

Estudios Morfoanatómicos y Actividad Antineumocócica y Antioxidante de Hojas de *Tetrapanax papyriferum* (Hook.) C. Koch.

Salomé Yurquina ROJAS ¹, Norma CUDMANI ³, Stella de J. ROJO ¹ & María I. ISLA ^{2*}

¹ Cátedra de Botánica.

² Cátedra de Fitoquímica. Instituto de Estudios Vegetales "Dr. Antonio R. Sampietro".

Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán.

Ayacucho 471, 4000-San Miguel de Tucumán, Argentina.

³ Hospital de Clínicas Dr Nicolás Avellaneda, 4000-San Miguel de Tucumán, Argentina.

RESUMEN. *Tetrapanax papyriferum* (Hook) K.Koch (Araliaceae) es usada tradicionalmente en la medicina China para tratar inflamaciones y disenterías. En nuestro país es utilizada como sustituto de *Cecropia pachystachya* Mart. (= *Cecropia adenopus* Mart.) (Cecropiaceae). Los objetivos del presente trabajo fueron determinar los caracteres micrográficos de *T. papyriferum*, que permitan su identificación y evaluar su capacidad antibiótica frente a microorganismos de interés en procesos respiratorios, así como su capacidad antioxidante. Preparados hidroalcohólicos de hojas de *T. papyriferum* presentan actividad inhibitoria del crecimiento de *Streptococcus pneumoniae* (cepas sensibles y resistentes a β -lactámicos) con valores de concentración inhibitoria mínima (CIM) de 100 μ g/mL y actividad depuradora de radicales libres con valores de CD₅₀ de 7,5 μ g/mL. Nuestros resultados indican que los extractos de *T. papyriferum* podrían tener potenciales aplicaciones como antimicrobianos y antioxidantes en formulaciones farmacéuticas.

SUMMARY. "Morphoanatomical Studies and Antineumococcal and Antioxidant Activities of Leaves from *Tetrapanax papyriferum* (Hook) K. Koch". *Tetrapanax papyriferum* (Hook) K. Koch (Araliaceae) is traditionally used in China medicine to treat inflammations and dysenteries. In Argentina is used as substitute of *Cecropia pachystachya* Mart. (= *Cecropia adenopus* Mart.) (Cecropiaceae). The aims of the present work were to determine the *T. papyriferum* micrographic characters in order to its identification and to evaluate the antibiotic activity against microorganisms with interest in breathing processes as well as their antioxidant activity. Leaves hydroalcoholic extracts of *T. papyriferum* present inhibitory activity against *Streptococcus pneumoniae* (either β -lactamic sensitive and resistant strains) with minimal inhibitory concentration (MIC) values of 100 μ g/mL and radicals free scavenging activity with CD₅₀ values of 7,5 μ g/mL. Our results suggest that the extracts of *T. papyriferum* could be used as antimicrobial and antioxidant in pharmaceutical preparations.

INTRODUCCION

Tetrapanax papyriferum (Hook.) K. Koch. (Araliaceae), comúnmente llamada "planta del papel de arroz", especie nativa del Sur de China y Taiwan es usada tradicionalmente en la medicina China para tratar inflamaciones y disenterías.

En trabajos previos se ha demostrado que extractos de hojas de *T. papyriferum* presentan actividad antitrombínica ¹ y que compuestos aislados de hojas de esta especie presentan actividad antiinflamatoria ², actividad antihepatotóxica ³ y anti HIV ⁴. *T. papyriferum* es una especie que está ampliamente difundida en la Provincia

de Tucumán ⁵, y si bien registra uso medicinal, es utilizada sólo como sustituto de *Cecropia pachystachya* ⁶, conocida popularmente como "ambay", en afecciones respiratorias.

De allí que los objetivos planteados en el presente trabajo fueron determinar los caracteres micrográficos de *T. papyriferum*, que permitan su identificación y detectar su presencia como sustituto de ambay, y evaluar la capacidad antibiótica de tinturas de hojas frente a microorganismos de interés en procesos respiratorios tales como *Streptococcus pneumoniae* (neumococo). Este microorganismo es un coco grampositivo, responsable de afecciones tales como otitis

PALABRAS CLAVE: Antibacteriano, Antioxidante, Morfoanatomía, *Tetrapanax papyriferum*.

KEY WORDS: Antibacterial, Antioxidant, Morphoanatomy, *Tetrapanax papyriferum*.

