

Efecto antifúngico de la óleo-resina de *Copaifera paupera* comparada con fluconazol sobre *Candida albicans*: un estudio in vitro.

Antifungal effect of Copaifera paupera oil-resin compared to fluconazole on Candida albicans: an in vitro study.

Teófilo Juan Horna-Reátegui¹, María Rocío del Pilar Llaque-Sánchez², Steve Tony Hurtado-Escamilo³

RESUMEN

Objetivo: Evaluar la eficacia antifúngica de la óleo-resina *Copaifera paupera* comparada con fluconazol sobre *Candida albicans*. **Material y Métodos:** Se aplicaron las técnicas de dilución en medio sólido Tween 80 y difusión en pocillo por técnica de Kirby-Bauer en Agar Müeller-Hinton. Se emplearon cepas ATCC 66027 de *Candida albicans* y la óleo-resina de *Copaifera paupera* a concentraciones de 50 %, 25 % y 12,5 %. Se estableció fluconazol (150 ug) como control positivo y Tween 80 como control negativo. La incubación se hizo a $35 \pm 2^\circ$ C y las lecturas hasta las 72 horas. **Resultados:** No hubo formación de halos de inhibición en cepas de *Candida albicans* a diferentes diluciones de *Copaifera paupera*, *Copaifera paupera* + Tween 80 y Tween 80, a diferencia del fluconazol con 150 ug se obtuvo una media de 40 mm, su desviación respecto a la media de 1,56mm y un rango intercuartílico de 2 mm considerando también el valor máximo y mínimo de 43 y 38 mm respectivamente. **Conclusión:** La *Copaifera paupera* no es eficaz como antifúngico frente a *Candida albicans* comparado con fluconazol.

Palabras Clave: *Copaifera paupera*, *Candida albicans*, antifúngico, aceite de Copaiba, fluconazol.

SUMMARY

Objective: To evaluate the antifungal effectiveness of the oil – resin *Copaifera paupera* compared with fluconazol in *Candida albicans*. **Material and Methods:** It applied dilution techniques in solid milieu Tween 80 and diffusion in well by Kirby-Bauer's technique in Agar Müeller-Hinton. It used strains ATCC 66027 of *Candida albicans* and the oil-resin of *Copaifera paupera* in concentration of 50 %, 25 % and 12,5 %. It established fluconazol (150 ug), as positive control and Tween 80 as negative control. The hatching it made in $35 \pm 2^\circ$ C and the readings until 72 hours. **Results:** There weren't halo's formation of inhibition in *Candida albicans* strains in different dilutions of *Copaifera paupera*, *Copaifera paupera* + Tween 80 and Tween 80, in different from fluconazol with 150 ug it obtained one mean of 40 mm, its deviate with the mean of 1,56 mm and a range interquartile of 2 mm considering also the maximum and minimum value of 43 and 38 mm respectively. **Conclusion:** The *Copaifera paupera* is not effective as antifungal in *Candida albicans*, compared with fluconazol.

Keywords: *Copaifera paupera*, *Candida albicans*, antifungal, *Copaiba oil*, fluconazol.

¹ Médico Cirujano. Universidad César Vallejo. Trujillo, Perú.

² Médico Cirujano. Docente de la Escuela de Medicina. Universidad César Vallejo. Trujillo, Perú.

³ Biólogo Microbiólogo. Docente de la Escuela de Medicina. Universidad César Vallejo. Trujillo, Perú.

Correspondencia a: Teófilo Juan Horna-Reátegui (onai81@hotmail.com)

Identificador Abierto de Investigador y Colaborador (ORCID):

Teófilo Juan Horna-Reátegui

 <https://orcid.org/0000-0002-5185-5047>

María Rocío del Pilar Llaque-Sánchez

 <https://orcid.org/0000-0002-6764-4068>

Steve Tony Hurtado-Escamilo

 <https://orcid.org/0000-0001-5608-7262>

Citar como: Horna-Reátegui TJ, Llaque-Sánchez MRP, Hurtado-Escamilo ST. Efecto antifúngico de la óleo-resina de *Copaifera paupera* comparada con fluconazol sobre *Candida albicans*: un estudio in vitro. Rev Med Vallejiana 2020; 9(1): 56 – 60.

