

Actividad antifúngica *in vitro* de extractos de *Hura crepitans* L. (Euphorbiaceae) frente a *Candida albicans*

(*In vitro* antifungal activity of extracts of *Hura crepitans* L. (Euphorbiaceae) against *Candida albicans*)

Mariangel Azuaje¹, Silvana Villarreal¹✉, Luis Rojas-Fermín¹, Clara Díaz², Judith Velasco², Oduar Salazar², María Rodríguez³.

¹Instituto de Investigaciones, Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes. Mérida-Venezuela.

²Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes. Mérida-Venezuela. ³Departamento de Farmacognosia y Medicamentos Orgánicos. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes. Mérida-Venezuela.

Recibido: 15 de Mayo de 2017.

Aceptado: 21 de Noviembre de 2017.

Publicado online: 23 de Enero de 2017.

[ARTÍCULO ORIGINAL]

PII: S2477-9369(16)06026-O

Resumen (español)

En la presente investigación se evaluó la actividad antifúngica *in vitro* de los extractos hexanoico, etanólico y acetónico obtenidos de las hojas de *Hura crepitans* L., por el método de difusión en agar con discos frente a *C. albicans* B-385. Solo el extracto etanólico inhibió el desarrollo de *C. albicans* con una concentración inhibitoria mínima (CIM) de <20 mg/μl. El estudio fitoquímico del extracto etanólico reveló compuestos como saponinas y esteroides, característicos de esta especie. Estos resultados contribuyen al estudio de las actividades biológicas de *H. crepitans* ya que es la primera vez que se reporta la actividad antifúngica del extracto etanólico obtenido de las hojas.

Palabras clave (español)

Actividad antifúngica, metabolitos secundarios, *Hura crepitans*, *Candida albicans*.

Abstract (english)

An evaluation of *in vitro* antifungal activity in hexanoic, ethanolic and acetonc plant extracts from *Hura crepitans* L., leaves was made. The study was developed on agar disc diffusion method against *C. albicans* B-385. Only ethanolic extract was found to inhibit the development of *C. albicans* with minimal inhibitory concentration (MIC) <20 mg/μl. Phytochemical screening on ethanolic extract showed saponin and steroidal compounds, which are commonly present in this species. These results could contribute to further biological research on *H. crepitans*, since a first antifungal activity of ethanoic plant extract has been reported in this study.

Keywords (english)

Antifungal activity, secondary metabolites, Hura crepitans, Candida albicans.

Introducción

Candida albicans es el patógeno oportunista aislado con mayor frecuencia en el sector hospitalario, responsable de un 60% de los cuadros de candidiasis. Se considera un patógeno oportunista ya que forma parte de la flora habitual de los individuos (1). Debido al aumento en la población de riesgo y el uso indiscriminado de antifúngicos, se ha observado un incremento en la resistencia de las especies de *Candida* a la familia de los azoles, compuestos que inhiben la enzima 14 α -lanosterol-desmetilasa, afectando la biosíntesis de ergosterol, un importante componente de la membrana plasmática fúngica (2), ocasionando falla terapéutica. En tal sentido, las plantas medicinales proporcionan estructuras simples o complejas con actividad biológica de gran interés terapéutico, representando una fuente importante de principios activos frente a microorganismos patógenos para el hombre (3).

Estudios etnobotánicos revelan que en la medicina tradicional se hace uso de plantas de la familia Euphorbiaceae con fines terapéuticos (4, 5). Por su parte, la especie *Hura crepitans* L., (Euphorbiaceae) descrita por Carlos Linneo, es conocida como jabillo, un árbol de gran tamaño con tronco espinoso y un látex venenoso, usado como árbol ornamental y de sombra (6); se le han descrito diversas aplicaciones terapéuticas a las hojas, corteza del tallo, las raíces y las semillas, tales como purgante, astringente y emolientes, usos dermatológicos, fungicida, antimicrobiano (7-9), para el tratamiento de la hipertensión (10).

