

Efecto antifúngico *in vitro* del látex de *Croton lechleri* (sangre de grado) frente a *Candida albicans* ATCC 10231

In vitro antifungal effect of latex of *Croton lechleri* (dragon's blood) over *Candida albicans* ATCC 10231

Ever Manuel Vásquez Torrejón¹, Marcos Jimmy Carruitero Honores²

Recibido: 15 de junio de 2016

Aceptado: 30 de junio de 2016

Resumen

Esta investigación tuvo como objetivo determinar el efecto antifúngico *in vitro* del látex de *Croton lechleri* (sangre de grado) frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Se usó un diseño experimental *in vitro*. Para determinar la concentración mínima fungicida y la sensibilidad de la *Candida albicans* frente al látex de *Croton lechleri*, se evaluaron cinco concentraciones (16 repeticiones para cada una) del látex de sangre de grado (0%, 25%, 50%, 75% y 100%) mediante extracto etanólico, empleándose fluconazol como control para la prueba de sensibilidad. El análisis estadístico se realizó mediante las pruebas Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney para comparar las concentra-

ciones por pares. La significancia estadística fue considerada al 5%. Hubo crecimiento negativo de colonias (menores a 16 ufc/ml), disminuye el recuento al aumentar la concentración del látex, cuando la concentración mínima fungicida fue 25%. La *Candida albicans* presentó sensibilidad frente a todas las concentraciones estudiadas. El látex de *Croton lechleri* es un agente altamente fungicida para *Candida albicans*. Se sugiere la investigación de este efecto *in vivo*.

Palabras clave: Látex de *Croton lechleri*, *Candida albicans*, efecto antifúngico.

Abstract

The aim of this research was to determine the antifungal effect *in vitro* of the latex of *Croton lechleri* (dragon's blood) against *Candida albicans* ATCC 10231. An *in vitro* experimental design was used. To determine the minimum fungicide concentration and the susceptibility of *Candida albicans* against the latex of *Croton lechleri*, five concentrations (sixteen repetitions for each one) of dragon's blood latex (0%, 25%, 50%, 75% and 100%) through ethanolic extract were evaluated, using fluconazol as a control for the susceptibility test of *Candida albicans*. The statistical analysis used were Kruskal-Wallis and U of Mann-Whitney tests to compare the concentrations by pairs. The

statistical significance was considered at 5%. The results showed negative growth of colonies (lower than 16 ufc/ml), decreasing this recount when the concentration of the latex increases; therefore, the minimum fungicide concentration was 25%. The *Candida albicans* showed sensibility against all of the concentrations of latex. Latex of *Croton lechleri* is a highly fungicidal agent against *Candida albicans*. It is suggested the investigation of this effect *in vivo*.

Key words: Latex of *Croton lechleri*, *Candida albicans*, antifungal effect.

1. Cirujano dentista. Policía Nacional del Perú. evast41@hotmail.com

2. Cirujana dentista. Doctor en Estomatología. Docente de la Universidad Privada Antenor Orrego.

I. INTRODUCCIÓN

Las infecciones micóticas son relevantes en las enfermedades infecciosas.¹⁻⁴ La candidiasis es la infección oportunista más importante y de mayor frecuencia en la cavidad bucal, afecta a ambos sexos y a cualquier edad.^{1,4-7} Incluye ocho especies de hongos, de las cuales, la especie *albicans* es la que produce enfermedades con mayor frecuencia.^{4,8}

Candida albicans es un hongo asexual dimórfico que presenta una pared celular compuesta, fundamentalmente, por polisacáridos (30-50%) y diversas proteínas (20-40%). En su pared celular existen estructuras fibrilares que participan en su adhesión celular al huesped.^{1,6,8} Presenta factores de virulencia importantes que facilitan la colonización y la infección del hospedador.^{6,9,10} Su patogenicidad es débil y refleja la necesidad de factores predisponentes locales o sistémicos.¹¹⁻¹³

En el tratamiento de la candidiasis oral, se usan con frecuencia los antifúngicos tópicos que no se absorben por vía digestiva.¹⁴ En candidiasis rebeldes y en pacientes con patología sistémica grave, se recurre a antifúngicos sistémicos más activos como el fluconazol, itraconazol, anfotericina B y el ketoconazol.¹⁵