Recibido: 29/03/20 – Revisado: 30/03/20 – Aceptado: 31/03/20

Introducción

Candida albicans es una de las más frecuentes especies de hongos oportunistas presente en diferentes patologías clínicas, por lo que adquiere relevancia dentro de las demás formas de su especie. La epidemiología de las infecciones por *C. albicans* ha ido cambiando en el mundo.¹

En la última década se ha observado progresivamente una mayor proporción de candidemias causadas por especies de *Candida*. A pesar de la introducción de nuevas terapias antifúngicas, la mortalidad atribuible a esta patología sigue siendo elevada, estimándose en cifras variables que van desde 29 % a 50 %.¹

Por otro lado, la candidiasis vulvovaginal constituye la segunda causa de vaginitis en mujeres en edad fértil así como en adolescentes.² En un estudio realizado en nuestro país estimaron que la prevalencia de candidiasis vaginal fue 11,25 %.³

La fitoterapia surge debido a la necesidad de identificación y el desarrollo de nuevos agentes que sean seguros y eficaces.⁴ La práctica medicinal con plantas, ha sido utilizada desde tiempos muy antiguos dándoles a ellas una propiedad importante para su uso. Las plantas le han dado un rol fundamental como medio para curar enfermedades en la población tradicional que es aproximadamente el 85%, en la cual está incluida la población andina y amazónica de nuestro país.⁵

Los efectos atribuidos a la *Copaiba* en la medicina popular incluyen anti-inflamatorio, anti-tetánico, anti-micótico, anti-tumoral, anti-blenorragia y actividades antisépticas urinarias. Además, se ha utilizado para tratar la bronquitis, enfermedades de la piel, úlceras, y la sífilis, así como para la curación de heridas. Los estudios farmacológicos han demostrado sus propiedades como un anti-inflamatorio, gastroprotector, analgésico y cicatricial de heridas.⁶

Es necesario que los medicamentos de origen natural se estandaricen químicamente y se presenten las pruebas para su uso con eficacia y seguridad. Por lo tanto, el análisis y la estandarización química de las óleo-resinas de diferentes especies de *Copaifera*, es sin duda esencial, por lo que debemos relacionar la composición química con la actividad biológica, de tal manera que permita la validación tanto de la seguridad como la eficacia fito-medicinal con un adecuado control de calidad.⁷

Material y Métodos

Se llevó a cabo un estudio experimental, aplicado, longitudinal, explicativo. La población estuvo representada por todas las cepas de *Candida albicans* ATCC (American Type Culture Collection) 66027 del laboratorio del Hospital EsSalud II Chocope. La unidad muestral estuvo constituida por cada una de las placas conteniendo el cultivo de *C. albicans* y los tratamientos en pocillos, que cumplen los criterios de inclusión y exclusión. La unidad de análisis estuvo dada por cada placa Petri conteniendo las colonias de *C. albicans*. Se establecieron 15 repeticiones por cada tratamiento incluido el control.

RG1	X1	O1
RG2	X2	O2
RG3	X3	O3
RG4	X4	O4

Donde:

- X1: Dilución al 50 % de óleo-resina de *Copaifera paupera*.
- X2: Dilución al 25 % de óleo-resina *Copaifera paupera*.
- X3: Dilución al 12,5 % de óleo-resina *Copaifera paupera*.
- X4: Control positivo (fluconazol).
- O: Las observaciones del diámetro del halo de inhibición.

Fueron incluidas:

- Placas de cultivo joven de *Candida albicans* ATCC 66027 conteniendo más de 105 unidades formadoras de colonias.
- Placas con Agar Mueller – Hinton y una altura de 4 mm.