Con el objeto de contribuir con el estudio de la actividad biológica de *H. crepitans*, en la presente investigación se evaluó la actividad antifúngica de los extractos de hojas frente a *Candida albicans* por el método de difusión en agar con discos..

Materiales y métodos

Material Vegetal: La especie *H. crepitans* L. (1 kg de hojas), fue recolectada en el Jardín de Plantas Medicinales de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis

“Dr. Luis Ruiz Terán”, Universidad de Los Andes, Mérida – Venezuela. Fecha de recolección: 27 de Junio 2016. La identificación botánica la realizó la Ing. Forestal María Rodríguez y una ficha de la muestra (código N° 01. M.Azuaje) se depositó en el herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes.

Obtención de los Extractos: Las hojas de *H. crepitans* L. se secaron a temperatura ambiente en la sombra durante una semana. Posteriormente se procedió a triturarlo con un molino eléctrico y se colocó a macerar con solventes de polaridad diferente: hexano, etanol y acetona, en periodos de tiempo distintos, de forma continua para obtener el mayor número de metabolitos secundarios de acuerdo con la solubilidad en los solventes empleados. Los extractos se colocaron en frascos estériles y se llevaron a la estufa hasta su completa secado. Obteniéndose 3 muestras: E₁: Hexano, E₂: Etanol y E₃: Acetona.

Evaluación de la Actividad Antifúngica: La actividad antifúngica se determinó por el método de difusión en agar con discos descrita por Contreras-Moreno y col., 2016 (11) con las siguientes modificaciones: la cepa *C. albicans* B-385 se cultivó en agar Sabouraud dextrosa con cloranfenicol a 37°C durante 18 horas previo al ensayo. El inóculo fúngico se ajustó con solución salina fisiológica (0.85%) al patrón de turbidez de McFarland N° 1 (3x10⁸ UFC/mL), 1 mL de esta suspensión se incorporó a 20 mL de agar Müller-Hinton (MH), suplementado con glucosa (2%p/v) y azul de metileno (0,5 μ g/mL). Una vez solidificado el medio MH, se colocó sobre la superficie un disco de papel de filtro (6 mm diámetro y 2 mm de espesor) previamente impregnado con 20 μ l del extracto y esterilizado con luz ultravioleta durante la noche, además un disco como control negativo con el solvente utilizado en cada caso (hexano, etanol y acetona) y un disco de Fluconazol® (control positivo). El medio de cultivo inoculado se preincubó durante 18 horas a 4°C y luego se incubó a 37°C (12). La lectura de los halos de inhibición se realizó a las 24 y 48 horas y la zona de inhibición alrededor del disco se expresó en mm (Tabla 1).