* Autor a quien dirigir la correspondencia. E-mail: misla@tucbbs.com.ar

media y sinusitis aguda y constituye el agente etiológico identificable más común de neumonía bacteriana.

La tasa de defunción por infecciones neumocócicas puede alcanzar un 55% de los casos. Si bien *S. pneumoniae* ha sido bastante sensible a numerosos antibióticos, incluyendo penicilinas, cefalosporinas, tetraciclinas, cloranfenicol, macrólidos, lincosamidas, vancomicina, etc., en las dos últimas décadas han ido apareciendo de forma progresiva neumococos resistentes a algunos antibacterianos, e incluso cepas multirresistentes. En Argentina aproximadamente el 36% de los aislamientos presentan resistencia y en Tucumán el 25 %. De allí la importancia de encontrar productos naturales capaces de inhibir el crecimiento de estos microorganismos. Por otro lado, dado que los procesos infecciosos están fuertemente asociados a estados de estrés oxidativo, decidimos analizar si estas tinturas presentan capacidad antioxidante.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

Se estudiaron muestras de hojas de *T. papyrifera* y de *C. pachystachya* obtenidas de diferentes usuarios que habitan en la provincia de Tucumán. El vegetal recolectado así como el suministrado por los usuarios fue desecado en estufa de aire forzado a una temperatura de 60 °C. El material seco se confrontó con hojas frescas recolectadas en la localidad de El Manantial, Provincia de Tucumán, aplicando técnicas de diafanización ⁷ y de inclusión en parafina, y de doble coloración con Safranina-Fast Green ⁸, obteniéndose cortes transversales de lámina y nervadura principal. Los estudios paradermales se realizaron por raspado y desgarrado de ambas epidermis previa eliminación de la densa pubescencia.

Preparación de los extractos alcohólicos

La molienda del material vegetal seco se realizó en molino a cuchillas. Se prepararon soluciones extractivas (tinturas) siguiendo normas de Farmacopea Argentina VI Edición ⁹.

Determinación del contenido de Compuestos fenólicos

El contenido total de compuestos fenólicos fue determinado de acuerdo al método de Singleton ¹⁰ en equivalentes de cumarinas.

Actividad antimicrobiana

Se utilizaron 14 cepas de *Streptococcus pneu-*

moniae aisladas de materiales clínicos de pacientes que padecían neumonía adquirida en la comunidad del Hospital de Clínicas "Dr. Nicolás Avellaneda" y del Servicio de Bacteriología del Sanatorio Rivadavia. Las mismas fueron caracterizadas previamente en cuanto a su resistencia a antibióticos mediante pruebas de difusión en agar y concentración inhibitoria mínima (CIM) según normas del National Committee for Clinical Laboratory ¹¹.

Se determinaron los valores de CIM por el método de macrodilución seriada en agar ¹¹. Se utilizó como medio de cultivo agar Mueller Hinton (MH, Laboratorio Britania) adicionado con 5% de sangre ovina. Se determinó la concentración bactericida mínima (CBM) por el método de microdilución en medio líquido ¹¹. Se utilizó como medio de cultivo caldo MH adicionado de sangre lisada de caballo.

Actividad depuradora de radicales libres

La capacidad de los extractos de *T. papyrifera* de donar hidrógeno fue determinada utilizando el radical libre estable 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ¹². Distintas cantidades de extracto (1 a 200 µg de compuestos fenólicos) se incubaron con una solución de DPPH (300 µM en 95% de etanol), durante diferentes tiempos (10 a 30 min) a temperatura ambiente. La reducción del DPPH se evalúa por comparación con un control mediante lecturas en un espectrofotómetro Beckman DU 650 a 517 nm. Se determinó el valor de CD50 (concentración de compuestos fenólicos necesaria para depurar el 50% del radical DPPH). Se utilizaron etanol y agua como controles negativos.

Inhibición de la peroxidación de lípidos: Test de blanqueo del Beta Caroteno

La mezcla de incubación consistió en β-caroteno, ácido linoleico, Tween 20 y el extracto alcohólico de *T. papyrifera*. La mezcla se evapora a sequedad. Se agrega H₂O₂ 20 vol calentando a 50 °C durante 60 min. A intervalos de 10 min se mide la absorbancia a 470 nm utilizando agua destilada como blanco ¹³.