Fueron excluidos:

- Cultivos jóvenes de *Candida albicans* ATCC 66027 que hayan detenido su crecimiento.
- Cultivos jóvenes de *Candida albicans* ATCC 66027 contaminados.

La técnica utilizada fue la observación directa de campo experimental. El procedimiento fue el siguiente:

A. Adquisición de la óleo-resina de *Copaifera paupera*:

Se obtuvo del Centro de Rehabilitación de Adicciones y de Investigación de Medicinas Tradicionales “Takiwasi” – Tarapoto, cuyo N° de Lote fue: 110013.

B. Preparación del inóculo fúngico:

En el Laboratorio del Hospital II EsSalud Chocope, la cepa de *Candida albicans* ATCC 66027, fue utilizada para preparar un inóculo estandarizado, para lo cual se suspendió en 3 mL de solución salina fisiológica (SSF) estéril cinco colonias representativas, obtenidas de un cultivo de 18-24 horas crecidas en Agar Sabouraud Dextrosa (ASD) a 35 ± 2° C. El inóculo final para prueba se llevó a una absorbancia equivalente a 0,05 en el turbidímetro de Microscan® y la suspensión fue equivalente a 1,4x10⁵ - 1,5x10⁵ UFC/mL, determinado por diluciones decimales sobre placas de Agar Sabouraud, inoculando alícuotas de 10 uL y extendidas con el asa Digrafski e incubadas en las mismas condiciones antes citadas para observar el crecimiento hasta las 72 horas. Una vez preparados los inóculos se utilizaron dentro de los 15 minutos.

C. Sistemas para determinar el efecto antifúngico de *Copaifera paupera*.

a. Dilución en medio sólido:

Al ASD doblemente concentrado, esterilizado en autoclave, se incorporó la óleo-resina de *Copaifera paupera* y el surfactante hidrofílico polisorbato 80 ó Tween 80 (T-80), a aproximadamente 56° C. La concentración final del Tween-80 en el sistema fue equivalente a 5 ug/ml (0,05 %), para solubilizar la óleo-resina de *Copaifera paupera*, y la óleo-resina se probó a concentraciones de 50 %, 25 % y 12,5 % (N/2, N/4 y N/8, respectivamente). Sobre la superficie de este sistema dispensado en placas de Petri y por triplicado, se sembró 20 uL del inóculo de *Candida albicans*, que luego de ser extendidas con el asa Digrafski se incubaron a 35 ± 2° C para observar el crecimiento hasta las 72 horas.

b. Difusión en pocillo por Técnica de Kirby-Bauer:

Sobre el Agar Müeller Hinton –Tween 80 al 0.05% contenido en placas de Petri, 20 uL del inóculo de *Candida albicans* se extendieron con el asa Digrafski y luego se les practicó 6 pocillos equidistantes. Tras el secado a temperatura ambiente del líquido que acompaña al inóculo, en no más de 30 minutos, en cada uno de dichos pocillos y por separado (15 repeticiones) se inoculó 50 uL de la óleo-resina de *Copaifera paupera* al 100% y 50% (en T-80); Fluconazol (150 ug, como control POSITIVO) y T-80 (control

NEGATIVO). La incubación se hizo a 35 ± 2° C y las lecturas hasta las 72 horas.

Los datos de las observaciones se organizaron inicialmente identificando cada grupo de estudio según diluciones, posteriormente se registraron las mediciones del halo inhibitorio a las 72 horas. Igualmente se anotaron los resultados de los controles tanto positivos y negativos utilizados. Se elaboraron las tablas y gráficos. El registro de datos fue ingresado en una base de datos elaborada en el paquete estadístico SPSS versión 21, versión en español.

