

Actividad antifúngica *in vitro* de extractos crudos de *Piper tuberculatum*

In vitro antifungal activity of crude extracts of *Piper tuberculatum*

Zahyda G.F. Palacios¹, Guillermo E. Delgado¹, Mario C. Moreno¹, Massuo J. Kato²
y Consuelo Rojas^{1*}

¹ Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Ciudad Universitaria, Juan XXIII No 391, Lambayeque, Perú. Correspondeencia a Consuelo Rojas E-mail: crojas2002@yahoo.es

² Instituto de Química, Universidade de São Paulo, C.P. 26077, 05513-970, São Paulo, Brasil.

Resumen

En la medicina tradicional Peruana *Piper tuberculatum* Jacq. (Piperaceae) es utilizado en humanos y animales domésticos como antiinflamatorio y desinfectante de heridas. *Piper tuberculatum* contiene las amidas isobutílicas, pirrolidina, dihidropiridona y piperidina. El objetivo de este trabajo fue investigar la actividad antifúngica de los extractos crudos de inflorescencias, hojas y tallos de plantas silvestres, obtenidos con CH₂Cl₂:MeOH (2:1), EtOH y decocción y de plantas *in vitro* obtenido con CH₂Cl₂:MeOH (2:1). Los extractos crudos exhibieron actividad antifúngica sobre *Trichophyton rubrum*, *Microsporium canis* y *M. gypseum*. La concentración inhibitoria mínima (CIM) observada con los extractos CH₂Cl₂:MeOH (2:1), EtOH y decocción, sobre *Trichophyton rubrum*, *Microsporium canis* y *M. gypseum* fue 0,1 mg/mL para inflorescencias y hojas, y 0,1 a 0,5 mg/mL para tallos. En plantas *in vitro* la inhibición en el crecimiento de *T. rubrum* y *M. canis* fue 100% en 0,5 mg/mL y para *M. gypseum* fue 95% en 1,5 mg/mL de concentración.

Palabras claves: cultivo de tejidos, extracto CH₂Cl₂:MeOH, *Microsporium canis*, *M. gypseum*, *Trichophyton rubrum*.

Abstract

Piper tuberculatum Jacq. (Piperaceae) is used in traditional Peruvian medicine as anti-inflammatory and disinfectant of wounds in humans and domestic animals. This species contains amides bearing isobutyl, pyrrolidine, dihydropyridone and piperidine moieties. The aim of this work was to investigate antifungal activity of crude extracts from the spikes, leaves and stems of wild plants extracted with CH₂Cl₂:MeOH (2:1), EtOH, decoction, and *in vitro* plants extracted with CH₂Cl₂:MeOH (2:1). The crude extracts showed antifungal activity on *Trichophyton rubrum*, *Microsporium canis* and *M. gypseum*. The minimum inhibitory concentration (MIC) observed with CH₂Cl₂:MeOH (2:1), EtOH and decoctions extracts against *T. rubrum*, *M. canis* and *M. gypseum* was 0,1 mg/mL for spikes and leaves, and 0,1 to 0,5 mg/mL for stems. The inhibition of growth using *in vitro* plants on *T. rubrum* and *M. canis* was 100% in 0,5 mg/mL, and 95% on *M. gypseum* 95% using 1,5 mg/mL of concentration.

Keywords: CH₂Cl₂:MeOH extract, *Microsporium canis*, *M. gypseum*, tissue culture, *Trichophyton rubrum*.

Presentado: 27/08/2009
Aceptado: 21/10/2009
Publicado online: 12/01/2010

Introducción

Ha sido ampliamente reconocido que las plantas constituyen un inestimable reservorio de metabolitos secundarios biológicamente activos en el control de diversas enfermedades (Cos et al. 2008; Gibbons 2008) y las provocadas por hongos en particular (Grayer & Harborne 1994; Osburn 1996). Los efectos secundarios adversos de algunas drogas, la resistencia frecuentemente inducida y los elevados costos en el tratamiento (Davicino et al. 2007), han estimulado y orientado muy intensamente la investigación en la búsqueda y utilización de sustancias puras o extractos crudos de plantas en el control de diversas enfermedades fúngicas (Dabur et al. 2004; Fenner et al. 2005; Zhang et al. 2005). Así tenemos que el extracto crudo de varias especies utilizadas en la medicina tradicional peruana como *Cestrum auriculatum*, *Iryanthera lancifolia* y *Wigandia urens*, entre otras, mostraron actividad inhibitoria sobre *Trichophyton mentagrophytes* y *Microsporium gypseum*, entre otros patógenos (Rojas et al. 2003); el aceite esencial, constituido por varios compuestos como β-Eudesmol, espatulenol e isocarofilene, entre otros, y extractos crudos de *Cordia curassavica*, mostraron una significativa actividad antibacteriana y antifúngica (Hernández et al. 2007) y el aceite esencial de hojas de *Mintostachys mollis*, donde fueron identificados los terpenoides pulegona, mentona, limoneno y mirceno, mostró una significativa actividad contra *Candida albicans*, *T. mentagrophytes* y *Microsporium canis* (Cano et al. 2008).

