



Facultad de Medicina  
Escuela de Medicina  
Centro de Investigaciones Biomédicas

**“ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE COMPUESTOS  
DRIMÁNICOS AISLADOS DEL ÁRBOL CANELO (*Drimys  
winteri*), POLIGODIAL, NORDRIMENONA E  
ISONORDRIMENONA, SOBRE BIOPELICULAS DE  
ESPECIES DEL GÉNERO *Candida*”**

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Médicas, mención en  
Biología Celular y Molecular

**GUILLERMO SEBASTIAN TRIVIÑO SOTO**

Director de Tesis : Dr. Joan Villena García  
Co-Director de Tesis : Dr. Iván Montenegro Venegas  
Supervisor Programa : Dr. Mario Párraga San Román

FECHA: 10 DICIEMBRE 2015



Facultad de Medicina  
Escuela de Medicina  
Programa de Magíster en Ciencias Médicas  
Mención Biología Celular y Molecular

**“ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE COMPUESTOS DRIMÁNICOS  
DERIVADOS DEL ÁRBOL CANELO (*Drimys winteri*), POLIGODIAL,  
NORDRIMENONA E ISONORDRIMENONA, SOBRE BIOPELÍCULAS  
DEL GÉNERO *Candida*”**

Guillermo Sebastián Triviño Soto

Este trabajo fue elaborado bajo la supervisión del Director de Tesis Dr. Joan Villena García en el Laboratorio de Biología Celular del Cáncer de la Universidad de Valparaíso, aprobado por los miembros de la Comisión.

Dr. Joan Villena García  
Director de Tesis

Dr. Iván Montenegro Venegas  
Co-Director de Tesis

Dr. Sebastián San Martín Henríquez  
Comisión Evaluación Tesis

Dr. Alejandro Madrid Villegas  
Comisión Evaluación Tesis

Dr. Patricio Godoy Martínez  
Comisión Evaluación Tesis

**Valparaíso, Chile  
2015**

***"A la memoria de quien fue uno de los artífices  
que este momento sea posible mi querido papá  
Pablo Baldovino Triviño Andrade (Q.E.P.D)"***

## **Agradecimientos**

***A mi profesor tutor de tesis de Magíster Dr. Joan Villena García por su infinito apoyo tanto a nivel educacional como profesional y personal. Me demostró lo que es la pasión por la ciencia en todos sus aspectos. Con usted nunca se deja de aprender***

***A mi profesor co-tutor de tesis de Magíster Dr. Iván Montenegro Venegas por su dedicación y tiempo siempre con una palabra de aliento en los momentos que todo se hacía más difícil.***

***Al profesor y coordinador del Programa de Magíster Dr. Mario Párraga San Román por su apoyo constante durante los años de estudio y recomendaciones científicas en desarrollo de mi tesis de grado***

***Al profesor del Programa de Magister y corrector de la Tesis Dr. Sebastián Sanmartín Henríquez por su apoyo y enseñanzas académicas y por enseñarnos a creer en nuestros conocimientos y capacidades***

***Al profesor y corrector de tesis Dr. Alejandro Madrid Villegas por su exigencia y valoración en pro del mejoramiento como científico***

***Al profesor y corrector de tesis Dr. Patricio Godoy Martínez por su colaboración desinteresada y recomendaciones para el desarrollo de esta tesis***

***A la profesora del Programa de Magister Dra Eva Madrid Aris por acompañarnos en nuestro camino y por su dedicación en nuestra formación***

***A la secretaria del Programa de Magíster srta. Elizabeth Reveco por su gestión siempre tan dedicada y su cercanía a nosotros los alumnos siempre muy preocupada de cada uno de nosotros***

***A mis compañeros del Programa de Magíster, Pamela Cuevas, Claudia Delgado, Isabel Gómez, Verónica Gutierrez, Samanta Melgar, Lorena Muñoz, Nieves Navarro, María Ignacia Ortuzar, Sandra Ríos, Daniela Smith, David***

***Astudillo, Mauricio Caneo, Jaime Díaz, Henry Guzmán, Javier Meza, por el apoyo constante en esas largas noches de estudio, la conversas eternas sobre la vida, el presente y el futuro, por mostrarme sus sueños y por sobre todo por la autenticidad de cada uno, sin ustedes no hubiera sido lo mismo***

***A la profesora docente del Instituto de Microbiología Clínica de la Universidad Austral de Chile T. M Laura Otth Rademacher, gracias por sus sabios consejos, por su colaboración académica, por siempre estar presente y por enseñarme como ser un buen docente e investigador, siempre agradecido de usted***

***Al cuerpo docente y alumnos de la Carrera de Tecnología Médica de la Universidad Central por su apoyo, cariño y aprecio durante mi estadía como docente, me enseñaron que un científico se hace y se descubre día a día en el quehacer diario en lo cotidiano fuera y dentro del laboratorio***

***Al cuerpo docente y alumnado de la Carrera de Enfermería de la Universidad Central por su apoyo constante como docente, por enseñarme a crecer como científico tanto de aula como en el laboratorio de investigación y por permitirme compartir con ustedes el conocimiento adquirido previamente***

***A mi madre María Teresa Soto Valdivia y mi Hermano Juan Pablo Triviño Soto, gracias por enseñarme a ser constante y a siempre entregar el corazón y no dejar de soñar con nuevos desafíos***

***Finalmente a quienes están día a día junto a mí, enseñándome a ser fiel en lo poco, quienes me dan todo su amor y constantemente apoyando en lograr mis metas mi esposa Ivet Marion Parra Gaete y mi hija Sofía Rafaella Triviño Parra, sin ustedes nada de esto sería igual***

***Guillermo Triviño Soto, 10 de Diciembre 2015***

## INDICE

<b>RESUMEN</b>	ix
<b>SUMMARY</b>	x
<b>CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>1.0 INTRODUCCIÓN</b>	2
<b>CAPÍTULO 2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS</b>	11
<b>2.1 HIPOTESIS</b>	12
<b>2.2 OBJETIVOS</b>	12
2.2.1 OBJETIVO GENERAL	12
2.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
<b>CAPÍTULO 3. MATERIALES Y METODO</b>	13
<b>3.1 MATERIALES</b>	14
3.1.1 QUÍMICOS	14
3.1.2 OTROS MATERIALES	14
3.1.3 EQUIPOS	15
3.1.4 REACTIVOS USADOS EN BIOLOGÍA CELULAR	15
3.1.5 MEDIOS DE CULTIVO	16

<b>3.2 METODOLOGÍA</b>	16
3.2.1 MICROORGANISMOS Y CULTIVO	16
3.2.2 EFECTO DE POLIGODIAL SOBRE BIOPELÍCULAS DE <i>Candida albicans</i> EN ESTADO PLANCTÓNICO	16
3.2.3 FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS	18
3.2.4 ENSAYOS DE SUCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA	18
3.2.5 VIABILIDAD CON CRISTAL VIOLETA	19
3.2.6 VIABILIDAD CELULAR POR EL ENSAYO MTT	20
<b>CAPÍTULO 4.0 RESULTADOS</b>	22
<b>4.0 RESULTADOS</b>	22
<b>4.1 EFECTO DE POLIGODIAL SOBRE BIOPELÍCULAS DE DIFERENTES ESPECIES DEL GÉNERO <i>candida</i></b>	22
4.1.1 <i>Candida albicans</i>	22
4.1.2 <i>Candida parapsilosis</i>	26
4.1.3 <i>Candida glabrata</i>	28
4.1.4 <i>Candida krusei</i>	29
4.1.5 <i>Candida dubliniensis</i>	30
<b>4.2 EFECTO DE NORDRIMENONA SOBRE BIOPELÍCULAS DE DIFERENTES ESPECIES DEL GÉNERO <i>candida</i></b>	32
4.2.1 <i>Candida albicans</i>	32

4.2.2 <i>Candida parapsilosis</i>	32
4.2.3 <i>Candida glabrata</i>	34
4.2.4 <i>Candida krusei</i>	36
4.2.5 <i>Candida dubliniensis</i>	37
<b>4.3 EFECTO DE ISNORDRIMENONA SOBRE BIOPELICULAS DE DIFERENTES ESPECIES DEL GÉNERO <i>candida</i></b>	39
4.3.1 <i>Candida albicans</i>	39
4.3.2 <i>Candida parapsilosis</i>	40
4.3.3 <i>Candida glabrata</i>	41
<b>CAPÍTULO 5.0 DISCUSIÓN</b>	43
<b>5.0 DISCUSIÓN</b>	44
<b>5.1 POLIGODIAL</b>	44
<b>5.2 NORDRIMENONA</b>	46
<b>5.3 ISONORDRIMENONA</b>	49
<b>CAPÍTULO 6.0 CONCLUSIONES</b>	51
<b>6.0 CONCLUSIONES</b>	52
<b>CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA</b>	53
<b>7.0 BIBLIOGRAFÍA</b>	54



## RESUMEN

Levaduras del género *Candida* corresponden a uno de los patógenos fúngicos más importante y uno de los mayormente aislados de los pacientes que presentan distintos dispositivos médicos como es el caso de prótesis, válvulas y catéteres. La formación de biopelículas como factor de patogenicidad por parte de varias especies del género *Candida* ha significado que estos hongos vayan desarrollando multirresistencia a los fármacos más utilizados en la práctica clínica, como es el caso de anfotericina B y fluconazol.

Poligodial, nordremenona e isonordremenona son compuestos aislados desde *Drimys winteri* Forst, el árbol canelo y junto con otros derivados han sido evaluados en relación a sus propiedades antifúngicas contra una batería de hongos, entre ellos cepas del género *Candida* a través de procedimientos estandarizados a partir de resultados obtenidos por mediciones de MIC<sub>100</sub>, MIC<sub>80</sub> y MIC<sub>50</sub>. En este trabajo, mediante los mismos procedimientos, pudimos observar que Poligodial presenta una elevada actividad antifúngica sobre los biopelículas de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* y *Candida dubliniensis*. Por otra parte, el mismo metabolito presenta una actividad reducida sobre la biopelícula de *Candida krusei* a las concentraciones estudiadas. Junto con ello se observó que nordremenona exhibe muy baja actividad sobre las biopelículas de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* y *Candida glabrata* y por el contrario mostró una elevada actividad sobre la biopelícula de *Candida krusei* y *Candida dubliniensis*. Finalmente en el caso de isonordremenona, este compuesto presenta una elevada actividad sobre biopelícula de *Candida albicans* en contraposición a la actividad antifúngica reducida que muestra frente a la biopelícula de *Candida parapsilosis* y *Candida glabrata*

**Palabras Clave:** poligodial, nordremenona, isonordremenona, actividad antifúngica, biopelícula, *Candida sp.*

## SUMMARY

Fungus *Candida* are among the most important fungal pathogens because they generate the most infections and are mostly isolated in patients having various medical devices such as prostheses, valves and catheters. Biofilm formation as pathogenicity factor by various type of *Candida*, has developed multidrug resistance to popular medications, such as Amphotericin B and Fluconazole.

*Drimys winteri* Forst (Canelo Tree) isolated compounds such as poligodyal, nordrimenona and isonordriemenona were evaluated to study their antifungal properties against diverse type of yeast, including *Candida*. Standardized procedures of MIC<sub>100</sub>, MIC<sub>80</sub> y MIC<sub>50</sub> methods were used.

This study showed that poligodyal presents a high antifungal activity on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Candida dubliniensis*. On the other hand, this metabolite showed a low antifungal activity on *Candida krusei* biofilm. Besides, nordreminona exhibited a low activity on *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* and *Candida glabrata* biofilm and conversely showed a high activity on *Candida krusei* and *Candida dubliniensis* biofilms. Finally isonordreminona showed a high activity on *Candida albicans* biofilm, and a low activity on *Candida parapsilosis* and *Candida glabrata* biofilms.

**Keywords:** poligodyal, nordreminone, isonordreminone, antifungal activity, biofilm, *Candida sp.*

# CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN

*CAPITULO 1.0  
INTRODUCCIÓN*

1

### 1.0 INTRODUCCIÓN

Levaduras del género *Candida* se pueden encontrar en variados ecosistemas en los cuales se encuentre el agua como afluentes y ríos y junto con ellos es posible además, hallarlas en alimentos, así como en seres humanos y animales. Las levaduras corresponden a microorganismos que poseen la capacidad de degradar proteínas y carbohidratos para obtener carbono y nitrógeno, elementos esenciales en su desarrollo. Debido a su gran capacidad adaptativa las levaduras pueden desenvolverse en ambientes en presencia de oxígeno como en anaerobiosis. La reproducción de estas la mayoría de las veces es de manera asexual, por medio de estructuras denominadas blastoconidios, sin embargo algunas especies de este género tienen la capacidad de multiplicarse de forma sexual con desarrollo de hifas, pseudohifas y hasta en algunos casos túbulo germinativo.

Estos microorganismos están clasificados taxonómicamente en el Reino *Fungi*, División *Eumycota*, Subdivisión *Deuteromycotina*, Clase *Blastomycetes*, Familia *Cryptococcaceae*.(Giolo, M. P. y Svidzinski, T. I., 2010). Se encuentran frecuentemente presentes en humanos de forma comensal, especialmente siendo parte de los microorganismos que componen la microbiota normal de la piel, de las mucosa y la vagina, y en la mayoría de los casos estos organismos se mantienen en un constante estado de equilibrio con el sistema inmune del hospedero (Schofield, D. A. *et al.* , 2003; Shinobu, C. *et al.* , 2007; Tavanti, A. *et al.* , 2004; Wroblewska, M. M. *et al.* , 2002). Sin embargo, determinados factores asociados a alteraciones del estado fisiológico e inmune del hospedero (Enfermedad de base, inmunosupresión, edades extremas), además de otras que impliquen la pérdida de barreras anatómicas mediante quemaduras, la introducción de catéteres y cirugías invasivas, pueden favorecer el cambio de estado comensal de estas levaduras hacia un estado patogénico, haciéndolas capaces de causar desde infecciones superficiales de las mucosas hasta en algunos casos infecciones sanguíneas, es por ello que se conocen como la principal levadura patogénica oportunista, siendo el género de hongos mayormente aislado de muestras clínicas humanas. (Bruder-Nascimento, A. *et al.* , 2010; Colombo, A. L. y Guimaraes, T., 2003; Vinsonneau, C. *et al.* , 2009), Las infecciones causadas el género *Candida* son denominadas candidiasis y como las micosis causadas por estos hongos causan un amplio espectro de manifestaciones, podemos encontrar desde superficiales, con compromiso cutáneo y mucoso hasta infecciones profundas diseminadas de alta gravedad como es el caso de una candidemia. Dentro de estas últimas las formas de transmisión pueden ser dos, una

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN

vía endógena en la cual los microorganismos provienen de sitios anatómicos del hospedero, que en condiciones de inmunosupresión actúan como patógenos oportunistas, o por vía exógena en la cual los microorganismos se encuentran en los materiales medico hospitalarios como catéteres o soluciones intravenosas que pudieran estar contaminadas con estos microorganismos(Colombo, A. L. y Guimaraes, T., 2003).

