

Determinación preliminar del potencial bioterapéutico de nanopartículas de quitosano plus extracto de *Prosopis* contra *Candida albicans*

Rodríguez Rico, D.* , Mena Favela A., Marszalek, J.E., De la Fuente-Salcido, N.M.

Universidad Autónoma de Coahuila. Facultad de Ciencias Biológicas. Departamento Bioprospección y Bioprocesos. Blvd. Torreón-Matamoros, Km. 7.5, Ciudad Universitaria, Torreón, Coahuila, México 27104.

*danyrrico@live.com.mx

RESUMEN:

Los polímeros antimicrobianos como el quitosano y los extractos vegetales (*Prosopis glandulosa*) son eficientes agentes bioactivos para inhibir el crecimiento de bacterias, hongos y levaduras y han generado novedosas investigaciones para utilizarlos como una alternativa real y efectiva para inhibir patógenos, sin generar resistencia como los antibióticos tradicionales. En esta investigación los objetivos fueron sintetizar nanopartículas de quitosano (nPQ) con extracto de mezquite (EM) y determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) contra levaduras de infecciones nosocomiales (*Candida albicans* y *C. parapsilosis*) mediante bioensayos por difusión en agar y microdilución. Las nPQEM al 2% fueron más efectivas para inhibir las levaduras ensayadas por el método de difusión en pozos (242 U y 164 U para *C. parapsilosis* y *C. albicans* respectivamente), y similares resultados se obtuvieron por difusión en discos con halos de menor resolución. Las CMIs se establecieron en nPQEM (2%) en 125 mg/mL para *C. parapsilosis* y 250 mg/mL para *C. albicans* pero la agitación limitada en la microplaca conduce a utilizar difusión en pozos como referencia más exacta..

ABSTRACT:

Antimicrobial polymers such as chitosan and plant extracts (*Prosopis glandulosa*) are efficient bioactive agents to inhibit the growth of bacteria, fungi and yeasts and have generated novel research to use them as a real and effective alternative to inhibit pathogens, without generating resistance as traditional antibiotics. In this research the objectives were synthesize chitosan nanoparticles (nPQ) added with mesquite extract (EM) and preliminarily determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) against yeasts growth from nosocomial infections (*Candida albicans* and *C. parapsilosis*) by agar diffusion and microdilution bioassays. The nPQEM (2%) was the most effective to inhibit the growth of the yeasts tested by the well diffusion method (242 U and 164 U for *C. parapsilosis* and *C. albicans* respectively). Similar results were obtained by disk diffusion, however but halos shows lower resolution. The MIC was preliminarily established in nPQEM (2%) at 125 mg/mL for *C. parapsilosis* and 250 mg/mL for *C. albicans* but the limited agitation in the microplate leads us to use well diffusion as a more accurate reference..

Palabras clave:

Candidiasis, Quitosano, Nanopartículas, Mezquite, Resistencia antimicrobiana.

Área: Microbiología y biotecnología

INTRODUCCIÓN

Los antibióticos y las drogas terapéuticas (antimicrobianos), son ineficaces contra la resistencia microbiana (Blair, et al., 2015). La resistencia microbiana es un cambio en la respuesta de acción de uno o varios agentes terapéuticos para tratamiento de infecciones causadas por microbios. En nuestro país las infecciones nosocomiales involucran gran cantidad de microorganismos causando una problemática grave y costosa, esto debido principalmente por la resistencia o multiresistencia que adquieren. Los microorganismos en las infecciones intrahospitalarias incluyen al grupo denominado ESKAPE (*Klebsiella*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *enterobacterias* -*Escherichia coli* y *Morganella*-), además de levaduras causantes de candidiasis. La levadura *Candida albicans* es frecuentemente aislada en los hospitales de segundo nivel en México (177) (Arias-Flores et al., 2015). *Candida albicans* es un colonizador comensal de la mayoría de las personas, pero patógeno en pacientes inmunocomprometidos, cuya flexibilidad metabólica y rasgos poligénicos (características bioquímicas, fisiológicas, genéticas y morfogenéticas) (Fig. 1) le permiten sobrevivir en múltiples nichos en el huésped (paciente en hospital) (da Silva Dantas et al., 2016).