En especies de *Piper* como *P. tuberculatum*, *P. hispidum* y *P. arboreum*, han sido aisladas las amidas piperamina, piplartina, piperina, 5,6-hidropiperlonguminina, arboreumina, fagaramida,

entre otras (Navickiene et al. 2000; Silva et al. 2002) y en *P. crassinervium*, fueron aisladas varias flavononas e hidroquinonas preniladas (Danelutte et al. 2003), todas ellas con actividad antifúngica sobre *Cladosporium cladosporioides* y *C. sphaerospermum* en ensayos por autografía directa; en *P. regnellii* el extracto crudo y las neolignanonas eupomatenoide-3 y eupomatenoide-5 mostraron una fuerte actividad sobre *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *M. canis* y *M. gypseum* (Koroishi et al. 2008) y varias especies de *Candida* (Pessini et al. 2005).

Estudios químicos realizados en especies de la familia Piperaceae del Brasil han revelado la ocurrencia de diversos productos naturales fisiológicamente activos tales como alcaloides, amidas, pironas, dihidrochalconas, flavonoides, fenilpropanoides, lignanos y neolignanonas (Orjala et al. 1994; Martins et al. 2000; Danelutte et al. 2003). Varias amidas isobutílicas, pirrolidina, dihidropiridona y piperidina (Alécio et al. 1998; Navickiene et al. 2000; Silva et al. 2002) han sido determinadas. Estas amidas han generado interés debido a sus potentes propiedades insecticidas y antifúngicas (Miyakado et al. 1989; Alécio et al. 1998; Navickiene et al. 2000; Silva et al. 2002; Soberón et al. 2006).

En trabajos previos (Navickiene et al. 1999; 2000), se ha reportado el aislamiento, la estructura química y la actividad antifúngica de varias amidas como la piplartina, piperamina, piperina, pelitorina, entre otras, aisladas de semillas y hojas de *Piper tuberculatum*. Los ensayos se realizaron con los hongos *Cladosporium sphaerospermum* (Navickiene et al. 2000) y *C. sphaerospermum* y *C. cladosporioides* (Silva et al. 2002), utilizando el método de bioautografía directa (Homans & Fuchs 1970).

Por otro lado, la correcta identificación taxonómica de *P. tuberculatum* Jacq. (Trelease 1936; Yuncker 1973) ha sido motivo de cierta controversia puesto que, recientemente, ha sido sinonimizada como *Piper arboreum* subsp. *tuberculatum* (Jacq.) Tebbs stat. nov. (Tebbs 1989), en base a algunas diferencias morfológicas con *P. arboreum* subsp. *arboreum* Aublet; sin embargo, estudios fitoquímicos comparativos han revelado que amidas extraídas de hojas de *P. arboreum* son diferentes a las extraídas de *P. tuberculatum* (Navickiene et al., 2002), por lo que sugerimos que *P. tuberculatum* debe ser considerada una especie distinta, con una amplia distribución desde México a Paraguay, reportándose para el Perú en las regiones de Amazonas, Huánuco, Lambayeque, Loreto, San Martín, Tumbes y Ucayali (Brako & Zarucchi, 1993).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad antifúngica de los extractos crudos de diclorometano-metanol ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$) (2:1), etanol (EtOH) y decocciones, de inflorescencias, hojas y tallos de plantas silvestres y plantas *in vitro* de *Piper tuberculatum* ("matico" o "cordoncillo") sobre *Trichophyton rubrum*, *Microsporium canis* y *M. gypseum*.

Materiales y métodos

Material vegetal. Inflorescencias con semillas maduras, hojas y tallos de *P. tuberculatum* Jacq. fueron colectadas en el mes de noviembre del 2003 en el Río Cumbil (Lambayeque, Perú); la especie fue identificada por el Dr. Guillermo E. Delgado de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo (UNPRG) de Lambayeque, Perú. Una muestra herborizada fue depositada en el Herbarium Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque. Las plantas *in vitro* fueron obtenidas de semillas germinadas *in vitro* y micropropagadas en tal condición por cultivo de ápices y segmentos nodales.

Microorganismos. Los microorganismos utilizados en el ensayo antifúngico, *T. rubrum*, *M. canis* y *M. gypseum* fueron proporcionados por el Laboratorio de Micología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Laboratorio de Micología de la Región II de Salud, MINSA y Laboratorio de Micología del Instituto Nacional de Salud del Perú. Las cepas fueron conservadas en medio de cultivo Agar Sabouraud Glucosado (ASG) 2% a 4 °C de temperatura y repicadas periódicamente.

Obtención de los extractos. En el caso de plantas silvestres, 45 g de inflorescencias, hojas y tallos, respectivamente, fueron secados en estufa a 40 °C durante una semana, reducidos a polvo fino y sometidos a extracción por 3 veces consecutivas durante 24 h y a temperatura ambiente; los solventes de extracción utilizados fueron diclorometano-metanol ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$) (2:1) y alcohol etílico (EtOH). En el caso de plantas micropropagadas *in vitro* se tomó 9 g de muestra la que fue sometida al mismo procedimiento anteriormente descrito, pero utilizando únicamente $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (2:1), como solvente de extracción; luego el extracto se separó por evaporación a presión reducida y 45 °C de temperatura. En las decocciones se utilizaron 10 g de polvo seco de inflorescencias, hojas y tallos de plantas silvestres, suplementándose 100 ml de agua destilada hirviendo y manteniéndose en ebullición durante 10 min; luego fueron filtrados en condiciones de asepsia total.