RESULTADOS

Se realizaron 20 entrevistas a usuarios de *C. pachystachya*. El análisis de la información presentada permitió establecer que todos los usuarios utilizaban *T. papyrifera* convencidos de estar utilizando ambay y que el criterio común en cuanto al uso popular de esta especie está orientado al tratamiento de afecciones bronquia-

les y asmáticas adjudicándole una acción terapéutica como expectorante, broncodilatador y mucolítica. Los caracteres hallados en el estudio endomorfológico de *T. papyrifera*, evidencian claramente que el material suministrado y relevado en distintas zonas de la provincia corresponde a esta especie y no a *C. pachystachya*, con la cual se confunde usualmente.

Anatomía foliar

La epidermis adaxial es glabra con células poliédricas y paredes engrosadas, observándose una cutícula mas o menos gruesa, mientras que la epidermis abaxial posee células estriadas y onduladas, muy tomentosa presentando pelos estrellados de 4 a 8 células con un pie de 1 a 4 células; los estomas son de tipo anisocítico y se ubican en la epidermis abaxial. La arquitectura foliar presenta una venación palmada de 7 a 15 nervaduras primarias que se ramifican en forma reticulada.

El mesófilo es de tipo trabado, presenta parénquima en empalizada biestratificado hacia la cara adaxial y parénquima esponjoso hacia la abaxial (Fig 1).

El corte transversal del pecíolo muestra una epidermis uniestratificada, colénquima angular con 5 a 6 estratos en posición subepidérmica, un parénquima homogéneo y anillos concéntricos de haces vasculares colaterales. Se observan abundantes drusas y canales secretores esquizógenos en el colénquima, parénquima y próximos al xilema y floema.

Actividad Antimicrobiana

De las 14 cepas utilizadas en este estudio, dos resultaron resistentes a penicilina (SPRP), dos de sensibilidad intermedia (SIPI) y el resto sensibles (SPSP). Frente a cefotaxima, un solo aislamiento fue de sensibilidad intermedia, mientras que el resto se comportó como sensible a este antibiótico β -lactámico. Se evaluó también la sensibilidad frente a eritromicina como representante del grupo de los macrólidos, obteniéndose sensibilidad en todos los aislamientos. El extracto alcohólico de hojas secas de *T. papyrifera* inhibió el crecimiento de todos los aislamientos clínicos de *S. pneumoniae* con valores de CIM de 75 μ g/mL a 300 μ g/mL (Tabla 1). Extractos vegetales almacenados a temperatura ambiente durante 6 meses conservan su capacidad antimicrobiana frente a *S. pneumoniae*.

Actividad depuradora de radicales libres

Se determinó la capacidad depuradora del radical libre 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). La solución extractiva evaluada presentó capacidad depuradora de radicales libres correlacionada positivamente con el correspondiente contenido de compuestos fenólicos con valores de CD_{50} de 7,5 μ g/mL (Figs 2 y 3). Extractos vegetales almacenados a temperatura ambiente durante 6 meses conservan su capacidad antioxidante.

