Efecto antifúngico de quitosán de alto peso molecular en cepas de *Candida* sp aisladas de muestras clínicas

Cecilia Tapia P., Diego Soto M., Leonardo Vergara G., Claudio Alburquerque O., Andrea Maccioni R., Ana M. Matamala C., Germán Hermosilla D. y Sergio Bucarey V.

Antifungal effect of high molecular weight chitosan on *Candida* spp isolated from clinical samples

Chitosan is a D-glucosamine polysaccharide derived from chitin that displays an antimicrobial activity against bacteria and fungi. **Objective:** to evaluate the antifungal effect of high molecular weight chitosan (HMWC) in clinical strains of *Candida* spp. **Methodology:** the susceptibility of forty strains of *Candida* spp. to HMWC was studied (16 *C. albicans*, 11 *C. glabrata*, 5 *C. tropicalis*, 5 *C. krusei*, 2 *C. parapsilosis* and 2 *C. famata*) by broth microdilution at pH 7.0 and pH 4.0. **Results:** of 40 strains, only 2 were inhibited at pH 7.0 and corresponded to ATCC control strains (*C. krusei* 6258 and *C. parapsilosis* 22019). On the other hand, 37/40 strains (92.5%) were inhibited by concentrations lower than 1.25 mg/mL of HMWC at pH 4.0. **Conclusion:** these results show that HMWC, presents activity against clinical *Candida* spp. strains, including *C. glabrata*, and that this activity is present at acid pH (4.0). This compound could potentially be used in vulvovaginal candidiasis since it occurs at pH 4.0-4.5.

Key words: Chitosan, antifungal effect, vulvovaginal candidiasis.

Palabras clave: Quitosán, quitosano, efecto antifúngico, candidiasis vulvovaginal.

Universidad de Chile,
Santiago

Facultad de Medicina

Instituto de Ciencias Biomédicas

Programa de Microbiología y Mico-
logía (CTP, DSM, LVG, CAO, AMR,
AMMC, GHD)

Facultad de Ciencias Veterinarias y
Pecuarias, Departamento de Cien-
cias Biológicas Animales, (SBV)

Clínica Dávila, Santiago, Chile

Laboratorio de Microbiología (CTP,
CAO)

No existen conflictos de interés
relacionados a este trabajo

Fuente de financiamiento: Proyecto
BicentenarioConicyt-Banco Mundial
Cod. PSD23

Recibido: 21 de enero de 2009
Aceptado: 22 de septiembre de 2009

Correspondencia a:

Cecilia Tapia P.
cetapia@med.uchile.cl

Introducción

El quitosán es un polímero lineal de β -1,4-D-glucosamina, derivado de la des-acetilación de la quitina (Figura 1), la cual se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza y forma parte estructural de insectos, crustáceos e incluso hongos^{1,2}.

De acuerdo al grado de polimerización, el quitosán se clasifica en de bajo peso molecular (QBPM) y de alto peso molecular (QAPM).

Se le han asociado diversas propiedades terapéuticas, fundamentalmente como hipoglicemiante³, hipolipemian-
te^{3,4}, para reducir sobrepeso y obesidad⁵ o como biopiel en pacientes con quemaduras⁶. Es un compuesto seguro, biocompatible y biodegradable^{7,8}. De esta manera, es un compuesto que se ha utilizado tanto por vía oral, como por vía tópica.

Recientemente se ha descrito una actividad antimicro-
biana de quitosán frente a bacterias y hongos^{1,9,10}.

Quitosán es un compuesto insoluble en agua, pero soluble en ácidos orgánicos diluidos, como ácido acético, ácido succínico y ácido fórmico, siendo su pKa de 6,3¹. Estudios previos en nuestro laboratorio indican que con-
centraciones inferiores o iguales al 0,1% de ácido acético,

permiten diluir el quitosán sin afectar el crecimiento de levaduras (datos no mostrados).

Se ha descrito que QBPM es más activo frente a hongos⁹; sin embargo, un estudio reciente demostró que el QAPM tendría mayor actividad anti-fúngica debido probablemente al mayor grado de protonación de la molécula¹¹. Ensayos preliminares en nuestro laboratorio habían demostrado actividad anti-fúngica de QBPM sobre cepas de *Candida* sp (datos no mostrados), por lo que se decidió evaluar la actividad anti-fúngica de QAPM en cepas clínicas de *Candida* sp mediante los métodos de recuento de colonias viables en placa post exposición a QAPM y microdilución en caldo.

