

ESTUDIO *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS VEGETALES DEL GÉNERO *BACCHARIS* SOBRE *CANDIDA ALBICANS*

Silvia Martínez^{1,2}, Patricia Mollinedo¹, Oscar Mamani³, Giovana Almanza³, Enrique Terrazas²

¹Instituto de Investigaciones en Productos Naturales, Carrera de Ciencias Químicas, Universidad Mayor de San Andrés, Campus Universitario, Edificio FCPN, Calle27, Cota-Cota, ²Instituto de Investigaciones Fármaco-Bioquímicas, Av. Saavedra 2224, Miraflores, ³Instituto de Investigaciones Químicas, Edificio FCPN, Calle27, Cota-Cota

Keywords: *Candida albicans*, *Baccharis*, Curvas de Letalidad, *in Vitro*

ABSTRACT

The research goal was to find alternatives for controlling the growth of microorganism. Thus antifungal activity was determined from polar and non polar plants crude extracts of *Baccharis*, using non-polar and polar extracts, of *Baccharis latifolia*, *Baccharis genistelloides*, *Baccharis obtusifolia*, *Baccharis papillosa*, *Baccharis santelicensis*, genus, against species on ATCC strains of *Candida albicans*. Extract of *Baccharis latifolia*, growth inhibition was observed.

Corresponding author: sssilmar92@gmail.com

RESUMEN

Con la finalidad de buscar alternativas para el control del crecimiento de microorganismos patógenos, se investigó la actividad antifúngica de plantas del género *Baccharis*, utilizando extractos no polares y polares, de las especies *Baccharis latifolia*, *Baccharis genistelloides*, *Baccharis obtusifolia*, *Baccharis papillosa*, *Baccharis santelicensis*, sobre cepas ATCC de *Candida albicans*. Presentando actividad inhibitoria los extractos de *Baccharis latifolia*.

INTRODUCCION

La Fitoterapia es una parte de la Terapéutica, cuyo desarrollo nos permite disponer de medicamentos a base de plantas, para prevenir, atenuar o curar un estado patológico, generalmente con una actividad suave o moderada, con márgenes terapéuticos relativamente amplios, que dan lugar a tratamientos menos agresivos.^{1,2} De esta manera las plantas juegan un papel primordial en los sistemas de salud pública de países en desarrollo. Es más, durante las últimas décadas, el interés del público en las terapias naturales ha aumentado enormemente en países industrializados y se halla en expansión el uso de plantas medicinales y medicamentos cuyas materias primas son drogas vegetales o sus extractos.^{3,4} En el desarrollo de un antimicrobiano se requiere de ensayos preclínicos y clínicos, dentro de los primeros, se distinguen dos grupos encaminados a investigar diferentes efectos del compuesto: ensayos toxicológicos y estudios de actividad, para asegurar una eficacia demostrada *in vitro* y posteriormente *in vivo*.^{5,6} El uso de fitocomponentes con propiedades microbicidas y/o microbiostáticas, además de incrementar el gradiente de acción en el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos, también promueve el uso alterno de ciertas plantas y el desarrollo de las regiones donde ellas crecen, incentivando al lugareño a asentarse y tener un medio de sustento familiar.^{7,8} Además, existen problemas de seguridad y toxicidad de los fármacos o la aparición de resistencias, lo cual motiva el desarrollo de nuevos antifúngicos naturales que aporten ventajas apreciables respecto a los actuales fármacos.^{9,10} Dentro de la biodiversidad vegetal,^{11, 12} se tienen estudios de especies del género *Baccharis*, de uso tradicional en América Latina.^{13,14} Su fitoquímica destaca la presencia de Flavonoides, Diterpenos y Triterpenos, observándose mayor acumulo de Flavonas, Flavonoides y Diterpenos Labdanos y Clerodanos.^{15,16} También presentan actividad antioxidante que parece correlacionar con esta actividad antiinflamatoria y con el contenido de compuestos Fenólicos.^{17,18} Además presentan otras actividades biológicas como ser antimicrobiana, espasmolítica, antiviral, gastroprotectiva, antileucémica.^{19,20} El estudio ha sido enfocado hacia el uso de Productos Naturales, extractos vegetales, centrándonos en la actividad antifúngica *in vitro*.^{21,22} Para lograr que la población disponga de fitofármacos

rigurosamente estudiados. Se decidió probar la actividad antifúngica^{23,24} *in Vitro* de un grupo de extractos vegetales de la especie *Baccharis* frente a microorganismos causantes de diversas patologías tanto en humanos y animales, lo cual podría llevarnos al desarrollo, a partir de plantas utilizadas tradicionalmente a formular la preparación de diferentes formas farmacéuticas con actividad farmacológica definida y colaborar con la gran demanda social de nuevos agentes antimicrobianos, con el fin de contribuir a preservar el recurso vegetal y permitir una explotación racional de la vegetación autóctona medicinal, es así que la composición química de las diferentes especies, en unión a sus propiedades farmacológicas, microbiológicas, permitirán valorizarlas, ofreciendo un respaldo científico que avale su aplicación en la medicina tradicional.