Preparación y estandarización del inóculo. Con la finalidad de obtener un número adecuado de esporas las especies en estudio fueron sembradas en medio de cultivo ASG 2% y una vez alcanzada la esporulación fueron lavadas con solución salina

fisiológica esterilizada de manera que el sobrenadante pudiera estandarizarse por turbidometría al tubo N° 0,5 del nefelómetro de Mc Farland, que corresponde a una concentración equivalente a 1×10^8 gérmes/mL, para conseguir en todos los ensayos una biomasa uniforme.

Actividad antifúngica. Los extractos obtenidos con $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (2:1) y EtOH y por decocción, fueron preparados en cuatro concentraciones diferentes (0,1; 0,5; 1,0 y 1,5 mg/mL) de acuerdo al método de dilución en agar (Navarro-García et al. 2003). En tal sentido, la solución stock fue preparada en proporción 10:1 entre la masa del extracto y la solución MeOH-agua, obteniendo una concentración equivalente a 10 mg/mL. Para el ensayo de actividad antifúngica se tomó 0,1; 0,5; 1,0 y 1,5 mL de esta solución stock suplementándose con 9,9; 9,5; 9,0 y 8,5 mL de medio de cultivo ASG, respectivamente, que luego fue aplicada a placas de Petri esterilizadas de 100x15 mm. Las placas de Petri fueron inoculadas con suspensión de esporas estandarizada a 0,1 mL, diseminadas con espátula de Drigalski e incubadas por 7-10 días en oscuridad en cámara húmeda a 25 °C de temperatura. Cada tratamiento fue repetido 3 veces y el experimento general dos veces. Como control negativo se emplearon placas de Petri sin extractos y para descartar el efecto de la solución MeOH-agua el tratamiento control fue suplementado con 1,5 mL de dicha solución.

Se estableció la actividad antifúngica determinando la concentración inhibitoria mínima (CIM), definida como la concentración más baja de extracto capaz de inhibir el crecimiento visible en el agar (Navarro-García et al., 2003).

Análisis estadístico. Se utilizó el diseño experimental con estímulo creciente donde los grupos experimentales fueron las especies fúngicas y el estímulo creciente las concentraciones de extractos. Los datos expresados en porcentajes de crecimiento de las especies fúngicas fueron transformados a $\sqrt{x+1}$ para una distribución normal de los errores experimentales. Se realizaron análisis de varianza para cada especie fúngica así como las pruebas de comparaciones múltiples de Tukey con un nivel de significación de 0,05% aplicando un diseño con arreglo factorial 4x3 (4 concentraciones, 3 estructuras vegetales) y 3 repeticiones para cada tipo de extracto.

Micropropagación de plantas. El cultivo *in vitro* fue iniciado a partir de explantes obtenidos de semillas asépticas. Las semillas (50 por frasco) fueron desinfectadas con etanol 70% (v/v) durante 1 min seguido con hipoclorito de sodio 2,5% (w/v) durante 20 min. Luego fueron lavadas por tres veces consecutivas con agua destilada esterilizada. Las semillas flotantes fueron descartadas y alrededor de 3-10 de estas fueron transferidas a tubos de ensayo de 120x16 mm conteniendo el medio de cultivo con las sales minerales MS (Murashige & Skoog 1962), sacarosa 2% y agar 0,8%. Ápices caulinares y segmentos nodales, de un cm de longitud conteniendo una yema lateral, tomados de plantas germinadas *in vitro* de tres meses de edad, fueron usados como fuente de explantes. Las sales minerales MS, suplementadas con varias concentraciones de ácido indol-3-acético (AIA), ácido giberélico (AG_3), 6-benzilaminopurina (BAP) y sacarosa 3%, fueron utilizadas en el medio de cultivo inicial y el mantenimiento de los cultivos se realizó cada 6 meses transfiriéndolos a medio de cultivo fresco de la misma formulación. En todos los cultivos, las sales minerales MS fueron suplementadas con m-inositol 100 mg/L y tiamina.HCl 1 mg/L, ajustándose el pH

Tabla 1. Inhibición en el crecimiento de *Trichophyton rubrum* por efecto de varias concentraciones de extractos de inflorescencias, hojas y tallos de *Piper tuberculatum* obtenidos con CH₂Cl₂:MeOH (2:1), EtOH y decocción.

Partes de la planta utilizadas	Concentración (mg/mL)	Inhibición (%)		
		CH ₂ Cl ₂ :MeOH ^a	EtOH ^b	Decocción
Inflorescencia	0,1	100	88,3	85
	0,5	100	100	100
	1,0	100	100	100
	1,5	100	100	100
Hojas	0,1	63,3	53,3	5
	0,5	100	100	63,3
	1,0	100	100	96,7
	1,5	100	100	100
Tallos	0,1	8,3	10	5
	0,5	100	20	6,7
	1,0	100	61,7	6,7
	1,5	100	98,3	6,7

a: CH₂Cl₂ = diclorometano, MeOH = metanol

b: EtOH = etanol

5,7 ± 0,1, con NaOH o HCl 0,5 N, gelificándose con "Phytigel" 0,2% y dispensándose en tubos de ensayo de 150x25 mm antes de la esterilización en autoclave a 121 °C de temperatura y 15 lbs/pulg² de presión durante 20 min. Todos los cultivos fueron incubados en 24–28 °C, fotoperiodo de 16–8 h de luz/oscuridad proporcionada por tubos de fluorescentes de color blanco con una irradiancia de 5 μmol m⁻² s⁻¹, para la germinación de semillas y 30 μmol m⁻² s⁻¹ para la micropropagación.

