



### Inhibición de *Cándida albicans* por *Prosopis laevigata*

María Porfiria Barrón-González\*, Valeria Medina-Ortiz, Yadira Quiñones-Gutiérrez, Ramón Rodríguez-Garza, Beatriz Licea-Guajardo, Daniel Eguiarte-Lara.



\*maria.barrongn@uanl.edu.mx

#### Resumen

**Introducción:** Las candidiasis son las infecciones micóticas más frecuentes, se presenta en forma de una placa blanquecina en el epitelio de la mucosa oral que se desprende fácilmente al tacto, puede llegar a ocasionar infecciones, el tratamiento de elección son drogas inespecíficas que dañan el ergosterol de la membrana celular de *C. albicans*, pero también llegan a afectar el colesterol de las células del paciente, entre otras afecciones. **Objetivo:** Evaluar la actividad biológica del extracto etanólico de *P. laevigata* sobre *C. albicans*. **Materiales y Método:** Se obtuvo el extracto etanólico de hojas de *P. laevigata*, se evaluó in vitro la actividad inhibitoria sobre *C. albicans*, se diseñó adyuvante para instalar la infección de *C. albicans* y para dosificar el tratamiento en un modelo murino Balb/C. **Resultados:** En este trabajo se demuestra que el extracto etanólico de *P. laevigata* inhibe in vitro y en modelo murino a *C. albicans*, además presenta moderada actividad citotóxica. **Conclusiones:** Los tratamientos fueron encapsulados y dosificados a modelos murinos, siendo este procedimiento novedoso y poco invasivo para el tratamiento de la candidiasis. A demás de brindar una alternativa de tratamiento contra la candidiasis.

**Palabras claves:** *Candida albicans*, *Prosopis laevigata*, Candidiasis.

#### Abstract

**Introduction:** Candidiasis is the most frequent mycotic infections, it appears in the form of a whitish plaque on the epithelium of the oral mucosa that is easily detached to the touch, it can cause infections, the treatment of choice is nonspecific drug that damage the ergosterol of the cell membrane of *C. albicans*, but they also affect the cholesterol of the patient's cells, among other conditions. **Objective:** To Evaluate the biological activity of the ethanolic extract of *P. laevigata* on *C. albicans*. **Materials and Method:** The ethanolic extract of *P. laevigata* leaves was obtained, the inhibitory activity on *C. albicans* was evaluated in vitro, an adjuvant was designed to install the *C. albicans* infection and to dose the treatment in a Balb/C murine model. **Results:** This work shows that the ethanolic extract of *P. laevigata* inhibits *C. albicans* in vitro and in a murine model and has moderate cytotoxic activity. **Conclusions:** Treatments were encapsulated and dosed to murine models, this being a novel and minimally invasive procedure for the treatment of candidiasis. In addition to providing an alternative treatment against candidiasis.

**Key word:** *Candida albicans*, *Prosopis laevigata*, Candidiasis.

## Introducción

*Candida albicans* es un agente comensal, encontrado en la microbiota normal de la mucosa oral, así como también del tracto gastrointestinal y de la vagina. El balance entre el huésped y este microorganismo pueden convertirse en una relación parasitaria, conocida como candidiasis o candidosis (Singh, Tóth and Gácsér, 2020). Las candidiasis son las infecciones micóticas más frecuentes, se presenta en forma de una placa blanquecina en el epitelio de la mucosa oral que se desprende fácilmente al tacto, puede llegar a ocasionar infecciones, el tratamiento de elección son drogas inespecíficas que dañan el ergosterol de la membrana celular de *C. albicans*, pero también llegan a afectar el colesterol de las células del paciente, entre otras afecciones, se ha reportado que en la farmacocinética de los antimicóticos más frecuentes para tratar la infección se utilizan fármacos de la familia de los azoles y polienicos que dañan el ergosterol de la membrana celular del hongo, pero tiende a dañar el colesterol de la membrana celular que es muy parecido en su estructura con el ergosterol (Catalán y Montejo, 2006). El extracto etanólico de *P. laevigata* podría ayudar en un futuro para el tratamiento de la candidiasis.

