



ACTIVIDAD BIOLÓGICA *in vitro* DEL GEL DE QUITOSANO SOBRE *Candida albicans*

**Ana Gil¹, Anabella Núñez¹, Gladys Velazco¹, Clara Díaz², Judith Velasco²,
Anajulia González¹.**

**1. Centro de Investigaciones Odontológicas. Facultad de Odontología
Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.**

**2. Laboratorio de Micología. Facultad de Bioanálisis. Universidad de Los Andes
.Mérida Venezuela**

Correspondencia: Dra. Gladys Velazco, Centro de Investigaciones Odontológicas, Facultad de Odontología, Universidad de Los Andes, Edificio del Rectorado. Calle 24, entre Avenidas 2 y 3, Mérida (5101), Venezuela. Tel/Fax. 00(58) 274-2402486.

E-mail: gvelazco@ula.ve

RESUMEN

Recibido: 10-03-2013

Aprobado: 5-05-2013



El aumento de infecciones causadas por *Candida*, limitaciones en los tratamientos, además de resistencia a los fármacos, ha incentivado la búsqueda de nuevas propuestas terapéuticas naturales, como el Quitosano; un biopolímero derivado de la quitina, que ha demostrado propiedades antibacterianas, antiinflamatorias y antifúngicas. Dado que la candidiasis es una de las enfermedades bucales más comunes de la cavidad bucal, el objetivo de esta investigación es evaluar la actividad biológica *in vitro* del gel de quitosano sobre *Candida albicans*, determinando la concentración inhibitoria mínima (CIM) del gel y estableciendo el cambio de la morfología microscópica de *Candida albicans*. Para este estudio de tipo descriptivo y diseño experimental, se utilizó una cepa de referencia *Candida albicans* CDC-B385, la cual fue cultivada por 24-48 horas en caldo extracto malta al 2% y quitosano en diferentes concentraciones (0,25; 0,50; 0,75; 1; 1,25; 1,50 mg/ml) Además, se estableció un control de crecimiento, control positivo y control negativo. Posteriormente se cultivó 100ul de cada tubo en placas de Petri y se incubó a 37°C por 24 horas más, para realizar el recuento de unidades formadoras de colonias. Luego se tomaron tubos con y sin adición de quitosano, los cuales fueron centrifugados y observados en el microscopio óptico. Como resultado se obtuvo que el quitosano inhibió el crecimiento fúngico a una CIM de 1mg/ml,

Recibido: 10-03-2013

Aprobado: 5-05-2013



observándose deformación de la célula fúngica y ausencia de pseudohifas, comprobando que este biomaterial es altamente efectivo contra *Candida albicans*.

PALABRAS CLAVE: Quitosano, estomatitis, biomaterial, *Candida albicans*,

BIOLOGICAL ACTIVITY OF GEL *in vitro* CHITOSAN ON *Candida albicans*

The increase in infections caused by *Candida*, limitations in treatments, in addition to drug resistance, has prompted the search for new natural therapeutic approaches, such as chitosan, a biopolymer derived from chitin, which has proven antibacterial, antifungal and anti-inflammatory. Since yeast is one of the most common oral diseases of the oral cavity, the objective of this study is to evaluate the *in vitro* biological activity of chitosan gel on *Candida albicans*, determining the minimum inhibitory concentration (MIC) of the gel and setting the change of microscopic morphology of *Candida albicans*. For this study, descriptive and experimental design, we used a reference strain CDC-B385 *Candida albicans*, which was cultured for 24-48 hours malt extract broth and 2% chitosan at different concentrations (0.25, 0, 50, 0.75, 1, 1.25, 1.50 mg / ml) also established a growth control, positive control and negative control. Subsequently 100ul of each tube cultured in

Recibido: 10-03-2013

Aprobado: 5-05-2013



Petri dishes and incubated at 37 ° C for 24 hours, to count the colony forming units. Tubes were then taken with and without addition of chitosan, which were centrifuged and observed under the light microscope. It was observed that chitosan inhibited the fungal growth to an MIC of 1mg/ml, showing deformation of the fungal cell and absence of pseudohyphae, proving that this biomaterial is highly effective against *Candida albicans*.