RESULTADOS, DISCUSION

Mediante microensayos de Microdilución y el Método de Susceptibilidad por Difusión Bauer-Kirby con Disco de Papel impregnado con Extracto sobre Agar, se determinó cualitativamente las especies vegetales que presentan actividad inhibitoria del extracto frente a la cepa *Candida albicans*. (Figura 1). De los extractos ensayados como se muestra en la Figura 1, se tiene que el extracto acuoso de *Baccharis latifolia* S2 presenta poca o ninguna turbidez, indicio de que existe una actividad inhibitoria en las primeras concentraciones diluidas. Por otro lado se observa la presencia de poca turbidez para los extractos S1 y S3, lo que indica que puede existir cierto porcentaje de inhibición. Lo cual concuerda con el Método de Susceptibilidad por Difusión BAUER-KIRBY con disco de papel impregnado con extractos vegetales sobre agar. Para conocer el extracto que presenta actividad antifúngica se toma en cuenta los halos de aquellos que fueron igual o están por encima de 30% de inhibición. La Tabla 1 presenta el porcentaje del halo de inhibición de los extractos acuosos de *B. latifolia* S2 de 37 %, de S2O de 35%, también se tomo en cuenta a *B. genistelloides* S1 de la Paz y S3 de Cochabamba ambos extractos acuosos con 42% de inhibición.

	C(-)	E	F	K	KJ	1/32	1/16	1/8	1/4	1/2	1
B6	4	0	0	0	0	4	4	3	3	2	2
R3	4	0	0	0	0	4	4	4	3	3	2
R4	4	0	0	0	0	4	4	3	3	2	2
R5	4	0	0	0	0	4	4	3	3	2	2
S1	4	0	0	0	0	4	4	3	3	2	1
S2	4	0	0	0	0	4	3	3	2	1	0
S2O	4	0	0	0	0	4	3	3	2	2	1
S3	4	0	0	0	0	4	3	3	2	2	1

Figura 1. Microdilución de extractos polares y no polares de plantas del genero *Baccharis* frente a *Candida albicans* C(-).

La Tabla 1 y Figura 2 representan el porcentaje del halo de inhibición de los extractos acuosos de *B. latifolia* S2 de 37 %, de S2O de 35%, también se tomo en cuenta a *B. genistelloides* S1 de la Paz y S3 de Cochabamba, ambos extractos acuosos con 42% de inhibición. Para determinar la actividad fungicida y/o fungistática, se realizó la prueba de la dinámica de acción inhibitoria en el tiempo, donde se obtienen Curvas de letalidad para cada uno de los extractos antimicrobianos, realizándose el ensayo para los extractos activos de *B. latifolia* y *B. genistelloides*. En la Figura 3 podemos ver que las curvas de mortalidad tiempo de los extractos acuosos de *B. genistelloides* de La Paz S1C y S1P que descienden dos unidades logarítmicas en las dos primeras horas, para luego incrementar su concentración cerca al inóculo inicial. Al no presentar tres unidades de logaritmo de diferencia con el control negativo C.A. y llegar a 4,8 y 4,3 log U.F.C./mL respectivamente, podemos considerar que los extractos de *B. genistelloides* pueden presentar un comportamiento fungistático utilizando cantidades mayores de 1 mg de extracto. Los extractos acuosos en la Figura 4 de *B. genistelloides* de Cochabamba S3C y S3P no descienden más de 1 Log U.F.C./mL, en las dos primeras horas y luego aumenta ligeramente la población microbiana permaneciendo casi constante muy cerca del valor del inóculo inicial. Comparando con el control negativo C.A. se puede decir que existe la posibilidad de un comportamiento fungistático a cantidades mayores de 1 mg de extracto acuoso.

