Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología 2014; 34:86-90

Artículo original

Composición química y evaluación de la actividad antifúngica del aceite esencial de corteza de *Vismia baccifera* var. *dealbata*

Marietta Vizcaya[a,*], Celina Pérez[b], Janne Rojas[a], Luis Rojas-Fermín[c], Claudia Plaza[d], Antonio Morales[a], Patricia Pérez[a]

[a]*Grupo de Investigación "Biomoléculas Orgánicas", Instituto de Investigaciones,* [b]*Laboratorio de Micología,* [c]*Grupo de Productos Naturales y Química Medicinal, Instituto de Investigaciones,* [d]*Postgrado en Química de Medicamentos, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela.*

Recibido 21 de maro de 2014; aceptado 20 de octubre de 2014

***Resumen*:** El objetivo de este trabajo fue evaluar la susceptibilidad de levaduras del género *Candida* y el Complejo *Cryptococcus neoformans* al aceite esencial de *Vismia baccifera* var. *dealbata*. El aceite, procedente de Chiguará, estado Mérida-Venezuela, fue analizado por CG/EM logrando la identificación de trece componentes, que constituyeron el 97,7% de la mezcla; tres de ellos se apreciaron como productos mayoritarios, representando el 70,4% de la totalidad (Óxido de cariofileno 31,4%, *β*-cariofileno 26,4% y *α*-zingibireno 12,6%). El ensayo de actividad antifúngica mostró que dicho aceite inhibió el crecimiento de varias cepas de los géneros *Candida* y el Complejo *C. neoformans,* evaluadas cualitativamente por difusión en agar con disco a una concentración de 1.000 µg/mL; se observaron halos de inhibición entre 8 y 12 mm, exhibiendo valores de CMI entre 1,6 y 1.000 µg/mL en el ensayo cuantitativo por el método "Spot on a lawn". Los datos obtenidos fueron sometidos a análisis de varianza y la prueba de Tukey, obteniéndose una actividad inhibitoria relevante contra *Candida krusei*. Este estudio constituye el primer reporte, tanto de la composición química como de evaluación antifúngica del aceite esencial extraído a partir de especies del género *Vismia*.

***Palabras clave*:** *Vismia*, Hypericaceae, aceite esencial, sesquiterpenos, *Candida krusei*, antifúngico.

Chemical composition and evaluation of anti-fungal activity of essential oil from *Vismia baccifera* var. *dealbata* bark

***Abstract*:** The purpose of this study was to evaluate the susceptibility of *Candida* genus yeasts and the *Cryptococcus neoformans* Complex to essential oil from *Vismia baccifera* var. *dealbata*. This oil, obtained at Chiguará, Mérida State, was analyzed by GC/MS, which identified thirteen components that constituted 97.7% of the mixture; three of them were established as majority products, representing 70.4% of the total: (cariophyllene oxide 31.4%, β-cariophyllene 26.4%, and α-zingibirene 12.6%). The anti-fungal assay showed that this oil inhibited the growth of several *Candida* genus strains and of the *C. neoformans* Complex, qualitatively evaluated by agar disk diffusion at a 1,000 µg/mL concentration; inhibition halos of a between 8 to 12 mm diameter were observed, showing MIC values between 1.6 and 1,000 µg/mL in the "Spot on a lawn" quantitative assay. The data obtained were submitted to ANOVA and Tukey's test, demonstrating a relevant inhibitory activity against *Candida krusei.* This study constitutes the first report, both of the chemical composition and of the anti-fungal evaluation, of the essential oil extracted from *Vismia* genus species.

***Keywords*:** *Vismia*, Hypericaceae, essential oil, sesquiterpenes, *Candida krusei*, antifungal agent.

* Correspondencia:
E-mail: marietta@ula.ve

Introducción

Las especies de *Vismia* (Hypericaceae) se han cultivado en gran escala y están distribuidas principalmente en la frontera de Venezuela con Colombia y Brasil; alrededor de 97 especies constituyen el género y aproximadamente nueve están ampliamente distribuidas en el territorio venezolano. *Vismia baccifera* es hasta ahora la especie más polimórfica del género, su corteza externa es de color marrón-rojizo y su desprendimiento produce el flujo de un exudado anaranjado [1].

