

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

## Propiedades antiprotozoarias de aceites esenciales extraídos de plantas cubanas

Lic. Lianet Monzote Fidalgo,<sup>1</sup> Lic. Idalia Sarriego Ramos,<sup>2</sup> Lic. Ana M. Montalvo Álvarez,<sup>3</sup> Téc. Nidia Garrido Lorente,<sup>4</sup> Lic. Ramón Scull Lizama<sup>5</sup> y Lic. Juan Abreu Payrol<sup>6</sup>

### RESUMEN

Se evaluó la actividad antiprotozoaria del aceite esencial extraído de *Artemisia abrotanum*, *Chenopodium ambrosioides*, *Pinus caribaea*, *Piper aduncum* y *Piper auritum*. Los aceites evaluados no mostraron actividad contra *L. amazonensis*; sin embargo, frente a *Trichomonas vaginalis* el aceite extraído de *C. ambrosioides* mostró una actividad promisoriosa con una concentración mínima inhibitoria de 25 mg/mL.

**Palabras clave:** Aceite esencial, *Leishmania*, *Trichomonas*.

*Leishmania sp.* y *Trichomonas vaginalis* son protozoos parásitos que causan infección en los humanos. Numerosas especies del género *Leishmania* producen un amplio espectro de manifestaciones clínicas que van desde lesiones cutáneas que curan espontáneamente hasta la diseminación visceral que puede provocar la muerte del paciente.<sup>1</sup> El control de esta parasitosis es muy difícil debido a que el vector y los reservorios habitan en grandes zonas boscosas. Contra la leishmaniosis no se ha desarrollado una vacuna eficaz y los fármacos disponibles (compuestos de antimonio pentavalente, anfotericina B, pentaidina, aminosidina y miltefosina) provocan serios efectos secundarios, son costosos o no son eficaces contra todas las formas de la enfermedad.<sup>2</sup>

La trichomonosis, por otra parte, tiene importantes implicaciones médicas, por su relación con la enfermedad pélvica inflamatoria, con el

cáncer cervical y con la predisposición a la ruptura temprana de la placenta, al parto prematuro y al nacimiento de niños con bajo peso al nacer.<sup>3</sup> El metronidazol constituye el fármaco de elección para el tratamiento de la trichomonosis, desde 1959;<sup>4</sup> sin embargo, su toxicidad no permite utilizarlo durante el primer trimestre del embarazo<sup>5</sup> y se ha reportado tanto su carácter mutagénico como su potencial carcinogénico.<sup>6</sup> También han sido descritos numerosos casos de resistencia clínica.<sup>7</sup> Por estos motivos, es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas contra esas parasitosis, como son los productos naturales, que desde el siglo pasado han desempeñado un papel importante en la quimioterapia de las enfermedades parasitarias; destacándose la quinina y la emetina para el tratamiento de la malaria y la amebiosis, respectivamente.<sup>8</sup> En este trabajo se investigaron las potencialidades frente a *Leishmania* y

<sup>1</sup> Máster en Farmacología. Licenciada en Ciencias Farmacéuticas. Aspirante a Investigador.

<sup>2</sup> Licenciada en Bioquímica. Investigadora Agregada.

<sup>3</sup> Licenciada en Biología. Investigadora Auxiliar.

<sup>4</sup> Técnico en Microbiología.

<sup>5</sup> Máster en Ecología. Licenciado en Agronomía. Investigador Agregado.

<sup>6</sup> Máster en Química. Licenciado en Química. Profesor Auxiliar.

*Trichomonas* de aceites esenciales extraídos de 5 especies de plantas cubanas, todas con antecedentes etnofarmacológicos como antiparasitarias.

