



Nota

Actividad antimicótica y citotóxica de aceites esenciales de plantas de la familia *Asteraceae*

Bibiana Zapata^{a,c}, Camilo Durán^{b,c}, Elena Stashenko^{b,c}, Liliana Betancur-Galvis^{a,c}
y Ana Cecilia Mesa-Arango^{a,c,*}

^a Grupo de Investigación Dermatológica, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

^b Centro de Investigación en Biomoléculas (CIBIMOL), Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia

^c Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas Medicinales Tropicales (CENIVAM), Colombia

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 24 de abril de 2009

Aceptado el 12 de enero de 2010

On-line el 24 de marzo de 2010

Palabras clave:

Asteraceae

Citotoxicidad

Actividad antimicótica

Aspergillus spp.

Candida spp.

R E S U M E N

Antecedentes: En la medicina tradicional de Colombia, las plantas de la familia *Asteraceae* se han utilizado con fines medicinales.

Objetivo: Evaluar la actividad antimicótica y el efecto citotóxico de 15 aceites esenciales de plantas de la familia *Asteraceae*.

Métodos: La actividad antimicótica se evaluó con las cepas *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida krusei* ATCC 6258, *Aspergillus flavus* ATCC 204304 y *Aspergillus fumigatus* ATCC 204305 de acuerdo con las técnicas EUCAST y CLSI M38-A para levaduras y hongos filamentosos, respectivamente. La actividad citotóxica se evaluó mediante la técnica del MTT en la línea celular Vero.

Resultados: Los aceites de las plantas *Achyrocline alata* y *Baccharis latifolia* fueron los únicos activos contra *A. fumigatus* (media geométrica de la concentración mínima inhibitoria=78,7 y 157,4 µg/ml, respectivamente). En contraste, no se evidenció actividad de los aceites contra especies de *Candida*. Además, estos aceites no fueron citotóxicos en las células Vero.

Conclusiones: Los aceites de *A. alata* y *B. latifolia* podrían ser candidatos para la desinfección de ambientes hospitalarios y para la inhibición de formación de biopelículas por *A. fumigatus*.

© 2009 Revista Iberoamericana de Micología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Antifungal activity, cytotoxicity and composition of essential oils from the *Asteraceae* plant family

A B S T R A C T

Background: The plants of the *Asteraceae* family have been used for medicinal purposes, in traditional Colombian medicine.

Aim: To evaluate the antifungal activity and the cytotoxic effects of 15 essential oils from plants of the *Asteraceae* family.

Methods: Antifungal activity was evaluated against *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida krusei* ATCC 6258, *Aspergillus flavus* ATCC 204304 and *Aspergillus fumigatus* ATCC 204305 following EUCAST and CLSI M38-A standard methods, for yeast and filamentous fungi, respectively. Cytotoxic effect was evaluated on Vero cell line by MTT assay.

Results: The oils from the plants *Achyrocline alata* and *Baccharis latifolia* were the only ones active against *A. fumigatus* (GM-MIC=78.7 and 157.4 µg/ml, respectively). In contrast, there was no evidence of oils active against *Candida* species. In addition, these oils were not cytotoxic on Vero cells. The oils of *A. alata* and *Baccharis latifolia* could be candidates for disinfecting hospital environments and for inhibiting biofilm formation by *A. fumigatus*.

Conclusions: The oils of *A. alata* and *B. latifolia* could be candidates for disinfecting hospital environments and for inhibiting biofilm formation by *A. fumigatus*.

© 2009 Revista Iberoamericana de Micología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Keywords:

Asteraceae

Cytotoxicity

Antifungal activity

Aspergillus spp.

Candida spp.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: amesa@medicina.udea.edu.co (A.C. Mesa-Arango).

La incidencia de las infecciones micóticas ha aumentado en los últimos 20 años principalmente en la población de individuos inmunodeficientes¹³. Teniendo en cuenta la resistencia de algunas

especies de *Aspergillus* y *Candida* a antimicóticos, como la anfotericina B, el fluconazol, el itraconazol y el voriconazol⁴, en las últimas décadas se vienen explorando nuevas fuentes de agentes antimicóticos de origen natural, entre ellos los aceites esenciales derivados de plantas¹. En el presente estudio se evaluó la actividad antimicótica y citotóxica de 15 aceites esenciales obtenidos de plantas de la familia Asteraceae recolectadas en Colombia.

