

Composición y actividad antifúngica del aceite esencial de *Fabiana imbricata* contra levaduras del género *Candida*

Composition and antifungal activity of *Fabiana imbricata* essential oil against *Candida* yeasts

Alejandro Martín Madrid-Villegas^{1*}, Camila Marcela Venegas-Valdés¹,
Manuel Alejandro Martínez-Lobos¹, Ana Lizeth Morales-Abularach¹,
Valeska Lorena Calderón-Fernández¹, Susana Belen Flores-González¹,
Vania Catalina Olave-Gonzalez¹, Ignacio Andrés Bravo-Lobos¹

¹Laboratorio de Productos Naturales y Síntesis Orgánica (LPNSO), Departamento de Química, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Playa Ancha, Avda. Leopoldo Carvallo 270, Playa Ancha, Valparaíso 2340000, Chile.

*Autor para correspondencia: alejandro.madrid@upla.cl

RECIBIDO: 28 de Diciembre de 2020

APROBADO: 23 de Abril de 2021



DOI: 10.22370/rev.mat.2.2021.2562

ESTUDIO DERIVADO DE PROCESO DE TESIS DE PREGRADO | EL AUTOR DECLARA NO TENER CONFLICTO DE INTERESES

Palabras claves: *Fabiana imbricata*, *Candida* sp., Fitoterapia.

Key words: *Fabiana imbricata*, *Candida guilliermondii*, Phytotherapy.

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antifúngica del aceite esencial (AE) de *Fabiana imbricata* Ruiz & Pav contra cinco especies de levaduras del género *Candida* comúnmente asociadas a enfermedades ginecológicas. El aceite esencial de las hojas fresca de *F. imbricata* fue obtenido por hidrodestilación y caracterizado mediante la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM). Se evaluó la actividad antifúngica a diferentes concentraciones del AE mediante el método de microdilución. Los compuestos más abundantes identificados en el AE (7a-isopropenil-4,5-dimetiloctahidroinden-4-il) metanol (43,66%), bulnesol (17,02%) y T-muurolol (5,75%). El AE mostró una potente y selectiva actividad antifúngica sobre el crecimiento de especie *Candida guilliermondii*, con una concentración mínima inhibitoria de 10 µg/mL, superior al control positivo clotrimazol que presentó un valor de 15 µg/mL. Estos resultados confirman las propiedades antifúngicas de los aceites esenciales

y su posible uso en el manejo de las infecciones producidas por especies del género *Candida* y como posible alternativa a los fungicidas sintéticos.

ABSTRACT

Candida is a very common type of fungus in humans. The treatment of these pathologies is generally pharmacological which turns out to be very invasive. Due to the above, natural products are presented as a complementary alternative to conventional treatments. In this context, *Fabiana imbricata*, better known as Rosemary Pichi, belonging to the Solanaceae family, stands out. Several studies support the possible antifungal activity of this species.

Therefore, this research seeks to determine the antifungal activity of *Fabiana imbricata* essential oil on the genus *Candida*. The essential oil was obtained by the method of hydrodistillation in Clevenger type apparatus, the characterization of the compounds was through gas chromatography coupled to masses (GC/MS) and the antifungal activity was evalua-

ted under the methodology of diffusion in agar with punching with Vicent & Vicent technique, applied in five types of *Candida* (*C. albicans*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* and *C. tropicalis*).

The majority of the compounds contained in Rosemary Pichi oil correspond to sesquiterpenes, the antifungal properties of the oil stand out in *C. guilliermondii* reaching values of 150 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ compared to the Fluconazole pattern. As mentioned above it is concluded that *Fabiana imbricata* is a promising alternative to combat *C. guilliermondii*.

INTRODUCCIÓN

La candidiasis es una infección provocada por levaduras del género *Candida* y puede afectar a distintas partes del cuerpo, según el tipo de cepa al cual pertenece. Estos hongos son considerados grandes agentes oportunistas (1).

En el último tiempo se ha observado un aumento significativo de especies distintas de *C. albicans*, como agentes de micosis, como lo es la *Candida guilliermondii*, que causa el 0,7 % de las candidiasis a nivel mundial y el 3,7 % en Latinoamérica (2).

