

# Actividades citotóxicas y antibacterianas de las raíces de *Capparis zeylanica* Linn

*Antibacterial and Cytotoxic Activities of Capparis zeylanica* Linn Roots

HAQUE M<sup>1</sup>, HAQUE ME<sup>1</sup>, RAHMAN MM<sup>1</sup>, KHONDKAR P<sup>1</sup>, RAHMAN MM<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Phytochemistry Research Laboratories, Department of Pharmacy, University of Rajshahi,  
Rajshahi-6205, Bangladesh

<sup>2</sup>Centre for Pharmacognosy and Phytotherapy, The School of Pharmacy, University of London,  
29–39 Brunswick Square, London WC1N 1AX, RU.

Autor de contacto: mukhlesur.rahman@pharmacy.ac.uk

## RESUMEN

Se analizaron extractos crudos y un ácido graso, ácido octadec-7-en-5-ynoic (1), de la corteza de la raíz de *Capparis zeylanica* Linn. (familia de las Capparidaceae) para observar sus actividades antibacterianas frente a la bacteria Gram positiva y Gram negativa. Entre los extractos crudos, el extracto de cloroformo mostró una buena actividad frente a todos los organismos de prueba. El ácido graso (1) aislado del extracto de cloroformo mostró actividades antibacterianas frente a todos los organismos de prueba, a excepción de *E. coli*. Las actividades se compararon con un antibiótico estándar: la kanamicina. Las concentraciones inhibitorias mínimas (CIH) de 1, determinadas mediante la técnica de dilución en serie, fueron 64 µg/ml frente a *Bacillus subtilis* y *Shigella dysenteriae*. Las actividades citotóxicas del extracto crudo y del ácido graso (1) se observaron mediante el bioensayo de gambas en salmuera y el valor de LC<sub>50</sub> del compuesto fue 6,27 µg/ml

PALABRAS CLAVE: *Capparis zeylanica*. Capparidaceae. Actividad antibacteriana. Citotoxicidad.

## ABSTRACT

Crude extracts and a fatty acid, octadec-7-en-5-ynoic acid (1), from the root bark of *Capparis zeylanica* Linn. (Fam. Capparidaceae) were screened for their antibacterial activities against Gram positive and Gram negative bacteria. Among the crude extracts, chloroform extract showed good activity against all test organisms. The fatty acid (1) isolated from chloroform extract exhibited antibacterial activities against test organisms except *E. coli*. The activities were compared to a standard antibiotic- kanamycin. The minimum inhibitory concentrations (MICs) of 1, determined by serial dilution technique, were found to be 64 µg/ml against *Bacillus subtilis* and *Shigella dysenteriae*. The cytotoxic activities of crude extract and fatty acid (1) were observed by brine shrimp bioassay and LC<sub>50</sub> value of the compound was found to be 6.27 µg/ml

KEYWORDS: *Capparis zeylanica*. Capparidaceae. Antibacterial activity. Cytotoxicity.