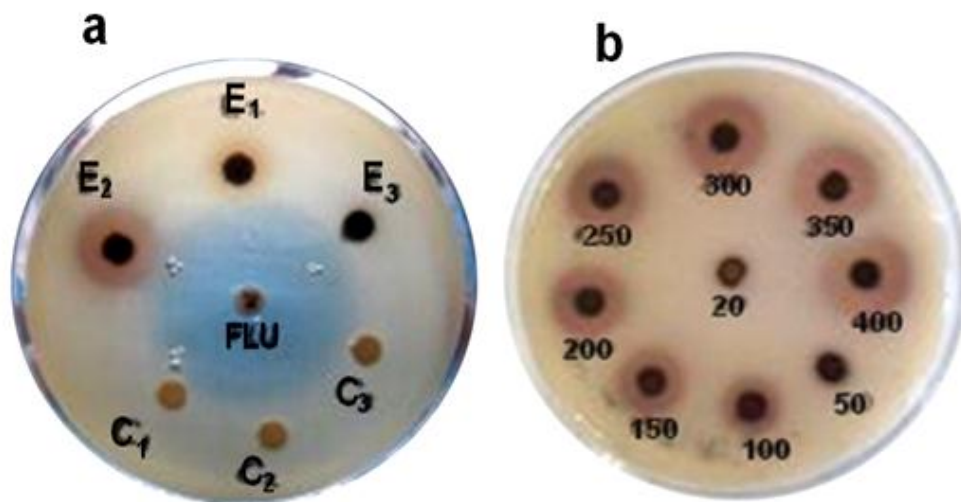


Figura 1. Actividad antifúngica de los extractos obtenidos de las hojas de *Hura crepitans* L. frente a *C. albicans* B-385. 1a. Extractos ensayados: E₁: Extracto Hexanoico, E₂: Extracto Etanólico, E₃: Extracto Acetónico. FLU: Fluconazol®. C₁: Hexano, C₂: Etanol, C₃: Acetona. 1b. Concentración inhibitoria mínima (CIM) del extracto etanólico obtenido de las hojas de *Hura crepitans* L., frente a *Candida albicans* B-385. Rango de concentración 20-400 mg/μl.

La concentración inhibitoria mínima (CIM) se determinó con el extracto que inhibió el desarrollo de la levadura, se realizaron diluciones con un rango de concentración 20-400 mg/mL en el solvente utilizado en el proceso de preparación del extracto; se impregnaron discos con 20 μl de cada dilución y se realizó el procedimiento anteriormente descrito. La CIM se define como la concentración más baja capaz de inhibir el desarrollo de la levadura (13). Los experimentos se realizaron por duplicado.

Estudio Fitoquímico del Extracto con Actividad Antifúngica: La caracterización fitoquímica del extracto que mostró actividad antifúngica se realizó mediante las técnicas descritas por Hinojosa y col., (14). Entre los metabolitos secundarios buscados se tienen: Alcaloides, triterpenos, esteroides, flavonoides y saponinas. Para la identificación cualitativa se realizó una cromatografía de capa fina, para la fase móvil: se agregó a la cámara hexano: Acetato de etilo (7:3), se tapó la cámara para evitar la evaporación, posteriormente, se sembró de 5 a 10 veces el extracto secándose a la vez. Al secarse se agregó la vainilla revelador universal mostrando múltiples manchas.

Se procedió a realizar la siguiente extracción: Se pesaron 10 g de hojas pulverizada y se agregaron 20 mL de la mezcla agua-etanol (1:10) y 20 mL de éter de petróleo en un matraz tapado y aislado de la luz. Luego, fue colocado en un agitador a 150 rpm durante 1 h. Transcurrido ese tiempo, el sobrenadante se colocó en un embudo de separación para obtener dos fases: etanol-agua y oleosa (etérea), para la

identificación de: a) Flavonoides (prueba Shinoda y por cromatografía de capa fina, se procedió a identificar la presencia de los flavonoides quercetina y rutina usando como patrones: Quercetina 2mg/mL MeOH y Rutina 2mg/mL MeOH, mediante el revelador NEU (2-aminoetil-difenilborato) (15). b) Saponinas (se utilizó el ensayo de espuma). c) Alcaloides (pruebas de Dragendorff, Wagner y Mayer). d) Triterpenos y esteroides (se utilizó la prueba de Lieberman-Buchard).

Resultados

En la figura 1 y tabla 1 se describen los resultados obtenidos de la evaluación antifúngica de los extractos de *H. crepitans* L. frente a *C. albicans* B-385. Sólo el extracto etanólico inhibió el desarrollo de la levadura a una concentración de 529 mg/μl y un halo de inhibición de 14 mm de diámetro, con una CIM de <20 mg/μl. Los ensayos de caracterización cualitativa realizados al extracto etanólico de las hojas de *H. crepitans* L., indican la presencia de saponinas y esteroides (Tabla 2).