La *Candida guilliermondii* es parte de la microbiota normal de la piel y mucosa humana. Es una especie poco común que se asocia con mayor frecuencia a onicomicosis y rara vez se ve como una causa de infección micótica invasiva. Se caracteriza por presentar una susceptibilidad disminuida a los azoles y equinocandidas. Se ha informado principalmente como un agente de sepsis en pacientes con cáncer (3) y en las últimas dos décadas las infecciones han aumentado significativamente en pacientes inmunocomprometidos y pediátricos (4).

Las especies del género *Candida* han mostrado un aumento de su resistencia a los tratamientos farmacológicos, presentando una resistencia al fluconazol que puede variar entre un 6,3 % y un 26,1 %, dependiendo de la especie (2). En vista de esto es que en las últimas décadas ha resurgido la necesidad de buscar alternativas terapéuticas que no sean parte de la línea de medicina convencional, como lo es la fitoterapia.

Las plantas medicinales han sido la base y parte importante de terapias. Sin embargo, el avance en el desarrollo científico a partir del siglo XX trajo aparejado un ingreso masivo al mercado de medicinas

con componentes sintéticos (5). Si bien estos tienen innumerables beneficios en costos y funcionalidad, presentan una gran cantidad de efectos adversos.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) valida el uso de terapias alternativas en el tratamiento, la prevención y la cura de enfermedades, además de tener una relevancia económica importante, si bien aún no se logra armonizar del todo con la medicina convencional. En Chile todavía existe una falencia en cuanto a las publicaciones sobre medicina alternativa por parte del Ministerio de Salud, que llamó a una licitación pública recién en el año 2007 (6).

Dentro de Chile podemos encontrar un sinnúmero de hierbas medicinales a lo largo de todo el territorio, las cuales han sido descritas por nuestros pueblos originarios, como lo es la *Fabiana imbricata*, conocida popularmente como Romero Pichi (7).

El Romero Pichi es un arbusto perenne de hojas imbricadas, que florece de manera abundante en primavera, con pequeñas flores tubulares en el extremo de ramillas laterales (8). Crece desde la región de Coquimbo hasta la de Magallanes (9).

A esta planta se le reconoce por sus propiedades antisépticas, diuréticas y digestivas (10). En la cultura popular chilena es empleada -principalmente- en el tratamiento de afecciones de las vías urinarias (cistitis, uretritis, inflamación de la vejiga) y se la considera de utilidad en las enfermedades del hígado (11). Estas propiedades han sido descritas en la literatura en base a estudios que mostraron que su composición química da cuenta de una rica diversidad de metabolitos, incluidos fenólicos, cumarinas, fenilpropanoides, alcaloides, azúcares, terpenos como el sesquiterpeno, con murolano y esqueletos amorfo y flavonoides, además de quercetina y rutina (11, 12).

En vista a los antecedentes mencionados es que presentamos una propuesta de investigación en busca de una solución a esta patología desde el mundo de la fitoterapia, dando una opción de tratamiento más cercana y comprensible para el usuario, frente a las infecciones causadas por especies del género *Candida*. Dicha alternativa apunta a evitar las múltiples reacciones adversas que se contraen al someterse a los métodos establecidos por la medicina convencional. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue determinar los componentes químicos del aceite esencial extraído de las partes aéreas frescas de *F. imbricata* y evaluar su actividad antifúngica.

MATERIAL Y MÉTODO

Recolección del material vegetal

La *Fabiana imbricata* fue recolectada en temporada de floración (enero 2019), en el cerro "Las Vizcachas" (33°05'04.8"S; 71°01'49.3"W), comuna de Olmué, Región de Valparaíso, Chile. La muestra vegetal fue identificada por el experto botánico Patricio Novoa y un espécimen (Voucher, Fi-01901) fue depositado en el Herbario del Laboratorio de Productos Naturales y Síntesis Orgánica "LPNSO", del Departamento de Química de la Universidad de Playa Ancha, Valparaíso, Chile.

