

Galileo
UNIVERSIDAD
La Revolución en la Educación

ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE ESPECIES DEL GÉNERO PIPER DE GUATEMALA

Vivian Zelada, Armando Cáceres, Sully M. Cruz ,
Luis E. Álvarez & João Carvalho



USAC
TRICENTENARIA
Universidad de San Carlos de Guatemala

**II CONGRESO CENTROAMERICANO DE PRODUCTOS NATURALES
MEDICINALES, COMAYAGUA, JUNIO 2017**

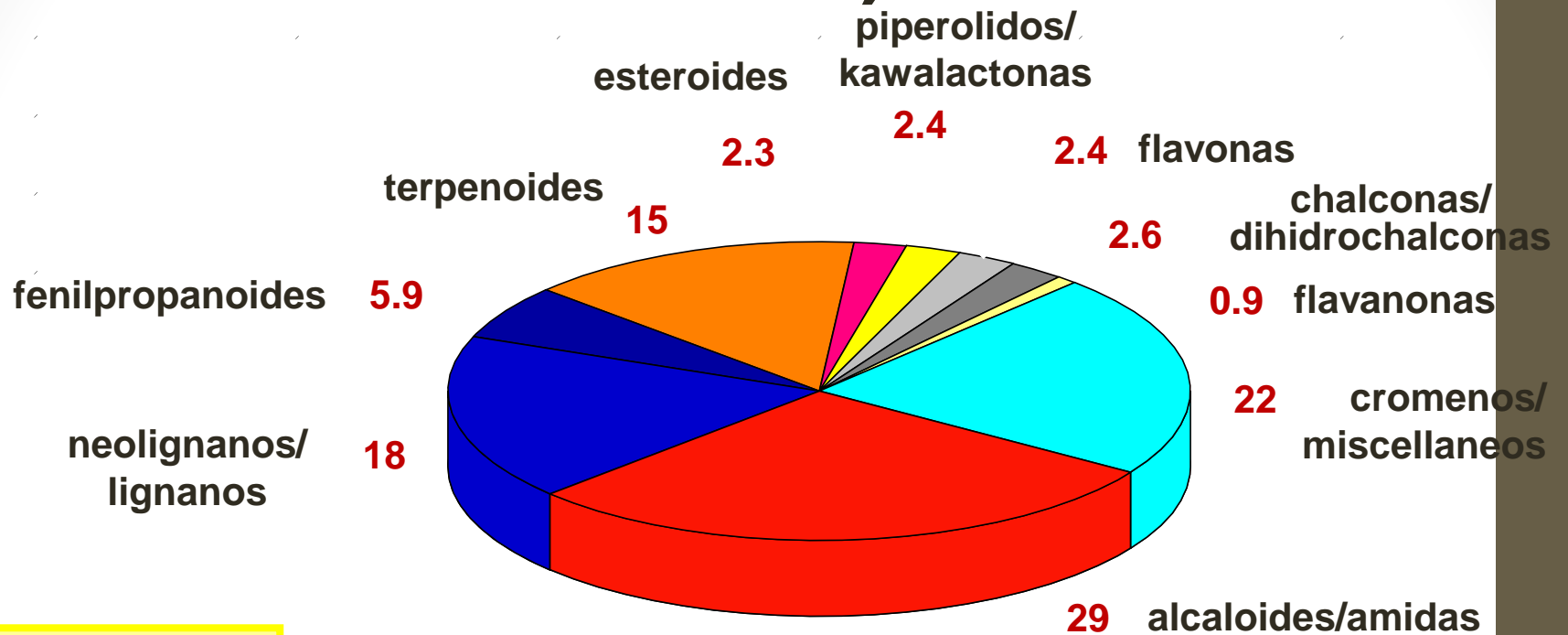
¿Por qué *Piper*?