La primera documentación que especifica al género *Candida* como patógeno es atribuida a Langenbeck quien en 1839 observó y aisló de la cavidad oral de un paciente con afta bucal un microorganismo, la levadura patógena, *Candida albicans* (Giolo, M. P. y Svidzinski, T. I., 2010).

*C. albicans*, el patógeno fúngico humano más importante, corresponde a un organismo polimórfico el cual puede ir variando su forma debido a cambios en el medio ambiente pasando del estado de levadura (blastospora) a uno mucho más filamentoso (pseudohifas o hifas) actuando este último como una importante forma de virulencia por parte del hongo. Por otro lado, bajo condiciones de laboratorio también es posible generar un estado de clamidospora, junto con ello muchos experimentos han demostrado que estos cambios morfológicos en el interior del huésped son necesarios para que el organismo pueda adaptarse y sobrevivir y además desarrollar su efecto patológico (Kruppa, M., 2009). *C. albicans* además de generar infecciones en pacientes inmunocomprometidos, es uno de las principales patógenos presentes en las infecciones asociadas a dispositivos médicos, como prótesis ortopédicas, válvulas cardíacas y catéteres vasculares (Kojic, E. M. y Darouiche, R. O., 2004). La candidiasis es la tercera causa más común de infección en los hospitales de los países desarrollados. Las candidiasis son infecciones fúngicas, causadas por levaduras pertenecientes al género *Candida*, destacándose: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. lusitaniae*, *C. rugosa*, *C. guilliermondii* y *C. dubliniensis* (Bruder-Nascimento, A. et al. , 2010; Colombo, A. L. y Guimaraes, T., 2003). Durante mucho tiempo se pensó que solamente algún tipo de debilidad orgánica por parte del hospedero (inmunosupresión) generaba el proceso infeccioso, actuando por tanto la levadura sólo de manera pasiva. Sin embargo hoy en día ya se ha descrito que en el desarrollo de una infección por *Candida sp.*, la levadura participa expresando una serie de factores de virulencia, lo que termina por favorecer la patogénesis del hongo.

Entre estos factores destacan la producción de:

**1. Enzimas extracelulares**, fosfolipasas o proteínasas que degradan el tejido del hospedero. Las fosfolipasas son un grupo de enzimas reguladas por el gen PLB1 y cuya

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN

expresión está afectada por factores nutricionales y ambientales, como el pH y la temperatura y actúan a nivel de los fosfolípidos de la membrana celular de seres humanos y otros organismos animales. Por su parte las proteasas, las cuales son reguladas por una serie de genes SAP, actúan sobre distintas proteínas y por lo tanto tienen la capacidad de degradar entre otros colágenos, queratina y otros péptidos ubicados a nivel de mucosas. Conjuntamente con ello estas enzimas son capaces de unirse a proteínas del sistema inmunológico como inmunoglobulinas, proteínas del complemento y citocinas, generando de esta forma una disminución de la respuesta inmune. (Giolo, M. P. y Svidzinski, T. I., 2010)

**2. Síntesis de Hemolisinas**, las necesidades de hierro, por parte de *Candida sp.*, serían fundamentales para su metabolismo. A partir de ello, en un proceso infeccioso, la captación de este elemento sería a partir de la hemoglobina, esto implicaría que el hongo se una a eritrocitos a través de receptores del sistema del complemento los cuales se generarían a partir de los genes de unión a hemoglobina RBT5, RBT51, WAP1/CSA1, CSA2 y PGA7, para posteriormente la levadura produzca un factor que induce a la lisis de los hematíes. Este factor, lo más probable, correspondería a una manoproteína la cual estaría unida a la superficie celular del hongo (mananos de la pared del hongo). Sin embargo, el mecanismo y base molecular de la hemólisis causada por *C. albicans* permanecen desconocidos (Almeida, R. S. *et al.* , 2009; Watanabe, T. *et al.* , 1999)

**3. Desarrollo del Túbulo Germinativo y Polimorfismo.** En levaduras el polimorfismo corresponde a la capacidad de transformación reversible de una fase planctónica a una de micelio. Este proceso se inicia en algunas especies de *Candida sp.* cuando una blastosporo produce un corto filamento, llamado túbulo germinal que más tarde puede convertirse en gran formación de hifas verdaderas. A medida que la levadura pueda generar estructuras miceliales se genera un aumento de la capacidad de adherencia del microorganismo a los tejidos del huésped debido al aumento en la superficie de contacto, lo que consecuentemente se traduce en un aumento en la diseminación de las levaduras hacia los órganos internos del huésped, siendo por ende esta capacidad de alteración fenotípica del microorganismo uno de los principales mecanismos de patogénesis. El túbulo germinal es de gran valor para el diagnóstico de laboratorio de *C. albicans* y *C. dubliniensis* (Cassone, A. *et al.* , 1973; Guirao-Abad, J. P. *et al.* , 2015; Rusu, E. *et al.* , 2014; Silva, S. *et al.* , 2012)

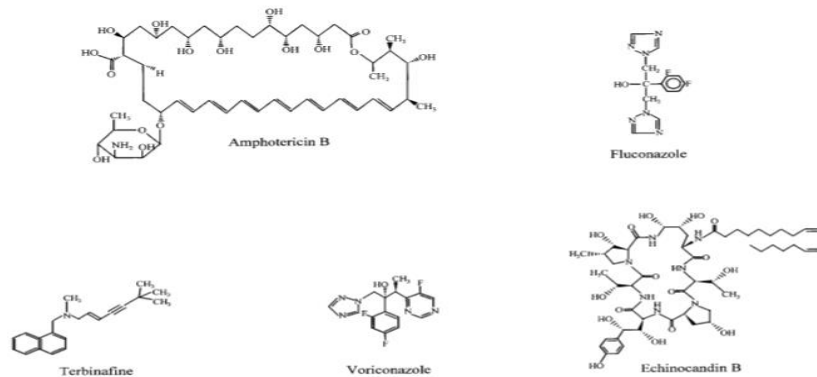
**4. Capacidad de Adhesión**, esta es un prerrequisito para que el microorganismo pueda colonizar e iniciar el proceso infeccioso, en este caso la presencia de proteínas adhesinas colabora en la formación de interacciones moleculares específicas como formación de puentes de hidrogeno, fuerzas de Van der Waals. Esto hace que el microorganismo aumente su capacidad de adhesión a superficies inanimadas, conjuntamente ello colabora a la formación de una comunidad de microorganismos en la que hay dependencia metabólica de una serie de constituyentes, caracterizando así el desarrollo de otro de los principales mecanismos de patogénesis. (Cuellar-Cruz, M. *et al.* , 2012)

**5. Biofilm**, el cual es constituido por un conjunto de microorganismos distintos que conviven. De ellos se puede observar que prácticamente sólo en los tejidos del hospedero pudiéramos encontrar al microorganismo en estado planctónico mientras que estos mismos se agrupan en comunidades multicelulares en algunas superficies como catéteres, prótesis entre otros. Una biopelícula, es una estructura de crecimiento producida entre otros por algunos microorganismo bacterianos como por ejemplo *Klebsiella sp.*, es generado además por organismos fúngicos como el género *Candida sp.* Este se forma a través de una serie de pasos: (i) inicialmente células de levadura se adhieren de modo irreversible a un sustrato, y las células sésiles que los componen muestran características fenotípicas diferentes a sus correspondientes células de vida libre o planctónicas (Quindos, G. *et al.* , 2009). (ii) la levadura comienza a generar túbulos germinales y las células de hifas forman una red conjuntamente con células de maduración, la cual consiste en intercalar levadura de crecimiento e hifas dentro de una matriz extracelular, y finalmente (iii) levaduras que se encuentra recién en formación al interior de la biopelícula se liberan, lo que permite una mayor difusión del organismo. Junto con ello se ha especulado que el denominado *Quorum sensing*, que corresponden a señales internas celulares y que permiten el paso de levadura a hifa o pseudohifa o que además puede generar la inhibición de este traspaso, juega un papel importante en el desarrollo y la maduración de la biopelícula, y potencialmente también, en la mayor difusión de la infección (Kruppa, M., 2009). Por otra parte Se ha visto que el crecimiento de la biopelícula es muy estructurado y organizado durante las primeras fases del desarrollo reconociéndose fácilmente estas etapas y demarcando una fase intermedia y otra de maduración más tardía (Chandra, J. *et al.* , 2001a). El primer evento es el proceso de adhesión de las levaduras, y posteriormente le sigue un proceso de maduración. En una biopelícula madura coexisten muchas microcolonias constituidas por distintas especies de levaduras, las cuales están envueltas en una

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN

matriz extracelular en donde sólo hay paso de agua y nutrientes. Las biopelículas maduras con un crecimiento de 24 a 48 horas consisten en una red densa de células levaduriformes, hifas y pseudohifas. Entre los beneficios que esto tiene para el desarrollo del microorganismo está la mayor protección contra las defensas inmunes del hospedero o contra los antifúngicos lo que acaba por favorecer el establecimiento del proceso patogénico (Douglas, J. L., 2004). Múltiples manifestaciones de candidiasis están asociadas a la formación de biopelículas tanto en los tejidos del huésped como en los dispositivos médicos (Douglas, L. J., 2003; Ramage, G. *et al.* , 2009), dentro de las cuales principalmente se encuentran leucocistosis, anemia, disminución de la ferremia, fiebre (Giolo, M. P. y Svidzinski, T. I., 2010). La formación de Biofilm conlleva implicaciones clínicas ya que las células que forman esta estructura se encuentran protegidas en relación a la respuesta inmune del huésped y a las acciones de los antifúngicos. Como en la mayoría de las biopelículas microbianas las células sésiles son mucho menos susceptibles a agentes antimicrobianos que las células plantónicas (Kuhn, D. M. y Ghannoum, M. A., 2004; Lewis, K., 2001).

Por su parte la presencia de biopelículas en *Candida* genera una gran resistencia a los antifúngicos más utilizados anfotericina B, fluconazol, etc. (Figura 1) lo cual ha sido estudiado por múltiples investigadores (Chandra, J. *et al.* , 2001a; Chandra, J. *et al.* , 2001b; Hawser, S. P. y Douglas, L. J., 1995; Kuhn, D. M. *et al.* , 2002).



**Figura 1.** Estructura de antifúngicos de uso común a nivel intrahospitalario. (Ghannoum, M. A. y Rice, L. B., 1999)

Por otro lado los mecanismos por los cuales *Candida sp.* pudiera estar generando esta multiresistencia a los fármacos también han sido muy estudiados (Ghannoum, M. A. y Rice, L. B., 1999; Sanglard, D. *et al.* , 1995), sin embargo la mayoría de estos trabajos ponen en evidencia las características por las cuales las levaduras generan resistencia, pero el mecanismo por el cual la biopelícula está

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN

desarrollando esta multiresistencia aún no ha sido completamente dilucidado.

Microscópicamente se han determinado las características que presenta una biopelícula y a partir de ello se ha observado que tiene una gran concentración de polisacáridos entre los cuales se encuentran principalmente manosa y residuos de glucosa, todo esto basado en la tinción con colorantes que se unen específicamente a estos hidratos de carbono. Por otra parte, las biopelículas maduras de *C. albicans* tienen una gran heterogeneidad en la arquitectura en términos de distribución de las células del hongo y el material extracelular, además en comparación con las biopelículas crecidas en superficies irregulares de polimetilmetacrilato, los que han crecido en superficies hidrófobas planas tales como elastómeros de silicona, tiene una estructura bifásica distintiva, compuesta por una capa de blastoconidios adherentes cubiertas por una gran cantidad de pseudohifas incrustadas en una capa profunda de material extracelular. La formación de esta estructura bifásica pudiera ser en respuesta a distintas modificaciones ambientales como por ejemplo alteraciones a nivel de pH y del potencial redox (Chandra, J. *et al.* , 2001b).

De las tres clases de agentes antifúngicos usados de manera recurrente en la clínica, solamente los polienos, ejemplo anfotericina B (AMB) y las equinocandinas, por ejemplo Caspofungina (CAS) tienen una consistente acción *in vitro* sobre los Biofilms de *C. albicans* (Kuhn, D. M. *et al.* , 2002). Los polienos, además generalmente provocan efectos nefrotóxicos en los pacientes, por su parte las equinocandinas presentarían principalmente efectos a nivel hepático, además que pudieran generar fiebre y cefalea (Diomedi, A., 2004). Otras moléculas como los azoles provocan otros conflictos asociados mayormente al hecho de ser fungistáticos ya que su uso prolongado induce resistencia en algunas cepas tales como *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* y algunas especies de hongos filamentosos (Cohen, B. E., 1998; Colombo, A. L. *et al.* , 2006; Sanglard, D. *et al.* , 2003). Muchos estudios están relacionados principalmente con los mecanismo de acción por parte de las diferentes especies de *Candida* para poder generar resistencia a fármacos azólicos como fluconazol, estos mecanismos están directamente relacionados con la generación de bombas de eflujo con el objetivo de disminuir la concentración intracelular del antifúngico, producción de enzimas que degradan las proteínas diana del fármaco, alteración en la síntesis de ergosterol, entre otros (Ghannoum, M. A. y Rice, L. B., 1999; Cuellar-Cruz, M. *et al.*, 2012; Mukherjee, P. K. y Chandra, J., 2004; Tobudic, S. *et al.*, 2012). Aún con estos agentes, las infecciones relacionadas con la presencia de biopelículas de *Candida* son extremadamente difíciles, sino imposibles, de erradicar y los dispositivos médicos que están infectados generalmente deben ser removidos (Pappas, P. G. *et al.* , 2009). La

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN

eliminación de dispositivos infectados, tales como válvulas cardíacas mecánicas, catéteres vasculares o prótesis articulares, requiere que los pacientes soporten múltiples operaciones y los riesgos concomitantes asociados a estas.

Actualmente las infecciones fúngicas invasivas producidas por especies del género *Candida* presentan una mortalidad elevada (40-50%), lo que demuestra la gravedad de estos cuadros clínicos y la importancia de su tratamiento con drogas antifúngicas adecuadas (Carneiro, H. A. *et al.* , 2011; Colombo, A. L. *et al.* , 2006; Liu, J. Y. *et al.* , 2011; Nucci, M. y Anaissie, E., 2007; Van der Linden, J. W. *et al.* , 2011). Por otra parte, el mayor problema que hay en la actualidad es que existen muy pocos compuestos sintéticos con actividad antifúngica que puedan utilizarse y aplicarse en el tratamiento de enfermedades sistémicas contra las especies del género *Candida*, especialmente *C. glabrata* y *C. krusei*, ya que como se mencionaba anteriormente los fármacos de uso actual presentan diferentes problemas (toxicidad, resistencia, etc.), por esto, la necesidad de buscar nuevas alternativas de tratamiento toma un gran realce (Da Matta, D. A. *et al.* , 2007; Godoy, P. *et al.* , 2003; Lewis, R. E. *et al.* , 2005).

