

Efecto antifúngico de un extracto de *Petiveria alliacea* L.

María T. Illnait-Zaragozí, José Illnait-Ferrer* y Armando Blanco-García.*

Laboratorio de Micología, Instituto "Pedro Kourí", Apartado Postal 601, Marianao 13, La Habana, Cuba. Correos electrónicos: mtillnait@ipk.sld.cu; mtillnait@infomed.sld.cu *Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Playa, Apartado Postal 6414, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 3 de diciembre de 2009.

Aceptado: 15 de enero de 2010.

Palabras clave: *Petiveria alliacea* L., actividad antifúngica, *Candida*, *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*, *Cryptococcus*.
Key words: *Petiveria alliacea* L., antifungal activity, *Candida*, *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*, *Cryptococcus*.

RESUMEN. La utilidad de *Petiveria alliacea* L. como agente antimicrobiano ha sido reportada por diferentes autores. Sin embargo, su actividad como antimicótico ha sido poco estudiada. El objetivo del presente estudio fue constatar el efecto antifúngico *in vitro* de un extracto hidroalcohólico de esta planta (EHAPAL) en 11 cepas de levaduras. (*Candida albicans* ATCC 64548 y ATCC 64550, *C. krusei* ATCC 6258, *C. glabrata* ATCC 90030, *C. lusitaniae* ATCC 200951, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, *Rhodotorula mucilaginosa* LMIPK 0282, *Trichosporon asahii* LMIPK 0293, *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* LMIPK 0291 y LMIPK 0292). La actividad antifúngica *in vitro* fue evaluada mediante procedimientos de difusión en agar y dilución en caldo. La concentración final de células en el medio (Sabouraud con EHAPAL al 0; 0,5; 2,5; 5 y 10 % fue de $0,5 \cdot 10^3$ levaduras \cdot mL⁻¹. Se definió como concentración mínima inhibitoria (CMI) la menor concentración del extracto que inhibiera al menos el 50 % del crecimiento al compararlo con el control de crecimiento de cada cepa. De las 11 cepas estudiadas, 9 fueron totalmente inhibidas en presencia del extracto al 10 % y seis con él al 7,5 %. El 100 % de las cepas alcanzó la CMI₅₀ a concentraciones entre 5 y 7,5 % de EHAPAL. Concentraciones más bajas del extracto solo produjeron inhibición débil del crecimiento. Los resultados demuestran el efecto antifúngico *in vitro* del anamú en todas las cepas de levaduras estudiadas, sugiriendo que el extracto de esta planta pudiera ser potencialmente empleado en el tratamiento de las infecciones causadas por estos agentes.

ABSTRACT. *Petiveria alliacea*'s utilities as antimicrobial agent have been reported by different authors. The aim of this work was to study the antifungal effect of a hydroalcoholic extract of this plant (HAEPAL) on 11 yeast strains (*Candida albicans* ATCC 64548 and ATCC 64550 *C. krusei* ATCC 6258, *C. glabrata* ATCC 90030, *C. lusitaniae* ATCC 200951, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, *Rhodotorula mucilaginosa* LMIPK 0282, *Trichosporon asahii* LMIPK 0293, *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* LMIPK 0291 y LMIPK 0292). The antifungal effect against these species has not been reported before. The *in vitro* antifungal activity of HAEPAL was evaluated by diffusion and dilution procedures. Final concentration of the strains in the medium (Sabouraud-dextrose with HAEPAL at 0, 0.5, 2.5, 5, 7.5 and 10 %) was $0.5 \cdot 10^3$ cells \cdot mL⁻¹. The minimal inhibitory concentration (MIC) was defined as the lowest concentration of the extract that inhibited at least half of the growth compared with the growth control for each strain. HAEPAL 10 % completely inhibited 9 of the 11 studied strains, while a total of six were inhibited by the extract at 7.5 %. All the studied species reached their MIC₅₀ value with HAEPAL at 5 and 7.5 %. Inhibition activity of lower concentrations of the extract was very weak. A significant *in vitro* inhibitory effect of *P. alliacea* extract on the studied yeasts was observed. These results suggest a potential use of the evaluated extract as antimycotic treatment.

