

Comparación *in vitro* de la acción fungicida de solución saturada de azúcar y nitrato de econazol

Comparison in vitro of saturated saccharose solution fungicide action against econazol nitrate

MEDVEDEFF MG (*), LLORET MA, VEDOYA MC, ESPÍNOLA MA Y HERSZAGE L

Laboratorio de Micología y Cátedra de Farmacotecnia. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones (UNaM). Posadas. Misiones. Argentina. (*) Beato Roque González 835. E-mail: mmedve@infovia.com.ar

RESUMEN

En investigaciones previas realizadas *in vitro* con solución saturada de sacarosa, eugenol y polietilenglicol 400 se comprobó su eficacia fungicida sobre *Candida albicans*.

Se comparó en las mismas condiciones el efecto fungicida con nitrato de econazol. Una suspensión de *Candida albicans* con nitrato de econazol se repicó en Agar Sabouraud 20 a distintos tiempos para demostrar la viabilidad de la cepa.

El tiempo promedio de muerte de *Candida albicans* en la solución saturada de sacarosa fue de 300 segundos, en nitrato de econazol fue de pocos segundos.

Aunque existen diferencias significativas en el tiempo de muerte de la cepa ensayada, la solución saturada de sacarosa sería una contribución terapéutica alternativa, en aquellos pacientes con lesiones cutáneas crónicas que no responden a los tratamientos tradicionales.

PALABRAS CLAVE: fungicida, nitrato de econazol, solución saturada de sacarosa, *Candida albicans*.

ABSTRACT

Previous research projects, carried out in vitro with saturated saccharose solution, checked eugenol and polyethylenglycol 400 for their effectiveness as a fungicide for Candida albicans.

Under the same conditions the fungicidal effect of econazol nitrate was compared. A suspension of Candida Albicans, with econazol nitrate, was finely cut in sabouraud agar 20, over different time periods, in order to demonstrate the viability of the strain.

The average time period in which the death of Candida albicans occurred in the saturated sucrose solution was 300 seconds, while in the case of econazol nitrate a few seconds.

Although significant time differences exist in the death of the strain tested, the saturated sucrose solution could provide an alternative therapeutic contribution for those patients with chronic cutaneous lesions that do not respond to traditional treatments.

KEY WORDS: Fungicide, Econazol nitrate, Saturated sucrose solution, *Candida albicans*.

INTRODUCCIÓN

En todo el mundo las infecciones micóticas son una causa de enfermedad importante y en crecimiento. La resistencia de los microorganismos a los antimicrobianos es un fenómeno bien conocido, sobre todo en el campo de las infecciones bacterianas. Sin embargo, hasta hace poco, no se ha prestado mucha atención a la resistencia de los hongos a los antifúngicos. El incremento de la población infectada por el virus de la inmunodeficiencia humana, del número de pacientes transplantados y de otro tipo de pacientes inmunodeprimidos, ha producido un aumento paralelo de las infecciones fúngicas, del uso de antifúngicos y de la aparición de hongos resistentes a los mismos^{1,2,3}.

En trabajos anteriores, se ha probado la acción fungicida de la solución saturada de sacarosa considerando varios parámetros tales como: temperatura, pH, actividad agua (a_w)⁴.

Se aprovecha la propiedad germicida de la sacarosa para el tratamiento de heridas supuradas^{5,6,7,8} y se prepara una solución saturada de la misma a la que se añade eugenol, quien suma su acción antiséptica^{9,10}. Con el objeto de disminuir aún más el tiempo de muerte de los microorganismos y lograr mayor estabilidad de la solución saturada de sacarosa se dispersa el eugenol en polietilenglicol 400 (PEG 400). Estas experiencias fueron realizadas con éxito *in vitro* observándose cambios celulares con microscopía electrónica en *Klebsiella pneumoniae*¹¹ y por observaciones con microscopía de contraste de fase sobre *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*¹². En el caso de hongos levaduriformes como *Cándida albicans*¹³ y hongos filamentosos dimórficos como *Sporothrix schenckii*¹⁴ se verifica que la sobrevivencia de la célula no supera los segundos.

