

Perfil químico y actividad antibacterial de los extractos de *Peltigera laciniata* (Merrill ex Riddle) Gyeln

Chemical profile and antibacterial activity of extracts from *Peltigera laciniata* (Merrill ex Riddle) Gyeln

Maby Martínez, Luz Eliana Mantilla, Daniel Ricardo Toro, Jhon Henry Galvis García

Universidad de Caldas, Colombia.

RESUMEN

Introducción: los líquenes, al presentar metabolitos secundarios como xantonas, antraquinonas y alcaloides, se han postulado como material con alto potencial biológico (e. g. antibiótico y antiviral), siendo el antibacteriano muy prometedor, el cual se determina por medio de antibiogramas por difusión, punto central de esta investigación.

Objetivo: evaluar la actividad antibacteriana de los extractos de *Peltigera laciniata* (Merrill ex Riddle) Gyeln. Olmo de hoja cortada.

Métodos: el material líquénico se sometió a percolación con etanol 96 %. Al extracto crudo etanólico se le realizó el aislamiento de alcaloides totales y flavonoides totales con adición de HCL 3 % y metanol, respectivamente. Ambas fracciones, fueron monitoreadas por cromatografía de capa fina y fraccionadas utilizando cromatografía de columna. Los extractos y fracciones se sometieron a bioensayos sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* para la valoración de los halos de inhibición, utilizando como control Sultamicilina. Los ensayos fueron realizados tres veces con 2 réplicas.

Resultados: al realizar la separación cromatográfica de los alcaloides, se observó aumento de la inhibición en comparación con la mezcla alcaloidal. La fracción A1 presenta valores de inhibición cercanos al control y presentó los menores valores de inhibición con respecto a los demás tratamientos evaluados. El efecto de la fracción de los flavonoides totales tuvo menor impacto sobre *E. coli* y *S. aureus*, sin embargo, es importante destacar la acción antibacteriana de los compuestos nitrogenados de tipo alcaloidal sobre microorganismos Gram positivos.

Conclusiones: en el perfil químico realizado a partir de los extractos de la especie de estudio se visualizó la presencia de metabolitos secundarios de tipo alcaloide y flavonoide, evidenciando el efecto antimicrobiano de los alcaloides presentes en el extracto y la fracción, lo cual ratifica el potencial farmacológico de tipo antibacterial, atribuido al núcleo Protoberberínico.

Palabras clave: alcaloides; antibiograma; Flavonoides; *Peltigera laciniata*.

ABSTRACT

Introduction: Due to their content of secondary metabolites such as xanthenes, anthraquinones and alkaloids, lichens have been suggested to be a material of high biological potential (e.g. antibiotic and antiviral). Their very promising antibacterial potential may be determined by diffusion antibiograms, the main concern of the present study.

Objective: Evaluate the antibacterial activity of extracts obtained from *Peltigera laciniata* (Merrill ex Riddle) Gyeln, cutleaf elm.

Methods: The lichenic material was percolated with 96 % ethanol. Total alkaloids and total flavonoids were isolated from the crude ethanolic extract by adding 3 % HCL and methanol, respectively. Both fractions were monitored by thin-layer chromatography and fractioned by column chromatography. Extracts and fractions were subjected to bioassays against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* for inhibition haloes, using sultamicillin as control. The assays were conducted 3 times with 2 replications.

Results: Upon chromatographic separation of the alkaloids, an increase was observed in inhibition when compared with the alkaloidal mixture. Fraction A1 displayed inhibition values close to the control. Fraction FT showed lower inhibition values than the other treatments evaluated. The fraction of total flavonoids had a lesser impact on *E. coli* and *S. aureus*, but alkaloidal nitrogenated compounds had significant antibacterial activity against Gram-positive microorganisms.

Conclusions: The chemical profile of extracts from the study species revealed the presence of alkaloidal and flavonoidal secondary metabolites, as well as the antimicrobial effect of the alkaloids contained in the extract and the fraction. This confirms the antibacterial pharmacological potential attributed to the protoberberine core.