Figura 1. Factores de virulencia poligénica de *Candida albicans*

Los polímeros antimicrobianos como el quitosano y los extractos vegetales (*Prosopis glandulosa*) son eficientes agentes bioactivos para inhibir el crecimiento de bacterias, hongos y levaduras (López Mata et al., 2015). Lo anterior ha generado investigaciones para utilizarlos como una alternativa real y efectiva para inhibir el crecimiento de patógenos, sin generar resistencia como los antibióticos tradicionales (Arias-Flores et al., 2015). En esta investigación los objetivos fueron sintetizar nanopartículas de quitosano (nPQ) adicionadas con extracto de mezquite (EM) por sonicación y determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de las nPQEM para inhibir el crecimiento de *C. albicans* y *C. parapsilosis* mediante bioensayos por difusión en agar y microdilución (EUCAST 2000; Balouri et al., 2016; CLSI 2017, Leclercq et al., 2017).

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de extracto de rama de mezquite (*P. glandulosa*)

El extracto (EM) se obtuvo por decocción (90°C/5min) de harina de rama de mezquite con acetona (1 mg/mL).

Producción de 2 formulaciones de las nPQEM.

Se obtuvieron tratamientos con diferentes concentraciones de nPQ (2% y 2.5%), EM (20% y 10%), ácido oleico, tripolifosfato de sodio (TPPS), Tween. La síntesis de las nanopartículas de quitosano con EM (nPQEM) se realizó por sonicación a una amplitud del 50% durante 15 minutos en intervalos de 5 minutos.

Bioensayos de la actividad antimicrobiana

Material biológico: *C. parapsilosis* y *Candida albicans* aisladas de pacientes del hospital general de zona e identificadas con sistema VITEK 2® (Biomérieux). En todos los bioensayos se utilizó nistatina (2000µg/mL) como control positivo.

Se utilizaron técnicas de difusión que proporcionan resultados basados en el efecto causado en el microorganismo blanco y técnicas de dilución para obtener resultados cuantitativos como el valor de la concentración mínima inhibitoria (CMI) (CLSI 2017; EUCAST 2000).

-Determinación preliminar de actividad antimicrobiana.

La actividad antifúngica *in vitro* se determinó preliminarmente por *difusión en pozos* en donde utilizaron placas con agar Sabouraud (AS) inoculado con las candidas (1×10^6 cel/mL), se realizaron pocillos 8 mm de diámetro, se depositaron 100 µL de cada tratamiento y se incubaron a 30°C/48h. Se midió el halo de inhibición del crecimiento (mm) de las levaduras.

-Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria

Se realizó una doble dilución de cada tratamiento:

a) Difusión en agar (en pozos y discos). La *difusión en pozos* se realizó como se mencionó previamente en las mismas condiciones. *C. parapsilosis* (1×10^6 cél/mL), se permitió la difusión por 12 h a 4°C y se incubaron a 30°C/24h. Se midieron los halos de inhibición del crecimiento de cada *Candida* por acción de cada tratamiento y se determinó la actividad antifúngica.

b) Microdilución. La concentración mínima inhibitoria (CMI) (fig. 2) se considera la concentración más baja, expresada en mg/L requerida para inhibir el crecimiento de un microorganismo bajo condiciones específicas *in vitro* en un período de tiempo pre-establecido (De la Fuente-Salcido *et al.*, 2015).

La CMI se determinó por microdilución (CLSI 2017) por doble dilución (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64) de cada tratamiento hasta un volumen final de 200 μ L que contenía 150 μ L CS con *Candida* (1×10^6 cél/mL) y 50 μ L de cada tratamiento diluido y se depositaron en placas de 96 pozos (Figura 2). La placas se incubaron a 30°C/48h en agitación orbital mínima. Se registró la densidad óptica (OD_{600 nm}) a 30°C a las 24 y 48h en un lector de microplacas WHY-101 (Poweam). Cada placa se preparó por duplicado.



