones sobre el género <i>Siparuna</i> por área de conocimiento.	6
Tabla 2. Autores con más de una publicación sobre el género <i>Siparuna</i> .	7
Tabla 3. Cantidades y porcentaje de rendimiento del peso seco de los extractos totales obtenidos de las hojas de <i>Siparuna sessiliflora</i> .	13
Tabla 4. Cantidades y porcentaje de rendimiento del peso seco de las fracciones obtenidas a partir de 1g del extracto de Petrol de las hojas de <i>Siparuna sessiliflora</i> .	14
Tabla 5. Cantidades y porcentaje de rendimiento de las fracciones obtenidas del extracto Etanolico de las hojas de <i>Siparuna sessiliflora</i> .	15
Tabla 6. Resultado de las pruebas químicas preliminares, realizadas a los extractos totales de las hojas de <i>Siparuna sessiliflora</i> .	15
Tabla 7. Diámetro y porcentaje de los halos de inhibición que presentaron las fracciones activas contra <i>Bacillus subtilis</i> .	16
Tabla 8. Diámetro y porcentaje de los halos de inhibición que presentaron las fracciones F _{2,2,1B} , F _{2,2,1B} , F _{2,2,1,1} y F _{2,2,2,1} contra <i>Bacillus subtilis</i> .	18
Tabla 9. Diámetro y porcentaje de los halos de inhibición que presentaron las fracciones activas contra <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i> .	19
Tabla 10. Valores de R _f de las fracciones activas por bioautografía contra <i>Bacillus subtilis</i> .	20
Tabla 11. Diámetro de los halos de inhibición de las fracciones F _{2,2,1,1} y F _{2,2,2,1} frente a <i>B. subtilis</i> a concentraciones de 20, 15, 10, 5 y 2,5mg/ml.	21
Tabla 12. Cantidades y porcentaje de rendimiento de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna al vacío, de la fracción F _{2,2,2,1} de extracto Etanolico de las hojas de <i>Siparuna sessiliflora</i> .	21
Tabla 13. Diámetro y porcentaje de los halos de inhibición que presentaron las fracciones 2,2,2,1A-D contra <i>Bacillus subtilis</i> .	22
Tabla 14. Resultados de las pruebas químicas hechas a las fracciones con actividad antibacteriana positiva.	23

RELACIÓN DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Países con más de una publicación sobre el género <i>Siparuna</i>	5
Figura 2. Número de publicaciones por año a nivel mundial sobre el género <i>Siparuna</i>	6
Figura 3. Diagrama general de trabajo para la evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos y fracciones de las hojas de <i>Siparuna sessiliflora</i> .	9
Figura 4. Diagrama general para la extracción de alcaloides a partir de la fracción F _{2,2} obtenida del extracto Etanólico de las hojas de <i>Siparuna sessiliflora</i> .	18

RESUMEN:

La presente investigación, se basó en la evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos y fracciones obtenidas a partir de las hojas de *Siparuna sessiliflora*, una especie vegetal poco estudiada desde el punto de vista fitoquímico, a pesar de ser muy utilizada en la medicina tradicional, por parte de varias comunidades indígenas. Este estudio se llevó a cabo mediante la obtención de un extracto Etanólico y de Petrol a partir de las hojas de esta planta, y su fraccionamiento con solventes orgánicos de diferentes polaridades, evaluando la actividad antibacteriana que presentaron estas fracciones sobre *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*.

Inicialmente, Se encontró actividad positiva solo contra *B. subtilis*. Sin embargo, al hacer un fraccionamiento biodirigido a la fracción más activa, orientado a la extracción de alcaloides, se encontró actividad positiva también contra *S. aureus* y *E. coli*. Por medio de pruebas químicas y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, se logró determinar que la mayor actividad antibacteriana que presentan las hojas de *S. sessiliflora*, puede ser atribuida a los alcaloides de tipo isoquinolínico presentes en esta planta.

INTRODUCCION:

Las plantas a lo largo de la historia han sido consideradas como la principal fuente de remedios y pócimas, útiles para tratar las diferentes afecciones que aquejan la salud humana. Estas, debido a sus diferentes propiedades medicinales han jugado un papel fundamental en la medicina tradicional, e incluso, hoy en día las plantas son vistas como una exclusiva fuente de medicamentos para gran parte de la población mundial (Hamburger & Hostettmann, 1991).

Actualmente, se sabe que muchas de las plantas más utilizadas en la medicina tradicional herbaria, exhiben una gran diversidad de propiedades medicinales, muchas de las cuales resultan relevantes para la industria farmacéutica, ya que pueden ser utilizadas para propósitos terapéuticos (Pérez, 2007). Asimismo, debido a la enorme variedad de compuestos de origen vegetal, muchos de los cuales exhiben gran espectro de actividades biológicas, es indiscutible el potencial que representan las plantas para la generación de nuevos fármacos. Sin embargo, este potencial es aún altamente inexplorado, ya que solo una pequeña fracción de la diversidad vegetal existente, ha sido estudiada desde un enfoque fitoquímico y aún menos desde un punto de vista farmacológico (Hamburger & Hostettmann, 1991).

Algunas de las plantas que han sido estudiadas desde un enfoque fitoquímico, hoy en día, son consideradas como especies vegetales de gran importancia farmacológica, ya que a partir de estas, se han logrado aislar importantes compuestos con propiedades medicinales, e identificado relevantes actividades biológicas. Y debido a que el género *Siparuna* comprende algunas de las plantas a cuyos compuestos se le atribuyen importantes actividades biológicas tales como antitumorales, antimaláricas y antileishmaniasis, entre otras, la presente investigación pretendió evaluar la actividad antibacteriana que presentan los extractos y fracciones obtenidas a partir de las hojas de *Siparuna sessiliflora*.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

Por centenares de años, el hombre ha recurrido al uso de las plantas para tratar los diferentes problemas que aquejan la salud humana, constituyéndose estas, como una gran alternativa para preservar y recuperar la salud sobre todo en aquellas comunidades que están geográfica o culturalmente aisladas (Rossi *et al.*, 2002). Asimismo, debido a que las plantas producen gran cantidad de compuestos producto de su metabolismo secundario, muchos de los cuales tienen propiedades medicinales, actualmente es indiscutible el enorme potencial que presentan las plantas para la generación de nuevos medicamentos, razón por la cual, el interés en la generación de nuevos fármacos de origen vegetal ha estado siempre presente en el desarrollo de la industria farmacéutica (Hamburger & Hostettmann, 1991).

Sin embargo, aún cuando en el mundo existe una diversidad vegetal de aproximadamente 500.000 especies, solo una pequeña fracción de estas ha sido estudiada desde un punto de vista fitoquímico y farmacológico, siendo considerado este como un campo de la ciencia en que todavía queda mucho por investigar, razón por la cual, es necesaria la realización de estudios biodirigidos en los que se relacionen los metabolitos secundarios provenientes de las plantas con una potencial utilidad o actividad biológica, a fin de descubrir las posibles aplicaciones que se le pueden dar a los distintos compuestos de origen vegetal (Corredor *et al.*, 2009).

El género *Siparuna* comprende un diverso grupo de plantas, algunas de las cuales son consideradas como especies vegetales promisorias debido a sus potencialidades en la industria farmacéutica, ya que estas son empleadas empíricamente por parte de varias comunidades indígenas para tratar diferentes problemas de salud (Bernal & Correa, 1990). Adicionalmente, investigaciones fitoquímicas realizadas a varias de las especies pertenecientes a este género, han permitido establecer para sus compuestos, actividades tales como antibacterianas, antimaláricas y antileishmaniasis, entre otras. Pero, aún cuando varias de las especies del género *Siparuna* han sido suficientemente estudiadas en diversas investigaciones científicas, la especie *Siparuna sessiliflora*, pese a ser muy utilizada empíricamente en la medicina tradicional, no ha sido estudiada desde el punto de vista fitoquímico-farmacológico, razón por la cual la información obtenida a partir de ésta puede resultar relevante para la fitoquímica y la ciencia en general.

PREGUNTA DE INVESTIGACION:

¿Poseen las hojas de *Siparuna sessiliflora*, compuestos con actividad antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y/o *Pseudomonas aeruginosa*?

1. MARCO TEORICO:

1.1 Las plantas y su uso en la Medicina Tradicional

Desde el inicio de las primeras civilizaciones, ha existido siempre una gran diversidad de patologías que afectan la salud humana, para lo cual el hombre a lo largo de los años ha ido desarrollando una serie de técnicas y medicamentos a partir de diferentes sustratos, con el fin de combatir tales afecciones; siendo las plantas uno de los sustratos

más utilizados a lo largo de centenares de años para combatir las principales patologías que afectan la salud humana. El uso de plantas medicinales, es considerado como un tipo de conocimiento tradicional que ha pasado a lo largo de los años, de generación en generación ya sea por transmisión oral o escrita, logrando perdurar hasta la época actual (Hamburger & Hostettmann, 1991).

Hoy en día, las plantas medicinales son consideradas como una gran alternativa para el cuidado la salud, ya que según cifras de la Organización Mundial de la Salud, alrededor del 80% de la población mundial, hacen uso de las plantas, para el tratar y curar las principales enfermedades que los aquejan (Ramirez & Diaz, 2007).

1.2 Potencial de las plantas para la generación de nuevos fármacos

Debido al enorme potencial que presentan las plantas para generación de nuevos fármacos, hoy en día, las principales industrias farmacéuticas tienen gran interés en las plantas como fuente de nuevas moléculas activas, que sirvan como base para la generación de nuevos medicamentos (Hamburger & Hostettmann, 1991). Sin embargo, la búsqueda de compuestos químicos de origen vegetal, que presenten alguna actividad biológica relevante para la industria farmacéutica, es una tarea larga y tediosa que requiere de un enfoque multidisciplinario entre distintas áreas del conocimiento tales como la botánica, la farmacología y la química, entre otras, a fin de seguir el proceso que lleva de la identificación de la planta a la obtención de un compuesto puro farmacológicamente activo (Hamburger & Hostettmann, 1991).

Las plantas por su diversidad y riqueza en metabolitos secundarios, proporcionan una importante fuente de sustancias bioactivas, constituyendo las sustancias derivadas de las plantas alrededor del 25% de las medicinas en la actualidad. Adicionalmente, estas son fuente de estructuras químicas que sirven como base para la generación de nuevos fármacos. Cabe anotar que el estudio de las plantas desde un enfoque farmacológico, ha cobrado una mayor importancia en la actualidad, debido a que varios de los compuestos químicos de origen vegetal muestran un amplio espectro de actividad en algunos casos comparable a los antibióticos existentes (Hamburger & Hostettmann, 1991).