Para el análisis de los datos obtenidos se emplearon estadísticos como: promedios para cada dilución, desviación estándar para cada dilución, cuadros y gráficos estadísticos, análisis de varianza ingresando los valores del tamaño por cada dilución; y pruebas de comparación múltiple como: diferencia mínima significativa, Tukey, usando prueba t de student para el análisis de varianza (ANOVA).

Resultados

Tabla 1. Indicadores estadísticos sobre el tamaño del halo de inhibición de *Candida albicans* en distintas diluciones de *Copaifera paupera*, Tween 80 y Fluconazol 150 ug.

Dilución	Mediana	Media	Desviación Típica	Rango Intercuartílico	Mínimo	Máximo
<i>Copaifera paupera</i>	0	0	0	0	0	0
Fluconazol 150 ug	40	40	1,56	2	38	43
<i>C. paupera</i> + Tween 80	0	0	0	0	0	0
Tween 80	0	0	0	0	0	0

Fuente: Cultivos en Laboratorio de Microbiología – Hospital II EsSalud Chocope.

Tabla 2. Efecto de las diluciones de *Copaifera paupera*, Tween 80 y Fluconazol 150 ug sobre *Candida albicans*.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	18000	3	6000	9882,4	,000
Intra-grupos	34	56	,607		
Total	18034	59			

Fuente: Cultivos en Laboratorio de Microbiología – Hospital II EsSalud Chocope.

Tabla 3. Comparación de efecto sobre *Candida albicans* a distintas diluciones.

Dilución 1	Dilución 2	Diferencia de medias	Error típico	Sig.
<i>C. paupera</i>	Fluconazol 150ug	-40.00	.28	.00
	<i>C. paupera</i> + Tween 80	.00	.28	1.00
	Tween 80	.00	.28	1.00
Fluconazol 150 ug	<i>C. paupera</i>	40.00	.28	.00
	<i>C. paupera</i> + Tween 80	40.00	.28	.00
	Tween 80	40.00	.28	.00
<i>C. paupera</i> + Tween 80	<i>C. paupera</i>	.00	.28	1.00
	Fluconazol 150ug	-40.00	.28	.00
	Tween 80	.00	.28	1.00
Tween 80	<i>C. paupera</i>	.00	.28	1.00
	Fluconazol 150ug	-40.00	.28	.00
	<i>C. paupera</i> + Tween 80	.00	.28	1.00

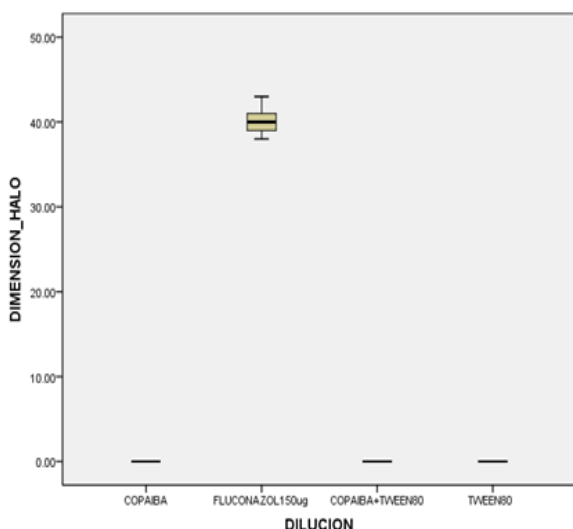
Fuente: Cultivos en Laboratorio de Microbiología – Hospital II EsSalud Chocope.

Tabla 4. Homogeneidad del efecto de *Copaifera paupera*, Tween 80 y Fluconazol 150ug sobre *Candida albicans*.

Dilución	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
<i>Copaifera paupera</i>	15	.00	
<i>Copaifera paupera</i> + Tween 80	15	.00	
Tween 80	15	.00	
Fluconazol 150ug	15		40.00
Sig.		1.00	1.00

Fuente: Cultivos en Laboratorio de Microbiología – Hospital II EsSalud Chocope.