La patogenicidad de *C. albicans* está dada principalmente por la característica polimórfica que tiene, es decir, que puede cambiar la forma estructural de su célula levaduriforme ovalada a células en forma de elipse las cuales tienen a evolucionar en formas de pseudohifas (Filler, 2012). A pesar de que ambas formas son propuestas como patógenas, se considera que la forma de pseudohifa es la forma en que *C. albicans* comienza su fase de invasión, en donde penetra el epitelio y establece su crecimiento, que es propiciado por la liberación de enzimas que contribuyen a la invasión y adhesión de *C. albicans*; y el tratamiento para infecciones de mucosas está dominado por los agentes antifúngicos de tipo azoles (drogas utilizadas tópica o sistémicamente), y debido a que estas drogas presentan múltiples efectos secundarios indeseables en los pacientes, es recomendable la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas (Kuvarina, Georgieva y Rogozhin, 2021).

Como alternativas de búsqueda de antimicóticos, la herbolaria es una alternativa viable en México, debido a la gran diversidad etnobotánica, por lo cual se seleccionó a *P. laevigata* (Humb. et Bonpl. ex Willd) para este propósito. A la cual se le atribuyen diversas propiedades medicinales, por ejemplo: de las hojas se obtiene un bálsamo utilizado para combatir la disentería e infecciones en los ojos; y la corteza se utiliza como vomitivo-purgante (Rodríguez, et al., 2014). El objetivo del presente trabajo fue determinar la actividad antimicótica del extracto etanólicos de *P. laevigata* sobre *C. albicans*.

## Materiales y Métodos

***C. albicans*:** Se obtuvo la cepa de *C. albicans* del ATCC® 90029. La activación se realizó en el medio de cultivo YPD-caldo que se indica para el crecimiento de la cepa según las instrucciones del ATCC. Para realizar la cinética de crecimiento, se inocularon 75 µL del cultivo de *C. albicans* en un tubo con 3 mL medio líquido YPD, se incubaron a 37°C, seguido de una medición de su turbidez cada hora, cuyos resultados se graficaron para determinar la curva de crecimiento. La lectura se realizó en tres eventos independientes por triplicado.

**Material vegetal y tamizaje fitoquímico parcial:** Al material vegetal colectado se le realizó el lavado de las hojas con agua destilada posteriormente fue secado a temperatura ambiente, triturado para luego realizar la extracción con etanol al 70%, eliminando el solvente mediante un rotavapor Büchi y almacenando en un frasco ámbar. Al extracto etanólico de la hoja de *P. laevigata* se le realizaron pruebas de identificación fitoquímica (Rodés, Peña y Hermosillo, 2015).

**Prueba de citotoxicidad:** Se utilizó la línea celular de Riñón de Mono Verde de África /VERO (ATCC® CCL-81), se siguió la técnica del MTT (Mosmann, 1983).

**Actividad inhibitoria del extracto etanólico de *P. laevigata* sobre *C. albicans*:** Método de vertido en placa: Se seleccionó la concentración de 2500 µg/ mL de EE-PI con mayor actividad biológica sobre *C. albicans*. En tubos de 13x150 mm se les añadió un volumen de 9mL de solución salina de NaCl 0.85% estéril y se agregó 1mL de la mezcla de los tratamientos y *C. albicans*, realizando diluciones seriadas 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-12</sup>, enseguida se agregó 1mL de las diluciones 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-12</sup> en placa de Petri por triplicado de cada uno de los tratamientos. Enseguida se agregaron 15 mL de agar YPD, se mezcló el contenido y se incubaron las placas a 37°C por 24 horas. Finalmente, se determinó la actividad biológica de los tratamientos por el método de recuento en placa, posteriormente se analizaron los resultados empleando el programa Microsoft Excel 2018.

**Microencapsulación:** Se empleó la técnica con alginato de sodio como soporte de inmovilización (Champagne y Fustier, 2007). Se prepara la solución de alginato de sodio, se esteriliza y posteriormente se mezcla con la concentración deseada de: a) *C. albicans*, b) extracto etanólico de *P. laevigata* (EE-PI) o c) Nistatina®.

**Bioensayo en modelo murino Balb/c:** Se dosificaron a ratones Balb/c dosis conocidas de capsulas conteniendo *C. albicans* por dos semanas, cada tercer día. Se determinaron las UFC/mL en heces de Balb/c. Se dosificaron los tratamientos encapsulados (EE-PI y Nistatina®) por dos meses, se registró el peso y se determinaron las UFC/mL por gramo de heces de cada ratón en tratamiento (9 individuos por tratamiento). Se trabajó conforme a NOM-062 para el manejo de animales.

## Resultados

**Análisis fitoquímico de los extractos etanólicos:** En el extracto etanólico de *P. laevigata* se encontraron insaturaciones, esteroides y triterpenos, carbohidratos y sesquiterpenlactonas.

