

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI-CANDIDA Y ANTI-ASPERGILLUS DE ACEITES ESENCIALES DE *LIPPIDIA ALBA* (MILLER) N.E BROWN QUIMIOTIPO CARVONA-LIMONENO Y SU ASOCIACIÓN CON SUS COMPONENTES MAYORITARIOS

RESUMEN

Las plantas son fuentes de metabolitos secundarios bioactivos y los aceites esenciales de *Lippia alba* están mostrando en los últimos años actividad antimicótica. En este estudio la actividad antifúngica de cinco aceites de *Lippia Alba* (Miller) N.E Brown quimiotipo carvona- limoneno provenientes de diferentes partes del país fueron evaluados mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI). Para tal fin se utilizaron las técnicas de microdilución en caldo AFST- EUCAST para levaduras fermentadoras de glucosa y la M38-A para hongos filamentosos. Se encontró que el aceite más activo fue el de *L. alba* de Flandes-Tolima con valores de CMI de $0,004 \pm 0,0\%$ v/v para *A. fumigatus* y $0,036 \pm 0,021$ para *C. krusei*. Los aceites esenciales mas activos de *L. alba* mostraron una asociación con sus componentes mayoritarios limoneno, carvona y bicyclosquifelandreno a una proporción aproximada de 18/27/27 respectivamente.

PALABRAS CLAVES: essential oil composition; limonene; carvone; antifungal activity,

ABSTRACT

The plants are source of active secondary metabolites and the essential oils of *Lippia alba* species have been showed antifungal activity *in vitro* recently. In this study, antifungal activity of five essential oils of *Lippia alba* species chemotype carvone- limonene from different parts of the country were evaluated by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) following standard microdilution method protocols AFST-EUCAST EUCAST for glucose fermentation yeasts and CLSI-M38-A for filamentous fungi. It was found that the most active oil was obtained of *Lippia alba* from Flandes-Tolima with values of MIC of $0,004 \pm 0,0\%$ v/v for *A. fumigatus* and $0,036 \pm 0,021$ for *C. krusei*. Essential oils of *Lippia alba* more active showed an association with its majority components limonene, carvone and bicyclosquiphellandrene to approximate rate of 18/27/27 respectively .

1. INTRODUCCIÓN

La incidencia de las micosis muestra un aumento notable debido a diferentes factores que favorecen la aparición de estas enfermedades (1), entre ellos, el incremento en el número de pacientes inmunocomprometidos por diferentes causas como la infección por el VIH y las terapias inmunosupresoras (2, 3). Estas condiciones hacen susceptibles a estos individuos de contraer infecciones tanto por hongos patógenos primarios como por otros que son inocuos para las personas inmunocompetentes (4). El aumento de las infecciones por hongos, unido a la resistencia que presentan estos

JEHIDYS MONTIEL

Microbióloga y bioanalista. Auxiliar de Investigación. Universidad de Antioquia
Grupo Infección y Cáncer
jeyito126@hotmail.com

ANA CECILIA MESA ARANGO

Bacterióloga y laboratorista clínico, MSc. Profesor Asistente. Universidad de Antioquia. Grupo Infección y Cáncer
amesa@medicina.udea.edu.co

CAMILO DURÁN

Químico, Asp MSc. Estudiante de Maestría en Química. Grupo CIBIMOL Universidad Industrial de Santander
cenivam2@tucan.uis.edu.co

JUAN GABRIEL BUENO

Médico y Cirujano, Asp MSc. Estudiante de Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas. Universidad de Antioquia. Grupo Infección y Cáncer
juangbueno@medicina.udea.edu.co

LILIANA BETANCUR GALVIS

Química, MSc, DrSc. Profesora Ocasional. Universidad de Antioquia. Grupo Infección y Cáncer.
labeta@quimbaya.udea.edu.co

ELENA STASHENKO

Química, PhD. Profesora Titular Grupo CIBIMOL. Universidad Industrial de Santander
elena@tucan.uis.edu.co

microorganismos a los antimicóticos disponibles, conduce a una constante búsqueda de alternativas terapéuticas como parte de la solución al problema.