Discusión

Los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad antifúngica de los extractos obtenidos de las hojas de *H. crepitans* L., se correlacionan con el estudio realizado por Oloyede y Olatinwo 2014 (16) en Nigeria, quienes evaluaron la actividad antimicrobiana

Tabla 1. Actividad antifúngica de los extractos de *Hura crepitans* L. frente a *C. albicans* B-385.

Extracto	Zona de Inhibición (mm)*	CIM mg/μl
E1	NA	NP
E2	14*	<20
E3	NA	NP
FLU	38*	NP

E₁: Extracto Hexanólico (527 mg/mL), E₂: Extracto Etanólico (529 mg/mL), E₃: Extracto Acetónico (526 mg/mL). FLU: Fluconazol® (25 mg), control positivo. NA: No activo. NP: No probado. *Zona de inhibición en mm, diámetro del disco 6 mm, media tomada de dos ensayos consecutivos. CIM: Concentración Inhibitoria Mínima, rango de concentración 20-400 mg/μl.

de extractos de hexano, butanol y acetato de etilo de la corteza del tallo de dicha especie, con inhibición del desarrollo de *C. albicans* a concentraciones de 6,25 a 200 mg/mL, siendo la fracción de acetato de etilo la más activa.

Solo el extracto etanólico mostró actividad antifúngica, al respecto, Rojas y col., (17) señalan que los solventes juegan un papel significativo en la efectividad de los extractos de las plantas como agentes antimicrobianos. Es importante destacar que este es el primer estudio *in vitro* de la actividad antifúngica del extracto etanólico de las hojas de *Hura crepitans* L.

Por otra parte, especies pertenecientes a la familia botánica Euphorbiaceae han presentado la inhibición de cepas de *C. albicans* y *Cryptococcus neoformans*, como es el caso del extracto etanólico de *Euphorbia lancifolia* (18). La especie *Cnidioscolus aconitifolius* ha mostrado la presencia de taninos, saponinas, alcaloides y flavonoides, metabolitos relacionados con actividad antimicrobiana (19).

Dentro de los hongos, *Candida* es uno de los patógenos oportunistas más comunes y en especial por la presentación de cuadros invasivos en pacientes inmunocomprometidos. Al respecto, *Candida albicans* es la especie más patógena y su virulencia se debe a un conjunto de atributos relacionados con su habilidad para evadir a los mecanismos de defensa del hospedador, de resistir al tratamiento antifúngico, o de lesionar las células y tejidos que invade (20). Como resultado, la terapia antifúngica está jugando un papel muy importante en el cuidado de la salud, y el tamizaje de plantas tradicionales en busca de nuevos antifúngicos es ahora más frecuente (21).

Tabla 2. Tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de las hojas de *Hura crepitans* L.

Fitocompuesto	Ensayo	Extracto Etanólico
	Dragendorff	(-)
Alcaloides	Wagner	(-)
	Mayer	(-)
Saponinas	Ensayo de Espuma	(+)
Flavonoides	Shinoda	(-)
Triterpenos	Lieberman-Buchard	(-)
Esteroides	Lieberman-Buchard	(+)

(-): Ausente, (+): presente.

Respecto al estudio fitoquímico de la especie en estudio, se ha reportado entre los metabolitos secundarios presentes en extractos metanólicos de las hojas y corteza del tallo de *H. crepitans*, se encuentran: alcaloides, esteroides y compuestos fenólicos. Los flavonoides, glucósidos cardíacos y taninos aunque presentes en la corteza eran sin embargo ausente en las hojas, pero saponinas y carbohidratos si fueron detectados (16).

La distribución de los compuestos antifúngicos puede ser definida ya sea en base a su distribución taxonómica o su clase química. Los antifúngicos naturales pertenecen a todas las clases mayores de metabolitos secundarios como compuestos fenólicos, alcaloides, terpenoides, saponinas, flavonoides, proteínas, y péptidos, entre otros (22).