El conocimiento, utilización de la fitoterapia con fines médicos son más frecuentes, ya que representa una parte importante de nuestros recursos terapéuticos.^{16,17} Existen estudios científicos que muestran la utilización del látex de *Croton lechleri* (sangre de grado) de forma tradicional en candidiasis orales en poblaciones indígenas y tribus amazónicas.¹⁸⁻²⁰ Se trata de un árbol perteneciente a la familia de las Euforbiáceas; en el Perú, se encuentra en los departamentos de Loreto, San Martín, Huánuco, Cerro de Pasco, Cuzco, Madre de Dios y Ucayali, cuyas propiedades medicinales se encuentran principalmente en los componentes del látex de la corteza del árbol.²¹ Conocido y estudiado como cicatrizante, antiinflamatorio, antimicrobiana y antiviral.²²

Métodos empleados para evaluar el efecto antifúngico son la prueba de sensibilidad y la concentración mínima inhibitoria, que evalúan la eliminación de los microorganismos viables después de un tiempo determinado de incubación, tal como se ha reportado en el estudio Huapaya y col²³ (2003), quienes observaron, *in vitro*, que en muestras de sangre de grado, había recuentos de colonias muy bajas de levaduras. Herforth y col²⁰ (2002), al igual que Gálvez y col²⁴ (2006), observaron específicamente actividad antifúngica frente a *Candida albicans*.

En tal sentido se planteó el presente estudio con el objetivo de determinar el efecto antifúngico *in vitro* del látex de *Croton lechleri* (sangre de grado) frente a *Candida albicans* ATCC 10231.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio prospectivo, comparativo y experimental. Se realizaron 16 repeticiones²⁵ para cada concentración del látex de sangre de grado (0%, 25%, 50%, 75% y 100%) en placas Petri conteniendo la macrodilución de caldo glucosado del microorganismo de prueba: *Candida albicans* ATCC 10231 y la concentración del látex de *Croton lechleri*, al igual que los discos de inhibición por concentración. Se excluyeron y eliminaron las placas Petri que no cumplieron con los criterios de selección.

Descripción del procedimiento

Obtención del látex de *Croton lechleri*

La corteza del árbol que contiene el látex de *Croton lechleri* (sangre de grado) fue recolectada en el distrito de Moyobamba, Región San Martín. Fue identificada por un especialista en Botánica y Herbología y posteriormente, filtrada de las fracciones de corteza y almacenada en frascos ámbar, hasta su posterior utilización.

Preparación del extracto del látex de *Croton lechleri*

Se midió 25 mL, 50 mL y 75 mL de látex, para las concentraciones de 25%, 50% y 75%, respectivamente; trasvasando cada volumen a un balón de vidrio de 250 mL de capacidad. Luego, se agregó 80 mL de etanol de 30° GL, se sometió a reflujo con ayuda de agitador magnético y temperatura de 50 °C por cuatro horas; posteriormente, se filtró con papel Whatman y ayuda de vacío, se transvasó a una fiola de 100mL y aforó con etanol de 30° GL. Para la concentración del 100%, se midió 100 mL de látex en una fiola de 100 mL, para finalmente almacenarlos en diferentes frascos ámbar.

Obtención de la cepa

La cepa de *Candida albicans* ATCC 10231 se obtuvo del laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de Trujillo, para posteriormente ser inoculada en caldo glucosado y colocada en una estufa a 37 ° C para obtener una cepa joven, después de 24 h. La concentración del cultivo se comparó con el tubo N° 0.5 de la escala Mac Farland, que corresponde a 10⁸ hongos/mL.

Determinación de la concentración mínima fungicida (CMF)

La CMF se determinó con diluciones de 0%, 25%, 50%, 75%, 100% del látex en tubos de ensayo; luego, se adicionó 0.2 mL de la macrodilución en caldo glucosado de la cepa de *Candida albicans* en los tubos correspondientes, los cuales se homogenizaron manualmente mediante agitación. La macrodilución se dividió en cuatro grupos, según cada concentración de látex y un control (caldo glucosado, 0%). Los tubos de ensayo fueron incubados a 37 ° C por 24 h.

De las diluciones preparadas en el paso anterior se adicionó 0.1 mL, de cada uno de los tubos de ensayo, en placas Petri que contenía agar Sabouraud para *Candida albicans*; luego, se procedió a extender en todas las direcciones con ayuda de la espátula Drigalsky previamente esterilizada, hasta que estuvo completamente seco. Las placas en posición invertida, se incubaron a 37° C por 24 h. Después del periodo de incubación se examinaron las placas. La CMF se determinó mediante el conteo de las unidades formadoras de colonias (ufc),²⁶ utilizando una cámara contadora de colonias.

