

Actividad antiplasmódica *in vitro* de *Piper holtonii* (cordoncillo)

In vitro antiplasmodial activity of *Piper holtonii* (cordoncillo)

MSc. Maritza A. Rojas Cardozo,^I Dr. Giovanni Garavito Cárdenas,^{II}
Dr. Javier Rincón Velandia^{III}

Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. D.C., Colombia.

RESUMEN

Introducción: especies vegetales del género *Piper* (Piperaceae) han sido usadas en la medicina tradicional en diferentes regiones del mundo, incluida Latinoamérica para el tratamiento de enfermedades tropicales como la malaria.

Objetivo: evaluar la actividad antiplasmódica del extracto etanólico y las fracciones de diferente polaridad de *Piper holtonii* C.DC.

Métodos: la actividad antiplasmódica del extracto etanólico de las partes aéreas de *Piper holtonii* y de las fracciones hexánica, clorofórmica, metanólica, butanólica y acuosa, se evaluó sobre un cultivo de *Plasmodium falciparum* cepa FCB-2. Se determinó la actividad hemolítica y se caracterizaron fitoquímicamente cada una de las fracciones.

Resultados: el extracto etanólico y las fracciones de baja polaridad presentaron actividad promisorio con valores de CI_{50} inferiores a 25 $\mu\text{g/mL}$.

Conclusiones: los resultados de la actividad biológica de *Piper holtonii* permiten sugerir que los metabolitos de baja y media polaridad están relacionados con la actividad antiplasmódica de esta especie.

Palabras clave: actividad antiplasmódica, *Piper holtonii*, Piperaceae.

ABSTRACT

Introduction: plant species of the genus *Piper* (Piperaceae) have been used in traditional medicine in various regions of the world. In Latin America they have been used to treat tropical diseases such as malaria.

Objective: evaluate the antiplasmodial activity of the ethanolic extract and fractions of varying polarity of *Piper holtonii* C. DC.

Methods: evaluation was conducted of the antiplasmodial activity of ethanolic extract from aerial parts of *Piper holtonii* and of hexane, chloroform, methanol, buthanol and aqueous fractions on a *Plasmodium falciparum* strain FCB-2 culture. Hemolytic activity was determined and phytochemical characterization of each fraction was performed.

Results: both the ethanolic extract and the low-polarity fractions displayed promising activity, with CI_{50} values below 25 $\mu\text{g/mL}$.

Conclusions: results concerning the biological activity of *Piper holtonii* suggest that low- and medium-polarity metabolites are related to antiplasmodial activity in this species.

Key words: antiplasmodial activity, *Piper holtonii*, Piperaceae.

INTRODUCCIÓN

La malaria es una enfermedad parasitaria que constituye uno de los principales problemas de salud pública en el mundo. Se reporta que en 2011 esta enfermedad causó cerca de 90 millones de episodios y alrededor de 107 mil muertes a nivel mundial; en Colombia de acuerdo con el último reporte de la OMS cerca de 23 % de la población está en riesgo de contraer esa enfermedad.¹ Existe una urgente necesidad de encontrar alternativas terapéuticas seguras y efectivas para la prevención y el tratamiento de la malaria.

El género *Piper* es el más numeroso de la familia Piperaceae, con cerca de 2 000 especies reportadas² que se distribuyen en regiones tropicales y subtropicales; y es el que más se conoce desde el punto de vista fitoquímico. Algunas especies pertenecientes a este género son reconocidas por su interés comercial y medicinal, como la pimienta (*Piper nigrum*) y especies medicinales como *P. betle*, *P. longum*, *P. angustifolium*, *P. cubeba*, *P. methysticum* y *P. aduncum*, y otras.^{3,4}

En la medicina tradicional latinoamericana algunas preparaciones empleadas para tratar la malaria o fiebres intermitentes incluyen especies del género *Piper*. En Colombia estas especies se conocen comúnmente como cordoncillos y son usadas en medicina popular como cicatrizantes, hemostáticos, analgésicos, antiinflamatorios, para el tratamiento de enfermedades pulmonares, gastrointestinales, malaria y estados febriles.⁵⁻⁷ El extracto etanólico inicial de *Piper holtonii* C.DC. mostró actividad antiplasmódica en ensayos previos,⁸ por lo que en el presente trabajo se estudió la actividad de fracciones de diferente polaridad obtenidas a partir del extracto etanólico de *P. holtonii*.