Ante estos antecedentes se ve la posibilidad de comparar la eficacia fungicida *in vitro* de la solución saturada de sacarosa, eugenol y PEG 400 con nitrato de econazol, antimicótico de uso tradicional en terapéutica.

MATERIALES Y MÉTODOS

a) Cepa de *Candida albicans* y preparación del inóculo: la cepa en estudio fue *Candida albicans* CDC B 385, cedida por el Instituto Na-

INTRODUCTION

All over the world, a major and ever increasing cause of illness has been produced by mycotic infections. The resistance of microorganisms to antimicrobial agents is already a well known phenomenon above all, in the field of bacterial infections. However, until recently, little attention has been given to fungal resistance to fungicidal agents. There has been an increase in the number of people infected by the human immunodeficiency virus, transplant patients and other types of immunosuppressed patients. As a consequence, a parallel increase in fungal infections, the use of fungicides and a corresponding appearance of resistance to antifungal treatments has arisen^{1,2,3}.

In previous works the fungicidal action of saturated sucrose solution has been tested, taking into account such parameters as: temperature, pH, water activity (a_w)⁴.

The germicidal properties of saccharose in the treatment of suppurated wounds are exploited^{5,6,7,8} and a saturated saccharose solution, to which eugenol was added, was prepared. With the objective of reducing death time of the microorganisms and to achieve greater stability in the saturated saccharose solution, eugenol was dispersed in polyethilenglycol 400 (PEG 400). These experiments were carried out successfully *in vitro* observing the cellular changes with an electron microscope in *klebsiella pneumoniae*¹¹ and by observations of *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*¹² with a phase contrast microscope. In the case of fungal yeast forms, such as *Candida albicans*¹³ and dysmorphic filamentous fungus, such as *Sporothrix schenckii*¹⁴, cell survival was not found to last longer than seconds.

Given these precedents, the possibility of making fungicide efficiency comparisons *in vitro* of saturated saccharose solution, eugenole and PEG 400 with econazol nitrate, and antimycotics used in traditional therapy, are considered.

MATERIALS AND METHODS

a) *Candida albicans* strains and inoculum preparation: the strain studied was *Candida albicans* CDC B 385, provided by the National Institute of Microbiology. "Dr. Carlos Malbrán",

cional de Microbiología “Dr. Carlos Malbrán”, la cual se mantuvo por subcultivo quincenal en agar glucosa Sabouraud 20 a 37°C. La composición del medio de cultivo utilizado fue la siguiente: glucosa 20 gr, peptona 10 gr, agar 15 gr. y agua destilada c.s.p. 1000 mL. La suspensión para el estudio de la actividad *in vitro* se preparó en solución salina isotónica estéril, a partir de cultivos de 24 horas de incubación y la densidad de la misma se aproximó al 0,5 de la escala de Mc Farland.

b) Antifúngicos empleados:

— Solución A: solución saturada de sacarosa + eugenol + PEG 400. La solución se preparó con 250 gr de sacarosa común a la cual se agregó 100 mL de agua destilada. Se disolvió a baño María obteniéndose un jarabe transparente. Una vez que adquirió temperatura ambiente se agregó 1,0 mL de eugenol y 1,0 mL de PEG 400.

— Solución B: nitrato de econazol 1% (Micolis^R).

c) Estudio de la actividad antifúngica *in vitro*: se determinó por repique sucesivos a placas de agar glucosa Sabouraud 20, incubadas a 37°C durante 20 días. A 50 µl de la suspensión de *Candida albicans*, preparada por el procedimiento antes mencionado, se agregó 2 mL de la solución antifúngica en ensayo.

Se agitó vigorosamente y se comenzó a tomar el tiempo de contacto entre ambas soluciones. Inmediatamente se sembró con ansa ojal calibrada (10 µL) por períodos regulares a placas de Petri con Sabouraud 20. Las mismas se observaron cada 24 horas durante 20 días.

Para comprobar la viabilidad de la cepa testigo se repicó la misma a agar glucosa Sabouraud 20 en paralelo a cada ensayo.