Sensibilidad de la *Candida albicans* frente al látex de *Croton lechleri*

Para la prueba de sensibilidad, se prepararon cuatro diluciones a las concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100% del látex de *Croton lechleri*. Dichas diluciones se conservaron a 4 ° C. Se utilizó el método de difusión en discos. Se prepararon discos de papel de filtro estériles, los cuales fueron sumergidos dentro de cada una de las concentraciones; luego, con una aguja estéril, fueron colocados sobre los cultivos de *Candida albicans* en placas Petri, previamente, preparados. Se realizaron 16 repeticiones por cada concentración. Posteriormente, las placas se incubaron a 37 ° C en estufa. Todo el procedimiento se llevó a cabo dentro del diámetro de 10 cm de la llama de un mechero. La lectura se llevó a cabo a las 24 h. Se midió el diámetro de los halos de inhibición en mm, con un calibrador Vernier.

Análisis estadístico de la información

Los datos recolectados fueron procesados de manera automatizada con el programa SPSS Statistics 19. Los valores de todos los grupos no cumplieron con el supuesto de normalidad, luego de aplicar la prueba Shapiro-Wilk; en consecuencia, las comparaciones fueron realizadas empleando el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y las pruebas de comparaciones de Mann-Whitney. La significancia estadística fue considerada al 5%.

III. RESULTADOS

La CMF in vitro del látex de *Croton lechleri* frente a *Candida albicans* ATCC 10231 fue de 25%. Hubo diferencia altamente significativa ($p < 0.001$) entre el promedio del grupo control (0%) con las demás concentraciones (25%, 50%, 75%, 100%) [Tabla 1, Gráfico 1]. La sensibilidad in vitro de la *Candida albicans* ATCC 10231 frente al látex de *Croton lechleri* se dio en todas las concentraciones; se encontró diferencia altamente significativa ($p < 0.001$) entre el grupo control y las concentraciones del látex (25%, 50%, 75% y 100%) [Tabla 2, Gráfico 2].

Tabla 1
Concentración mínima fungicida in vitro de las concentraciones del látex de *Croton lechleri* al 25%, 50%, 75% y 100% frente a la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231

Grupo	Promedio	Desviación estándar	Subgrupos para prueba de Mann-Whitney**	P*
0% (n=16)	1.56x10 ⁹	2.25x10 ⁹	a	< 0.001
25% (n=16) ^c	15.69	31.03	b	
50% (n=16)	9.94	12.14	b	
75% (n=16)	3.63	3.32	b	
100% (n=16)	0.69	2.50	b	

* Kruskal - Wallis; ** a diferente de b ($p < 0.05$); c, concentración mínima fungicida.

Gráfico 1
Recuento de unidades formadoras de colonias de *Candida albicans* ATCC 10231 por concentraciones

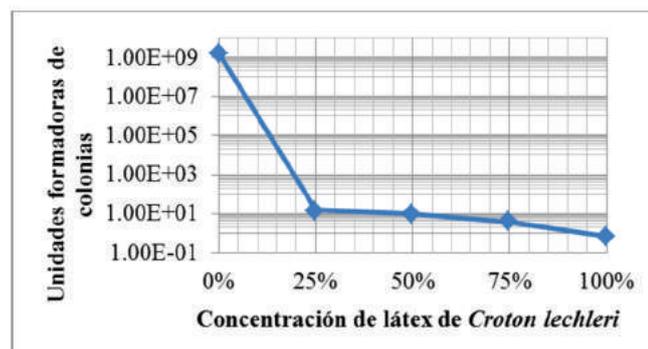


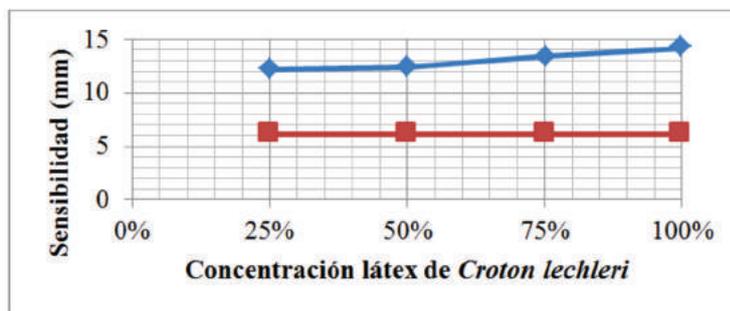
Tabla 2
Sensibilidad (en mm) in vitro de la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231 frente al látex de *Croton lechleri*

Grupo	Promedio	Desviación estándar	Subgrupos para prueba de Mann-Whitney**	p*
Control [Fluconazol](n=16)	6.13	0.50	a	
25% (n=16)	12.19	2.32	b	< 0.001
50% (n=16)	12.38	1.54	b	
75% (n=16)	13.38	2.03	b	
100% (n=16)	14.19	1.28	b	