MÉTODOS

El material vegetal de las partes aéreas de *Piper holtonii* se recolectó en el municipio de Mesitas, Cundinamarca, Colombia (04° 38' 23" N, 74° 28' 0" O). Un ejemplar fue depositado en el Herbario Nacional Colombiano (Universidad Nacional de Colombia) registrado con el número COL468663. El material fresco se secó en estufa de aire circulante a 45 °C durante 24 h, se molió y se sometió a extracción por percolación exhaustiva con etanol 96 %; el solvente se retiró empleando

evaporador rotatorio conectado a una bomba de vacío, procedimiento que dio lugar al extracto etanólico denominado PhEtOH.

El extracto etanólico seco (PhEtOH) se sometió a partición líquido-líquido con una mezcla cloroformo:agua (1:1), para obtener una fracción orgánica y una fracción acuosa. La fracción clorofórmica se sometió a una columna de filtración por sílica gel 60 (Merck) con un tamaño de partícula de 63 a 200 μm , empleando como solventes hexano, cloroformo y metanol, para obtener las fracciones PhH, PhC y PhM, respectivamente. La fracción acuosa se extrajo con *n*-butanol para dar lugar a la fracción butanólica (PhB) y a la fracción acuosa (PhA) (Fig.).

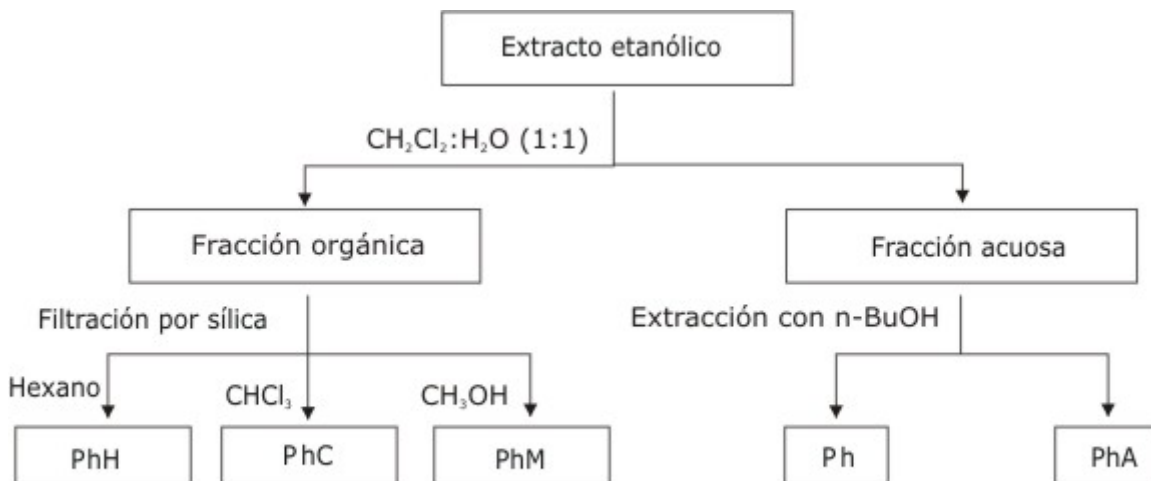


Fig. Esquema de partición del extracto etanólico de *Piper holtonii*.

Cada fracción, después de eliminar el solvente, fue caracterizada utilizando cromatografía en capa delgada (CCD) con el empleo de placas de sílica gel (60 F₂₅₄, 0,25 mm, Merck). Una vez eluidas las placas se revelaron con luz UV a 254 y 365 nm y reveladores químicos, como vainillina 1 %/H₂SO₄ 10 % en EtOH (Godin), NP/PEG y Dragendorff.⁹ La fracción hexánica (10 g) se sometió a una cromatografía en columna sobre sílica gel 60 empleando como fase móvil hexano y mezclas de hexano:CHCl₃ (95:5) hasta CHCl₃ (100 %); de esta columna se lograron 38 fracciones, la fracción 13 (PhH-13) se obtuvo como un líquido puro en CCD, por lo que se evaluó su actividad antiplasmódica y se analizó por CG-MS en un cromatógrafo de gases Shimadzu 14B/QP5050A, equipado con una columna HP-5, 30 m x 0,25 mm (temperatura inicial 80 °C, temperatura final 250 °C, velocidad 5 °C/min).