Keywords: alkaloids; antibiogram; flavonoids; *Peltigera laciniata*.

INTRODUCCIÓN

Los líquenes son una relación simbiótica entre hongos y algas fotosintéticas (y/o cianobacterias), los cuales producen una variedad de metabolitos secundarios únicos, con el fin de adaptarse a condiciones ambientales adversas.¹⁻³ Estos organismos producen nalcano, betaínas inusuales y glicolípidos, ácidos grasos ramificados e insaturados, oxigenados y halogenados.^{4,12} Las sustancias liquénicas tienen muchas funciones ecológicas, incluyendo antibióticos, antibacterianos, antivirales, antiinflamatorio, analgésico, antipirético y antiproliferativo.^{1,5,12-14}

Las rutas biogénicas clásicas permiten al micobionte fabricar sustancias que se encuentran genéricamente en los hongos, además la asociación con el alga les permite especificidades que abren paso hacia las llamadas "Sustancias Liguénicas". Estas corresponden a los productos del metabolismo secundario que se depositan en el talo.¹³ Estas sustancias desempeñan un papel tan importante en la fisiología de los líquenes¹⁴ como en la clasificación taxonómica de los mismos, lo que ha aportado un campo de investigación activo.¹⁵

Los líquenes, junto con briófitos y hepáticas, se desarrollan sobre árboles^{15,16} o sobre rocas.¹⁷ Los líquenes epífitos pueden ser utilizados como indicadores de los niveles de contaminación asociados con el aumento de población.¹⁸ Además, las comunidades de líquenes pueden ser usados como bioindicadores del cambio en los ecosistemas forestales, en relación a los cambios en la calidad del aire, el clima y el manejo forestal en grandes regiones y períodos de tiempo largos, como es el caso de *P. laciniata*, donde, el potencial biológico de esta especie se ha demostrado a través de su uso en la medicina tradicional, la cual ejerce una amplia variedad de acciones biológicas incluyendo su uso como antioxidantes.¹⁹ En este estudio, se investigaron los metabolitos secundarios producidos por *P. laciniata*, además de determinar la actividad biológica de los extractos y fracciones del organismo ensayo citado.

MÉTODOS

Recolección del material

Aspectos botánicos

El material liquénico se colectó en el municipio de Manizales, departamento de Caldas, Colombia. Un ejemplar reposa en el herbario adscrito a la Facultad de Agronomía de la Universidad de Caldas (FAUC) bajo el número 20601.

Aspectos químicos: preparación del extracto

El material se percoló con etanol al 96 % mediante el método de maceración en frío, el cual se llevó a cabo hasta que se obtuvieron filtrados incoloros. Al extracto etanólico se le realizó un desengrase con hexano y luego se realizó la extracción clásica de alcaloides totales, donde el extracto se disuelve en HCl 3 %, con el fin de obtener los alcaloides totales (A.T.) en forma de sales y, luego, extraerlos puros en medio básico con diclorometano.²⁰ En cuanto a los flavonoides, estos fueron aislados con metanol, recomendado para garantizar la extracción de los compuestos más polares.²¹ Dichas sales fueron monitoreadas por cromatografía de capa fina (TLC) y lámpara de luz U.V., y fraccionadas con cromatografía de columna (CC), con el empleo de sílica gel como fase estacionaria y un sistema de solventes como fase móvil (Hexano/CHCl₃/AcOET/MeOH). Posteriormente, se realizó espectrofotometría UV-Vis, con rangos de 200 nm a 300 nm (intervalo de 20 nm), con el fin de identificar el núcleo de los metabolitos mayoritarios presentes tanto en los extractos como en las fracciones.