Fecha de recepción: 09-05-2007

Fecha aceptación: 08-03-2008

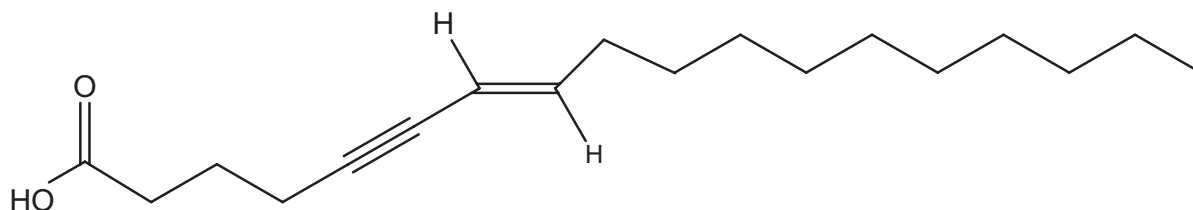
## INTRODUCCIÓN

*Capparis zeylanica* Linn. (familia de las Capparidaceae), conocida en la región como Kalokera o Kalukaon, es una planta herbácea trepadora rígida, nervuda y muy ramificada, con amplia presencia en Bangladesh, India, Filipinas, Sri Lanka y Malasia.<sup>1-3</sup> La corteza de la raíz de esta planta se utiliza tradicionalmente como sedante, para afecciones estomacales y también para el cólera.<sup>3,4</sup> En el norte de India, las hojas se utilizan como rubefaciente,<sup>5</sup> anti irritante y como cataplasma en furúnculos, hinchazones y hemorroides.<sup>3,6</sup> A pesar de su gran número de usos medicinales tradicionales en India subcontinental, existe muy poca documentación sobre sus actividades biológicas y farmacológicas así como de sus constituyentes químicos. Hace poco se ha identificado la actividad inmunoestimulante de sus hojas.<sup>7</sup> Anteriormente, se habían identificado pocos ácidos grasos procedentes de esta planta.<sup>8</sup> Recientemente, se ha aislado otro ácido graso, el ácido octadec-7-en-5-ynoic (1), de la raíz.<sup>9</sup> Como parte de nuestra investigación continuada de constituyentes de plantas biológicamente activos,<sup>10-16</sup> comunicamos ahora las actividades citotóxicas y antibacterianas de extractos crudos y del ácido octadec-7-en-5-ynoic (1) (Figura 1 de *C. zeylanica*).

## INTRODUCTION

*Capparis zeylanica* Linn. (Fam. Capparidaceae), locally known as Kalokera or Kalukaon, is a rigid, wiry and much branched climbing shrub that is widely distributed throughout Bangladesh, India, the Philippines, Sri Lanka and Malaysia.<sup>1-3</sup> The root bark of this plant is used traditionally as sedative, stomachic, and also in cholera.<sup>3,4</sup> In Northern India, the leaves are used as a rubefacient,<sup>5</sup> counter irritant and as a cataplasm in boils, swellings and piles.<sup>3,6</sup> Despite its wide range of folk medicinal uses in India sub-continent, there is very little documentation on its pharmacological and biological activities as well as its chemical constituents. Immunostimulant activity of its leave is reported recently.<sup>7</sup> Few fatty acids have previously been reported from this plant.<sup>8</sup> Recently, another fatty acid, octadec-7-en-5-ynoic acid (1), has been isolated from its root.<sup>9</sup> As a part of our on going research on biologically active plant constituents,<sup>10-16</sup> we here report on the antibacterial and cytotoxic activities of crude extracts and octadec-7-en-5-ynoic acid (1) (Figure 1 from *C. zeylanica*).

**FIGURA 1.** Estructura del ácido octadec-7-en-5-ynoic  
**FIGURE 1.** Structure of octadec-7-en-5-ynoic acid



## MATERIALES Y MÉTODOS

**Material de la planta.** Las raíces de *Capparis zeylanica* Linn. se recogieron en enero de 2001 en áreas cercanas al Campus Universitario de Rajshahi, Bangladesh y fueron identificadas por el profesor Naderuzzaman, del Departamento de Botánica de la Universidad de Rajshahi, Bangladesh y por el Herbario Nacional de Bangladesh (Bangladesh National Herbarium), Mirpur, Dhaka, donde se ha depositado un espécimen de muestra de esta colección con el número de acceso DACB 28092.