El extracto etanólico y las fracciones obtenidas de *P. holtonii* se sometieron a evaluación de actividad antiplasmódica, de acuerdo con la técnica descrita por Deharo y otros, en un cultivo de *P. falciparum* cepa cloroquino-resistente FCB-2 (INS-Colombia) al 1 % de parasitemia y suplementado con 10 % de plasma humano. Previamente a la realización del ensayo, el cultivo se sincronizó a formas jóvenes entre 0 y 20 h, empleando sorbitol 5 %.¹⁰

Se prepararon soluciones en DMSO a 20 mg/mL, que luego se diluyeron con medio RPMI suplementado, para alcanzar concentraciones en la microplaca de 96 pozos de 50, 25, 10, 1 y 0,1 $\mu\text{g/mL}$; cada concentración fue evaluada por triplicado. El

diseño de la microplaca contó con un testigo de crecimiento, un control de vehículo y un control positivo de cloroquina a 0,50, 0,25, 0,10, 0,01 y 0,001 µg/mL.

La microplaca se incubó a 37 °C durante 48 h, en atmósfera de O₂ (5 %) y CO₂ (5 %). finalizado este período se realizó un extendido con 5 mL de glóbulos rojos sedimentados, que se fijó con metanol y se coloreó con el reactivo de Giemsa. La cuantificación de la parasitemia se efectuó por microscopia óptica, realizando el recuento de glóbulos rojos parasitados por cada 1000 glóbulos rojos totales. La capacidad inhibitoria de cada una de las muestras evaluadas se expresó como el porcentaje de inhibición y la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) se calculó para cada uno de los ensayos mediante análisis de regresión no lineal de los porcentajes de inhibición y el logaritmo de la concentración. Para esto se empleó el programa GraphPad Prism 5[®] y se expresaron los resultados como la media ± error medio estándar (EMS) de 3 ensayos independientes.

Para evaluar el efecto de las fracciones sobre la integridad de los eritrocitos no infectados se realizó el ensayo de actividad hemolítica, siguiendo el protocolo descrito por *Okamoto*.¹¹ El extracto y las fracciones se evaluaron a una concentración de 50 µg/mL en PBS (*buffer* de fosfatos), que representa la máxima concentración evaluada en el ensayo de actividad antiplasmódica *in vitro*; se empleó agua para generar 100 % de hemólisis a 1 h de incubación, PBS como control negativo de hemólisis y se evaluó el efecto del vehículo (DMSO 2 %). La determinación de la hemoglobina libre se realizó por espectrofotometría a 490 nm en un lector de placas de micro-ELISA (Bio-Rad Modelo 550). El porcentaje de hemólisis se calculó respecto a la absorbancia de las muestras tratadas con H₂O, que representan 100 % de hemólisis.

RESULTADOS

Los resultados de la actividad antiplasmódica *in vitro* de las fracciones, obtenidas a partir del extracto etanólico de *Piper holtonii* se reportan en la tabla, los cuales muestran que el extracto etanólico y las fracciones de baja polaridad presentan los menores valores de CI₅₀. La caracterización por CCD y pruebas fitoquímicas preliminares permitieron detectar presencia de esteroides, terpenos y fenilpropanoides en la fracción hexánica y clorofórmica. La fracción metanólica mostró la presencia de saponinas esteroidales y la fracción butanólica y acuosa produjeron respuesta positiva para flavonoides.

El análisis por CG-MS de la subfracción PhH-13 obtenida de la fracción hexánica de *P. holtonii* permitió identificar los fenilpropanoides apiol y dilapiol en proporción 10:7, respectivamente. La evaluación de la actividad antiplasmódica de esta mezcla evidenció que la CI₅₀ es mayor que 50 µg/mL.