RESULTADOS

Se realizaron numerosos ensayos previos para determinar el tiempo aproximado de muerte de *Candida albicans* en las distintas soluciones de ensayo. Una vez obtenido el mismo se intensificaron las pruebas dentro de ese rango para tener así mayor precisión en la determinación del tiempo de supervivencia de la cepa sometida a estudio.

and was maintained bimonthly in glucose Sabouraud agar 20 at 37°C. The composition of the culture medium used was as follows: glucose 20 gr, peptone 10 gr, agar 15 gr, and distilled water c.s.p. 1000 mL. The suspension for the study of the activity *in vitro*, was prepared in sterile isotonic saline solution, from cultures incubated for 24 hours with a density of 0.5 on the Mc Farland scale.

b) Fungicides used:

— Solution A: saturated saccharose solution + eugenole + PEG 400. The solution was prepared with 250 gr of common saccharose to which 100 mL of distilled water was added. It was then dissolved in a double boiler until a transparent syrup had been obtained. Once room temperature had been reached, 1.0 mL of eugenole and 1.0 of PEG 400 were added.

— Solution B: econazol nitrate 1% (Micolis^R).

Fungicidal activity study *in vitro*: was determined through successive peelings on sheets of glucose Sabouraud agar 20, incubated at 37° C for 20 days. As prepared in the previously mentioned procedure, 2 ML of the fungicidal solution to be tested was added to 50 µl of the *Candida albicans* suspension.

This was subsequently shaken vigorously and the contact time between the two solutions was measured. It was then immediately seeded with a calibrated loop (10 µL) for regular periods on petri dishes with Sabouraud 20 and was observed every 24 hours for 20 days.

In order to check viability, the double blind strain was finely cut and added to glucose Sabouraud agar 20 in parallel with each test.

RESULTS

Several tests were carried out previously in order to determine the approximate death time of *Candida albicans* in the different test solutions. Once obtained, the tests within this range were intensified so as to achieve greater precision in the determination of survival time of the strain subjected to study.

The last 30 tests were those that were taken into account. In such a way, an average death time in solution A, of 300 seconds was obtained.

Se tomaron en cuenta los últimos 30 ensayos. Así se obtuvo un valor promedio de muerte en la solución A de 300 segundos. Este valor se redujo a 4,9 segundos en los ensayos realizados con nitrato de econazol (solución B).

Los resultados se pueden observar en la Tabla N° 1.

This value was reduced to 4.9 seconds in the tests carried out with econazol nitrate (solution B).

The results can be observed in table N° 1.

TABLA N°1: Valores medios, desviación standard y coeficiente de variación % del tiempo de muerte de *Candida albicans* en solución saturada de sacarosa + eugenol + PEG 400 (solución A) y nitrato de econazol al 1% (solución B).

	Solución A	Solución B
N°de muestras	30	30
Valor medio	300 seg.	4,9 seg.
Desviación standard	17,03	0,78
Coeficiente de variación %	5,67 %	15,91 %

TABLE N° 1: average values, standard deviation and coefficient of variation % of *Candida albicans* death times in saturated saccharose solution + eugenole + PEG 400 (solution A) and econazol nitrate at 1% (solution B).

	Solution A	Solution B
N° of samples	30	30
Average value	300 sec	4.9 sec
Standard deviation	17,03	0,78
coefficiente of variation	5,67 %	15,91 %

DISCUSIÓN

A pesar que se dispone de diversas drogas específicas para el tratamiento de infecciones micóticas, algunas de ellas son difíciles de tratar con los agentes existentes. Si la droga empleada no es lo suficientemente efectiva contra el agente patógeno comprometido, existe el peligro que se produzca una eliminación incompleta de la infección seguida por una recidiva. En el caso de algunas infecciones es necesario prolongar el

DISCUSSION

In spite of the fact that a number of specific drugs treatments are available, some mycotic infections are difficult to treat with existing agents. If the drug used is not sufficiently effective against the pathogen involved, there is a danger that the elimination process may remain incomplete and a subsequent relapse may occur. In the case of some infections the need may arise for long periods of treatment, bringing about the accompanying

tratamiento, con el riesgo concomitante de un pobre acatamiento del paciente. Esto ocurre especialmente en los casos de onicomicosis, que pueden requerir tratamiento de hasta 1 año, lo que trae como consecuencia un alto costo y el abandono del mismo por parte del paciente.