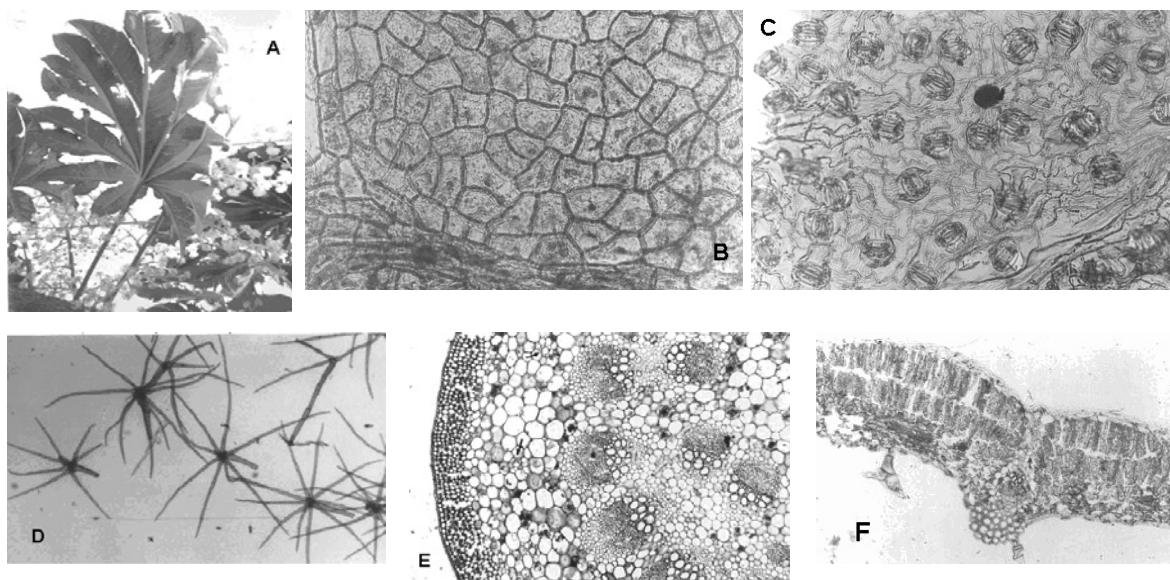


Figura 1. *T. Papyrifera*. a) vástago floral, b) epidermis abaxial vista al M.O. 40X, c) epidermis adaxial vista al M.O. 40X, d) pelos estrellados, e) pecíolo, f) lámina foliar en corte transversal.

<i>Streptococcus pneumoniae</i>	CIM ($\mu\text{g/mL}$)
Fito S-3	75
Fito S-4	75
Fito S-6	75
Fito S-9	75
Fito S-11	75
Fito S-15	75
Fito S-16	75
Fito S-17	> 300
Fito S-18	75
Fito S-20	75
Fito S-21	75
Fito S-26	> 300
Fito S-33	> 300
ATCC	300

Tabla 1. Actividad antimicrobiana de extracto alcohólico de hojas de *Tetrapanax papyriferum* frente a *Streptococcus pneumoniae* por métodos de macrodilución en agar y microdilución en medio líquido.

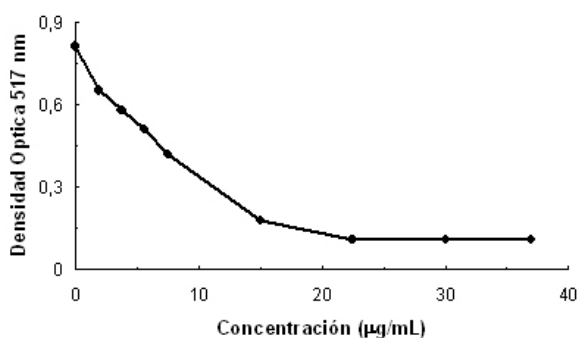


Figura 2. Capacidad depuradora de DPPH de diferentes concentraciones de tintura de *T. papyriferum* determinada por métodos espectrofotométricos.

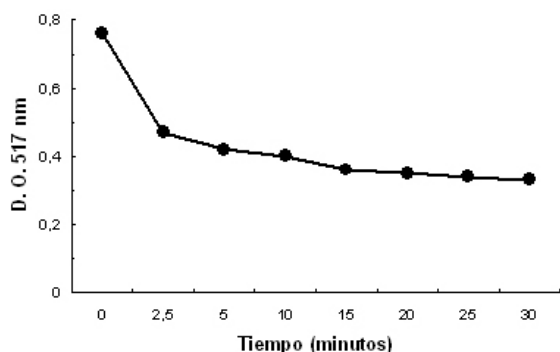


Figura 3. Capacidad depuradora de DPPH de tintura de *T. papyriferum* utilizando concentraciones de compuestos fenólicos correspondientes a los valores de CD_{50} e incubados distintos tiempos.

Test de blanqueo de β caroteno

Se determinó la capacidad inhibitoria de la oxidación del β -caroteno inducida por calor. Se necesitan entre 30 y 90 μg de compuestos fenólicos/mL para inhibir en un 100% la oxidación de 200 μg de β -caroteno tanto en tinturas recientemente preparadas como conservadas diferentes tiempos a temperatura ambiente (Fig. 4).