Los aceites esenciales se extrajeron a partir de 300 g de hojas secas y tallos de las plantas, y se utilizó la técnica de hidrodestilación asistida por radiación con microondas por medio de un equipo de destilación tipo Clevenger y un horno microondas¹². La caracterización de los aceites esenciales que mostraron actividad se llevó a cabo por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas¹².

La actividad antimicótica se evaluó con las cepas *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida krusei* ATCC 6258, *Aspergillus flavus* ATCC 204304 y *Aspergillus fumigatus* ATCC 204305 mediante las técnicas de microdilución estándar EUCAST³ y M38-A CLSI⁹ para levaduras y hongos filamentosos, respectivamente.

Los aceites esenciales se evaluaron en un rango entre 31,25 y 500 µg/ml. Los fármacos itraconazol y anfotericina B (Sigma-Aldrich) se emplearon como controles a concentraciones en un rango de 0,031–16 µg/ml. Además, en cada ensayo se incluyó un control de crecimiento que correspondió al inóculo de cada hongo sin tratamiento. Los ensayos se realizaron por duplicado en 3 momentos diferentes. Se expresaron como las medias geométricas (MG) de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI).

La citotoxicidad de los aceites se evaluó a concentraciones entre 25–200 µg/ml en las células de riñón de mono verde africano (Vero ATCC CCL-81) mediante la técnica del MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio bromuro². Los ensayos se realizaron por duplicado. Las concentraciones inhibitorias del 50% del crecimiento se obtuvieron mediante análisis de regresión lineal simple con el paquete estadístico R (Viena, Austria, 2008), en el que se correlacionó la media del porcentaje de inhibición ($100 - [\text{densidad óptica del tratamiento} / \text{densidad óptica del control}] * 100$) y la concentración. La citotoxicidad se definió de acuerdo con el criterio del Instituto Nacional de Cáncer de Estados Unidos⁷.

Actualmente no se tienen criterios estándares para definir la actividad antimicótica de productos naturales. Holetz et al (2002) indican clasificar la actividad antimicótica de productos naturales con base en el valor de la CMI de la siguiente manera: CMI inferior o igual a 100 µg/ml: buena, CMI entre 100 y 500 µg/ml: moderada, y CMI entre 500 y 1.000 µg/ml: débil⁸. En base a lo anterior, sólo los aceites de las plantas *Achyrocline alata* (MG-CMI=78,7 µg/ml) y *Baccharis latifolia* (MG-CMI=157,4 µg/ml) mostraron actividad moderada frente a *A. fumigatus* (tabla 1). Con las cepas de *Candida*, no se encontró actividad (CMI > 500 µg/ml). Las MG-CMI de los fármacos itraconazol y anfotericina B se encontraron dentro de los valores establecidos por las técnicas de referencia.

Hasta el momento, no se había evaluado la actividad antimicótica de *B. latifolia*. Albuquerque et al¹ encontraron actividad contra *Candida albicans* (CMI=2,8 µg/ml) en el aceite de otra especie de esta familia (*Baccharis trinervis*) con una técnica de difusión en agar.

La divergencia de los valores de las CMI de aceites esenciales entre los diferentes estudios puede explicarse por la diversidad de las técnicas utilizadas en los estudios, la variación en la composición de los aceites esenciales de acuerdo con los géneros y las especies de las plantas o por la procedencia geográfica. Las diferencias estructurales que existen entre los géneros o las especies de los hongos evaluados también pueden ser un factor de variabilidad en los resultados de la actividad antimicótica de productos naturales.

El componente mayoritario del aceite de *B. latifolia* fue limoneno (9,4%) y el de *A. alata* fue timol (24,04%). En estudios previos se ha demostrado la actividad del limoneno y el timol contra *Fusarium oxysporum* y *C. albicans*, respectivamente; por tanto, posiblemente estos terpenos son los causantes de la actividad de los aceites mencionados^{11,5}.

Los aceites no mostraron citotoxicidad sobre las células Vero, excepto el aceite de *Ambrosia arborescens* (concentraciones inhibitorias 50=15,7 ± 3,4) (tabla 1).