Igualmente, debido a la actividad antibacteriana que exhiben muchos extractos vegetales y productos naturales, “se ha revelado el potencial de las plantas superiores, como fuente de nuevos agentes anti-infectivos, permitiendo de esta manera un avance al uso empírico de las especies vegetales medicinales con una base científica” (Ramírez & Díaz, 2007).

1.4 El género *Siparuna* y sus actividades farmacológicas.

El género *Siparuna*, perteneciente a la familia Siparunaceae, (anteriormente reconocido como perteneciente a la familia Monimiácea según Valentini, *et al.*, 2010) comprende un diverso grupo de 65 especies vegetales, ampliamente distribuidas en el hemisferio sur, principalmente en regiones tropicales de Suramérica (Hutchinson, 1967). Algunas de las especies vegetales pertenecientes a este género, son utilizadas empíricamente en la medicina tradicional por parte de varias comunidades indígenas, razón por la cual, muchas de estas son consideradas como especies vegetales promisorias (Bernal & Correa, 1990).

Según diversos estudios químicos, se ha establecido que en términos generales, este género se caracteriza por biosintetizar compuestos tales como sesquiterpenos,

flavonoides y alcaloides isoquinolínicos del tipo aporfinas principalmente (Renner & Hausner, 2005; Leitão *et al.*, 1999). Los cuales según Abbasoglu *et al.* (1990), son compuestos considerados de gran importancia farmacológica, justificando de esta manera, las propiedades medicinales atribuidas a varias especies del género *Siparuna*.

El estudio fitoquímico de numerosas especies del género *Siparuna*, tales como: *S. guianensis*, *S. apiosyce*, *S. radiata*, *S. aspera*, y *S. thecaphora*, entre otras, ha conducido al aislamiento de metabolitos muy diversos, con una amplia variedad de actividades biológicas, dentro de las cuales cabe resaltar las siguientes:

Actividad antibacteriana de *Siparuna guianensis* sobre *Streptococcus faecalis*, *Mycobacterium phlei*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* (Lopez *et al.*, 2001).

Actividad antibacteriana de *Siparuna conica* y *Siparuna guianensis* sobre *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* (Pino *et al.*, 2008).

Actividad antiplasmodica atribuible a la especie *Siparuna guianensis* (Fischer *et al.*, 2004), al igual que a los extractos crudos de las hojas de *S. grandiflora*, *S. pauciflora* y *S. thecaphora* (Jennet *et al.*, 1999).

Actividad antitumoral o citotóxica, de los extractos de la especie *Siparuna decipiens* (Suffness *et al.*, 1988; López *et al.*, 1990).

Actividad antiprotozoica sobre *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania chagasi* de las especies *Siparuna apiosyce* y *Siparuna guianensis* (Tempone *et al.*, 2003).

Actividad antimalarica y antileishmaniasis de *Siparuna aspera* y *Siparuna radiata* respectivamente (Celine *et al.*, 2009).

Actividad antihemorrágica neutralizante del veneno de *Bothrops asper*, atribuible a las hojas de *Siparuna thecaphora* (Lomonte *et al.*, 2009).

1.5 Análisis Cienciométrico del género *Siparuna*.

El análisis cienciométrico del género *Siparuna*, se realizó por medio de la base de datos ISI Web of Science, tomando para tal propósito todas las publicaciones hechas sobre el género *Siparuna*, desde enero del 2001 hasta mayo del 2010. Encontrándose 26 publicaciones de las cuales 24 corresponden a artículos y 2 a *proceedings papers*.

Igualmente, se encontró que los países con más publicaciones sobre el género *Siparuna*, fueron Brasil y Estados Unidos; siendo el aporte de Colombia poco significativo con únicamente dos publicaciones (Figura 1), hechas por los autores Quijano C., Rangel J. y Pabón A.

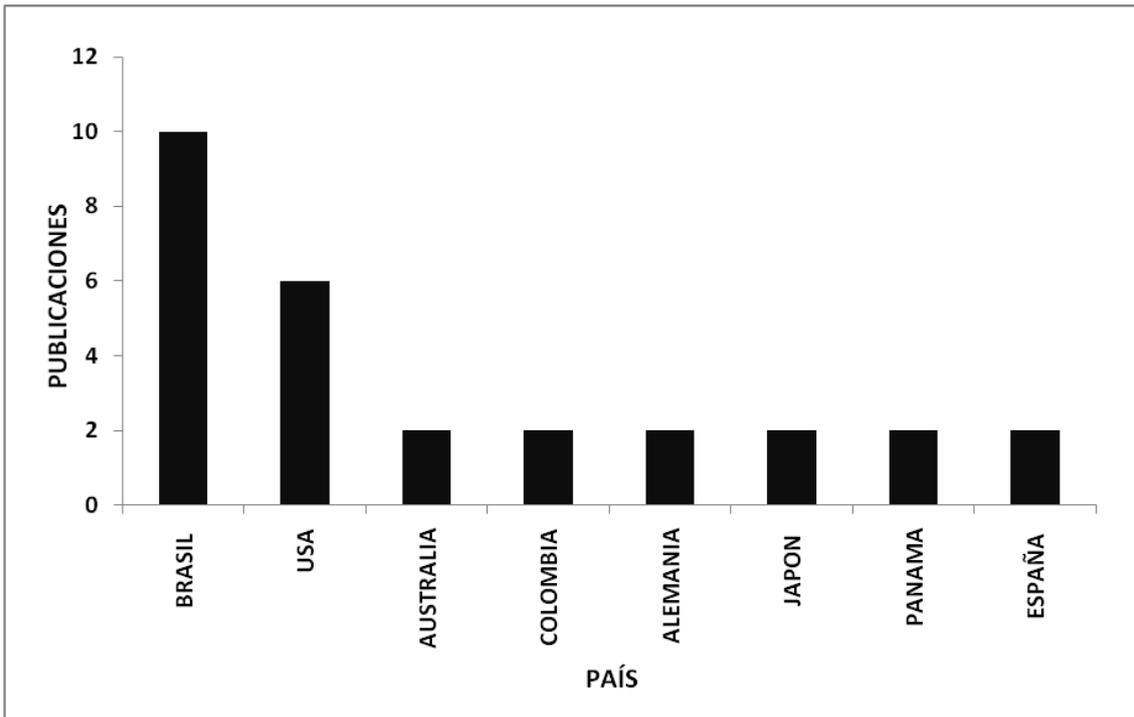


Figura 1. Países con más de una publicación sobre el género *Siparuna*. (Datos no excluyentes, ya que hay autores de diferentes nacionalidades en un mismo artículo).

Asimismo, los años en los que se reportaron más publicaciones sobre este género, fueron los años 2005 y 2008 (Figura 2).

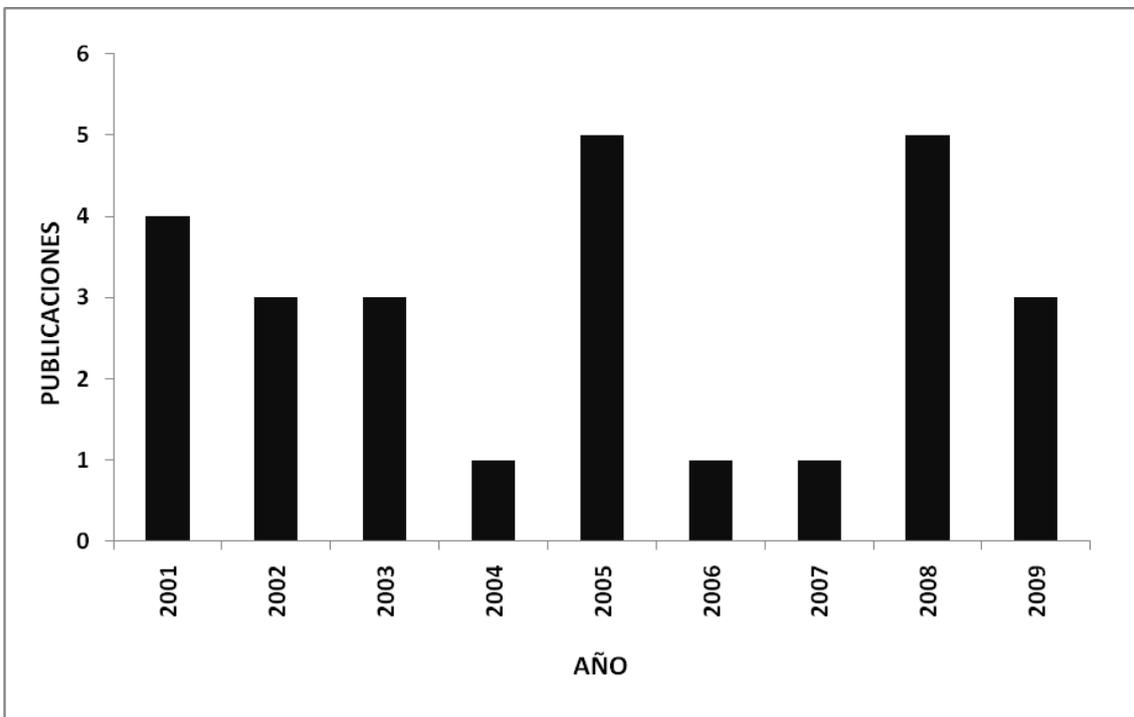


Figura 2. Número de publicaciones por año al nivel mundial sobre el género *Siparuna*.

Las revistas en las que se encuentra la mayoría de las publicaciones hechas sobre este género, fueron el *Jornal Of Essential Oil Research* y *American Journal Of Botany* con 5 y 4 publicaciones respectivamente.

Cabe anotar que las 26 publicaciones hechas sobre este género, se encuentran clasificadas en diferentes áreas del conocimiento según esta base de datos (Tabla 1). Sin embargo, en términos generales 11 de estas publicaciones corresponden a artículos relacionados con fitoquímica y/o actividad biológica. Igualmente, estas fueron publicadas por los autores relacionados en la Tabla 2.

Tabla 1. Publicaciones sobre el género *Siparuna* por área de conocimiento. (Datos no excluyentes, ya que hay artículos cuya temática involucra más de un área del conocimiento).