Extracción del aceite esencial

El aceite esencial (AE) se extrajo de las partes aéreas frescas de la *F. imbricata* (500g) las cuales fueron licuadas en 3 L de agua destilada, obteniendo una pasta espesa que fue depositada en un balón de 5 L. Posteriormente, la mezcla fue sometida durante cuatro horas a una hidrodestilación mediante un aparato de tipo Cleavenger (13), a 70°C. Una vez terminado el proceso se extrajo la mezcla (agua/aceite) con acetato de etilo, eliminando las trazas de agua con Sulfato de sodio anhídrido (Na₂SO₄), la mezcla es filtrada y concentrada a presión reducida. La muestra de AE obtenida se almacenó a -4 °C hasta que se realizaron las pruebas químicas y biológicas.

Análisis Cromatográfico

El AE de *F. imbricata* se analizó mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM) (14). Para la CG-EM se utilizó un GC/MS 6890 de Hewlett-Packard acoplado a un detector selectivo de masas 5973 de Hewlett-Packard (ionización de electrones, 70 eV, Palo Alto, CA, EE.UU.) y equipado con una columna capilar HP-5 MS. Las condiciones de trabajo fueron las siguientes: temperatura del inyector 250 °C, temperatura del detector, 280 °C; gas portador, He a 1,25 mL/min; programa de temperatura del horno: 35 °C durante 5 min, aumentar a 260 °C a 5 °C/min, y luego 260°C durante 5 min. Los compuestos en el cromatograma se identificaron por comparación de sus espectros de masa con los de la base de datos de la biblioteca del NIST 2014, y por comparación de su índice de retención con los reportados en la literatura (15) para el mismo tipo de columna o a los estándares comerciales disponibles.

Actividad Biológica

Cepas de *Candida*

El aceite esencial de *F. imbricata* se ensayó contra cinco diferentes cepas de *Candida*: *C. albicans*, *C. parapsilopsis*, *C. lusitaniae*, *C. tropicalis* y *C. guilliermondii*. Las cepas se obtuvieron de la colección del laboratorio de investigación de Bioensayos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso.

Actividad Antifúngica

La Concentración Inhibitoria Mínima (CMI) se determinó por el método de microdilución para hongos levaduriformes (NCCLS/CLSI, 2008) M27-A3. Los cultivos de todas las levaduras se colocaron en Agar Sabouraud Dextrosa (SDA) y se incubaron durante 24-72 h a una temperatura de 37 °C. Las colonias de este cultivo se suspendieron en NaCl estéril al 0,85% y el inóculo se estandarizó según la escala de 0,5 McFarland (1-5 106 UFC/mL). El test antimicótico fue realizado en placas de 96 pozos. Las cepas de levadura fueron preparadas en agua estéril y se diluyeron en el medio RPMI 1640 (excepto en el control de esterilidad). El aceite se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) a concentraciones finales de 25 a 0,1 µg/mL. La concentración mínima inhibitoria (CMI) se determinó visualmente, después de 24 h de incubación, como la concentración más baja de droga que causó una disminución significativa del crecimiento ($\geq 50\%$ de inhibición) por debajo de los niveles de control (16).

RESULTADOS

Composición química del AE de *F. imbricata*

De las hojas frescas de *F. imbricata* se obtuvieron 2,4 g de un aceite amarillo claro con un rendimiento del 0,48% (v/w). El AE está compuesto principalmente por sesquiterpenos oxigenados (78,81%), monoterpenos oxigenados (4,75%), sesquiterpenos hidrocarbonados (4,58%) y ésteres de ácidos grasos (0,72%) (Tabla 1).