**Extracción, fraccionamiento y aislamiento de compuestos.** Las raíces frescas se lavaron, se trocearon, se secaron al sol y se molieron. Se obtuvieron extractos de las raíces molidas (400 gm) con etanol (3 L) a temperatura ambiente seguido de partición disolvente-disolvente con éter de petróleo (de 60 a 80 °C), cloroformo y metanol. En función de las mejores actividades biológicas, el extracto de  $\text{CHCl}_3$  (2 gm) se fraccionó mediante cromatografía de columna sobre gel de sílice (Merck) en elución con n-hexano, etilacetato y metanol con aumento de polaridad. El TLC preparativo (fase móvil- n-hexano: EtOAc=1:1) en fracciones de CC de 19-22 produjo ácido octadec-7-en-5-ynoic 1 (10 mg).<sup>9</sup>

**Ensayo antibacteriano.** El ensayo antibacteriano se realizó mediante la técnica de difusión en disco.<sup>17,18</sup> Las soluciones de muestra de los materiales (extractos y compuesto puro) que se iban a comprobar, se prepararon mediante la disolución de una cantidad definida de material en un disolvente adecuado para conseguir una concentración de 50 mg/ml de extractos y de 30 mg/ml para el compuesto 1. Se aplicaron 10  $\mu\text{l}$  de dicha solución al disco estéril (5 mm de diámetro, papel de filtro) y se dejó secar el disolvente en una cubierta aséptica. Por tanto, los discos contenían 500  $\mu\text{g}$  de extractos crudos y 300 $\mu\text{g}$  de compuesto 1. Para comparar la actividad con antibióticos estándar, se utilizó kanamicina (disco de 30  $\mu\text{g}$ ). Como control negativo, se utilizó un disco blanco impregnado con 10 $\mu\text{l}$  de disolvente seguido por secado. El ensayo se realizó por duplicado y el resultado se calculó como la media de dos experimentos.

En este análisis antibacteriano se utilizaron un total de cinco bacterias Gram positivas y seis Gram negativas (Tabla 1). Brevemente, en este

## MATERIALS AND METHODS

**Plant material.** The roots of *Capparis zeylanica* Linn. were collected in January 2001 from the adjoining areas of Rajshahi University Campus, Bangladesh and identified by Prof. Naderuzzaman, Department of Botany, Rajshahi University, Bangladesh and the Bangladesh National Herbarium, Mirpur, Dhaka where a voucher specimen of this collection has been deposited under the accession number DACB 28092.

**Extraction, fractionation and isolation of compounds.** The fresh roots were washed, chopped, sun dried and ground. The ground roots (400 gm) were extracted with ethanol (3 L) at room temperature followed by solvent-solvent partitioning with petroleum ether (60-80°C), chloroform and methanol. Based on better biological activities, the  $\text{CHCl}_3$  extract (2 gm) was fractionated by column chromatography over silica gel (Merck) eluting with n-hexane, ethylacetate and methanol with increasing polarity. Preparative TLC (mobile phase- n-hexane: EtOAc=1:1) on CC fractions 19-22 yielded octadec-7-en-5-ynoic acid 1 (10 mg).<sup>9</sup>

**Antibacterial assay.** The antibacterial assay was performed by disc diffusion technique.<sup>17,18</sup> The samples solution of the materials (extracts and pure compound) to be tested were prepared by dissolving a definite amount of material in appropriate solvent to attain a concentration of 50mg/ml for extracts and 30mg/ml for compound 1. 10  $\mu\text{l}$  of such solution was applied on sterile disc (5mm diameter, filter paper) and allowed to dry off the solvent in an aseptic hood. Thus, such discs contain 500  $\mu\text{g}$  of crude extracts and 300 $\mu\text{g}$  of compound 1. To compare the activity with standard antibiotics, kanamycin (30  $\mu\text{g}/\text{disc}$ ) was used. As negative control, a blank disc impregnated with 10 $\mu\text{l}$  solvent followed by drying off, was used. The assay was performed in duplicate and the result was calculated as an average of two experiments.

