

ACTIVIDAD *IN VITRO* ANTI-CANDIDA Y ANTI-ASPERGILLUS DE ACEITES ESENCIALES DE PLANTAS DE LA FAMILIA PIPERACEAE

RESUMEN

Plantas de la familia Piperaceae se han utilizado con fines curativos en diferentes regiones del mundo. El objetivo del presente fue evaluar la actividad antifúngica *in vitro* de 10 aceites esenciales provenientes de especies del género *Piper*, mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), con las cepas *Aspergillus flavus* ATCC 204304 y *A. fumigatus* ATCC 20430, siguiendo el protocolo CLSI M38-A. Además, se evaluaron las cepas *Candida krusei* ATCC 6258 y *Candida parapsilosis* ATCC 22019 según el protocolo M27-A2 modificado. El aceite esencial con mayor actividad fue el de *P. sanctifelisis* para *C. krusei* (CMI: 125 µg/mL).

PALABRAS CLAVES: actividad antifúngica, Piperaceae, aceites esenciales

ABSTRACT

Plants of the Piperaceae family have been used with medicinal purposes in different regions around the world. In vitro antifungal activity of 10 essential oils from species of Piper genus were measured by determination of minimum inhibitory concentration (MIC) against A. flavus fungi ATCC 204304 and A. fumigatus ATCC 204305 following the standard protocol CLSI M38-A. In addition, Candida krusei ATCC 6258 and C. parapsilosis ATCC 22019 were evaluated with modified protocol M27-A2. The essential oil with the most antifungal activity was Piper sanctifelisis for C. krusei (CMI: 125 µg/mL).

KEYWORDS: Antifungal activity, Piperaceae, essential oils.

ANA CECILIA MESA
Bacterióloga y laboratorista clínico,
MSc Profesor Asistente
Grupo Infección y Cáncer
Universidad de Antioquia
amesa@medicina.udea.edu.co

JEHIDYS MONTIEL
Microbióloga y bioanalista
Auxiliar de Investigación
Grupo Infección y Cáncer
Universidad de Antioquia
jeyito126@hotmail.com

CATALINA MARTÍNEZ
Microbióloga y bioanalista
Auxiliar de Investigación
Grupo Infección y Cáncer
Universidad de Antioquia
catamartinezjyyahoo.com

BIBIANA ZAPATA
Microbióloga y bioanalista, Asp
MSc Estudiante de Maestría en
Ciencias Básicas Biomédicas
Grupo Infección y Cáncer
Universidad de Antioquia
bibianazapata@gmail.com

NAYIVE PINO
Bióloga Química, MsC
Profesora
Grupo de Productos Naturales
Universidad Tecnológica del
Chocó
nayivepino@yahoo.com

JUAN GABRIEL BUENO
Médico y Cirujano, Asp MSc
Estudiante de Maestría en Ciencias
Básicas Biomédicas
Grupo Infección y Cáncer
Universidad de Antioquia
juangbueno@medicina.udea.edu.co

ELENA STASHENKO
Química, PhD
Profesora Titular
Grupo CIBIMOL
Universidad Industrial de
Santander
elena@tucan.uis.edu.co

1. INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas, las infecciones ocasionadas por hongos han incrementado notablemente dado el aumento de la población inmunocomprometida y al avance en los trasplantes de órganos [1].

A nivel mundial, se explora el uso y valoración de los productos naturales como fuente de nuevos y variados agentes antimicóticos [2]. Las plantas, en particular, representan un alto potencial terapéutico si se considera que desde la antigüedad son utilizadas para el tratamiento de diversas enfermedades infecciosas [3].

Plantas del género *Piper*, son ampliamente utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de vaginitis, desordenes intestinales, y como antimicrobiano y citotóxico [4]. La evaluación *in vitro* de extractos de estas plantas, muestran propiedades antifúngica y antibacteriana. Los aceites esenciales (AE) de *Piper* spp. inhiben el crecimiento de un amplio grupo de microorganismos que causan infecciones importantes en humanos como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa*, *E.coli*, y los hongos *Trichophyton mentagrophytes*, *C. albicans*, *A. flavus* y *A. fumigatus* [5].

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material vegetal

Se utilizaron 10 plantas de la familia Piperaceae recolectadas en diferentes regiones de Colombia.

2.2. Obtención de AE

Los AE se obtuvieron de 350g de material fresco correspondientes a hojas y tallos, por el método de hidrodestilación por la técnica de arrastre de vapor, descrito por Stashenko y col (2004). [6].

2.3. Actividad antifúngica

2.3.1. Cepas

Se utilizaron las cepas *C. parapsilosis* ATCC (American Type Culture Collection) 22019, *C. krusei* ATCC 6258, *A. flavus* ATCC 204304 y *A. fumigatus* ATCC 204305.

2.3.2 Preparación de las placas con los AE

De cada uno de los AE se realizaron cinco diluciones dobles seriadas en DMSO a partir de una solución stock de 20mg/mL. Posteriormente, se realizó una dilución

1:20 en agua destilada con tween 80 al 0.001% , para obtener cinco concentraciones finales (500-31.25µg/mL). De estas soluciones se agregaron 100uL en placas de 96 pozos. Estas se conservaron a -70°C hasta su uso. Los ensayos se realizaron por duplicado en tres momentos diferentes.