Tabla 1. Porcentaje de inhibición aplicando el Método de Susceptibilidad por Difusión BAUER-KIRBY, de extractos polares del genero *Baccharis* sobre *Candida albicans* (Cs. QUIMICAS-IIFB).

MUESTRA	0,5 mg	1 mg
S1	33	42
S2	30	37
S2O	20	35
S3	25	42
E20	10	33
K	17	58
KJ	20	60
C(-)	0	0

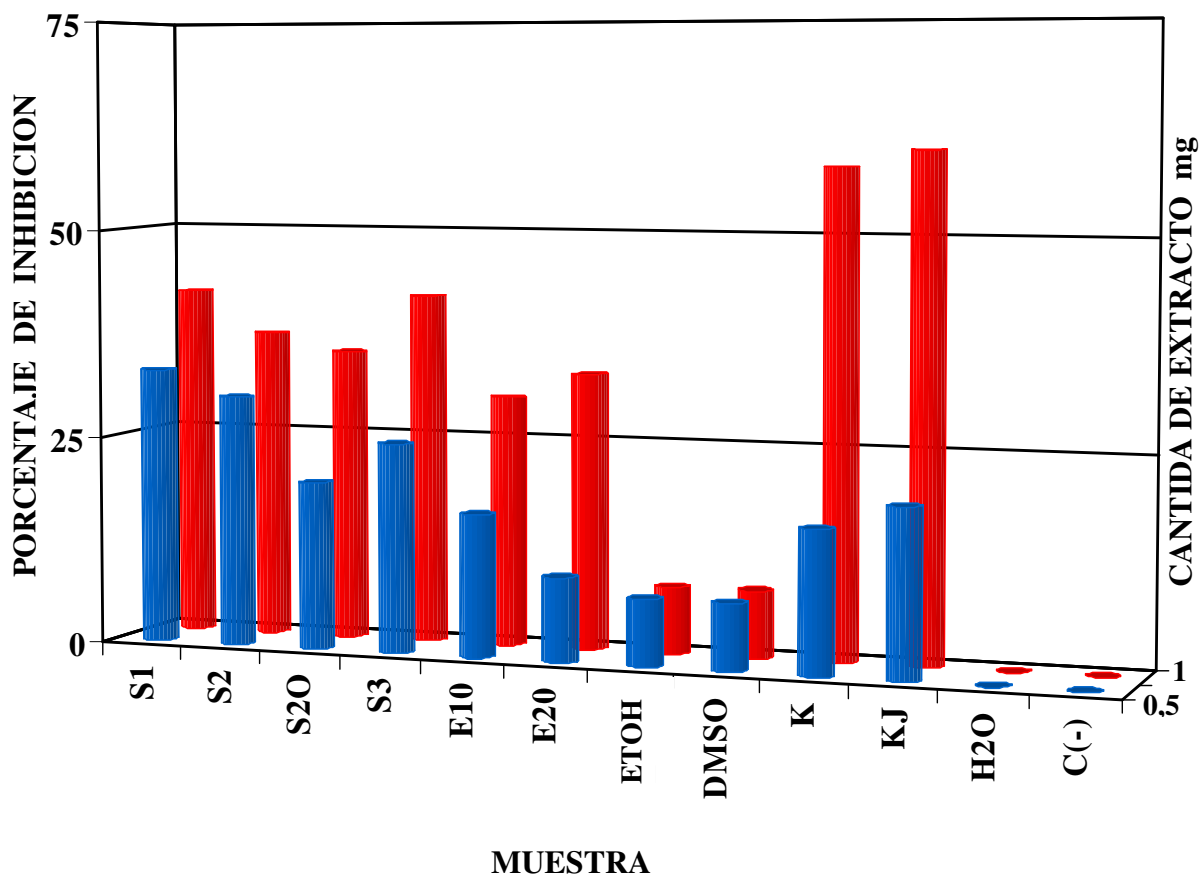


Figura 2. Halos de inhibición en mm de extractos polares de plantas del genero *Baccharis* frente a *Candida albicans*.

Para *Baccharis latifolia* (Figura 5), el extracto S2P inhibe de 5,8 a cerca de 1 U.F.C./mL hasta las 12 horas de ensayo, para luego permitir un moderado incremento de la concentración microbiana llegando a una concentración de 3 log U.F.C./mL. El extracto S2C descenden inicialmente de 5,8 a 3,0 U.F.C./mL hasta las 6 horas, posteriormente incrementa su concentración microbiana de *Candida albicans* hasta permanecer casi constante a 3,5 U.F.C./mL.