A total of five Gram positive and six Gram negative bacteria (Table 1) were used in this antibacterial screening. Briefly, in this study the test discs, standard disc and blank disc were placed in a petridish seeded with a particular bacteria and then left in a refrigerator at 4°C for 12-18 hrs in order to diffuse the material from the discs to the

estudio los discos de prueba, el disco estándar y el disco blanco se colocaron en una placa de Petri sembrada con una bacteria específica y se dejaron en un refrigerador a 4 °C de 12 a 18 horas para difundir el material de los discos a los medios circundantes de las placas de Petri. A continuación, se incubaron las placas de Petri a 37 °C durante la noche para favorecer el crecimiento bacteriano. Para determinar las actividades antibacterianas de los extractos y del compuesto se midió la zona de inhibición respectiva en mm.

surrounds media in the petridishes. The petridishes were then incubated at 37°C for overnight to allow the bacterial growth. The antibacterial activities of the extracts or compound were then determined by measuring the respective zone of inhibition in mm.

**TABLA 1.** Actividad antibacteriana del extracto de éter de petróleo (PE), extracto de cloroformo (CH), extracto de metanol (ME) y ácido octadec-7-en-5-ynoic (1) en la zona de inhibición expresado en mm  
**TABLE 1.** Antibacterial activity of petroleum ether extract (PE), chloroform extract (CH), methanol extract (ME) and octadec-7-en-5-ynoic acid (1) in term of zone of inhibition in mm

Bacteria	Diámetro de la zona de inhibición en mm <i>Diameter of zone of inhibition in mm</i>				
	PE 500µg/ disco <i>disc</i>	CH 500µg/ disco <i>disc</i>	ME 500µg/ disco <i>disc</i>	1 300µg/ disco <i>disc</i>	K* 30µg/ disco <i>disc</i>
Gram positiva / <i>Gram positive</i>					
<i>Bacillus subtilis</i>	15	16	-	14	28
<i>B. megaterium</i>	16	16	-	14	26
<i>Sarcina lutea</i>	7	9	-	9	29
<i>Staphylococcus aureus</i>	8	10	-	9	28
<i>Staphylococcus β-haemolyticus</i>	10	10	8	8	29
Gram negativa / <i>Gram negative</i>					
<i>Escherichia coli</i>	-	10	-	-	30
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8	11	-	11	29
<i>Salmonella typhi</i>	12	10	7	9	29
<i>Shigella boydii</i>	10	13	7	11	29
<i>Sh. dysenteriae</i>	12	20	-	15	28
<i>Sh. flexneri</i>	12	18	7	14	27

\*K= Kanamicina

\*K= Kanamycin

Asimismo, se determinaron por duplicado las concentraciones inhibitorias mínimas (CIH) del compuesto frente a *Bacillus subtilis* y *Shigella dysenteriae* mediante la técnica de dilución en serie.<sup>19</sup>

**Análisis citotóxico.** Las huevas de gambas en salmuera, *Artemia salina*, se adquirieron en una tienda de acuarios (Dhaka, Bangladesh) y se incubaron durante 48 horas para que madurará la gamba denominada nauplii.<sup>20</sup> La preparación de las muestras de prueba (extractos y compuesto)

The minimum inhibitory concentrations (MICs) in duplicate of the compound against *Bacillus subtilis* and *Shigella dysenteriae* were also determined by serial dilution technique.<sup>19</sup>

**Cytotoxicity screening.** The eggs of the brine shrimp, *Artemia salina*, were collected from an aquarium shop (Dhaka, Bangladesh) and hatched for 48 hr to mature shrimp called nauplii.<sup>20</sup> The test samples (extracts and compound) were prepared by dissolving them in DMSO (not more