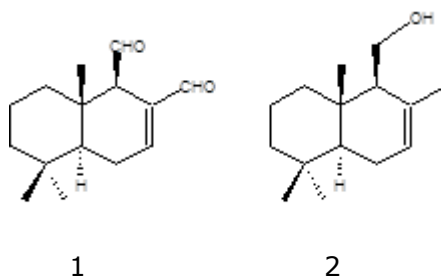
En este contexto, los extractos vegetales y los metabolitos secundarios naturales que poseen una actividad antifúngica relevante, adquieren mayor importancia y son objeto de estudio. (Alves, T. M. *et al.* , 2000; Hoareau, L. y DaSilva, E. J., 1999; Montanari, C. A. y S., V. d., 2001; Saito, M. L., 1990; Silver, L. L. y Bostian, K. A., 1993; Yunes, R. A. *et al.* , 2001; Zhang, X., 2002). La necesidad de utilizar compuestos naturales como tratamiento para las distintas patologías es indiscutible. Según la OMS, en el 90% de los países en vías de desarrollo, coexisten las terapias occidentales con la medicina natural (Vandebroek, I. *et al.* , 2004). De acuerdo a esta perspectiva, el estudio de la química de compuestos naturales obtenidos de las plantas, sigue siendo un tema de interés, principalmente porque el reino vegetal es una fuente inagotable de nuevos compuestos y potenciales fármacos.

Una gran gamma de metabolitos secundarios pueden ser aislados de distintas especies vegetales entre ellos destacan los terpenos los cuales son una de las clases más grandes y más diversas. Aproximadamente unos 55.000 miembros han sido obtenidos a la fecha, entre los cuales encontramos drimanos, labdanos, abietanos, etc. En la naturaleza, las enzimas ciclasa terpenos convierten fosfatos de hidrocarburos simples y lineales en una amplia variedad de esqueletos carbocíclicos quirales. Además, la oxidación y de reordenamiento dan como resultados un número casi infinito de estructuras concebibles. La enorme diversidad de estas estructuras mostradas por esta clase de productos naturales garantiza una amplia gama de

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN

propiedades biológicas que van desde presentar una actividad elevada contra tumores y evitar el desarrollo de la malaria hasta la activación de uniones a través de canales iónicos. (Maimone, T. J. y Baran, P. S., 2007). Dentro de las especies con las propiedades ya mencionadas, se encuentra el *Drimys winteri* Forst (Canelo). Este árbol posee drimanos; que son sesquiterpenos con esqueleto del tipo biciclo farnesano. Estos drimanos sesquiterpénicos presentan diversas bioactividades entre ellas, actividad antimicrobiana (antibacteriana y antifúngica)(Anke, H. y Sterner, O., 1991; Derita, M. *et al.* , 2013) , citotóxica (Anke, H. y Sterner, O., 1991; D' Acunto, M., 2001); larvícida (Montenegro, I. *et al.* , 2013), entre otras.

De lo anterior y para efectos de este estudio, se destaca la actividad antifúngica que las moléculas drimánicas ejercen sobre los hongos filamentosos y levaduriformes. Estudios previos sobre la composición química y actividad biológica del canelo (*D. winteri*) indican que a partir de su corteza y hojas se han aislado y caracterizado numerosos "drimanos" donde poligodial (1), drimenol (2) entre otros (Figura 2), han demostrado tener actividad antifúngica contra *Candida albicans* y *Sacharomyces cereviceae* (Lee, S. H. *et al.* , 1999; Lunde, C. S. y Kubo, I., 2000). Además, se destaca la presencia de aceites esenciales ricos en  $\alpha$ -cubebeno,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno y limoneno que poseen actividad antifúngica (Barrero, A. F. *et al.* , 2000; Jansen, B. J. y de Groot, A., 2004).

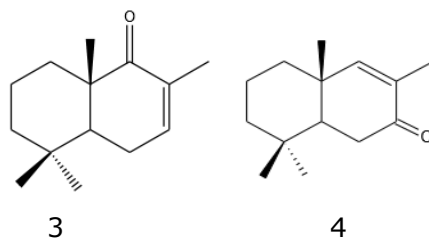


**Figura 2.** Drimanos aislados de *D. winteri* con actividad antifúngica. 1, poligodial; 2, drimenol.

De la misma forma Anke y colaboradores evaluaron la actividad antimicrobiana, fungicida, citotóxica y mutagénica de 20 sesquiterpenos drimánicos, dentro de los cuales, poligodial resultó ser el antifúngico más activo de los compuestos ensayados, y no evidenció actividad mutagénica. Al evaluar la actividad citotóxica sobre distintas especies de hongos, se observó que este metabolito fue 10 veces mayor en comparación con los otros compuestos (Anke, H. y Sterner, O., 1991). Junto con ello, son varios los estudios en los cuales se ha observado que poligodial posee actividad antifúngica en *Saccharomyces cerevisiae* (De Almeida Alves, T. M. *et al.* , 2001; Lee,

## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN

S. H. *et al.* , 1999; McCallion, R. F. *et al.* , 1982; Taniguchi, M. *et al.* , 1984). De forma similar recientemente Derita y colaboradores han mostrado la actividad antifúngica de varios compuestos drimánicos sobre diferentes especies de *Candida*. Resultados previos en el grupo indican que compuestos como nordrimenona u 11-nordrimenona (3), e isonordrimenona también denominado 11-nordrimen-7-ona (4) (Figura 3), los cuales fueron obtenidos de manera sintética a partir de un metabolito natural sesquiterpeno derivado de la corteza del árbol Canelo (*Drimys winteri*) denominado drimenol, presentaron actividad moderada sobre levaduras (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* y *Saccharomyces cerevisiae*), así como en hongos filamentosos (*Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* y *Microsporum gypseum*). (Derita, M. *et al.* , 2013). Por otra parte, se observó que estos compuestos presentaban una pequeña actividad inmunomoduladora y citotóxica principalmente sobre células cancerígenas, además de larvicida sobre *Epilachna paenulata* y *Spodoptera frugiperda* (Montenegro, I. *et al.* , 2013; Montenegro, I. *et al.* , 2014)



**Figura 3.** Compuestos sintéticos derivados de drimenol con actividad antifúngica. 3. nordrimenona; 4. isonordrimenona.

Junto con ello se ha visto que todos los compuestos sesquiterpénicos aislados de *Drimys winteri* Forst, presentan características estructurales similares. Lo anterior, les permite tener una gran actividad antifúngica y antimicrobiana, que también se han observado en otros compuestos drimánicos presentes en otros vegetales, destacando los patrones asociados a moléculas dialdehídicas (Anke, H. y Sterner, O., 1991; Derita, M. *et al.* , 2013).

Estos antecedentes indican el interés de estos compuestos naturales y sus derivados como antifúngicos y nos llevan a plantear la siguiente hipótesis.

## CAPITULO 2: HIPOTESIS Y OBJETIVOS

*CAPÍTULO 2.0*  
*HIPOTESIS Y OBJETIVOS*

11

## 2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

### 2.1 HIPOTESIS

**“Compuestos drimanánicos como poligodial, nordrimenona e isonordrimenona, presentan actividad antifúngica sobre biopelículas de diferentes especies patógenas del género *Candida sp.*”**

### 2.2 Objetivos

#### 2.2.1 Objetivo General

- Determinar la acción de poligodial, nordrimenona e isonordrimenona aislados de *Drimys winteri* Forst (Canelo) sobre la formación de biopelículas en cultivos de *C. albicans* y otras especies de *Candida* (*C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* y *C. krusei*).

#### 2.2.2 Objetivos Específicos

- Realizar los cultivos de las especies de *Candida* mencionadas anteriormente de forma que estas desarrollen biopelículas.
- Determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) en la cual poligodial, nordrimenona e isonordrimenona aislados de *D. winteri* inhiben las biopelículas ya formadas por las distintas especies de *Candida* estudiadas.
- Comparar la actividad antifúngica de poligodial, nordrimenona e isonordrimenona, drimanos aislados de *D. winteri*, con los antifúngicos de uso habitual en clínica como son anfotericina B y fluconazo



### 3.0 MATERIALES Y MÉTODO

#### 3.1 MATERIALES

##### 3.1.1 QUÍMICOS

**Reactivos:** Todos los productos químicos como biológicos fueron obtenidos desde Merck y/o Sigma-Aldrich.

##### **Obtención de compuestos naturales**

El metabolito natural poligodial, fue aislado del extracto de diclorometano de la corteza de *D. winteri* Forst (Winteraceae). En el caso de los compuesto nordrimenona e isonordrimenona fueron obtenidos de forma sintética a partir de drimenol el cual es otro compuesto natural aislado de *D. winteri* Forst. Los tres compuestos fueron obtenidos por el Dr. Iván Montenegro según como se describe en su tesis doctoral (Montenegro, I., 2013). Posteriormente fueron mantenidos a -20° C en el Laboratorio de Biología Celular del Cáncer del Edificio de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Valparaíso. Edificio Bruno Günther, Hontaneda N° 2664, Valparaíso. Seguido de ello los compuestos poligodial, nordrimenona e isonordrimenona se solubilizaron en alcohol Tween 20 al 2 % mediante sonicación y con la ayuda de un vortex para ser llevados a una concentración final de 50 mg/mL y finalmente almacenados a -20°C para su posterior uso en los ensayos antifúngicos correspondientes.

##### 3.1.2 OTROS MATERIALES

- Botellas de vidrio con tapa Duran Schott®. 250 mL y 500 mL
- Micropipeta multicanal de 200 µL Biopette®.
- Micropipetas Biopette®, modelos p2, p10, p20, p200 y p1000.
- Pipeta graduada HGB® de 10 mL.
- Placas de micropocillos para cultivo celular de 6, 12, 24 y 96 pocillos Orange Scientific®.
- Placas petri plásticas para cultivo celular de 60 y 100 mm Orange Scientific®.
- Portaobjetos y cubreobjetos.
- Probeta de 100 mL Duran®.
- Propipeta Fastpette®.
- Puntas para micropipetas desechables de 10, 200 y 1000 µL.
- Tubos para centrifuga de 15 y 50 mL Orange Scientific®.

## CAPITULO 3: MATERIALES Y MÉTODO

- Tubos para microcentrífuga de 1,5 mL Eppendorf®.

### **3.1.3 EQUIPOS.**

- Balanza analítica modelo TE 214 S Sartorius®.
- Baño termostático Memmert®.
- Cámara de flujo laminar clase II ESCO®.
- Cámara Digital modelo DP 71 Olympus®.
- Centrífuga modelo 5415 R Eppendorf®.
- Centrífuga modelo TJ-6 Beckman®.
- Congelador Beste®.
- Incubadora Memmert®.
- Microscopio óptico invertido Japan Optical Corporation®.
- Refrigerador modelo Altus 700 Mademsa®.
- Vortex V1 plus Boeco®.

### **3.1.4 REACTIVOS USADOS EN BIOLOGÍA CELULAR**

- Ácido Acético Winkler LTDA®.
- Ácido morfolinpropanosulfónico (MOPS) Winkler LTDA®.
- Ácido Tricloroacético (TCA en inglés) Winkler LTDA®.
- Kit MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrasodio bromuro). Ensayo de Proliferación Celular. Cayman Chemical Company
- Dimetil Sulfoxido (DMSO) Sigma-Aldrich®.
- Tween® 20 Sigma-Aldrich para Biología Molecular
- Anfotericina B (Fungizona 250 µg/mL) Thermo Scientific®.
- Fluconazol Sigma-Aldrich®
- Tampón Fosfato Salino (PBS en inglés) pH 7,4 Gibco®.
- Cristal Violeta Merck®.
- RPMI-1640 (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.).
- Etanol 99% para análisis.
- Hidroximetil-aminometano (TRIS) Merck®.
- Tripsina-EDTA (0,25 %) Gibco®.

### 3.1.5 Medios de cultivo

#### Agar Sabouraud cloranfenicol:

Digerido pancreático de caseína	5,0 g
Digerido péptico de tejido animal	5,0 g
Dextrosa	40,0 g
Agar	15,0 g
Cloranfenicol	0,05 g
Agua	1000 ml
pH	5,6+/- 0,2

## 3.2 METODOLOGÍA

### 3.2.1 MICROORGANISMOS Y CULTIVOS

Para la evaluación antifúngica se utilizaron cepas de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. kusrei*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis* y *C. tropicalis* productoras de biopelículas, de los ceparios propios del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Valparaíso, las cuales fueron obtenidas de aislados clínicos. Las cepas se cultivaron en placas de agar de Sabouraud-cloranfenicol durante 48 h a 30 °C, y fueron subcultivadas cada 15 días para evitar transformaciones pleomórficas. Los inóculos de células o suspensiones de esporas se obtuvieron de acuerdo con procedimientos publicados en el protocolo M27 - A3 para técnica de microdilución en placa y se ajustaron a un 0,5 McFarland (70% de transmitancia a 530nm, equivalente a  $1 - 5 \times 10^6$  UFC/mL)(CLSI, 2008).

### 3.2.2 EFECTO DE POLIGODIAL SOBRE *C. ALBICANS* EN ESTADO PLANCTÓNICO

Para observar el efecto que tuvo poligodial como agente antifúngico lo primero que se realizó fue comprobar la susceptibilidad que presenta la levadura en estado planctónico frente a este metabolito para ello se solubilizó poligodial en alcohol tween 20 al 2% y se realizaron diluciones a partir de una solución stock 1600 µg/mL (Tubo 2) según la siguiente tabla 1.

**Tabla 1.** Diluciones seriadas para preparar MIC<sub>80</sub> frente a *Candida albicans* en estado plantónico.

Tubo	Concentración (µg/mL)	Transferir	A un tubo con (ml de alcohol tween 20 al 2%)	Concentración final (µg/mL)	Tubo
2	1600	0,50	0,50	800	3
2	1600	0,25	0,75	400	4
2	1600	0,25	1,75	200	5
5	200	0,50	0,50	100	6
5	200	0,25	0,75	50	7
5	200	0,25	1,75	25	8
8	25	0,50	0,50	12,5	9
8	25	0,25	0,75	6,25	10
8	25	0,25	1,75	3,12	11

A partir de las diluciones preparadas se tomaron 100 µL y se llevaron a 4,9 mL de RPMI, posteriormente de estas últimas soluciones se tomó un volumen de 100 µL y se agregaron a una placa de 96 pocillos, donde la columna 1 correspondía al control de esterilidad por lo cual se agregó 200 µL de RPMI y el tubo 12 correspondía al control de crecimiento agregándose 100 µL de RPMI con alcohol tween 20 al 2 %. Por otro lado se prepararon los inóculos con *Candida* a partir de soluciones obtenidas al 0,5 Mc Farland a una dilución 1:1000, de esta última se tomaron 100 µL y se colocaron en las placas de 96 pocillos (excepto tubo 1 que corresponde al control de esterilidad). Al cabo de 24 h se midió la absorbancia a 530 nm según lo expresado por las directrices de CLSI/NCCLS (CLSI, 2008; NCCLS, 2002) Los puntos finales se definieron como la menor concentración de los compuestos que resulta en la inhibición total (MIC<sub>100</sub>) de crecimiento visual en comparación con el crecimiento en los pocillos control que no contienen ningún antimicótico. MIC<sub>50</sub> se define como la menor concentración de un compuesto que inhibe el 50% del crecimiento del medio control.

