

**ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL ACEITE ESENCIAL DE
Aristolochia gibertii Hooker**

[Antifungal activity of the essential oil from *Aristolochia gibertii* Hooker]

NANCY CANELA¹, NELSON ALVARENGA¹, ESTEBAN FERRO¹,
SUSANA ZACCHINO² & MARÍA DE LOS ÁNGELES GETTE²

¹Departamento de Fitoquímica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción, PO BOX 1055, San Lorenzo, Paraguay. E-mail: ncanela65@hotmail.com

²Departamento de Farmacognosia, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Suipacha 531, 2000, Rosario, Argentina

RESUMEN: Se realizó la evaluación de la actividad antifúngica del aceite esencial obtenido de la parte aérea de *Aristolochia gibertii* Hooker (Aristolochiaceae) contra un panel de hongos patógenos y oportunistas utilizando el método estandarizado de microdilución en caldo del Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). La esencia mostró acción sobre especies de los géneros *Microsporum* y *Trichophyton*. No se observó actividad sobre especies de los géneros *Candida*, *Saccharomyces*, *Cryptococcus* y *Aspergillus*.

Palabras clave: Aristolochiaceae, *Aristolochia gibertii*, actividad antifúngica, aceite esencial.

SUMMARY: Evaluation of antifungal activity of the essential oil from the aerial parts of *Aristolochia gibertii* Hooker (Aristolochiaceae) against a panel of human opportunistic and pathogenic fungi was performed with the CLSI standardized microbroth dilution method. The oil showed action against *Microsporum* and *Trichophyton* species, whereas no activity was observed against species of *Candida*, *Saccharomyces*, *Cryptococcus* and *Aspergillus* genii.

Keywords: Aristolochiaceae, *Aristolochia gibertii*, antifungal activity, essential oil.

INTRODUCCIÓN

Los antibióticos fueron considerados “fármacos milagrosos” cuando estuvieron disponibles para su uso en medicina entre finales de los años 40 y principios de los 50 del siglo pasado. Sin embargo, su popularidad llevó rápidamente a su empleo excesivo y en muchos casos injustificado. Esto trajo como consecuencia la pérdida de actividad de varios de ellos, al desarrollar los microorganismos resistencia frente a los mismos. Para complicar más el panorama, los microorganismos pueden desarrollar resistencia por más de un mecanismo, haciendo que evitar la aparición de la misma o su diseminación no sea un problema sencillo.

Manuscrito recibido: 14 de junio de 2012.

Manuscrito aceptado: 16 de agosto de 2012.

Para lidiar con el problema, las compañías farmacéuticas internacionales han reavivado esfuerzos para el desarrollo de nuevos fármacos antimicrobianos (Amábile-Cuevas, 2003), lo cual es actualmente una cuestión urgente, debido a la aparición de cepas de microorganismos resistentes a los fármacos en uso clínico actual, como es el caso del *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) y el *Mycobacterium tuberculosis* con resistencia a múltiples fármacos (MDR-TB). Podemos mencionar además dentro de ellos a los bacilos Gram negativos resistentes a los carbapenemes y los *Enterococcus* con resistencia a vancomicina.

Dentro de este panorama, las infecciones fúngicas han mostrado un marcado aumento, principalmente en pacientes con un estado inmunitario deficiente, tanto por recibir medicación inmunosupresora como en aquellos que padecen del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). Normalmente, los microorganismos causantes de estas infecciones no son sensibles a los antifúngicos empleados convencionalmente (González & Tobón, 2006).

Los agentes antifúngicos actualmente disponibles para empleo clínico adolecen de varios inconvenientes, tales como toxicidad, interacciones con otros fármacos, pérdida de eficacia fungicida, costo, y además, la aparición de cepas resistentes, debido al uso frecuente de varios de ellos (González & Tobón, 2006).

Debido a esto, existe una gran demanda de nuevos fármacos antifúngicos, buscando hallar sustancias que sean al mismo tiempo más efectivas y menos tóxicas (Rapp, 2004; Kauffman, 2006).

Los productos naturales han sido empleados para el tratamiento de múltiples dolencias desde los albores de la humanidad. En la actualidad son fuente importante de diversidad química, y además, parte del arsenal terapéutico disponible. No es extraño que la búsqueda de nuevos compuestos antimicrobianos se haya centrado en parte en ellos, ya que la variabilidad de estructuras obtenidas de fuentes naturales aumenta las posibilidades de encontrar potenciales cabezas de serie de nuevas familias de fármacos.

Las plantas aromáticas han sido empleadas tradicionalmente como agentes antimicrobianos por diversas culturas (Grayer & Harborne, 1994; Cowan, 1999). Es sabido que los aceites esenciales de muchas plantas poseen actividad antimicrobiana y antifúngica (Dorman & Deans, 2000; Kalemba & Kunicka, 2003; Burt, 2004; Bakkali *et al.*, 2008) y aunque han sido utilizados empíricamente como agentes antimicrobianos, sin embargo, tanto su espectro de acción como su mecanismo son poco conocidos.