Diversos estudios, acerca de la obtención de aceites

esenciales de especies pertenecientes al género *Vismia* se han reportado, y en algunos casos, han evaluado el poder antimicrobiano de los mismos; estos aceites parecen exhibir compuestos mayoritarios comunes como los derivados sesquiterpénicos de núcleo cariofilano, germacrano y cadinano [2-5]. Además, han mostrado poseer actividad frente a microorganismos como *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*, determinados por técnicas de difusión en agar [4,5]. En el presente estudio, se evaluó la sensibilidad de organismos superiores pertenecientes al reino Fungi al aceite esencial de *V. baccifera* var. *dealbata*, particularmente en levaduras del género *Candida* como *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* y el Complejo *Cryptococcus neoformans*, responsables de infecciones micóticas oportunistas. De acuerdo a la bibliografía consultada, este sería el primer reporte tanto de la composición química como de evaluación antifúngica del aceite esencial aislado de la corteza de *Vismia baccifera* var. *dealbata*.

Materiales y métodos

Recolección del material botánico: La especie fue recolectada en la finca "Los Topes", Aldea San Juanito, Parroquia Chiguará, Municipio Sucre, estado Mérida, Venezuela, a una altitud de 1.250 msnm. Una muestra del material recogido, luego de su identificación por el Ingeniero Juan Carmona, fue depositada en el herbario de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes (ULA) bajo el voucher JR-21.

Obtención del aceite esencial: La corteza de *V. baccifera* var. *dealbata* (Triana & Planch), recién separada del tallo, fue sometida a un proceso de hidrodestilación por 4 horas para la obtención de los componentes volátiles. El aceite se recogió utilizando una trampa de Clevenger, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se guardó en frasco ámbar a temperatura entre 4 y 6 ºC.

Análisis del aceite esencial: La esencia obtenida se analizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM) utilizando un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard modelo 6890, con columna capilar HP-5 de 30 metros de largo, equipado con un detector de masa Hewlett-Packard modelo 5973. Los espectros de masas obtenidos para cada pico en el cromatograma fueron comparados con los reportados en la sexta edición de la base de datos Wiley MS. Para el análisis se preparó una solución 1:20 de esencia *n*-heptano y se inyectó 1 µL en el cromatógrafo. El programa de temperatura utilizado inició en 60 ºC, luego se incrementó a razón de 4 ºC/min hasta alcanzar 260 °C. El inyector se mantuvo a 200 ºC. La relación de reparto fue 1:100. Se calcularon los índices de Kovats [6] obtenidos en los cromatogramas de ambos aceites en relación a los tiempos de retención de los componentes de cada aceite con una serie de *n*-parafinas (C_9-C_{27}) [7]. Los valores obtenidos se compararon con los publicados en la literatura, seguido de los espectros de masas de la librería Wiley MS 6ta edición data, junto con la base de datos NIST-05 [8].

Microorganismos utilizados y sustancias de referencia: Se utilizaron un total de seis especies de levaduras: *C. albicans* ATCC 90028, *C. glabrata* ATCC 90030, *C. tropicalis* ATCC 50658, *C. krusei* ATCC 6258, *C. parapsilosis* ATCC 22019 (provenientes de la Micoteca del Departamento de Micologia del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel") y Complejo *C. neoformans* (aislado clínico, identificado por auxanograma -asimilación de fuentes carbonadas y nitrogenadas- ureasa y termotolerancia). Todas las cepas se mantuvieron conservadas por el método de Castellani en el Laboratorio de Micología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, de la ULA. Para el ensayo cualitativo se usaron como control positivo discos de fluconazol de 25 µg (Oxide Basingstoke®) y para el ensayo cuantitativo soluciones de fluconazol (Calox®) a diferentes concentraciones (1.000; 200; 40; 8; 1,6; 0,32; 0,06; 0,001 µg/mL), las mismas utilizadas para la esencia, de Fluconazol (Calox®). En ambos estudios, el control negativo usado fue dimetil sulfóxido (DMSO) grado HPLC (Scharlau Chemie S.A.®).

Ensayo cualitativo de difusión en agar con disco: Se realizó la prueba de susceptibilidad por difusión en agar con disco para fluconazol, en agar Müeller-Hinton más glucosa y azul de metileno, con algunas modificaciones [9].