### 3.2.3 FORMACIÓN DE LAS BIOPELÍCULAS

Se agregó 1mL de Medio RPMI 1640 tamponado con 165 mM ácido morfolinpropanosulfónico a pH 7.0 a 37 °C, previamente filtrado, a cada pocillo de una placa de 96, tras lo cual se agregó 100 µL de la solución al 0,5 McFarland de las diferentes especies de *Candida* sp, exceptuando la columna N° 12 de la placa de 96 pocillos, en la cual no se agregaron levaduras para ser utilizado como Control negativo (Control de Esterilidad) y se dejó incubando el cultivo por 24 h a 37 °C en condiciones aeróbicas. La formación de la biopelícula, fue evaluada al observar tanto a ojo desnudo como por medio de un microscopio invertido, la presencia de un botón denso unido al fondo de cada pocillo de la placa. Posteriormente, se utilizó una pipeta multicanal para poder aspirar el medio de cultivo, teniendo el debido cuidado de no tocar y destruir las biopelículas ya formadas. Finalmente cada pocillo fue lavado muy cuidadosamente con 100 µL de agua destilada, ayudados por la pipeta multicanal, por dos veces, con el objetivo de no dejar residuos de medio de cultivo (Pierce, C. G. *et al.* , 2010).

### 3.2.4 ENSAYOS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA.

La concentración mínima inhibitoria (MIC) de cada compuesto se determinó mediante el uso de técnicas de microdilución en caldo, de acuerdo con las directrices para las levaduras (M27-A3) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2008. Valores de MIC se determinaron en el medio RPMI-1640 (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.) tamponado a pH 7,0 con MOPS. Placas de microvaloración se incubaron a 37° C por 48 h.

A partir de soluciones madre (50 mg/mL) se prepararon soluciones de trabajo en medio RPMI 1640 de cada compuesto a ser probado (1600, 800, 400, 200, 100, 50, 25 10 µg/mL) de las cuales se agregaron 150 µL a los correspondientes pocillos de la columna de cada placa de microtitulación que contiene las biopelículas fúngicas, desde la columna 1 a la 8 respectivamente de esta manera se fueron creado una serie de diluciones del antifúngico de interés desde la más concentrada en los pocillos de la columna 1 a la menos concentrada en los pocillos de la columna 8. Los pocillos correspondientes a las columnas 9 y 10 corresponden a los controles positivos de antifúngicos de uso común siendo el primero de los casos anfotericina B y el segundo fluconazol, los cuales se utilizaron a la mayor concentración probada es decir 1600 µg/mL. Las biopelículas de la columna 11 fueron utilizadas como controles positivos y los pocillos de la columna 12 como controles negativos (Figura 4). Posteriormente los

### CAPITULO 3: MATERIALES Y MÉTODO

placas fueron cubiertas e incubadas durante 48 horas a 37 °C. Después del período de incubación a las placas se le extrajo el medio y fueron lavadas suavemente con agua. Los puntos finales se definen como la menor concentración del fármaco que resulta en la inhibición total (MIC<sub>100</sub>) de crecimiento visual en comparación con el crecimiento en los pocillos control que no contienen ningún antimicótico. MIC<sub>50</sub> se define como la menor concentración de un compuesto que inhibe el 50% del crecimiento del medio control, respectivamente (medio de cultivo con el microorganismo pero sin la adición de ningún compuesto) y se determinó espectrofotométricamente (Pierce, C. G. *et al.* , 2010; Zhao, L. X. *et al.* , 2013).

COLUMNAS											
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
COMPUESTO EN ESTUDIO								AB	F	POS	NEG
1600	800	400	200	100	50	25	10	1600	1600	0	0
1600	800	400	200	100	50	25	10	1600	1600	0	0
1600	800	400	200	100	50	25	10	1600	1600	0	0
1600	800	400	200	100	50	25	10	1600	1600	0	0
1600	800	400	200	100	50	25	10	1600	1600	0	0
1600	800	400	200	100	50	25	10	1600	1600	0	0
1600	800	400	200	100	50	25	10	1600	1600	0	0
1600	800	400	200	100	50	25	10	1600	1600	0	0

**Figura 4.** Distribución de los compuestos en la placa de 96 pocillos por columnas. Concentración en µg/mL. 1) 1600; 2) 800; 3) 400; 4) 200; 5) 100; 6) 50; 7) 25; 8) 10; 9) anfotericina B a 1600; 10) Fluconazol a 1600; 11) Positivo sin Compuesto; 12) Negativo sin compuesto

#### 3.2.5 VIABILIDAD CON CRISTAL VIOLETA

Para cuantificar la citotoxicidad de los compuestos frente a las distintas cepas fúngicas se desarrollaron ensayos colorimétricos con cristal violeta basado en la capacidad de este último, al ser un colorante catiónico, de unirse a los extremos aminos de las proteínas de la pared de los hongos. Por lo cual, aquellos organismos que hayan sido destruidos por acción del metabolito, no podrían ser teñidos, visualizándose la disminución del color respecto a la de los controles. Para llevar esto a

## CAPITULO 3: MATERIALES Y MÉTODO

cabo, lo primero que se hizo fue remover el sobrenadante (correspondiente al medio de cultivo) desde la placa con la utilización de una pipeta multicanal, teniendo la precaución de no remover los restos de las biopelículas si aún quedaba. Seguido de ello se agregaron 100  $\mu$ L de Cristal Violeta 0,1 % p/v en cada uno de los 96 pocillos y se incubó a temperatura ambiente por 20 minutos. Posteriormente el exceso de tinción fue removido realizando dos lavados con agua destilada, agregando 200  $\mu$ L en cada pocillo por vez y siempre teniendo la precaución de no soltar la biopelícula que se encontraba en el fondo. A continuación se agregaron 100  $\mu$ L de ácido acético 33% v/v por 20 minutos, aprovechando su capacidad de diluyente, con el objetivo de remover la biopelícula que no fue afectado por los metabolitos y que por lo tanto fue teñido con cristal violeta. Finalmente fue leída la absorbancia a 620 nm en un lector de placas y se restó a cada resultado los valores de absorbancia obtenidos en los pocillos de la columna 12 correspondientes a los controles de esterilidad. Los datos obtenidos fueron analizados y expresados en porcentaje de crecimiento respecto del control positivo que fue considerado como el 100% de viabilidad.(O'Toole, G. A., 2011; Raut, J. S. *et al.* , 2013)

### 3.2.6 VIABILIDAD CELULAR POR EL ENSAYO MTT

Este método se basa en la reducción de la sal de tetrazolio MTT (3-(4,5-dimetiltiasol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrasodio) de color amarillo y soluble en agua, en cristales de formazán azul oscuro insolubles en agua. Esta reacción sólo ocurre en células viables y es catalizada por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa.

El formazán insoluble en agua debe ser solubilizado y la densidad óptica del material resultante se mide espectrofotométricamente y la absorbancia es proporcional a la concentración de la tinción lo que se correlaciona con el número de células metabólicamente viables en el cultivo.(Riss, T. L. *et al.* , 2004)

El ensayo se basa en lo descrito por Tim Mosmann el año 1983 pero con modificaciones, utilizando el Kit MTT Ensayo de Proliferación Celular de Cayman Chemical Company (Montenegro, I., 2013). Una vez obtenidas las biopelículas y luego de la incubación con el antifúngico se agregó una solución del reactivo MTT (1 mg/mL) disuelto en medio completo en un volumen igual al de la suspensión celular para lograr una concentración de 0,5 mg/mL por pocillo. Los pocillos se incubaron por 1 hora a 37 °C y posteriormente se lavaron una vez con medio sin suplementar, el precipitado de color violáceo en el interior de las células a menudo visible a simple vista fue

### CAPITULO 3: MATERIALES Y MÉTODO

resuspendido con 100  $\mu$ L de Dimetil sulfóxido (DMSO) por pocillo para finalmente ser leída la absorbancia a 550 nm en un multilector de placas.

## CAPITULO 4.0: RESULTADOS

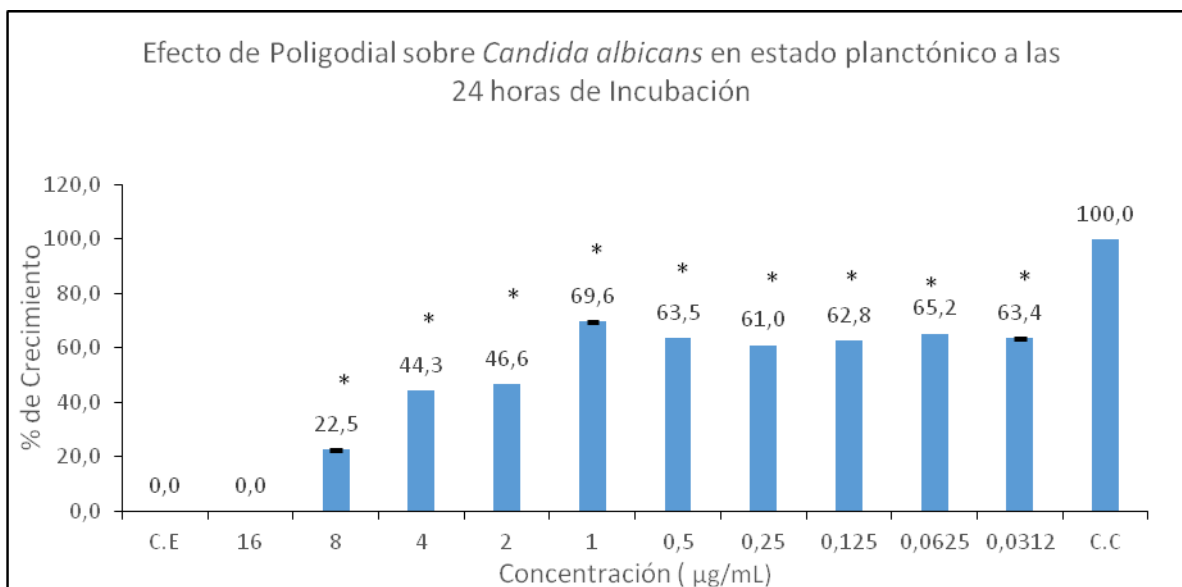
## 4.0 RESULTADOS

### 4.1 EFECTO DE POLIGODIAL SOBRE BIOPELÍCULAS DE DIFERENTES ESPECIES DEL GÉNERO *CANDIDA*.

Poligodial sesquiterpeno del tipo dialdehído se observó su actividad antifúngica frente a biopelículas de distintas especies del género *Candida* y los resultados obtenidos fueron los siguientes:

#### 4.1.1 *Candida albicans*

Al cabo de 24 h de tratamiento de *C. albicans* con poligodial, en estado planctónico, se obtuvieron los siguientes resultados que se presentan en la Figura 5.



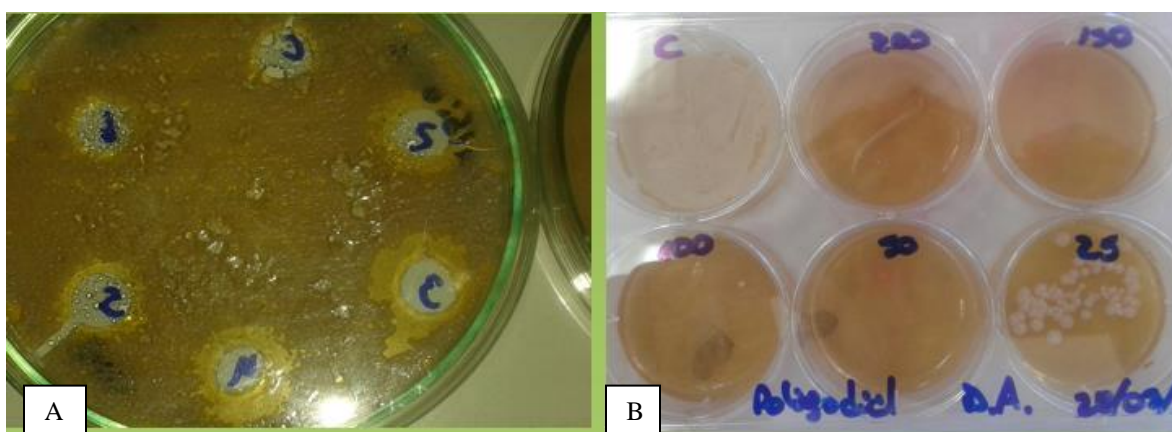
**Figura 5.** Viabilidad de *Candida albicans* en estado planctónico frente a la acción de poligodial al cabo de 24 h de incubación. N de Experimentos = 2. Réplicas por experimento = 8. \*=  $p < 0,05$

En ella es posible observar que la MIC<sub>50</sub> se encontró entre las concentraciones de metabolito de 2 µg/mL y 4 µg/mL, llegando a presentarse la MIC<sub>100</sub> a un valor final de 16 µg/mL.

Por su parte, mediante la técnica de difusión en agar (Figura 6a) se analizó la

## CAPITULO 4.0: RESULTADOS

inhibición del crecimiento de *C. albicans* a distintos volúmenes (15, 25, 50, 75 y 100  $\mu\text{L}$ ) de una concentración determinada de 50 mg/mL de poligodial. Posterior al tratamiento con el compuesto se pudo observar que con un volumen de 25  $\mu\text{L}$  de la concentración establecida se genera inhibición completa del crecimiento microbiano. De la misma forma a través del desarrollo de la técnica de inclusión en agar se evaluó la inhibición del crecimiento de *C. albicans* al enfrentar este microorganismos a diferentes concentraciones del metabolito (Figura 6b.). A partir de ello se obtuvo que con 25  $\mu\text{g/mL}$  de poligodial se obtiene una inhibición parcial del crecimiento del hongo, observándose una inhibición total a la concentración de 50  $\mu\text{g/mL}$ .

