

Evaluación de la actividad *in vitro* de aceites esenciales derivados de plantas nativas en Colombia y sus componentes mayoritarios contra especies de *Candida* con diferentes perfiles de sensibilidad antifúngica y búsqueda de una posible diana

Carolina Zapata-Zapata¹, Ana Cecilia Mesa-Arango²

RESUMEN

Introducción: diferentes especies de *Candida* están implicadas en infecciones que comprende desde las formas mucocutáneas hasta más severas, por la alta morbilidad y mortalidad, como la invasiva o la candidemia. En los últimos años, se ha registrado un incremento importante, no solo en el número de casos de candidiasis, sino en la emergencia de especies multirresistentes o panresistentes a los antifúngicos de uso clínico. Este escenario, sumado a la toxicidad de estos fármacos, suponen un desafío para la medicina y dejan en evidencia la necesidad de desarrollar nuevas moléculas que superen o potencien la actividad los actuales.

Los aceites esenciales (AE) son metabolitos secundarios producidos por familias de plantas aromáticas, utilizados en la medicina tradicional por sus atributos curativos. En Colombia, se han llevado a cabo estudios dirigidos a identificar actividad antifúngica en diferentes AE con resultados prometedores, demostrando el potencial de estos compuestos en la búsqueda de nuevos antifúngicos.

Objetivo: evaluar la actividad *in vitro* de aceites esenciales de plantas cultivadas en Colombia y sus componentes mayoritarios contra especies de *Candida* sensibles y resistentes a los principales antifúngicos de uso clínico e identificar una y posible diana.

Metodología: se determinaron los perfiles de sensibilidad de 11 cepas de diferentes especies de *Candida* y nueve aislados clínicos (*C. auris* y *C. parapsilosis*) a anfotericina B (AMB), fluconazol (FLZ), itraconazol (ITZ) y caspofungina (CPG), siguiendo el protocolo estándar CLSI M27 4ta ed. Posteriormente, con la misma técnica,

se evaluó la actividad antifúngica de 28 muestras (12 AE de plantas nativas, 8 terpenos y 8 fracciones enriquecidas) a 256 $\mu\text{g/mL}$. Con las muestras que inhibieron el crecimiento fúngico $\geq 90\%$, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI). Las muestras con los valores de CMI más bajos, se seleccionaron para la determinación del efecto (fungistático o fungicida) con curvas de tiempo-muerte, la citotoxicidad en la línea de queratinocitos HaCat, la gentotoxicidad usando el ensayo cometa, la inducción de producción de ROS y el potencial de membrana mitocondrial. Además, se evaluó la interacción de uno de los aceites y terpenos más activos con los antifúngicos AMB y FLZ, usando la técnica del tablero de ajedrez.

Resultados: las 11 cepas y los 9 aislados clínicos mostraron diferentes perfiles de sensibilidad. Las medias geométricas (MG) y rangos de CMI fueron los siguientes: 0,23 (0,03-2 $\mu\text{g/mL}$), 0,20 (0,03-16 $\mu\text{g/mL}$), 2,8 (0,5 - $\geq 64 \mu\text{g/mL}$) y 0,55 (0,125-8 $\mu\text{g/mL}$), para AMB, ITZ, FLZ y CPG, respectivamente.