Se utilizaron plantas de *Chenopodium ambrosioides* L (No. herbario 4639), *Piper auritum* L (No. herbario 4622), *Piper aduncum* L (No. herbario 4649) y *Artemisia abrotanum* L (No. herbario 4640), conocidas comúnmente como: “apasote”, “caisimón”, “platanillo de Cuba” e “incienso”, respectivamente. Un ejemplar de cada especie se encuentra depositado en la Estación Experimental de Plantas Medicinales “Dr. Juan Tomás Roig”. El material vegetal fue recogido en áreas del Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de La Habana, en junio de 2000. Se emplearon también plantas de *Pinus caribaea*, conocida como “pino macho”, colectadas en la Estación Experimental Forestal de Viñales, Pinar del Río, en esta misma época.

Se extrajo el aceite esencial de las partes aéreas de las plantas frescas, por destilación con arrastre de vapor, en un equipo *Clevenger* según la norma NRSP-309.<sup>9</sup>

Para la determinación de la actividad antileishmania se utilizó una cepa de *Leishmania amazonensis* (MHOM/77/LTB0016), donada por el Departamento de Inmunología de la Fundación Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Río de Janeiro, Brasil. Los promastigotes fueron mantenidos en medio de Schneider (SIGMA, St. Louis, MO, USA), suplementado con antibióticos (penicilina sódica 200 UI, estreptomycin 200 µg/mL) y suero fetal bovino (SIGMA, St. Louis, MO, USA), descomplementado con calor (56 °C, 30 min) hasta el momento de su uso. La actividad de cada aceite esencial se ensayó de la forma siguiente: a 199 mL de promastigotes, previamente ajustados a 10<sup>5</sup> células/mL y distribuidos en una placa de 96 pozos, se les adicionó 1 mL del aceite correspondiente, diluido en dimetilsulfóxido (DMSO), a concentraciones finales menores que 500 mg/mL. Se ensayaron 11 concentraciones por cuadruplicado y se incluyó 1 pozo control en cada fila, donde los parásitos se trataron con el solvente. Las placas fueron incubadas a 26 °C. A las 72 h se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) por observación directa al microscopio invertido de promastigotes móviles.<sup>10</sup> Se realizaron 3 experimentos para cada aceite esencial.

Para determinar la actividad antitrichomonas se utilizó el aislamiento Tv-173 obtenido a partir de un exudado vaginal, procedente de una adolescente sintomática. Los parásitos fueron mantenidos a 37 °C en medio TYI-S-33, suplementado a 10 % con suero de ternero recién nacido, libre de calostro y descomplementado por calor (56 °C, 30 min). La axenización se realizó mediante cambios sucesivos de medio de cultivo, suplementado además con antibióticos (penicilina sódica 200 UI, estreptomycin 200 µg/mL). Se prepararon diluciones dobles seriadas desde 400 µg/mL hasta 3,125 µg/mL, en DMSO como solvente. Para los ensayos se utilizaron placas estériles de 96 pozos donde se añadieron 99 µL de medio completo, 1 µL de DMSO, como control de solvente correspondiente del aceite esencial y 100 µL de la suspensión de parásitos para una concentración final de 1 x 10<sup>5</sup> parásitos/mL. La placa fue incubada durante 48 h, en jarra para cultivo anaerobio, colocada a 37 °C. Transcurrido ese período de tiempo se procedió a la determinación de la CMI, como se describió anteriormente. Se realizaron 3 ensayos con 3 réplicas cada uno para cada aceite esencial.<sup>11</sup>

La CMI se define como la más baja concentración a la que los aceites esenciales causaron una inhibición completa del crecimiento parasitario.<sup>12</sup>

Todos los aceites esenciales mostraron una CMI muy elevada contra *L. amazonensis*, si se compara con la droga de referencia, la anfotericina B (tabla 1). En el caso de *T. vaginalis* el aceite extraído de *C. ambrosioides* fue solamente el que mostró una actividad promisorio, con valores de CMI similares a la droga de referencia, el metronidazol (tabla 2). Este aceite fue el que causó una mayor actividad frente a *L. amazonensis*.

**TABLA 1.** Concentración mínima inhibitoria de aceites esenciales frente a promastigotes de *L. amazonensis*

Aceite esencial	CMI (mg/mL) <sup>a</sup>
<i>A. abrotanum</i>	116,5
<i>C. ambrosioides</i>	27,8
<i>P. aduncum</i>	50,8
<i>P. auritum</i>	490,7
<i>P. caribaea</i>	276,6
Anfotericina B	0,16

<sup>a</sup>: CMI, concentración que causa una inhibición de 100 % del crecimiento parasitario.