Finalmente, se ha reportado otros usos a la especie *Hura crepitans* L., como insecticida natural en áreas tropicales. Los insecticidas vegetales han vuelto a ser considerados como una opción válida para la eliminación de insectos por ser muchas las ventajas que ofrecen, especialmente desde el punto de vista ecológico (23). Asimismo, el extracto hexanoico posee actividad antiviral contra BHV-1 (24) y actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* (21).

La actividad antifúngica exhibida por el extracto etanólico de las hojas contra *C. albicans*, apoyará futuras investigaciones orientadas a aislar y caracterizar el o los componentes responsable(s) de dicha actividad.

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener ningún conflicto.

Referencias

- Net A, Quintana E. Infecciones en el paciente crítico. 1ra ed. Barcelona: Springer-Verlag Ibérica; 1997.
- Fuentes M, Hermosilla G, Alburquenque C, Falconer M, Amaro J, Tapia C. Caracterización de los mecanismos de resistencia a azoles en aislados clínicos chilenos de *Candida albicans*. Rev. Chilena Infectol. 2014; 31: 511-517. [\[PubMed\]](#) [\[GoogleScholar\]](#)
- Fachín-Espinar M, López-Del Águila P, Arzubialdes K, Gutiérrez W, Alva A. Actividad antifúngica del extracto de *Brosimum rubescens* (Palisangre). Ciencia Amazónica. 2012; 2: 100-107. [\[GoogleScholar\]](#)
- Mwine J, Van Damme P. Why do Euphorbiaceae tick as medicinal plants? A review of Euphorbiaceae family and its medicinal features. J. Med Plants Res. 2011; 5: 652-662. [\[GoogleScholar\]](#)
- Oryema C, Bukunya-Ziraba R, Omagor N, Opio A. Medicinal plants of Erute country, Lira district, Uganda with particular reference to their conservation. Afr J Ecol. 2010; 48: 285-298. [\[GoogleScholar\]](#)
- Hoyos J. Los Arboles de Caracas. Caracas: Sociedad de Ciencias Naturales La Salle; 1979.
- Poswal MA, Akpan TA. Current trends in the use of traditional and organic methods for the control of crop pests and diseases in Nigeria. Trop. Pest Managem. 1991; 37: 329-333. [\[GoogleScholar\]](#)
- David OM, Ojo OO, Olumekun VO, Famurewa O. Antimicrobial activities of essential oils from *Hura crepitans* (L.), *Monodora myristica* (Gaertn Dunal) and *Xylopiya aethiopica* (Dunal A. Rich) seeds. Br J Appl Sci Technol. 2014; 4: 3332-3341. [\[GoogleScholar\]](#)
- Adedire CO, Ajayi OE. Potential of sandhox, *Hura crepitans* seed oil for protection of cowpea seeds from *Callosobruchus Maculatus* Fabricius (Coleoptera: Bruchidae) Infestation. J Plant Dis Protect. 2003; 110: 602-610. [\[GoogleScholar\]](#)
- Adindu EA, Elekwa I, Okereke S, Ogwo J. Comparative antihypertensive properties of aqueous extracts of leaves, stem bark and roots of *Hura crepitans* (L) in adrenaline induced hypertensive albino rats. Inter J Tech Res App. 2016; 4: 185-193. [\[GoogleScholar\]](#)
- Contreras-Moreno B, Velasco J, Rojas J, Méndez L, Celis M. Antimicrobial activity of essential oil of *Pimenta racemosa* var. *racemosa* (Myrtaceae) leaves. J Pharm Pharmacog Res. 2016; 4: 224-230. [\[GoogleScholar\]](#)
- Velasco J, Contreras E, Buitrago D, Velasco E. Efecto antibacteriano de *Virolo sebifera* sobre *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. Ciencia. 2005; 13: 411-415. [\[GoogleScholar\]](#)
- Patel JB. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014. [\[GoogleScholar\]](#)