INTRODUCCIÓN

Importantes epidemias de enfermedades infecciosas recuerdan constantemente que se vive en un universo de microorganismos que evolucionan más rápidamente que los medicamentos antimicrobianos efectivos que el hombre es capaz de desarrollar para combatirlos. Los hongos han emergido como la cuarta causa más frecuente de infección. Un 40 % de estas infecciones tienen un desenlace fatal.^{1,2}

Esta situación resalta la necesidad de desarrollar nuevos medicamentos que resulten más efectivos e inocuos. En este sentido, las plantas constituyen abundantes fuentes de productos que han sido utilizados durante siglos para el tratamiento de enfermedades infecciosas.³

Petiveria alliacea L, conocida popularmente como anamú, es una planta natural de América tropical. Se le atribuyen propiedades antiespasmódicas, diuréticas, emenagogas, estimulantes y sudoríficas. También se ha empleado en cataplasmas para mitigar dolores, contra la hidropesía, la artritis, la mala memoria y para inducir el aborto.⁴ Adicionalmente, se encuentran disponibles en el mercado internacional múltiples productos aprobados por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA, de sus siglas en inglés) de los EE. UU. como medicamento de apoyo al sistema inmunológico y estimulante general que la utilizan como materia prima.⁵

En una base de datos para el anamú <http://www.rain-tree.com/anamú.htm>, ha sido reportado el efecto antimi-

cótico de su extracto como una de las propiedades de la planta y se menciona a *Candida albicans* entre las especies susceptibles. No obstante, se aprecian algunas contradicciones referentes a sus potencialidades en este sentido.^{6,7}

Hasta la fecha, se han realizado en Cuba algunas investigaciones sobre las características farmacognósticas y fitoquímicas de *Petiveria Alliacea* L.⁷ Sin embargo, sus propiedades antimicrobianas, especialmente frente a los hongos han sido poco estudiadas. Los resultados reportados hasta el momento sobre este último aspecto, sugieren pobre o ninguna actividad de los extractos ensayados sobre *Candida albicans* en tanto que para otros agentes micóticos se desconoce.^{7,8}

Tomando en consideración la presencia en la planta de sustancias con probada actividad contra los hongos,⁹ este trabajo se propuso corroborar su acción contra *C. albicans* y ampliar el número de especies a estudiar para determinar su susceptibilidad frente a un extracto hidroalcohólico de *Petiveria Alliacea* L.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación del extracto (tintura)

Se preparó un extracto con las hojas de *Petiveria Alliacea* L. previamente secas a 40 °C y pulverizadas en molinos con perlas de porcelana y alcohol al 70 % (EHAPAL). Una parte de hojas secas y molidas de mezcló con cinco partes de etanol y se agitó durante 24 h a temperatura ambiente. La tintura obtenida del sobrenadante después de 6 h de reposo se diluyó al 1, 5, 10, 15 y 20 % en agua destilada y filtrada por membrana de 0,22 µm. La esterilidad de estos preparados se comprobó mediante estría por agotamiento en placas de agar dextrosa de Sabouraud (ADS).

Cepas empleadas y preparación del inóculo

Se utilizaron cultivos de 24 a 48 h en ADS de *Candida albicans* ATCC 64548, *C. albicans* ATCC 64550, *C. krusei* ATCC 6258, *C. glabrata* ATCC 90030, *C. lusitaniae* ATCC 200951, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, *Rhodotorula mucilaginosa* LMIPK 0282, *Trichosporon asahii* LMIPK 0293, *Cryptococcus grubii* LMIPK 0291 y *C. grubii* LMIPK 0292. Para cada cepa se preparó una suspensión madre en agua destilada estéril, la cual fue ajustada a una concentración final de $1 \cdot 10^3$ células · mL⁻¹ mediante conteo en cámara de Neubauer.

Determinación de la actividad antifúngica

La determinación de la actividad antifúngica se llevó a cabo mediante difusión en agar (variantes 1 y 2) y dilución en caldo. En cada caso, la concentración final de levaduras fue de $0,5 \cdot 10^3$ células · mL⁻¹ y de 0,5; 2,5; 5; 7,5 y 10 % de EHAPAL. La concentración mínima inhibitoria (CMI₅₀) fue definida para cada cepa como la menor concentración del extracto capaz de inhibir al menos la mitad del crecimiento con relación al control (crecimiento en medio de cultivo solo con el diluyente del extracto). Cada procedimiento se realizó por duplicado.

Para la primera variante de difusión en agar se emplearon placas Petri con ADS sobre cuya superficie se inocularó con hisopo estéril la suspensión de levaduras. Después de dejar reposar a temperatura ambiente durante media hora se colocaron discos de papel de filtro (Ø = 7 mm) impregnados con las diferentes disoluciones de EHAPAL y se incubó a 30 °C durante 72 h.