Actividad antibacteriana sobre *Escherichia Coli* y *Staphylococcus Aureus*

El ensayo de actividad antibacteriana se efectuó por el método de Antibiograma por difusión o difusión en disco de papel filtro Whatman® (6 mm de diámetro; 0,6 mm de espesor) en agar Müller-Hinton para la valoración de los halos de inhibición de *E. coli* y *Staphylococcus aureus*;²²⁻²⁷ previamente se realizó la estandarización de la turbidez para la preparación del inóculo por medio del estándar de 0.5 McFarland,²⁸ con el fin de obtener una suspensión de $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ UFC/mL. Los discos se impregnaron con las diluciones etanólicas de los extractos y compuestos depurados a concentraciones de 1000, 500 y 250 µg/mL, incubados a 37 °C durante 48 h en cajas de Petri.^{28,29} Como control se utilizó Sultamicilina (Ampicilina/Sulbactán; 1000 µg/mL), de acuerdo a los estándares reportados en la literatura.³⁰ En todos los casos los ensayos se efectuaron por triplicado. Se midió el diámetro (mm) de todos los halos de inhibición, con el fin de comparar el efecto de los extractos con el medicamento utilizado como control y así determinar los puntos de corte, basados en los criterios del European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), documento "Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters version 1.3",³⁰ para identificar la sensibilidad o resistencia del microorganismo frente a los tratamientos.

RESULTADOS

En el extracto etanólico del líquen se identificaron aquellos alcaloides de los cuales se disponía de la cantidad necesaria, por medio de espectrofotometría U.V.; evidenciando máximos de absorción hacia 280 y 320 nm y para los flavonoides máximos de absorción entre 300 y 325 nm (fig. 1), característico de sistemas protoberberinicos y flavonas,³¹ respectivamente.

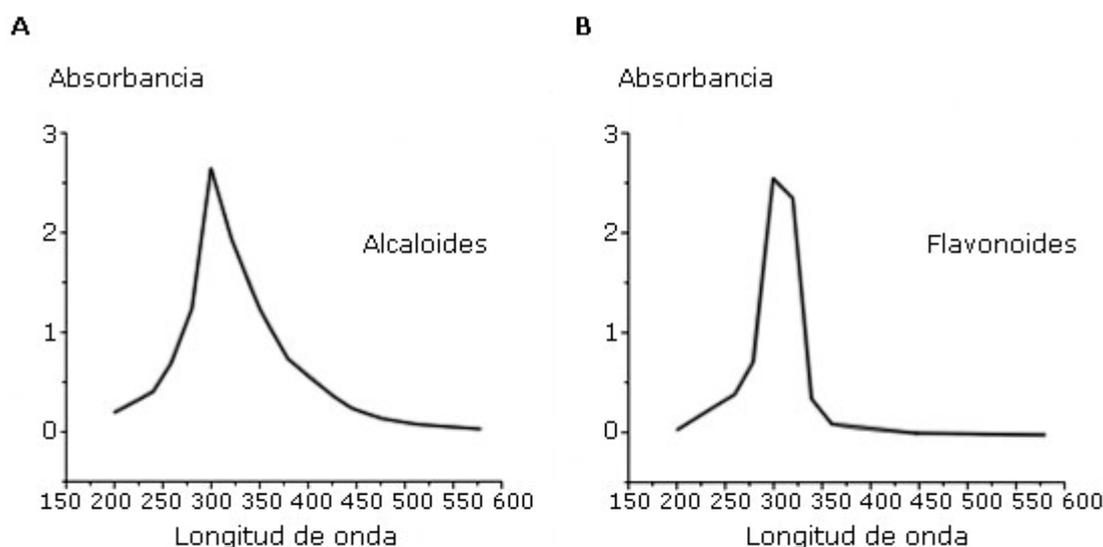


Fig. 1. Absorbancias obtenidas por espectrofotometría a diferentes longitudes de onda de la fracción.

Se determinó la inhibición de los extractos y fracciones evaluadas sobre *Escherichia coli* (Extracto Crudo= 5,05 mm; Alcaloides Totales= 12,16 mm y Fracción A1= 8,58 mm) y *Staphylococcus aureus* (Extracto Crudo= 8,4 mm; Alcaloides Totales= 9,63 mm y Fracción A1= 10,26 mm) (tablas 1 y 2; fig. 2). El efecto del extracto crudo sobre ambos microorganismos tuvo un menor impacto, sin embargo, es importante destacar la acción antibacterial sobre microorganismos Gram positivos.