2.3.3. Determinación de las CMI

La concentración mínima inhibitoria (CMI), definida como la mínima concentración de un AE aceite que inhibe el crecimiento de un hongo, se determinó por la técnica de microdilución en caldo EUCAST para levaduras fermentadoras de glucosa [7]. Para las especies de *Aspergillus*, se siguió el protocolo CLSI M38-A [8].

2.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se determinaron las medias geométricas (MG) y las desviaciones estándar (DS) de las CMI de los seis resultados obtenidos para cada AE con cada cepa.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La familia Piperaceae comprende 10 géneros. En el género *Piper* se estima que existen aproximadamente 700 especies algunas utilizadas para la atención primaria en salud [9]. Estudios previos reportaron su utilidad como antiviral, antibacteriano y particularmente como antimicótico. Estas propiedades biológicas son atribuidas a la presencia de lignanos y flavonoides en los extracto. Además, la actividad de estos, puede variar de acuerdo al solvente utilizado y a la parte de la planta empleada para la extracción [10].

En este estudio se encontró actividad importante en el aceite extraído de dos plantas: *P. sanctifelis* y *Piper* spp, contra *C. krusei* (CMI de 125 ug/mL) (Tabla 1). Otras especies también presentaron actividad contra esta levadura a concentraciones mayores (Tabla 1). *C. krusei* presenta resistencia intrínseca a fluconazol, medicamento de elección para el tratamiento de infecciones por levaduras del género [11]. por lo que identificar moléculas con actividad en este microorganismo es de vital importancia.

El AE de la planta *P.bogotense* fue el único que mostró actividad contra *A. fumigatus*. Este hongo es el más implicado en aspergilosis invasiva la cual causa alta mortalidad en individuos inmunocomprometidos [12]

AE	Cepa			
	<i>C. parapsilos is</i>	<i>C. krusei</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. fumigatus</i>
<i>Piper sanctifelisis</i>	>500	125	>500	>500
<i>Piper auritum Kunth</i>	>500	>500	>500	>500
<i>Piper auduncum</i>	>500	250	>500	>500
<i>Piper spp.</i>	>500	250	>500	>500
<i>Piper bogotense</i>	>500	>500	>500	250
<i>Piper michita</i>	>500	>500	>500	>500
<i>Piper friedestalina</i>	>500	>500	>500	>500
<i>Piper spp.</i>	>500	125	>500	>500
<i>Piper brachypodom</i>	>500	>500	>500	>500
<i>Piper brachypodom</i>	>500	>500	>500	>500

Tabla 1. MG de las CMI's (ug/mL) de 10 aceites esenciales procedentes de plantas del género *Piper* con cuatro cepas de hongos

4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio, presentan una posibilidad para la búsqueda de moléculas con actividad antimicótica en AE derivados de plantas del género *Piper*. Estudios posteriores se enfocaran en la identificación de los compuestos responsables de la actividad antimicótica de los aceites. Además se evaluará la actividad citotóxica.

5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Quindos, G., 2002. [Mycoses at dawn of XXI Century]. *Rev Iberoam Micol* 19: 1-4.
- [2] Cowan, M.M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 12: 564-582.
- [3] Mesa-Arango, A.C., Bueno Sanchez, J.G. and Betancur Galvis, L.A., 2004. [Natural products with antimycotic activity]. *Rev Esp Quimioter* 17: 325-331.
- [4] Reddy SV, Srinivas PV, Praveen B, et al. 2004. Antibacterial constituents from the berries of *Piper nigrum*. *Phytomedicine* 11:697-700.
- [5] Lopez A, Hudson JB, Towers GH. 2001. Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 77:189-196

[6] Stashenko, E.E., Jaramillo, B.E. and Martinez, J.R., 2004. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. *J Chromatogr A* 1025: 93-103.

[7] Cuenca-Estrella, M., Moore, C.B., Barchiesi, F., Bille, J., Chryssanthou, E., Denning, D.W., Donnelly, J.P., Dromer, F., Dupont, B., Rex, J.H., Richardson, M.D., Sancak, B., Verweij, P.E. and Rodriguez-Tudela, J.L., 2003. Multicenter evaluation of the reproducibility of the proposed antifungal susceptibility testing method for fermentative yeasts of the Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (AFST-EUCAST). *Clin Microbiol Infect* 9: 467-474.

[8] CLSI (2002). M38-A-Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard. Wayne, Pennsylvania, USA, CLSI.

[9] Dorman HJ, Deans SG, 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol* 88:308-316.

[10] Pessini GL, Dias Filho BP, Nakamura CV, Cortez DA, 2003. Antibacterial activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98:1115-1120.

[11] Rodríguez-Tudela, J. L., Cuenca Estrella, M., 2002. "Has a decade of standardizing antifungal sensitivity tests accomplished anything?." *Enferm Infecc Microbiol Clin* 20, 191-193.

(12) Latgé, J.P., 1999. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 12, 310-350