Área del Conocimiento	Publicaciones
PLANT SCIENCES	10
FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY	6
CHEMISTRY, APPLIED	5
CHEMISTRY, MEDICINAL	4
ECOLOGY	4
PHARMACOLOGY & PHARMACY	2
BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY	2
BIOLOGY	2
EVOLUTIONARY BIOLOGY	2
FORESTRY	2
AGRICULTURE, MULTIDISCIPLINARY	1
AGRONOMY	1
BIOCHEMICAL RESEARCH METHODS	1
CHEMISTRY, ANALYTICAL	1
GENETICS & HEREDITY	1
INTEGRATIVE & COMPLEMENTARY MEDICINE	1
MYCOLOGY	1

Tabla 2. Autores con más de una publicación sobre el género *Siparuna*.

Autor	Publicaciones
LEITÃO, GG	3
DE MORAIS, SM	2
GUPTA, MP	2
NICOTRA, AB	2
RENNER, SS	2
SOLIS, PN	2

Por último, es importante resaltar que este análisis se llevo a cabo también utilizando como criterio de búsqueda a la especie *Siparuna sessiliflora*, por ser la especie objeto de estudio en la presente investigación, encontrándose que esta no tiene ningún registro de publicaciones científicas en las revistas indexadas en la base de datos *ISI Web of Science* en el periodo comprendido entre enero del 2001 y mayo del 2010.

1.6 *Siparuna sessiliflora* y su posible potencial farmacológico.

Siparuna sessiliflora, es una especie vegetal de hábito arbustivo comúnmente conocida como Limoncillo, Limón de monte o Limón cimarrón, que en Colombia se encuentra distribuida en la mayoría de los departamentos del país, por lo general en claros de zonas boscosas, en alturas que van desde los 50m hasta los 1700m sobre el nivel del mar (Camargo, 1969; Renner & Hausner, 2005).

Según Renner & Hausner (2005) *Siparuna sessiliflora*, presenta diversos registros de usos etnobotánicos por parte de comunidades indígenas que habitan en Colombia, Ecuador y Perú, tales como los Huitoto, Nukak, Maraña, Quichua y Aguaruna, para tratar problemas de salud tales como la fiebre y el dolor de cabeza; igualmente, las hojas de esta especie son utilizadas como cataplasma para aliviar el reumatismo y curar infecciones como el herpes o las generadas por picaduras de insectos.

A la vista de los importantes antecedentes de género *Siparuna*, y los registros de usos etnobotánicos en la medicina tradicional de *S. sessiliflora*, es posible considerar a esta especie vegetal como una posible fuente de moléculas bioactivas contra algunos de los principales agentes infecciosos que afectan la salud humana.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General:

Evaluar la actividad antibacteriana que presentan los extractos y fracciones obtenidas a partir de las hojas de *Siparuna sessiliflora*, sobre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*.

2.2 Objetivos Específicos:

- Obtener extractos y fracciones con solventes orgánicos de diferentes polaridades a partir de las hojas de *Siparuna sessiliflora*.
- Determinar la actividad antibacteriana que presentan los extractos y fracciones de diferentes polaridades y la concentración mínima a la cual se logra inhibir el crecimiento bacteriano.
- Identificar el posible grupo de compuestos químicos responsables de la actividad antibacteriana.

3. METODOLOGIA:

La realización del presente trabajo de grado comprendió cuatro etapas, las cuales son: la preparación del material vegetal (recolección e identificación), la obtención de extractos y fracciones de diferentes polaridades, la determinación de la actividad antibacteriana de dichas fracciones, y por último la identificación del posible grupo de compuestos responsables de la actividad antibacteriana positiva. Este procedimiento es resumido en la Figura 3.

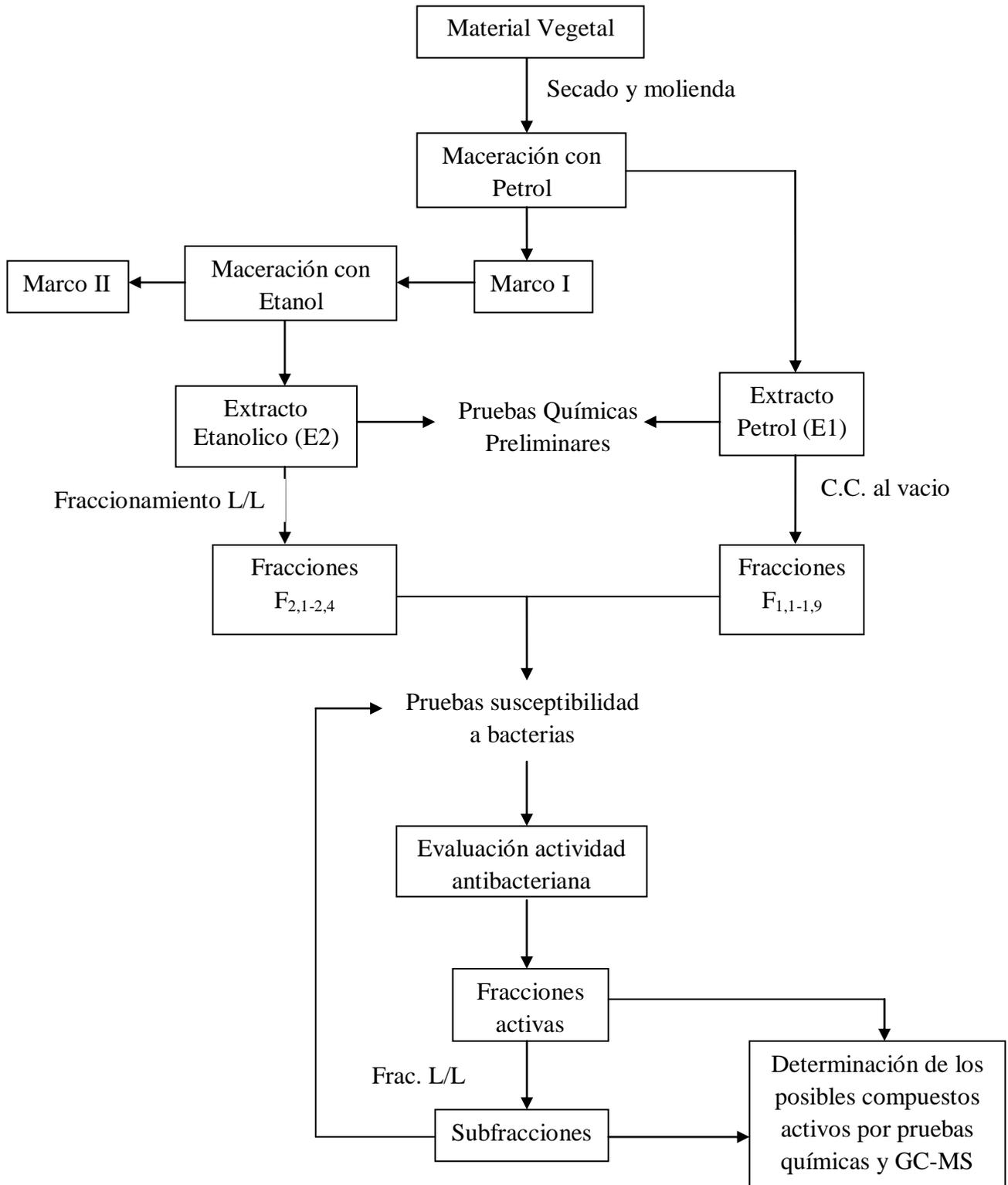


Figura 3. Diagrama general de trabajo para la evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos y fracciones de *Siparuna sessiliflora*.

3.1 Recolección, identificación y preparación del material vegetal

La recolección de esta planta se llevo a cabo en el municipio de Viotá Cundinamarca, a una altitud de 567 m.s.n.m., en la Vereda Brasil (Sendero ambiental Mogambo), y fue posteriormente identificada por Gaviria S. y García N. e incluida en la colección del Herbario de la Pontificia Universidad Javeriana, con el numero de colección 13.

Una vez colectado el material vegetal, se procedió a su secado a temperatura ambiente para su posterior molienda, por medio de la trituración de las hojas secas de esta especie en un molino eléctrico de cuchillas para producir el tamaño de partícula deseado.

3.2 Extracción y fraccionamiento

La extracción y fraccionamiento de las hojas, secas y molidas, de *Siparuna sessiliflora*, se llevó a cabo mediante un estudio biodirigido, orientado a la actividad antibacteriana de dichos extractos y las fracciones.

3.2.1 Extracción con Éter de Petróleo (Petrol) y Etanol: La extracción con Petrol y Etanol se llevo a cabo por medio del método de maceración en frío, poniendo en contacto el material vegetal con cada uno de estos solventes por un periodo de 5 días en tres diferentes ocasiones. Inicialmente, se llevo a cabo la extracción con Petrol, a fin de extraer los lípidos y compuestos de baja polaridad, para después realizar una extracción exhaustiva con Etanol al 96% y obtener los compuestos de mayor polaridad. Una vez obtenido el extracto Etanólico y de Petrol, estos fueron concentrados a baja presión y temperatura en un Rotoevaporador Büchi R-208 y llevados a sequedad, para su posterior pesado, floculación y fraccionamiento.

3.2.2 Floculación de los extractos Etanólico y de Petrol: Una vez obtenidos los extractos, se procedió a llevar a cabo la floculación de los mismos, a fin de extraer los compuestos lípidicos presentes en estos. Esto se llevo a cabo utilizando como sustancias floculantes la acetona en el caso del extracto de Petrol y agua destilada para el extracto Etanólico en igual o mayor proporción (2:1) con respecto al extracto diluido en su respectivo solvente. Finalmente, se dejo reposar por 24 horas, a fin de facilitar la aglutinación de las sustancias anteriormente mencionadas para su posterior filtrado al vacío y fraccionamiento.

3.2.3 Fraccionamiento del extracto Etanólico: El extracto Etanólico obtenido, se fraccionó por medio del método de fraccionamiento Liquido/Liquido continuo, con los siguientes solventes orgánicos de creciente polaridad: Petrol, CH_2Cl_2 , AcOEt y Butanol. Cada uno de estos fraccionamientos se llevo a cabo por un periodo de 72 horas continuas, a fin de que este proceso fuera lo mas exhaustivo posible. En cada caso se evaporó el solvente, llevando a sequedad cada fracción para su posterior pesado.

3.2.4 Fraccionamiento del extracto de Petrol: El fraccionamiento de este extracto, se llevo a cabo mediante Cromatografía en columna al vacío, utilizando para tal propósito la fase estacionaria Sílica Gel 60H, con una relación de muestra / adsorbente de 1:30; es decir 1g del extracto por 30g de la fase estacionaria. Como eluyentes se empleo Petrol, Diclorometano, Acetato de Etilo y Etanol, y combinaciones de los anteriores solventes en proporción 1:1, empleando para cada eluyente un volumen entre 25 y 200ml. (ver Tabla 4) En cada caso se evaporó el solvente, llevando a sequedad cada fracción para su posterior pesado. Una vez llevado a cabo esto, se procedió al monitoreo de las fracciones eluidas por medio de cromatografía en capa delgada, a fin de registrar los

diferentes compuestos eluidos en cada fracción, al igual que agrupar aquellas fracciones que presentaron la misma mezcla de compuestos.

