

**Revista Cubana de Farmacia 2012 vol. 46 (supl. 1)**

**Congreso Cubafarmacia 2012**

**EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE  
*PIPER AURITUM*.**

Lianet Monzote Fidalgo<sup>a</sup>, Marley García Parra<sup>a</sup>, Ramón Scull Lizama<sup>b</sup>, Louis Maes<sup>c</sup>, Paul Cos Wellens<sup>c</sup>.

<sup>a</sup> Departamento de Parasitología, Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”, Habana, Cuba

<sup>b</sup> Departamento de Química, Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, Cuba

<sup>c</sup> Laboratory for Microbiology, Parasitology and Hygiene (LMPH), Faculty of Pharmaceutical, Biomedical and Veterinary Sciences, Antwerp University, Belgium

**RESUMEN**

Las enfermedades infecciosas representan una amenaza para la salud pública a nivel mundial a pesar de los enormes avances en la medicina humana. El control de los agentes causales es un gran desafío, ya que las vacunas sólo están disponibles contra un número limitado de patógenos. La mayor parte de los anti-infecciosos presentan de limitaciones considerables en términos de espectro anti-microbiano y efectos secundarios. Adicionalmente, su abuso generalizado ha dado lugar a resistencia a los medicamentos. Por estos motivos, la investigación sobre nuevos medicamentos anti-infecciosos constituye una necesidad urgente. Actualmente, el 60 % de la población de área endémica depende de la medicina tradicional y natural para el tratamiento. *Piper auritum* es una planta de las regiones tropicales ampliamente conocida por sus efectos farmacológicos. En este trabajo, nosotros evaluamos la actividad del aceite esencial extraído de esta planta frente a un amplio panel de microorganismos, incluyendo: bacterias (*Escherichia coli* y *Staphylococcus*

*aureus*), hongos (*Trichophyton rubrum* y *Candida albicans*) y protozoos (*Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi* y *T. brucei*). El producto mostró una actividad específica frente a *P. falciparum* (CI<sub>50</sub> = 0.5 µg/mL) y *T. brucei* (CI<sub>50</sub> = 5.3 µg/mL) y no se observó toxicidad (CI<sub>50</sub> > 64 µg/mL) frente a la línea celular MCR-5. Nuestro estudio demuestra las potencialidades del aceite esencial extraído de *P. auritum* para el desarrollo de un nuevo agente antiparasitario frente a la malaria y la enfermedad del sueño, causadas por *P. falciparum* y *T. brucei*, respectivamente.

## INTRODUCCIÓN

Dentro de la familia Piperaceae las especies del género *Piper* han sido consideradas de relevante importancia desde el punto de vista económico. Este género comprende alrededor de 1 000 - 2 000 especies y el mayor número se encuentra en las Américas (cerca de 700 especies), seguido por el Sur de Asia (alrededor de 300 especies). En regiones del Pacífico Sur y África existen pequeños grupos de estas especies (1).

Entre estas especies, *Piper auritum* Kunt ITS se reconoce fácilmente por su gran tamaño (20-50 cm) y un olor característico a anís en sus hojas. Las plantas crecen con un solo tronco principal con hojas grandes en dos filas alternas y en posición horizontal sobre las ramas superiores, formando una ligera corona (1). Existe información de *P. auritum* con una serie de propósitos diferentes entre los que se incluyen la culinaria y sus propiedades medicinales. Entre las aplicaciones medicinales se ha reportado el uso como diurético, sudorífico y estimulante en casos de fiebre, para la angina de pecho, anestésico local, para los cólicos, dolor de cabeza y para la digestión (2). Otros efectos han sido reportados como anti-inflamatorio, antibacteriano y antifúngico (3, 4). En la literatura se han descrito diferentes especies de *Piper* que han mostrado actividad antiparasitaria. Ejemplo de ello podemos citar: a *P. aduncum* frente a *Leishmania* (5) y *P. hostmannianum* frente a *Plasmodium falciparum* (6).