Tabla. Valores de CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) obtenidos en el ensayo de actividad antiparasitaria *in vitro* frente a *Plasmodium falciparum* y porcentaje de hemólisis para las fracciones de *Piper holtonii*

Muestras de <i>Piper holtonii</i>	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) \pm EMS	% de hemólisis \pm EMS (a 50 $\mu\text{g/mL}$)
Extracto etanólico (PhEtOH)	12,0 \pm 1,5	1,02 \pm 0,02
Fracción hexánica (PhH)	17,2 \pm 3,0	0,22 \pm 0,01
Fracción clorofórmica (PhC)	22,3 \pm 2,6	0,38 \pm 0,01
Fracción metanólica (PhM)	> 50	3,29 \pm 0,21
Fracción butanólica (PhB)	> 50	1,45 \pm 0,04
Fracción acuosa (PhA)	> 50	3,18 \pm 0,10
Cloroquina	0,045 \pm 0,007	0,3 \pm 0,12
<i>Cinchona</i> sp.	< 0,1	ND
Dimetil sulfóxido (DMSO)	> 50	0,02

EMS: error medio estándar. ND: no determinado. Los valores se expresan como la media de 3 ensayos independientes.

DISCUSIÓN

El uso tradicional de preparaciones que incluyen especies del género *Piper*, para el tratamiento de malaria o de estados febriles intermitentes en Colombia y Latinoamérica ha sido documentado. Algunas especies empleadas con este fin son *P. marginatum*, *P. nigrum*, *P. angustifolium*, *P. brachypodon*, *P. peltatum* y *P. tricuspe*,^{6,7} entre otras especies.

Los resultados en los ensayos de actividad antiplasmódica permitieron clasificar como fracciones promisorias las obtenidas en hexano y cloroformo (PhH y PhC). El extracto etanólico inicial de *P. holtonii* ($CI_{50} = 12,0 \mu\text{g/mL}$), presentó actividad significativamente diferente (prueba de Dunnett $p < 0,05$) a las fracciones hexánica (PhH, $CI_{50} = 17,2 \mu\text{g/mL}$) y clorofórmica (PhC, $CI_{50} = 22,3 \mu\text{g/mL}$); resultado que puede atribuirse, entre otros factores, a un posible efecto sinérgico de metabolitos de baja polaridad presentes en estas fracciones. Las fracciones de mayor polaridad y la mezcla de fenilpropanoides, apiol y dilapiol, no presentaron *in vitro* efecto sobre el parásito a la máxima concentración evaluada (50 $\mu\text{g/mL}$), es decir, que estos metabolitos no se encuentran relacionados con la actividad *in vitro* ejercida por la fracción hexánica.

Los resultados de actividad antiplasmódica para *P. holtonii* mostraron un comportamiento similar al de otras especies de *Piper* que han sido objeto de evaluación cuyas fracciones activas corresponden a aquellas obtenidas en hexano, diclorometano o cloroformo. A saber, el estudio bioguiado de la fracción hexánica de *P. hostmannianum* condujo al aislamiento de 2 dihidrochalconas y 1 flavanona

con actividad antiplasmódica *in vitro* sobre *P. falciparum* con valores de CI_{50} de 12,69, 10,33 y 5,64 mM en la cepa F32; y 16,91, 15,06 y 5,27 mM en FCB-1¹². La evaluación de la especie *P. hispidum*, usada por comunidades indígenas de América Central para tratar malaria y fiebres, condujo al aislamiento de una dihidrochalcona a partir de extractos lipofílicos con una CI_{50} de 16,9 y 10,4 mg/mL en 2 cepas de *Plasmodium*;¹³ en *Piper holtonii* no se determinó la presencia de dihidrochalconas en las fracciones de baja polaridad, por lo que la actividad estaría relacionada con otra clase de metabolitos.

Respecto al ensayo de actividad hemolítica, ninguna de las fracciones produjo un efecto significativo sobre los eritrocitos no infectados por lo que se descarta que la actividad biológica observada se deba a un efecto sobre la membrana de los glóbulos rojos. La fracción metanólica (PhM) generó un bajo porcentaje de hemólisis (3,29 %), que puede estar relacionado con la presencia de saponinas en esta fracción.

El uso de especies del género *Piper* en medicina tradicional ha llevado a que sean objeto de estudios fitoquímicos y farmacológicos. En el caso particular de actividad antimalárica, la información etnofarmacológica ha conducido al estudio de algunas especies y sus metabolitos secundarios; tal es el caso de *P. sarmentosum* especie de la que se aislaron amidas con valores de CI_{50} de 18,9 y 6,5 mg/mL sobre la cepa resistente de *P. falciparum* K1.¹⁴ La especie *P. tricuspe* usada por comunidades del sur de Colombia para tratar la malaria contiene metabolitos que presentaron actividad antimalárica *in vitro*, con valores de CI_{50} de 9,8, 29,8 y 1,37 mM en *P. falciparum* FCB-1.¹⁵ Estos resultados incentivan la continuación del estudio de fracciones de baja polaridad de *P. holtonii*.

