

Evaluación de la eficiencia anti-fúngica del extracto de Justicia Spicigera en hongos productores de aflatoxinas



Colaboración

Guadalupe Gabriela Bárcena Vicuña; Johana Ramírez Hernández, Instituto Tecnológico Superior de Atlixco; María Guadalupe Delgado López, Centro de Investigación Biomédica de Oriente; Juan Carlos Guevara Contreras; Cesar Sánchez de La Luz, Instituto Tecnológico Superior de Atlixco

RESUMEN: Los hongos son un misterio, tan grande que es el reino que alberga distintos géneros, z poco conocidos hasta el momento, con gran impacto tanto para el desarrollo humano como para el mismo deterioro de la salud.

México posee una enorme diversidad de recursos naturales como son las plantas medicinales. Justicia spicigera posee antecedentes etnobotánicos contra padecimientos como anemia, presión arterial y problemas urinarios, entre otros. Farmacológicamente al extracto de Justicia se le ha comprobado actividad antibacteriana, antiprotzoaria y antifúngica. Tomando en cuenta esta última propiedad, así como el incremento de las enfermedades por hongos y la biodisponibilidad de esta planta, consideramos la importancia de continuar con el estudio de Justicia spicigera que permita determinar su actividad contra diferentes especies de hongos de importancia médica.

PALABRAS CLAVE: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, eficiencia antifúngica, Justicia spicigera.

ABSTRACT: Fungi are a mystery, so great that it is the kingdom that hosts different genres and little known so far, with great impact for both human development and the same deterioration of health. Mexico has an enormous diversity of natural resources such as medicinal plants. Justicia spicigera has an ethnobotanical background against conditions such as anemia, blood pressure and urinary problems, among others. Pharmacologically, the extract of Justice has been proven antibacterial, antiprotozoal and antifungal activity. Taking into account this last property, as well as the increase of fungal diseases and the bioavailability of this plant, we consider the importance of continuing with the study of spicigera Justice that allows to determine its activity against different species of fungi of medical importance.

KEYWORDS: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, antifungal efficiency, Justicia spicigera.

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos están ampliamente distribuidos en la naturaleza, entre éstos se encuentran los hongos [1], quienes se han convertido en un problema tal, que el poco conocimiento sobre ellos causa una gran desventaja; al presentarse problemas en la salud derivados del consumo desmoderado de alimentos contaminados; principalmente semillas, leguminosas y verduras a las que no se les realiza un análisis para la determinación de hongos.

Se han descrito más de doscientas especies de hongos que pueden ser patógenas para los humanos. Las más comunes son las distintas especies de *Cándida* y *Aspergillus* que pueden producir tanto infecciones localizadas, como invasivas y con mayor frecuencia de las vías respiratorias provocando alteraciones pulmonares, sinusitis, entre otras enfermedades las cuales cabe la posibilidad de terminar en algún tipo

de cáncer, ya que las especies de *Aspergillus* contienen aflatoxinas que son toxinas producidas en cultivos agrícolas como el maíz, cacahuates, la semilla de algodón y los frutos secos, los síntomas provocados por estas toxinas son casi indetectables hasta cierto punto; por tanto son difíciles de diagnosticar sin las herramientas adecuadas. La diversidad botánica de México es muy amplia y un alto porcentaje de esta se usa en la medicina tradicional. Ejemplo de lo anterior es el muicle (*Justicia spicigera*) es una planta originaria de México, se encuentra presente en climas cálidos [2, 3]. Posee antecedentes etnobotánicos contra padecimientos como anemia, presión arterial y diabetes [4,5]. Farmacológicamente al extracto de Justicia se le ha comprobado actividad antibacteriana, antiprotzoaria y antifúngica. [4]. Considerando los antecedentes y disponibilidad de la planta, se considera evaluar el efecto antifúngico de *Justicia spicigera*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Este proyecto se llevó a cabo en las instalaciones del Instituto Tecnológico Superior de Atlixco, el extracto de *J. spicigera* fue donado por la Dra. María Guadalupe Delgado López del Centro de Investigación Biomédica de Oriente (CIBIOR), para este trabajo los hongos se inocularon en el medio de cultivo agar dextrosa y papa, con los métodos estandarizados por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A).

Para la preparación del inóculo se partió de un cultivo de 48 h, en agar papa dextrosa a 35 (± 2°C). Se tomaron colonias de cada cepa de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans* y se resuspendieron en una solución de agua estéril, homogeneizando durante 15 segundos, ajustando la turbidez a 0.5 de la escala McFarland (equivalente a 1 x 10⁶ a 5 x 10⁶ UFC).

Se realizó la inoculación por extensión de placa, una vez que se preparó el inóculo de cada cepa se extrajeron entre 200-600 µL del mismo y se colocaron en la placa Petri. Se distribuyeron homogéneamente por la superficie con la ayuda de un asa de Digraskly. Se utilizó como control positivo voriconazol a 1 µg/mL, agua estéril utilizada como control negativo y se adicionaron por separado 9 diluciones diferentes del extracto de *J. spicigera*, C1 30 µg/mL, C2 25 µg/mL, C3 20 µg/mL, C4 19 µg/mL, C5 15 µg/mL, C6 10 µg/mL, C7 9 µg/mL, C8 5 µg/mL, C9 4 µg/mL con el fin de determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).

