

COMPARACIÓN DE PROCEDIMIENTOS MACRO Y MICRO PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE HONGOS Y LEVADURAS PATÓGENOS AL HOMBRE

Flores PA, Guancín MJ, Ozaeta CM, Cáceres A, Gaitán I.
Escuela de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia,
Universidad de San Carlos de Guatemala

1. RESUMEN

El tamizaje de la actividad antifúngica permite evidenciar *in vitro* como un extracto vegetal inhibe el crecimiento de un hongo en condiciones estándar. Actualmente, en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia se emplea la metodología de Macrodilución en Agar, la cual utiliza cantidades significativas de recursos, materiales y tiempo. Como parte de los procesos de globalización, el Comité Nacional para la Estandarización de Laboratorios Clínicos (NCCLS), aprobó la técnica de Microdilución en placa como un estándar para la medición de la actividad antifúngica, la cual haciendo uso de una mínima cantidad de recursos brinda resultados en menor tiempo. A pesar de su aprobación, ésta técnica aún no se aplica en Guatemala para el tamizaje, ni para la determinación de concentración mínima inhibitoria (CIM) de extractos vegetales, razón por la cual el presente estudio tuvo como objetivo comparar ambas técnicas, a partir de la evaluación de 12 extractos de uso popular contra 4 cepas ATCC de hongos levaduriformes y 6 cepas ATCC de hongos filamentosos para determinar si ambas técnicas son equiparables.

La comparación de ambas técnicas se realizó por medio de un estudio de concordancia y con el uso de la prueba de t de Student para medias de dos muestras emparejadas, se demostró que existe diferencia significativa entre ambas, ya que se obtuvo un valor de $p < 0.025$.

De tal forma, se pudo concluir que la técnica de Microdilución en placa aún no puede sustituir a la Macrodilución en agar, pero ambas pueden ser utilizadas simultáneamente con el fin de combinar sus beneficios. Se comprobó la actividad fungicida del extracto etanólico de la hoja de *S. americanum* y del extracto clorofórmico de la hoja de *L. graveolens*.

2. INTRODUCCIÓN

En los últimos años las infecciones micóticas han mostrado un incremento importante en todo el mundo debido al aumento del número de pacientes inmunodeprimidos por diversas causas, quienes son afectados principalmente por los géneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus*, *Histoplasma*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Acremonium*, *Fusarium* y los dermatofitos (1-3).

Un aspecto que ha complicado la situación es el desarrollo de mecanismos de resistencia, explicada porque la mayoría de los fármacos son fungistáticos y por la administración prolongada de los tratamientos, que permite la selección de clones resistentes (2,4).

Según los informes de la Organización Mundial de la Salud (OMS), aproximadamente el 80% de la población mundial utiliza productos naturales con fines medicinales (5). Así mismo, la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos de América (FDA) aprobó, entre 1983 y 1994, 520 nuevos fármacos, de los cuales el 39% eran de origen natural o sus derivados (4). Debido a esto, la búsqueda de la actividad antifúngica en productos naturales es de gran importancia, ya que permite encontrar nuevas opciones de tratamiento obteniéndose así, un producto de menor toxicidad y de mayor disponibilidad para el paciente (6)

En la actualidad, en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, se utiliza la técnica de macrodilución en agar, para la búsqueda de actividad antifúngica de extractos vegetales, la que emplea una cantidad considerable de material, equipo y tiempo para su

elaboración. Esta técnica no es la aprobada actualmente por el Comité Nacional para la Estandarización de Laboratorios Clínicos (NCCLS), sin embargo se continua haciendo uso de la misma, ya que en Guatemala no se ha realizado ningún estudio que demuestre que la técnica de Macrodilución en agar es equiparable con la técnica de Microdilución en placa (aprobada por el NCCLS), la cual hace uso de una mínima cantidad de recursos y presenta resultados en menos tiempo.