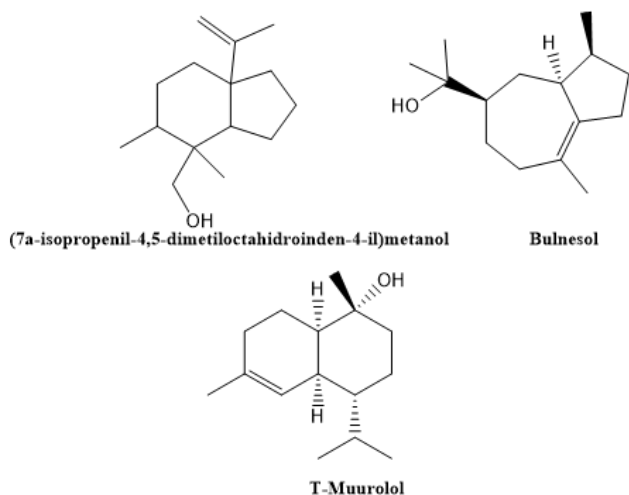
Se identificaron trece compuestos en el AE de *F. imbricata*, que correspondieron al 88,86% del total del aceite analizado y los principales componentes son: (7a-isopropenil-4,5-dimetiloctahidroinden-4-il) metanol (43,66%), bulnesol (17,02%) y T-muurolol (5,75%) (Figura 1).

Tabla 1: Tabla de componentes químicos del aceite esencial de *F. imbricata* / Table of chemical components of essential oil of *F. imbricata*.

Nº	Compuesto	RT (min)	% Area ^a	RI ^b	RI ^c	Identificación
1	Borneol	15,34	0,86	1147	1147	RL, MS, Co
2	Terpinen-4-ol	15,656	3,38	1176	1177	RL, MS, Co
3	Terpineol	16,041	0,51	1186	1185	RL, MS
4	α -Cedreno	22,16	0,74	1410	1409	RL, MS
5	β Funebreno	22,30	3,49	1419	1419	RL, MS
6	Amorfadieno	23,39	3,84	1463	1463	RL, MS
7	Isoshiobunona	25,42	1,24	1518	1518	RL, MS
8	Sesquiteriferona	25,96	5,30	1567	1566	RL, MS
9	(7a-Isopropenil-4,5-dimetiloctahidroinden-4-il)metanol	27,02	43,66	1659	1659	RL, MS
10	Bulnesol	27,34	17,02	1663	1664	RL, MS
11	T-Muurolol	27,98	5,75	1666	1666	RL, MS
12	β -Costol	31,10	2,35	1787	1788	RL, MS
13	trans-Valerenil acetato	31,93	0,72	1831	1832	RL, MS
Total			88,86			

Se identificaron trece compuestos en el AE de *F. imbricata*, que correspondieron al 88,86% del total del aceite analizado y los principales componentes son: (7a-isopropenil-4,5-dimetiloctahidroinden-4-il) metanol (43,66%), bulnesol (17,02%) y T-muurolol (5,75%) (Figura 1).

Figura 1: Estructura química de los compuestos presentes mayoritariamente en el aceite esencial de *F. imbricata*



Actividad Antifúngica

El ensayo antifúngico al que fue sometido el AE de *F. imbricata* se llevó a cabo con cinco especies del género *Candida* y para este ensayo se utilizó como control clotrimazol y fluconazol, registrándose la CIM como se detalla a continuación (Tabla 2):

Tabla 2: Actividad presentada por el AE de *F. imbricata* sobre diferentes especies de *Candida* / Activity presented by EO of *F. imbricata* on different species of *Candida*.

Muestra	CIM ($\mu\text{g/mL}$)				
	C. parapsilosis	C. tropicalis	C. lusitanae	C. albicans	C. guilliermondii
AE	>25	>25	>25	20	10
Fluconazol	0,5	1,0	10	1,0	1,0
Clotrimazol	10	5	15	15	15

En la Tabla 2 se observa que el AE fue selectivo para la cepa de *C. guilliermondii*, registrando un valor 100 $\mu\text{g/mL}$ que supera al control clotrimazol, el que a su vez es superado diez veces por el fluconazol, con respecto a esta misma cepa del género *Candida*. Sin embargo, presentó una débil actividad

frente a la cepa de *C. albicans* y una nula actividad frente al resto de cepas a las concentraciones de trabajo evaluadas.