Resultados y discusión

El rendimiento de extractos de 45 g de materia seca con CH₂Cl₂:MeOH (2:1) de inflorescencias, hojas y tallos, de plantas de campo de *P. tuberculatum* fue 2,7 (6,0%); 2,0 (4,4%) y 0,7 (1,6%) g, respectivamente, y con EtOH fue 5,3 (11,8%); 2,3 (5,0%) y 0,9 (2,1%) g, respectivamente, en tanto que el rendimiento de 9,0 g de extracto de plantas micropropagadas *in vitro* con CH₂Cl₂:MeOH (2:1) fue 0,6 g (6,3%).

En el caso de *T. rubrum* los extractos de CH₂Cl₂:MeOH (2:1) de todas las partes de las plantas utilizadas (inflorescencias

Tabla 2. Inhibición en el crecimiento de *Microsporum canis* por efecto de varias concentraciones de extractos de inflorescencias, hojas y tallos de *Piper tuberculatum* obtenidos con CH₂Cl₂:MeOH (2:1), EtOH y decocción.

Partes de la planta utilizadas	Concentración (mg/mL)	Inhibición (%)		
		CH ₂ Cl ₂ :MeOH ^a	EtOH ^b	Decocción
Inflorescencia	0,1	91,7	100	91,7
	0,5	100	100	100
	1,0	100	100	100
	1,5	100	100	100
Hojas	0,1	68,3	70	25
	0,5	100	100	88,3
	1,0	100	100	96,7
	1,5	100	100	100
Tallos	0,1	28,3	55	30
	0,5	98,3	99,3	90
	1,0	100	100	96,7
	1,5	100	100	100

a: CH₂Cl₂ = diclorometano, MeOH = metanol

b: EtOH = etanol

Tabla 3. Inhibición en el crecimiento de *Microsporum gypseum* por efecto de varias concentraciones de extractos de inflorescencias, hojas y tallos de *Piper tuberculatum* obtenidos con CH₂Cl₂:MeOH (2:1), EtOH y decocción.

Partes de la planta utilizadas	Concentración (mg/mL)	Inhibición (%)		
		CH ₂ Cl ₂ :MeOH ^a	EtOH ^b	Decocción
Inflorescencia	0,1	100	100	100
	0,5	100	100	100
	1,0	100	100	100
	1,5	100	100	100
Hojas	0,1	38,3	76,7	6,7
	0,5	100	100	95
	1,0	100	100	100
	1,5	100	100	100
Tallos	0,1	18,3	8,3	5
	0,5	100	91,7	13,3
	1,0	100	100	13,3
	1,5	100	100	15

a: CH₂Cl₂ = diclorometano, MeOH = metanol

b: EtOH = etanol

0,1–1,5 mg/mL y hojas y tallos 0,5–1,0 mg/mL), fueron altamente activos, inhibiendo 100% el crecimiento del hongo; un efecto inhibitorio similar fue, también, observado con extractos de EtOH de inflorescencias y hojas (0,5–1,5 mg/mL), en tanto que únicamente las decocciones de inflorescencias (0,5–1,5 mg/mL) y hojas (1,5 mg/mL) permitieron alcanzar 100% de inhibición en el crecimiento del hongo (Tabla 1).

Referente a *M. canis*, solamente las más altas concentraciones de extractos de CH₂Cl₂:MeOH (2:1) de inflorescencias y hojas (0,5–1,5 mg/mL) y tallos (1,0–1,5 mg/mL) mostraron 100% de inhibición en el crecimiento del hongo; un efecto inhibitorio similar fue observado con extractos de EtOH de inflorescencias (0,1–1,5 mg/mL), hojas (0,5–1,5 mg/mL) y tallos (1,0–1,5 mg/mL), en tanto que únicamente las decocciones de inflorescencias (0,5–1,5 mg/mL), hojas y tallos (1,5 mg/mL) permitieron alcanzar 100% de inhibición en el crecimiento del hongo (Tabla 2).

Sobre *M. gypseum*, solamente las mayores concentraciones de extractos de CH₂Cl₂:MeOH (2:1) de inflorescencias (0,1–1,5 mg/mL), hojas (0,5–1,5 mg/mL) y tallos (0,5–1,5 mg/mL), mostraron 100% de inhibición en el crecimiento del hongo; un efecto inhibitorio similar fue observado con extractos de EtOH de inflorescencias (0,1–1,5 mg/mL), hojas (0,5–1,5 mg/mL) y tallos (1,0–1,5 mg/mL), en tanto que únicamente las decocciones de inflorescencias (0,1–1,5 mg/mL), hojas y tallos (1,5 mg/mL) permitieron alcanzar 100% de inhibición en el crecimiento del hongo (Tabla 3). La concentración inhibitoria mínima (CIM), observada con los tres tipos de extractos ensayados, contra *T. rubrum*, *M. canis* y *M. gypseum*, fue 0,1 mg/mL, para inflorescencias y hojas, y 0,1–0,5 mg/mL para tallos (Tabla 4). En los tratamientos control el crecimiento de los dermatofitos fue 100%.