En la segunda variante se empleó el método de placa vertida según Pérez y col.¹⁰ con modificaciones mínimas.

El medio de cultivo (ADS) fue vertido en la placa previa inoculación con la suspensión de levaduras para obtener una altura de 4 mm. Una vez solidificado el agar, se perforaron pozos de 5 mm de diámetro y se descargaron 20 µL de cada dilución de EHAPAL en ellos. Después de media hora a temperatura ambiente, las placas se incubaron a 30 °C durante 72 h.

En ambos casos, se consideró actividad inhibitoria del extracto ante la presencia de una zona de inhibición microbiana alrededor del disco o pozo.¹¹

En la prueba de dilución en caldo, el medio de cultivo (caldo dextrosa de Sabouraud) + EHAPAL a las distintas concentraciones, se dispuso en tubos 100 X 13 con tapa de rosca estériles. Cada cepa fue inoculada en una batería de tubos con medio + extracto a concentraciones desde 0 hasta 10 %. Una vez realizada la siembra, los tubos se mantuvieron en incubación a 30 °C. Transcurridas 72 h, se aplicó agitación vigorosa a cada tubo y se realizaron diluciones 1/10, 1/100 y 1/1 000 en agua destilada estéril. De cada una de ellas, se transfirieron 10 µL a placas con ADS las que se mantuvieron 72 h a 30 °C con observaciones mediciones diarias. Con ayuda de un visor de aumento (Gallenkamp), se realizó el conteo de unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL) de cada cepa frente a cada dilución del extracto empleado.

RESULTADOS

Mediante el empleo del método de dilución en caldo, se pudo constatar que EHAPAL al 0,5 y 2,5 % solo produjeron inhibición débil o nula del crecimiento de las cepas estudiadas. La presencia del extracto al 5 % fue capaz de inhibir en al menos la mitad, el crecimiento de *C. parapsilosis*, *S. cerevisiae*, *R. mucilaginosa* y *C. grubii*, las cuales no fueron capaces de crecer en lo absoluto a concentraciones mayores. Para las cepas de *C. albicans* ATCC 64548 y *T. asahii* se alcanzó la CIM₅₀ con EHAPAL al 7,5 %, mientras que para *C. albicans* ATCC 64550, *C. glabrata* y *C. krusei* fue necesario un 10 %. Estos resultados fueron más fáciles de apreciar en el conteo de las UFC a las 48 h de incubación empleando la dilución 1/1 000 (Tabla 1).

No se observaron halos de inhibición en ninguna de las variantes del método de difusión en agar, por lo que este no resultó útil en la evaluación del efecto antifúngico del extracto.

DISCUSIÓN

El riesgo de padecer infecciones micóticas oportunistas ha experimentado un dramático incremento, especialmente, en aquellos pacientes con algún grado de compromiso del sistema inmune.¹ Esta situación se ha tornado aún más alarmante con la aparición de la pandemia del SIDA, siendo las más frecuentes la candidiasis, la neumocistosis, la criptococosis y la histoplasmosis sin dejar de destacar el amplio espectro de agentes fúngicos hasta ahora considerados inocuos y a los cuales se les ha responsabilizado de cuadros infecciosos muchas veces fatales.^{1,2} Por otra parte, a pesar de los avances alcanzados en el tratamiento específico, aún quedan muchos problemas por resolverse; por ejemplo, el empleo de la anfotericina B se encuentra limitado debido a su elevada nefrotoxicidad, en tanto que el uso de los azoles tales como el fluconazol, el ketoconazol y el itraconazol ha dado como resultado la emergencia de cepas resistentes.²

El efecto antimicótico de algunas plantas ha sido objeto de interés de algunos investigadores que basados en reportes etnomédicos han confirmado dicha acción

en diferentes hongos.⁶ Los más estudiados han sido el aceite del árbol del té y de la naranja agria,⁶ así como los extractos de *Solanum*,⁶ *Alpinia galange*,¹² *Noesenbergia pendurete*,¹² *Zingiber officinalis*,¹³ *Juglans cinérea*,¹³ *Origanum manjorana* y *Plantado lanceolada* Hook.¹⁴