Por otra parte, en años recientes se ha incrementado el uso de aceites esenciales en la búsqueda de nuevos tratamientos antiparasitarios (7). En este estudio, se evaluó la actividad del aceite esencial extraído de *P. auritum* frente a un amplio panel de microorganismos, incluyendo: bacterias (*Escherichia coli*

y *Staphylococcus aureus*), hongos (*Trichophyton rubrum* y *Candida albicans*) y protozoos (*Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi* y *T. brucei*).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Aceite Esencial de *P. auritum*: La planta fue colectada en el Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de La Habana, Cuba, en julio de 2001. Un ejemplar fue depositado en la Estación Experimental de Plantas Medicinales "Dr. Juan Tomás Roig ", Cuba, y se le asignó el número de espécimen 4622. El aceite esencial se obtuvo por destilación, en condiciones de laboratorio, de la parte aérea de la planta, utilizando el aparato de Clevenger, de acuerdo con el Reglamento NR309 (8).

Fármacos de referencia: La eritromicina y el cloranfenicol fueron comprados de la Sigma-Aldrich (Bornem, Bélgica); mientras que el miconazol y la flucitosina fueron gentilmente donadas por Janssen Pharmaceuticals (Beerse, Bélgica). El tamoxifen, el benzonidazol, la suramina, la miltefosina y la cloroquina fueron gentilmente donadas por el Programa de Enfermedades Infecciosas de la Organización Mundial de la Salud.

Microorganismos y Cultivos de células: Para este estudio se utilizaron los siguientes microorganismos: *Escherichia coli* ATCC8739, *Staphylococcus aureus* ATCC6538, *Trichophyton rubrum* B68183, *Candida albicans* B59630, *Plasmodium falciparum* Ghana, *Trypanosoma brucei brucei* Squib-427 y *T. cruzi* Tulahuen CL2. Para el análisis de la toxicidad se utilizó la línea de fibroblastos humanos MRC-5 SV<sub>2</sub> (Colección Europea de Cultivos de Células, Reino Unido).

Experimentos integrados de evaluación: El panel para la evaluación antimicrobiana de forma integrada del aceite esencial fue adoptado de las metodologías estandarizadas descritas por Cos y colaboradores (9). Los experimentos fueron llevados a cabo en placas de 96 pozos (Greiner, Germany) utilizando concentraciones seriadas 1:4 en un rango entre 0.25 y 64 µg/mL. Las diluciones fueron llevadas a cabo por una estación robótica y programada de precisión (BIOMEK 2000, Beckman, USA). En cada placa se incluyó un control del medio de cultivo (0% de crecimiento), controles no tratados (100% de crecimiento) y cultivo tratado con una droga de referencia.

La Concentración Inhibitoria Media (CI<sub>50</sub>) fue determinada a través de la ecuación de regresión lineal a partir de las curvas de respuesta-concentración. Los resultados fueron expresados como el promedio de dos réplicas ± su desviación estándar.

## RESULTADOS

La citotoxicidad y actividad del aceite esencial de *P. auritum* frente a bacterias, hongos y protozoos se muestra en la tabla 1. El aceite esencial mostró una actividad específica frente a *P. falciparum* y *T. brucei* y no se observó toxicidad frente a la línea celular MCR-5.

**Tabla 1.** Toxicidad y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Piper auritum*.

Células/Microorganismos	CI <sub>50</sub> (µg/mL)	
	Aceite de <i>P. auritum</i>	Fármaco de referencia
MRC-5	>64.0	11.3 ± 1.4 <sup>a</sup>
<i>T. cruzi</i>	>64.0	2.2 ± 0.5 <sup>b</sup>
<i>T. brucei</i>	5.3 ± 3.3	0.05 ± 0.05 <sup>c</sup>
<i>P. falciparum</i>	0.5 ± 0.2	0.3 ± 0.1 <sup>e</sup>
<i>S. aureus</i>	>64.0	6.6 ± 4.3 <sup>f</sup>
<i>E. coli</i>	>64.0	6.9 ± 3.4 <sup>g</sup>
<i>T. rubrum</i>	>64.0	0.3 ± 0.2 <sup>h</sup>
<i>C. albicans</i>	>64.0	0.7 ± 0.1 <sup>i</sup>

a: tamoxifeno, b: benzonidazol; c: suramina; d: miltefosina; e: cloroquina; f: eritromicina; g: cloranfenicol; h: miconazol; i: flucitosina.