Figura 1. Homogeneidad del efecto de *Copaifera paupera*, Tween 80 y Fluconazol 150ug sobre *Candida albicans*.



Discusión

Las diversas variedades del género *Copaifera* han mostrado actividad antibiótica, antiinflamatoria, cicatrizante, antifúngica, entre otros. La presente investigación tuvo como objetivo mostrar la actividad antifúngica de la óleo-resina de *Copaifera paupera* sobre *Candida albicans* ATCC 66027.

En la Tabla 1 se muestran los resultados del tamaño del halo de inhibición de *Candida albicans*, a diferentes diluciones; encontramos que en las cepas donde se administró *Copaifera paupera*, *Copaifera paupera* + Tween 80 y Tween 80 sus dimensiones fueron nulas (0.0 mm) a diferencia del control, que fue el Fluconazol, con 150 ug se obtuvo una media de 40 mm, su desviación respecto a la media de 1,56 mm y un rango intercuartílico de 2 mm considerando también el valor máximo y mínimo de 43 mm y 38 mm respectivamente.

Estos resultados coinciden con lo descrito por Oliveira et al.⁶ quienes reportaron que, los aceites de *C. lucens* y *C. paupera* mostraron una actividad moderada frente a hongos dermatofitos (*Trichophyton rubrum* y *Microsporum canis*). Sin embargo, estos mismos aceites no mostraron ninguna actividad contra bacterias Gram-negativas y levaduras (*Candida albicans* ATCC 10231, *Candida tropicalis* ATCC 28707 y *Candida parapsilosis* ATCC 22019).

En el análisis de varianza de la Tabla 2 se determina la diferencia significativa con $p < 0,01$ entre todas las diluciones, implicando entonces que algunos de ellos tienen mayor efecto. En la Tabla 3 se comparan el efecto de las diluciones usando la distribución t de student respecto a las dimensiones encontramos que solo el Fluconazol a 150 ug (control) ha tenido diferencia significativa $p < 0,01$ sobre las demás diluciones.

En la Tabla 4, se expresa la agrupación de subconjuntos de diluciones según su homogeneidad del efecto usando la técnica de Tukey con $p < 0.01$ en la que se considera que la *Copaifera paupera*, *Copaifera paupera* + Tween 80 y Tween 80 tienen efecto nulo comparado con el Fluconazol 150 ug (Figura 1). Sin embargo, los resultados de Deus et al.¹², se oponen a lo descrito anteriormente, quienes describieron actividad fungistática in vitro de *Copaifera multijuga* Hayne contra *Candida parapsilosis* IOC-2882, *Aspergillus flavus* IOC-3874 y *A. Tamarii* IOC-187 con halos de inhibición $16,0 \pm 1,4$ mm; $19,5 \pm 2,1$ mm y $12,5 \pm 3,5$ mm, respectivamente.

La falta de efecto antifúngico de *C. paupera* encontrada en la presente investigación, se le puede atribuir a los diferentes subgéneros de *Copaifera* o a la cepa de *Candida* usados en el último antecedente mencionado (Deus et al ¹²). Usando el criterio anterior, se puede considerar que nuestros resultados coincidieron con los de Oliveira et al ⁶, porque ellos usaron la misma especie de *Copaifera* y la misma subespecie de *Candida* tal como en el presente estudio.

