

# Influencia de seis aceites esenciales sobre la producción de óxido nítrico en leucocitos humanos

Renato Pérez-Rosés<sup>a</sup>, Ester Risco<sup>a</sup>, Roser Vila<sup>a</sup>, Pedro Peñalver<sup>b</sup>, Salvador Cañigüeral<sup>a</sup>



<sup>a</sup> Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona. Av. Diagonal, 643. E-08028 Barcelona (España).

<sup>b</sup> Lidervet, S.L. Plaça García Lorca, 17, Baixos. E-43006 Tarragona (España).



## Introducción

El óxido nítrico (NO) es un radical libre citotóxico utilizado por el sistema inmune en la defensa frente a microorganismos invasores. Sin embargo, en exceso, puede causar daño en los tejidos del huésped [1]. Algunos aceites esenciales han demostrado poseer actividad antioxidante y están relacionados con la mejora de la respuesta inmune. Para profundizar en las propiedades antioxidantes de los aceites esenciales hemos estudiado su efecto sobre la producción de NO inducida por lipopolisacáridos (LPS), en leucocitos humanos.



## Aceites esenciales y sustancias investigadas

Se investigaron seis aceites esenciales, además de los terpenos de clavo y el acetato de bornilo.

Las muestras de aceites esenciales investigadas, obtenidas a partir de fuentes comerciales, fueron:

- **Árbol del té australiano** (*Melaleuca alternifolia* Cheel)
- **Cayeput** (*Melaleuca cajuputi* Powell.)
- **Cilantro** (*Coriandrum sativum* L.)
- **Jengibre** (*Zingiber officinale* Roscoe)
- **Laurel** (*Laurus nobilis* L.)
- **Niaulí** (*Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S.T. Blake)
- **Terpenos de la esencia de clavo** (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry)

## Resultados y discusión

En la Tabla 1 se muestra un resumen de los resultados obtenidos.

El **aceite esencial de jengibre** ha sido el más activo, con una  $IC_{50}$  de  $4.3 \pm 0.4 \mu\text{g/mL}$ , que es más de ocho veces superior al compuesto de referencia utilizado, el L-NMMA, ( $IC_{50} = 38.2 \pm 1.4 \mu\text{g/mL}$ ). Este mismo aceite esencial mostró una inhibición de 43% y 26%, a las concentraciones de 2.9 y 1.5  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

El **acetato de bornilo** ha presentado una actividad inhibitoria ( $IC_{50} = 41.9 \pm 7.1 \mu\text{g/mL}$ ) similar al L-NMMA (**Figura 1**).

Los aceites esenciales de niaulí, árbol del té australiano, laurel, cilantro y cayeput no presentaron actividad inhibitoria.

El aceite esencial de cilantro, a la concentración de 45.5  $\mu\text{g/mL}$  estimuló significativamente la producción de NO en un 31% ( $p \leq 0.05$ ).

Además, nuestros resultados confirman que el principal responsable de la actividad del **aceite esencial de clavo** ( $IC_{50} = 39.8 \pm 6.3 \mu\text{g/mL}$ ), obtenida en estudios previos, es el eugenol ( $IC_{50} = 19.0 \pm 1.8 \mu\text{g/mL}$ ) [3], ya que la fracción terpénica de la esencia de clavo no ha presentado actividad ( $IC_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$ ) (**Figura 2**).

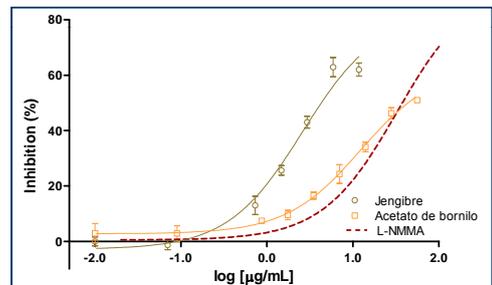
En estudios anteriores, habíamos observado también una importante actividad antioxidante del aceite esencial de jengibre, mediante la inhibición de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en leucocitos humanos, con una  $IC_{50}$  de  $8.9 \pm 5.8 \mu\text{g/mL}$ , resultado únicamente comparable al presentado por la esencia de clavo ( $IC_{50} = 7.5 \pm 1.6 \mu\text{g/mL}$ ), de un total de once aceites esenciales estudiados [4]. Esta capacidad de inhibición de la producción de ROS y NO del aceite esencial de jengibre, y también del de clavo, podría ser uno de los mecanismos relacionados con su actividad sobre la inmunidad celular [5].