## DISCUSIÓN

Las enfermedades infecciosas representan una amenaza para la salud pública a nivel mundial a pesar de los enormes avances en la medicina humana. El control de los agentes causales es un gran desafío, ya que las vacunas sólo están disponibles contra un número limitado de patógenos. La mayor parte de los anti-infecciosos sufren de limitaciones considerables en términos de

espectro antimicrobiano y efectos secundarios. Adicionalmente, su abuso generalizado ha dado lugar a resistencia a los medicamentos. Por estos motivos, la investigación sobre nuevos medicamentos anti-infecciosos constituye una necesidad urgente (10).

El uso de *P. auritum* como agente anti-infeccioso ha sido poco estudiado, pero nuestros resultados demuestran sus potencialidades frente a *T. brucei* y *P. falciparum*. En este último caso, el valor de  $CI_{50}$  fue similar a la demostrada por la cloroquina, fármaco de primera línea utilizada en pacientes que padecen la enfermedad provocada por este parásito. Por otra parte, el aceite esencial no demostró citotoxicidad a la máxima concentración evaluada, lo cual habla a favor de este producto debido a que la toxicidad de los fármacos convencionales disponibles en el mercado es una de las principales desventajas de los mismos. *P. falciparum* es el agente causal de la malaria, clasificada como una de las enfermedades tropicales más importantes en el mundo (11). Actualmente, entre 300 a 500 millones de individuos se encuentran infectados con *Plasmodium* spp, y entre 1.5 a 2.7 millones de personas mueren anualmente por esta infección, siendo niños en su mayoría. Malaria es endémica de 90 países, donde el 90 % de los casos se encuentran en África. A pesar de numerosos esfuerzos, no se ha podido lograr la inmunoprotección a través de la vacunación, las medidas de control del vector son difíciles, siendo el tratamiento una de las opciones para combatir esta infección. Sin embargo, los fármacos que están disponibles en el mercado no son universalmente efectivos (12). En los últimos años se ha incrementado el interés en el estudio de las plantas medicinales como una valiosa fuente en la búsqueda de agentes contra *Plasmodium*, teniendo en cuenta el éxito de la artemisina, una lactona sesquiterpénica aislada de *Artemisia annua* con potente actividad antimalarial (13, 14).

Este estudio constituye el primer reporte que demuestra la actividad del aceite esencial de *P. auritum* frente a *P. falciparum*. En este sentido, compuestos aislados de otras especies de este género han demostrado actividad antiplasmodial, como son dihidrochalconas y flavonoides de *P. hostmannianum* (6), derivados del ácido benzoico prenilado aislados de *P. heterophyllum* y *P. aduncum* (15) y el extracto metanólico de *P. betle* (16).

En paralelo, el aceite esencial mostró una actividad específica frente a *T. brucei*, agente utilizado como modelo de la Trypanosomiasis Africana o Enfermedad del Sueño. Esta parasitosis es una enfermedad transmitida por vectores en el sub-Sahara Africano, con una compleja epidemiología, diversa presentación clínica y alta tasa de mortalidad. Hasta la actualidad, no existen vacunas comerciales disponibles y la toxicidad de los fármacos disponibles limita su utilidad (17). En nuestro estudio, la actividad mostrada por el aceite esencial de *P. auritum* no se compara con la obtenida por el fármaco de referencia la suramina ( $CI_{50}=0.05 \pm 0.05 \mu\text{g/mL}$ ), aunque pudiera explorarse como una alternativa en aquellos pacientes que no pueden acceder a los tratamientos convencionales o hayan mostrado resistencia a los mismos.