KEY WORDS: Chitosan, stomatitis, biomaterial, *Candida albicans*.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, las enfermedades producidas por hongos han ido en aumento; debido en parte al uso de potentes inmunosupresores, esteroides y antibióticos. El aumento de estas infecciones ha sido más notable en las causadas por especies del género *Candida*. La mayoría de las micosis en la cavidad bucal son producidas por estas

levaduras considerándose según la Organización Mundial de la Salud que cuatro de cada mil pacientes que acuden a una consulta odontológica general presentan síntomas de infección candidiásica (1). La cavidad bucal alberga gran cantidad de especies bacterianas y otros organismos en vida saprofita, sin desarrollar alteración patológica constituyendo de esta manera

Recibido: 10-03-2013

Aprobado: 5-05-2013

su flora habitual. La relación entre hospedero sano y su microflora bucal representa un sistema biológico equilibrado, el cual permite la supervivencia de ambos (1,2); de manera que deben incidir elementos anormales para romper este estado de acciones y reacciones y se motive la proliferación micótica patógena, como es el caso de *Candida albicans* (3). La candidiasis, también conocida como moniliasis, algodoncillo o muguet, es una enfermedad infecciosa de origen fúngico, ocasionada por especies del género *Candida*, frecuentes en la mucosa bucal. La magnitud de la infección micótica va a depender de las condiciones del

hospedero, modificaciones de la barrera mucosa y saliva, alteraciones hormonales, nutricionales e inmunológicas (4).

Existen más de 150 especies conocidas de *Candida*, siendo *Candida albicans* el patógeno que se identifica más frecuentemente en el hombre; sin embargo, otras especies clínicamente importantes incluyen: *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida pseudotropicalis* y *Candida guilliermondi* (5). El quitosano; es un biopolímero natural que se obtiene de elementos orgánicos producidos por invertebrados y crustáceos (6). Posee excelentes propiedades como: antifúngico, antiviral, antimicrobiano,

Recibido: 10-03-2013

Aprobado: 5-05-2013



emulsionante, absorbente de grasas, absorbente de metales contaminantes, filmogénico, además de ser biocompatible y biodegradable, por lo que es considerado de gran aplicación en distintos campos, entre estos Medicina y Odontología demostrando que tiene excelentes propiedades biomédicas siendo altamente útil para tratar lesiones inflamatorias o ulcerosas de la cavidad bucal (7). Han reportado estudios donde se propone el uso de quitosano como antifúngico en odontología (7, 8, 9, 10) debido a que se ha demostrado la presencia de *Candida albicans* en bases protésicas como la causante clínica de estomatitis subprotésica (ESP) (7, 9, 10).

Recibido: 10-03-2013

Aprobado: 5-05-2013

METODOLOGIA

El enfoque de esta investigación es cuantitativo, es de tipo descriptiva para determinar la efectividad biológica del gel de quitosano sobre *Candida albicans* determinando la concentración inhibitoria mínima (CIM).

Materiales: Ácido acético al 5%, Quitosano de la casa Guinama con 98% de desacetilación, Caldo extracto Malta al 2%, Agar extracto Malta al 2%, Solución salina fisiológica estéril, Fluconazol 64 ug/ml, Placas de Petri, Pipetas serológicas y automáticas, Pipetas Pasteur, Puntas para pipeta automática, Propipetas, Tubos de ensayo con tapas de algodón, Mechero, Gradilla, Varillas acodadas,



Asa en aro, Microscopio óptico, Incubadora, Autoclave eléctrico tipo olla, Balanza electrónica digital, Balanza mecánica, Estufa eléctrica, Vortex mixer, Refrigerador, Centrífuga. Se utilizó una cepa de referencia de *Candida albicans* CDC B-385. La cepa de referencia de *Candida albicans* CDC (B-385), cultivada en Agar Sabouraud dextrosa e incubado a 37°C durante 24-48 horas. A partir del cultivo fresco de 24 horas de la cepa *C.albicans*, se preparó un inóculo con solución salina fisiológica (S.S.F) y 1 asada de la cepa que se ajustó al patrón de turbidez N° 0,5 de MacFarland.