Tabla 1. Porcentajes de preparación y número de registro de las plantas que componen el EHAM₇

Planta	Porcentaje de preparación	Número de registro	Lugar de recolección
<i>Bidens odorata</i> Cav L	13	IBUG189162	En los tejidos de Zapote del Valle, Jal. Roca Azul de Jocotepec, Jal. San Juan de Morelia, Mich. (Septiembre)
<i>Tecoma stans</i> L	13	IBUG189157	
<i>Equisetum hyemale</i> L	13	IBUG189159	
<i>Rosmarinus officinalis</i> L	13	IBUG189160	Por medio de distribuidores de plantas del mercado de Jamaica, México, D.F. (octubre-noviembre)
<i>Cynara scolymus</i> L	11	IBUG189158	
<i>Peumus boldus</i> L	11	IBUG189163	
<i>Linum usitatissimum</i> L (semillas)	26	IBUG189161	

Tabla 2. Fitoconstituyentes encontrados en el EHAM₇

Plantas	Rendimiento total	Ácido Siálico	Carbohidratos	Polifenoles	Hexosaminas	Total
<i>Bidens odorata</i>	18,70	0,897	1,254	1,541	4,300	7,992
<i>Tecoma stans</i>	14,97	0,554	0,768	1,233	5,708	8,263
<i>Linum usitatissimum</i>	5,42	0,069	0,130	0,014	5,210	5,423
<i>Cynara scolymus</i>	23,88	1,000	6,460	3,200	0,391	11,051
<i>Equisetum hyemale</i>	16,72	0,641	2,174	0,040	3,880	6,735
<i>Peumus boldus</i>	22,97	3,420	4,650	2,848	1,121	12,039
<i>Rosmarinus officinalis</i> L	14,47	0,654	0,900	1,505	2,344	5,403

Los datos se presentan en g por cada 100 g de hojas y flores secas.

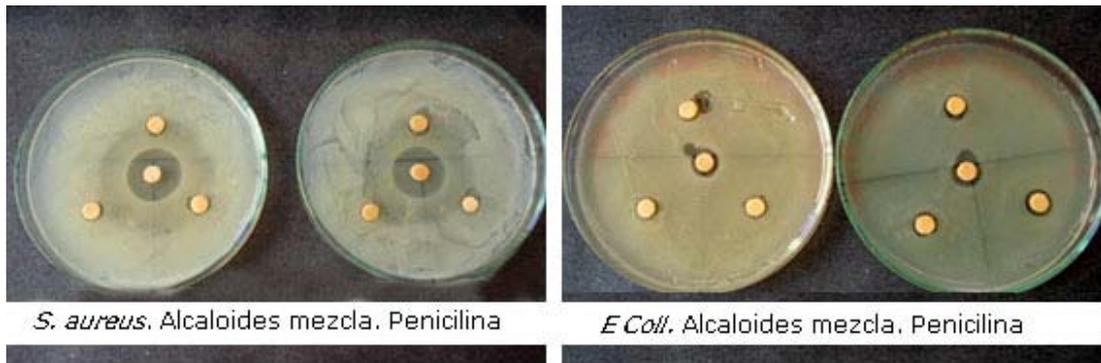


Fig. 2. Halos de inhibición sobre *E. coli* y *S. aureus* para los tratamientos (Fracciones alcaloidales y flavónicas).

La [fig 3](#) muestra el efecto antimicrobiano de los diferentes tratamientos. Se evidencia mayor efecto sobre *S. aureus*, específicamente de las fracciones alcaloidales. Las fracciones de flavonoides presentan menor actividad frente a los dos microorganismos. La fracción EC, presuntivamente presenta mayor actividad sobre *E. coli*. La fracción A1 presenta mayor actividad antibacterial, tanto para *E. coli* como para *S. aureus*, convirtiendo esta fracción en un candidato promisorio para futuras investigaciones.