Posterior a la extracción y fraccionamiento del material vegetal, se tomo el peso seco de cada extracto a fin de determinar el rendimiento del proceso, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Rendimiento} = \frac{\text{Peso Extracto(g)}}{\text{Peso total del material vegetal(g)}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 1})$$

3.3 Determinación de la actividad antibacteriana

Los microorganismos utilizados para la determinación de la actividad antibacteriana, procedieron de cepas control de acuerdo a la clasificación de *la American Type Culture Collection* (ATCC) y para el presente estudio se utilizaron: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6535) y *Bacillus subtilis* (ATCC 6638) como microorganismos indicadores para bacterias gram positivas y *Escherichia coli* (ATCC 8739) y *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 9027) como microorganismos indicadores para gram negativas.

Para la evaluación de la actividad antibacteriana, se emplearon los métodos de Difusión en Gel y Bioautografía, usando como medio de crecimiento Agar Mueller Hinton, debido a que éste es un medio rico en nutrientes, transparente y sin materiales termolábiles (Mueller & Hinton, 1941).

Como control positivo, se utilizó el Antibiótico Gentamicina (Laboratorio Schering-Plough), en una concentración de 3mg/ml, ya que éste es un antibiótico de amplio espectro. Como control de crecimiento negativo se utilizó Dimetilsulfoxido (DMSO) por ser el solvente en el cual se disolvieron las fracciones.

La preparación del inculo bacteriano se llevo a cabo en tubos de ensayo con 10ml de caldo Mueller Hinton, haciendo la suspensión de las bacterias en estos, hasta alcanzar una concentración de 0,5 en la escala de Mac-Farland. Posteriormente se procedió a adicionar 0.5 ml del inculo de cada una de las 4 bacterias en cada caja de petri con el Agar preparado de acuerdo a las especificaciones del fabricante, de tal modo que al crecer las bacterias sobre el agar no quedara ningún espacio libre de bacterias en la superficie del Agar.

3.3.1 Método de Difusión en Gel

El método consiste principalmente en agregar al medio de cultivo el antibiótico y extracto vegetal en concentración conocida, para que luego de la incubación, se logre observar las zonas de inhibición del crecimiento bacteriano sobre la superficie del agar (Ríos, *et al.*, 1988). Este método tiene la ventaja de utilizar una pequeña cantidad de la muestra a evaluar, y ofrece la posibilidad de ensayar varias sustancias contra un mismo microorganismo (Ríos, *et al.*, 1988).

Para la elaboración de los pozos, se utilizó el reverso de una Pipeta Pasteur, estableciéndose dos pozos por caja, los cuales contenían 50 µL de cada una de las fracciones de la planta disueltas en DMSO, en una concentración de 20, 40 y 100 mg/ml.

3.3.2 Método de Bioautografía

El método se basa en incluir los cromatogramas obtenidos por cromatografía en capa delgada al medio de cultivo, y observar que compuesto o grupo de compuestos en particular son los responsables de la inhibición del crecimiento bacteriano. Para ello se utilizan placas cromatograficas (MERCK), a las cuales previamente se procede a eliminar el solvente, para evitar falsas interpretaciones positivas. Este método tiene la ventaja de permitir la localización de la actividad en un complejo matriz de compuestos, permitiendo de esta manera la posibilidad de un directo aislamiento de los constituyentes activos (Ríos, *et al.*, 1988).

En el presente estudio, se empleo en particular la bioautografía de contacto, en la cual los componentes antimicrobiales son transferidos de la capa fina cromatografica al medio de cultivo por contacto directo (Ríos, *et al.*, 1988).

Una vez sembradas las muestras y los respectivos controles, por los dos métodos anteriormente descritos, las cajas de petri fueron incubadas por un periodo de 20 horas a una temperatura de 37°C. Después de transcurrido este tiempo se procedió a determinar el porcentaje de inhibición de las fracciones activas, utilizando la ecuación 2.

$$\% \text{ de Inhibición} = \frac{\text{D. Halo del Extracto} - \text{D. Halo DMSO}}{\text{D. Halo Gentamicina} - \text{D. Halo DMSO}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 2})$$

Fuente: (Ramírez & Díaz, 2007)

Donde D = Diámetro

Una vez identificadas las fracciones activas, se procedió a su fraccionamiento, biodirigido, dependiendo del grupo de sustancias que estas contenían, al igual que la determinación de la concentración mínima inhibitoria de la fracción más activa por el método de difusión en gel.

3.4 Posibles compuestos activos.

Una vez identificadas las fracciones que presentaron actividad antibacteriana positiva, se llevó a cabo la determinación cualitativa de los posibles grupos de compuestos responsables de dicha actividad, mediante el empleo de pruebas químicas y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

3.4.1 Pruebas químicas

Las pruebas químicas realizadas a las fracciones que presentaron actividad positiva, se basaron en el análisis fitoquímico preliminar de Bilbao (1997). Estas pruebas permiten establecer la presencia o ausencia de ciertos grupos de compuestos, por medio de una reacción que produce la alteración de la estructura molecular del mismo, permitiendo su agrupación de acuerdo a parámetros estructurales generales tales como grupos funcionales, sistema aromático, etc; dando como resultado una manifestación cualitativa sensible de dicho cambio (Bilbao, 1997).

3.4.2 Cromatografía de gases acoplada a espectrometro de masas GC-MS.

Esta técnica es útil para la separación, identificación y cuantificación de los componentes volátiles y semivolátiles presentes en mezclas complejas, y consiste en inyectar la fracción vegetal al cromatógrafo de gases, para la separación de los componentes de la muestra en la columna cromatográfica, obteniendo una elución sucesiva de los componentes individuales aislados, los cuales pasan inmediatamente al espectrometro de masas, en donde cada uno de estos compuestos se registra en forma de pico cromatográfico y se identifica mediante la comparación de su respectivo espectro de masas con la biblioteca del equipo. (Gutiérrez & Droguet, 2002)

El análisis se llevó a cabo por GC-MS 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 de sílice fundida, 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 incremento hasta 320°C (2min) @ 10°C/min.

Los espectros de masas se obtuvieron por impacto de electrones (EI) de energía de 70eV. Las temperaturas de la cámara de ionización y de la línea de transferencia fueron de 230 y 285 °C, respectivamente. El gas de arrastre utilizado fue 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*), a 4,75 *scan* s⁻¹, en el rango de masas *m/z* 20-300uma.

El reconocimiento de los componentes presentes en las fracciones se realizó con base en la comparación de espectros de masas adquiridos, confrontados con los reportados en la base de datos Willey7.

Se realizó una semicuantificación de los compuestos mayoritarios, con base en los porcentajes de área relativa de cada pico reportada en los cromatogramas. Cabe anotar que esta es una técnica muy sensible que responde a cualquier tipo de interferencia presente en las muestras analizadas, lo cual puede ocasionar alteraciones, y en algunas ocasiones, solapamiento de picos cromatográficos de interés, brindando valores erróneos de áreas.

4. RESULTADOS Y DISCUSION:

Una vez colectado y preparado el material vegetal de acuerdo a las especificaciones descritas en el numeral 3.1, se partió de 1000g de este para la realización del presente estudio.

4.1 Obtención de Extractos y Fracciones

La obtención de extractos y fracciones, llevada a cabo por medio de los métodos anteriormente descritos, mostro diferentes resultados en cuanto al porcentaje de rendimiento (Ecuación 1) de cada uno de los extractos y fracciones obtenidas.

4.1.1 Extractos de Petrol y Etanol

Los extractos de Petrol y Etanol, arrojaron los resultados relacionados en la Tabla 3, en cuanto al peso seco que presento cada extracto y su respectivo porcentaje de rendimiento. Estos valores fueron obtenidos por medio de la ecuación 1.

Tabla 3. Cantidades y porcentaje de rendimiento del peso seco de los extractos totales obtenidos por maceración en frio de las hojas de *Siparuna sessiliflora*.

Hojas (1000g)		
Extracto	Peso (g)	% Rendimiento
Petrol (E1)	20,5	2,0
Etanol (E2)	84,5	8,5

Una vez obtenido el extracto Etanólico, se tomaron 74,5g de este para su floculación, a fin de extraer los compuestos lípidicos que pudieran estar presentes en este extracto. Se encontró que de los 74,5g de este, 22,02g (29,55%) correspondían al peso del floculo. Según Molina (2008), la proporción de compuestos lipídicos puede deberse a una característica adaptativa de las especies vegetales a las condiciones climáticas en las que se encuentran, ya que se cree que debido a las características abióticas presentes en diferentes gradientes altitudinales, las plantas varían no solo estructuralmente (pubescencia y área foliar, etc.), sino también metabólicamente, modificando entre otros la proporción de compuestos lípidicos presentes en ellas (Pantis, *et al.*, 1987).

4.1.2 Obtención de Fracciones del extracto de Petrol

En la cromatografía al vacío del extracto de Petrol, se obtuvieron 17 fracciones, las cuales por monitoreo con cromatografía en capa delgada (CCD), fueron agrupadas en 9 diferentes fracciones de acuerdo a la similitud de sus compuestos. El cálculo del porcentaje de rendimiento de cada fracción (Tabla 4), se realizó con base en la ecuación 1. Este procedimiento se llevó a cabo por cuadruplicado, a fin de obtener una mayor cantidad de cada fracción para realizar las pruebas de actividad biológica. Cada réplica fue monitoreada por cromatografía en capa delgada, con el fin de tener certeza que las fracciones obtenidas tuvieran una composición similar de compuestos y poder agrupar dichas fracciones. En los casos en los que se encontró que las mismas fracciones eluidas en las diferentes réplicas de la cromatografía en columna fueron muy disímiles entre sí ($F_{1,8}$), fueron separadas y probada su actividad biológica independientemente.

Se encontró que las fracciones que presentaron un mayor porcentaje de rendimiento, fueron las fracciones F_{1,2} y F_{1,5}, las cuales fueron eluidas con los solventes Petrol: Diclorometano (1:1) y Diclorometano: Acetato de Etilo(1:1), respectivamente.

Tabla 4. Cantidades y porcentaje de rendimiento de las fracciones obtenidas por Cromatografía en columna al vacío del extracto de Petrol de las hojas de *Siparuna sessiliflora*.