A nivel mundial, se explora el uso y valoración de los productos naturales como fuente de nuevos y variados agentes antimicóticos (5). Muchas plantas son importantes por la producción de aceites esenciales (AEs), los cuales son metabolitos secundarios, ricos en compuestos con una estructura isopreno, como los terpenos y los terpenoides (6). La composición química de los AEs de *L. alba* depende de factores geobotánicas, y hasta la fecha se han identificado los siguientes

quimiotipos: citral, linalool, carvona, limoneno, terpineno, citral–myrceno, citral–limoneno, citral–caryophyllene, citral–germacreno-D, carvona–limoneno, 1,8-cineol–camphor, 1,8-cineol–limoneno, y limoneno–piperitone (7).

En los últimos años se ha dirigido las investigaciones en aceites esenciales, hacia la búsqueda de su actividad biológica. Recientemente se ha demostrado actividad antiviral, antibacteriana y antimicótica a los aceites obtenidos de género *Lippia* (8). En Colombia se conocen las especies de *Lippia alba* por los nombres populares “Pronto alivio” (Antioquia), “Curatodo y Orégano de cerro” (Magdalena). Esta especie se ha empleado como estomacal y antiespasmódica en infusión; también se ha usado como sedante, desinfectante, diaforética y emenagoga (9,10).

En el presente estudio se evaluó la actividad antifungal *in vitro*, mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria CMI, contra *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus flavus*, de cinco AEs de *Lippia alba* (Miller) N.E Brown, quimiotipo carvona-limoneno, recolectadas en diferentes lugares de Colombia, con el fin de relacionar la actividad biológica con la composición de sus compuestos mayoritarios, estudio que hasta ahora no se ha realizado para este quimiotipo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material vegetal

La identificación taxonómica de las muestras botánicas, se llevó a cabo en el Instituto de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia (Bogotá) por el doctor José Luís Fernández.

La extracción, 300g de material en 250ml de agua, se llevó a cabo empleando un equipo de destilación tipo *Clevenger* con reservorio de destilación *Dean Stark* y adaptación para calentamiento por radiación de microondas. Cada extracción tuvo una duración de 30 minutos.

2.2 Análisis cromatográfico

La identificación de los componentes presentes en los AEs de *Lippia alba* se llevó a cabo por cromatografía de gases – espectrometría de masas (GC-MS), empleando un cromatógrafo *Agilent Technologies 6890 Plus* (HP, Palo Alto, California, USA) acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies MSD 5973*, equipado con un puerto de inyección *split/splitless* (1:50), un inyector automático *Agilent 7863*, un sistema de datos *HP-MS ChemStation G17001DA* (Versión D.00.01.27, 2002), incluyendo las bases de datos *NBS 75K*, *WILEY 138K*, *NIST 2002* y *ADAMS 2004* (11).

Se utilizó una columna capilar apolar de sílice fundida DB-5MS (*J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU*) de 60

m x 0.25 mm, D.I x 0.25 μ m, d_f con fase estacionaria de 5% fenil – poli(metil siloxano) y una columna polar de sílice fundida DB-WAX (*J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU*) de 60 m x 0.25 mm, D.I x 0.25 μ m, d_f con fase estacionaria de polietilenglicol. La temperatura del horno se programó desde 45°C, (5 minutos) hasta 150°C (2 minutos) a razón 4°C/min luego se incrementó hasta 250°C (5 minutos) a razón de 5°C/min. Finalmente, la temperatura aumentó a razón de 10°C/min hasta alcanzar 275°C (15 minutos). Las temperaturas de la cámara de ionización y de la línea de transferencia se mantuvieron a 230 y 285 °C, respectivamente (11).