Así de acuerdo con los resultados obtenidos, a pesar de la mayor supervivencia de *Candida albicans* en la fórmula realizada con sacarosa, podría ser tenida en cuenta como alternativa terapéutica.

risk of poor patient compliance with such treatment. This occurs especially in cases of onychomycosis, that may require treatments of up to 1 year and therefore may prove costly and may produce a poor degree of treatment compliance by the patient.

In accordance with the results obtained and in spite of the fact that *Candida albicans* present higher survival times in the formulations carried out with saccharose, these formulations may be considered as an alternative therapeutic treatment.

AGRADECIMIENTO/ACKNOWLEDGEMENTS

Nuestro reconocimiento por la desinteresada colaboración prestada por el Mrs. Miguel E. Schmalko.

Acknowledgements: Our thanks goes to Miguel E. Schmalko for his disinterested help given and to Miguel E. Schmalko.

BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAPHY

1. Denning DW, Baily G, Hood SV. Azole resistance in *Candida*. Eur J Clin Microbiol Dis 1997; 16: 261-280.
2. Hitchcock CA. Resistance of *Candida albicans* to azole antifungal agents. Biochem Soc Trans 1993; 21: 1039-1047.
3. Odds FC. Resistance of yeast to azole-derivate antifungals. J Antimicrob Chemother 1993; 31: 463-71.
4. Fennema OR. Food Chemistry, Third Ed., New York, Marcel Dekker Inc. 1996; 52-54.
5. Joseph A, Montenegro JR, Herszage L. Tratamiento de las heridas supuradas con azúcar granulado comercial. Boletín y Trabajos de la Sociedad Argentina de Cirujanos 1980; 21: 315-350.
6. Herszage L, Montenegro J, Joseph A. Treatment of suppurating wound with comercial granulated sugar. Forum Dr. Med. 1982; 82: 22-30.
7. Chirife J, Herszage L, Joseph A, Kohn E. Sugar and bacterial growth in infected wounds. Antimicrob Agents Chemother 1983; 23: 766-773.
8. Chirife J, Herszage L, Joseph A, Kohn E. *In vitro* study of bacterial growth inhibition in concentrated sugar solutions. Microbiological basis for the use of sugar intreatment infectes wounds. Antimicrob Agents and Chemother 1983; 23: 733-766.
9. Chirife J, Nuñez L, Ballesteros A, Bonzzini J, Herszage L, D'Aquino M. Estudios sobre la acción bactericida del aceite de clavo de olor dispersado en una solución concentrada de azúcar. Rev Argent Microbiol 1992; 24: 32-39.
10. Medvedeff M, Lloret M, Vedoya M, Reza M, Herszage L. Estudio *in vitro* de la acción fungicida del eugenol en solución sobresaturada de azúcar. Rev Argent Micol 1997; 20: 46-52.
11. Bozzini J, Kohn E, Joseph A, Herszage L, Chirife J. Submicroscopical changes in *Klebsiella pneumoniae* cells treated with concentrated sucrose and polyethylene glycol 400 solutions. J Appl Bacteriol 1986;. 60: 375-379.
12. Chirife J, Herszage L, Joseph A, Bozzini J, Leardini N, Kohn E. *In vitro* antibacterial activity of concentrated polyethyleneglycol 400 solutions. Antimicrob Agents Chemother 1983; 24: 409-412.
13. Medvedeff, M., Lloret, M., Vedoya, M., Zaneck, M. Efecto fungicida de la solución saturada de azúcar, eugenol y polietilenglicol 400 sobre *Candida albicans*. Rev Argent Micol 1998; 21: 14-17.
14. Medvedeff, M., Vedoya, M., Lloret M. A., Espínola, M.A., Herszage, L. Bioactividad de la solución saturada de sacarosa sobre *Sporothrix schenkii*. Rev Iberoam Micol 2000; 17: 146-148.