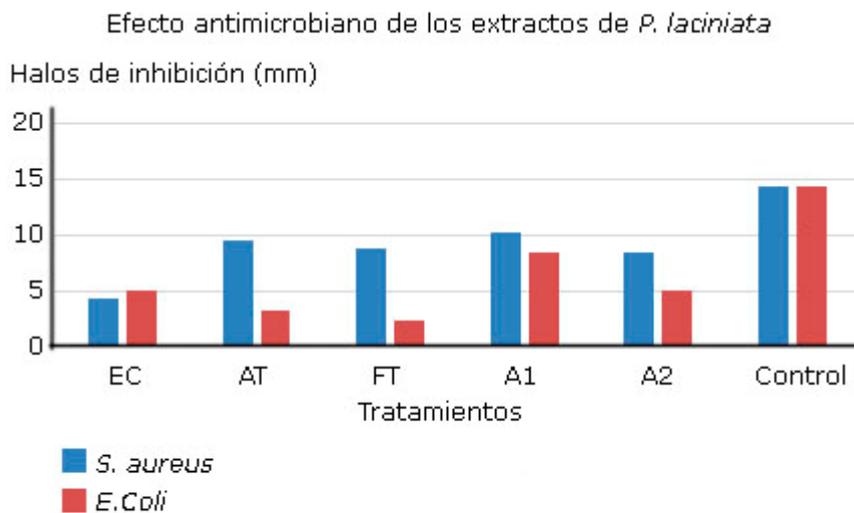


Fig. 3. Comparación actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos de *P. laciniata*.

De acuerdo a los datos reportados en la [tabla 1](#), para los bioensayos sobre *Escherichia coli* se evidencia que al realizar la separación cromatográfica de los alcaloides, aumentó la inhibición en comparación con la mezcla alcaloidal. La fracción A1 presenta valores de inhibición cercanos al control, siendo promisorio para futuras investigaciones. La fracción FT presentó los menores valores de inhibición con respecto a los demás tratamientos evaluados. Sin embargo, se carece de información referente a la bioactividad de los compuestos separados pertenecientes a esta fracción, por ende, se recomienda la evaluación de dichos metabolitos.

Con respecto a la evaluación antimicrobiana sobre *S. aureus* se observó que el extracto crudo presentó una promisorio actividad antimicrobiana, con valores cercanos al control usado. Esto permite concluir las diferencias en la bioactividad de un extracto crudo, debido a que fue notablemente más activo frente a un organismo gram positivo que frente a un organismo gram negativo de las especies evaluadas.

DISCUSIÓN

Al realizar el perfil químico de *P. laciniata*, por espectrofotometría UV-Vis y CCF, se visualiza la presencia de metabolitos de tipo alcaloide y flavonoide, similar a lo reportado por Plaza *et al.*,³² quienes encontraron polifenoles de tipo flavonoide en la especie de estudio. La bioactividad reportada por la etnobotánica colombiana para esta especie, podría fundamentarse no solo en los diferentes mecanismos ejercidos principalmente por los compuestos alcaloidales.

El efecto sinérgico del conjunto de metabolitos secundarios que pudieron evidenciarse en la especie no favorece en general la actividad antimicrobiana, esto es evidente cuando comparamos la inhibición del extracto crudo en las dos especies evaluadas, en *E. coli* se obtienen halos de inhibición de 5,05 mm y *S. aureus* de 8,4 mm. Al realizar la separación cromatográfica y aislar los alcaloides del extracto se observa un mayor efecto antimicrobiano en *E. coli* (12,16 mm) que en *S. aureus* (9,63 mm), su actividad mayoritaria en la especie gram negativa puede atribuirse a las flavonas visualizadas en UV-Vis.