se realizó mediante su disolución en DMSO (no más de 50 µl en una solución de 5 ml) más agua de mar (3,8% NaCl en agua) para conseguir concentraciones de - 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml y 80 µg/ml. Como control se utilizó un vial con 50 µl de DMSO que se diluyó hasta 5 ml. A continuación se aplicaron 20 gambas maduras a cada uno de los viales experimentales y al vial de control. Se contabilizó el número de nauplii que murieron después de 24 horas. Los hallazgos se presentaron gráficamente trazando un logaritmo de concentración frente al porcentaje de mortalidad de nauplii del cual se determinó el valor de  $LC_{50}$  mediante extrapolación. El ensayo se realizó por duplicado y el resultado se calculó como la media de dos determinaciones.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del análisis antibacteriano en la zona de inhibición expresados en mm se muestran en la Tabla 1. Entre los extractos crudos, el extracto de cloroformo (CH) mostró la mayor actividad en comparación con los demás. Aunque el extracto de éter de petróleo (PE) no mostró ninguna actividad frente a *E. coli*, sus actividades frente al resto de los organismos fueron ligeramente inferiores que las del extracto de cloroformo (CH). El extracto de metanol (ME) no mostró ninguna actividad frente a la mayoría de bacterias de prueba. Por tanto, el compuesto, ácido octadec-7-en-5-ynoic (1), aislado de los extractos de cloroformo, mostró una actividad significativa frente a todos los organismos de prueba excepto frente a *E. coli*. Se determinó que la concentración inhibitoria mínima (CIH) del ácido octadec-7-en-5-ynoic (1) frente a *Bacillus subtilis* y *Shigella dysenteriae* fue de 64 µg/ml en ambos casos.

Las actividades citotóxicas de los extractos (éter de petróleo, cloroformo y metanol) y del ácido octadec-7-en-5-ynoic (1) se estudiaron mediante un bioensayo de gambas en salmuera (Figura 2). Entre los extractos, el extracto de cloroformo ( $LC_{50}$  =10,11 µg/ml) mostró mayores efectos citotóxicos que los extractos de éter de petróleo ( $LC_{50}$  =15,85 µg/ml) y los extractos de metanol ( $LC_{50}$  =19,95 µg/ml). El valor de  $LC_{50}$  del compuesto, ácido octadec-7-en-5-ynoic (1), fue de 6,27 µg/ml.

than 50 µl in 5 ml solution) plus sea water (3.8% NaCl in water) to attain concentrations - 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml and 80 µg/ml. A vial containing 50 µl DMSO diluted to 5ml was used as a control. Then 20 matured shrimps were applied to each of all experimental vials and control vial. The number of the nauplii that died after 24 hr was counted. The findings were presented graphically by plotting log of concentration versus percentage of mortality of nauplii from which  $LC_{50}$  was determined by extrapolation. The assay was performed in duplicate and the result was calculated as an average of two determinations.