DISCUSIÓN

Las levaduras del género *Candida* se presentan como la causa más habitual de infecciones micóticas oportunistas (16), lo que sumado al aumento en la resistencia a los medicamentos da cuenta de la necesidad de terapias alternativas en base a plantas. Según la OMS se estima que alrededor del 80% de la población global utiliza extractos de hierbas o sus componentes activos como medicina folclórica (17). Debido a esto, el estudio se enfocó en la actividad antifúngica del AE de *F. imbricata* sobre las cepas de *Candida parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. albicans* y *C. guilliermondii*, la que mostró efectividad en contra de las dos últimas cepas de las cinco evaluadas. En este sentido, estudios recientes con extractos *Solanum lycopersicum* -especie perteneciente a la familia Solanaceae-, al igual que la *F. imbricata*, informan la sensibilidad de los extractos frente a *C. guilliermondii* y una alta resistencia sobre diferentes cepas de *C. albicans* (18).

Asimismo, se ha reportado que los sesquiterpenos oxigenados principal familia de compuestos identificados en el AE de *F. imbricata* presentan potentes propiedades antibacterianas, antioxidantes y anti-fúngicas (19). Es el caso del AE de *Cryptocarya alba* que evidencia un alto contenido de sesquiterpenos y monoterpenos oxigenados con una potente actividad anti-fúngica contra hongos de diferentes clases como son *Nosema ceranae* (20), micosis que afecta a las abejas melíferas y *C. albicans* (21).

En base a lo expuesto, los aceites esenciales tienen dos características destacadas: baja toxicidad para las personas vía tópica y el medio ambiente, debido a sus composición, y bajo riesgo de desarrollo de resistencia por parte de los microorganismos patógenos de los que se encuentran constituidos (22), derivada de su mixtura de volátiles. Por estas razones y considerando los resultados, recomendamos el potencial uso de AE de *F. imbricata* para el desarrollo de un nuevo y selectivo compuesto antifúngico en contra de *C. guilliermondii*.

CONCLUSIONES

La *F. imbricata* no posee una actividad antifúngica de amplio espectro, pero si tiene un efecto antifúngico dirigido sobre *C. guilliermondii*, lo que la convierte en un posible coadyuvante para tratamientos médicos contra este agente y, por ende, es posible introducirlo como un potencial alimento funcional.

También cabe consignar que los compuestos mayoritarios encontrados en el aceite pueden ser los responsables de esta actividad, quedando como proyección la posibilidad de indagar más sobre las actividades antifúngicas de cada uno de ellos, además de buscar el mecanismo de acción que presenta frente a *C. guilliermondii*.

REFERENCIAS

1. Bona, E., Cantamessa, S., Pavan, M., Novello, G., Massa, N., Rocchetti, A., & Gamalero, E. (2016). Sensitivity of *Candida albicans* to essential oils: are they an alternative to antifungal agents? *Journal of applied microbiology*, 121(6), 1530-1545.
2. Gómez, S., García, S. M., de Bedout, C., & García, A. M. (2011). Protein profile analysis of *Candida guilliermondii* clinical isolates sensitive and resistant to fluconazole. *Infectio*, 15(1), 20-24.
3. Marcos-Zambrano, L. J., Puig-Asensio, M., Pérez-García, F., Escribano, P., Sánchez-Carrillo, C., Zaragoza, O., & Muñoz, P. (2017). *Candida guilliermondii* complex is characterized by high antifungal resistance but low mortality in 22 cases of candidemia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(7).
4. Tseng, T. Y., Chen, T. C., Ho, C. M., Lin, P. C., Chou, C. H., Tsai, C. T., & Ho, M. W. (2018). Clinical features, antifungal susceptibility, and outcome of *Candida guilliermondii* fungemia: an experience in a tertiary hospital in mid-Taiwan. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 51(4), 552-558.
5. VALDIVIANA, P. E. L. S. (2013). PROFESOR PATROCINANTE: Karin Jürgens Sch. INSTITUTO: Farmacia (Doctoral dissertation, Universidad Austral de Chile).
6. Toneti, B. F., Barbosa, R. F. M., Mano, L. Y., Sawada, L. O., Oliveira, I. G. D., & Sawada, N. O. (2020). Beneficios del Qigong como terapia alternativa y complementaria para la salud: una revisión sistemática. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*, 28.