Como medios de cultivo se utilizaron: agar Sabouraud dextrosa, (BBL™, Becton Dickinson and Company®) con cloranfenicol (Colmed Internacional®), mezclado constantemente bajo calor y distribuido en tubos a razón de 6 mL, y agar Müeller-Hinton (BBL™, Becton Dickinson and Company®) con glucosa anhídrida y solución de azul de metileno (DIFCO®), el cual se sirvió en tubos a razón de 20 mL por tubo. Los medios se esterilizaron por 15 minutos a 121 °C y se dejaron solidificar formando taco.

Se repicaron las levaduras de referencia en agar Sabouraud dextrosa con cloranfenicol y se conservaron a temperatura ambiente por 48 h. Para el bioensayo, se preparó el inóculo de la cepa resuspendiéndola en solución salina fisiológica y ajustando la suspensión a un patrón de turbidez 0,5 Mac Farland, equivalente a 1-5x10^6 UFC/mL. A partir del inoculo preparado de cada cepa, se tomó 1 mL y se agregó al medio Müeller-Hinton modificado, mezclando con movimientos rotativos; luego se vertió en la placa de Petri de 90 mm y se dejó solidificar. Una vez solidificado el medio en la placa, se colocaron los discos de papel de filtro (6 mm de diamétro, Whatman® Nº1); posteriormente, se impregnaron con 10 µL de la solución del aceite esencial a 1.000 µg/mL. Dos discos adicionales se colocaron por placa: fluconazol de 25 µg (control positivo) y DMSO (control negativo). Las placas se incubaron a 37 ºC por un período de 48 h. Se midieron los halos de inhibición y se expresaron en mm. Este ensayo se realizó por triplicado.

Ensayo cuantitativo. Determinación de la Concentración

Mínima Inhibitoria (CMI): Se realizó la determinación de la CMI bajo la técnica de difusión en gota, denominado "Spot on a law" [10]. Una microgota (10 µL) de la sustancia a evaluar se colocó sobre la superficie del medio a ocho concentraciones diferentes. Para ello se realizaron diluciones seriadas en DMSO de las sustancias a ensayar, comenzando con la solución madre de 1.000 µg/mL obteniéndose soluciones de 1.000; 200; 40; 8; 1,6; 0,32; 0,06 y 0,001 µg/mL, las cuales se colocaron en placas de Petri preparadas de la misma forma que en el ensayo cualitativo, que se mantuvieron a temperatura ambiente por 48 horas. La menor concentración donde se evidenció un halo de inhibición del crecimiento de la levadura hasta en un 50%, se consideró como la CMI. Este ensayo se realizó por triplicado.

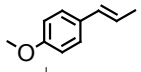
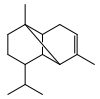
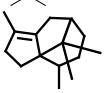
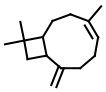
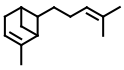
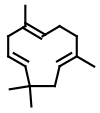
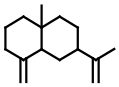
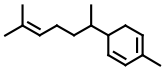
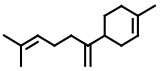
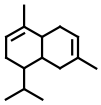
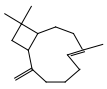
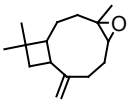
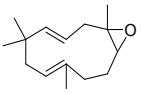
Análisis estadístico: Los halos de inhibición registrados junto con las CMI de los ensayos por triplicado, arrojaron una media aritmética y una desviación estándar, calculadas con el paquete estadístico SPSS Statistics 15.0 versión para Windows; de igual manera se realizó el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparación de medias de Tukey, con el fin de determinar si los halos de inhibición y las CMI de las levaduras ensayadas eran significativamente diferentes.