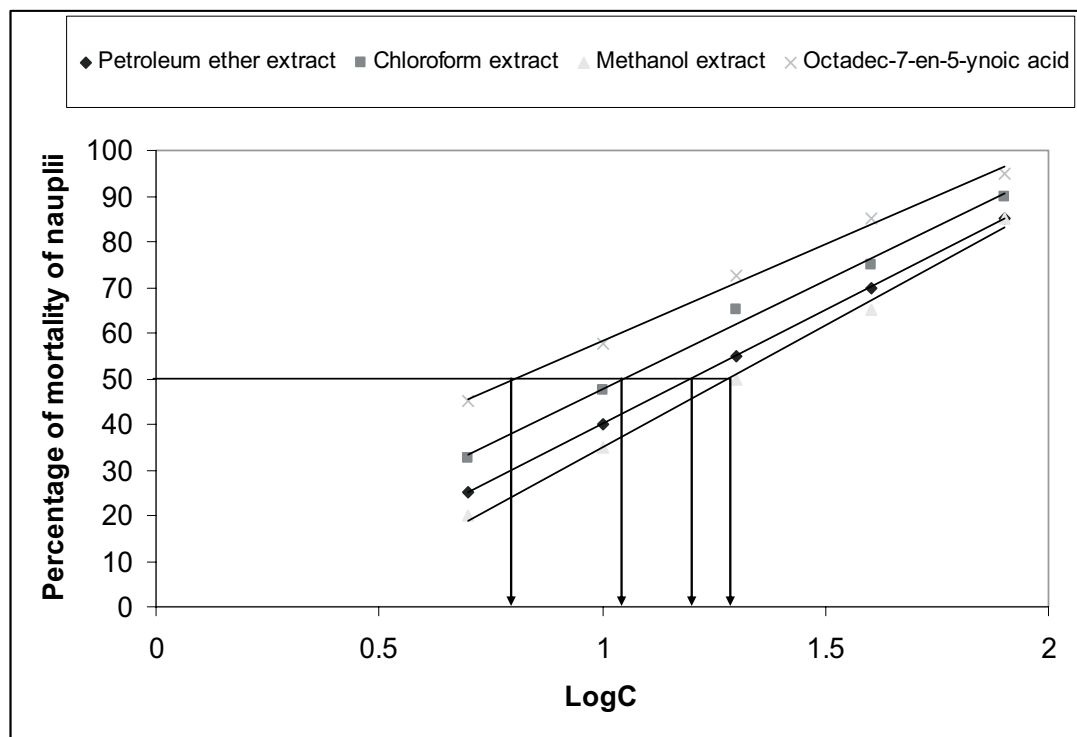
## RESULTS AND DISCUSSION

The results of antibacterial screening in terms of zone of inhibition in mm are presented in Table 1. Among the crude extracts, the chloroform extract (CH) showed highest activity in comparison to others. Although the petroleum ether extract (PE) did not show any activity against *E. coli*, its activities against rest of the organisms were slightly lower than that of the chloroform extract (CH). Methanol extract (ME) did not show any activity against most the test bacteria. So, the compound, octadec-7-en-5-ynoic acid (1), isolated from the chloroform extracts, showed significant activity against all test organisms except *E. coli*. The minimum inhibitory concentration (MIC) of octadec-7-en-5-ynoic acid (1) were determined against *Bacillus subtilis* and *Shigella dysenteriae* and found to be 64 µg/ml in both cases.

The cytotoxic activities of the extracts (petroleum ether, chloroform and methanol) and octadec-7-en-5-ynoic acid (1) were studied by brine shrimp bioassay (Figure 2). Among the extracts, the chloroform extract ( $LC_{50}$  =10.11 µg/ml) showed more cytotoxic effects than those of petroleum ether ( $LC_{50}$  =15.85 µg/ml) and methanol extracts ( $LC_{50}$  =19.95 µg/ml). The  $LC_{50}$  value of the compound, octadec-7-en-5-ynoic acid (1), was found to be 6.27 µg/ml.

**FIGURA 2.** LogC frente al porcentaje de mortalidad de nauplii de éter de petróleo, cloroformo, extracto de metanol y ácido octadec-7-en-5-ynoico (1)

**FIGURE 2.** LogC versus average percentage of mortality of nauplii of petroleum ether, chloroform, extract and octadec-7-en-5-ynoic acid (1)



### CONCLUSIÓN

En conclusión, la actividad antibacteriana de *Capparis zeylanica* parece justificar algunos de sus usos medicinales tradicionales frente a enfermedades infecciosas como el cólera. La fuerte citotoxicidad del ácido graso, ácido octadec-7-en-5-ynoico (1), está fomentando el trabajo con otros miembros de la familia *Capparis* para la obtención de compuestos bioactivos.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al profesor Naderuz-zaman, Departamento de botánica, Universidad de Rajshahi, Bangladesh y al Herbario Nacional de Bangladesh (Bangladesh National Herbarium), Mirpur, Dhaka, por la identificación de la planta.

### CONCLUSION

In conclusion, antibacterial activity of *Capparis zeylanica* seems to justify some of its folk medicinal uses against infectious diseases like cholera. The strong cytotoxicity of the fatty acid, octadec-7-en-5-ynoic acid (1), is encouraging to work on other members of *Capparis* for bioactive compounds.