Todas las especies de dermatofitos estudiados resultaron altamente susceptibles a la actividad inhibitoria de los tipos de extractos ensayados. Los extractos de CH₂Cl₂:MeOH (2:1) exhibieron una mayor actividad antifúngica que los extractos de EtOH y estos que los obtenidos por decocción. Asimismo, los extractos de inflorescencias fueron más eficientes que los de hojas y estos que los obtenidos de tallos, en tanto que las

Tabla 4. Concentración inhibitoria mínima (CIM) de extractos CH_2Cl_2 :MeOH^a (2:1), EtOH^b y decocción de *Piper tuberculatum* sobre *Trichophyton rubrum*, *Microsporium canis* y *Microsporium gypseum*. Valores en mg/mL.

	CH_2Cl_2 :MeOH	EtOH	Decocción
<i>Trichophyton rubrum</i>			
Inflorescencias	0,1	0,1	0,1
Hojas	0,1	0,1	0,1
Tallos	0,5	0,5	-
<i>Microsporium canis</i>			
Inflorescencias	0,1	0,1	0,1
Hojas	0,1	0,1	0,1
Tallos	0,1	0,1	0,1
<i>Microsporium gypseum</i>			
Inflorescencias	0,1	0,1	0,1
Hojas	0,1	0,1	0,5
Tallos	0,5	0,5	-

a: CH_2Cl_2 = diclorometano, MeOH = metanol

b: EtOH = etanol

Tabla 5. Prueba de significación de Tukey para *Trichophyton rubrum*, *Microsporium canis* y *Microsporium gypseum* respecto a los factores concentración del extracto [CH_2Cl_2 :MeOH (2:1), EtOH y decocción] y partes de la planta (inflorescencias, hojas y tallos) de *Piper tuberculatum*^{a,b,c}.

Concentración (mg/mL)	Inhibición (%)		
	CH_2Cl_2 :MeOH	EtOH	Decocción
<i>Trichophyton rubrum</i>			
1,5	100,0 a	99,4 a	68,9 a
1,0	100,0 a	87,2 b	67,8 a
0,5	100,0 a	73,3 c	56,7 b
0,1	57,2 b	50,6 d	31,7 c
<i>Microsporium canis</i>			
1,5	100,0 a	100,0 a	100,0 a
1,0	100,0 a	100,0 a	97,2 a
0,5	99,4 a	99,4 a	92,8 b
0,1	62,8 b	75,0 b	48,9 c
<i>Microsporium gypseum</i>			
1,5	100,0 a	100,0 a	71,7 a
1,0	100,0 a	100,0 a	69,4 a
0,5	100,0 a	97,2 a	42,2 b
0,1	52,2 b	61,7 b	37,2 b
Partes - planta	CH_2Cl_2 :MeOH	EtOH	Decocción
<i>Trichophyton rubrum</i>			
Inflorescencia	100,0 a	97,0 a	96,2 a
Hojas	90,8 b	88,3 b	66,2 b
Tallos	77,0 c	47,0 c	6,2 c
<i>Microsporium canis</i>			
Inflorescencia	100,0 a	97,9 a	97,9 a
Hojas	92,5 b	92,0 b	78,7 b
Tallos	88,3 c	81,7 c	77,5 b
<i>Microsporium gypseum</i>			
Inflorescencia	100,0 a	100,0 a	100,0 a
Hojas	84,6 b	94,2 b	53,3 b
Tallos	79,6 c	75,0 c	11,3 c

a: Valores con la misma letra son significativamente iguales.

b: CH_2Cl_2 = diclorometano, MeOH = metanol

c: EtOH = etanol

concentraciones de 0,5 a 1,5 mg/mL mostraron, también, la más alta actividad biológica contra *T. rubrum*, *M. canis* y *M. gypseum* (Tabla 5).

Varios autores han reportado la actividad antifúngica de diversos extractos de plantas sobre diversos hongos, resultando relativamente recientes los trabajos referidos a los dermatofitos *Trichophyton* y *Microsporium*. Así tenemos que para *T. mentagrophytes* la zona de inhibición en el crecimiento fue entre 19–31 mm con 25 mg/mL del extracto etanólico de hojas de *Cestrum auriculatum*, *Iryanthera lancifolia*, *Ophryosporus peruvianus* y *Wigandia urens* y para *M. gypseum* fue 21 mm con *C. auriculatum* (Rojas et al. 2003). Diferentes especies de *Trichophyton*, entre ellas, *T. rubrum* resultaron con una inhibición en el crecimiento entre + a +++, con una escala máxima de +++, utilizando extractos etanólico y acuoso de *Solanum nigrum*, *Aloe vera* y *Allium sativum* en diluciones de 1:10 a 1:500 de 100 mg/mL (Shamim et al. 2004). Asimismo, 0,1 mL (50 y 100% de concentración) y 5–10 $\mu\text{L}/10$ mL, de aceite esencial de *Mintostachys mollis*, con los métodos de agar en difusión y dilución en tubo, respectivamente, inhibieron 100% el crecimiento de *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans* y *M. canis* (Cano et al. 2008). También, el extracto etanólico de *Piper betle*, *Alpinia galanga* y *Allium ascalonicum* mostraron actividad antidermatofítica sobre *T. mentagrophytes*, *M. canis* y *M. gypseum*, destacando *P. betle* con una CI_{50} entre 110,4–119,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Trakranrungsi et al. 2008) y el extracto crudo hidroalcohólico y las neolignanas eupomatenoides-3 y eupomatenoides-5, de *Piper regnellii*, mostraron actividad antidermatofítica sobre *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *M. canis* con CL_{90} de 15,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y para *M. gypseum* con CL_{90} de 62,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Koroishi et al. 2008). Todos estos trabajos nos indican que el extracto crudo de varias especies vegetales exhibe una significativa actividad antifúngica sobre diversos dermatofitos, variando significativamente sus efectos en función de las concentraciones utilizadas, destacando las especies *P. betle* y *P. regnellii*, de origen asiático y americano, respectivamente.