Aunque solo existe información consistente limitada acerca de su actividad contra hongos patógenos humanos, algunos aceites esenciales han demostrado actividad antifúngica contra levaduras, dermatofitos y cepas de *Aspergillus* spp, lo cual puede predecir efectos terapéuticos beneficiosos, principalmente en enfermedades que involucran mucosas, piel y tracto respiratorio (Pina-Vaz, 2004; Cavaleiro *et al.*, 2006; Pinto *et al.*, 2006).

Constituyen de esta forma tratamientos alternativos, pero que van ganando popularidad, aunque para varios de ellos todavía debe realizarse una evaluación científica adecuada.

Con estos antecedentes, se ha realizado la evaluación de la actividad antifúngica del aceite esencial obtenido de las partes aéreas *Aristolochia gibertii* contra varios hongos patógenos y oportunistas humanos, utilizando el método estandarizado de microdilución en caldo del Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal.

Aristolochia gibertii Hooker fue colectada en el Jardín de Aclimatación de Plantas Nativas y Medicinales de la Facultad de Ciencias Químicas, Campus de la Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo, Paraguay. Un ejemplar fue depositado en el Herbario FCQ de la Facultad de Ciencias Químicas (M. Ortiz 1.455).

Obtención del aceite esencial.

1 kg de las partes aéreas de la planta seca fue triturado en un molino de cuchillas. A partir de este material, porciones de 200 g fueron colocadas en un aparato de hidrodestilación tipo Clevenger adicionándose a continuación 1 L de agua destilada. El aparato fue sometido a calentamiento utilizando una manta calefactora y se recogió el aceite esencial destilado hasta el agotamiento del material vegetal. El rendimiento final de esencia obtenida fue de 0,14% (v/p).

Determinación de la actividad antifúngica.

La actividad antifúngica fue determinada utilizando los métodos de microdilución en caldo M 27 A2 para levaduras y M38A para hongos filamentosos siguiendo las guías del Clinical and Laboratory Standard Institute (NCCLS, 2002). Los fármacos antifúngicos ketoconazol (Janssen Pharmaceutica), anfotericina B (Sigma Chemical Co.) y terbinafina (Sigma Chemical Co.) fueron incluidos como controles positivos. El aceite esencial y los fármacos de referencia se ensayaron frente a los microorganismos *Candida albicans* ATCC 10231, *C. tropicalis* C 131, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, *Cryptococcus neoformans* ATCC 32264, *Aspergillus fumigatus* ATCC 26934, *A. flavus* ATCC 9170, *A. niger* ATCC 9029, *Microsporium gypseum* C 115, *Trichophyton rubrum* C 113 y *T. mentagrophytes* ATCC 9972, procedentes de la American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA (ATCC) y del Centro de Referencia en Micología, Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Argentina (C).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el ensayo realizado, se observó que el aceite esencial de *A. gibertii* posee actividad antifúngica sobre las especies que causan micosis superficiales: *Microsporium gypseum*, *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*, con 125 µg/mL como valor de concentración mínima inhibitoria para cada uno de ellos.

El valor de CMI obtenido es bastante bueno para un aceite esencial, considerando que varias esencias poseen valores de CMI superiores a los obtenidos frente a diferentes cepas de hongos (Reichling *et al.*, 2009; Zarai *et al.*, 2011) en incluso, componentes

individuales aislados como el mentol, han dado valores similares a los encontrados en el presente estudio (Al-Bayati, 2009). Para los demás microorganismos ensayados se observó una CIM superior a los 250 µg/mL. Los resultados se presentan en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Actividad antifúngica (CMI g/mL) del aceite esencial de *A. gibertii*.

Microorganismos	Ca ¹	Ct ²	Sc ³	Cn ⁴	Afu ⁵	Aff ⁶	An ⁷	Mg ⁸	Tr ⁹	Tm ¹⁰
Aceite esencial de <i>A. gibertii</i>	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	125	125	125
Anfotericina B	0.78	0.78	0.50	0.25	0.50	0.50	0.50	0.125	0.075	0.075
Terbinafina	1.56	1.56	3.12	0.39	0.78	1.56	0.78	0.04	0.01	0.025
Ketoconazol	0.5	0.5	0.5	0.25	0.125	0.25	0.50	0.05	0.025	0.025

Candida albicans ATCC 10231

²*Candida tropicalis* C 131

³*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763

⁴*Cryptococcus neoformans* ATCC 32264

⁵*Aspergillus fumigatus* ATCC 26934

⁶*Aspergillus flavus* ATCC 9170

⁷*Aspergillus niger* ATCC 9029

⁸*Microsporium gypseum* C 115

⁹*Trichophyton rubrum* C 113

¹⁰*Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9972

ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA

C: CEREMIC, Centro de Referencia en Micología, Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Argentina

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria.

Excepto las tres cepas anteriormente mencionadas, no se observó actividad relevante sobre las demás especies de hongos evaluadas. Sin embargo, teniendo presente que estos microorganismos producen infecciones en humanos y el riesgo de aparición de cepas resistentes a los antifúngicos existentes, podría evaluarse la posibilidad de emplear el aceite esencial en conjunto con los fármacos utilizados en clínica para tratar infecciones producidas por estos hongos. Por otra parte, el resultado obtenido valida el empleo popular de la misma, ya que se ha descrito que el tallo y las hojas se utilizan como antimicóticos (Basualdo *et al.*, 2003; Pin *et al.*, 2009) y el aceite esencial se ha aislado de estas mismas partes de la planta.