El quitosano utilizado se preparó a una concentración de 20 mg/ml diluido en

Recibido: 10-03-2013

Aprobado: 5-05-2013

0,8% de ácido acético, facilitado por el Centro de Investigaciones Odontológicas de la Facultad de Odontología de la Universidad de los Andes; del cual se realizó una dilución para obtener una concentración menor de ácido acético al 0,1%, a partir de ésta se prepararon diferentes concentraciones de quitosano. Todo el estudio se realizó por duplicado. A partir del inóculo preparado, se sembró 1 ml en tubos con caldo extracto malta al 2%, adicionando el quitosano a las diferentes concentraciones utilizadas: 0,25 mg/ml, 0,50 mg/ml, 0,75 mg/ml, 1 mg/ml, 1,25 mg/ml y 1,50 mg/ml. Como controles se utilizaron tubos con caldo extracto malta al 2%, más 1 ml del



inóculo: Control de crecimiento: a los cuales no se les agregó ningún medicamento, control positivo: fluconazol a una concentración de 64 ug/ml, control negativo: ácido acético al 0,1% y ácido acético al 0,8%, todos se incubaron a 37°C por 24 horas. Posterior al periodo de incubación se tomaron 100 ul de cada tubo y se cultivaron en placas de Petri que contenían 25 ml de agar extracto malta 2%, utilizando la técnica de rastrillo, las cuales se incubaron a 37°C por 24 horas más. Trascorrido este tiempo, se procedió a observar si hubo o no crecimiento en las diferentes placas de Petri, y se realizó el contaje de colonias expresadas en UFC/ml a las 24, 48 y 72

horas de incubación, con la finalidad de verificar si ocurría reacción en el número de colonias, obteniendo el tiempo de inhibición del quitosano sobre *C. albicans*, determinando la concentración en que se produjo la inhibición total de la cepa. Se utilizaron tubos que contenían Caldo extracto malta 2%, con y sin adición de quitosano a las concentraciones previas a la inhibición total de la levadura, como fueron: 0,25 mg/ml, 0,50 mg/ml y 0,75 mg/ml, a los cuales se adicionó 1ml de inóculo ajustado al patrón 0,5 de Mcfarland y se incubaron a 37°C por 24 horas. Posteriormente fueron centrifugados por 5 minutos; se descartó el sobrenadante de

Recibido: 10-03-2013

Aprobado: 5-05-2013

cada tubo y con una pipeta Pasteur estéril, colocando 1-2 gotas del sedimento entre lámina y laminilla; finalmente fueron observados en el microscopio óptico con objetivos de 10x y 40x.

RESULTADOS Y DISCUSION

Al evaluar la actividad del quitosano sobre la cepa de *Candida albicans* CDC (B-385) utilizando la técnica de macrodilución, se determinó una concentración inhibitoria mínima (CIM) de 1 mg/ml, en la que hubo inhibición total de la cepa (Gráfico 1) comprobando que el quitosano posee efectividad antifúngica sobre *Candida albicans*. A las 24 horas de exposición se observó crecimiento fúngico a las concentraciones

Recibido: 10-03-2013

Aprobado: 5-05-2013

de quitosano: 0,25 mg/ml, 0,50 mg/ml y 0,75 mg/ml, contabilizando de 3,1 y 1 UFC/ml respectivamente; sin embargo, a las 48 horas y a las concentraciones 0,25 mg/ml y 0,50 mg/ml, el número de colonias fue mayor, con un total de 11 y 3 UFC/ml respectivamente. En vista de lo presentado, se extendió el tiempo de incubación hasta las 72 horas, donde se observó que el número de colonias se mantuvo, es decir, no hubo más desarrollo levaduriforme (Gráfico 1).