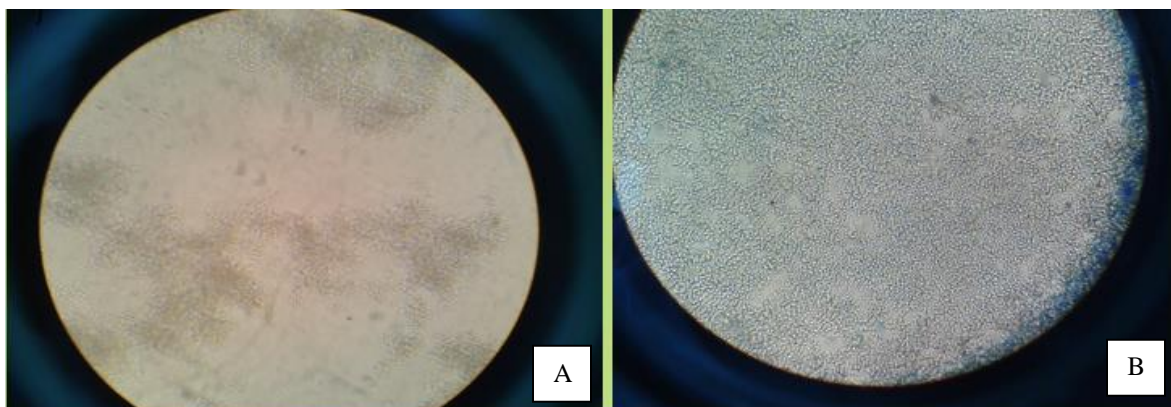


**Figura 6.** A. Efecto del tratamiento con poligodial (50 mg/mL) sobre el crecimiento de *C. albicans* según la técnica de difusión en agar. C) Control Positivo de Crecimiento 1) 15  $\mu\text{L}$ ; 2) 25  $\mu\text{L}$ ; 3) 50  $\mu\text{L}$ ; 4) 75  $\mu\text{L}$ ; 5) 100  $\mu\text{L}$ . B. Efecto del tratamiento con poligodial sobre el crecimiento de *C. albicans* según la técnica de inclusión en agar C) Control Positivo de Crecimiento; 25  $\mu\text{g/mL}$ , 50  $\mu\text{g/mL}$ , 100  $\mu\text{g/mL}$ , 150  $\mu\text{g/mL}$ , 200  $\mu\text{g/mL}$

Posteriormente se realizaron las correspondientes pruebas de susceptibilidad contra biopelículas de *C. albicans* al cabo de una incubación de 48 h con poligodial. La Figura 7 muestra una imagen cualitativa al microscopio del efecto que tiene este metabolito sobre la biopelícula de *C. albicans*. Además los datos presentados en la Figura 8a, efecto de poligodial cuantificado con MTT, muestran que se obtiene una  $\text{MIC}_{50}$  entre las concentraciones de 25  $\mu\text{g/mL}$  y 50  $\mu\text{g/mL}$ , sin embargo al realizar la misma medición con cristal violeta (Figura 8b), es posible observar que esta  $\text{MIC}_{50}$  se obtiene a la concentración de 25  $\mu\text{g/mL}$ . Por otro lado, los mismos datos nos demuestran que a pesar que el metabolito fue incapaz de generar la eliminación completa de la biopelícula ya formada ( $\text{MIC}_{100}$ ), al cuantificar con cristal violeta, se

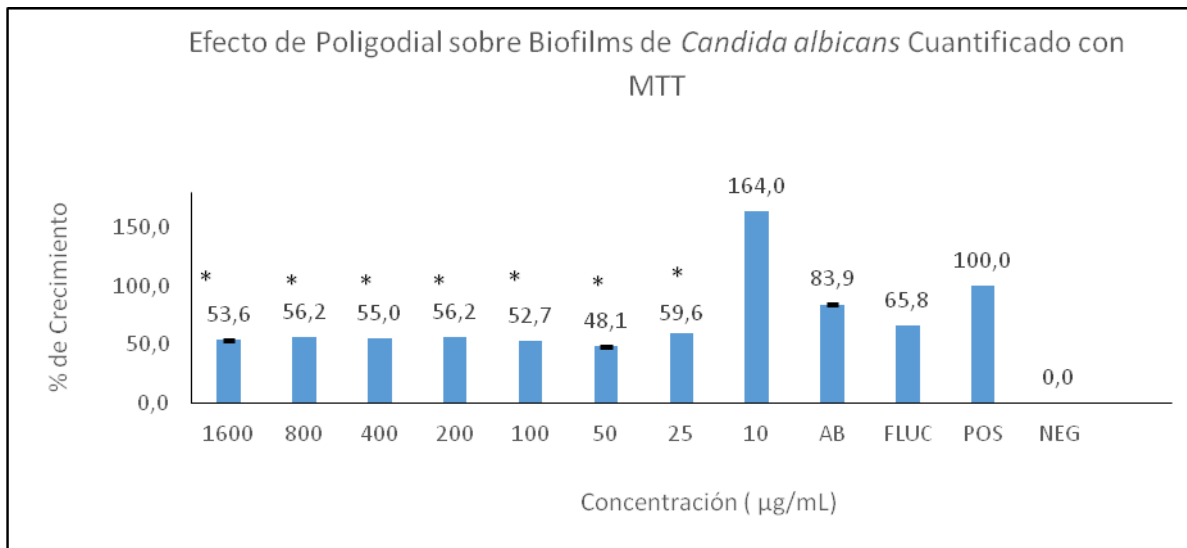
## CAPITULO 4.0: RESULTADOS

obtiene una  $MIC_{80}$  entre las concentraciones 50  $\mu\text{g/mL}$  y 100  $\mu\text{g/mL}$ , para posteriormente, llegar incluso, a un porcentaje de inhibición cercano a un 86% (porcentaje de crecimiento igual a 14% a una concentración de 200  $\mu\text{g/mL}$ ), a la vez es posible observar que se genera una curva donde a concentraciones medias (100-400  $\mu\text{g/mL}$ ) el efecto de poligodial es mucho mayor pero a medida que nos vamos hacia los extremos, concentración de 25  $\mu\text{g/mL}$  y de 1600  $\mu\text{g/mL}$ , se observa una disminución de la actividad del metabolito llegando incluso a la mayor concentración a presentar un porcentaje de inhibición cercano a un 60% (porcentaje de crecimiento igual a un 40,1%). Junto con lo anteriormente nombrado, toma realce el hecho que a todas las concentraciones podemos observar una actividad, significativamente, mucho mayor a la presentada por los antifúngicos de uso común, los cuales se encuentran a la concentración mayor de 1600  $\mu\text{g/mL}$ . La acción de anfotericina B se ve prácticamente inhibida en su totalidad ya que al cuantificar su acción con cristal violeta, la biopelícula presenta un crecimiento igual al 102,4% lo que claramente es superior al 100% mostrado por el control de crecimiento. Esto se contrapone con la sensibilidad mostrada por la biopelícula de *C.albicans* frente a poligodial, ya que a la misma concentración de 1600  $\mu\text{g/mL}$ , como se dijo anteriormente, la levadura presenta un crecimiento sólo de un 40,1%. Por otro lado cuando se somete la biopelícula de *C.albicans* a la acción de Fluconazol, vemos que este compuesto, a la concentración estudiada genera una inhibición del crecimiento de la levadura de un 74,8 % (porcentaje de crecimiento de 26,2%), sin embargo poligodial presenta esta misma actividad a concentraciones mucho menores, entre los 400  $\mu\text{g/mL}$  y los 800  $\mu\text{g/mL}$ .

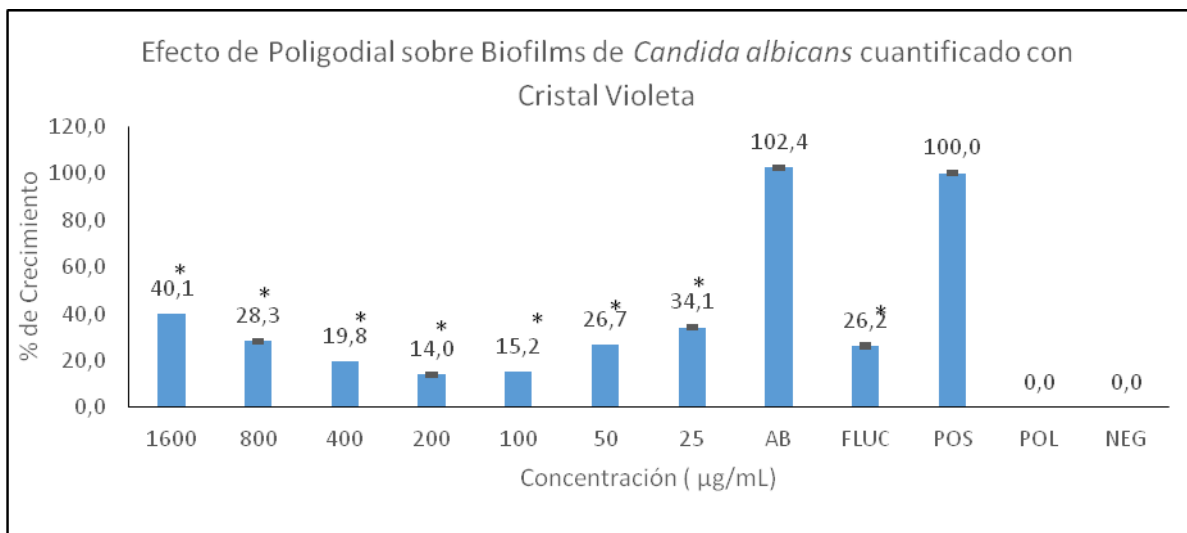


**Figura 7.** A) Efecto de poligodial sobre biopelículas de *C. albicans*. B) Desarrollo de la biopelícula de *C.albicans* sin tratamiento

A.



B.



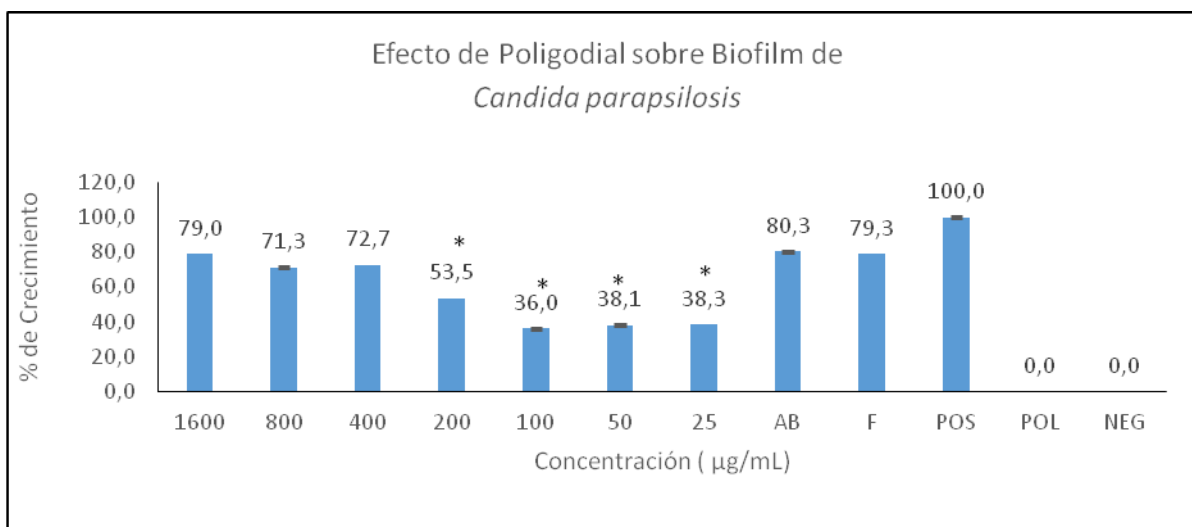
**Figura 8.** Efecto de poligodial sobre biopelículas de *C. albicans*. A. Cuantificación con ensayo de MTT. N de Experimentos = 2. Réplicas por experimento = 8. \*= P<0,05 B. Cuantificación por medio de tinción con Cristal Violeta N de Experimentos = 3. Réplicas por experimento = 8. \*=p<0,05

#### 4.1.2 *Candida parapsilosis*

A partir de los resultados obtenidos, que se muestran en la Figura 9, podemos observar que poligodial presenta una actividad significativa sobre la biopelícula de

## CAPITULO 4.0: RESULTADOS

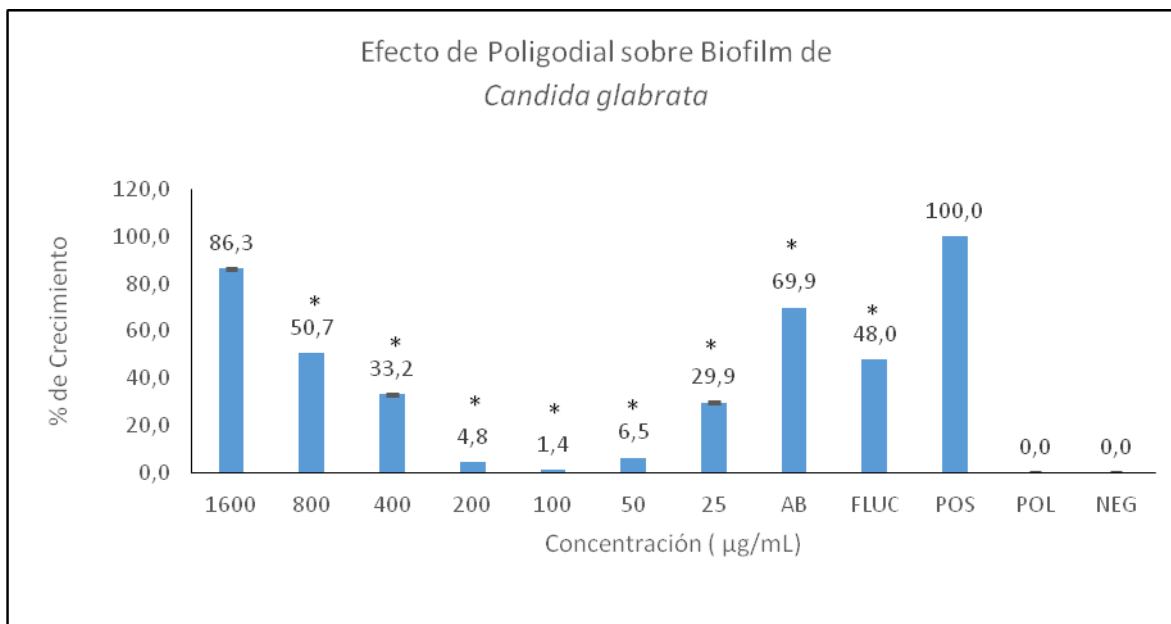
*C. parapsilosis* entre las concentraciones que van desde 25 µg/mL hasta 200 µg/mL. En ellas se obtuvo inhibición de la biopelícula de hasta un 64 % (porcentaje de crecimiento de 36 % a una concentración de 100 µg/mL) en relación al valor 100% del control de crecimiento. Podemos observar además que la MIC<sub>50</sub> se presenta a concentraciones menores a 25 µg/mL. Por otra parte los datos muestran que una vez aumentada la concentración del metabolito por sobre los 200 µg/mL comienza un proceso de inhibición de la acción de éste, provocando que la biopelícula, en el caso de la concentración mayor de 1600 µg/mL, sufra inhibición en sólo un porcentaje igual al 21% (porcentaje de crecimiento igual a un 79%). Junto con ello los datos obtenidos una vez más nos muestra que al igual que lo descrito frente a *C. albicans*, que los antifúngicos de uso común presentan actividad mucho menor a la observada cuando la biopelícula de *C. parapsilosis* es tratado con poligodial. Con la concentración de 1600 µg/mL el porcentaje de inhibición en el caso de anfotericina B es igual a un 19,7 % (porcentaje de crecimiento 80, 3% ) y en el caso de fluconazol a la misma concentración de 1600 µg/mL la inhibición de la biopelícula alcanza sólo a un 21, 7% (porcentaje de crecimiento igual a 79,3 %) todo ello en contraposición el porcentaje de inhibición de un 64% (porcentaje de crecimiento de 36%) que se puede obtener frente a la concentración de 100 µg/mL de poligodial. Por lo tanto se presenta mayor actividad a menor concentración.