## Determinación del porcentaje de inhibición de *C. albicans*

**a).-Bioensayo *in vitro*:** En la tabla I se muestran los valores de inhibición porcentual que presentó el extracto etanólico de *P. laevigata* sobre el cultivo de *C. albicans* a las dosis de 2500 µg/mL, observando 99.994 y 99.999 % de inhibición respectivamente. La droga de elección, la Nistatina a 2 µg/mL inhibió un 84.38%, estos resultados no muestran diferencia significativa entre estos tratamientos, pero sí con respecto a la Nistatina®.

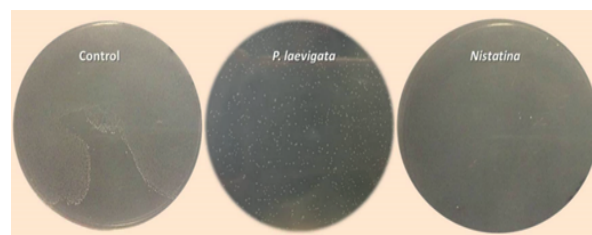


Figura 1. Comparación de las UFC/mL de *C. albicans* obtenidas en presencia del extracto de *P. laevigata* [2500 µg/mL] y de Nistatina® [2 µg/mL].

**b).- Bioensayo *in vivo*:** Después de haber sido establecida la infección de *C. albicans* en el modelo murino Balb/c, se dosificaron a los tratamientos por 2 semanas el extracto etanólico de *P. laevigata* y Nistatina® encapsulados, mezcladas con el alimento, se obtuvo que los ratones administrados con Nistatina® fue el que presentó mayor inhibición de *C. albicans* con 99.68 y 72 % de inhibición respectivamente (Tabla 1)

**Tabla 1.** Inhibición (%) de *C. albicans* por *P. laevigata* bajo condiciones *in vitro* e *in vivo*

Modalidad de Bioensayo	Inhibición (%)	
	Extracto etanólico <i>P. laevigata</i> [2500 µg/ml]	Nistatina [2 µg/ml]
In vitro	99.994	84.38
In vivo	72.00	99.68

Fuente: autoría propia

## Discusión

Existen diversos reportes en los cuales evalúan la actividad antimicrobiana de extractos de especies de *Prosopis* sp; en uno de ellos reportan la actividad antibacteriana del extracto hexánico y cetónico de *P. laevigata* sobre *Staphylococcus aureus* (Salinas, et al., 2009) determinando la concentración mínima inhibitoria (CMI) y obteniendo 0.5 y 4 mg/mL respectivamente. En otro estudio evaluaron el extracto acuoso, metanólico, cetónico y de éter de petróleo de *Prosopis glandulosa* sobre *C. albicans* aisladas de pacientes con infección vaginal reportando susceptibilidad al emplear discos conteniendo 50 mg del extracto (Lone, Priya, Menaka, Sivasankari y Lone, 2015). Se reportó también que, nanopartículas de quitosán con extracto cetónico de rama de mezquite (*P. glandulosa*) al 2% presentó CMI de 125 mg/mL para *Candida parapsilosis* y 250 mg/mL para *C. albicans* (Marszalek, 2019).

En este trabajo, fue evaluada la actividad antimicótica del extracto etanólico de *P. laevigata* sobre *C. albicans*, se realizó la determinación de las Unidades formadoras de colonia por mL (UFC/mL) y se obtuvo inhibición de 99.994%, se realizó esta prueba debido a que es más precisa que la determinación de sensibilidad por difusión en disco o Prueba de Bauer-Kirby (Metin, et al., 2011).

Al emplear microcápsulas conteniendo tanto *C. albicans* dosificadas a murinos Balb/C para instalar la micosis sistémica, así como para dosificar los tratamientos antimicóticos, se observó que esta técnica permite dosificar tratamientos sin ser invasivo, y permiten que los extractos mantengan sus características. La técnica de microencapsulación es ampliamente empleada en la industria de los alimentos ya que esaralidad y protección de los compuestos bioactivos; sin embargo recientemente se ha empleado para encapsular vitaminas, hierro, nutraceuticos, y permitir mayor protección del material de interés, encaminado a tener una mayor biodisponibilidad del producto (Durán, Villalobos, Churio, Pizarro y Valenzuela, 2017). Esta técnica tiene como beneficio la protección de los extractos hacia el entorno, lo

cual asegura mayor estabilidad reológica, y es necesario realizar más estudios encaminados para encontrar las condiciones de composición de la microcápsula que le permita la liberación del contenido en el sitio de interés de acción del agente químico en el modelo murino.