Al comparar el efecto antimicrobiano, con respecto a las diferentes concentraciones evaluadas, se observa que en *E. coli* los alcaloides totales, los flavonoides totales y el extracto crudo a concentraciones de 1000 µg/mL y 250 µg/mL tienen una diferencia poco significativa ($\leq 0,5$ mm) en el promedio de diametro, esto permite suponer que los metabolitos presentes en estas muestras a bajas concentraciones tienen un efecto antimicrobiano similar pero poco atractivo; al comparar las fracciones A1 y A2, a estas concentraciones, es notable la diferencia en la actividad, estas tuvieron la inhibición más cercana al control siendo 10,5 mm y 8,10 mm, respectivamente, lo que demuestra que al obtener compuestos más depurados la actividad antibacteriana se potencia, en el caso de la *E. coli*.

Con respecto a los productos (EC, AT y FT) en *S. aureus* las diferencias de estos a concentraciones de 1000 µg/mL y 250 µg/mL son mayores ($\geq 0,7$ mm), lo que permite concluir que la concentración si influye en la actividad antimicrobiana. Con respecto a los otros productos (A1 y A2), tienen una mejor actividad inhibitoria a 1000 µg/mL con un promedio de diametro de 10 mm. Es importante destacar que en esta evaluación, los alcaloides totales demostraron tener más actividad que los separados (promedio de diametro de 12,5 mm) demostrando que el efecto sinérgico de los alcaloides favorece la actividad antimicrobiana en especies gram negativas esto puede deberse a la estructura hidrofóbica (anillos aromáticos) de los alcaloides.

Al comparar los diametros promedio de las muestras versus el control es evidente que los metabolitos presentes en *Peltigera laciniata* muestran un mayor efecto antimicrobiano en *S. aureus* que en *E. coli*, siendo promisorio para futuras investigaciones, con el objetivo de evaluar la actividad de alcaloides hidrofóbicos (protoberberínicos).

A pesar de que las dos especies bacterianas fueron resistentes a las muestras, los resultados permiten concluir que en la especie *Peltigera laciniata* se encuentran metabolitos de tipo alcaloidal que poseen propiedades farmacológicas de tipo antimicrobiano, especialmente en gram negativas por lo cual, se hace necesario continuar estudiando estos principios activos que permitan determinar las propiedades antitumorales y antiprotozoarios.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad de Caldas, específicamente al personal del laboratorio de Microbiología y del laboratorio de Bioquímica y a los integrantes de la línea de investigación de Microbiología Ambiental del Grupo GEAAS (Grupo de Investigación de Estudios Ambientales en Agua y Suelo).

CONFLICTOS DE INTERESES

Todos los autores manifiestan expresamente no tener conflicto alguno de intereses, ni internos ni externos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barrero E, Ortega S. Líquenes de la reserva natural integral de Muniellos, Asturias, consejería del medio ambiente, ordenación del territorio e infraestructura del principado de Asturias. KDK ediciones. 2003.
2. De Valencia ML, Aguirre-CJ. Hongos liquenizados. Trabajo de Grado. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. 2002.
3. Miadlikowska J, François L. Phylogenetic revision of the genus *Peltigera* (lichen-forming ascomycota) based on morphological, chemical, and large subunit nuclear ribosomal DNA data. *Int. J. Plant Sci.* 2000;161:925-58.
4. Torres A, Dor I, Rottem E, *et al.* n-Alkane and fatty acid variations in the lichen *Xanthoria parietina*, their photobiont *Trebouxia* sp. and mycobiont, from Jerusalem hills. *Eur. J. Biochem.* 2003;270:2120-5.
5. Rezanka T & Dembitsky V. Novel brominated lipidic compounds from lichens of Central Asia. *Phytochemistry.* 1999;51:963-8.
6. Dembitsky VM. Lipids of Lichens. *Prog. Lipid Res.* 1992;31:373-97.
7. Dembitsky VM, Bychek IA, Shustov MV, *et al.* Phospholipid and fatty acid composition of some lichen species. *Phytochemistry.* 1991;30:837-9.
8. Dembitsky VM, Pechenkina-Shubina EE, *et al.* Glycolipids and fatty acids of some seaweeds and marine grasses from the Black Sea. *Phytochemistry.* 1991;30:2279-83.