**Figura 9.** Efecto de poligodial sobre biopelículas de *C. parapsilosis*. N de Experimentos = 3. Réplicas por experimento = 8. \*=p<0,05

### 4.1.3 *Candida glabrata*

La Figura 10 muestra el efecto que presenta poligodial sobre la biopelícula de *C. glabrata*. En ella podemos observar que nuevamente la mayor actividad del metabolito se encuentra entre las concentraciones menores a 400 µg/mL. Por los valores obtenidos podemos inferir que la MIC<sub>50</sub> es probable que se presente bajo los 25 µg/mL ya que a esta concentración el porcentaje de inhibición es de un 70, 1% (porcentaje de crecimiento igual a 29,9%). Por otro lado, a medida que vamos aumentando la concentración del metabolito, también se presenta un aumento de la actividad de éste, encontrándose la MIC<sub>80</sub> entre las concentraciones de 25 µg/mL y 50 µg/mL, para finalmente llegar a obtener a la concentración de 100 µg/mL la mayor actividad de poligodial, generando la destrucción de la biopelícula en prácticamente un 98,6% (porcentaje de crecimiento 1,4%) con respecto al control de crecimiento. Además de ello, es posible observar que, al igual que lo obtenido en las anteriores especies de *Candida* a medida que seguimos aumentado las concentraciones de poligodial se produce una reducción del efecto del metabolito, generando inhibición de la biopelícula con valores que llegan sólo a 49,3 % a 800 µg/mL (porcentaje de crecimiento igual a 50,7%) y de un 13, 7 % a la concentración de 1600 µg/mL (porcentaje de crecimiento igual 86,3 %) respecto del 100 % del control de crecimiento. Junto con lo anteriormente descrito, también es importante hacer notar la significativa diferencia presente entre la actividad de poligodial sobre biopelícula de *C. glabrata* a diferencia de los resultados mostrados por los antifúngicos de uso común. En el caso de anfotericina B vemos que a la concentración de 1600 µg/mL el porcentaje de inhibición de la biopelícula es de un 30,1% (porcentaje de crecimiento igual a 69,1%), mientras que en el caso de fluconazol a la misma concentración el porcentaje de inhibición es de un 52% (porcentaje de crecimiento igual a 48%), lo cual se contrapone con la actividad mostrada por poligodial el cual como se expuso anteriormente a mucho menor concentración presenta una actividad mucho mayor, con una inhibición de un 98,6% de la biopelícula a la concentración de 100 µg/mL (porcentaje de crecimiento de 1,4%).



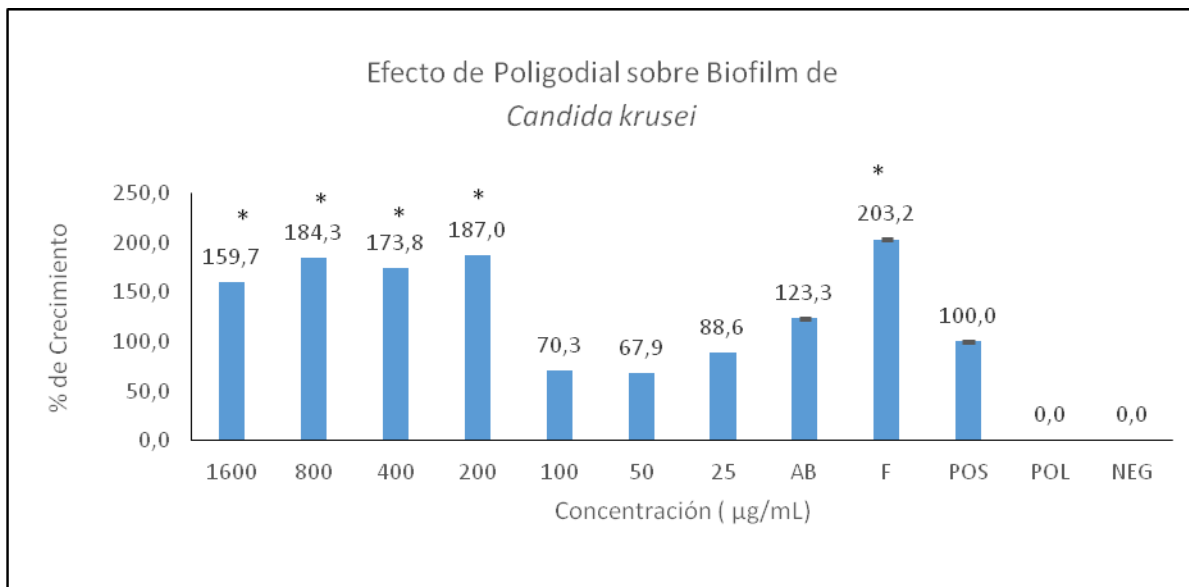
**Figura 10.** Efecto de poligodial sobre biopelícula de *C. glabrata*. N de Experimentos = 3. Réplicas por experimento = 8. \*=p<0,05

#### 4.1.4 *Candida krusei*

Una vez que la biopelícula de *C. krusei* fue tratado con poligodial se obtuvieron los resultados que se presentan en la Figura 11, en ella podemos observar que en relación a lo obtenido en las demás especies de *Candida* aquí existen algunas variaciones ya que si bien la mayor actividad sobre la biopelícula formada se encuentra entre las concentraciones de 25 µg/mL y 100 µg/mL, prácticamente la acción es casi nula ya que no fue posible generar un 50 % de inhibición de la biopelícula a partir de las distintas concentraciones utilizadas como tratamiento. La mayor sensibilidad se presenta a los 50 µg/mL donde la biopelícula es inhibida en un 32,1 % (porcentaje de crecimiento igual a 67,9%). Por otro lado podemos ver que si bien hay diferencias estadísticamente significativas en relación al 100 % de crecimiento con las concentraciones entre los 200 µg/mL y 1600 µg/mL, estas más que generar inhibición sobre la biopelícula presentan un efecto estimulador del crecimiento llegando casi incluso a duplicar el valor del control positivo (porcentaje de crecimiento igual a un 187% a la concentración de 200 µg/mL). Este fenómeno se repite además con los controles de antifúngicos de uso común ya que al someter a tratamiento la biopelícula de *C. krusei* con fluconazol se observa un porcentaje de crecimiento igual a 203,2% a la concentración de 1600 µg/mL y al realizar el procedimiento con anfotericina B el porcentaje de crecimiento es igual a un 123,3 % a la misma concentración de 1600

## CAPITULO 4.0: RESULTADOS

$\mu\text{g/mL}$ , aun así es posible mostrar una diferencia de actividad si estos resultados los contraponemos a la concentración de mayor actividad de poligodial que vendría siendo los 50  $\mu\text{g/mL}$ .



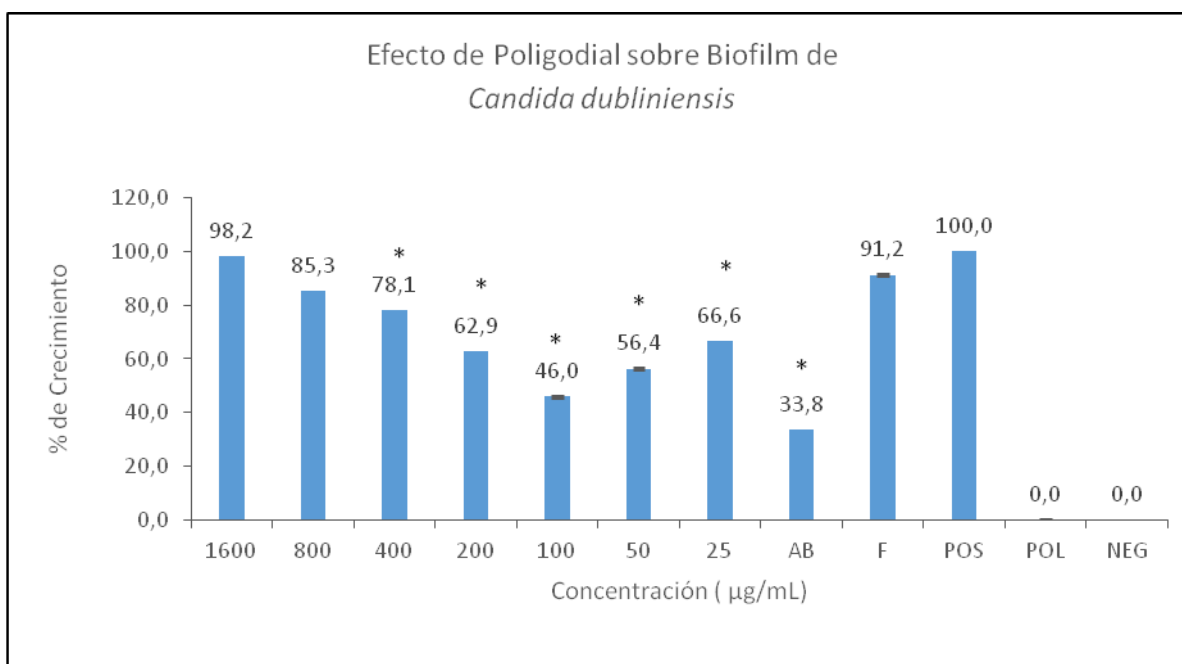
**Figura 11.** Efecto de poligodial sobre biopelícula de *C. krusei*. N de Experimentos = 3. Réplicas por experimento = 8. \*= $p < 0,05$

### 4.1.5 *Candida dubliniensis*

Los resultados que se muestran en la Figura 12 nos expresan el efecto que genera poligodial sobre la biopelícula de *C. dubliniensis*, en ella es posible observar que ya entre las concentraciones de 50  $\mu\text{g/mL}$  y 100  $\mu\text{g/mL}$  se logra generar la Inhibición del 50 % del crecimiento de la biopelícula ( $\text{MIC}_{50}$ ) y conjuntamente con ello a la misma concentración de 100  $\mu\text{g/mL}$  se presenta la mayor actividad de este. Sin embargo al igual que lo exhibido frente a la biopelícula de *C. krusei* a medida que seguimos aumentando las concentraciones de poligodial por sobre los 200  $\mu\text{g/mL}$  hasta los 1600  $\mu\text{g/mL}$ , se genera una reducción de la actividad del metabolito y podemos observar que a cada aumento de la concentración, la capacidad de inhibición disminuye, con el consiguiente aumento en el porcentaje de crecimiento de la biopelícula llegando a generar sólo una inhibición de un 1,8 % a la concentración de 1600  $\mu\text{g/mL}$  (porcentaje de crecimiento igual a 98,2%). Por otro lado al realizar una comparación con los antifúngicos de uso común observamos que en este caso tal como ya se ha planteado

## CAPITULO 4.0: RESULTADOS

antes, fluconazol presenta una muy baja actividad a la concentración de 1600  $\mu\text{g/mL}$  generando una inhibición sólo de un 8,8 % (porcentaje de crecimiento igual a 91,2%) lo que se contrapone con la actividad presentada por poligodial a mucho menos concentración como ya fue expuesto anteriormente. Por su parte en el caso de anfotericina B, este antifúngico presenta una actividad mucho mayor que la observada por poligodial ya que a la concentración de 1600  $\mu\text{g/mL}$  genera una inhibición de un 66,2% (porcentaje de crecimiento igual a 33,8%), diferencia significativa frente a la acción de poligodial cuando presenta su mejor actividad a la concentración de 100  $\mu\text{g/mL}$  y mucho mayor aún si usamos poligodial a la concentración de 1600  $\mu\text{g/mL}$ .



**Figura 12.** Efecto de poligodial sobre biopelícula de *C. dubliniensis* N de Experimentos = 3. Réplicas por experimento = 8.  $*=p<0,05$

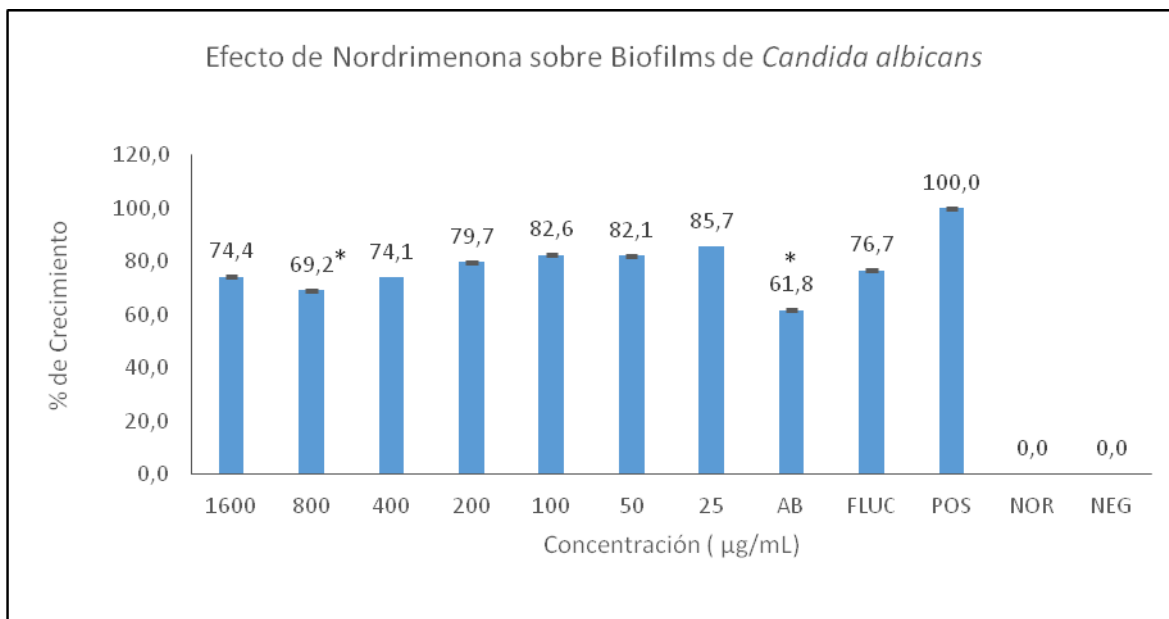
## **4.2 EFECTO DE NORDRIMENONA SOBRE BIOPELÍCULA DE DISTINTAS ESPECIES DEL GÉNERO *Candida*.**

Los resultados obtenidos por nordrimenona u 11-nordrimenona frente a diferentes especies del género *Candida* son los siguientes:

### **4.2.1 *Candida albicans***

Como podemos observar en la Figura 13 la biopelícula de la especie de *Candida* con mayor presencia en infecciones intrahospitalarias, presenta una leve susceptibilidad a nordrimenona, ya que el mayor porcentaje de inhibición fue de un 30,8 % a la concentración de 800 µg/mL (porcentaje de crecimiento de la biopelícula de un 69,2%), esto determina que no se pudiera obtener una MIC<sub>50</sub> dentro del rango de concentraciones estudiado, aun siendo este valor significativamente estadístico en relación al 100 % del control de crecimiento. Por otro lado, frente a las demás concentraciones de nordrimenona utilizadas, la biopelícula de *C. albicans* sufre una inhibición que van desde un porcentaje de 25,9% a la concentración de 400 µg/mL (porcentajes de crecimiento entre un 74,1 %) a la de 14,3 % a una concentración de 25 µg/mL (porcentaje de crecimiento igual a 85,7%).