Resultados y discusión

En el presente estudio se obtuvieron 1,7±0,1 mL de aceite esencial de corteza de *V. baccifera* var. *dealbata*, con un rendimiento de 0,011%. Al realizar la CG/EM se identificaron 13 componentes que conformaron el 97,7% de la totalidad del aceite. Se obtuvieron espectros de masas para cada señal en el cromatograma, los cuales se compararon con los que se encuentran en la librería digital Wiley MS, 6ta edición. La tabla 1 muestra la composición del aceite esencial junto con los índices de Kovats calculados para este experimento y cotejados con los reportados por la bibliografía [8]. Al observar dicha composición, se evidenció que está basada principalmente en sesquiterpenos, a excepción del 1,5,5,8-tetrametil-12-oxabiciclo [9.1.0]dodeca-3-7-dieno, que se encontró en menor proporción. Tres de los 13 componentes se evidenciaron como mayoritarios: 2 de ellos de núcleo cariofilano (óxido de cariofileno en 31,4% y *β*-cariofileno en 26,4%) y en menor porcentaje se observó al *α*-zingibereno en un 12,6%, un derivado del bisaboleno. Estas sustancias conformaron el 70,4% de la totalidad del aceite analizado.

Especial atención merecieron los estudios realizados en la misma especie, aunque en diferentes partes de la misma, ya que se encontró al *β*-cariofileno en hojas recolectadas en distintas localidades del estado Mérida en porcentajes de 45,7% (especie recolectada en La Hechicera) y 10,1% (especie recolectada en Chiguará) como componente mayoritario [2]; para el caso de los frutos, este compuesto se encontró en un 11,9% [4]. De igual manera, esta sustancia es porcentualmente considerable en la esencia de hojas de *V. macrophylla* (20,1%) [3] y en el aceite esencial de las hojas de *V. guianensis* (19,6%) [5]. En virtud de lo antes expuesto, sería recomendable explorar a través de futuras investigaciones, si las plantas del género *Vismia* requieren metabolitos secundarios similares para su interacción ecológica.

Tabla 1. Composición química e índices de Kovat (IK) del aceite esencial extraído de la corteza de *Vismia baccifera* var. *dealbata.*

Nº	Nombre	%	*IK	**IK	Estructura
1	trans-anetol	1,1	1.295	1.283	
2	*α*-copaeno	1,3	1.378	1.376	
3	cipereno	3,8	1.397	1.398	
4	*β*-cariofileno	26,4	1.420	1.418	
5	*α*-bergamoteno	2,3	1.437	1.436	
6	*α*-humuleno	5,7	1.457	1.454	
7	*β*-selineno	2,5	1.491	1.485	
8	*α*-zingibereno	12,6	1.498	1.498	
9	*β*-bisaboleno	2,9	1.512	1.509	
10	*β*-cadineno	1,7	1.527	1.524	
11	trans-cariofileno	2,2	1.554	1.557	
12	óxido de cariofileno	31,4	1.581	1.581	
13	1,5,5,8-tetrametil-12-oxabiciclo [9.1.0]dodeca-3-7-dieno	3,7	1.604	-	

*Índice de Kovats calculado para este experimento. **Índice de Kovats reportado en la bibliografía [8]

Por su parte, el ensayo antifúngico cualitativo, mostró actividad inhibitoria contra todas las cepas de referencia evaluadas; tal como se puede observar en la tabla 2, los halos de inhibición estuvieron comprendidos entre 8 y 12 mm de diámetro. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas en la sensibilidad de las levaduras evaluadas ($p>0,05$), ya que las medias de los halos inhibición fueron cercanas entre ellas.

La actividad antifúngica observada con el aceite esencial

Tabla 2. Actividad antifúngica del aceite esencial de corteza de *Vismia baccifera* var. *dealbata* contra levaduras ATCC y el Complejo *C. neoformans*.

Microorganismos	Ensayo Cualitativo			Ensayo Cuantitativo		
	Zona de Inhibición (mm)			CMI (µg/mL)		
	Aceite	Fluconazol®	Fluconazol[a]	Aceite	Fluconazol®	Fluconazol[b]
C. albicans	8,3 ±0,6	53±1	28-39	1.000,00±0	1,60±0	0,25-1
C. glabrata	11,7 ±0,6	20,6±1,2	NR	200,00±0	0,32±0	NR
C. tropicalis	8 ± 0	41,7±2,1	26-37	1.000,00±0	1,60±0	1-4
C. krusei	9,3 ± 1,3	9,7±0,6	≤18	1,60±0	8,00±0	16-64
C. parapsilosis	11,3±0,6	23,7±2,5	22-33	1.000,00±0	8,00±0	2-8
C. neoformans	10,3 ±2,1	39±1	NR	1.000,00±0	0,32±0	NR

a = Valores de referencia utilizados para disco de Fluconazol de 25 µg [9]. b = Valores de referencia utilizados para soluciones de Fluconazol entre 0,125-64µg/mL [16]. NR = No Reportado (los valores de referencia).