**TABLA 2.** Concentración mínima inhibitoria de aceites esenciales sobre el cultivo *in vitro* de *T. vaginalis* (Tv-173)

Aceite esencial	CMI (mg/mL) <sup>a</sup>
<i>A. abrotanum</i>	400
<i>C. ambrosioides</i>	25
<i>P. aduncum</i>	100
<i>P. auritum</i> <sup>b</sup>	-
<i>P. caribaea</i>	200
Metronidazol	12,5

<sup>a</sup>: CMI, concentración que causa una inhibición de 100 % del crecimiento parasitario; <sup>b</sup>: el aceite esencial a la dosis mayor ensayada (1 600 mg/mL) no inhibió el crecimiento del parásito.

Iguales resultados fueron obtenidos al evaluar los aceites esenciales frente a otros aislamientos de *T. vaginalis*, obtenidos también de pacientes sintomáticas (resultados no mostrados).

Existen pocos datos sobre la actividad antiprotozoaria de los aceites esenciales extraídos de *P. auritum*, *P. aduncum*, *P. caribaea* y *A. abrotanum* que crecen en Cuba. Solo se ha reportado sobre las propiedades antiparasitarias del aceite esencial de *C. ambrosioides*, donde el ascaridol es el constituyente principal y al cual se le atribuye un papel clave en las propiedades antiparasitarias de esta especie, sin menospreciar aquella que aportan los hidroperóxidos.<sup>13</sup>

Se ha reportado que el aceite esencial de *C. ambrosioides* es activo contra *Plasmodium falciparum*.<sup>14</sup> Por otra parte, el jugo de esta planta es efectivo para el tratamiento de *Ascaris lumbricoides*<sup>15</sup> y varios hidroperóxidos, extraídos de las partes aéreas, han mostrado efecto también contra epimastigotes de *Trypanosoma*.<sup>13</sup>

La anfotericina B, utilizada como control, mostró una actividad 150 veces mayor que la causada por el aceite extraído de *C. ambrosioides* contra *Leishmania*. Es necesario considerar que los aceites esenciales son una mezcla compleja de varios componentes, por lo que la preparación de fracciones, o incluso la purificación de un compuesto, podría resultar en un incremento considerable de la actividad, o en la pérdida de esta. Sin embargo, se podría tener en cuenta lo reportado en el 2001, por Delorenzi y otros, los que estudiaron el efecto de un extracto de *Peschieria australis* frente a promastigotes de *L. amazonensis*. Ellos obtuvieron solamente 30 % de inhibición del crecimiento al incubar los parásitos con 100 mg/mL; sin embargo, al purificar un

alcaloide indólico, coronaridina, obtuvieron 97 % de inhibición del crecimiento de los promastigotes a una concentración de 12,5 mg/mL.<sup>16</sup> Tomando en consideración este ejemplo, se decidió continuar las investigaciones farmacológicas sobre el estudio de la actividad antiprotozoaria que podrían mostrar las fracciones del aceite esencial de *C. ambrosioides*.

Por otra parte, hay que tener en cuenta que todas las drogas que actualmente se usan contra la leishmaniosis presentan una elevada toxicidad. En cambio, estos aceites, al ser productos naturales, es probable que presenten una baja toxicidad lo que permitiría emplearlos a dosis más elevadas.

El metronidazol, utilizado para el tratamiento de la trichomonosis, solo mostró una actividad 2 veces mayor que el aceite esencial extraído de *C. ambrosioides*, lo que brinda suficiente evidencia para continuar estudios farmacológicos acerca de sus potencialidades frente a esta parasitosis.

Por estos motivos, se recomienda profundizar en el estudio de la actividad farmacológica y la toxicidad del aceite esencial de *C. ambrosioides* y/o de sus componentes principales. Los resultados obtenidos para *Trichomonas*, demuestran la importancia que tiene la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas en la medicina tradicional y natural.