Los espectros de masas y corrientes iónicas reconstruidas (TIC) se obtuvieron en un cuadrupolo, por medio de barrido automático de frecuencia (*full scan*), a 6 *scan s*⁻¹, en el rango de masas *m/z* 40-350. Para la identificación de los compuestos se usaron los espectros de masas e índices de retención de Kováts (12).

La cuantificación de los componentes presentes en cada AE extraído e identificado, se llevó a cabo empleando la técnica de estandarización interna, utilizando el *n*-tetradecano como patrón interno. La concentración, a la cual se llevó el patrón interno en el extracto fue de 3040 ppm.

2.3 Actividad antimicótica

2.3.1 Cepas. Se utilizaron las cepas *Candida parapsilosis* ATCC (American type culture collection) 22019, *C. krusei* ATCC 6258, *Aspergillus flavus* ATCC 204304 y *A. fumigatus* ATCC 204305.

2.3.2 Preparación de las placas. Se evaluaron diez concentraciones dobles seriadas partiendo de 2% (v/v) de los aceites siguiendo el protocolo de Hammer y col (1998) (13). En cada placa se incluyó un control de crecimiento (100%), libre de aceite y un control de esterilidad. Para cada experimento se realizaron controles positivos con los fármacos itraconazole (ITZ) y amfotericina B (AMB). Las placas se conservaron a – 70.C, hasta su uso.

2.3.3 Actividad anti-*Candida*

Se utilizó la técnica de microdilución en caldo AFST-EUCAST (14). Las levaduras se cultivaron en agar Sabouraud (Merck) durante 24h a 35°C. A partir del cultivo, se preparó un inóculo inicial ajustado al patrón 0.5 de McFarland del cual se tomaron 100 μ L del inóculo y se agregaron a las placas que contenían las diferentes concentraciones de los aceites, para obtener una concentración final de 0.5 - 2.5 x 10⁵ blastoconidias/mL. Las placas se incubaron a 35°C por 24 h y se procedió a determinar, por lectura espectrofotométrica a 405 nm la CMI definida como la mínima concentración que inhibe el 90% del crecimiento del microorganismo. Los ensayos se realizaron por duplicado en tres momentos diferentes.

2.3.4 Actividad anti-*Aspergillus*

Se siguió la técnica estándar de microdilución en medio líquido CLSI M38-A (15). Las cepas se cultivaron en agar papa dextrosa, PDA (Merck), durante 7 días a 35°C. El tamaño del inóculo se ajustó por conteo en cámara de Neubauer. Para el ensayo se tomaron 100 µL a una concentración de 0.4 - 5.0 x 10⁴ y se agregaron a las placas con las diferentes concentraciones de los aceites. Las placas se incubaron a 35°C por 48 h y se procedió a determinar la CMI, definida como la mínima concentración del aceite que inhibe el crecimiento del hongo en un 100%, mediante lectura visual por comparación con el control de crecimiento. Los ensayos se realizaron por duplicado en tres momentos diferentes.

2.3.5. Análisis estadístico

Se determinó la media geométrica (MG) y la desviación estándar (DS) de las CMIs de los seis resultados obtenidos para cada AE con cada cepa.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La revisión de la literatura sorprende con una inmensa variabilidad de los metabolitos secundarios volátiles aislados de plantas de *L. alba*, cultivadas en diferentes regiones del mundo (8). La composición química del aceite esencial de *L. alba* depende del origen geográfico de la planta, las condiciones de su cultivo, la edad y la parte de la planta empleada para la extracción, y de algunos otros factores geobotánicas (7). En la tabla 1 se presenta el código de la planta, el lugar de recolección del material vegetal y el número de voucher. La composición química del quimiotipo carvona- limoneno de *L. alba* evaluado en este estudio difiere considerablemente en la composición de sus componentes mayoritarios (ver tabla 2), lo que justifica un estudio de actividad antifúngica enfocado hacia la búsqueda de la asociación de la actividad biológica con respecto a sus componentes mayoritarios, en un quimiotipo que no ha sido evaluado anteriormente tal actividad.