de corteza sobre las levaduras, podría deberse a componentes comunes presentes en las plantas del género *Vismia*, tal como se ha mencionado anteriormente, aunque posiblemente esté presente una actividad sinérgica entre los mismos por tratarse de una mezcla. En este ensayo cualitativo, el aceite esencial presentó halos de inhibición considerablemente cercanos al diámetro del disco y menores que para el antifúngico usado como control, que fueron cercanos a los limites de los valores de referencia, hecho que promovió que en el desarrollo del ensayo cuantitativo se colocara una microgota directamente sobre la superficie del medio Müeller-Hinton modificado, tal como lo realizaron Lizcano y col [10].

En el ensayo cuantitativo el aceite esencial de la corteza de la especie en estudio mostró actividad contra las levaduras *C. tropicalis, C. parapsilosis* y el complejo *C. neoformans* con valores de CMI de 1.000 µg/mL, magnitud que coincidió con la concentración máxima evaluada; sin embargo, para *C. krusei* y *C. glabrata* se observó una mayor actividad inhibitoria, exhibiendo valores de CMI entre 1,6 y 200 µg/mL, respectivamente; el análisis estadístico mostró diferencias significativas en la CMI determinada para *C. krusei* contra el resto de las levaduras evaluadas ($p<0,05$).

Sin duda alguna, el resultado arrojado para *C. krusei,* donde la CMI fue similar e inclusive menor a la ensayada con el antifúngico de referencia fluconazol, representó una derivación importante, ya que el desarrollo de resistencia a los azoles es un fenómeno bien conocido en los hongos del género *Candida* y en particular *C. krusei*, por la presencia de resistencia intrínseca [11]. Existen diversos estudios de la actividad antifúngica que presentan los aceites esenciales, extraídos de diversas fuentes, contra organismos del reino Fungi [12-15], no obstante, para el género *Candida* en particular, no se han reportado evaluaciones de actividad antifúngica con esencias, aunque se han publicado estudios donde se determina la CMI de extractos o metabolitos secundarios provenientes de especies del género *Vismia*, en particular *V. laurentii* [17-19] y *V. rubescens* [20], por lo que este estudio constituiría uno de los primeros reportes de aceite esencial con actividad antifúngica, extraído a partir de especies del género *Vismia*, representando un aporte tanto a la fitoquímica de los productos naturales como a estudios de sustancias de origen natural con potencial biológico.

Conclusión

El aceite esencial de corteza de *V. baccifera* var. *dealbata* presentó actividad antifúngica *in vitro* contra levaduras del género *Candida y* contra el Complejo *C. neoformans.*

Debido a los múltiples estudios que se han reportado en los últimos años con respecto a la aparición de cepas de levaduras resistentes a antifúngicos como los azoles, este estudio evidenció que el aceite esencial extraído a partir de la corteza de *V. baccifera* var. *dealbata,* podría constituir una alternativa en la búsqueda de tratamientos para infecciones fúngicas producidas por *C. krusei.*

Agradecimientos

Los autores desean expresar su gratitud al Dr. Alfredo Usubillaga por su valiosa contribución en la realización de los cromatogramas y al Br. Alexander Moreno por su colaboración en la preparación de los medios de cultivo y descarte del material biológico.

Referencias

1. Ewan J. Synopsis of the South American species of *Vismia* (Guttiferae). Vol 35. Washington DC, USA: Smithsonian Institution; 1962.
2. Buitrago A, Rojas L, Rojas J, Buitrago D, Usubillaga A, Morales A. Comparative studie of the chemical composition of the essential oil of *Vismia baccifera* var. *dealbata* (Guttiferae) collected in two different locations in Merida, Venezuela. J Essent Oil Bear Pl. 2009; 12:651-5.
3. Rojas J, Buitrago A, Rojas L, Morales A. Esential oil composition of *Vismia macrophylla* leaves (Guttiferae). Nat Prod Commun. 2010; 6:85-6.
4. Rojas J, Buitrago A, Rojas L, Morales A, Lucena M,

Baldovino S. Essential oil composition and antibacterial activity of *Vismia baccifera* fruits collected from Mérida, Venezuela. Nat Prod Commun. 2011; 6:699-700.