- ⦿ **Biológico:** Porque son Angiospermas basales con una historia de millones de años y que su estudio ayuda a entender los procesos de diversificación biológica y las diversas interacciones biológicas.
- ⦿ **Histórico:** En el siglo XV, Cristóbal Colón convenció a Isabel de Castilla a buscar una ruta para obtener pimienta negra (*P. nigrum*) más rápida y directa.
- ⦿ **Potencial convencional:** *P. nigrum* es considerado el “Rey de las Especies”, existiendo unos 50 cultivares usados como condimento, medicina, preservante y agente biocontrolador que representan varios millones de dólares en el mercado internacional.

¿Por qué *Piper*?

- ⊙ **Potencial innovador:** Gran diversidad química y farmacológica con enorme potencial de aprovechamiento integral como producto natural. Hasta 1980 toda la información sobre el género provenía de países asiáticos, desde entonces más del 80% de la información proviene de Latino América.
- ⊙ **Étnico:** Amplio y múltiple uso de varias de sus especies por las poblaciones nativas como alimento, aroma, biocida, condimento y cosmético.
- ⊙ **Estratégico:** Varios grupos de científicos trabajando en este género en Iberoamérica e interés en organizar una red iberoamericana para el estudio multidisciplinario del género.

Fitoquímica del género *Piper* (% de frecuencia)



~2000 especies

112
investigadas
químicamente

~660

compuestos
identificados

Dyer LA & Palmer AN (2004) *Piper*. A model genus for studies of evolution, chemical ecology, and trophic interactions. Kluwer Academic Publishers.

Parmar, VS, Jain, SC, Bisht, KS, Jain, R. Taneja, P et al. (1997) *Phytochemistry of the genus Piper*. *Phytochemistry* 46: 597-673.

Kato, M. J. & Furlan, M. (2007) Chemistry and evolution of Piperaceae. *Pure and Applied Chemistry*, 79, 529-538.

Actividades biológicas de especies del género *Piper* de América Latina

Actividad	Especie	Referencia
Antibacteriana	<i>P. regnelli</i>	Felipe et al., 2008
Antifúngica	<i>P. hispidinervum</i>	Fazolin et al., 2006
Antiprotozoo	<i>P. heterophyllum</i>	Flores et al., 2009
Anti- <i>H. pylori</i>	<i>P. multiplinervium</i>	Rüegg et al., 2006
Larvicida	<i>P. marginatum</i>	Autram et al., 2009
Insecticida	<i>P. aduncum</i>	Leyva et al., 2008
Acaricida	<i>P. amalago</i>	Ferraz et al., 2010
Anti-miotóxica	<i>P. umbellatum</i>	Nuñez et al., 2005
Anti-secretoria	<i>P. carpunya</i>	Quílez et al., 2010
Ansiolítica	<i>P. tuberculatum</i>	Felipe et al., 2007
Estrogénica	<i>P. hispidum</i>	Michel et al., 2010
Anti-inflamatoria	<i>P. aduncum</i>	Parise-Filho et al., 2011
Anti-cáncer	<i>P. regnelli</i>	Longato et al., 2011

Recolección y secado de los materiales vegetales

- ◆ Basados en estudios etnobotánicos previos se realizó una prospección en dos zonas de Guatemala (Suchitepequez y Alta Verapaz).
- ◆ Se colectaron once especies del género *Piper*, se depositó una muestra de referencia en el Herbario CFEH de Laboratorios Farmaya, se secaron a la sombra y en horno.
- ◆ Las plantas secas se extrajeron por percolación secuencial con diclorometano y metanol y por extracción fraccionada con hexano, acetato de etilo, diclorometano, metanol y butanol, se concentraron en rotavaporador y se desecaron en un desecador con silica gel.