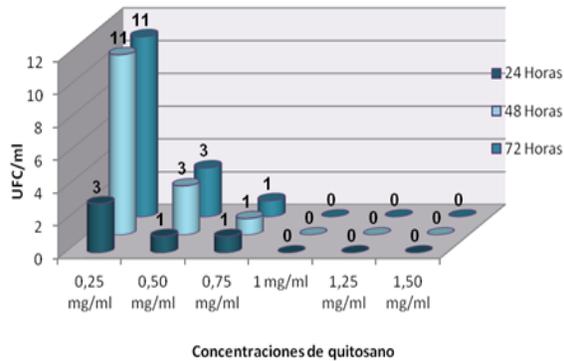


Gráfico 1. Unidades formadoras de colonias desarrolladas

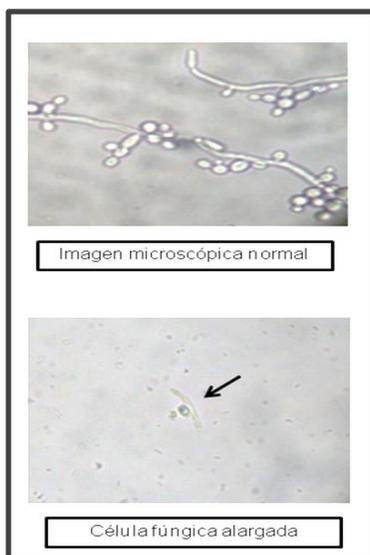
Por otra parte en los controles se pudo observar: Control crecimiento: hubo crecimiento fúngico mayor a 100.000 UFC/ml, en el cual la célula fúngica se desarrolló normalmente. Control positivo: No hubo desarrollo levaduriforme, comprobando que la cepa es sensible al fluconazol a una concentración de 64 ug/ml. Control negativo: Con ácido

Recibido: 10-03-2013

Aprobado: 5-05-2013

acético al 0,1% hubo crecimiento fúngico mayor a 100.000 UFC/ml y con ácido acético al 0,8% no hubo crecimiento, evidenciando que a 0.1% no inhibe el crecimiento fúngico, pero a una concentración de 0.8%, el ácido acético interviene en el desarrollo del hongo. En cuanto a los cambios morfológicos de *Candida albicans* a través de microscopía óptica, se pudo demostrar el efecto del quitosano sobre la célula levaduriforme a las concentraciones estudiadas, al compararlas con el crecimiento que no contenía el gel, observando: Crecimiento normal: abundantes blastoconidias, pseudohifas e hifas. Contaje mayor a 100 blastoporas por campo de 40x. A 0,25

mg/ml: Cambio de la morfología original de la célula fúngica, de células ovaladas se modificaron a células alargadas o arriñonadas. No se observaron hifas; sin embargo, hubo presencia de pseudohifas cortas, al compararlo con el control de crecimiento. Contaje menor de blastoporas, aproximadamente de 10-12xc por campo de 40x (Figura 1)



Recibido: 10-03-2013

Aprobado: 5-05-2013

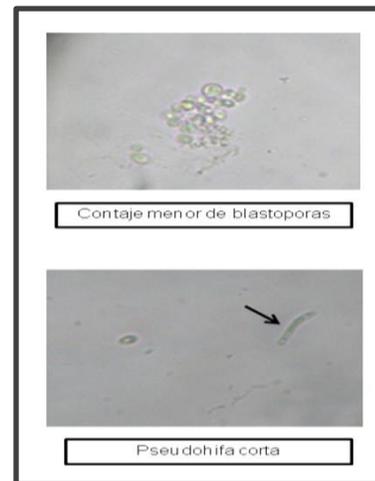


Figura 1. Cambios morfológicos a 0,25 mg/ml de quitosano

0,50 mg/ml y 0,75 mg/ml: cambio de la morfología celular en forma moderada, se observan células alargadas o arriñonadas y no se observaron hifas ni pseudohifas. Contaje menor de blastoporas, de 4-6xc y 0-2xc respectivamente (Figura 2).

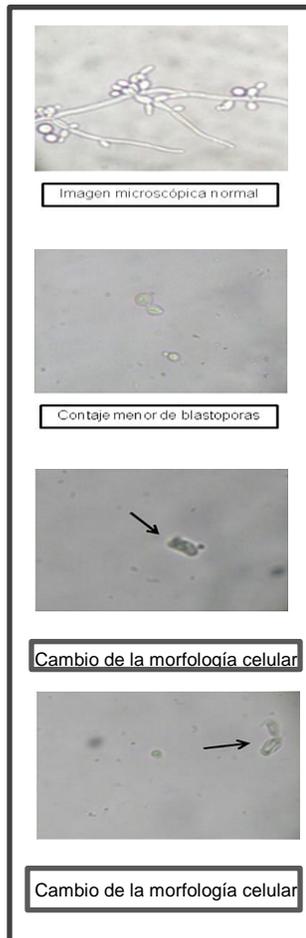


Figura 2. Cambios morfológicos a 0,50 y 0,75 mg/ml de quitosano.