Para demostrar si la técnica de Microdilución en placa puede sustituir a la Macrodilución en agar, se realizó el presente estudio de concordancia, el cual a través del índice kappa y valor de p demostró que entre ambas, existe diferencia significativa, pero que al emplearse de manera combinada pueden aprovecharse de mejor manera sus beneficios.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de extractos vegetales. A partir de bases de datos del Departamento de Citohistología y el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT) de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, y el Laboratorio Farmaya, fueron seleccionados los extractos de plantas nativas guatemaltecas partiendo de dos criterios: plantas que contaran con registro de actividad antifúngica contra hongos filamentosos y/o levaduriformes y plantas de las cuales no se tiene registro de actividad antifúngica pero que poseen propiedades antibacterianas o antiparasitarias. Los extractos vegetales, el órgano y el solvente de las plantas se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Extractos de plantas utilizadas en el estudio.

Nombre Científico	Nombre Común	Órgano y solvente a utilizar
<i>Bourreria huanita</i> (Llave & Lex.)	Esquisuchil	Flores / etanol
<i>Cornelia pyramidata</i> L.	Joroete	Hoja / etanol
<i>Smilax domingensis</i> Willd.	Zarzaparrilla	Tallo / metanol
<i>Wigandia urens</i> var. <i>caracasana</i> (R. & P.) HBK.	Chocón	Flores / hexano
<i>Phlebodium pseudoaureum</i> Smith	Calahuala	Hoja / etanol
<i>Rhizophora mangle</i> L.	Mangle	Corteza / etanol
<i>Acalypha pseudoalupecurioides</i> Jacq.	Hierba del cáncer	Hoja / etanol
<i>Lippia graveolens</i> HBK.	Orégano	Hoja / cloroformo
<i>Solanum americanum</i> Miller	Macuy	Hoja / etanol
<i>Terrestroemia tepzapote</i> Schlect. & Cham.	Tila	Hoja / hexano
<i>Valeriana prionophylla</i> Standl.	Pericón de monte	Raíz / hexano
<i>Piper jacquemontianum</i> Treal.	Cordoncillo	Hoja / cloroformo

Fuente: Departamento de Citohistología, LIPRONAT. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. FARMAYA

Cepas ATCC. Se emplearon seis cepas de hongos filamentosos; *Aspergillus fumigatus* ATCC 26934, *Aspergillus niger* ATCC 9029, *Microsporum gypseum* ATCC 1152000, *Trichopyton mentagrophytes* ATCC 9972, *Trichophyton rubrum* ATCC 113200, y 4 cepas de hongos levaduriformes; *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida tropicalis* ATCC 1312000, *Cryptococcus neoformans* ATCC 32264, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763.

Curva de susceptibilidad. Se realizó una curva para evaluar la susceptibilidad de las cepas ATCC, frente al Voriconazol (Pfizer). A partir de una cápsula de 200 mg de principio activo de Voriconazol, con un peso aproximado de 625mg, se pesaron en balanza analítica 200 mg de la misma, se maceró, y se disolvió en 20 ml de caldo Sabouraud doble para

tener una solución madre de 3,200 µg/ml. Esta se llevó a tres concentraciones finales de 160 µg/ml, 16 µg/ml y 1.6 µg/ml (7).

Macrodilución en agar para hongos filamentosos.

- **Preparación del inóculo.** A partir de un cultivo de 7 días de los hongos filamentosos, se realizó una resiembra en medio Takashio, y se incubó a 25°C por 21 días. En el día 21 con una asa en argolla y en campana estéril se agregaron 2 ml de solución salina estéril y se realizó un raspado de esporas. Esta solución se ajustó con solución salina hasta una concentración mayor de 5×10^4 esporas/ml, luego se llevó a cabo la evaluación de la actividad antifúngica de los extractos por medio del método de referencia según Brancato & Holding modificado por MacRae *et al* (8). Los resultados se interpretaron por medición de diámetros de crecimiento.
- **Preparación de los extractos a ensayar.** En balanza analítica se pesó 0.100 gr de cada uno de los extractos y se disolvieron en 10 ml de etanol al 50%
- **Preparación del agar planta.** En caja de petri estériles, se sirvieron 13.5 ml de Agar Sabouraud y 1.5 ml de cada extracto preparado y se dejó solidificar en campana estéril. Con campanilla de Durham, se realizaron 4 orificios equidistantes. Se llevó a cabo los controles de esterilidad respectivos por 24 horas a 37°C.
- **Inoculación en agar planta.** Se agregaron 30 µl del inóculo a cada pozo del agar planta preparado. Se incubaron y revisaron los resultados a los 7, 14 y 21 días. Los resultados se interpretaron por medición de diámetros de crecimiento y se compararon con el halo de crecimiento control.