Resulta interesante destacar que estudios previos en nuestro laboratorio demostraron la actividad antileishmanial de *P. auritum* (18). El componente principal del aceite esencial estudiado fue el safrol con un 87 % (18). Este compuesto es un monoterpeno oxigenado, del cual se han descrito sus propiedades anti-cancerígenas (19).

En conclusión, este estudio demuestra las potencialidades del aceite esencial de *P. auritum* como agente anti-parasitario, particularmente frente a *P. falciparum*. Futuros estudios en modelos *in vivo* podrían contribuir a esclarecer la efectividad de este producto para el desarrollo de una nueva alternativa terapéutica como antiprotozoario.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Berger WC 1983. *Piper auritum*. In: DH Janzen, *Natural history of Costa Rica*, University of Chicago Press, Chicago, p. 304-305.
2. Joly LG. Feeding and trapping fish with *Piper auritum*. *Economic Bot* 1981;35:383-90.
3. Gupta MP, Arjas TD, Williams NH, Bos R, Tattje DHE. Safrole, the main component of the essential oil from *Piper auritum* Panamá. *J Nat Prod* 1985;48:330-6.

4. Hernández L, Rodríguez M, García D, Pino J. Actividad antidermatofítica *in vitro* de aceites esenciales. Rev Cub Plan Med 2003;8
5. Caio TSE, Lima MD, Kaplan MAC, Nazareth MM, Rossi-Bergmann B. Selective effect of 2',6'-dihydroxy-4'methoxychalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. Antimicrob Agents Chemother 1999;43:1234-41.
6. Portet B, Fabre N, Roumy V, Gornitzka H, Bourdy G, Chevalley S, Sauvain M, Valentin A, Moulis C. Activity-guided isolation of antiplasmodial dihydrochalcones and flavanones from *Piper hostmannianum* var. *berbicense*. Phytochem 2007;68:1312-20.
7. Antony JP, Fyfe L, Smith H. Plant active components – a resource for antiparasitic agents? Trends Parasitol 2005;21:462-8.
8. Norma Ramal. NRSP 309 “Medicamentos de origen vegetal. Droga cruda. Métodos de ensayos”. Cuba, 1992.
9. Cos P, Vlietinck AJ, Vanden Berghe D and Maes L. Anti-infective potential natural products: How to develop a stronger *in vitro* “proof-of-concept”. J Ethnopharmacol 2006;106:290-302.
10. Fauci AS. Infectious diseases: considerations for the 21st century. Clin Infect Dis 2001;32:675-85.
11. Breman JC. The ears of the hippopotamus manifestations, determinants, and estimates of the malaria burden. Am J Trop Med Hyg 2001;64:1-11.
12. Garcia LS. Malaria. Clin Lab Med 2010;30:93-129.
13. Christen P, Veuthey JL. New trends in extraction, identification and quantification of artemisinin and its derivatives. Curr Med Chem 2001;8:1827-39.

14. Rosenthal PJ. Antimalarial drug discovery: old and new approaches. *J Exp Biol* 2003;206:3735-44.
15. Flores N, Jiménez IA, Giménez A, Ruiz G, Gutiérrez D, Bourdy G, Bazzocchi IL. Antiparasitic activity of prenylated benzoic acid derivatives from *Piper* species. *Phytochem* 2009;70:621-7.
16. Al-Adhroey AH, Nor ZM, Al-Mekhlafi HM, Amran AA, Mahmud R. Antimalarial activity of methanolic leaf extract of *Piper betle* L. *Molecules* 2010;16:107-18.
17. Malvy D, Chappuis F. Sleeping sickness. *Clin Microbiol Infect* 2011;17:986-95.
18. Monzote L, García M, Montalvo AM, Scull R, Miranda M. Chemistry, cytotoxicity and antileishmanial activity of the essential oil from *Piper auritum*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010;105:168-73.
19. Du A, Zhang S, Miao J, Zhao B. Safrole oxide induces apoptosis in A549 human lung cancer cells. *Exp Lung Res* 2004;30:419-29.