Los resultados obtenidos demuestran que el quitosano logró inhibir el crecimiento

Recibido: 10-03-2013

Aprobado: 5-05-2013

fúngico a una CIM de 1 mg/ml, luego de una exposición de 24 y 48 horas, determinando la efectividad antifúngica del gel de quitosano sobre *Candida albicans*, existen estudios que demuestran una CIM de 0,89 mg/ml en cepas clínicas de *C. albicans*; sin embargo, algunas no son sensibles al quitosano, lo cual puede deberse a resistencia generada por tratamientos prolongados con antimicrobianos (12). Por otro lado se ha estudiado el efecto del quitosano de alto peso molecular sobre diferentes cepas de *Candida* sp, obteniendo una CIM de 1,25 mg/ml. No obstante la CIM de quitosano obtenida en estas experiencias fue intermedia (13).



Otros estudios revelan una significativa actividad antifúngica del quitosano sobre cepas clínicas de *Candida*, obteniendo una concentración inhibitoria mínima de 4,8 mg/ml, 2,5 mg/ml y en otras cepas como *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, *Candida parapsilosis*, y *Candida glabrata* (11, 14, 15,16). En cuanto a los cambios morfológicos pudo observarse deformación de la célula fúngica y las pseudohifas cortas a una concentración de 0,25 mg/ml; ausencia de hifas y pseudohifas en concentraciones de 0,50 mg/ml y 0,75 mg/ml; además de una notable disminución del número de blastoporas, otras experiencias

demuestran alteración de la superficie celular de *Candida albicans* al utilizar quitosano de bajo peso molecular (17, 18). A través de microscopia electrónica, se demostró que el quitosano deforma la célula fúngica e inhibiendo la producción de filamentos (19). Otros estudios demuestran la disminución de blastoporas y ausencia tanto del tubo germinativo (14) comprobando que el quitosano interfiere en el desarrollo del tubo germinativo, lo que reafirma que el quitosano interfiere en el proceso de gemación de la célula, así como en la producción de micelios.

Recibido: 10-03-2013

Aprobado: 5-05-2013



CONCLUSION

En la determinación de la actividad antifúngica del gel de quitosano sobre una cepa de referencia de *Candida albicans* CDC(B-385) mediante la técnica de macrodilución en caldo demostro la inhibición del crecimiento fúngico, demostrando que el quitosano podría ser una alternativa viable para el tratamiento de la Candidiasis producida por esta especie. La CIM donde se sensibilizo el hongo fue de 1 mg/ml. Las células de *Candida albicans* tratadas con quitosano presentaron cambio de la morfología original, a una concentración de 0,25 mg/ml; además de una considerable disminución del número de levaduras. El

Recibido: 10-03-2013

Aprobado: 5-05-2013

gel de quitosano resultaría útil para el tratamiento de la Estomatitis subprotésica, por sus excelentes propiedades antiinflamatorias y antifúngicas, factores a considerar para incentivar la producción natural del producto en nuestro país. Finalmente, con base en los resultados obtenidos y tomando en cuenta la literatura consultada, este trabajo constituye un aporte científico para continuar la búsqueda de nuevas terapéuticas para la estomatitis subprotésica y la candidiasis bucal. No obstante, se requiere realizar otras investigaciones con el fin de ampliar el conocimiento sobre la actividad



antifúngica del gel de quitosano en el tratamiento de la candidiasis bucal.