Materiales y Métodos

Cepas: Se estudiaron 38 cepas de *Candida* sp prove-
nientes de un cepario del Laboratorio de Clínica Dávila
previamente identificadas a nivel de especie, mediante
la metodología convencional (tubo germinativo, micro-
cultivo) y el sistema de asimilación de azúcares API 32C
AUX™ (Biomérieux). Las cepas correspondieron a 16
C. albicans, 11 *C. glabrata*, 5 *C. tropicalis*, 5 *C. krusei*,

Figura 1. Desacetilación de la quitina y su producto quitosán.

2 *C. parapsilosis* y 2 *C. famata* y 3 cepas ATCC, *C. albicans* 90029, *C. krusei* 6258 y *C. parapsilosis* 22019. Se incluyeron en el estudio cepas susceptibles, susceptibles dosis dependiente (SDD) y resistentes a fluconazol. Para estudiar la susceptibilidad a QAPM se utilizaron dos métodos: recuento de colonias viables en placas post exposición a QAPM. y microdilución en caldo a pH 7,0 y a pH 4,0.

Recuento de colonias viables en placas. Este método, diseñado por los autores, se realizó para evaluar preliminarmente el efecto anti-fúngico de quitosán de alto peso molecular (QAPM), Sigma-Aldrich™. El compuesto no difunde en agar, por lo que no pudo utilizarse un método de difusión en disco. Se sub-cultivaron las cepas a 37 °C por 24 hrs en agar Sabouraud. Luego, se realizó una suspensión de células a una escala de Mc Farland de 0,5. Se tomaron 10 µL y se agregaron a 990 µL (dilución 1:100) de dos soluciones de QAPM (2 y 5 mg/mL) diluido en ácido acético a 0,1% (mínima concentración para no inhibir el crecimiento de las levaduras).

Posteriormente se hizo una siembra en rastrillo de 100 µL de las soluciones de trabajo en agar Sabouraud y a las 24 hrs de incubación a 37 °C se realizó un recuento de colonias viables (Figura 2).

Adicionalmente, las cepas fueron suspendidas en otras dos soluciones, una de ácido acético solo (AA) al 0,1% y otra de agua destilada, como controles.

Los ensayos se realizaron por duplicado.

Con el fin de evaluar el efecto temporal de QAPM, se ejecutó el mismo procedimiento anteriormente descrito, pero esta vez efectuando la siembra de tres cepas ATCC

Figura 2. Placa sembrada con cepa de *Candida albicans*; A) en solución de ácido acético (AA) al 0,1%; B) en quitosán de alto peso molecular (QAPM) más AA al 0,1% post incubación a 37 °C durante 24 hrs.

de *Candida* (*C. albicans* 90029, *C. krusei* 6258 y *C. parapsilosis* 22019) a distintos tiempos de exposición a QAPM: 1 min, 5 min, 30 min, 1 hr, 2 hrs (Tabla 2).

Microdilución en caldo: Este estudio se basó en el estándar europeo EUCAST-AFST¹², con modificaciones, adaptando la técnica para medir la concentración inhibitoria mínima (CIM) a QAPM. Las modificaciones incluyen: el uso de ácido acético al 0,1% para disolver QAPM, y la utilización de RPMI 1640 a pH 4,0, además de RPMI 1640 pH 7,0, como medio de cultivo. El resto de las actividades se realizaron de acuerdo al estándar.

Se prepararon placas de RPMI 1640 a pH 7,0 y 4,0, con concentraciones máximas de QAPM de 1,25 mg/mL (máxima concentración alcanzada que permitió la realización del ensayo).

Las cepas fueron sub-cultivadas a 37 °C durante 24 hrs en agar Sabouraud. Se realizó un inóculo de cada cepa alcanzando una concentración Mc Farland de 0,5. Se realizó una dilución 1:10 y se sembraron 100 µL de esta dilución en las placas de microdilución. Las placas se incubaron a 35 °C por 24 hrs, en ausencia de luz. Finalmente, se realizó una lectura espectrofotométrica de las CIMs.

Resultados

Se analizaron 21 cepas por el método de recuento de colonias viables en placa post exposición a QAPM y 40 por el de microdilución en caldo modificado.

De las cepas analizadas con el primer método, en 20/21 cepas (95,2%) se observó una disminución del número de unidades formadoras de colonia post exposición a 2 y 5 mg/mL de QAPM (7 *C. albicans*, 8 *C. glabrata*, 3 *C. parapsilosis*, 1 *C. tropicalis* 1 *C. krusei*). La cepa C161 no mostró inhibición y correspondió a una *C. glabrata* (Tabla 1).