Al realizar la comparación correspondiente de la actividad de nordrimenona frente a la biopelícula de *C. albicans* con la acción que presentan los antifungicos de uso común anfotericina B y fluconazol sobre la misma, nos damos cuenta que no existe una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) ya que el porcentaje de inhibición generado por estos antifungicos es prácticamente el mismo que nordrimenona a la mayor concentración estudiada (1600 µg/mL) e incluso a la concentración de mayor actividad de nuestro compuesto (800 µg/mL) entre un 30% y un 35%



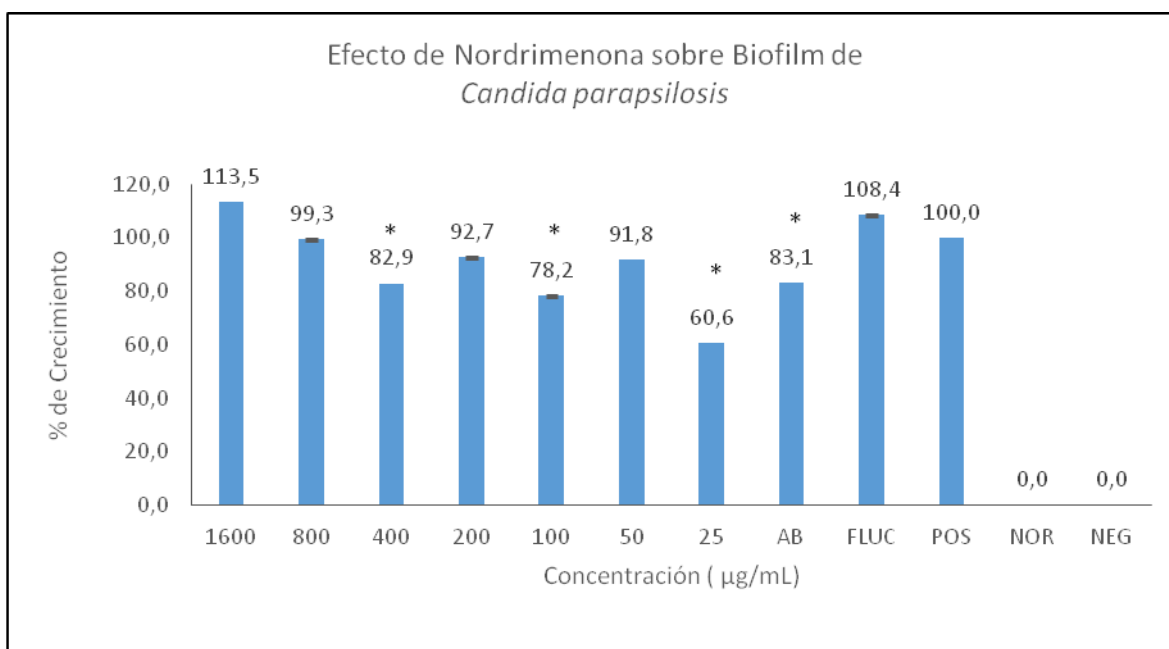
**Figura 13.** Efecto de nordrimenona sobre biopelícula *C. albicans* N de Experimentos = 2. Réplicas por experimento = 8. \*= $p < 0,05$

#### 4.2.2 *Candida parapsilosis*

La Figura 14 nos muestra que al someter la biopelícula de *C. parapsilosis* al tratamiento con nordrimenona se observa una gran resistencia esto debido a que la mayor sensibilidad se presenta a la concentración de 25 µg/mL en la cual se genera una inhibición del desarrollo microbiano de un 39,4% (porcentaje de crecimiento igual a 60,6%), lo cual nuevamente determina que a pesar de ser una diferencia estadísticamente significativa respecto de 100% de crecimiento del control no es posible determinar una MIC<sub>50</sub> con el rango de concentraciones utilizadas en este estudio. Por otro lado el resto de las concentraciones de nordrimenona estudiadas presentaron una actividad mucho menor con porcentajes de inhibición que fueron desde un 17,1% a la concentración de 400 µg/mL (porcentaje de crecimiento igual a 82,9%) hasta incluso no generar inhibición y permitir el crecimiento de la biopelícula hasta un 113,5 % a la concentración del compuesto de 1600 µg/mL. Al comparar el efecto de nordrimenona sobre la biopelícula de *C. parapsilosis* respecto de la acción de los antifúngicos de uso común, vemos que en el caso de anfotericina B la actividad que este presenta a la concentración de 1600 µg/mL es un poco mayor a la presentada por nordrimenona, a la misma concentración produciendo un porcentaje de inhibición de

## CAPITULO 4.0: RESULTADOS

16,9% (porcentaje de crecimiento igual a 83,1%), pero a la vez es posible observar que el efecto de anfotericina B es mucho menor si la comparamos con la concentración de mayor actividad de nordrimenona. Por su parte en el caso de fluconazol la actividad que este antifúngico presenta a la concentración de 1600 µg/mL es muy similar la mostrada por nuestro metabolito en estudio a la misma concentración, no produciendo inhibición de la biopelícula y generando un crecimiento que alcanza hasta un 108,4% respecto del 100% del control positivo. Sin embargo al igual que lo que ocurre con anfotericina B, es posible observar que la actividad mostrada por fluconazol a la concentración estudiada (1600 µg/mL), es significativamente menor a la presentada por nordrimenona a la concentración de mayor actividad (25 µg/mL).



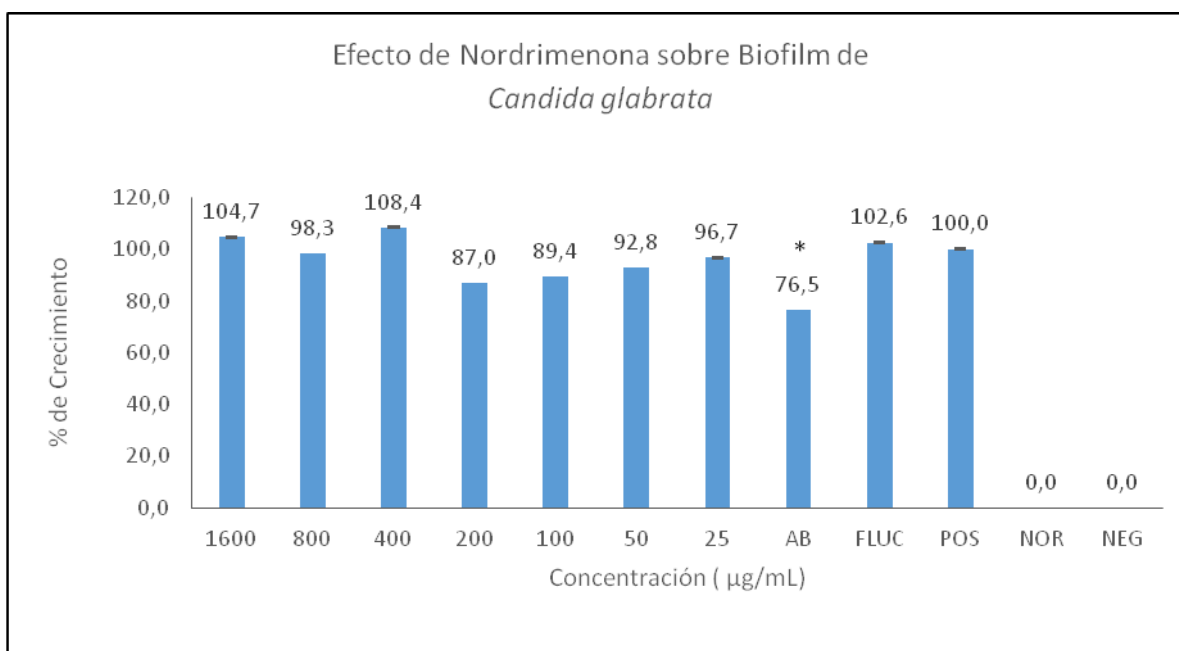
**Figura 14.** Efecto de nordrimenona sobre biopelícula de *C. parapsilosis*. N de Experimentos = 2. Réplicas por experimento = 8. \*=p<0,05

### 4.2.3 *Candida glabrata*

Al someter la biopelícula de *C. glabrata* al tratamiento con nordreminona podemos observar que al igual que la especie anterior, este microorganismo presenta resistencia a la acción de nordrimenona, esto debido a que según los datos entregados en la Figura 15 la mayor actividad de nuestro compuesto, a partir de las concentraciones estudiadas, se presenta a 200 µg/mL, la cual produce una inhibición de la biopelícula de un 13% (porcentaje de crecimiento igual a 87%), además producto

## CAPITULO 4.0: RESULTADOS

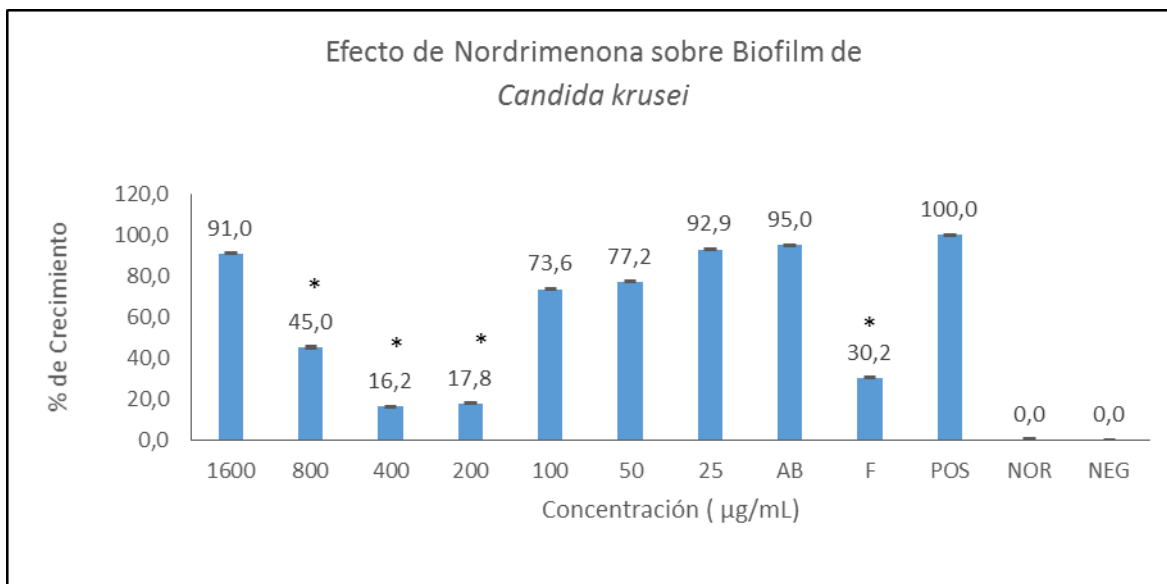
de ello se puede determinar que no fue posible obtener MIC<sub>50</sub> con este rango de concentraciones. El resto de las concentraciones en estudio permitió sólo inhibir la biopelícula en porcentajes que fueron desde un 10,6% (porcentaje de crecimiento igual a 89,4%) a la concentración de 100 µg/mL hasta no generar inhibición y permitir el crecimiento de la biopelícula hasta a un 108,4 % a la concentración de 400 µg/mL de nordrimenona. Por su parte al realizar una comparación con los antifúngicos de uso común vemos que anfotericina B presenta, a la concentración de 1600 µg/mL, una actividad significativamente mayor a la mostrada por nordrimenona a la misma concentración y respecto del 100% del control positivo, pero muy similar a la presentada por nuestro compuesto cuando este último tiene su mayor actividad. Por el contrario fluconazol presenta una actividad muy similar a nordrimenona a la concentración de 1600 µg/mL no generando inhibición y permite el crecimiento de la biopelícula hasta un 102,6% y a la vez no presenta una diferencia significativa respecto de la mayor actividad del compuesto en estudio.



**Figura 15.** Efecto de nordrimenona sobre biopelícula de *C. glabrata*. N de Experimentos = 2. Réplicas por experimento = 8. \*=p<0,05

#### 4.2.4 *Candida krusei*

Los resultados que se presentan en la Figura 16 nos muestran que al poner la biopelícula de *C. krusei* bajo tratamiento con nordrimenona se observa una gran sensibilidad. Es posible observar que se obtiene un porcentaje de inhibición de esta especie de un 50% (MIC<sub>50</sub>) entre las concentraciones de 100 µg/mL y 200 µg/mL, rango en el cual además, es posible obtener un porcentaje de inhibición de un 80% del desarrollo de la biopelícula (MIC<sub>80</sub>), diferencia que es estadísticamente significativa respecto del control positivo. Junto con ello podemos observar que la mayor actividad de este compuesto se presenta a la concentración de 400 µg/mL el cual genera un porcentaje de inhibición de la biopelícula de un 83,8% (porcentaje de crecimiento igual a 16,2%). Sin embargo podemos darnos cuenta también, que al seguir aumentando las concentraciones de nordrimenona se produce disminución de la actividad de este compuesto y ya a 800 µg/mL se genera inhibición de la biopelícula sólo en un 55% (porcentaje de crecimiento igual a un 45%), diferencia que aún sigue siendo estadísticamente significativa respecto del 100% del Control positivo. Sin embargo a la concentración de 1600 µg/mL, la actividad de este compuesto disminuye aún más notoriamente generando inhibición solamente en un 9% (porcentaje de crecimiento igual a 91%) con lo cual ya no se aprecia diferencia significativa respecto del control. Por otra parte al comparar con el efecto presentado por los antifúngicos de uso común vemos que la actividad que muestra anfotericina B a la concentración de 1600 µg/mL es similar a la presentada por nordrimenona a la misma concentración generando una inhibición sólo de un 5% (porcentaje de crecimiento igual a un 95%) pero claramente es significativamente menor a la mostrada por el compuesto en estudio a la concentración de mayor actividad (400 µg/mL) incluso a la concentración que le sigue en actividad (200 µg/mL). Por su parte es posible observar que fluconazol presenta una elevada actividad a la concentración de 1600 µg/mL respecto de nordrimenona a la misma concentración generando una inhibición de un 69,8% (porcentaje de crecimiento igual a 30,2%), pero sigue siendo significativamente menor a la presentada por nuestro compuesto cuando este último tiene su mayor actividad (400 µg/mL).