9. Dembitsky VM, Rezanka T, Bychek IA. *et al.* Identification of fatty acids from *Cladonia lichens*. *Phytochemistry*. 1991;30:4015-8.
10. Dembitsky VM, Rezanka T, Bychek IA. Fatty acid composition of *Parmelia lichens*. *Phytochemistry*. 1992;31:841-3.
11. Dembitsky VM, Rezanka T, Bychek IA. Fatty acid and phospholipids from lichens of the order Lecnorales. *Phytochemistry*. 1992;31:851-3.
12. Dembitsky VM, Shubina EE, Kashin AG. Phospholipid and fatty acid composition of some Basidiomycetes. *Phytochemistry*. 1992;31:845-9.
13. Toledo FJ, García A, León F, *et al.* Ecología química en hongos y líquenes. *Rev Acad Colomb Cienc*. 2004;28:509-28.
14. Armaleo D, Clerc P. Lichen chimeras: DNA analysis suggest that one fungus forms two morphotypes. *Experimental mycology*. 1990;15:1-10.
15. Toledo FJ, García A, León F, *et al.* Ecología química en hongos y líquenes. *Rev Acad Colomb Cienc*. 2004;28:509-28.
16. Dembitsky VM. Lipids of bryophytes. *Prog. Lipid Res*. 1993;32:281-56.
17. Wilson MJ. Weathering of rocks by lichens with special reference to stonework: a review. *Land. Reconst. Managem. Series*. 2004;3:51-60.
18. Conti ME. Lichens as bioindicators of air pollution. *Sustainable World*. 2008;17:111-62.
19. Klos A, Rajfur M, Stodolka M, *et al.* Chemometric methods in environmental monitoring using lichens. *Ecol. Chem. Engineer*. 2006;13:515-22.
20. Lock O. Investigación fitoquímica: Métodos en el estudio de productos naturales. 2nd ed. Lima, Perú: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú; 1994. 300 pp.
21. Martínez S, González J, Culebras JM, *et al.* Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp* 2002;5:271-8.
22. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. Approved standard M2-A5. 1993a. 31.
23. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A3. Villanova, PA. 1993b. 30.
24. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. Approved standard. Villanova, PA. 2001. 29.
25. Müller J, Hinton J. A protein free medium for primary isolation of *Gocococcus* and *Meningococcus*. *Proc. Soc. Esp. Biol. Med*. 1941;48:330-3.

26. Bauer AL, Kirby WMM, Sherris JC, *et al.* Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am. J. Clin. Pathol.* 1966;45:493-6.
27. McFarland J. Nephelometer. *J. Am. Med. Assoc.* 1907;14:1176-8.
28. Rojas A., Hernández L. Screening for antimicrobial activity of crude drugs extracts and pure natural form Mexican medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 1992;5:275-83.
29. Arroyo G. Determinación químico-bromatológica y actividad antimicrobiana de *Spondias mombi* L. (Ubo). *Ciencia e Investigación.* 2000;3:59-62.
30. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters (citado 30 mar 2014). (v 1.3). [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk test documents/EUCAST breakpoints v1.3 pdf.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/EUCAST_breakpoints_v1.3_pdf.pdf)
31. Magalhães AF, Tozzi A, Sales B, *et al.* Twenty three flavonoids from *Lonchocarpus subglaucescens*. *Phytochemistry.* 1996;42:1459-71.
32. Plaza CM, Díaz de Torres L, Lückingf RK, *et al.* Antioxidant activity, total phenols and flavonoids of lichens from Venezuelan Andes. *Pharm. Pharmacogn. Res.* 2014;2:138-47.

Recibido: 13 de febrero de 2015.

Aprobado: 28 de septiembre de 2016.

Jhon Galvis. Departamento de Química, Universidad de Caldas, Manizales, Colombia.
Correo electrónico: Jhon.galvis@ucaldas.edu.co