REFERENCIAS

1. Santos M, Betancourt A, Queirós M, Curbeira E, Santana D. Manual de terapéutica antimicrobiana en estomatología. Temas de actualización. Rev Cubana Estomatol. 1999; 36 (2) 103-150.
2. Campos B, Ovalle C. Prevalencia de *Candida* en pacientes geriátricos. Rev ADM. 1999; 56 (5): 230-233.
3. Rodríguez J, Miranda J, Morejón H, Santana J. Candidiasis de la mucosa bucal. Revisión bibliográfica. Rev Cubana Estomatol. 2002; 39 (2): 187-23.
4. Lazarde L, Avilán B. Candidiasis eritematosa de la cavidad bucal. Reporte de un caso y revisión de la literatura. Acta Odontol. Venez. 2003; 41 (3) 236-239.
5. Aguirre J. Candidiasis Orales. Rev Iberoam Micol. 2002; 19: 17-21.
6. Moran E, Ferreiro A. La candidiasis como manifestación bucal en el SIDA. Rev Cubana Estomatol. 2001; 38 (1): 25-32.
7. Pardi G, Cardozo E, Perrone M, Salazar E. Detección de Especies *Candida* en pacientes con estomatitis

Recibido: 10-03-2013

Aprobado: 5-05-2013



- subprotésica. Acta Odontol. Venez. 2001; 39 (3): 32-44.
8. Arango M, Sánchez B, Betancur, G. Productos naturales con actividad antimicótica. Rev Espe Quimioterapia. 2004; 17 (4): 325-331.
9. Nápoles I, Hidalgo S, Milanés R, Fernández N, Guzmán, O. Aplicación de Colutorio de *Aloe vera* en el tratamiento de estomatitis subprótesis. Arch Med Camagüey. 2003; 7(5) SN.
10. Quintero L. Efecto de extractos de propóleos mexicanos de *Apis mellifera* sobre el crecimiento *in vitro* de *Candida albicans*. Rev Iberoam Micol. 2008; 25 (1): 22-26.
11. Suarez D, García C, Velazco G, Ortiz R, González A. Biogel de Quitosano a partir de la desacetilación termocatalítica de conchas de camarón propuesta para el tratamiento de la estomatitis subprotésica. Rev Odontol de los Andes. 2009; 4 (2): 5-12.
12. Lárez C. Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro. Avanc Quím. 2006; 1(2): 15-21.
13. Tapia C, Soto D, Vergara L, Alburquerque C, Maccioni A, Matamata A, Hermosilla G, Bucarey S. Efecto antifúngico de quitosán de alto peso molecular en cepas de

Recibido: 10-03-2013

Aprobado: 5-05-2013



- Candida sp* aisladas de muestras clínicas. Rev Chil Infect. 2009; 26(6): 515-519.
14. Valenzuela E, Maldonado C, Paredes J. Actividad antifúngica del quitosano carbamato de etilo en *Candida albicans*. Bol Micol. 2003; 18: 105 - 110.
15. İkinci G, Senel S, Akincibay H, Kas S, Ercis S, Wilson C, et al. Effect of chitosan on a periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* (Abstract). Int J Pharm. 2002; 235(1): 121-127.
16. Azcurra A, Barembaum S, Bojanich M, Calamari S, Aguilar J, Batellino L, et al. Efecto del quitosano de alto peso molecular y de alginato de sodio sobre la hidrofobicidad y adhesión de *Candida albicans* a células. Med. oral patol. oral cir. bucal (Internet). 2006; [en línea] [citado el 6 diciembre 2011] 11 (2): 120-125. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S1698-69462006000200005&script=sci_arttext&tlng=es
17. Fernández M, Muñoz G, Palazón Z, Gutierrez M, Carrillo D, Dilbao O. Estudio de la actividad antimicrobiana de la combinación quitina gentamicina. Rev Mex Cienc Farm. 2006; 37 (4): 21-29.
18. Fontana C, dos Santos D Jr, Bosco J, Spolidorio D, Chiérici R. Evaluation

Recibido: 10-03-2013

Aprobado: 5-05-2013



of chitosan gel as antibiotic and photosensitizer delivery (Abstract).

Drug Deliv. 2008; 15(7):417-422.

19. Padilla D, Ucar A, Ballester L.

Estudio comparativo entre los métodos químico y microondas para la eliminación de *Candida albicans* en bases blandas y duras de prótesis removibles. Rev Odontol de los Andes. 2008; 3 (1) SN.

Recibido: 10-03-2013

Aprobado: 5-05-2013