La actividad antifúngica de las muestras fue cepa dependiente. Los AE de *Lippia origanoides*, de otras especies de *Lippia* (Bio-Reto 0008, Bio-Reto 0018, Bio-Reto 0019) y los terpenos D-limoneno, timol, carvacrol y *p*-cimeno fueron activos contra todos los aislados de *C. auris* con rango de CMI 64-256 $\mu\text{g/mL}$. Asimismo, los terpenos limoneno, carvacrol y timol inhibieron el crecimiento de todas las cepas y aislados clínicos (rango de CMI 8-256 $\mu\text{g/mL}$). Las fracciones mostraron actividad con los aislados de *C. auris*. La cepa *C. tropicalis* ATCC 200956 (multirresistente) fue inhibida por 22 de las 28 muestras evaluadas. Los AE menos citotóxicos fueron Bio-Reto 008 ($CC_{50} = 778,0$) y Bio-Reto 0010 ($CC_{50} = 903,6$); este último, mostró alto índice de selectividad con los aislados clínicos de *C. auris* (IS=14) y *C. tropicalis* ATCC 200956 (IS=7). En el ensayo cometa el AE Bio-Reto 0018 y el timol, mostraron daño tipo I (4.5 % DS=0.70 y 1% DS=0.70, respectivamente). AE 0018 y el timol fueron fungicidas a las concentraciones de 1CMI y 2CMI con las cepas *C. tropicalis* ATCC 20956 y *C. albicans* ATCC 10231. Las combinaciones: AE Bio-Reto 0018-FLZ y timol-FLZ fueron sinérgicas (FICI=0,28 en ambos casos) dando como resultado la disminución 32 veces la concentración de la CMI del FLZ. Además, con ambas combinaciones se observó incremento del potencial de membrana mitocondrial e inducción de

Correspondencia carozapatazapata1228@gmail.com - ana.mesa@udea.edu.co

ROS. Por último, se observó fragmentación nuclear en las levaduras tratadas con timol solo y en combinación, mientras que con Bio-Reto 0018 se observó agrandamiento del núcleo.

Conclusión: los resultados sugieren que en AE de plantas nativas de Colombia o en algunos de sus componentes existe un potencial importante para el desarrollo de productos contra especies de *Candida* con diferentes perfiles de sensibilidad antifúngica. Además, el hecho que cepas resistentes a los principales antifúngicos, sean sensibles a varios de ellos, es un punto interesante para posteriores estudios básicos con el fin de identificar nuevas dianas o mecanismo de acción.

Agradecimientos: Minciencias, Mineducación, Mincomercio e ICETEX. Convocatoria Ecosistema Científico - Colombia Científica. Fondo FJC, RCFP44842-212-2018. Programa Bio-Reto XXI-15:50

PALABRAS CLAVE

Candida Spp., *Lippia*, Antifúngicos, Aceites Esenciales, Terpenos, CMI, Estrés Oxidativo, Citotoxicidad, Mitocondria.

BIBLIOGRAFÍA

1. Rodríguez JY, Le Pape P, Lopez O, Esquea K, Labiosa AL, Alvarez-Moreno C. *Candida auris*: A Latent Threat to Critically Ill Patients With Coronavirus Disease 2019. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2020 Nov 1;73(9):e2836–7.
2. Winska K, Maczka W, Łyczko J, Grabarczyk M, Czubaszek A, Szumny A. Essential Oils as Antimicrobial Agents-Myth or Real Alternative? *Molecules*. 2019 Jun;24(11).
3. Betancur-Galvis L, Zapata B, Baena A, Bueno J, Ruíz-Nova CA, Stashenko E, et al. Antifungal, cytotoxic and chemical analyses of essential oils of *Lippia* organoides H.B.K grown in Colombia. *Rev la Univ Ind Santander Salud* [Internet]. 2011;43:141–8.
4. Córdoba S, Vivot W, Szusz W, Albo G. Antifungal Activity of Essential Oils Against *Candida* Species Isolated from Clinical Samples. *Mycopathologia*. 2019 Oct;184(5):615–23.
5. Mesa-Arango AC, Montiel-Ramos J, Zapata B, Durán C, Betancur-Galvis L, Stashenko E. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 Sep;104(6):878–84.
6. Forastiero A, Mesa-Arango AC, Alastruey-Izquierdo A, Alcazar-Fuoli L, Bernal-Martinez L, Pelaez T, et al. *Candida tropicalis* antifungal cross-resistance is related to different azole target (Erg11p) modifications. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Oct;57(10):4769–81.
7. Shaban S, Patel M, Ahmad A. Improved efficacy of antifungal drugs in combination with monoterpenic phenols against *Candida auris*. *Sci Rep*. 2020 Jan;10(1):1162.
8. CLSI. Reference Method For Broth of Yeasts; Dilution Antifungal Susceptibility Testing Approved Standard-Fourth Edition. Vol 37.; 2017.