Se incubó por 72 horas a 35 (± 2°C). El diámetro de cada zona de inhibición se midió con un vernier. Nueve diluciones se consideraron para el extracto, se utilizaron controles positivos y negativos, el control negativo fue agua estéril y positivo voriconazol y el experimento se realizó por triplicado[7].

De acuerdo a los Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (do-

cumentos M27-A3, M38-A y M44-A) (Cantón-Lacasa et al, 2007). Estas categorías están basadas en los puntos de corte que se establecieron mediante el método de dilución, las concentraciones que el anti fúngico alcanza en suero y la distribución de las (concentraciones mínimas inhibitorias) CMI para la especie estudiada. El documento M44-A describe el método de difusión en agar para levaduras del género *Candida*.

RESULTADOS

El objetivo final de las pruebas de sensibilidad In vitro a los antifúngicos es predecir la respuesta de los pacientes al tratamiento. Sin embargo, el establecimiento de una correlación entre la sensibilidad In vitro de un hongo a un antifúngico y la eficacia clínica de ese antifúngico para tratar la micosis es difícil de obtener y no está totalmente resuelto en la actualidad. Para la mayoría de los antifúngicos el éxito terapéutico disminuye a medida que aumenta la concentración mínima inhibitoria (CMI), pero se ha observado que hasta el 50% de los pacientes infectados con un organismo resistente a un antifúngico responde clínicamente al tratamiento con ese agente [6].

En éste proyecto se determinó que la CMI en del extracto acuoso de *Justicia spicigera* (*J. spicigera*) sobre *Candida albicans* (*C. albicans*) fue de 4 µg/mL.

Vega-Ávila y col. analizaron en 2012, un extracto etanólico de *J. spicigera* que no afectó a concentraciones de 5.0 mg/mL el crecimiento de *C. albicans*. Reportes previos indican que el extracto etanólico de las hojas en concentraciones de 0.375 mg/disco (Jacobó-Salcedo et al, 2011) y 2.0 mg/disco [10] no inhiben el crecimiento de este hongo. Sin embargo, una fracción hexánica inhibió el crecimiento de *C. albicans* con MIC de 0.25 mg/mL.

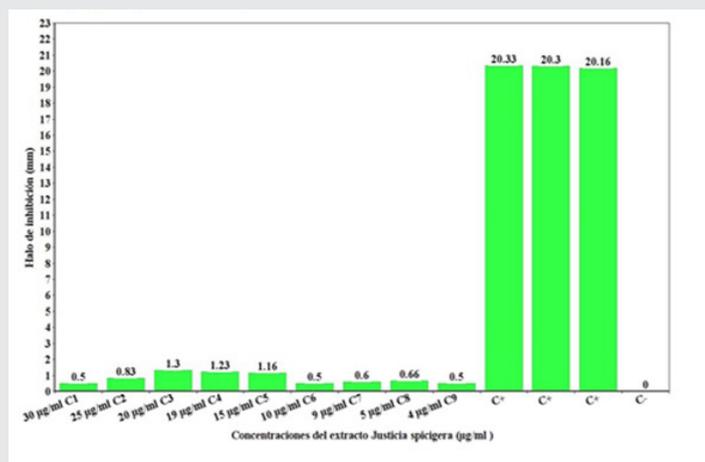
Los dos grupos de trabajo anteriormente mencionados emplearon la técnica de difusión en agar, en tanto que nosotros empleamos el método estandarizado por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio CLSI para el estudio de la sensibilidad de los antifúngicos; lo que nos permitió evaluar la actividad del extracto acuoso de *J. spicigera* en diversas concentraciones, incluso más altas que la probada por dichos grupos de trabajo.

Tabla 1 Efecto del extracto acuoso de *J. spicigera* sobre *C. albicans*

Concentraciones del extracto <i>Justicia spicigera</i>	Halo de inhibición (mm)
30 µg/mL C1	0.6
25 µg/mL C2	0.83
20 µg/mL C3	1.3
19 µg/mL C4	1.23
15 µg/mL C5	1.16
10 µg/mL C6	0.5
9 µg/mL C7	0.6
5 µg/mL C8	0.66
4 µg/mL C9	0.5

La tabla 1, muestra la medida del halo de inhibición de las diferentes concentraciones del extracto de la planta *J. spicigera*, $C_1, C_2, C_3, C_4, C_5, C_6, C_7, C_8, C_9$, aplicadas a la cepa *C. albicans*, ya que en las cepas *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus fumigatus* no se obtuvieron halos de inhibición.

A partir de los resultados presentados en la gráfica 1 se observa que el extracto presentó una inhibición del crecimiento micelial, que no es dependiente de la dosis usada, la tasa de crecimiento para este extracto se mantuvo alrededor de 1.23 a 0.5 mm a dosis de 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las concentraciones, C_2, C_3, C_4, C_5 , son las que tienen mayores resultados al ser aplicadas sobre la cepa.