### ACKNOWLEDGEMENT

The authors are grateful to Prof. Naderuz-zaman, Department of Botany, Rajshahi University, Bangladesh and the Bangladesh National Herbarium, Mirpur, Dhaka for the identification of the plant.

## BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAPHY

1. Hooker JD. The flora of British India. 1879. L. Reeve & Co., London.
2. Kirtikar KR and Basu, BD. Indian medicinal plants. 1993. Bishen Singh Mahendra Pal Singh, India.
3. Yusuf M, Chowdhury JU, Wahab MA and Begum J. Medicinal plants of Bangladesh. 1994. BCSIR Laboratories, Chittagong, Bangladesh.
4. Duke JA. Dr. Duke's phytochemical and ethnobotanical databases, phytochemical database. 2004. USDA-ARS-NGRL, Beltsville Agricultural Research Centre, Maryland, USA. available online at <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/duke/ethnobot.pl>
5. Lewis WH and Elvin-Lewis MPF. Medical Botany. Plants affecting man's health. 1977. John Wiley., New York.
6. Biswas K and Ghosh E. Bharoty Banoushodhi. 1973. Calcutta University Press, Calcutta.
7. Ghule BV, Murugananthan G, Nakhath PD and Yeole PG. Immunostimulant effects of *Capparis zeylanica* Linn. leaves J. Ethnopharmacol. 2006. 108: 311-315.
8. Mahmood C, Daulatabad JD, Desai VA and Hosaman KM. New source of oil with novel fatty acids for industrial utilization. Ind. Eng. Chem. Res. 1991. 30: 2596-2598.
9. Haque ME, Haque M, Rahman MM, Rahman MM, Khondkar P, Wahed MII, Mossadik MA, Gray AI and Sarker SD. E-Octadec-8-en-5-ynoic acid from the roots of *Capparis zeylanica*. Fitoterapia. 2004. 75: 130-133.
10. Anjum A, Haque ME, Rahman MM and Sarker SD. Antibacterial activities of the compounds from the flower of *Alangium salviifolium*, Fitoterapia. 2002. 73: 526-528.
11. Rahman MM, Qais N and Rashid MA. A new C-benzoylated chalcone from *Desmos chinensis*. Fitoterapia. 2003. 74: 513-516.
12. Khatune NA, Islam ME, Haque ME, Khondkar P and Rahman MM. 2004. Antibacterial compounds from the seeds of *Psoralea corylifolia* Linn., Fitoterapia 75: 228-230.
13. Rahman MM, Sarker SD, Byres M and Gray AI. New salicylic acid and isoflavone derivatives from *Flemingia paniculata*. J. Nat. Prod. 2004. 67: 402-406.
14. Rahman MM, Polfreman D, MacGeachan J and Gray AI. Antimicrobial Activities of *Barringtonia acutangula*, Phytotherapy Research. 2005. 19: 543-545.
15. Rahman MM, Parvin S, Haque ME, Islam ME and Mosaddik MA. Antimicrobial and cytotoxic constituents from the seeds of *Annona squamosa* Linn. Fitoterapia. 2005. 76: 484-489.
16. Rahman MM and Gray AI. A benzoisofuranone derivative and carbazole Alkaloids from *Murraya koenigii* and their antimicrobial activity. Phytochemistry. 2005. 66: 1601-1606.
17. Barry AL. Principle and Practice of Microbiology. 1976. Lea and Fabager, Philadelphia.
18. Bauer AW, Kibry WMM, Sheris JC, Truck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. 1966. Am. J. Clin. Pathol. 45: 493-496.
19. Reiner R. Antibiotics- An Introduction. 1982. F. Hoffman La Roche & Co., Basle, Switzerland.
20. Meyer BN, Ferringni NR, Puam JE, Lacobsen LB, Nichols, DE, McLaughlin JL. Brine shrimp: A convenient general bioassay for the active constituents. Planta Medica. 1988. 45: 31-32.