## Conclusiones

El extracto etanólico de hoja de *P. laevigata* inhibe el crecimiento *in vitro* e *in vivo* de *C. albicans*.

## Referencias Bibliográficas

Catalán M. y Montejo JC. (2006). Antifúngicos sistémicos. Farmacodinámica Y Farmacocinética. Revista Iberoamericana de Micología, 23(1), 39 – 49. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1130140606700122#section-cited-by>

Champagne, C. P. and Fustier, P. (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. Current opinion in biotechnology, 18(2), 184-190. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.03.001>

Durán, E., Villalobos, C., Churio, O., Pizarro, F., & Valenzuela, C. (2017). Encapsulación de hierro: Otra estrategia para la prevención o tratamiento de la anemia por deficiencia de hierro. Revista chilena de nutrición, 44(3), 234 - 243. <https://doi.org/10.4067/s0717-75182017000300234>

Filler, S.G., (2012). Insights from human studies into the host defense against candidiasis. Cytokine, 58,129-13. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2011.09.018>

Kuvarina, A.E., Georgieva, M.L. y Rogozhin, E.A. (2021). Potencial antimicrobiano del hongo alcalofílico *Sodiomyces alkalinus* y selección de cepas productoras de nuevos compuestos antimicóticos. Appl Biochem Microbiol, 57:86–93. recuperado de <https://link.springer.com/article/10.1134/S0003683821010142>.

Lone, T.A., Priya U., Menaka, S, Sivasankari, M. y Lone, R.A. (2015). *Prosopis glandulosa* medicinal plant an alternative medication against clinical pathogen *Candida albicans*. *Int J Pure App Biosci*, 3(3), 254-61. Recuperado de [https://www.researchgate.net/publication/279960346\\_Prosopis\\_glandulosa\\_Medicinal\\_Plant\\_An\\_Alternative\\_Medication\\_Against\\_Clinical\\_Pathogen\\_Candida\\_albicans](https://www.researchgate.net/publication/279960346_Prosopis_glandulosa_Medicinal_Plant_An_Alternative_Medication_Against_Clinical_Pathogen_Candida_albicans)

Marszalek, J. (2019). Determinación preliminar del potencial bioterapéutico de nanopartículas de quitosano plus extracto de *Prosopis* contra *Candida albicans*, 4. 225-229. Recuperado de <http://www.investigacionyposgrado.uadec.mx/site/wp-content/uploads/2020/07/2019-Normal.pdf>

Metin, D.Y., Hilmioglu, S., Samlioglu, P., Doganay, B., Inci, R., and Tumbay, E. (2011). Evaluation of antifungal susceptibility testing with microdilution and E-test methods of *Candida* blood isolates. *Mycopathologia*, 172(3):187-99. <https://doi.org/10.1007/s11046-011-9413-y>

Mosmann, T. (1983) Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. (<http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/062ZOO.PDF>).

Rodés, S., Peña, D., y Herмосilla, R. (2015). Tamizaje fitoquímico de extractos y tinturas al 20 % de la raíz y corteza de *Dichrostachys cinerea* L. (Marabú). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 20(2), 156-166. Recuperado de [http://scielo.sld.cu/scielolp.php?script=sci\\_arttext&pid=S1028-47962015000200002&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielolp.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962015000200002&lng=es&tlng=es).

Rodríguez, E., Rojo, G., Ramírez, B., Martínez, R., Cong, M., Medina, S. y Piña, H. (2014). Análisis técnico del árbol del mezquite (*Prosopis laevigata* Humb. & Bonpl. ex Willd.) en México. *Ra Ximhai*, 10(3),173-193. Universidad Autónoma Indígena de México El Fuerte, México. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/461/46131111013.pdf>

Salinas, D.O., Arteaga, G.L., León, I., Dorado, O., Valladares, M.G., y Navarro, V.M. (2009). Antimicrobial activity of medicinal plants from the Huautla Sierra Biosphere Reserve in Morelos (México). *Polibotánica*. 28,213-225. Recuperado de: <https://www.scielo.org.mx/pdf/polib/n28/n28a10.pdf>

Singh, D.K., Tóth, R., and Gácsér, A. (2020). Mechanisms of Pathogenic *Candida* Species to Evade the Host Complement Attack. *Front Cell Infect Microbiol*, 12,10:94. DOI: <https://doi.org/10.3389%2Ffcimb.2020.00094>