La actividad antifúngica de *Petiveria alliacea* L. también ha sido estudiada por algunos investigadores. Martínez y cols. en 2003 reportaron ausencia de actividad antimicrobiana al estimar los porcentajes de inhibición relativa frente a *C. albicans* empleando el método de difusión en agar.⁷ Cáceres y col. evaluaron su acción frente a *Epidermophyton floccosum*, *Microsporium canis*, *Microsporium gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum* al realizar un estudio comparativo de plantas nativas de Guatemala.¹⁵⁻¹⁷ Más recientemente, Alves Silva y col. encontraron una baja proporción de esporas germinadas de *Colletotrichum gloeosporides* después del tratamiento con el extracto de *Petiveria Alliacea* L.¹⁴ mientras que Benavides y col. emplearon cepas mutantes de *S. cerevisiae*, *Cladosporium cladosporioides* y *C. sphaerospermum* para demostrar el efecto antifúngico de polisulfuros de *Petiveria alliacea* L.¹⁸ No obstante, los resultados han sido muy variables, lo que pudiera deberse, en buena medida, a la sensibilidad de las diferentes cepas estudiadas frente a los compuestos que se proponen como responsables de la acción antifúngica, a la pro-

porción en que se encuentran los principios activos en los extractos o a los diferentes métodos empleados en la preparación de estos.

Por otro lado, esta variabilidad también pudiera obedecer a los métodos empleados para determinar la actividad antifúngica. Según Cáceres y cols. los mejores resultados se obtienen con aquellos métodos en los cuales el extracto está más en contacto con la cepa estudiada,¹⁵ lo que sugiere la posibilidad de una pobre difusión del producto activo a través del agar. En este trabajo, la inhibición del crecimiento empleando métodos de difusión en agar para cada una de las cepas fue nulo, lo que motivó la realización del experimento mediante dilución en caldo según las condiciones antes descritas y con el cual se logró observar claramente el efecto antifúngico de *Petiveria alliacea* L. Esta experiencia sugiere la necesidad de repetir los estudios empleando este último método con especies que hayan tenido poca o ninguna inhibición.

CONCLUSIONES

Con este trabajo, se confirma el efecto antifúngico del EHAPAL en *C. albicans* y se describe en otras especies patógenas para el hombre. Los resultados sugieren las potencialidades del extracto estudiado en el tratamiento de infecciones causadas por estos agentes. No obstante, se requieren otros ensayos que permitan comparar la

Tabla 1. Unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL) obtenidas a partir de la dilución 1/1 000 a las 48 h de incubación de las cepas estudiadas después de ser enfrentadas a las diferentes concentraciones del extracto.

Especies de levaduras	UFC/mL					
	Concentración final de EHAPAL en el medio de cultivo					
	(%)					
	0 ^a	0,5	2,5	5	7,5	10
<i>C. albicans</i>						
ATCC 64548	8 • 10 ⁶	6,5 • 10 ⁶	6,5 • 10 ⁶	7 • 10 ⁶	4 • 10 ⁶	0
<i>C. albicans</i>						
ATCC 64550	4 • 10 ⁶	4 • 10 ⁶	3,7 • 10 ⁶	3,8 • 10 ⁶	4 • 10 ⁶	0
<i>C. krusei</i>						
ATCC 625	6 • 10 ⁶	6,5 • 10 ⁶	6,3 • 10 ⁶	6,4 • 10 ⁶	6 • 10 ⁶	1 • 10 ⁶
<i>C. glabrata</i>						
ATCC 90030	8 • 10 ⁷	8 • 10 ⁷	7 • 10 ⁷	6,8 • 10 ⁷	6,7 • 10 ⁷	4 • 10 ⁷
<i>C. lusitaniae</i>						
ATCC 200951	5 • 10 ⁶	5,1 • 10 ⁶	5,6 • 10 ⁶	3,3 • 10 ⁶	0	0
<i>C. parapsilosis</i>						
ATCC 22019	7,6 • 10 ⁷	7 • 10 ⁷	7 • 10 ⁷	2,3 • 10 ⁷	0	0
<i>S. cerevisiae</i>						
ATCC 9763	7,1 • 10 ⁶	4,4 • 10 ⁶	7 • 10 ⁶	2 • 10 ⁶	0	0
<i>R. musilaginosa</i>						
LMIPK0282	6,5 • 10 ⁶	6,4 • 10 ⁶	4,4 • 10 ⁶	3,2 • 10 ⁶	0	0
<i>T. asahii</i>						
LMIPK 0293	3,8 • 10 ⁶	3,1 • 10 ⁶	3 • 10 ⁶	3 • 10 ⁶	1 • 10 ⁶	0
<i>C. grubii</i>						
LMIPK 0291	2 • 10 ⁶	1,9 • 10 ⁶	1,2 • 10 ⁶	1 • 10 ⁶	0	0
<i>C. grubii</i>						
LMIPK 0292	3 • 10 ⁶	2 • 10 ⁶	2 • 10 ⁶	1,5 • 10 ⁶	0	0

^a Control de crecimiento en medio libre de extracto.

actividad de sus principales componentes con los antimicóticos comerciales.