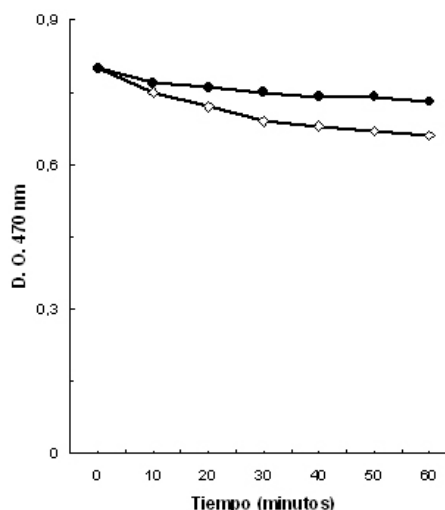


Figura 4. Test de blanqueo de β -caroteno frente a dos concentraciones de tintura de *T. papyriferum* ∇ - 30 μg de compuestos fenólicos/mL - $\bullet$ - 60 μg de compuestos fenólicos/mL.

CONCLUSIONES

Los caracteres observados en el estudio endomorfológico de *T. papyriferum*, evidencian claramente que el material suministrado y relevado en distintas zonas de la provincia corresponde a esta especie y no a *C. pachystachya*. Mientras *T. papyriferum* presenta tricomas pluricelulares estrellados en *C. pachystachya* se describieron cinco tipos de tricomas simples¹⁴, unicelulares a pluricelulares con paredes silicificadas o calcificadas y cuyas longitudes varían entre 15-200 μm .

De la serie de entrevistas y seguimiento realizadas a los usuarios de esta especie, y visto los resultados de sus posibles propiedades se concluye que dicha especie estaría dentro de las especies de acción terapéutica para las "vías respiratorias". Por ello se hace imprescindible determinar los caracteres de identificación de las especies mediante un estricto control de calidad a fin de evitar sustituciones en la comercialización, verificar científicamente sus bioactividades ya que estas se usan empíricamente como una

fueron de recursos naturales invaluable. Se observa que un importante sector poblacional se orienta a éste tipo de práctica teniendo en cuenta los crecientes costos de la medicina alopática.

La actividad antimicrobiana obtenida para el extracto de *T. papyrifera* fue (CIM < 300 µg/mL). Los valores de CBM fueron idénticos al correspondiente valor de CIM, indicando que el extracto ejercería una acción bactericida sobre *Streptococcus pneumoniae*. Es de destacar que la sensibilidad de este microorganismo frente al extracto fue idéntica tanto en las cepas sensibles como en las de sensibilidad disminuida a los β-lactámicos.

Nuestros resultados justificarían el desarrollo de formulaciones farmacéuticas con esta especie vegetal para afecciones producidas por *Streptococcus pneumoniae* y serían una fuente apropiada de antioxidantes naturales para su uso en la industria farmacéutica, cosmética o alimenticia. Se encuentran en marcha estudios de toxicidad de estas tinturas.

Agradecimientos. Este trabajo ha sido financiado con subsidios otorgados por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica (ANPCyT), el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y el Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Tucumán (CIUNT).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Chistokhodova, N., C. Nguyen, T. Calvino, I. Kachirskaia, G. Cunningham & D. Miles (2002) *J. Ethnopharmacol.* **81**: 277-80
2. Sugishita, E., S. Amagaya & Y. Ogihara (1982) *J. Pharmacobiodyn.* **5**: 379-87
3. Sugishita, E., S. Amagaya & Y. Ogihara (1983) *J. Pharmacobiodyn.* **6**: 287-94
4. Ho, J., C Chen. & L Row. (2007) *Phytochemistry* **68**: 633-5
5. Dimitri, M.J. (1987) Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería. Tomo 1. Editorial ACME SACI, Buenos Aires.
6. Erize, F. (1998) *El Nuevo Libro del Arbol*. Tomo II. Editorial El Ateneo, Madrid, España.
7. Strittmater, D. (1973) *Bol. Soc. Arg. Bot.* **15**: 126-9.
8. Strittmater, D. (1979) *Bol. Soc. Arg. Bot.* **18**: 121-2
9. Farmacopea Nacional Argentina VI edición (1978) 1010-1.
10. Singleton, V.L., R. Orthofer & R.M. Lamuela-Raventos (1999) *Meth. Enzymol.* **299**: 152-78.
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards (2002) *Standards for antimicrobial susceptibility testing. Twelfth International Supplement Performance*. M100- S12. Wayne, P.A.
12. Yamaguchi, T, H. Takamura, T. Matoba & Y. Terao (1998) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**: 1201-4
13. Ordóñez, A., M. Vattuone, D. Gómez & M.I. Isla (2006) *Food Chem.* **97**: 452-8.
14. Cativiela M., Torres M. & M.Gattuso (1998) *Fitoterapia* **69**: 313-21.