Todas las cepas presentaron inhibición al minuto de exposición a QAPM, siendo las cepas ATCC estudiadas completamente inhibidas a este tiempo (Tabla 2).

De un total de 40 cepas analizadas con el método de microdilución en caldo modificado, la mayoría de las cepas no fue inhibida por 1,25 mg/mL de QAPM a pH 7.0 (Figura 3 A). Sólo dos cepas fueron inhibidas y correspondieron a las cepas control ATCC (*C. krusei* y *C. parapsilosis*).

Por otra parte, 37/40 (92,5%) cepas fueron inhibidas a concentraciones inferiores a 1,25 mg/mL de QAPM a pH 4.0, incluidas las dos cepas ATCC (*C. krusei* y *C. parapsilosis*) (Tabla 3, Figura 3 B). Por otra parte, la mayoría de las cepas sensibles dosis dependiente (SDD) y resistentes a fluconazol, fueron inhibidas por QAPM a la concentración máxima señalada (18/21), salvo las cepas C19 (*C. albicans*), C144 (*C. glabrata*) y C161 (*C.*

Tabla 1. Porcentaje de inhibición de cepas de *Candida* sp post exposición a quitosán de alto peso molecular

n	Id cepa	Especie	Recuento de colonias	
			QAPM 2 mg/mL (% de inhibición)	QAPM 5 mg/mL (% de inhibición)
1	C12	<i>C. albicans</i>	100	100
2	C15	<i>C. albicans</i>	100	100
3	C16	<i>C. albicans</i>	100	100
4	C26	<i>C. albicans</i>	73	97
5	C54	<i>C. albicans</i>	100	100
6	C90	<i>C. glabrata</i>	98	100
7	C91	<i>C. glabrata</i>	32	94
8	C92	<i>C. glabrata</i>	76	91
9	C103	<i>C. glabrata</i>	100	100
10	C151	<i>C. glabrata</i>	99	100
11	C161	<i>C. glabrata</i>	0	0
12	C144	<i>C. glabrata</i>	40	100
13	C59	<i>C. glabrata</i>	92	99
14	C126	<i>C. glabrata</i>	97	100
15	ATCC 6258	<i>C. krusei</i>	26	15
16	C2	<i>C. parapsilosis</i>	100	100
17	C55	<i>C. parapsilosis</i>	85	100
18	ATCC 22019	<i>C. parapsilosis</i>	69	91
19	C30	<i>C. tropicalis</i>	73	68
20	C57	<i>C. albicans</i>	100	100
21	C58	<i>C. albicans</i>	100	100

QAPM= quitosán de alto peso molecular

Tabla 2. Perfil temporal del efecto anti-fúngico de quitosán de alto peso molecular en tres cepas ATCC de *Candida* sp

Cepa	No expuesta a QAPM (ufc/100 µL)	Expuesta a QAPM (ufc/100 µL)				
		Tiempo de exposición (minutos)				
		1	5	30	60	120
<i>C. albicans</i> ATCC 90029	1.207	302	300	266	286	304
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	1.658	0	0	0	0	0
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	1.834	0	0	0	0	0

ufc= unidades formadoras de colonia. QAPM: quitosán alto peso molecular

Tabla 3. Susceptibilidad de cepas clínicas de *Candida* sp a fluconazol (FCZ) y a quitosán de alto peso molecular a pH 4,0