- *Concentración mínima inhibitoria.* Para establecer extractos con actividad antifúngica positiva, se realizó el mismo procedimiento en cuanto a la preparación del inóculo, siembra e interpretación de resultados, con la variante de que la preparación del medio de cultivo se llevó a cabo realizando diluciones iniciales de 1.0, 0.5, 0.25 mg/ml en adelante, según fue necesario, hasta establecer la CIM del extracto.

Macrodilución en agar para levaduras.

- *Preparación del inóculo.* A partir de un cultivo de 48 horas, se inoculó una asada en 5 ml de Caldo Tripticasa soya de los hongos a ensayar. Se incubaron las suspensiones a 37°C por un período de 48 horas. Luego de este período se tomaron 50 µl de la suspensión y se llevó a una dilución de 1:10 con solución salina.
- *Preparación de extractos a ensayar.* Ver preparación de extractos para la técnica de Macrodilución en agar de hongos filamentosos.
- *Preparación de agar planta.* Ver preparación de agar planta para la técnica de Macrodilución en agar de hongos filamentosos.
- *Inoculación de agar planta.* a partir de la dilución 1:10 del inóculo preparado, se realizaron las siembras en agar Müller Hinton utilizando plantillas previamente elaboradas. Se incubaron 24 horas a 37° C. Los resultados se interpretaron por crecimiento en las estrías de la plantilla.
- *Concentración mínima inhibitoria.* Se realizó el mismo procedimiento que para hongos filamentosos.

Microdilución en placa para filamentosos.

- *Suspensión de esporas.* En tubos de 15 ml de agar Sabouraud se sembraron los hongos a ensayar durante 21 días hasta obtener un crecimiento homogéneo. A cada uno de los tubos se les agregó 3 ml de agua estéril y se desprendió el hongo con ayuda de un asa bacteriológica, ésta solución se filtró con la ayuda de un embudo y gasa estéril, para determinar la cantidad de esporas en cámara de Neubauer y llevarlas a una cantidad de 1×10^4 esporas/ml; y se almacenó posteriormente a 4°C hasta su uso.
- *Preparación del extracto.* En balanza analítica se pesó 0.050 gramos de extracto en 1 ml de DMSO para obtener una concentración de 50 mg/ml.
- *Inoculación en placas.* En placas con fondo en u de 96 pozos se añadieron 100 µl del extracto preparado, 100µl de la suspensión de esporas y 100 µl de caldo Sabouraud doble. La interpretación de resultados se realizó cualitativamente con relación al control de crecimiento y esterilidad en cada placa, a los 48 -72 horas para el género *Aspergillus* y para los géneros *Trichophyton* y *Microsporium* a los 7 días. (9)
- *Concentración mínima inhibitoria.* Se realizó el mismo procedimiento que para la macrotécnica de hongos filamentosos.

Microdilución en placa para levaduras.

- *Preparación del inóculo.* A partir de un inóculo de cultivo fresco se realizó un conteo de levaduras en cámara de Neubauer para determinar la concentración inicial de esporas, ésta concentración inicial se ajustó a una concentración final de 5×10^2 esporas/ml.

- La preparación del extracto, inoculación en placas e interpretación de resultados se llevó a cabo de igual manera que en la Microdilución para filamentosos. (9)
- *Concentración mínima inhibitoria*. Se realizó el mismo procedimiento que para hongos filamentosos.

Diseño de investigación.

Estudio de Concordancia, con respuesta de tipo nominal, para lo cual se corrieron todas las cepas y extractos por ambas técnicas; macrodilución en agar y microdilución en placa, realizando cuatro réplicas para cada variable.

Con el fin de comparar los dos métodos, se clasificaron los resultados en una tabla de contingencia 2x2, considerando al método de macrodilución en agar como el método de referencia, para posteriormente evaluar la sensibilidad, especificidad, índice kappa y t de Student.