Nombre científico	Lugar recolección	Voucher specimen
<i>Lippia alba</i> 007	Cachipai, Cundinamarca	484650 ⁵
<i>Lippia alba</i> 001	Bucaramanga, Santander	480750
<i>Lippia alba</i> 004	Anolaima, Cundinamarca	484650 ⁵
<i>Lippia alba</i> 005	San Jerónimo, Tolima	484650 ⁵
<i>Lippia alba</i> 006	Flandes, Tolima	

Tabla 1. Listado de plantas y sitio de recolección

Como se puede observar en la tabla 3, el aceite más activo contra las cuatro cepas de hongos evaluadas fue el aceite 006 obtenido de *L. alba* de Flandes-Tolima, el cual tuvo como componentes mayoritarios biciclosesquifelandreno, carvona y limoneno en un porcentaje de 27.4%, 26.9% y 18.6%, respectivamente (ver tabla 2).

El aceite 001 obtenido de la *L. alba* de Bucaramanga-Santander fue el menos activo, el cual tuvo como componentes mayoritarios carvona, limoneno y biciclosesquifelandreno en un porcentaje 38,22 %, 31.76% y 8,96% respectivamente (ver tabla 2 y 3).

COMPUESTO	Cantidad relativa (%)				
	001	007	005	006	004
β-Mirceno	0.87	0.00	0.10	0.10	0.00
Limoneno	31.76	17.4	14.7	18.6	20.6
Linalol	0.64	0.00	0.00	0.10	0.00
Carvona	38.22	22.0	24.5	26.9	25.5
Piperitona	2.61	0.70	0.80	0.70	0.80
Piperitenona	4.39	0.70	1.50	1.00	0.90
β-Bourboneno	1.31	8.90	6.10	7.60	7.90
<i>trans</i> -β-Cariofileno	0.14	2.10	3.60	2.80	1.80
Biciclosesquifelandreno	8.96	34.7	35.9	27.4	33.3

Tabla 2. Componentes mayoritarios de los (AEs). de *L. alba*

La actividad antimicótica de los quimiotipos carvona y carvona-limoneno no ha sido reportada por ningún grupo de investigación hasta el momento. La carvona y el limoneno hacen parte como componentes mayoritarios de otras especies como *Mentha spicata* L, con 27.3% de (S)-(-)-limoneno y 56.6% de (S)-(-)-carvona, y *Anethum sowa* Roxb con un 21.4% de (R)-(+)-limoneno y 50.4% de (R)-(+)-carvona (16). Aggarwal et al (2002) (16) evaluaron la actividad antifúngica de los aceites de *Mentha spicata* L. y *Anethum sowa* Roxb; la actividad de los aceites fue comparable a la actividad encontrada para los dos monoterpenos evaluados individualmente. En éste estudio, a pesar que se evaluaron aceites con diferentes concentraciones de limoneno y carvona (ver tabla 2), no fue posible establecer una relación directa dosis dependiente entre el aumento de la concentración de carvona-limoneno, y el aumento de la actividad antifúngica. Aunque en este estudio aun no se ha evaluado individualmente la actividad antimicótica de los componentes mayoritarios, en vista de los resultados obtenidos, se podría lanzar como hipótesis, que más que una relación directa dosis-dependiente, se presentó un sinergismo entre los componentes, donde ciertos rangos de concentraciones fueron lo más óptimos para obtener una mayor actividad, como pudimos observar para los aceites obtenidos de *L. alba* de Flandes-Tolima y San Jerónimo-Tolima. Las concentraciones de los componentes mayoritarios de los aceites obtenidos de *L. alba* quimiotipo carvona- limoneno del Tolima muestran

su mayor actividad antifúngica cuando estos están presentes en una relación aproximada de 18 % de limoneno, 27% de carvona y 27%.