7. **Hoffmann, J., Farga, C., Lastra González, J. D. L., & Veghazi, E.** (1992). Plantas medicinales de uso común en Chile.
8. **Doll, U., Norambuena, C., & Sánchez, O.** (2013). Efecto de la aplicación de IBA sobre el enraizamiento de estacas en seis especies arbustivas nativas de la región mediterránea de Chile. *Idesia (Arica)*, 31(3), 65-69.
9. **Burgos, A. N., & Morales, M. A.** (2010). Estudio cualitativo del uso de plantas medicinales en forma complementaria o alternativa con el consumo de fármacos en la población rural de la ciudad de Bulnes, Región del Bío-Bío, Chile. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 9(5), 377-387.
10. **Navas, L. E.** (1973). Flora de la cuenca de Santiago de Chile. Tomo I. Pteridophyta, Gimnospermae, Monocotyledonae. Ediciones de la Universidad de Chile, Santiago, Chile.
11. **Schmeda-Hirschmann, G., & Theoduloz, C.** (2019). *Fabiana imbricata* Ruiz et Pav. (Solanaceae), a review of an important Patagonian medicinal plant. *Journal of Ethnopharmacology*, 228, 26-39.
12. **Brown, G. D.** (1994). The sesquiterpenes of *Fabiana imbricata*. *Phytochemistry*, 35(2), 425-433.
13. **Golmakani, M. T., & Rezaei, K.** (2008). Comparison of microwave-assisted hydrodistillation with the traditional hydrodistillation method in the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L. *Food Chemistry*, 109(4), 925-930.
14. **de Oliveira, M. S., Almeida, M. M., Salazar, M. D. L. A. R., Pires, F. C. S., Bezerra, F. W. F., Cunha, V. M. B., ... & Pinto, R. H. H.** (2018). Potential of Medicinal Use of Essential Oils from Aromatic Plants. *Potential of Essential Oils*, 1.
15. **Adams, R. P.** (2007). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry (Vol. 456). Carol Stream, IL: Allured publishing corporation.
16. **González, Á., & Tobón, Á. M.** (2011). Infecciones micóticas oportunistas en pacientes con VIH/SIDA. *Infectio*, 10(4).
17. **Bhalodia, N. R., & Shukla, V. J.** (2011). Antibacterial and antifungal activities from leaf extracts of *Cassia fistula* l.: An ethnomedicinal plant. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 2(2), 104.
18. **Devadas, S. M., Giffen, S. R., Kumar, N., Lobo, R., & Ballal, M.** (2017). Activity of *Solanum lycopersicum* against *Candida* Species Isolated from Retro-Positive Patients—An Invitro Study. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 9(7), 1233.
19. **Shin, S.** (2003). Anti-*Aspergillus* activities of plant essential oils and their combination effects with ketoconazole or amphotericin B. *Archives of Pharmacal Research*, 26(5), 389.
20. **Bravo, J., Carbonell, V., Sepúlveda, B., Delporte, C., Valdovinos, C. E., Martín-Hernández, R., & Higes, M.** (2017). Antifungal activity of the essential oil obtained from *Cryptocarya alba* against infection in honeybees by *Nosema ceranae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 149, 141-147.
21. **Touma, J., Navarro, M., Sepúlveda, B., Pavon, A., Corsini, G., Fernández, K., ... & Neira, I.** (2020). The Chemical Compositions of Essential Oils Derived from *Cryptocarya alba* and *Laurelia sempervirens* Possess Antioxidant, Antibacterial and Antitumor Activity Potential. *Molecules*, 25(23), 5600.
22. **Mahilraján, S., Nandakumar, J., Kailayalingam, R., Manoharan, N. A., & SriVijeindran, S.** (2014). Screening the antifungal activity of essential oils against decay fungi from palmyrah leaf handicrafts. *Biological Research*, 47(1), 35.