Colecta y procesamiento de material de *Piper*





Colecta de material vegetal



Secado de material vegetal



Extracción de aceite esencial por Neoclevenger



Concentrado de extractos por rotavapor

Materiales endémicos de Mesoamérica del género *Piper*



P. brevilimbum



P. hispidum



P. jacquemontianum



P. oradendron



P. patulum



P. psilorhachis



P. retalhuleuense



P. schippianum



P. sempervirens



P. tuerckheimii

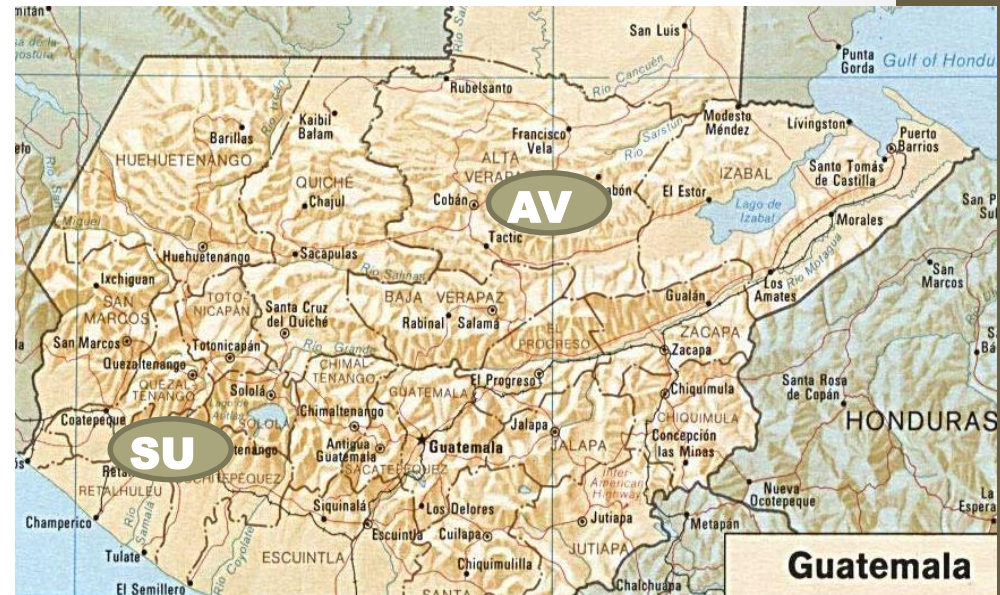


P. variable



P. umbellatum

Materiales



Nombre científico	Lugar de colecta	Latitud	Longitud	Herbario
<i>P. amalago</i>	Suchitepéquez	14°20'10.9"N	091°30'37.1"O	1073
<i>P. brevilimbium</i>	Alta Verapaz	15°49'14.8"N	89°36'30.94"O	1198
<i>P. jacquemontianum</i>	Suchitepéquez	14°33'06.3"N	091°27'57.9"O	1069
<i>P. oradendron</i>	Suchitepéquez	14°33'05.8"N	091°27'59.6"O	1075
<i>P. patulum</i>	Suchitepéquez	14°33'06.3"N	091°27'57.9"O	1074
<i>P. psilorhachis</i>	Alta Verapaz	15°54'50.1"N	090°31'19.5"O	1143
<i>P. retalhuleuense</i>	Suchitepéquez	14°20'10.9"N	091°30'37.1"O	1053
<i>P. sempervirens</i>	Alta Verapaz	15°54'55.4"N	090°31'14.6"O	1195
<i>P. tuerckheimii</i>	Alta Verapaz	15°49'18.1"N	089°36'19.4"O	1200
<i>P. umbellatum</i>	Suchitepéquez	14°33'06.9"N	091°28'00.5"O	1070
<i>P. variabile</i>	Alta Verapaz	15°54'40.8"N	090°31'18.2"O	1196