n	Id cepa	Especie	CIM FCZ µg/mL	Categoría de susceptibilidad a FCZ	CIM QAPM mg/mL
1	C54	<i>C. albicans</i>	0,125	S	0,0025
2	C12	<i>C. albicans</i>	0,125	S	0,0025
3	C16	<i>C. albicans</i>	0,125	S	0,0025
4	C167	<i>C. albicans</i>	0,125	S	0,005
5	C15	<i>C. albicans</i>	0,125	S	0,625
6	C57	<i>C. albicans</i>	0,25	S	0,0025
7	C166	<i>C. albicans</i>	0,25	S	0,0025
8	C168	<i>C. albicans</i>	0,25	S	0,0025
1	C26	<i>C. albicans</i>	0,25	S	0,005
2	C58	<i>C. albicans</i>	0,5	S	0,0025
3	C130	<i>C. albicans</i>	0,5	S	0,0025
4	C129	<i>C. albicans</i>	16	SDD	0,0025
5	C41	<i>C. albicans</i>	64	R	0,0025
6	C62	<i>C. albicans</i>	64	R	0,0025
7	C75	<i>C. albicans</i>	64	R	0,0025
8	C43	<i>C. albicans</i>	64	R	0,005
9	C93	<i>C. albicans</i>	64	R	0,005
10	C94	<i>C. albicans</i>	64	R	0,005
11	C19	<i>C. albicans</i>	64	R	> 1,25
12	C113	<i>C. famata</i>	32	SDD	0,0025
13	C32	<i>C. famata</i>	32	SDD	0,005
14	C126	<i>C. glabrata</i>	16	SDD	0,625
15	C151	<i>C. glabrata</i>	16	SDD	1,25
16	C144	<i>C. glabrata</i>	16	SDD	> 1,25
17	C59	<i>C. glabrata</i>	32	SDD	0,0025
18	C92	<i>C. glabrata</i>	32	SDD	0,0025
19	C152	<i>C. glabrata</i>	32	SDD	0,0025
20	C103	<i>C. glabrata</i>	32	SDD	0,0025
21	C91	<i>C. glabrata</i>	32	SDD	0,005
22	C44	<i>C. glabrata</i>	32	SDD	0,01
23	C90	<i>C. glabrata</i>	32	SDD	0,01
24	C161	<i>C. glabrata</i>	64	R	> 1,25
25	C128	<i>C. krusei</i>	4	S	0,0025
26	C55	<i>C. parapsilosis</i>	0,125	S	0,0025
26	C2	<i>C. parapsilosis</i>	1	S	0,0025
27	C30	<i>C. tropicales</i>	0,5	S	0,625
28	C35	<i>C. tropicales</i>	1	S	0,0025
29	C14	<i>C. tropicales</i>	4	S	0,0025
30	ATCC 6258	<i>C. krusei</i>	8	S	0,0025
31	ATCC 22019	<i>C. parapsilosis</i>	1	S	0,0025

S= sensible a FCZ; SDD sensible dosis dependiente a fluconazol; R= resistente a fluconazol.
QAPM= quitosán alto peso molecular.

Figura 3. Placa de microdilución. A) a pH 7,0. Se observa turbidez en todos los pocillos, lo cual indica que no hubo inhibición de las cepas a pH 7,0. B) a pH 4,0. La mayoría de las cepas fue inhibida por QAPM a pH ácido.

glabrata). La mayor parte de las cepas de *C. glabrata* estudiadas fueron inhibidas por QAPM a las concentraciones ensayadas (9/11) (Tabla 3).

Discusión

En general, con ambos métodos las cepas fueron inhibidas en su mayoría a pH 4,0. Es interesante destacar que todas cepas ensayadas fueron inhibidas a tiempos tan bajos de exposición a QAPM, como un minuto (Tabla 2), indicando que QAPM presenta un efecto anti-fúngico rápido. Además QAPM fue capaz de inhibir a la mayoría de las cepas sensibles dosis dependiente (SDD) y resistentes a fluconazol.

Una posible alternativa de uso terapéutico de QAPM, podría ser en la candidiasis vulvo-vaginal. Esta última,

es una infección frecuente en la mujer, cuyo agente etiológico más común es *C. albicans*, aunque pueden aislarse otras especies, algunas de ellas, más resistentes a los anti-fúngicos convencionales, como *C. glabrata*¹³.

Estos resultados demuestran que QAPM tiene un efecto inhibitorio en levaduras del género *Candida*, incluyendo *C. glabrata*, y este efecto ocurre a pH ácido, similar a las condiciones del ambiente vaginal normal o durante una candidiasis vulvo-vaginal, (pH = 4,0-4,5)¹³, podría ser alternativa de tratamiento de uso tópico contra esta patología. Recientes trabajos, han estudiado el uso de quitosán como vehículo de liberación de drogas anti-fúngicas intravaginales, como econazol¹⁴. La mayoría de estos estudios se han realizado en tejido vaginal *ex vivo*.

Este trabajo utilizó 38 cepas clínicas como primera aproximación. Se requiere un estudio que analice un mayor número de cepas y una evaluación del perfil de seguridad de este compuesto al ser aplicado por vía intra-vaginal.

Estos resultados preliminares muestran que QAPM, tendría actividad contra algunas cepas clínicas de *Candida* sp y que esta actividad se presenta a pH ácido (4,0).

Agradecimientos: Al Curso "Unidades de Investigación" impartido por el Instituto de Ciencias Biomédicas de la Fa-

cultad de Medicina de la Universidad de Chile para alumnos de segundo año de Medicina, que permitió la realización de este trabajo.