* Kruskal - Wallis p < 0.001; ** a diferente de b (p < 0.05). b, Concentraciones a las cuales es sensible la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231

Gráfico 2

Sensibilidad de la *Candida albicans* frente a las diferentes concentraciones del látex (línea azul) de *Croton lechleri* y el control (fluconazol, línea roja)



IV. DISCUSIÓN

La CMF es conocida como la mínima concentración de antifúngico que elimina más del 99.9% de los microorganismos viables después de un tiempo determinado de incubación. En el presente estudio se determinó la CMF mediante la siembra en placas Petri obteniéndose como resultado una CMF de 25% con valores menores a 16 ufc/mL (negativo), y diferencias significativas con el grupo control negativo (0%), donde se desarrolló 109 ufc/mL de *Candida albicans*. De manera similar, Huapaya y col23 (2003) encontraron, en un estudio *in vitro*, que en muestras de látex de sangre de grado procedentes de Moyobamba, Tingo María y Pucallpa habían recuentos de colonias de *Candida albicans* menores que 10 UFC/mL (negativo) en concentraciones de 50% y 100%.

Por otro lado, la sensibilidad *in vitro* frente a una sustancia se puede dar de tres formas, dependiendo del diámetro del halo de inhibición (mm): resistente (menor que 6 mm), medianamente sensible (entre 6 y 9 mm) o sensible (mayor que 9 mm).²⁶

Respecto a la sensibilidad, se obtuvieron diámetros de halos de inhibición de 6.13 mm para el fluconazol y diámetros mayores que 12 mm, en promedio, para las diferentes concentraciones de sangre de grado. El mayor efecto antifúngico la concentración al 100%, con 14.19 mm observándose mayor efecto a mayor concentración. Resultados similares fueron reporta

dos por Herforth y col20 (2006), quienes encuentran sensibilidad con halos entre 4.1 y 10.0 mm de diámetro de la cepa de *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae* frente al látex de *Croton lechleri*, empleando una concentración estándar de 25 mg/mL.

El efecto antifúngico del latex frente a *Candida albicans* puede atribuirse a sus propiedades medicinales que se encuentran principalmente en la corteza del árbol, como los lignanos y polifenoles (proantocianidina SP-303, 1,3,5-trimetoxibenceno y el 2,4,6-trimetoxifenol), los cuales pueden desnaturar las enzimas responsables del inicio de la gemación. Además, debido a su carácter hidrofóbico interactúan con los lípidos de la membrana citoplasmática causando la pérdida de la integridad y la de material celular, tales como los iones, ATP y ácidos nucleicos, logrando la muerte del hongo.^{21,22,29}

En el presente estudio se halló que el látex de *Croton lechleri* tuvo mayor efecto que el fluconazol. Se ha reportado una posible resistencia de la *Candida albicans* al fluconazol, atribuible a la modificación de la enzima blanco (14- α -esterol-demetilasa o Erg11p) y a la incapacidad de alcanzar concentraciones adecuadas del antifúngico en el sitio de acción por la presencia de barreras de permeabilidad o sistemas de bombeo activo.^{30,31} Zuluaga y col³² (2010) han re-

portado baja sensibilidad de especies de *Candida* frente al fluconazol, constituyéndose la sangre de grado en una alternativa viable frente a esta resistencia sobre el fluconazol.

Debido a que algunos fungicidas presentan efectos adversos, muchos investigadores en el campo odontológico han mostrado interés por la fitoterapia; de ahí la importancia de comprobar que el látex de *Croton lechleri* posee efecto antifúngico *in vitro* frente a *Candida albicans*, ya que constituye una base para futuras investigaciones y en la elaboración de tratamientos más tolerables y económicos para los pacientes que padezcan de candidiasis oral.