4. RESULTADOS

Para darle validez a este estudio de comparación se realizaron ensayos por cuadruplicado con ambas técnicas, utilizando un antifúngico comercial de la casa Pfizer llamado Voriconazol. Es así que al realizar la técnica de Macrodilución en agar para dicha validación los hongos filamentosos *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus* y *M. gypseum* fueron inhibidos a una concentración de 16 µg/ml, mientras que con la técnica de Microdilución en placa a esta misma concentración, fueron inhibidos *T. rubrum*, *A. flavus*, *A. niger* y *M. gypseum*, y a una concentración de 160 µg/ml solamente fue inhibido el crecimiento de *T. mentagrophytes* y *A. fumigatus*. Todos los hongos levaduriformes fueron inhibidos a una concentración

de 16 µg/ml utilizando la Macrodilución en agar, mientras que con la Microdilución en placa todos fueron inhibidos a una concentración de 160 µg/ml y solamente *C. neoformans* y *S. cerevisiae* a 16 µg/ml (7).

Con respecto a la actividad de los extractos contra hongos levaduriformes, aplicando la técnica de Macrodilución en agar se observó que *C. albicans* fue inhibida por *R. mangle*, *L. graveolens* y *S. domingensis*; *C. tropicalis* por *R. mangle*, *L. graveolens*, *T. tepezapote*, *W. urens* y *C. pyramidata*; *C. neoformans* por *R. mangle*, *W. urens* y *C. pyramidata* y *S. cerevisiae* solamente por *V. prionophylla*.

Luego de realizado el tamizaje correspondiente se procedió a elaborar el CIM de los extractos con probable actividad, así pues en la Tabla 2 se observa que al utilizar la técnica macro la mayoría de los extractos presentaron actividad inhibitoria contra los hongos, mientras que al utilizar la técnica micro solamente *S. americanum*, *L. graveolens* y *P. jacquemontianum* tuvieron actividad. Además se puede observar que tanto *L. graveolens* como *P. jacquemontianum* presentaron únicamente actividad contra hongos filamentosos en contraposición con *S. americanum* quien tuvo actividad tanto para filamentosos como para levaduriformes.

Es importante destacar que solamente la actividad de *S. americanum* y de *L. graveolens* contra *M. gypseum* coincidió en los resultados obtenidos por ambas técnica.

Tabla 2. Comparación de CIM entre la Macrodilución en agar y Microdilución en placa a partir de los extractos con actividad positiva

Extracto	Microorganismo	CIM	
		Macro (mg/ml)	Micro (mg/ml)
S. americanum	S. cerevisiae	>1	0.016
	M. gypseum	0.5	0.0625
	C. albicans	>1	0.125
	T. mentagrophytes	>1	0.016
R. mangle	C. neoformans	1	>1
	C. albicans	0.5	>1
	C. tropicalis	1	>1
L. graveolens	C. albicans	1	>1
	C. tropicalis	1	>1
	M. gypseum	0.5	0.0312
	T. rubrum	>1	0.0625
T. tepezapote	T. mentagrophytes	>1	0.0321
	C. tropicalis	1	>1
S. domingensis	C. albicans	1	>1
W. urens	C. neoformans	1	>1
	C. tropicalis	1	>1
A. pseudoalopecurioides	C. tropicalis	0.5	>1
V. prionophylla	S. cerevisiae	1	>1
	T. mentagrophytes	>1	0.5
P. jacquemontianum	C. neoformans	1	>1
	C. tropicalis	0.5	>1

Fuente: Datos experimentales. Evaluaciones por cuadruplicado. N: Actividad negativa. P: Actividad positiva.

Así pues, según los datos que se muestran en la Tabla 2 la concordancia entre ambas técnicas fue muy baja únicamente coincidiendo en un 29%. Se indica también que la técnica experimental, en este caso, la Microdilución en placa posee solamente una buena especificidad, demostrando que detecta a los extractos que verdaderamente no presentan actividad alguna pero no a los extractos con verdadera actividad inhibitoria, ya que el porcentaje de sensibilidad fue muy bajo.

Tabla 3. Pruebas estadísticas realizadas con un IC del 95% para análisis de datos provenientes del tamizaje de actividad

PRUEBA ESTADÍSTICA	VALOR	IC (95 %)
Sensibilidad	21.74	20.96 - 22.52
Especificidad	93.19	93.05 - 93.32
Índice kappa	0.1770	0.0621 - 0.2920

Fuente: Unidad de Biometría. Facultad de Ciencias Química y Farmacia, USAC.