Extracto Petrol (1g)					
Fracción	Solvente	Volumen de solvente utilizado (ml)	\bar{X} Peso (g)	σ	% Rendimiento
1,1	Petrol	100	0,028	0,011	2,8
1,2	Petrol:Diclorometano (1:1)	150	0,273	0,040	27,3
1,3	Diclorometano	150	0,063	0,008	6,3
1,4	Diclorometano	75	0,082	0,003	8,2
1,5	Diclorometano: Acetato de Etilo (1:1)	100	0,344	0,024	34,4
1,6	Acetato de Etilo	50	0,021	0,005	2,1
1,7	Acetato de Etilo	50	0,016	0,006	1,6
1,8	Acetato de Etilo: Etanol (1:1)	25	0,005	0,003	0,5
1,9	Etanol	150	0,019	0,004	1,9

4.1.3 Obtención de Fracciones del extracto de Etanol.

En la tabla 5, se presentan los resultados del fraccionamiento líquido/líquido continuo del extracto Etanólico, encontrándose que las fracciones que presentaron un mayor porcentaje de rendimiento fueron aquellas eluidas con Diclorometano y Butanol, con rendimientos del 19,43% y 10,04% respectivamente.

Tabla 5. Cantidades y porcentaje de rendimiento de las fracciones obtenidas por Fraccionamiento L/L del extracto Etanólico de las hojas de *Siparuna sessiliflora*.

Extracto EtOH (52,48g)			
Fracción	Solvente	Peso (g)	% Rendimiento
2,1	Petrol	1,2	2,3
2,2	Diclorometano	10,2	19,4
2,3	Acetato de Etilo	0,2	0,4
2,4	Butanol	5,3	10,0

4.2 Pruebas Químicas Preliminares

Las pruebas se realizaron a los extractos totales de Petrol (E1) y Etanol (E2), a fin de tener una idea generalizada de la composición química de las hojas de la planta, encontrándose compuestos tales como alcaloides, terpenos y flavonoides, entre otros

(Tabla 6), los cuales corresponden con los reportados como compuestos mayoritarios para varias especies del genero *Siparuna* (Leitão *et al.*, 1999).

Estos resultados demuestran la diversidad de compuestos químicos presentes en las hojas de *Siparuna sessiliflora*. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que según Valentini, *et al.* (2010) la composición química de las plantas varía entre diferentes países, regiones geográficas e incluso de acuerdo con las diferentes estaciones del año. Esto, debido a que las especies vegetales desarrollaron a lo largo de su curso evolutivo mecanismos de defensa y adaptación a su ambiente, siendo los compuestos químicos producto de la activación de rutas específicas del metabolismo secundario.

Tabla 6. Resultado de las pruebas químicas preliminares, realizadas a los extractos totales de las hojas de *Siparuna sessiliflora*.

Extracto	Grupo a Identificar	Prueba aplicada	Resultado*
Petrol	<i>Esteroides y Esteroles</i>	Lieberman-Burchard	+/-
	<i>Terpenos</i>	Salkowski	+
	<i>Terpenos y Esteroles</i>	Baljet	+
	<i>Sesquiterpenlactonas</i>	Hidroximato Férrico	+
Etanol	<i>Flavonoides y Fenoles</i>	Shinoda	+
		Cloruro Férrico	+
	<i>Glicosidos de Flavonoides o de terpenos</i>	Antrona	+
	<i>Alcaloides</i>	Dragendroff	+
	<i>Saponinas</i>	Prueba de la Espuma	+

*Los resultados fueron clasificados de acuerdo al siguiente criterio:

- = Resultado negativo
- +/- = Resultado dudoso
- + = Resultado positivo

4.3 Determinación de la Actividad Antibacteriana

Las fracciones F_{1,1-1,9} y F_{2,1-2,4}, al igual que el residuo hidroalcohólico del fraccionamiento L/L del extracto E2, se probaron contra las bacterias *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, a concentraciones de 20 y 40mg/ml, encontrándose, que solo *B. subtilis* fue sensible a las fracciones F_{1,6}, F_{1,7}, F_{1,9}, F_{2,1} y F_{2,2}. Posteriormente, la fracción F_{2,2} fue subfraccionada, por ser la más activa. (Tabla 7)

Las fracciones que no presentaron actividad positiva a concentraciones de 20 y 40mg/ml fueron evaluadas nuevamente a una concentración de 100mg/ml, a fin de descartar la posibilidad que la concentración inicial fuera muy baja para la obtención resultados positivos. De este análisis, se encontró que ninguna de estas fracciones presento actividad positiva por lo cual fueron descartadas como negativas.

Tabla 7. Diámetro y porcentaje de los halos de inhibición que presentaron las fracciones activas contra *Bacillus subtilis*.

Fracción	Concentración mg/ml	<i>Bacillus subtilis</i>	
		Halo Inhibición (mm)	% halo Inhibición
1,6	20	10	33,3
	40	12	40,0
1,7	20	10	33,3
	40	12	40,0
1,9	40	13	43,3
2,1	20	12	40,0
	40	16	53,3
2,2	20	14	46,7
	40	16	53,3
Control Positivo		30	100,0
Control Negativo		0	0

El análisis de los diámetros de los halos de inhibición permitieron determinar que las fracciones más activas fueron las F_{2,1} y F_{2,2} del extracto Etanólico, extraídas por fraccionamiento L/L con Petrol y Diclorometano respectivamente, ambas con porcentajes de inhibición del 53,33% (obtenidos por medio de la ecuación 2) a una concentración de 40mg/ml. Sin embargo, la fracción F_{2,2} fue más activa a 20mg/ml, con un diámetro del halo de inhibición de 14mm.

Según las normas del *National committee for Clinical Laboratory Standards* (N.C.C.L.S.) se considera resistencia por parte de la bacteria, para la gentamicina, si el diámetro de inhibición es menor o igual a 12mm. Sin embargo, aun cuando las fracciones F_{1,6} y F_{1,7} presentaron halos con diámetros de inhibición de 12mm a 40mg/ml, fueron consideradas como positivas, ya que por ser fracciones totales, estas son una mezcla compleja de compuestos y es posible que la actividad pueda deberse en algunos casos a uno o pocos compuestos en particular.

Estos resultados concuerdan con investigaciones hechas por López, *et al.* (2001) y Pino, *et al.* (2008), en las cuales se encontró que algunas especies del género *Siparuna* (*S. conica* y *S. guianensis*) fueron activas contra *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*. Igualmente, estos corroboran lo dicho por Arévalo & Enciso (1996) los cuales exponen que *Bacillus subtilis* presenta una muy alta sensibilidad, razón por la cual es muy utilizado en esta clase de bioensayos.

Adicionalmente, según Ramírez & Díaz (2007) muchas investigaciones demuestran que los microorganismos gram positivos son en general más sensibles que los gram negativos, debido posiblemente a que las bacterias gram negativas por poseer una capa más delgada de peptidoglicano en su pared celular, hay una disminución de la permeabilidad de la pared celular a sustancias externas, además de poseer una segunda membrana de lipopolisacáridos, ausente en las gram positivas. (Arévalo & Enciso, 1996)

4.3.1 Fraccionamiento biodirigido y actividad antibacteriana

Debido a que la fracción $F_{2,2}$ fue la más activa, y teniendo en cuenta que presenta compuestos de tipo alcaloides (Tabla 14), se llevo a cabo una extracción exhaustiva orientada hacia este tipo de metabolitos, a fin de determinar si estos eran algunos de los posibles compuestos responsables la bioactividad. Según Leitão *et al.* (1999) y Fischer *et al.* (2004), el género *Siparuna* se caracteriza por biosintetizar principalmente alcaloides isoquinolinicos de tipo aporfinicos, los cuales según Abbasoglu *et al.*, (1990) son considerados como compuestos de interés para la humanidad por su valor medicinal, ya que están dotados de actividades farmacológicas de gran interés; dentro de las cuales se resaltan importantes actividades antimicrobianas (Iwasa *et al.*, 2001; Carretero, 2001; Hufford *et al.*, 1974).

Al disolver la fracción $F_{2,2}$ (10g) en Diclorometano, esta produjo un sólido (7g), soluble en etanol el cual se separo por decantación, clasificándose de esta manera, dos subfracciones: $F_{2,2,1}$ como soluble en diclorometano y $F_{2,2,2}$ como soluble en etanol. Esta separación espontanea se debió posiblemente a que esta fracción poseía algunos compuestos de alta polaridad que coeluyeron con los compuestos de mediana polaridad solubles en Diclorometano.

Las dos subfracciones $F_{2,2,1}$ y $F_{2,2,2}$, se siguieron separando por medio de un fraccionamiento liquido/liquido discontinuo con acido clorhídrico (HCl) al 5%, monitoreando con el reactivo Dragendroff las fracciones obtenidas. Posteriormente, se alcalinizó con amoniaco hasta pH 10, para precipitar los alcaloides y extraerlos con cloroformo. Este procedimiento se llevo a cabo de acuerdo con la metodología para el aislamiento de alcaloides, según Domínguez (1973) en la cual se expone que en un medio básico estos compuestos son solubles en solventes orgánicos como el cloroformo. Procedimiento esquematizado en la Figura 4.

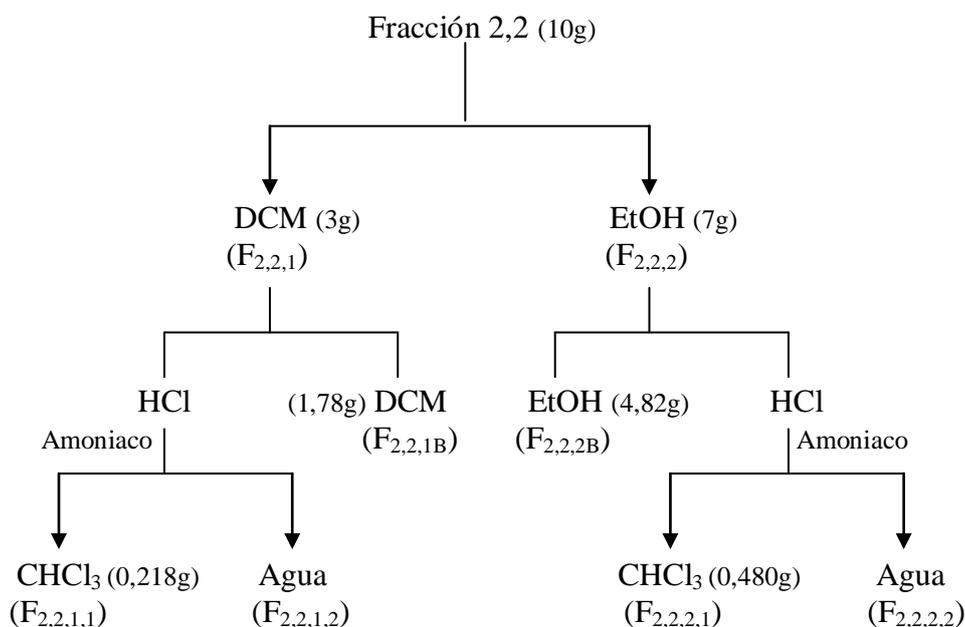


Figura 4. Diagrama general para la extracción de alcaloides a partir de la fracción $F_{2,2}$ obtenida del extracto Etanolico de las hojas de *Siparuna sessiliflora*.