AGRADECIMIENTOS

A los doctores Gerardo F. Martínez Machín y Carlos M. Fernández Andreu del Laboratorio de Micología del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" por sus valiosos aportes a la realización de este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Zhang JD, Xu Z, Cao YB, Chen HS, Yan L, An MM, *et al.* Antifungal activities and action mechanisms of compounds from *Tribulus terrestris* L. *J Ethnopharmacol.* 2006;103:76-84.
2. Picazo JJ, Candel FJ, González-Romo F. Update on fungal infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;32:s79-s81.
3. Chapman and Hall. *Dictionary of Natural Products on CDROM 2007.* Chapman and Hall/CRC: Boca Ratón, FL: 2007.
4. Kim S, Kubec R, Musah RA. Antibacterial and antifungal activity of sulfur-containing compounds from *Petiveria alliacea* L. *J Ethnopharmacol.* 2006;104:188-92.
5. Lemus Z, García ME, Batista A, Guardia O, Alfonso A. La tableta de anamú: un medicamento inmunoestimulantes. *MEDISAN.* 2004;8:57-64.
6. Martin KW, Ernst E. Herbal medicines for treatment of fungal infections: a systematic review of controlled clinical trials. *Mycoses.* 2004;47:87-92.
7. Martínez Pilar MM, Bacaraldo Barrera N, Santos Obregón M y Nieves Guzmán D. Estudio farmacognóstico, fitoquímico y microbiológico de la *Petiveria alliacea* Lin 1998. *Gaceta Médica Espirituana.* 2003;5(1). Disponible en: [http://bvs.sld.cu/revistas/gme/pub/vol.5.\(1\)_02/p2.html](http://bvs.sld.cu/revistas/gme/pub/vol.5.(1)_02/p2.html)
8. Jiménez CA, Rojas NM, López AM. Contribución a la evaluación biológica de plantas cubanas. *Rev Cub Med Trop.* 1979;31:21-7.
9. Roman K, Rabi A. Cysteine sulfoxide derivatives in *Petiveria alliacea*. *Phytochemistry.* 2001;58:981-5.
10. Pérez C, Pauli M, Bazevque P. An antibiotic assay by the agar well diffusion method. *Acta Biologiae et Medicine Experimentalis.* 1990;15:113-5.
11. Owen RJ, Palombo EA. Anti-listerial activity of ethanolic extract of medicinal plants, *Eremophila alternifolia* and *Eremophila duttonii* in food homogenates and milk. *Food Control.* 2007;18:387-90.
12. Phongpaicit S, Subhadhirasakul S, Wattanapiromsakut C. Antifungal activities of extracts from Thai medicinal plants against opportunistic fungal pathogens associated with aids patients. *Mycoses.* 2005;48:333-8.
13. Ficker CE, Arnason JT, Vindas PS, Alvarez LP, Akpagana K, Gbéassor M, *et al.* Inhibition of human pathogenic fungi by ethnobotanically selected plant extract. *Mycoses.* 2003;46:29-37.
14. Alves P, Ferreira D, Robson do Prado N. Evaluation of the antifungal activity by plants extracts against *Colletotrichum gloeosporides* PENZ. *Ciênc Agrotec Lavras.* 2008;32:420-8.
15. Cáceres A, Figueroa L, Taracena AM, Samayoa B. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infection. II. Screening of antimicrobial activity of 44 plant extracts. *J Ethnopharmacol.* 1991;31:263-76.
16. Cáceres A, Girón LM, Alvarado SR, y Torres MF. Screening of antimicrobial activity of plants popularly used in Guatemala for the treatment of dermatomucosal diseases. *J Ethnopharmacol.* 1987;20:223-7.
17. Cáceres A, López B, González S, Berger I, Tada I, Maki J. Plants used in Guatemala for treatment of protozoal infection. Screening of activity to bacteria, fungi, and American trypanosomes of 13 native plants. *J Ethnopharmacol.* 1998;62:195-202.
18. Benevides PJ, Young MC, Giesbrecht AM, Roque NF, Bolzani vs. Antifungal polysulphides from *Petiveria alliacea* L. *Phytochemistry.* 2001;57:743-7.