Como conclusión podemos destacar el interés del **aceite esencial de jengibre** en la prevención del daño celular por exceso tanto de ROS como de NO.

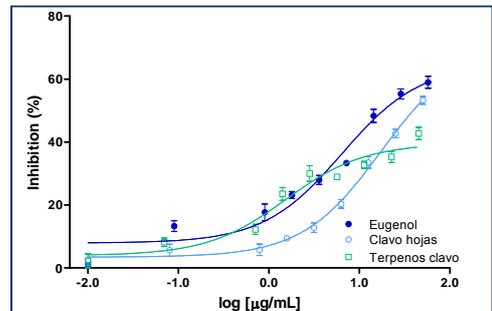
**Tabla 1.** Actividad inhibitoria ( $IC_{50}$ ) de aceites esenciales o constituyentes sobre la producción de NO en leucocitos humanos estimulados con LPS.

Aceite esencial o sustancia	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL} \pm \text{DE}$ )
Árbol del té australiano	No actividad
Cayeput	No actividad
Cilantro	No actividad*
Jengibre	$4.3 \pm 0.4$
Laurel	No actividad
Niaulí	No actividad
Acetato de bornilo	$41.9 \pm 7.1$
Terpenos de la esencia de clavo	No actividad
L-NMMA (control positivo)	$38.2 \pm 1.4$

\*: estimuló la producción de NO a 45.5  $\mu\text{g/mL}$  (31%,  $p > 0.05$ )



**Figura 1.** Actividad inhibitoria (%), media  $\pm$  DE, n=4) del aceite esencial de jengibre, acetato de bornilo y L-NMMA (control positivo) sobre la producción de NO en leucocitos humanos estimulados con LPS.



**Figura 2.** Comparación de la actividad inhibitoria (%), media  $\pm$  DE, n=4) de los terpenos de clavo con la del aceite esencial de clavo y el eugenol, éstos últimos de estudios anteriores [4], sobre la producción de NO en leucocitos humanos estimulados con LPS.

## Métodos

### Análisis de los aceites esenciales

La composición de los aceites esenciales fue determinada mediante GC-FID y GC-MS. En todos los casos se empleó una columna capilar (60 m, 0.25 mm d.i., 0.25  $\mu\text{m}$  film) Supelcowax 10<sup>TM</sup>. Las condiciones de las cromatografías variaron según el aceite esencial en estudio. La identificación de los compuestos se realizó a partir de los índices de retención y los espectros de masas. La cuantificación se realizó por normalización de las áreas del cromatograma GC-FID.

### Aislamiento de los leucocitos y análisis de la concentración de NO

Los leucocitos humanos se aislaron a partir de *buffy coats* obtenidos de sangre humana proveniente de voluntarios sanos.

La suspensión de leucocitos fue distribuida en microplacas de 96 pocillos, y las células fueron tratadas, durante diez minutos, con diferentes concentraciones de aceites esenciales o de las otras muestras estudiadas, y se estimularon con LPS durante 1h. En el sobrenadante obtenido, se determinaron los nitritos acumulados, como indicador de la producción de NO, mediante la reacción de Griess (15 min de incubación a temperatura ambiente) [2]. Se midió la absorbancia a 540 nm en un lector de microplacas (BioRad Benchmark Plus). Las concentraciones de nitrito en las muestras se calcularon a partir de una recta patrón de nitrito sódico. Como control negativo se utilizaron leucocitos no estimulados con LPS. El L-NMMA fue utilizado como control positivo. Los resultados se expresan como porcentaje de la inhibición provocada por el tratamiento respecto al NO producido por células tratadas únicamente con LPS.

## Referencias

1. Tung Y.-T. *et al.* (2008) *Bioresource Technology* 99, 3908-3913.
2. Green, LC *et al.* (1982) *Anal. Biochem.* 124, 131-138.
3. Pérez-Rosés, R. *et al.* (2009) 57th Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research, Geneva (Switzerland).
4. Pérez-Rosés, R *et al.* (2008) 39th ISEO, Quedlingburg (Germany).
5. Carrasco *et al.* (2008). *J Pharm. Pharmacol* 61: 961-967.

## Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo financiero brindado por la entidad Lidervet S.L. (Tarragona, España). R. Pérez-Rosés fue financiado durante la investigación por la Generalitat de Catalunya y el Fondo Social Europeo.