Rendimiento de los extractos



Especie	Parte	CH ₂ Cl ₂	MeOH
		%	%
<i>P. amalago</i>	hoja	3.52	7.96
	raiz	6.83	5.97
<i>P. brevilingum</i>	hoja	3.12	8.50
	raiz	3.76	3.46
<i>P. Jacquemontianum</i>	hoja	7.48	6.78
	raiz	1.51	3.32
<i>P. oradendron</i>	hoja	3.57	1.75
	raiz	1.44	2.59
<i>P. patulum</i>	hoja	3.62	15.73
	raiz	1.68	2.29
<i>P. psilorhachis</i>	hoja	5.42	10.71
	raiz	1.12	2.49
<i>P. retalhuleuense</i>	hoja	1.80	13.91
	raiz	0.71	6.11
<i>P. schippianum</i>	hoja	10.24	8.11
	raiz	1.84	1.15
<i>P. sempervirens</i>	hoja	6.33	11.49
	raiz	2.52	1.67
<i>P. umbellatum</i>	hoja	7.43	8.89
	raiz	6.81	3.94
<i>P. variable</i>	hoja	3.29	15.53
	raiz	2.60	3.45

Rendimiento de aceites esenciales (en Neoclevenger)



Especie	Rendimiento (%)	
	Hojas	Raíces
<i>P. amalago</i>	0.29±0.04	0.09±0.03
<i>P. hispidum</i>	0.52±0.18	0.55±0.03
<i>P. jacquemontianum</i>	0.51±0.06	0.42±0.03
<i>P. oradendron</i>	0.53±0.10	0.09±0.03
<i>P. patulum</i>	0.84±0.16	0.60±0.60
<i>P. psilorhachis</i>	0.39±0.15	0.09±0.03
<i>P. retalhuleuense</i>	0.07±0.02	0.23±0.05
<i>P. schippianum</i>	0.58±0.20	0.13±0.10
<i>P. sempervirens</i>	0.06±0.01	0.09±0.03
<i>P. umbellatum</i>	0.22±0.07	0.09±0.01
<i>P. variable</i>	0.99±0.34	0.11±0.06

Principales hallazgos sobre la composición del aceite esencial

❖ Alta diversidad en el número de aceites esenciales:
P. oradendron (70) → *P. retalhuleuense* (12)

❖ Algunos compuestos presentes en la mayoría de aceites: β -cariofileno (100%); β -pineno (87%), germacreno D (73%), α -copaeono, β -elemeno y γ -cadineno (67%)

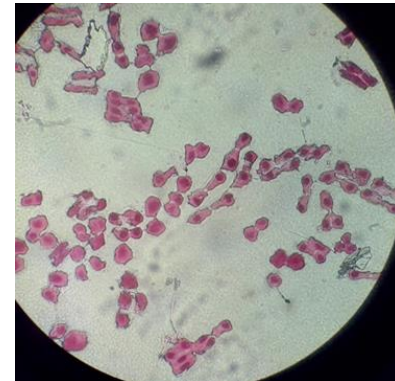
❖ Algunos compuestos mayoritarios únicos para una especie: *P. jacquemontianum* (linalool, 70%); *P. amalago* (nerolidol, 48%); *P. variable* (alcanfor, 29%) y *P. sempervirens* (biciclogermacreno (28%))

Metodología

- ❖ La actividad antioxidante fue demostrada por la reducción de DPPH la cual fue evaluada cualitativamente por TLC, y cuantitativamente por medio de espectrofometría (DPPH y fenoles totales).
- ❖ Citotoxicidad preliminar fue evaluada por el test micrométrico de *A. salina*
- ❖ La citotoxicidad fue evaluada en las líneas celulares [U251 (cerebro), MCF-7 (mamario) y NCI-H460 (pulmón)] por el ensayo micrometrico de sulforodamina B y Vero (Células epiteliales de riñón de mono verde), Hep-2 (Carcinoma epitelioide de laringe), PC-3 (Carcinoma de próstata), SiHa (Carcinoma epitelial de cervix).
- ❖ La genotoxicidad fue evaluada por medio del ensayo *Allium cepa*