#### SUMMARY

The antiprotozoan activity of the essential oil extracted from *Artemisia abrotanum*, *Chenopodium ambrosioides*, *Pinus caribaea*, *Piper aduncum* and *Piper auritum*, was evaluated. The evaluated oils did not show activity against *L. amazonensis*; however, the oil extracted from *C. ambrosioides* showed a promising activity against *Trichomonas vaginalis* with a minimum inhibitory concentration of 25 mg/mL.

**Key words:** Essential oil, *Leishmania*, *Trichomonas*

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Plock A, Sokolowska-Köhler W, Presber W. Application of flow cytometry and microscopical methods to characterise the effect of herbal drugs on *Leishmania* spp. *Exp Parasitol* 2001;97:141-53.
2. Delorenzi J C, Freire-de-Lima L, Gattass CR, Costa DA, He L, Kuehne M E *et al.* *In vitro* activities of iboga alkaloid congeners coronaridine and 18-methoxycoronaridine against *Leishmania amazonensis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:2111-5.
3. Petrin D, Delgaty K, Bhatt R, Garber G. Clinical and Microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clin Microbiol Rev* 1998;11:300-17.

4. Cosar C, Julou L. Activity of 1-(2'-hydroxyethyl)-2-methyl-5-nitroimidazole (8823 RP) against experimental *Trichomonas vaginalis* infection. *Ann Inst Pasteur* 1959; 96:238-41.
  5. Lossick JG, Kent HL. Trichomoniasis: trends in diagnosis and management. *Am J Obstet Gynecol* 1991;165:1217-22.
  6. Lossick JG. Therapy of urogenital trichomoniasis. In: Honigber BM (Ed). *Trichomonads Parasitic in Humans*. New York: Springer, 1990. p. 324-41.
  7. Kulda J, Vojtechovska M, Tachezy J, Demes P, Kunzova E. Metronidazole resistance of *Trichomonas vaginalis* as a cause of treatment failure in trichomoniasis. *Br J Vener Dis* 1982; 58:394-9.
  8. Caio E, Lima D, Kaplan MAC, Nazareth M, 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.
  9. Norma Ramal. NRSP 309 "Medicamentos de origen vegetal. Droga cruda. Métodos de Ensayos". 1992.
  10. Bodley AL, McGarry MW, Shapiro TA. Drug cytotoxicity assay for African Trypanosomes and *Leishmania* species. *J Infect Dis* 1995;172:1157-9.
  11. Meingassner JG, Thurner J. Strain of *Trichomonas vaginalis* resistant to metronidazole and other 5-nitroimidazoles. *Antimicrob Agents Chemother* 1979;15:254-7.
  12. Freiburghaus F, Steck A, Pfander H, Brun R. Bioassay-guide isolation of a diastereoisomer of kolavenol from *Entada abyssinica* active on *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *J Ethnopharmacol* 1998;61:179-83.
  13. Kiuchi F, Itano Y, Uchiyama N, Honda G, Tsubouchi A, Nakajima-Shimada J, Aoki T. Monoterpene hydroperoxides with Trypanocidal activity from *Chenopodium ambrosioides*. *J Nat Prod* 2002;65:509-12.
  14. Pollack Y, Segal R, Golenser J. The effect of ascaridole on the *in vitro* development of *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Res* 1990;76:570-2.
  15. López D, Neyra RS, Ramiro JH. Ascariasis: comparison of the therapeutic efficacy between paico and albendazole in children from Huaraz. *Rev Gastroenterol Peru* 2001;21:212-9.
  16. Delorenzi JC, Attias M, Gattass CR, Andrade M, Rezende C, Cunha A. *et al.* Antileishmanial activity of an indole alkaloid from *Peschiera australis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1349-54.
- Recibido: 5 de mayo de 2004. Aprobado: 12 de septiembre de 2004.
- Lic. *Lianet Monzote Fidalgo*. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourf". Apartado Postal 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: monzote@ipk.sld.cu