Resumen

El quitosán es un polisacárido de D-glucosamina derivado de la quitina que presenta una actividad antimicrobiana frente a bacterias y hongos. **Objetivo:** Evaluar el efecto antifúngico de quitosán de alto peso molecular (QAPM) en cepas clínicas de *Candida* sp. **Metodología:** Se estudiaron 40 cepas (16 *Candida albicans*, 11 *C. glabrata*, 5 *C. tropicalis*, 5 *C. krusei*, 2 *C. parapsilosis* y 2 *C. famata*) mediante un método de microdilución en caldo a pH 7,0 y a pH 4,0. **Resultados:** De un total de 40 cepas analizadas sólo dos cepas fueron inhibidas por QAPM a pH 7,0 y correspondieron a las cepas control ATCC (*C. krusei* 6258 y *C. parapsilosis* 22019). Como contrapartida, 37/40 cepas (92,5%) fueron inhibidas a concentraciones inferiores a 1,25 mg/mL de QAPM a pH 4,0. **Conclusión:** Estos resultados muestran que el QAPM, presenta actividad antifúngica contra cepas clínicas de *Candida* sp., incluyendo *C. glabrata* y que esta actividad ocurre a pH ácido (4,0). Este compuesto podría utilizarse en candidiasis vulvovaginal que cursa a pH 4,0-4,5.

Referencias

- 1.- Rabea E I, Badawy M E, Stevens C V, Smagghe G, Steurbaut W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules* 2003; 4: 1457-65.
- 2.- Zakrzewska A, Boorsma A, Brul S, Hellingwerf K J, Klis F M. Transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to the plasma membrane-perturbing compound chitosan. *Eukaryot Cell* 2005; 4: 703-15.
- 3.- Reis C P, Ribeiro A J, Veiga F, Neufeld R J, Damgé C. Polyelectrolyte biomaterial interactions provide nanoparticulate carrier for oral insulin delivery. *Drug Deliv* 2008; 15: 127-39.
- 4.- Yao H T, Huang S Y, Chiang M T. A comparative study on hypoglycemic and hypocholesterolemic effects of high and low molecular weight chitosan in streptozotocin-induced diabetic rats. *Food Chem Toxicol* 2008; 46: 1525-34.
- 5.- Jull A B, Ni Mhurchu C, Bennett D A, Dunshea-Mooij C A, Rodgers A. Chitosan for overweight or obesity. *Cochrane Database Syst Rev* 2008; 16: CD003892.
- 6.- Cárdenas G, Anaya P, von Plessing C, Rojas C, Sepúlveda J. Chitosan composite films. Biomedical applications. *J Mater Sci Mater Med* 2008; 19: 2397-405.
- 7.- Dhanikula A B, Panchagnula R. Development and characterization of biodegradable chitosan films for local delivery of Paclitaxel. *AAPS J* 2004; 6: e27.
- 8.- Baek K S, Won E K, Choung S Y. Effects of chitosan on serum cytokine levels in elderly subjects. *Arch Pharm Res* 2007; 30: 1550-7.
- 9.- Rhoades J, Roller S. Antimicrobial actions of degraded and native chitosan against spoilage organisms in laboratory media and foods. *Appl Environment Microbiol* 2000; 66: 80-6.
- 10.- Yadav A V, Bhise S B. Chitosan: a potential biomaterial effective against typhoid. *Current Science* 2004; 87: 1176-8.
- 11.- Seyfarth F, Schliemann S, Elsner P, Hipler U C. Antifungal effect of high- and low-molecular-weight chitosan hydrochloride, carboxymethyl chitosan, chitosan oligosaccharide and N-acetyl-D-glucosamine against *Candida albicans*, *Candida krusei* and *Candida glabrata*. *Int J Pharm* 2008; 353: 139-48.
- 12.- Subcommittee on antifungal susceptibility testing (ASFT) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial susceptibility testing (EUCAST). Method for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. *Clin Microbiol Infect* 2003; 9: 1-8.
- 13.- Sobel J D. Vulvovaginal candidosis. *Lancet* 2007; 369 (9577): 1961-71.
- 14.- Albertini B, Passerini N, Di Sabatino M, Vitali B, Brigidi P, Rodríguez L. Polymer-lipid based mucoadhesive microspheres prepared by spray-congealing for the vaginal delivery of econazole nitrate. *Eur J Pharm Sci* 2009; 36 (4-5): 591-601.