Otros trabajos han reportado la ocurrencia de varias especies de *Microsporium* en animales en cautiverio (Levy et al. 2006) y silvestres (Araújo et al. 2008) pero sin proponer medidas de control. Por otro lado, la literatura consultada reporta apenas el trabajo de Davicino et al. (2007) utilizando decocciones de algunas plantas medicinales de Argentina mostrando actividad antifúngica sobre algunos microorganismos como *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae*. En nuestro trabajo, las decocciones de inflorescencias, y en menor proporción las de hojas, resultaron muy efectivas en la inhibición del crecimiento de las tres especies de dermatofitos ensayadas. Con certeza la obtención de extractos por decocción así como con EtOH abre la posibilidad de su utilización amplia por parte de las poblaciones rurales; en este último caso utilizando solventes caseros como el "yonque" o "cañazo", aguardiente obtenido artesanalmente de la caña de azúcar.

En relación a los extractos de otras especies de Piperaceae (*Piper* y *Peperomia*), trabajos previos han reportado que la cantidad mínima de amidas necesaria para inhibir el crecimiento de los hongos *Cladosporium sphaerospermum* en placas TLC fue determinada de 0,1 a 5 μg para *P. tuberculatum* y 5 μg para *P. hispidum* (Navickiene et al. 2000). Asimismo, la actividad antifúngica de amidas contra *C. sphaerospermum* y *C. cladosporioides* fue determinada de 0,1 a 10 μg para *P. arboreum* y

Tabla 6. Inhibición en el crecimiento de *Trichophyton rubrum*, *Microsporium canis* y *Microsporium gypseum* por varias concentraciones de extracto de CH₂Cl₂:MeOH (2:1) de plantas *in vitro* de *Piper tuberculatum*.

Concentración (mg/mL)	Inhibición (%)		
	<i>T. rubrum</i>	<i>M. canis</i>	<i>M. gypseum</i>
0,1	20	65	70
0,5	100	100	80
1,0	100	100	90
1,5	100	100	95

P. tuberculatum (Silva et al. 2002) y para ambas especies de hongos, las flavononas e hidroquinonas preniladas antifúngicas de *P. crassinervium* fue determinada de 1 a 10 µg (Danelutte et al. 2003). Relacionado a estos trabajos, derivados del ácido benzoico en especies de *Piper* y su actividad antifúngica contra *C. cladosporioides* y *C. sphaerospermum* ha sido también reportada (Lago et al. 2004). Recientemente, la actividad antifúngica de siete nuevos cromenes de *Peperomia villipetiola* ha sido determinada para ambos hongos, donde la cantidad mínima requerida para la inhibición en el crecimiento del hongo en placas TLC fue 100 µg (Malquichagua et al. 2005). En nuestro trabajo, la CIM contra *T. rubrum*, *M. canis* y *M. gypseum* fue 0,1 mg/mL o 100 µg/mL. La inhibición en el crecimiento del hongo sugiere que compuestos como la piperidina, dihidropiridona y amidas isobutílicas de *P. tuberculatum* son compuestos de elevada actividad antifúngica e incluso más potentes que los cromenes de *P. villipetiola*. *P. tuberculatum* biosintetiza amidas con geometría *cis* en su cadena lateral, lo cual es una característica muy rara en la naturaleza (Shah et al. 1986; Alécio et al. 1998). Con certeza, el análisis de estos datos nos lleva a entender que la concentración adecuada para mostrar un determinado efecto depende de la especie vegetal utilizada y el tipo de extracto, donde la actividad sobre los microorganismos no se deba a la acción de un único principio activo sino al efecto sinérgico de varios de ellos que en la planta se encuentran en proporción minoritaria (Leatemala & Isman 2004; Davicino et al. 2007)