Gráfica 1 Comparación de las diferentes concentraciones utilizadas del extracto de *J. spicigera* aplicado en la cepa *C. albicans*

La figura 1 muestra que el control positivo (C+) utilizado es voriconazol; el cual alcanzó un halo de inhibición de 20.00, 20.40, 20.25 mm, C_1 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ alcanzó un halo de inhibición de 1.5, 0.5, 0 mm, C_2 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ alcanzó un halo de inhibición de 0, 1, 1.5 mm, C_4 19 $\mu\text{g}/\text{mL}$ alcanzó un halo de inhibición de 0, 3.2, .2 mm y en la zona de C- no se formó halo de inhibición.



Figura 1 Cultivo de la cepa *C. albicans*

Con base a los datos obtenidos del diámetro del halo de inhibición, se establecieron las siguientes categorías:

1. Sensible
2. Intermedio / Sensible dependiente de dosis
3. Moderadamente sensible
4. Resistente

Estas categorías están basadas en el método de dilución en caldo, documento M27-A3.

Las 9 concentraciones del extracto de la planta *J. spicigera* (*muicle*), se realizaron por triplicado, los resultados obtenidos fueron: C_1 moderadamente sensible, C_2 sensible, C_3 sensible, C_4 sensible, C_5 sensible, C_6 moderadamente sensible, C_7 moderadamente sensible, C_8 moderadamente sensible, C_9 moderadamente sensible, comparado con el documento M44-A.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos con el extracto de la planta *J. spicigera* (*muicle*), en la inhibición del crecimiento de la cepa *Candida albicans* fueron prometedores, no obstante cabe destacar que las concentraciones no lograron el mismo efecto necesario para la inhibición del crecimiento de las cepas *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus fumigatus* a partir de estos resultados se observa una tendencia a aumentar la concentración del extracto sobre estas cepas, para que presenten un efecto inhibitorio.

El extracto de la planta *J. spicigera* en las concentraciones 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 19 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$, es prometedor para la inhibición del crecimiento de la cepa *C. albicans*.

El voriconazol que es un potente antifúngico generó un halo de inhibición mucho mayor comparado con cualquiera de las diferentes concentraciones del extracto de *J. spicigera*, al aplicarse en la cepa *C. albicans*.

Los resultados obtenidos se clasificaron en: 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ moderadamente sensible, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sensible, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sensible, 19 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sensible, 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sensible, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ moderadamente sensible, 9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ moderadamente sensible, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ moderadamente sensible, 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ moderadamente sensible.

De acuerdo a resultados obtenidos del extracto de *J. spicigera* sobre la cepa *C. albicans*, se propone que la concentración mínima inhibitoria para este hongo es de 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

BIBLIOGRAFÍA

[1] Camacho, A., Giles, M., Ortegón, A., Palao, M., Serrano, B., Velázquez, O. (2009). *Técnicas para el Análisis, Microbiológico de Alimentos*. (Eds.), Facultad de Química (2da. Ed.). Universidad Autónoma de México.

[2] Vega-Ávila, E., Tapia-Aguilera, R., Reyes-Chilpab, R., Guzmán-Gutiérrez, S., Pérez-Flores, J., Velas-

co-Lezama, R. (2012). Actividad antibacteriana y antifúngica de *Justicia spicigera*. *Rev. Latinoam. Quím.* 40/2, 75-82.

[3] Altamirano Jácome, S. E. (2013). Desarrollo de una bebida funcional elaborada a base de extracto de muicle (*Justicia spicigera*). (Tesis) Facultad de ingeniería química. Universidad veracruzana.

[4] Peña Agüero, B. (2010). Usos y aplicaciones del muicle (*Justicia spicigera schlect et schdl*) (Tesina). Diplomado de medicina tradicional mexicana. Licenciatura en Enfermería. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

[5] Girón Cruz, N. (2015). Evaluación de la actividad antidiabética y antioxidante in vitro de extractos polares de *Justicia spicigera* y elucidación estructural de los compuestos fenólicos mayoritarios. (Tesis). División de estudios de posgrados. Universidad Tecnológica de la Mixteca.

[6] Odds FC, Brown AJP, Gow NAR. (2003). Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol.* 11: 272-9.

[7] Barrera Necha, LL y García Barrera LJ. (2008). Actividad antifúngica de aceites esenciales y sus compuestos sobre el crecimiento de *Fusarium sp.* Aislado de papaya (*Carica papaya*). *UDO Agrícola*, 8 (1): 33-41.

[8] Vega-Ávila et al. (2012). Actividad antibacteriana y antifúngica de *Justicia spicigera*. *Rev. Latinoam. Quím* [online]. 40 (2): 75-82.

[9] Jacobo-Salcedo et al. (2011). Antimicrobial and cytotoxic effects of Mexican Medicinal Plants. *NPC Natural Product Communications*, 6 (12): 1925-1928.

[10] Murillo-Álvarez, J.I., Encarnación, D.R., Franzblau, S.G. (2001). Antimicrobial and cytotoxic activity of some medicinal plants from Baja California Sur (México). *Pharmaceutical Biology* 39:445-449.