A. salina



A. cepa

Actividad antioxidante (DPPH) *P. patulum*

Fracción/organo	Cualitativo <i>P. patulum</i>	Cuantitativo <i>P. patulum</i> (IC ₅₀ mg/ml)
Hexano hoja	+	1.19±0.01
Diclorometano hoja	+	1.37±0.01
Acetato de etilo hoja	+	3.70±0.01
Metanol hoja	++++	1.50±0.13
Butanol hoja	+++++	-
Hexano raíz	++	1.47±0.02
Diclorometano raíz	++	0.61±0.04
Acetato de etilo raíz	++	1.69±0.01
Metanol raíz	+++++	1.99±0.02
Butanol raíz	++++	-
Estàndar		
Quercitina	+	0.64±0.01
Rutina	++	0.03±0.01
TBHQ	++	1.16±0.01
Trolox	++	-
Vitamina C	+++	0.14±0.01

*Decoloración= +: pobre, ++: poco, +++: moderado y ++++: abundante.

Fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu *P. patulum*

Fracción/Órgano	µg equivalentes a ácido gálico/mL
Hexano hoja	77.01±0.98
Diclorometano hoja	61.80±0.06
Acetato de etilo hoja	21.32±0.12
Metanol hoja	0.62±0.02
Butanol hoja	-
Hexano raíz	-
Diclorometano raíz	848.42±9.89
Acetato de etilo raíz	21.65±0.13
Metanol raíz	0.72±0.01

Actividad citotóxica de *Piper* (44 extractos, 11 especies)

Colaboración entre la Universidad de San Carlos (Guatemala) y el Instituto Mexicano del Seguro Social, Mérida, Yucatán

Especie de Piper	Par	Extracto	Vero*	Hep-2	PC-3	SiHa
<i>P. jacquemontianum</i>	R	MeOH	31	18.4 (1.7)**	31.6 (1)	23.6 (1.3)
	H	CH ₂ Cl ₂	39.6	40.7 (0.9)	50.0 (0.8)	27.4 (1.4)
<i>P. sempervirens</i>	H	CH ₂ Cl ₂	34.6	23.1 (1.5)	43.4 (0.8)	33.5 (1)
	R	MeOH	37.2	30.3 (1.2)	48.2 (0.8)	30.1 (1.2)
<i>P. umbellatum</i>	R	CH ₂ Cl ₂	27	19 (1.4)	33.7 (0.8)	10.4 (2.3)
<i>P. retahuleuensis</i>	H	CH ₂ Cl ₂	61	44.7 (1.3)	>100	55(1.1)
<i>P. psilorhachis</i>	R	CH ₂ Cl ₂	>100	61.2 (-)	>100	>100
<i>P. patulum</i>	H	CH ₂ Cl ₂	>100	58.3 (-)	>100	55.7(-)

* Vero: Células epiteliales de riñón de mono verde; Hep-2: Carcinoma epitelioide de laringe; PC-3: Carcinoma de próstata; SiHa: Carcinoma epitelial de cervix

**Valores = Cl₅₀ µg/ml) (Indice de selectividad)

Cuantificación del crecimiento celular

- ◆ Se desarrollaron tres líneas celulares neoplásicas [H-460 (pulmón), MCF-7 (mama), U-251 (cerebro)] en medio RPMI 1640 con 5% de suero bovino fetal.
- ◆ En placas de 96 pocillos se enfrentaron los extractos en DMSO con los cultivos celulares durante 48 h, se fijaron con ácido tricloracético al 50% y el contenido de proteína celular cuantificado por espectrofotometría a 540 nm usando el ensayo de la sulforhodamina B.
- ◆ Usando la curva de concentración-respuesta se calculó la inhibición total de crecimiento (TGI) con un análisis de regresión no lineal