En los quimiotipos carvona-limoneno de Colombia se encontró el compuesto biciclosquifelandreno en un rango de 8,59% a 35.9%. A la fecha no se ha documentado la presencia de este compuesto en otros aceites con actividad antimicótica, por lo que trabajos posteriores se dirigirán a identificar la actividad del biciclosquifelandreno, y a evaluar la actividad antifúngica de los componentes mayoritarios de los aceites más activos y el posible sinergismo entre ellos.

AE	CMI (%vol/vol)			
	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. fumigatus</i>
007	0,119±0,08	0,083±0,03	0,166±0,065	0,036±0,02
001	0,219±0,06	0,113±0,03	0,083±0,032	0,062±0
004	0,115±0,07	0,094±0,03	0,063±0	0,146±0,13
005	0,063±0	0,125±0,07	0,063±0	0,052±0,016
006	0,060±0,04	0,060±0,04	0,031±0	0,004±0
ITZ µg/ml	0.03 - 0.12	0.06-0.25	0.25± 0.00	0.14 ± 0.08
AMB µg/mL	1	0.5	1	2

Tabla 3. CMI de los aceites esenciales con las cuatro cepas

4. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Quindos G. [Mycoses at dawn of XXI Century]. Rev Iberoam Micol 2002; 19:1-4.
- [2] Warnock DW. Fungal infections in neutropenia: current problems and chemotherapeutic control. J Antimicrob Chemother 1998; 41 Suppl D:95-105.
- [3] Loeffler J, Stevens DA. Antifungal drug resistance. Clin Infect Dis 2003; 36:S31-41.
- [4] Perea S, Patterson TF. Antifungal resistance in pathogenic fungi. Clin Infect Dis 2002; 35:1073-80.
- [5] Zacchino S, Yunes R, Filho V, Enriz D, Kouznetsov V, Ribas J. The need for new antifungal drugs: Screening for antifungal compounds with a selective mode of action with emphasis on the inhibitors of the fungal cell wall. In: Rai M, Mares D, editors. Plant-Derived Antimycotics Current Trends and Future Prospects. New York: Haworth Press; 2003: 1-34.
- [6] Cowann M. Plant products as antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev 1999; 12:564-582.
- [7] Matos FJA, Machado MIL, Craveiro AA, Alencar JW. The essential oil composition of two chemotypes of *Lippia alba* grown in Northeast Brazil. Journal of Essential Oil Research 1996; 8:695-8.
- [8] Pascual ME, Slowing K, Carretero E, Sanchez Mata D, Villar A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and

pharmacology: a review. J Ethnopharmacol 2001; 76:201-14.

[9] García-Barriga H. Plantas Medicinales de Colombia, Santafé de Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 1974: 506-507.

[10] Gupta M. 270 Plantas Medicinales Iberoamericanas, Primera edición. Santafé de Bogotá: Convenio Andrés Bello; 1995: 557-560.

[11] Stashenko EE, Jaramillo BE, Martinez JR. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. J Chromatogr A 2004; 1025:93-103.

[12] Kováts E. Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system. Advances in chromatography 1965; 1:229-247.

[13] Hammer KA, Carson CF, Riley TV. In-vitro activity of essential oils, in particular *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and tea tree oil products, against *Candida* spp. J Antimicrob Chemother 1998; 42:591-5.

[14] Cuenca-Estrella M, Moore CB, Barchiesi F, Bille J, Chryssanthou E, Denning DW, et al. Multicenter evaluation of the reproducibility of the proposed antifungal susceptibility testing method for fermentative yeasts of the Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (AFST-EUCAST). Clin Microbiol Infect 2003; 9:467-74.

[15] CLSI. M38-A-Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard, Wayne, Pennsylvania, USA: CLSI; 2002: 1-29.

[16] Aggarwal, K. K., Khanuja, S. P. S., Ahmad, A., Kumar, T. R. S., Gupta, V. K., & Kumar, S. (2002). Antimicrobial activity profiles of the two enantiomers of limonene and carvone isolated from the oils of *Mentha spicata* and *Anethum sowa*. Flavour and Fragrance Journal, 17, 59-63.