5. Silvestre R, Morales M, Lins A, Ralph M, Lima-Filho J, Camara C, Silva T. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of the essential oil from *Vismia guianensis* fruits. Afr J Biotechnol. 2012; 11:9888-93.
6. Kovats E. Gas-chromatographische charakterisierung organischer verbindungen. Teil 1: retentions indices aliphatic cherhalogenide, alkohole, aldehyde und ketone. Helv Chim Acta. 1958; 41:1915-32.
7. Lamparsky D. Fingerprints in essential oil analysis. In: Capillary gas chromatography in essential oil analysis, P. Sandra, C. Bicchi, editors. Heidelberg, Germany: Verlagsgruppe Huthig Jehle Rehm GmbH; 1987. p 155-213.
8. Robert P, Dr. Adams. Identification of essential oil components by gas chromatography/Mass spectrometry. 4th Ed. New South Wales, Australia: Allure Pub Corp; 2007. viii-804.
9. Barry A, Bille J, Brown S, Ellis D, Meis J, Pfaller J, Rennie R, Rinaldi M, Rogers T, Traczewski M. Quality control limits for fluconazole disk susceptibility tests on Mueller-Hinton agar with glucose and methylene blue. J Clin Microbiol. 2003; 47:3410-2.
10. Lizcano LJ, Viloria-Bernal M, Vicente F, Berrueta LA, Gallo B, Martínez Cañamero M, Ruiz-Larrea MB, Ruiz-Sanz JI. Lipid oxidation inhibitory effects and phenolic composition of aqueous extracts from medicinal plants of Colombian amazonia. Int J Mol Sci. 2012; 13:5454-67.
11. Bedout C, Ayabaca J, Vega R, Méndez M, Santiago A, Pabón M, Tabares A, Arango M, Restrepo A, Neweil V. Evaluación de la susceptibilidad de especies de *Candida* al fluconazol por el método de difusión en disco. Biomédica. 2003; 23:31-7.
12. Barrera L, García L. Actividad antifúngica de aceites esenciales y sus compuestos sobre el crecimiento de *Fusarium* sp. aislado de papaya (*Carica papaya*). Revista Científica UDO Agrícola. 2008; 8:33-41.
13. Wilson C, Solar J, El Ghaouth A, Wisniewski M. Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. Plant Disease.1997; 81:204-10.
14. Gogoi R, Barvah P, Nath S. Antifungal activity of the essential oil of *Litsea cubeba* Pers J Essent Oil Res. 1997; 9:213-21.
15. Pitarikili D, Tzakou O, Couladis M, Verikokidou E. Composition and antifungal activity of the essential oil of *Salvia pomifera* subsp. *calycina* growing wild in greed. J Essent Oil Res. 1999; 11:655-9.
16. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard. Second edition. Document M27-A2. Pennsylvania USA; 2002.
17. Kuete V, Nguemeving JR, Benga VP, Azebaze AG, Etoa FX, Meyer M, Bodod B, Nkengfack AE. Antimicrobial activity of the methanolic extracts and compounds from *Vismia laurentii* De Wild (Guttiferae). J Ethnopharmacol. 2007; 109:372-9.
18. Tala MF, Krohnb K, Hussain H, Kouamc SF, Waboa HK, Tanea P,Schulzd B, Hu Q. Laurentixanthone C: a new antifungal and algicidal xanthone from stem bark of *Vismia laurentii.* Z Naturforsch. 2007; 62:565-8.
19. Nguemeving JR, Azebaze AG, Kuete V, Carly NN, Beng VP, Meyer M, Blond A, Bodo B, Nkengfack AE. Laurentixanthones A and B, antimicrobial xanthones from *Vismia laurentii*. Phytochemistry. 2006; 67:1341-6.
20. Tamokoua J de D, Tala MF, Wabob HK, Kuiatea JR, Taneb P. Antimicrobial activities of methanol extract and compounds from stem bark of *Vismia rubescens.* J Ethnopharmacol. 2009; 124:571-5