Referente a los extractos de CH₂Cl₂:MeOH (2:1), obtenidos de plantas *in vitro*, la inhibición en el crecimiento fue 100% en concentraciones de 0,5 a 1,5 mg/mL pero solamente para *T. rubrum* y *M. canis*; para *M. gypseum* la inhibición en el crecimiento (70–95%) fue ligeramente inferior (Tabla 6). Estos resultados abren la posibilidad de biosintetizar a gran escala los compuestos antifúngicos de *P. tuberculatum* mediante el establecimiento de suspensiones celulares, tal como se viene realizando en varias especies de importancia medicinal (Yeoman & Yeoman 1996). En el caso de especies de *Piper*, en suspensiones celulares de *P. cernuum* fueron producidas las feniletilaminas dopamina y tiramina, y en *P. crassinervium* predominaron cuatro alkamidas, entre ellas la inédita 2,3,4-trimetoxi-*N*-metil-aristolactamano, en tanto, que en plantas adultas fenilpropanoides y ácidos benzoico prenilados, respectivamente, fueron los mayores compuestos detectados (Danelutte et al. 2005; Kato & Furlán 2007). Adicionalmente, utilizando el método HPLC en fase reversa fueron detectadas las amidas antifúngicas e insecticidas dihidropiartina, piplartina, Δ^{α,β}-dihidropiperina y pelitorina en plantas *in vitro* y callos de *P. tuberculatum* (Navickiene et al. 2003). Estos trabajos reafirman la importancia de varias modalidades de los cultivos *in vitro* en la biosíntesis de diversos metabolitos secundarios.

Agradecimiento

Este estudio fue financiado en parte con fondos de la Fundação de Amparo ao Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), São Paulo, Brasil.

Literatura citada

- Alécio A.C., V.S. Bolzani, M.C.M. Young, M.J. Kato & M. Furlan. 1998. Antifungal amides from leaves of *Piper hispidum*. *J. Nat. Prod.* 61: 637-639.
- Araújo G.A., L.B. Galiza da Silva, D.R. da Silva, R. de Moraes Peixoto, et al. 2008. Dermatophytosis caused by *Microsporium canis* and *Microsporium gypseum* in free-living *Bradypus variegatus* (Schiz, 1825) in the state of Pernambuco, Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 39: 508-510.
- Brako L. & J.L. Zarucchi. 1993. Catalogue of the Flowering Plants and Gymnosperms of Peru. Missouri Botanical Garden 45: 884-923.
- Cano C., P. Bonilla, M. Roque & J. Ruiz. 2008. Actividad antimicótica *in vitro* y metabolitos del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña). *Rev. Peru Med. Exp. Salud pública.* 25(3): 298-301.
- Cos P., L. Maes, A. Vlietinck & L. Pieters. 2008. Plant-derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection – an update (1998 – 2007). *Planta Med.* 2008: 1323-1337.
- Dabur R., H. Singh, A.K. Chhillar, M. Ali & G.L. Sharma. 2004. Antifungal potential of Indian medicinal plants. *Fitoterapia* 75(3-4): 389-391.
- Danelutte A.P., J.H.G. Lago, M.C.M. Young & M.J. Kato. 2003. Antifungal flavanones and prenylated hydroquinones from *Piper crassinervium* Kunth. *Phytochemistry* 64: 555-559.
- Danelutte A.P., M. Costantin, G.E. Delgado, R. Braz-Filho & M.J. Kato. 2005. Divergence of secondary metabolism in cell suspension cultures and differentiated plants of *Piper cernuum* and *P. crassinervium*. *J. Braz. Chem. Soc.* 16 No 6B: 1425-1430.
- Davicino R., M.A. Mattar, Y.A. Casali, S.G. Correa, E.M. Pettenati & B. Micalizzi. 2007. Actividad antifúngica de extractos de plantas usadas en medicina popular en Argentina. *Rev. peru. biol.* 14(2): 247-251.
- Fenner R., M. Sortino, S.M. Rates, R. Dall'Agnol, A. Ferraz, et al. 2005. Antifungal activity of some Brazilian *Hypericum* species. *Phytomedicine* 12(3): 236-240.
- Grayer R.J. & J.B. Harborne. 1994. A survey of antifungal compounds from higher plants. 1982-1993. *Phytochemistry* 37(1): 19-42.
- Gibbons S. 2008. Phytochemicals for bacterial resistance – strengths, weaknesses and opportunities. *Planta Med.* 74: 594-602.
- Hernández T., M. Canales, B. Teran, O. Avila, et al. 2007. Antimicrobial activity of the essential oil and extracts of *Cordia curasavica* (Boraginaceae). *J. Ethnopharm.* 111: 137-141.
- Homans A.L. & A. Fuchs. 1970. Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. *J. Chromatograph.* 51: 327-329.
- Kato M.J. & M. Furlan. 2007. Chemistry and evolution of the Piperaceae. *Pure Appl. Chem.* 79(4): 529-538.
- Koroishi A.M., S.R. Foss, D.A.G. Cortez, T. Ueda-Nakamura, C. Vataru & B.P. Dias Filho. 2008. *In vitro* antifungal activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* against dermatophytes. *J. Ethnopharm.* 117: 270-277.
- Lago J.G.L., C.S. Ramos, C.C.D. Casanova, A. de A. Morandim, et al. 2004. Benzoic acid derivatives from *Piper* species and their fungitoxic activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. *J. Nat. Prod.* 67: 1783-1788.