Figura 2. Métodos para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de nanopartículas de quitosano con extracto de mezquite (nPQEM) para inhibir a *C. parapsilosis*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Difusión de pozos en agar

Este método permite la medición de los halo que genera cada tratamiento en ambos tratamientos con nPQ se confirma preliminarmente que tienen un efecto inhibitorio de la levadura y midió la actividad antifúngica (mm) (tabla 3 y fig. 4) Cabe destacar que le mayor halo de inhibición esta en las nPQEM 2%.

Tabla 3. Actividad antifúngica* *in vitro* de nanopartículas de quitosano con extracto de mezquite, extracto de mezquite y quitosano contra levaduras

| Tratamiento | <i>Candida parapsilosis</i> | | | | <i>Candida albicans</i> | | | |
|--------------|-----------------------------|-----|-----|-----|-------------------------|-----|-----|-----|
| | 1/1 | 1/2 | 1/4 | 1/8 | 1/1 | 1/2 | 1/4 | 1/8 |
| nPQEM (2%) | 242 | 120 | ND | ND | 164 | 66 | ND | ND |
| nPQEM (2.5%) | 164 | ND | ND | ND | 120 | 66 | ND | ND |
| EM | 333 | ND | ND | ND | 82 | ND | ND | ND |
| nPQ | 141 | 120 | ND | ND | 100 | ND | ND | ND |

*Diámetro de inhibición del crecimiento en mm²

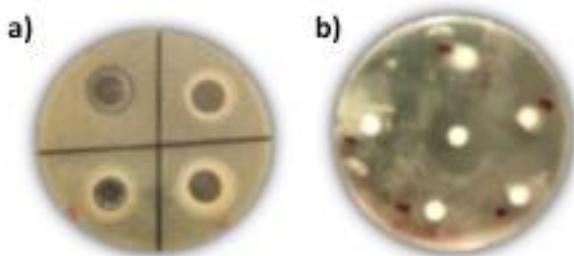


Figura 4. Determinación de la actividad antifúngica por difusión en agar a) pozos b) discos.

Se observa la diferencia de la resolución del halo de inhibición del crecimiento en ambos métodos

Concentración mínima inhibitoria (CMI)

En ambos tratamientos con nPQ se confirmó preliminarmente la concentración mínima inhibitoria utilizando el método microdilución. El método permite establecer la concentración efectiva mínima para el desarrollo de las candidas. Este método es ampliamente usado pero se debe de tener varias consideraciones como la previa calibración del equipo así como la correcta limpieza de la cámara y el aislado de la misma al incubarla. Para mejorar la observación de las curvas que genera los controles positivos y negativos, así como los tratamientos, el extracto de mezquite y las nanopartículas de quitosano. Se analizó por medio de grafica (fig. 5). La mayor dilución para nPQEM (2%) es de 125 mg/mL (1/8), para nPQEM (2.5%) 250mg/mL (1/4), en el EM 500mg/mL (1/2), y las nPQ 500mg/mL (1/2). Estos datos arrojan que nPQEM (2.5%) tiene una efectividad hasta en una dilución de 1/4.