- Hinojosa DJ, Gutiérrez LM, Siller LF, Rodríguez SA, Morales J, Guerrero MP, Del Toro SC. Screening fitoquímico y capacidad antiinflamatoria de hojas de *Tithonia tubaeformis*. Biotecnia. 2013; XV: 53-60. [\[GoogleScholar\]](#)
- Wollenweber E, Valant-Vetschera KM, Ivancheva S, Kuzmanov B. Flavonoid aglycones from the leaf surfaces of some *Achillea* species. Phytochemistry. 1987; 26: 181-182. [\[GoogleScholar\]](#)
- Oloyede GK, Olatinwo MB. Phytochemical investigation, toxicity and antimicrobial screening of essential oil and extracts from leaves and stem bark of *Hura crepitans* (Euphorbiaceae). Academia Arena. 2014; 6: 7-15. [\[GoogleScholar\]](#)
- Rojas R, Bustamante B, Bauer J, Fernández I, Alban J, Lock O. Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. J Ethnopharm. 2003; 88: 199-204. [\[PubMed\]](#) [\[GoogleScholar\]](#)
- Gupta M. 270 Plantas Medicinales Ibero americanas. 1ra ed. Santafé de Bogotá: Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo; 1995. [\[GoogleScholar\]](#)
- Oyagbemi A, Odetola A, Azeez O. Phytochemical investigation and proximate analysis on the leaves of *Cnidioscolus aconitifolius*. J Medicinal Food. 2011; 14: 322-324. [\[PubMed\]](#) [\[GoogleScholar\]](#)
- Zuluaga A, De Bedout C, Agudelo C, Hurtado H, Arango M, Restrepo A, González A. Sensibilidad a fluconazol y voriconazol de especies de *Candida* aisladas de pacientes provenientes de unidades de cuidados intensivos en Medellín, Colombia (2001–2007). Rev Iberoam Micología. 2010; 27: 125–129. [\[PubMed\]](#) [\[GoogleScholar\]](#)
- Yoc CA, Soto LE, Gutiérrez MJ, Arriola NM. Estudios de actividad biocida, citotóxica y genotóxica de tres plantas medicinales de la familia Euphorbiaceae: *Euphorbia lancifolia*, *Cnidioscolus aconitifolius* var. *mansa* y *Cnidioscolus aconitifolius* var. *Estrella* [Tesis de Licenciatura]. Guatemala: Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia Universidad de San Carlos de Guatemala; 2012. [\[GoogleScholar\]](#)
- Ruiz J. Actividad antifúngica *in vitro* y concentración mínima inhibitoria mediante microdilución de ocho plantas medicinales [Tesis de Maestría]. Lima: Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2013 [\[GoogleScholar\]](#)
- Cázares HJ. Actividad en *Drosophila melanogaster* y *Sitophilus zeamais* de aceites esenciales de plantas usadas para combatir insectos en Hidalgo [Tesis de Licenciatura]. Pachuca: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; 2006. [\[GoogleScholar\]](#)
- Taborda N, Acevedo L, Patiño C, Forero J, López A. Actividad antiviral *in vitro* de extractos de *Hura crepitans* y *Codiaeum variegatum* en la replicación de herpes virus bovino tipo-1 y virus de estomatitis vesicular. Rev Colombiana Ciencias Pecuarias. 2007; 20: 241-49. [\[GoogleScholar\]](#)

Como citar este artículo: Azuaje M, Villarreal S, Rojas-Fermín L, Díaz C, Velasco J, Salazar O, Rodríguez M. Actividad antifúngica *in vitro* de extractos de *Hura crepitans* L. (Euphorbiaceae) frente a *Candida albicans*. *Avan Biomed* 2017; 6: 197-202.



Avances en Biomedicina se distribuye bajo la Licencia Creative Commons Atribución -No Comercial -Compartir Igual 3.0 Venezuela, por lo que el envío y la publicación de artículos a la revista son completamente gratuitos.