Actividad citotóxica de hojas del género *Piper* en dos extractos secuenciales

Espece de <i>Piper</i>	Extracto	U-251	MCF-7	H-460
<i>P. amalago</i>	CH ₃ Cl ₂	80.7*	58.2	179.6
<i>P. previlimum</i>	MetOH	>250	44.1	>250
<i>P. Jacquemontianum</i>	CH ₃ Cl ₂	19.6	6.5	7.2
<i>P. oradendron</i>	CH ₃ Cl ₂	29.8	31.1	43.5
<i>P. patulum</i>	CH ₃ Cl ₂	26.5	3.5	44.2
<i>P. psilorachis</i>	MetOH	60.5	89.2	>250
<i>P. retalhuleuensis</i>	CH ₂ Cl ₂	26.1	19.9	28.2
<i>P. sempervirens</i>	CH ₂ Cl ₂	0.25	1.8	3.0
<i>P. turckheimii</i>	CH ₂ Cl ₂	29.4	27.0	64.0
<i>P. umbellatum</i>	CH ₂ Cl ₂	30.6	25.1	52.2
<i>P. variable</i>	CH ₂ Cl ₂	22.4	25.9	26.2
Doxorubicina		0.029	0.025	0.025

* Inhibición de crecimiento: IC₅₀ (µg/ml) de las líneas celulares

LD₅₀ por el método de A. salina

Fracción/ órgano	LD ₅₀ mg/ml	LC inferior 95.0%	LC superior 95.0%
HL	0.79±0.01	0.74	0.84
DL	0.72±0.02	0.67	0.76
AL	>2	-	-
ML	1.46±0.01	1.38	1.55
BL	1.24±0.01	1.17	1.32
HR	0.49±0.02	0.46	0.52
DR	0.29±0.02	0.28	0.31
AR	0.68±0.01	0.64	0.73
MR	0.26±0.02	0.25	0.27
BL	0.93±0.03	0.86	0.99
Aceite esencial hoja	0.32±0.02	0.29	0.35

Zelada, Carvalho and Cáceres. *International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients*. 2016; 3:08

Inhibición total de crecimiento en líneas celulares U251, MCF-7 y NCI-H460

Extractos	TGI (µg/mL)		
	U251	MCF-7	NCI-H460
HL	178.8	17.0	105.3
DL	68.9	23.5	74.4
AL	53.8	42.0	71.6
ML	>250	>250	>250
BL	190.3	114.9	>250
HR	110.1	43.2	159.5
DR	94.2	31.0	88.6
AR	121.9	39.7	96.6
MR	>250	114.0	>250
BR	242.0	87.5	>250
Doxorubicina	>25	02.4	5.8

Zelada, Carvalho and Cáceres. *International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients*. 2016; 3:08

Actividad genotóxica en ápices de *A. cepa*

Extracto	Indice mitótico	% de inhibición
HL	62.5	26.47
DL	80	5.88
AL	72	15.29
ML	82	3.53
HR	70	17.65
DR	80	5.88
AR	65	23.53
MR	73	14.12
Paraquat	30	64.70
Control negativo	85	0

ANOVA= $p < 0.05$, para todas las fracciones (solo evidenció diferencia en el control positivo)

Potencial de especies nativas del género *Piper* como productos naturales

Especie	A	B	C	L	P	Otro	Aceite	Componente
<i>P. amalago</i>							E-nerolidiol	piperina?
<i>P. auritum</i>	★			★		alimento	safrol	
<i>P. hispidum</i>						estrogénico	espatulenol	butenólidos
<i>P. Jacquemontianum</i>	★	★	★		★		linalool	piperina?
<i>P. oradendron</i>						colorante	isoeugenol	flavonoides
<i>P. patulum</i>	★		★	★	★	condimento	metileugenol	esteroides
<i>P. psilorachis</i>	★							
<i>P. retalhulehuense</i>							E-nerolidol	piperina?
<i>P. schippianum</i>	★						β-bisaboleno	
<i>P. sempervirens</i>		★	★		★		germacreno	
<i>P. umbellatum</i>	★		★		★		germacreno	esteroides
<i>P. variable</i>	★				★		cariofileno	

A: Antioxidante; B: Bactericida; C: Citotóxica; L: Larvicida; P: Antiprotozoo