- Leatemia J. & B. Isman. 2004. Toxicity and antifeedant activity of crude seed extracts of *Annona squamosa* (Annonaceae) against epiphytic pests and natural enemies. *Int. J. Trop. Insect Sci.* 24(1): 150-158.
- Levy B.H.D., J.D.L. Fedullo, S.H.R. Corrêa, R.H.F. Teixeira & S. Dall'Acqua. 2006. Isolation of *Microsporum gypseum* from the haircoat of health wild felids kept in captivity in Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 37: 148-152.
- Malquichagua K.J., G.E. Delgado, L. Ripalda, M.C.M. Young & M.J. Kato. 2005. Chromenes of polyketide origin from *Peperomia villipetiola*. *Phytochemistry* 66: 573-579.
- Martins R.C.C., L.R. Latorre, P. Sartorelli & M.J. Kato. 2000. Phenylpropanoids and tetrahydrofuran lignans from *Piper solmsianum*. *Phytochemistry* 55: 843-846.
- Miyakado M., I. Nakayama & N. Ohno. 1989. Insecticides of plant origin. En: J.T. Arnason, B.J.R. Philogène & P. Morand. (Eds). ACS Symposium Series Am. Chem. Soc. Washington, DC. p. 387-390.
- Murashige T. & F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Navarro-García V.M., A. Gonzalez, M. Fuentes, M. Avilés, M.Y. Rios, G. Zepeda & M.G. Rojas. 2003. Antifungal activities of nine traditional Mexican medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 87(1): 85-88.
- Navickiene H.M.D., M.J. Kato, V. da S. Bolzani, M.C.M. Young, G.E. Delgado & M. Furlan. 1999. Amidas antifúngicas isoladas de *Piper tuberculatum* (Piperaceae). 23ª. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas, MG, Brasil. PN-096. p. 96.
- Navickiene H.M.D., A.C. Alcício, M.J. Kato, V. da S. Bolzani, M.C.M. Young, A.J. Cavalheiro & M. Furlan. 2000. Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry* 55: 621-626.
- Navickiene H.M.D., V. da S. Bolzani, M.J. Kato, A.M.S. Pereira, B.W. Bertoni, S. Castro & M. Furlan. 2003. Quantitative determination of anti-fungal and insecticide amides in adult plants, plantlets and callus from *Piper tuberculatum* by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Phytochem. Analysis* 14: 281-284.
- Orjala J., A.D. Wright, H. Behrends, G. Folker & O. Sticher. 1994. Cytotoxic and antibacterial dihydrochalcones from *Piper aduncum*. *J. Nat. Prod.* 57: 18-26.
- Osborn A.E. 1996. Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell* 8: 1821-1831.
- Pessini G.L., B.P. Dias Filho, C. Vataru & D.A. Garcia. 2005. Antifungal activity of the extracts and neolignan from *Piper regnellii* (Miq.) C.DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. *J. Braz. Chem. Soc.* 16(6A): 1130-1133.
- Rojas R., B. Bustamante, J. Bauer, I. Fernández, J. Albán & O. Lock. 2008. Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. *J. Ethnopharm.* 88: 199-204.
- Shah S., A.K. Kalla & K.L. Dhar. 1986. A cinnamoyl pyrrolidine amide from *Piper peepuloides*. *Phytochemistry* 25: 1997-1998.
- Shamim S., S. Waseemuddin Ahmed & I. Azhar. 2004. Antifungal activity of *Allium*, *Aloe*, and *Solanum* species. *Pharm. Biol.* 42: 491-498.
- Silva R.V., H.M.D. Navickiene, M.J. Kato, V. da S. Bolzani, C.I. Méda M.C.M. Young & M. Furlan. 2002. Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry* 59: 521-527.
- Soberón, G.V., C. Rojas, J. Saavedra, M.J. Kato & G.E. Delgado. 2006. Acción biocida de plantas de *Piper tuberculatum* Jacq. sobre *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera, Pyralidae). *Rev. peru. biol.* 13(1): 107-112.
- Tebbs M.C. 1989. Revision of *Piper* (Piperaceae) in the New World. 1. Review of characters and taxonomy of *Piper* section *Macrostachys*. *Bull. Br. Mus. Nat. Hist. (Bot.)* 19: 117-158.
- Trakranrungsie N., A. Chatchawanchonteeera & W. Khunkitti. 2008. Etnoveterinary study for antidermatophytic activity of *Piper betle*, *Alpinia galanga* and *Allium ascalonicum* extracts in vitro. *Res. Veter. Sci.* 84: 80-84.
- Trelease W. 1936. 40. Piperaceae. En: Macbride, J.F. Flora of Peru. Field Museum of Natural History, Botanical Series, Chicago, USA. 253 p.
- Yeoman M.M. & C.L. Yeoman. 1996. Manipulating secondary metabolism in cultured plant cells. *Tansley Review* No 90. *New Phytol.* 134: 553-569.
- Yuncker T.G. 1973. The Piperaceae of Brazil. II. *Piper* - Group V; *Ottonia*, *Pothomorphe*, *Sarcorhachis*. *Hoehnea* 3: 29-284.
- Zhang J.D., Y.B. Cao, Z. Xu, H.H. Sun, M.M. An, L. Yan, H.S. Chen, R.H. Gao, Y. Wang, X.M. Jia & Y.Y. Jiang. 2005. In vitro and in vivo antifungal activities of the eight steroid saponins from *Tribulus terrestris* L. with potent activity against fluconazole-resistant fungal pathogens. *Biol. Pharm. Bull.* 28(12): 2211-2215.