En este estudio se demostró la actividad de los aceites esenciales de las plantas *B. latifolia* y *A. alata* contra *A. fumigatus*, así como la ausencia de citotoxicidad en las células Vero. Estos hallazgos son importantes si se considera que este hongo se

Tabla 1
Nombre de las plantas, y sus números de registro, medias geométricas de las concentraciones mínimas inhibitorias (µg/ml) y concentración inhibitoria 50 (µg/ml) de los aceites evaluados

Planta	N.º de registro	MG-CMI, µg/ml				IC ₅₀ , µg/ml	
		<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 204304	<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 204305	Línea celular Vero ATCC CCL-81	
		MG-CMI				CC ₅₀ ± DE	R ²
<i>Artemisia vulgaris</i> L.	517002	> 500	> 500	> 500	> 500	≥ 200	-
<i>Condylium iresinoides</i>	517735	> 500	> 500	> 500	> 500	≥ 200	-
<i>Baccharis aff. buddeleioides</i>	517332	> 500	> 500	> 500	> 500	30 ± 5,7	0,73
<i>Montanoa ovalifolia</i>	521065	> 500	> 500	> 500	> 500	108,6 ± 5,5	0,98
<i>M. ovalifolia</i>	517718	> 500	> 500	> 500	> 500	30,2 ± 5,4	0,76
<i>Tagetes caracasana</i>	521072	> 500	500	> 500	> 500	≥ 200	-
<i>Tagetes zipaquirensis</i>	521096	> 500	> 500	> 500	> 500	≥ 200	-
<i>T. zipaquirensis</i>	521028	> 500	> 500	> 500	> 500	≥ 200	-
<i>Verbesina centroboyacana</i>	521098	> 500	> 500	> 500	> 500	56,3 ± 10,9	0,83
<i>Achyrocline alata</i>	519601	> 500	> 500	500	78,7	73,8 ± 17,3	0,82
<i>Ambrosia arborescens</i>	519599	> 500	> 500	> 500	> 500	15,7 ± 3,4	0,78
<i>Baccharis latifolia</i>	519595	> 500	> 500	> 500	157,4	52,6 ± 10,9	0,82
<i>Condylium cuatrecasasii</i>	516321	> 500	> 500	> 500	> 500	127 ± 19,2	0,93
<i>Conyza bonariensis</i>	517011	> 500	> 500	> 500	> 500	70 ± 16,1	0,73
<i>Stevia aff. lucida</i>	517758	> 500	> 500	> 500	> 500	94,7 ± 7	0,93
Itraconazol	-	0,099	0,125	0,198	0,157	-	-
Anfotericina B	-	0,630	0,630	1,260	1,260	-	-

DE: desviación estándar; IC₅₀: concentración inhibitoria 50; MG-CMI: media geométrica de la concentración mínima inhibitoria; R²: coeficiente de correlación múltiple al cuadrado.

encuentra en el ambiente y que representa un riesgo en hospitales⁶. Además, tiene la capacidad de formar biopelículas en catéteres¹⁰, por tanto, una posible aplicación de estos aceites podría estar a este nivel.

Financiación

Los resultados de este artículo se derivan del proyecto RC 432-2004, financiado por el Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología (COLCIENCIAS), Bogotá, Colombia.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Albuquerque MRJR, Souza EB, Lins MU, Nogueira NAP, Lemos TLG, Silveira ER, et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oil from aerial parts of *Baccharis trinervis* (Lam.). *Pers Arkovic*. 2004;VI:59–65.
2. Betancur-Galvis LA, Morales GE, Forero JE, Roldan J. Cytotoxic and antiviral activities of Colombian medicinal plant extracts of the *Euphorbia* genus. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002;97:541–6.
3. 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;9:467–474.
4. Espinel-Ingroff A. Mechanisms of resistance to antifungal agents: Yeasts and filamentous fungi. *Rev Iberoam Micol*. 2008;25:101–6.
5. Guo N, Liu J, Wu X, Bi X, Meng R, Wang X, et al. Antifungal activity of thymol against clinical isolates of fluconazole-sensitive and -resistant *Candida albicans*. *J Med Microbiol*. 2009;58:1074–9.
6. Haiduvan D. Nosocomial aspergillosis and building construction. *Med Mycol*. 2008;25:1–7.
7. Hennebel T, Sahpaz S, Joseph H, Bailleul F. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. *J Ethnopharmacol*. 2008;116:211–22.
8. Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DA, Nakamura CV, Filho BP. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002;97:1027–31.
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard. Document M38-A. Wayne, USA: National Committee for Clinical Laboratory Standards.
10. Seidler MJ, Salvenmoser S, Müller FM. *Aspergillus fumigatus* forms biofilms with reduced antifungal drug susceptibility on bronchial epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:4130–6.
11. Sekine T, Sugano M, Majid A, Fujii Y. Antifungal effects of volatile compounds from Black Zira (*Bunium persicum*) and other spices and herbs. *J Chem Ecol*. 2007;33:2123–32.
12. Stashenko EE, Jaramillo BE, Martínez 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.
13. Warnock DW. Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi*. 2007;48:1–12.