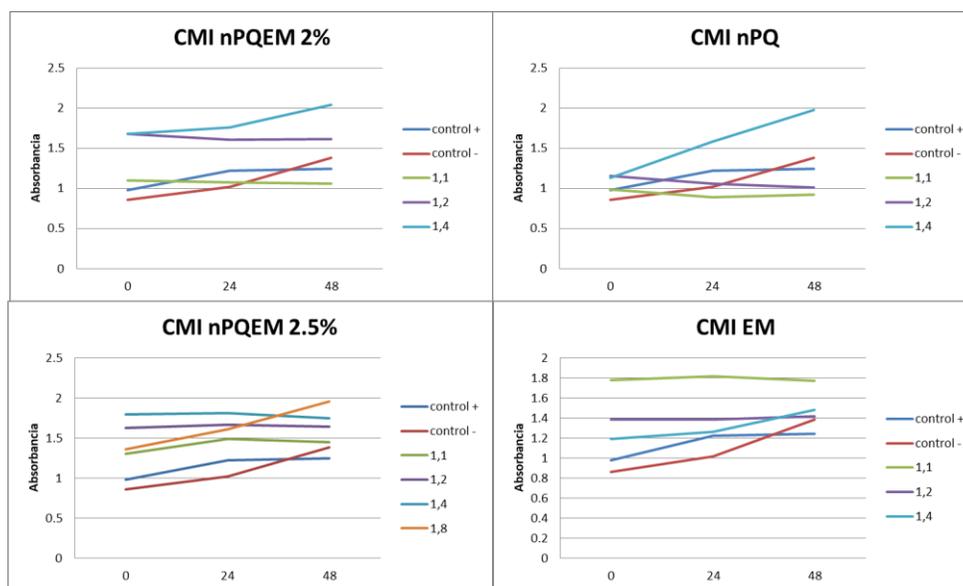


Figura 5. Determinación de la CMI por microdilución. Efecto de las nPQEM contra el crecimiento de levaduras (OD 600nm) durante 48 h. Control positivo nistatina (línea azul marino) y control negativo medio inoculado (línea guinda).

Las nanopartículas de quitosano y el extracto de mezquite por sí mismo muestran tener un efecto inhibitorio en el desarrollo de *Candida parapsilosis* a un en dilución de 500ug/mL para ambos compuestos, pero destaca el efecto inhibitorio de la mezcla de las nanopartículas de quitosano y el extracto de mezquite generando valores superiores y teniendo un efecto inhibitorio en diluciones menores. Cabe mencionar que el mejor tratamiento

resultado ser nPQEM al 2% y en o el tratamiento de nPQEM 2.5% mantiene mejor la actividad antifúngica en diluciones menores. En base a estos datos se pretende desarrollar un tratamiento biomédico para el tratamiento de candidiasis o potencializar los medicamentos comerciales que han presentado resistencia.

CONCLUSIÓN

Las nPQEM muestran un efecto inhibitorio importante contra levaduras de importancia en infecciones nosocomiales, con un interesante potencial bioterapéutico.

BIBLIOGRAFÍA

- Arias-Flores, R., Rosado-Quiab, U., Vargas-Valerio, A., & Grajales-Muñiz, C. (2016). Los microorganismos causantes de infecciones nosocomiales en el Instituto Mexicano del Seguro Social. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social.*, 54(1) , 20-24.
- Balouiri, M., Sadiki, M. & Ibsouda, S.K. (2016). Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6 (2), 71-79.
- da Silva Dantas, A., Klee, K., Raziunaite, Schaefer, K., Wagener, J., Yadav, B., & Gow, N. (2016). Cell biology of *Candida albicans*–host interactions. *Current Opinion in Microbiology*, (34)-111-118.
- EUCAST DEFINITIVE DOCUMENT E.Def 3.1 (2000). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution. *Clinical Microbiology and Infection*. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 6 (9), 509-515.
- Leclercq, R., Canto, R., Brown, D.F.J., Giske, C.G., Heisig, P., MacGowan, A.P., Mouton, J.W., Nordmann, P., Rodloff, A.C., Rossolini, G.M., Soussy, C.J., Steinbakk, M., Winstanley, T.J., & Kahlmeter, G. (2011). EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clinical Microbiology and Infection*, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, (19), 141-160.
- López-Mata, A., Ruiz-Cruz, S., & Silva-Beltrán, N., (2015). Physicochemical and Antioxidant Properties of Chitosan Films Incorporated with Cinnamon Oil. *International Journal of Polymer Science*, (2015), 1-8
- Purwantiningsih, S., Dhian, E., Gustini, S., & Rita, M. (2017) Antimalarial Drugs Based on Chitosan Nanoparticles of *Cassia fistula* L. and *Duranta repens* L. Fruits Methanol Extract. *Der Pharma Chemica*, 9 (18), 58-63.
- Wei, Y., Qiu, W., Zhou, X., Zheng, X., Zhang, K-K., Wang, S-D., Li, Y-Q., Cheng, L., Li, J-Y., Xu, X., & Li, M-Y. (2016). Alanine racemase is essential for the growth and interspecies competitiveness of *Streptococcus mutans*. *International Journal of Oral Science*, (8), 231.
- Pfaller, M., Chaturvedi, V., Espinel-Ingroff A., Ghannoum, M., Gosey, L., Odds, F., Rex, J., Rinaldi, M., Shaeahan, D., Walsh, T., & Warnock, D., (2002) Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 22 (15), 8-9