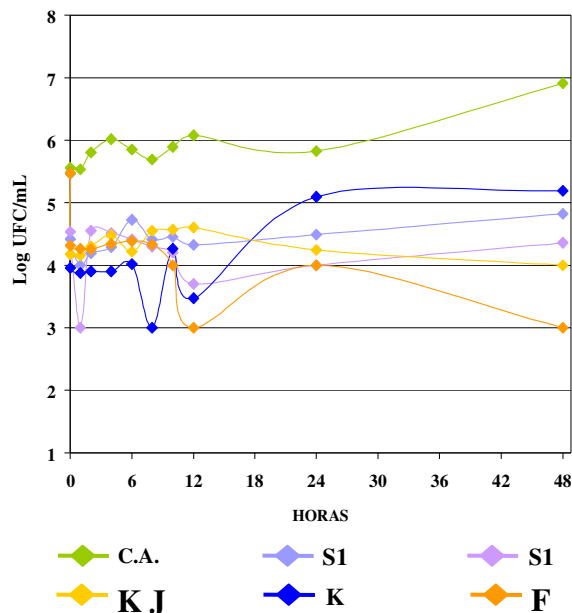


Figura 3. Actividad antifúngica de extractos polares acuosos de *Baccharis genistelloides* de La Paz contra *Candida albicans* Control negativo C.A.

Pasadas las 2 horas de ensayo el extracto S2O inhibe a cerca de 3 log U.F.C./mL, luego se observa un ligero incremento a 3,6 U.F.C./mL, para continuar estable a lo largo de las otras 24 horas. La representación de la letalidad de los extractos etanólicos se observa en la Figura 6, donde a las primeras horas existe una inhibición total al inóculo de *Candida albicans* con E10C y E10P para luego pasadas las 12 horas comenzar a disminuir su actividad inhibitoria poco a poco hasta llegar a 1,8 U.F.C./mL, pero aun mantiene 3 unidades logarítmicas por debajo de la curva de crecimiento de *Candida albicans* en color verde claro. Con el extracto E20C y E20P se observa inhibición total del desarrollo de *C. albicans* desde un inicio hasta las 48 horas de ensayo en comparación al control negativo en línea verde claro, que representa el crecimiento de *C. albicans*.

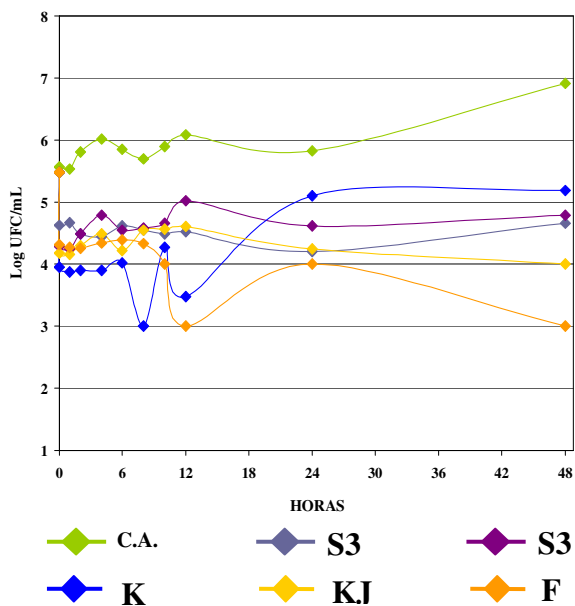


Figura 4. Actividad antifúngica de extractos polares acuosos de *Baccharis genistelloides* de Cochabamba contra *Candida albicans* Control negativo C.A.

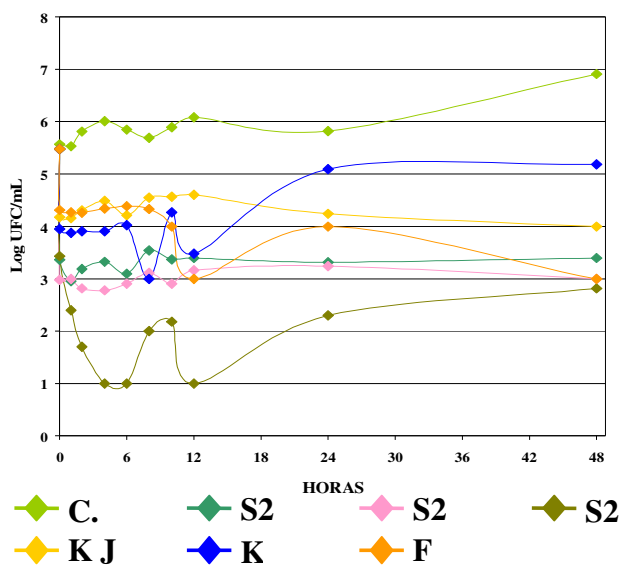


Figura 5. Actividad antifúngica de extractos polares de *Baccharis latifolia* contra *Candida albicans* Control negativo C.A.