Referencias Bibliográficas

1. Ajenjo MC. Perfil epidemiológico de la candidiasis invasora en unidades de pacientes críticos en un hospital universitario. *Rev Chil Infect* 2011; 28 (2): 118 – 22.
2. Pimentel B, Reynolds E. Candidiasis Vaginal. *Rev Paceaña Med Fam* 2007; 4(6): 121 – 7.
3. Hernández-Ríos E. Prevalencia de vaginitis y vaginosis bacteriana en personal policial de la provincia de Ica, Perú. *Rev. méd. panacea* 2011; 1(2).
4. Pontón J, Quindós G. Mecanismos de resistencia a la terapéutica antifúngica. *Med. Cl.* 2006; 126(Supl 1): 56 – 60.
5. García, RL. Efecto antimicrobiano de la Óleo-resina de *Copaifera officinalis* sobre principales cepas bacterianas periodontópatogenas de la cavidad bucal. [Tesis]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú. 2013.
6. Oliveira A, Ueda T, Prado B, Veiga JV, Pinto A, Vataru C. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008; 103(3): 277 – 81.
7. Pacheco T, Barata L, Duarte M. Antimicrobial activity of copaiba (*Copaifera spp*) balsams. *Rev. Bras. Pl. Med.* 2006; 8: 123 – 4.
8. Masson D, Salvador S, Polizello AC, Frade M. Atividade antimicrobiana do óleo-resina de Copaiba (*Copaifera langsdorfii*) em bactérias de significância clínica em úlceras cutâneas. *Rev. Bras. Pl. Med.* 2013; 15(4): 664 – 9.
9. Soares D, Portella N, Freiman M, Siani A, Saraiva E. Trans- β -Caryophyllene: An effective antileishmanial compound found in commercial copaiba oil (*Copaifera spp.*). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013; 2013(761323): 13.
10. Tavares F, Guerino R, Almeida A, Alves V, De Almeida A. *Copaifera multijuga* ethanolic extracts, oilresin, and its derivatives display larvicidal activity against *Anopheles darlingi* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Rev. Bras. Farmacogn. Braz. J. Pharmacogn.* 2013; 23(3): 464 – 70.
11. Mussi M. Análise da atividade antimicrobiana dos óleos de Copaíba (*Copaifera officinalis*) e da melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) sobre *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis*, determinação das concentrações inibitórias e bactericidas mínimas. [Tesis]. Universidades de São Paulo. São Paulo, Brasil. 2011.
12. Deus R, Carvalho A, Banna D, Arruda M, Alves C, Santos A. Efeito fungitóxico in vitro do óleo-resina e do óleo essencial de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne). *Rev. Bras. Pl. Med.* 2009; 11(3): 347 – 53.
13. Francia JJ. Actividad antimicrobiana -in vitro- del aceite de Copaiba frente a bacterias patógenas [Tesis]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú. 2013.
14. Arroyo J, Quino M, Martínez J, Almora Y, Alba A, Condorhuamán M. Efecto cicatrizante del aceite de *Copaifera officinalis* (copaiba), en pacientes con úlcera péptica. *An. Fac. med.* 2011; 72(2): 113 – 7.
15. Barléu G. Historia dos feitos recentemente praticados durante oito anos no Brasil. Belo Horizonte: Ed. Itatiaia; 1974.
16. Veiga V, Pinto A. O Gênero *Copaifera* L. *Revista da Sociedade Brasileira de Química.* *Quim. Nova* 2002; 25(2): 273 – 86.
17. Rengifo E. Las Ramas Floridas del Bosque: Experiencias en el Manejo de Plantas Medicinales Amazónicas. Iquitos: Instituto de investigaciones de la Amazonía Peruana; 2007.
18. Sibille AM. Descripción general y anatómica de 105 maderas del Grupo Andino. Lima: Junta del Acuerdo de Cartagena; 1981.
19. Ramírez ER. Caracterización geográfica, ecológica, socioeconómica y cultural de la cuenca media del río Callería a escala básica. [Tesis]. Universidad Nacional de Ucayali. Pucallpa, Perú. 2006.

Conflicto de Interés

Los autores niegan conflictos de interés.

Autoría

Teófilo Juan Horna-Reátegui, María Rocío del Pilar Llaque-Sánchez y Steve Tony Hurtado-Escamilo realizaron la concepción y diseño del artículo, recolección de resultados, análisis e interpretación de datos, redacción del artículo, revisión crítica del artículo y aprobación de la versión final.