Como la composición química del aceite esencial es conocida (Canela *et al.*, 2004) debe también evaluarse la actividad de los componentes mayoritarios de la esencia sobre los hongos y levaduras utilizados en el presente ensayo en forma individual. También debe ampliarse el estudio para incluir a cepas resistentes a los antifúngicos utilizados actualmente.

Como conclusión, el aceite esencial de *Aristolochia gibertii* demostró poseer relativa actividad sobre especies de hongos filamentosos patógenos para la especie humana. Los

resultados obtenidos son promisorios y abren la posibilidad de evaluar en el futuro el uso conjunto de la esencia con los fármacos convencionales empleados para el tratamiento de infecciones producidas por estos hongos, ya que su empleo conjunto podría retrasar la aparición de resistencia a los mencionados fármacos. El resultado avala el uso que se hace en medicina popular para la especie.

BIBLIOGRAFÍA

- Al-Bayati, F. 2009. Isolation and identification of antimicrobial compound from *Mentha longifolia* L. leaves grown wild in Iraq. *Ann. Of Clin. Microb. Antimicrob* 8: 20-25.
- Amabile-Cuevas, C. F. 2003. New antibiotics and new resistance. *Am. Sci.* 91: 138-149.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. & M. Idaomar. 2008. Biological effects of essential oils – a review. *Food Chem Toxicol* 46: 446–475.
- Basualdo, I., Soria, N., Ortíz, M. & R. Degen. 2003. Uso medicinal de plantas comercializadas en los mercados de Asunción y Gran Asunción, Paraguay. *Revista de la Sociedad Científica* 14: 5-22.
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *Int J Food Microbiol* 94: 223–253.
- Canela N, Ferro E, Alvarenga N, Vila R. & C. Cañigueral. 2004. Chemical composition of the essential oil of *Aristolochia gibertii* Hooker from Paraguay. *J Essent Oil Res.* 16: 566-567.
- Cavaleiro, C., Pinto, E., Goncalves, M. J. & L. Salgueiro. R. 2006. Antifungal activity of *Juniperus* essential oils against dermatophyte, *Aspergillus* and *Candida* strains. *J Appl Microbiol* 100: 1333–1338.
- Cowan, M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 12: 564–582.
- Dorman, H. J. D. & Deans, S. G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol* 88: 308–316.
- González, A. & Tobón, A. 2006. Infecciones micóticas oportunistas en pacientes con VIH/SIDA. *Infectio*. 10 (4): 279-288.
- Grayer, R. J. & Harborne, J. B. 2006. A survey of antifungal compounds from higher plants, 1982–1993. *Phytochemistry* 37: 19–42.
- Kalembe, D. & Kunicka, A. 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr Med Chem* 10: 813–829.
- Kauffman, C. A. Fungal infections. 2003. *Proc Am Thorac Soc* 3: 35–40.
- National Committee for Clinical and Laboratory Standards (NCCLS). 2002. Method M-27-A2 for yeast, 2nd ed., 22 (15), Wayne Ed, pp.: 1–29.
- National Committee for Clinical and Laboratory Standards (NCCLS). 2002. Method M-38A for filamentous fungi, 2nd ed., 22 (16), Wayne Ed, pp.: 1-27.
- Pin, A., González, G., Marín, G., Céspedes, G., Cretton, S., Crhisten, P. & D. Rouguet. 2009. Plantas medicinales del Jardín Botánico de Asunción. Municipalidad de Asunción, AEPY, Université de Genève. 441 pp.

- Pina-Vaz, C., Rodrigues, A. G., Pinto, E., Costa-de-Oliveira, S., Tavares, C., Salgueiro, L., Cavaleiro, C., Goncalves, M. J., Martinez de-Oliveira, J. 2004. Antifungal activity of *Thymus* oils and their major compounds. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 18: 73–78.
- Pinto, E., Pina-Vaz, C., Salgueiro, L., Goncalves, M. J., Costa-de-Oliveira, S., Cavaleiro, C., Palmeira, A., Rodrigues, A. & J. Martinez de Oliveira. 2006. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *J Med Microbiol* 55: 1367–1373.
- Rapp, R. P. 2004. Changing strategies for the management of invasive fungal infections. *Pharmacotherapy*. 24: 4S–28S.
- Reichling, J., Schnitzler, P., Suschke, U. & R. Saller. Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial, Antifungal, Antiviral, and Cytotoxic Properties – an Overview. *Forsch Komplementmed*. 16:79–90.
- Zarai, Z., Kadri, A., Ben Chobba, I., Ben Mansour, R., Bekir, A., Mejdoub, H. & N. Gharsallah. 2011. The in-vitro evaluation of antibacterial, antifungal and cytotoxic properties of *Marrubium vulgare* L. essential oil grown in Tunisia. *Lipids in Health and Disease*. 10: 161-168.