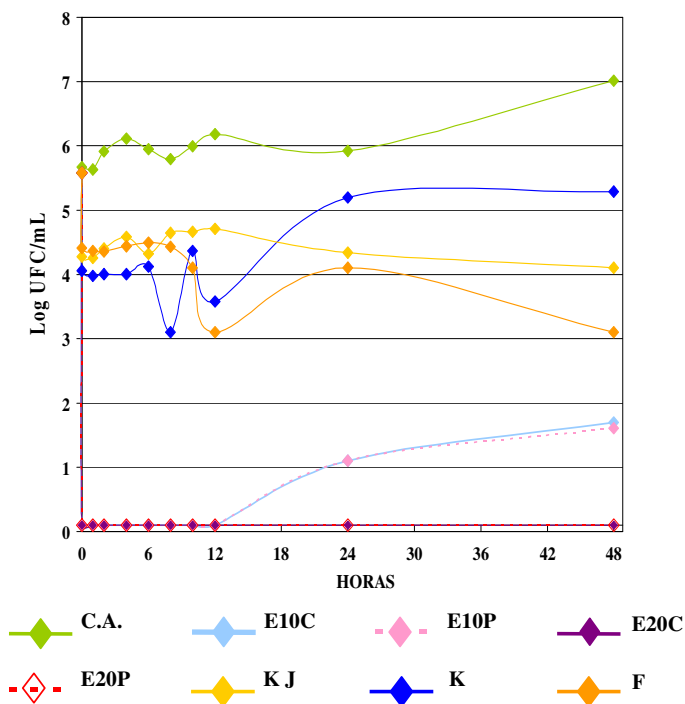


Figura 6. Actividad antifúngica de extractos polares etanólicos de *Baccharis latifolia* de La Paz contra *Candida albicans* Control negativo C.A.

SECCION EXPERIMENTAL

Las especies vegetales *Baccharis santelicens*, *Baccharis genistelloides*, *Baccharis latifolia*, *Baccharis papillosa*, *Baccharis obtusifolia*, se recolectaron e identificaron para luego utilizar las partes aéreas realizando el secado,

trituration y preparación de los extractos polares y no polares, según la metodología estandarizada por el área de Productos Naturales del Instituto de Investigaciones Químicas, de la Carrera de Ciencias Químicas. Los extractos obtenidos se concentran en un rotaevaporador. Los residuos secos obtenidos se guardan en frascos estériles en ambiente seco y oscuro. Como fármacos Control se utilizaron Ketoconazol 20 µg/mL, Fluconazol 40 µg/mL. Se aplicó el método de Curvas de letalidad para determinar la característica Fungicida o Fungiestática de los extractos. Se utilizó la cepa de *Candida albicans* 98001 ATCC como población celular de partida entre 1 a 5×10^5 UFC/ml, incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, aplicando el método de Curvas de letalidad según la NCCLS, realizado en el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas. **Nota.** B6 es el Extracto etanólico de *B. genistelloides* de Cochabamba, R3 es el Extracto no polar de *B. papillosa* en diclorometano por 18 horas, R4 es el Extracto etanólico de *B. latifolia* por 37 horas, R5 es el Extracto no polar de *B. papillosa* en diclorometano por 2 horas, S1, S1C, S1P son Extractos acuosos de *B. genistelloides* de La Paz, S2, S2C y S2P son Extractos acuosos de *B. latifolia*, S2O es el Extracto fenólico de polaridad media de *B. latifolia*, S3, S3C S3P son Extractos acuosos de *B. genistelloides* de Cochabamba, E10C, E10P, E20C y E20P son extractos polares etanólicos de *B. latifolia*. Los Controles positivos Ketoconazol comprimidos simbolizado como K, KJ representa a Ketoconazol Jarabe y F es Fluconazol I.V.