Una vez obtenidas estas fracciones se procedió a evaluar su actividad antibacteriana por el método de difusión en gel, frente a *Bacillus subtilis*, a concentraciones de 20 y 40mg/ml, obteniendo los resultados relacionados en la Tabla 8.

Tabla 8. Diámetro y porcentaje de los halos de inhibición que presentaron las fracciones F_{2,2,1B}, F_{2,2,1B}, F_{2,2,1,1} y F_{2,2,2,1} contra *Bacillus subtilis*.

Fracción	Concentración mg/ml	<i>Bacillus subtilis</i>	
		Halo Inhibición (mm)	% de Inhibición
2,2,1B	20	10	33,3
	40	12	40,0
2,2,2B	20	0	0,0
	40	0	0,0
2,2,1,1	20	22	73,3
2,2,2,1	20	20	66,7
Control Positivo		30	100,0
Control Negativo		0	0,0

Los resultados arrojados por estas pruebas, permitieron determinar que las fracciones F_{2,2,1,1} y F_{2,2,2,1} (Figura 6. Anexo I) fueron las más activas, con porcentajes de inhibición de 73.3 y 66.7% respectivamente. Adicionalmente, se encontró que la fracción F_{2,2,2B} no presentó actividad positiva contra *Bacillus subtilis*, mientras la fracción F_{2,2,1B} (Figura 5. Anexo I) presentó una menor actividad, incluso comparada con la fracción original (F_{2,2}).

Las fracciones F_{2,2,1B} y F_{2,2,2B} corresponden a los residuos después de la extracción con HCl, lo que significa que no contienen alcaloides. Sin embargo, es posible que en la fracción F_{2,2,1B} quedaran trazas de alcaloides, por lo cual esta presentó menor actividad en comparación con las fracciones F_{2,2}, F_{2,2,1,1} y F_{2,2,2,1}.

Teniendo en cuenta que las fracciones F_{2,2,1,1} y F_{2,2,2,1} presentaron mayor actividad contra *B. subtilis*, se propuso probarlas contra *S. aureus*, *E. Coli* y *P. aeruginosa*, a fin de determinar si estas fracciones lograban inhibir el crecimiento de las otras bacterias evaluadas, encontrándose bioactividad contra *S. aureus* (Figura 8. Anexo I) y *E. Coli* (Figura 10. Anexo I), (Tabla 9). Cabe anotar que según investigaciones hechas por Ezekiel *et al.* (2009) se ha encontrado que algunos alcaloides presentan actividad positiva contra bacterias gram negativas, por lo cual sugieren que puede existir alguna clase de interacción entre estos alcaloides y algunos constituyentes de la pared celular de dichas bacterias, causando por lo tanto un daño citotóxico a este grupo de bacterias.

Los resultados obtenidos, indican que la mayor actividad antibacteriana atribuible a las hojas de *Siparuna sessiliflora*, puede ser debida a los alcaloides presentes en las hojas de esta planta. Es importante resaltar también que la bacteria *P. aeruginosa*, presentó resistencia a todas fracciones estudiadas, posiblemente debido a que esta es una bacteria con alta capacidad de adaptación, cuya resistencia de tipo natural está asociada con la baja permeabilidad de su membrana externa, y también con mecanismos de expulsión del antibiótico y beta lactamasas cromosómicas (Crespo, 2005).

Tabla 9. Diámetro y porcentaje de los halos de inhibición que presentaron las fracciones activas contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Fracción	Concentración mg/ml	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Escherichia coli</i>	
		D. halo Inhibición (mm)	% de Inhibición	D. halo Inhibición (mm)	% de Inhibición
2,2,1,1	20	19	67,9	16	57,1
2,2,2,1	20	17	60,7	12	42,9
Control Positivo		28	100,0	28	100,0
Control Negativo		0	0	0	0

Con el fin de determinar de forma rápida la sinergia o no de los compuestos presentes en las fracciones de la planta, todas las fracciones que presentaron bioactividad (F_{1,6}, F_{1,7}, F_{1,9}, F_{2,1}, F_{2,2,1B}, F_{2,2,1,1} y F_{2,2,2,1}), fueron probadas también por el método de bioautografía contra *B. subtilis*. Para tal propósito, se utilizaron placas cromatograficas (MERCK), con Silica gel 60F como fase estacionaria y diferentes combinaciones de solventes como fase móvil. Los valores de R_f de los compuestos en orden consecutivo que presento cada fracción, son presentados en la tabla 10.

Tabla 10. Valores de R_f de las fracciones activas por bioautografía contra *Bacillus subtilis*.

Fracción	Fase móvil	Numero de manchas	Valores de R _f	
2,1	CHCl ₃ 10	7	0,26	0,70
			0,42	0,79
			0,47	0,89
			0,53	
2,2,1,1	CHCl ₃ :MeOH 9:1	6	0,16	0,48
			0,26	0,61
			0,35	0,69
2,2,2,1	CHCl ₃ :MeOH 9:1	6	0,16	0,44
			0,26	0,61
			0,33	0,66

Los resultados de las pruebas mostraron que únicamente las fracciones F_{2,1}, F_{2,2,1,1} y F_{2,2,2,1} (Figuras 11 a 16. Anexo I), presentaron una conspicua actividad positiva. Sin embargo, la fracción F_{2,2,1B} (Figuras 17 y 18. Anexo I) presento una pequeña estela de inhibición por donde corrió la fracción, lo cual indica que posiblemente esta fracción presenta compuestos activos en menor concentración, confirmando de esta manera los resultados obtenidos por el método de difusión en gel, en donde esta fracción también presento menor actividad en comparación con las fracciones F_{2,1}, F_{2,2,1,1} y F_{2,2,2,1}.

En todos los casos se observó que la bioactividad era debida a toda la fracción, ya que hubo inhibición por parte de todos los compuestos presentes la misma, indicando que posiblemente, cada uno de los compuestos es activo contra la bacteria evaluada.

Debido a que las fracciones $F_{1,6}$, $F_{1,7}$ y $F_{1,9}$ no fueron positivas por bioautografía, pero si por difusión en gel, hace pensar en un posible efecto sinérgico entre sus compuestos. Sin embargo, no se puede descartar el hecho que debido a que la cantidad de muestra utilizada para la cromatografía en capa fina es tan baja, esta puede influir en los resultados de la actividad, ya que los compuestos activos pueden estar en muy baja concentración para lograr inhibir el crecimiento bacteriano.

4.3.2 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Teniendo en cuenta que las fracciones $F_{2,2,1,1}$ y $F_{2,2,2,1}$ fueron las más activas, se determinó la concentración mínima a la cual lograban inhibir el crecimiento de *B. subtilis*. (Tabla 11) Según las normas del N.C.C.L.S.

La tabla 11 permite concluir, que la concentración mínima inhibitoria para este microorganismo, se encuentra por debajo de 2,5 mg/ml, ya que a esta concentración aun se presentó un halo de inhibición de 14 y 13mm para las fracciones $F_{2,2,1,1}$ y $F_{2,2,2,1}$ respectivamente. (Figura 19. Anexo I)

Tabla 11. Diámetro de los halos de inhibición de las fracciones $F_{2,2,1,1}$ y $F_{2,2,2,1}$ frente a *B. subtilis* a concentraciones de 15, 10, 5 y 2,5mg/ml.

Fracción	Concentración mg/ml	<i>Bacillus subtilis</i>	
		D. halo Inhibición (mm)	% de Inhibición
2,2,1,1	15	20	66,7
	10	17	56,7
	5	17	56,7
	2,5	14	46,7
2,2,2,1	15	18	60,0
	10	15	50,0
	5	15	50,0
	2,5	13	43,3
Control Positivo		30	100,0
Control Negativo		0	0

Finalmente, aun cuando los objetivos del presente estudio ya se habían cumplido, se quiso realizar el subfraccionamiento de la fracción $F_{2,2,2,1}$, debido a que de esta fracción se disponía de una mayor cantidad de muestra en comparación con la fracción $F_{2,2,1,1}$. Esto se llevo a cabo, a fin de separar los alcaloides presentes y poder determinar los responsables de la mayor actividad antibacteriana.

Para tal propósito, se hizo una cromatografía en columna al vacío, utilizando 1g de Silica Gel 60H como fase estacionaria y 100mg de muestra. Como fase móvil se emplearon diferentes proporciones de diclorometano y metanol. (Tabla 12)

A partir de este procedimiento, se obtuvieron 6 fracciones alcaloideas, las cuales por monitoreo con CCD y utilizando reactivo Dragendroff como agente revelador, fueron agrupadas en cuatro diferentes fracciones, debido a la similitud de sus compuestos. El peso seco y porcentaje de rendimiento de estas fracciones, se presenta en la tabla 12.

Tabla 12. Cantidades y porcentaje de rendimiento de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna al vacío, de la fracción F_{2,2,2,1} de extracto Etanólico de las hojas de *Siparuna sessiliflora*.

Fracción 2,2,2,1 (100mg)			
Fracción	Solvente	Peso (mg)	% Rendimiento
2,2,2,1A	DCM:MeOH 9:1	21,4	21,4
2,2,2,1B	DCM:MeOH 8:2	4,8	4,8
2,2,2,1C	DCM:MeOH 1:1	37,5	37,5
2,2,2,1D	DCM:MeOH 1:9	30,0	30,0

Estas fracciones fueron probadas por el método de difusión en gel contra *Bacillus subtilis*, a concentraciones de 10, 5 y 2,5mg/ml, ya que esta fue la bacteria que mostro la mayor sensibilidad a los alcaloides de la planta, arrojando los resultados relacionados en la tabla 13.

Tabla 13. Diámetro y porcentaje de los halos de inhibición que presentaron las fracciones 2,2,2,1A-D contra *Bacillus subtilis*.