V. CONCLUSIONES

- El látex de *Croton lechleri* (sangre de grado) posee efecto antifúngico *in vitro* frente a la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231.
- La concentración mínima fungicida del látex de *Croton lechleri* frente a la *Candida albicans* ATCC 10231 fue de 25%.
- La *Candida albicans* ATCC 10231 mostró ser susceptible *in vitro* al látex de *Croton lechleri* en las concentraciones del 25%, 50%, 75% y 100%. A mayor concentración, mayor sensibilidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tortora B, Funke R, Case A. Introducción a la microbiología. 9na ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2007.
2. Cevallos E. Fundamentos de oncología. Quito: M&J; 2006.
3. Mosquera J, Galdos P. Farmacología clínica para Enfermería. 3ra ed. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana; 2001.
4. Laskaris G. Pocket atlas of oral diseases. 2da ed. Stuttgart: Thieme; 2006.
5. Sapp P, Eversole L, Wysocki G. Patología oral y maxilo facial contemporánea. 2da ed. Madrid: Elsevier; 2006.
6. Mitchell R, Kumar V, Abbas A, Fausto N. Compendio de Robbins y Cotran: Patología estructural y funcional. 7ma ed. Madrid: Elsevier; 2007.
7. Regezi J, Sciubba J. Patología bucal. 3ra ed. México D.F.: McGraw-Hill-Interamericana; 2007.
8. Negroni M. Microbiología estomatológica, Fundamentos y guía práctica. 2da ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2009.
9. Carrillo A, Brío S, Cárdenas C. Infecciones fúngicas por levaduras y sertaconazol. 1era ed. Lima: Difco; 2006.
10. Muzyka B. Oral fungal infections. 2da ed. New York: Dent clin; 2005.
11. Miloro M, Ghali G, Larsen P, Waite P. Peterson's principles of oral and maxillofacial surgery. 2da ed. Hamilton: BC Decker Inc; 2004.
12. Wolf H, Rateitschak K, Rateitschak E. Periodoncia. 3ra ed. Madrid: Masson; 2005.
13. Shafer W, Levy B. Tratado de patología bucal. 4ta ed. México D.F: Mosby; 2001.
14. Chimenos E, Puy D, López J. Fármacos antifúngicos utilizados en el tratamiento de la micosis. 2da ed. España: Masson; 2005.
15. López-Pintor R. Lesiones orales en pacientes trasplantados renales y factores asociados a su aparición. [Tesis] Madrid: Universidad complutense de Madrid; 2008.
16. Sánchez F. La fitoterapia, medicina natural. 3ra ed. México DF: Mundo Moderno; 2006.
17. Mermoz P. Fitoterapia, algunas plantas y sus efectos. Lima: Fameba; 2002.

18. Williams J. Portal to the interior: viral pathogenesis and natural compounds that restore mImmunity and modulate inflammation. *Alternative Med Review* 2003;8(4):395–409.
19. Rengifo E. Las ramas floridas del bosque: Experiencias en el manejo de plantas medicinales amazónicas. 1ra ed. Iquitos: Gráfica Biblos S.A; 2007.
20. Herforth A, Mosquera E, Ruiz J, Laux M, Rodriguez E. Amazonian women's medicine: Treatments for mycoses. Citado: 10 Oct 2011. Disponible en: URL:http://www.econbot.org/_about_/06_awards/awards_morton/pdfs/a_herforth.pdf
21. Jorge A. Tratado de fitofármacos y nutracéuticos. Buenos Aires: Corpus; 2004.
22. Risco E, Villa R, Henriques A, Cañigual S. Bases químicas y farmacológicas de la utilización de la sangre de grado. *Revista de Fitoterapia* 2005;5(2):101– 14.
23. Huapaya J, Flórez M, Larrea H. Control microbiológico y evaluación de la actividad antibacteriana in vitro de *Croton lechleri* "Sangre de Grado". *Horizonte* 2003;3(1-2).
24. Gálvez L, Roque M, Villavicencio J, Petkova M, Madrid M. Pasta terapéutica anti-A: Producto (2da Parte). *Odontología Sanmarquina* 2006;9(2):3 –7.
25. Dawson B, Trapp G. Bioestadística médica. 4ta ed. México: Manual Moderno; 2005.
26. Sirén EK, Haaosalo MP, Ranta K, Salmi P, Kerosuo EN. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *Int. Endod. J.* 1997;30:91-5.
27. Koneman E, Allen S, Dowell V, Janda W, Sommers H, Winn W. Diagnóstico microbiológico. 3ra ed. Buenos aires: Médica Panamericana S.A.; 1998.
28. Pascuzzo C. Farmacología básica. 1ra ed. Barquisimeto: UCLA; 2008.
29. Shiva C. Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento. [Tesis] Barcelona. Universidad Autónoma de Barcelona; 2007.
30. Gómez C. Resistencia de levaduras del género *Candida* al fluconazol. *Infection* 2010; 14(S2): S172 – S180.
31. Pontón J, Quindós G. Mecanismos de resistencia a la terapéutica antifúngica. *Medicina Clínica* 2006;126(1);56 – 60.
32. Zuluaga A, De Bedout C, Agudelo C, Hurtado H, Arango M, Restrepo A, González A. Sensibilidad a fluconazol y voriconazol de especies de *Candida* aisladas de pacientes provenientes de unidades de cuidados intensivos en Medellín, Colombia (2001 – 2007). *Revista Iberoamericana de Micología* 2010;27(3):125–9.