REFERENCIAS

- 1 Cañigueral Salvador, Las monografías de calidad seguridad y eficacia en el uso racional de los preparados a base de plantas medicinales, Rev. de Fitoterapia 2006; 6 (S1):25–29
- 2 Vázquez Alvaro, Control de Calidad de Medicamentos herbarios: ¿Cómo y Cuánto?, Resúmenes del VI Congreso de FeFaS- Abril 2000 – Uruguay
- 3 FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la alimentación, OIT). El futuro de la agricultura depende de la biodiversidad. 2004
- 4 Vidaurre de la Riva, et. al., Plantas medicinales en los andes de Bolivia, Botánica Económica de los Andes Centrales, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, 2006:268-284
- 5 Cañigueral Salvador, Vila Roser, La Fitoterapia como herramienta terapéutica, Ginecología y Obstetricia Clínica 2005; 6(1):43–51
- 6 Carrillo-Muñoz A.J., et.al., Una nueva generación de fármacos antifúngicos, Rev. Iberoam. Micol. 2001; 18: 2-5
- 7 Pelaéz García Ma. T., et.al., Nuevos Antifúngicos, Medicine 1998; 7(91):4251-4262
- 8 Sánchez Carazo J.L., et.al., Tratamiento actual de las micosis superficiales, Rev. Iberoam. Micol. 1999; 16: S26-S30
- 9 Organización Mundial de la Salud, Estrategia Mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos. WHO/CDS/CSR/2001.2
- 10 Villagrán C., et.al., Etnobotánica del Sur de los Andes de la Primera Región de Chile: Un enlace entre las Culturas Altiplánicas y las de Quebradas Altas del Loa Superior, Chungara, Revista de Antropología Chilena, 2003; 35(1):73–124
- 11 Siqueira N.C.S. de, et.al., Aspectos farmacognósticos e perfil cromatográfico dos constituintes de *Baccharis articulata* Lam. (Pers.), Compositae, Caderno de Farmacia, 1988; 4(1):63–76
- 12 Macía M.J., Las plantas de fibra, Botánica Económica de los Andes Centrales, Editores: M. Moraes R., B. Øllgaard, L. P. Kvist, F. Borchsenius & H. Balslev, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, 2006:370–384
- 13 Madeira Moreira F. P., et.al., Flavonoides e Triterpenos de *Baccharis pseudo tenuifolia* – Bioatividade sobre *Artemia salina*, Quim. Nova, 2003; 26(3):309–311
- 14 Davicino R., et.al., Actividad antifúngica de extractos de plantas usadas en medicina popular en Argentina, Rev. Perú. Biol., 2007; 14(2):247-251
- 15 Marín Ocampo A. M., et.al., Actividad antifúngica de los extractos aquosos de *Baccharis trinervis*, *Baccharis latifolia* y *Solanum dolichosepalum*, Biosalud, 2006; 5:51–59
- 16 Rangel D., et.al., Actividad antimicrobiana de los extractos etanólico, acetónico y acuoso de *Baccharis nitida* (Ruiz et Pavon) Pers, Revista de la Facultad de Farmacia, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela, 2001; 42:43–46
- 17 Chidiak Soley, et.al., Flavonoides aislados de la especie *Baccharis nitida* (Ruiz et Pavon Pers), CIENCIA 2007;15(3), 361–365
- 18 Gonzaga Verdi L., et.al., Género *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos químicos, económicos e biológicos, Quim. Nova, 2005; 28(1):85–94
- 19 Almanza G. R., et.al., Estudio Fitoquímico de *Baccharis leptophylla* Biodirigido contra *Neurospora crassa*, Rev. Bol. Quím., 2000; 17 (1):1–8
- 20 Abad M.J., et.al., Anti-inflammatory activity of four Bolivian *Baccharis* species (*Compositae*), Journal of Ethnopharmacology, 2006; 103:338–344
- 21 Coelho M.G.P., Anti-arthritis effect and subacute toxicological evaluation of *Baccharis genistelloides* aqueous extract, Toxicol. Lett. 2004;154:69–80
- 22 Salcedo Lily, et.al., Aislamiento de Flavonoides y Estudio de la Actividad Tóxica y Antibacteriana de Extractos de *Baccharis Latifolia* Rev. Bol. Quím. 2003, 20 (1): 43–48
- 23 Guardiola Gómez Luís, Tesis Doctoral: "Actividad y Farmacodinamia de cinco Antifúngicos frente a *Cryptococcus neoformans*", Universidad Complutense de Madrid, 1997
- 24 Cantón Emilia, et.al., Curvas de Letalidad en antifúngicos, Rev. Iberoam. Micol. 1999; 16: 82–85