Los resultados del presente estudio aportan a la validación del uso tradicional y muestran que el género *Piper* puede constituirse en una fuente potencial de moléculas con actividad antiparasitaria, además, permiten sugerir que la actividad antiplasmódica de *Piper holtonii* puede deberse a metabolitos de baja y mediana polaridad, diferentes a apiol y dilapiol.

AGRADECIMIENTOS

A la División de Investigación de la Sede Bogotá (DIB) de la Universidad Nacional de Colombia por el apoyo financiero otorgado para el desarrollo de este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization- Global Malaria Programme, World malaria Report: 2012, Switzerland, 2012. [Citada 28 Mar 2013]. Disponible en http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012/en/
2. Quijano-Abril MA, Callejas-Posada R, Miranda-Esquivel DR. Areas of endemism and distribution patterns for Neotropical *Piper* species (Piperaceae). J Biogeogr. 2006;33(7):1266-78.
3. Parmar VS, Jain SC, Bisht KS, Jain R, Taneja P, Jha A, et al. Phytochemistry of the Genus *Piper*. Phytochemistry. 1997;46(4),591-673.

4. Parmar VS, Jain SC, Gupta S, Talwar S, Rajwanshi VK, Kumar R, et al. Polyphenols and alkaloids from *Piper* species. *Phytochemistry*. 1998;38(3):958-67.
5. García-Barriga H. Flora Medicinal de Colombia-Botánica Médica. Bogotá: Mundo Editores; 1992. p 225-249.
6. Blair S, Correa A, Madrigal B, Zuluaga C, Franco H. Plantas antimaláricas. Medellín Colombia: Universidad de Antioquia; 1991. p. 91-2.
7. Blair S, Madrigal B. Plantas antimaláricas de Tumaco, Costa Pacifica Colombiana. Medellín-Colombia: Editorial Universidad de Antioquia; 2005. p. 210-2.
8. Garavito G, Rincón J, Arteaga L, Hata Y, Bourdy G, Gimenez A, et al. Antimalarial activity of some Colombian medicinal plants. *J Ethnopharmacol*. 2006;107(3):460-42.
9. Wagner H, Bladt S, Zgainski EM. Plant drug analysis, a thin layer chromatography atlas. Germany: Springer-Verlag; 1996.
10. Deharo E, Gautre PH, Muñoz V, Sauvain M. Técnicas de laboratorio para la selección de sustancias antimaláricas. La Paz-Bolivia: CYTED-IRD; 2000. p. 31-64.
11. Okamoto Y, Ohkoshi K, Itagaki H, Tsuda T, Kakishima H, Ogawa T, et al. Interlaboratory validation of the in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. (3) Evaluation of the haemolysis test. *Toxicol In Vitro*.1999;13(1):115-24.
12. Portet B, Fabre N, Roumy V, Gornitzka H, Bourdy G, Chevalley S, et al. Activity-guided isolation of antiplasmodial dihydrochalcones and flavanones from *Piper hostmannianum* var. *berbicense*. *Phytochemistry*. 2007;68(9):1312-20.
13. Jenett-Siems K, Mockenhaupt FP, Bienzle U, Gupta MP, Eich E. *In vitro* antiplasmodial activity of Central American medicinal plants. *Trop Med Int Health*.1999;4(9):611-5.
14. Rukachaisirikul T, Siriwattanakit P, Sukcharoenphol K, Wongvein C, Ruttanaweang P, Wongwattanavuch P, et al. Chemical constituents and bioactivity of *Piper sarmentosum*. *J Ethnopharmacol*. 2004;93(2-3):173-6.
15. Sáez Vega A, Rojanoa B, Blair S, Segura C, Figadere B, Seone B, et al. Antimalarials and antioxidants compounds from *Piper tricuspe* (Piperaceae). *Pharmacologyonline*. 2008;1(1):1-8.

Recibido: 2 de mayo de 2013.

Aprobado: 9 de octubre de 2013.

Maritza A. Rojas Cardozo. Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Carrera 30 45-03, Bogotá. D.C., Colombia, Teléf.: 3165000 Ext. 14630. Correo electrónico: marojasc@unal.edu.co