Con el uso de la prueba de t de Student para medias de dos muestras emparejadas, se obtuvo un valor de p igual a 0.012, el cual al compararlo con un alfa de 0.025 demuestra que existe diferencia significativa entre ambas técnicas

5. DISCUSIÓN

La comparación de ambas técnicas se realizó en base a porcentajes de sensibilidad, especificidad y concordancia. De acuerdo a la Tabla 3 se puede observar que con un total de 960 ensayos realizados, un intervalo de confianza del 95%, y empleando la técnica de Macrodilución en agar como técnica de referencia, la Microdilución en placa presentó una especificidad del 93.19, dato que permite establecer que la técnica presentó una capacidad aceptable de identificar los resultados negativos como verdaderos negativos. En contraparte, la técnica presentó una sensibilidad de 21.74, lo cual indica que ésta posee una baja capacidad de detectar la verdadera actividad antifúngica de un extracto.

La concordancia entre ambas técnicas fue de 29% con un índice kappa de 0.1770, lo que indica que existe diferencia significativa entre ambas, razón por la cual la técnica Macro no puede ser reemplazada

por la Microtécnica. Además, el modelo estadístico indica que se necesita de un 50% o más de concordancia para que ambas técnicas sean equiparables en cuanto a sus resultados.

Así pues, la Microdilución en placa puede ser útil para corroborar los resultados que realmente son negativos. A pesar de esto existe una limitante en la obtención de resultados con esta técnica, que es el error humano en la lectura cualitativa de la placa, ya que no se cuenta con un método que permita la lectura cuantitativa de los resultados, disminuyendo así, la exactitud de los mismos.

En cuanto a la Macrodilución en agar, a pesar del porcentaje de concordancia obtenido, es posible establecer que la técnica es apta para el tamizaje de extractos con actividad antifúngica, ya que debido al procedimiento que se utiliza, esta técnica permite una mejor visualización del crecimiento del hongo y actividad del extracto lo que hace más sensible el análisis de la misma.

Es así que ambas técnicas son útiles para evaluar la actividad antifúngica, pero pueden ser de mayor utilidad cuando se emplean de manera combinada.

Además de estos hallazgos, se logró estandarizar el procedimiento de la técnica de Microdilución en placa según estándares internacionales, y se corroboró por medio de la Macrotécnica la actividad antifúngica de los extractos de *L. graveolens*, *S. americanum*, *R. mangle*, *T. tepezapote*, *S. domingensis*, *V. prionophylla* y *P. jacquemontianum*.

Es importante enfatizar que se deben realizar estudios fitoquímicos y farmacológicos de los extractos de hoja/etanol y hoja/cloroformo de *S.*

americanum y *L. graveolens*, ya que ellos fueron los únicos que mostraron actividad antifúngica con ambas técnicas.

Este trabajo permitió integrar los esfuerzos de los tres primeros autores para presentarlo como seminario de tesis, para la evaluación terminal de la carrera de Química Biológica.

6. REFERENCIAS

1. Quindós, G. (2002). Las micosis en el amanecer del siglo XXI. Rev Iberoam Micol, 19, 1-4.
2. Loeffler, J. (2003). Antifungal drug resistance. Clin Infect Dis, 17, 31-41.
3. Wheat, J. (1995). Endemic mycoses in AIDS: A clinical review. Clin Microbiol Rev. 8, 146-159.
4. Perea, S. (2002). Antifungal resistance in pathogenic fungi. Clin Infect Dis 35, 1073-1080.
5. Gaitán, I. (2005). Actividad de doce plantas nativas Guatemaltecas contra *Sporothrix schenckii*. Tesis de licenciatura. Universidad de San Carlos de Guatemala.
6. Paz, A.M. (2005). Búsqueda de actividad contra especies de *Campylobacter* en plantas nativas de Guatemala. Tesis de maestría MUPLAM. Universidad de San Carlos de Guatemala.

7. Serrano M. (2005). Actividad in vitro de voriconazol y otros tres antifúngicos frente a dermatofitos. Sevilla, España: Servicios de Microbiología del Hospital Universitario de 16.
8. Brancato F. Golding NS. (1983). The Diameter of the mold colony as a reliable measure of growth. *Micología* Vol. 45. (p.848-862).
9. MD Pfaller, M.A. et al. (2002). Reference Method for Broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard. NCCLS Documento M38-A Vol. 22. No. 16.