Fracción	Concentración mg/ml	<i>Bacillus subtilis</i>	
		D. halo Inhibición (mm)	% de Inhibición
2,2,2,1A	10	22	73,3
	5	18	60,0
	2,5	16	53,3
2,2,2,1B	10	20	66,7
	5	16	53,3
	2,5	15	50,0
2,2,2,1C	10	18	60,0
	5	14	46,7
	2,5	12	40,0
2,2,2,1D	10	10	33,3
	5	0	0,0
	2,5	0	0,0
Control Positivo		30	100,0
Control Negativo		0	0,0

Con base en los resultados por estas pruebas, se logro determinar que las fracciones F_{2,2,2,1A} y F_{2,2,2,1B} fueron más activas (Figuras 20 y 21. Anexo I), lo cual indica que son los alcaloides de baja polaridad presentes en estas fracciones, los posibles responsables de la mayor actividad antibacteriana atribuible a la fracción F_{2,2,2,1}.

4.4 Identificación de los Posibles Compuestos Activos

4.4.1 Pruebas químicas.

La determinación de los posibles grupos de compuestos activos, se llevo a cabo mediante el empleo de pruebas químicas, según los métodos descritos por Bilbao (1997) y Domínguez (1974). Los resultados de estas pruebas son presentados en la tabla 14. Estos resultados permitieron determinar que la actividad antibacteriana atribuible de las hojas de *Siparuna sessiliflora* posiblemente es debida a metabolitos secundarios tales como esteroides, terpenos, flavonoides, compuestos glicosilados y alcaloides.

Sin embargo, gracias al fraccionamiento biodirigido y las pruebas antibacterianas, se logro determinar que los alcaloides son los principales compuestos responsables de la mayor actividad antibacteriana, ya que las fracciones más activas fueron las que contenían mayor concentración de ellos. Cabe anotar que aun cuando varias investigaciones reportan importantes actividades antimicrobianas atribuibles a diferentes tipos de alcaloides, el mecanismo de acción por el cual estos logran inhibir el crecimiento bacteriano, es aun hoy en día desconocido (Ezekiel *et al.*, 2009).

Tabla 14. Resultados de las pruebas químicas hechas a las fracciones con actividad antibacteriana positiva.

Prueba Aplicada									
	Lieberman-Burchard	Salkowski	Baljet	Hidroxiato Férrico	Shinoda	Cloruro Férrico	Antrona	Dragendroff	Prueba de la Espuma
Grupo a identificar	<i>Esteroides y Esteroles</i>	<i>Terpenos</i>	<i>Terpenos y Esteroles</i>	<i>Sesquiterpen lactonas</i>	<i>Flavonoides y Fenoles</i>		<i>Glicosidos Flavonoides o terpenos</i>	<i>Alcaloides</i>	<i>Saponinas</i>
Fracción									
1,6	+	+	-	-	-	-	+	-	-
1,7	+	+	-	-	-	-	+	-	-
1,9	-	-	-	-	-	-	+	+	-
2,1	+	+	+	+	+	+	+	+	-
2,2	+	+	+	+	+	+	+	+	-
2,2,1B	+	+	+	+	+	+	+	+/-	-
2,2,2B	-	+	+	+	+	+	+	+/-	-
2,2,1,1	-	-	-	-	-	-	+	+	-
2,2,2,1	-	-	-	-	-	-	+	+	-

*Los resultados fueron clasificados de acuerdo al siguiente criterio:

- = Resultado negativo
- +/- = Resultado dudoso
- + = Resultado positivo

El análisis de los resultados obtenidos en la prueba Lieberman-Burchard para esteroides y esteroles, permitió determinar, según Bilbao (1997), que las fracciones F_{1,7}, F_{2,1}, F_{2,2} y F_{2,2,1B} posiblemente presentan colesterol o esteroides de tipo sistosterol, ya que una vez agregado el reactivo, la intensidad del color fue mínima, y fue creciendo lentamente hasta alcanzar la mayor intensidad después de los 20 minutos, agregado el reactivo. Es de resaltar que el sitosterol en forma libre y glicosilada, ha sido reportado por Leitão *et al.* (1990) como uno de los principales fitoesteroides presentes en las hojas de *Siparuna apiocye* y *Siparuna arianae*, de igual forma que por Braz Filho (1976) en troncos de *Siparuna guianensis*. Sin embargo, es importante tener en cuenta que cualquier esteroide o triterpenoide con un doble enlace puede dar positivo con esta reacción, así como los carotenos y xantofilas (Bilbao, 1997).

La aplicación de la prueba de Salkowski, evidencio la posible presencia de terpenos en algunas de las fracciones activas, y según Leitão *et al.* (1990), en el género *Siparuna*, se ha reportado como característica la presencia de Sesquiterpenos de tipo cadinano. Cabe anotar que varias investigaciones científicas han reportado actividades antibacterianas atribuibles a este tipo de compuestos químicos (Murphy, 1999).

Los resultados de las pruebas de Cloruro férrico y Shinoda, indican la posible presencia de flavonoides, pero no de flavonoles ni flavonas, ya que la aplicación de esta última prueba, evidencio una coloración rojiza clara y según Bilbao (1997) este tipo de compuestos reaccionan produciendo una coloración verde o azul. Sin embargo, según Leitão *et al.* (1990), los flavonoides del género *Siparuna*, son básicamente flavonoides derivados del Camferol ya sea en forma metoxilada o glicosilada, al igual que flavonoles y flavonas, los cuales según Murphy (1999), son compuestos sintetizados por las plantas como respuesta a infecciones microbianas, razón por la cual, se han descubierto actividades antimicrobianas *in vitro* para este tipo de compuestos.

4.4.2 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

El análisis de los resultados obtenidos por GC-MS, siguiendo los parámetros operacionales descritos en el numeral 3.4.2, realizados a las fracciones que presentaron actividad positiva, permitió el reconocimiento y cuantificación de algunos de los principales compuestos presentes en estas fracciones.

Los Cromatogramas de las fracciones activas, se presentan en las figuras 24 a 33 (Anexo II). En ellos se puede apreciar picos con intensidades abundantes, y es probable que los compuestos presentes en estos picos sean los responsables de la bioactividad.

El análisis del cromatograma de la fracción F_{1,6} (Figura 24, Anexo II) permitió determinar que el compuesto mayoritario presente en esta fracción es el acetato 2-Butanol-4-[2,2,6-trimetilciclohexil], con un tiempo de retención de 21,102min. Este compuesto tiene un porcentaje relativo del 69,12% dentro de la fracción. Posiblemente este compuesto es el principal responsable de la actividad positiva atribuible a esta fracción. Otros compuestos minoritarios identificados, corresponden a sesquiterpenos bicíclicos como el Eudesmol (Tabla 15, Anexo II). Estos resultados corroboran los obtenidos en las pruebas químicas, en donde se encontraron igualmente compuestos de tipo terpenico.

El cromatograma de la fracción F_{1,7} (Figura 25, Anexo II) mostro tres picos correspondientes a los compuestos del tipo sesquiterpenico como el aloaromadendreno y el alfa cadinol. Sin embargo el pico más abundante presente en esta fracción,

correspondiente al 16% de la misma, no fue identificado por la biblioteca del equipo. Para esta fracción se identificaron otros compuestos minoritarios de tipo sesquiterpenos como el beta eudesmol y el eicosanol (Tabla 15, Anexo II). En la fracción F_{2,1} se identificaron también sesquiterpenos como el T-cadinol (Figura 26. Anexo II), el cual es uno de los principales compuestos activos en esta fracción. Otros compuestos mayoritarios presentes en esta, no fueron identificados por la biblioteca del equipo. Como compuestos minoritarios se encontraron en general sesquiterpenos y ácidos grasos.

Para las fracciones F_{2,2}, F_{2,2,1,1}, F_{2,2,2,1}, F_{2,2,2,1C} y F_{2,2,2,1D}, algunas de las más activas, los cromatogramas (Figuras 27, 28, 29, 32 y 33 respectivamente. Anexo II), mostraron en general alcaloides isoquinolinicos tales como la asimilobina, la N-metilcalicotomina, la corlumina y la 1-benzil-6-metoxi-3,4-Dihidroisoquinolin-7-ol. Estos compuestos presentaron algunos de los porcentajes más altos para estas fracciones (Tabla 15, Anexo II), por lo cual se considera que posiblemente alcaloides de este tipo representan el principio activo de estas fracciones. Según estudios realizados por Simeón (1988) se ha encontrado que alcaloides como la asimilobina tienen actividad bactericida contra algunas bacterias gram positivas.

En las fracciones F_{2,2,2,1A} y F_{2,2,2,1B} no fue posible la identificación de los principales picos presentes. Sin embargo, se encontraron compuestos como el 1,2-dihidro-1,1,6-trimetilNaftaleno (hidrocarburo aromático) para la fracción F_{2,2,2,1A} (Figura 30. Anexo II) y el 4-(3-hidroxi-1-propenil)-2-metoxiFenol, para la F_{2,2,2,1B} (Figura 31. Anexo II). En estas fracciones se encontraron también alcaloides como la asimilobina, en menor proporción. Para las fracciones F_{2,2,2,1A} y F_{2,2,2,1C}, se encontró el compuesto 1,7-Dimetil-4,4a,5,6-tetrahidropirido-1H-[1,2-b]piridazin-2(3H)-ona, como uno de los compuestos más abundantes en ambas fracciones (Tabla 15. Anexo II). Este tipo de compuestos derivados del pirazol, han sido reportados como importantes precursores de antibióticos, que además, forman parte del sitio activo de antibióticos de tipo quinolonas. Estos actúan sobre las bacterias bloqueando la enzima ADN girasa, inhibiendo su replicación (Folks *et al.*, 2005). Se ha encontrado que algunas pirazinas inhiben el crecimiento de *S. aureus*, entre otros microorganismos (Folks *et al.*, 2005).

Los resultados obtenidos en el presente estudio, concuerdan con investigaciones hechas por Hufford *et al.* (1974) y Iwasa *et al.* (2001), quienes identificaron a los alcaloides del tipo isoquinolinico, como algunos de los principales compuestos responsables de importantes actividades antimicrobianas frente a varios microorganismos patógenos, al igual que actividades antimalaricas, citotoxicas y anti VIH, entre otras, razón por la cual estos son considerados como importantes compuestos de origen vegetal que pueden servir de base para la generación de nuevos y potentes agentes quimioterapéuticos (Iwasa *et al.*, 2001). Asimismo, según Waksmundzka *et al.* (2008) aquellas plantas que contienen alcaloides de tipo isoquinolinico, pueden ser usadas para propósitos terapéuticos, al ser incluidas en farmacopreparados o como fuente de compuestos individuales de uso farmacológico.

5. CONCLUSIONES

1. La identificación de alcaloides de tipo isoquinolínico en las hojas de *Siparuna sessiliflora*, revelan el enorme potencial que presenta esta especie como posible fuente de nuevos o mejores antibióticos contra algunas de las principales enfermedades causadas por las bacterias evaluadas.
2. Se evidenció actividad positiva por parte de algunas fracciones de las hojas de *Siparuna sessiliflora* contra *Escherichia coli*. Actividad que no ha sido reportada previamente en estudios realizados a otras especies del mismo género.
3. Este proyecto permitió aportar nuevo conocimiento al estudio fitoquímico de la especie *Siparuna sessiliflora*, al reportar compuestos tales como alcaloides, flavonoides y terpenos, entre otros, los cuales son de gran importancia medicinal.
4. La identificación de compuestos de la familia de las pirazinas por GC-MS, demuestra que las hojas de *Siparuna sessiliflora*, pueden ser utilizadas para obtener este tipo de compuestos, los cuales hacen parte del sitio activo de muchos antibióticos.

6. RECOMENDACIONES

Realizar estudios confirmatorios de la actividad positiva que presentaron los alcaloides hallados en las hojas de *Siparuna sessiliflora* contra *Escherichia coli*.

Probar las fracciones F_{2,2,1,1} y F_{2,2,2,1} a concentraciones inferiores a 2,5mg/ml sobre *B. subtilis*, e inferiores a 20mg/ml contra *S. aureus* y *E. coli.*, para determinar la CMI específicas que presentan estas fracciones sobre dichos microorganismos.

Seguir subfraccionando las fracciones F_{2,2,1,1} y F_{2,2,2,1}, hasta encontrar el principal compuesto responsable de la mayor actividad antibacteriana.

Se recomienda el trabajo con cantidades mayores de hojas para el posible aislamiento de sustancias que se encuentran en menor proporción.

Emplear metodologías orientadas hacia el aislamiento y purificación de los alcaloides presentes en las hojas de esta especie.

Llevar a cabo estudios de resonancia magnética nuclear y otros métodos espectroscópicos, con el fin de elucidar las estructuras de los compuestos no identificados por GC-MS.

Probar otras actividades biológicas para los alcaloides presentes en las hojas de *Siparuna sessiliflora*, ya que varios estudios han reportado actividades tales como antimaláricas.

BIBLIOGRAFIA:

Abbasoglu, U., Sener, B., Günay, Y., Temizer, H. 1990. Antimicrobial Activity of Some Isoquinoline Alkaloids. *Archiv der Pharmazie*. Vol 324, No 6. Pp: 379-380.

Arévalo, M., Enciso, A. 1996. Determinación de la actividad antimicrobiana (bacterias, hongos y levaduras) de algunas especies de *Espeletias* encontradas en el paramo de Guasca. Carrera de Bacteriología, Pontificia Universidad Javeriana, Tesis de pregrado. Bogotá, D.C.

Bernal, H., Correa, J. 1990. Especies vegetales promisorias de los países del Convenio Andrés Bello. Programa de Recursos Vegetales del Convenio Andrés Bello. Bogotá, D.C.

Bilbao, M. 1997. Análisis Fitoquímico Preliminar. Oficina de Publicaciones Universidad del Quindío. Armenia, Colombia.

Braz Filho, R. 1976. Oxoaporfine alkaloids from *Fusea longifolia* and *Siparuna guianensis*. *Phytochemistry*, Vol.15. Pp:1187-8.

Camargo, L. 1969. Catalogo Ilustrado de las Plantas de Cundinamarca. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, D.C.

Carretero, 2001. Alcaloides: derivados de Fenilalanina y tirosina (II). *Panorama Actual Med.* Vol 25. Pp: 341-346.

Celine, V., Pabon, A., Deharo, E., Albán, J., Esteves, Y., Lores, F., Rojas, R., Gamboa, D., Sauvain, M., Castillo, D., Bourdy, G. 2009. Medicinal plants from the Yaneshá (Peru): Evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol 123 Pgs: 413-422

Corredor, C., Guhl, F., Duque, C. 2009. Tendencias y Futuro de la Investigación en Parasitología y en Productos Naturales. Memorias del seminario internacional ACOFACIEN – ACCEFYN.

Crespo, M. 2005. La resistencia bacteriana: ¿estamos preparados para detectarla?. *Infectio*. Vol 9. No 1. Pp:31-45

Domínguez, X. 1973. Métodos de Investigación Fitoquímica. Primera edición. Editorial Limusa, S. A. México, D. F. Pp: 215

Ezekiel, C., Anokwuru, C., Nsofor, E., Odusanya, O., Adebajo, O. 2009. Antimicrobial activity of the methanolic and crude alkaloid extracts of *Acalypha wilkesiana* cv. *macafeeana* copper leaf. *Res. J. Microbiol.*, 4: 269-277.

Fischer, D., De Amorim, N., Bachiega, D., Salerno, C., Nogueira, F., Bonotto, S., De Oliveira, M., Yogi, A., Di Santi, S., Avila, P., Kirchgatter, K., Hrihorowitsch, P. 2004. In vitro screening for antiplasmodial activity of isoquinoline alkaloids from Brazilian plant species. *Acta Tropica*. Vol 92. Pp: 261-266.

- Folks, H., Pancechowska-Ksepko, H., Zwolska, A., Mieczysław, Z., Augustynowicz-Kopec, J. 2005. Synthesis and antibacterial activity of 1H-pyrazolo[3,4-b]pyrazine and -pyridine derivatives. *Il Farmaco* Vol. 60. Pp:513–517.
- Hamburger, M., Hostettmann, K. 1991. Bioactivity in plants: The link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry* Vol. 30, No. 12, Pp. 3864 – 3874.
- Hufford, C., Funderburk, M., Morgan, J., Robertson, L., 1974. Two antimicrobial alkaloids from heartwood of *liriodendron tulipifera* L. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Vol 64, No 5. Pp: 789-792.
- Hutchinson, J. 1967. *The Genera of Flowering Plants* Vol. II. Oxford University Press, London, Pp. 110.
- Iwasa, K., Moriyasu, M., Tachibana, Y., Kim, H., Wataya, Y., Wiegrebe, W., Bastow, K., Cosentino, L., Kozuka, M., Lee, K. 2001. Simple Isoquinoline and Benzylisoquinoline Alkaloids as Potential Antimicrobial, Antimalarial, Cytotoxic, and Anti-HIV Agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. Vol 11. Pp:2871-2884.
- Jennet, K., Mockenhaupt, F., Bienzle, U., Gupta, M., Eich, E. 1999. In vitro antiplasmodial activity of Central American medicinal plants. *Trop. Med. Intl. Health* Vol. 4. Pp: 611-615.
- Leitão, G., Simas, N., Soares, S., De Brito, A., Claros, B., Brito, T., Monache, F. 1999. Chemistry and pharmacology of Monimiaceae: a special focus on *Siparuna* and *Mollinedia*. *Journal of Ethnopharmacology* Vol. 65. Pp: 87–102.
- Lomonte, B., León, G., Angulo, Y., Rucavado, A., Núñez, V. 2009. Neutralization of *Bothrops asper* venom by antibodies, natural products and synthetic drugs: Contributions to understanding snakebite envenomings and their treatment. *Toxicon* Vol. 54. Pp: 1012–1028.
- Lopez, A., Hudson, J., Towers, G. 2001. Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* Vol. 77. Pp: 189–196.
- Molina, M. 2008. Variación de la pubescencia foliar en plantas y sus implicaciones funcionales a lo largo de gradientes altitudinales. *Ecosistemas*. Vol 17. Pp: 146-154.
- Murphy, M .1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 12. No 4. Pp: 564–582
- Mueller, J., Hinton. 1941. A protein free medium for primary isolation of *gococcus* and *meningococcus*. *Proc. Soc. Esp. Biol. Med.* 48. Pp: 330-333.
- National committee for Clinical Laboratory Standards (N.C.C.L.S.). 2000. Criterios de Interpretación Basados en el Método de Kirby-Bauer de Pruebas de Sensibilidad para Microorganismos de Fácil Crecimiento. Tabla M2-A7 Vol. 20 No. 1.

Pantis, J., Diamantoglou, S., Margaris, N. 1987. Altitudinal variation in total lipid and soluble sugar content in herbaceous plants on Mount Olympus (Greece). *Vegetatio*. Vol 72. Pp: 21-25.

Pérez, R. 2007. Actividad antimicrobiana de *Oedogonium capillare*. *Revista Mexicana de ciencias farmacéuticas* Vol. 38. Pp: 26 29.

Pino, N., Martínez, L., Stashenko, E. 2008. Actividad antibacteriana del aceite esencial de *S. conica* y *S. guianensis*. especies de la Familia Monimiaceae. *Revista Salud UIS*. Vol. 40. Pp: 140-142.

Ramirez, L., Diaz, H. 2007. Actividad Antibacteriana de Extractos y Fracciones del Ruibarbo (*Rumex conglomeratus*). *Scientia et Technica* Año XIII, No 33.

Ríos, J., Recio, M., Villar, A. 1988. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: A review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology* Vol. 23. Pp: 127–129.

Rossi, C., Arias, G., Lozano, L. 2002. Evaluación antimicrobiana y Fitoquímica de *Lepechinia meyeri* Walp "Salvia".

Renner, S., Hausner, G. 2005. *Siparunaceae*. *Flora Neotropica Monograph* 95. The New York Botanical Garden.

Simeón, A. 1988. Alcaloides de la corteza del tronco de *Annona cherimolia* mil Tesis doctoral, Universidad de Valencia. Departamento de Farmacología y Farmacotecnia.

Suffness, M., Abbott, B., Statz, D., Wonillowicz, E., Spjut, R. 1988. The utility of P388 leukemia compared to B16 melanoma and Colon carcinoma 38 for in vitro screening of plant extracts. *Phytotherapy Research*. Vol 2. Pp:89-97.

Tempone, A., Borborema, S., Andrade, H., Gualda, N., Yogi, A., Carvalho, C., Bachiega, D., Lupo, F., Bonotto, S., Fischer, D. 2003. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. *Phytomedicine*. Vol 12. Pp: 382–390.

Valentini, C., Rodriguez, C., Coelho, M. 2010. *Siparuna guianensis* Aublet (negramina): uma revisão. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Botucatu, Vol.12, n.1, Pp: 96-104.

Waksmundzka, M., Sherma, J., Kowalska, T. 2008. *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*. CRC Press, Taylor and francis Group. New York.