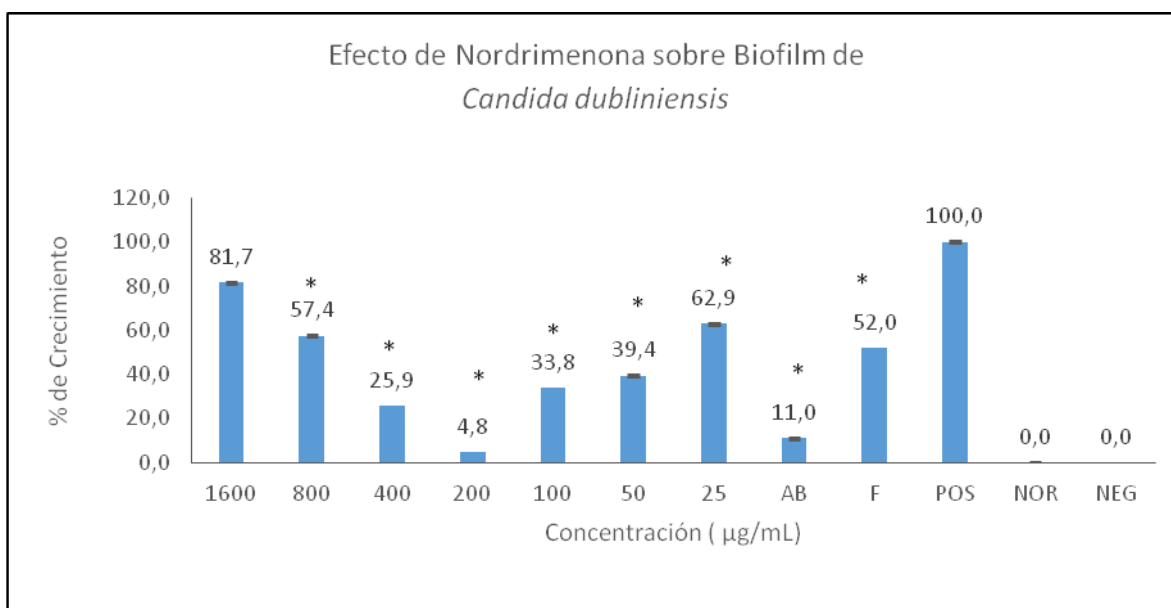
**Figura 16.** Efecto de nordrimenona sobre biopelícula de *C. krusei*. N de Experimentos = 2. Réplicas por experimento = 8. \*=p<0,05

#### 4.2.5 *Candida dubliniensis*

Finalmente, como se muestra en la Figura 17, nordrimenona presenta una elevada actividad sobre la biopelícula de *C. dubliniensis*. Aquí es posible observar que el compuesto genera inhibición de un 50 % del crecimiento microbiano y conjuntamente con ello se obtiene la MIC<sub>50</sub> ya entre las concentraciones que van desde 25 µg/mL hasta los 50 µg/mL presentando en este último caso un porcentaje de inhibición de un 60,6% (porcentaje de crecimiento igual a 39,4%). Por su parte a medida que seguimos aumentando la concentración de nordrimenona cada vez la actividad va siendo mayor logrando entre las concentraciones de 100 µg/mL y 200 µg/mL inhibir la biopelícula en un 80% (MIC<sub>80</sub>), presentando además en este último caso la concentración de mayor actividad con un porcentaje de inhibición igual a 95,2% (porcentaje de crecimiento igual a 4,8%) a 200 µg/mL diferencia que en todos estos casos es estadísticamente significativa respecto del control positivo. Sin embargo si continuamos con el aumento de las concentraciones, podemos observar, que nuevamente se presenta una reducción de la acción del compuesto generando ya a la concentración de 400 µg/mL una inhibición de 74,1% (porcentaje de crecimiento igual a 25,9%) para finalmente a 1600 µg/mL presentar una inhibición sólo de un 18,3% (porcentaje de crecimiento igual a 81,7%). Al comparar estos resultados con la actividad mostrada por los antifúngicos de uso común podemos ver que tanto anfotericina B como fluconazol presentan una elevada actividad sobre la biopelícula de

## CAPITULO 4.0: RESULTADOS

*C. dubliniensis* a la concentración de 1600  $\mu\text{g/mL}$  generando en el primero de los casos una inhibición de un 89% (porcentaje de crecimiento igual a 11%) y en el segundo una inhibición de un 48% (porcentaje de crecimiento igual a 52%) valores que son estadísticamente significativos en relación a lo mostrado por nordrimenona a la misma concentración. Sin embargo como ya fue descrito previamente la actividad de nuestro compuesto a la concentración de 200  $\mu\text{g/mL}$  es significativamente mucho mayor a la presentada por los dos antifúngicos disponibles comercialmente. Por lo tanto podemos ver mayor actividad con menor concentración de compuesto.



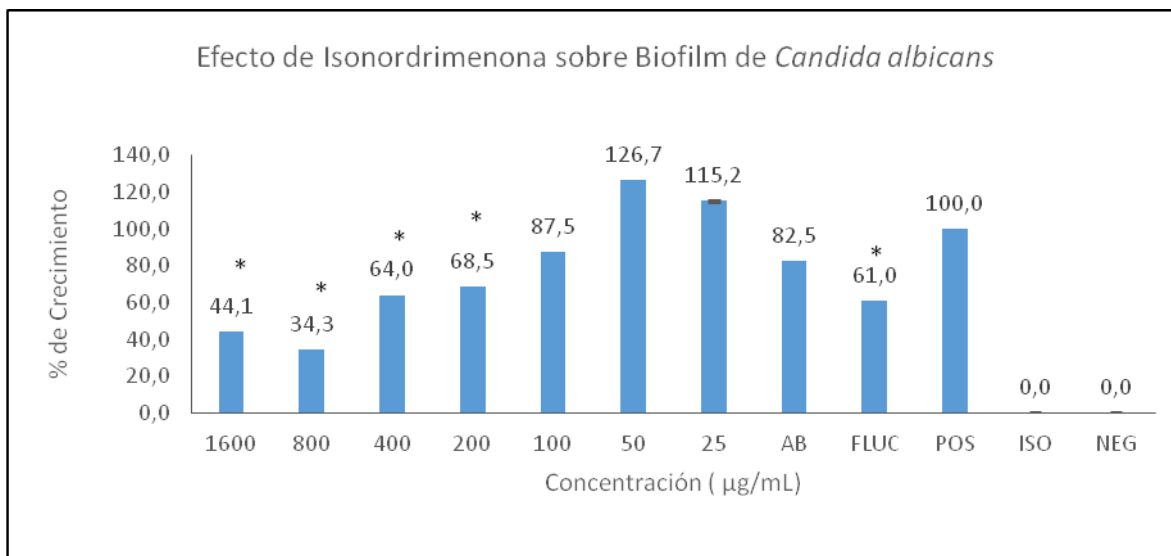
**Figura 17.** Efecto de nordrimenona sobre biopelícula de *C. dubliniensis*. N de Experimentos = 2. Réplicas por experimento = 8. \*= $P < 0,05$

### **4.3 EFECTO DE ISONORDRIMENONA SOBRE BIOFILM DE DISTINTAS ESPECIES DE *CANDIDA*.**

Los efectos que presenta isornodreminona sobre biopelícula de diferentes especies del género *Candida* se detallan a continuación.

#### **4.3.1 *Candida albicans***

La Figura 18 nos muestra que isonordrimenona presenta una actividad moderada sobre la biopelícula de *C. albicans*. Es posible observar en ella que a concentraciones muy bajas entre 25 µg/mL y 50 µg/mL. El compuesto no genera inhibición del microorganismo y permite el desarrollo de la biopelícula incluso por sobre el 100 % del crecimiento del control positivo. En el primero de los casos la levadura se desarrolla hasta un 115,2%, mientras que a la concentración siguiente el crecimiento de la biopelícula alcanza hasta un 126,7 %, sin embargo a partir de ahí en adelante a medida que continuamos aumentando la concentración de isonordrimenona, ésta empieza a generar inhibición del desarrollo de la biopelícula mostrando a la concentración de 100 µg/mL un porcentaje de inhibición de un 12,5% ( porcentaje de crecimiento igual a 87,5%) hasta llegar entre las concentraciones de 400 µg/mL a 800 µg/mL a obtenerse la MIC<sub>50</sub> y conjuntamente con ello presentar la mayor actividad del compuesto generando inhibición de un 65,7% a la concentración de 800 µg/mL (porcentaje de crecimiento igual a 34,3%), valores que son estadísticamente significativos respecto del control positivo ( $p < 0,005$ ). Por su parte a la concentración de 1600 µg/mL se mantiene un efecto de inhibición aunque algo menor al observado a 800 µg/mL, generando inhibición en 55,9% de la biopelícula (porcentaje de crecimiento igual a 44,1%). Al contraponer con los antifúngicos de uso común vemos que la actividad de isonordreminona tanto a 1600 µg/mL como a 800 µg/mL (concentración de mayor actividad) es significativamente superior a la presentada por anfotericina B a 1600 µg/mL, la cual genera un inhibición sólo de un 17,5% (porcentaje de crecimiento igual a 82,5%) así como por fluconazol quien a la misma concentración de 1600 µg/mL muestra una inhibición de la biopelícula de un 39% (porcentaje de crecimiento igual a 61%).



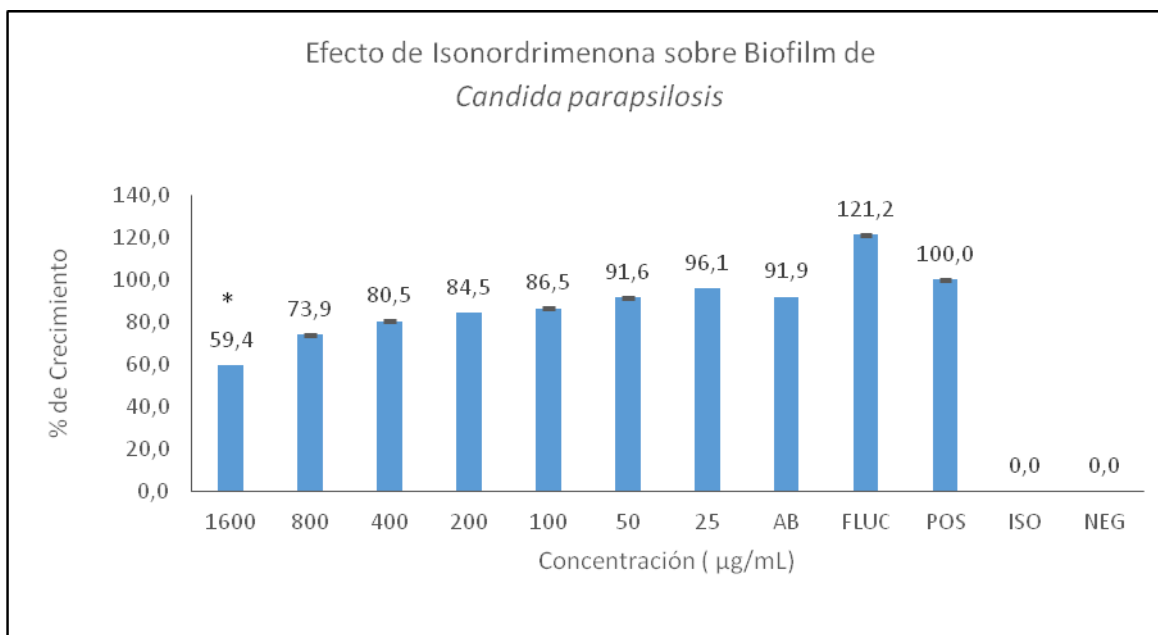
**Figura 18.** Efecto de isonordrimenona sobre biopelícula de *C. albicans*. N de Experimentos = 2. Réplicas por experimento = 8. \*=p<0,05

#### 4.3.2 *Candida parapsilosis*

En el caso de la biopelícula de *C. parapsilosis*, tal y como se muestra en la Figura 19, este presenta una sensibilidad reducida a la acción de isonordrimenona, determinándose de esta forma una baja actividad por parte del compuesto. Cuando se observan las concentraciones bajas, entre 25 µg/mL y 50 µg/mL, la inhibición es de un 3,9% (porcentaje de crecimiento igual a 96,1%) en el primero de los casos y de un 8,4% (porcentaje de crecimiento igual a 91,6%) en el segundo de ellos. A partir de ahí y a medida que vamos aumentando la concentración del compuesto desde los 100 µg/mL en adelante cada vez la actividad del compuesto es mayor llegando a la concentración de 1600 µg/mL a generar una inhibición de la biopelícula de un 40,6% (porcentaje de crecimiento igual a 59,4%), valor que a pesar de ser estadísticamente significativo con respecto al control positivo no permite dar a conocer la MIC<sub>50</sub> dentro del rango de concentraciones utilizadas en este estudio. Por otro lado si comparamos con los antifúngicos de uso común, la actividad que presenta isonordrimenona a la concentración de 1600 µg/mL es significativamente mayor a la mostrada tanto por anfotericina B quien a la misma concentración genera una inhibición de la biopelícula de sólo un 8,1% (porcentaje de crecimiento igual a 91,9%), así como a la de

## CAPITULO 4.0: RESULTADOS

fluconazol quién a la concentración de 1600  $\mu\text{g/mL}$  no presenta inhibición de la biopelícula de *C. parapsilosis* y por el contrario permite el crecimiento de la levadura hasta un 121,2%.



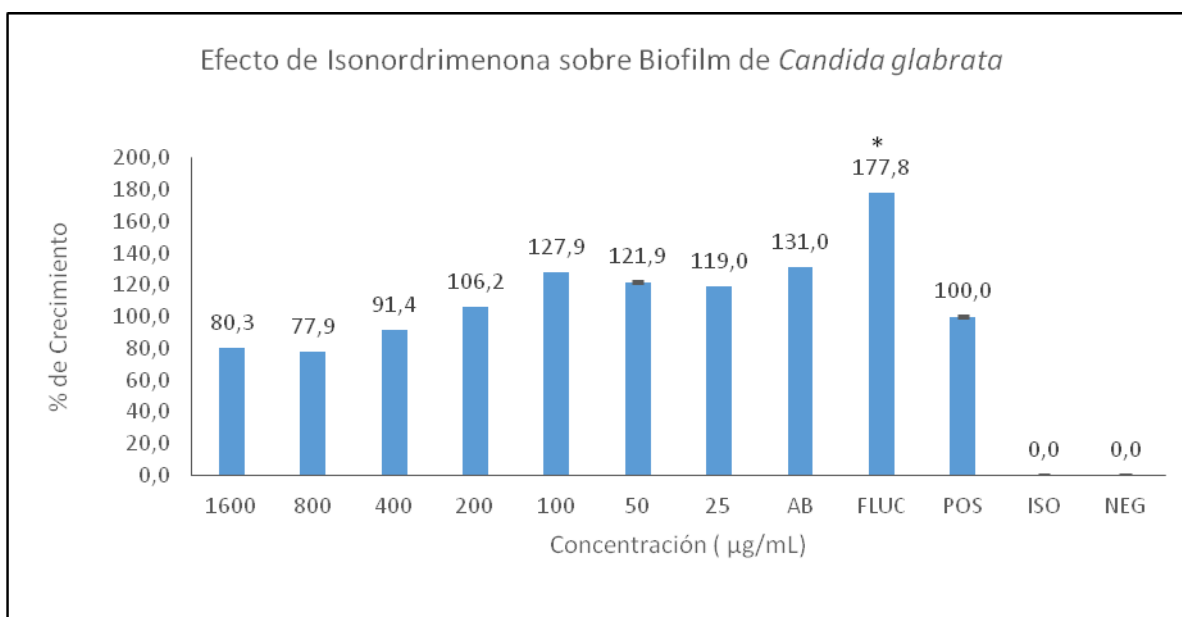
**Figura 19.** Efecto de isonordrimenona sobre biopelícula de *C. parapsilosis*. N de Experimentos = 2. Réplicas por experimento = 8.  $*=P<0,05$

### 4.3.3 *Candida glabrata*

Finalmente en el caso de la biopelícula de *C. glabrata* este presenta una elevada resistencia a la acción de isonordrimenona, como se puede apreciar en la Figura 20. Entre las concentraciones que van desde los 25  $\mu\text{g/mL}$  hasta los 200  $\mu\text{g/mL}$  no se observa actividad por parte del compuesto presentándose crecimiento de la biopelícula incluso hasta 127,9% respecto del control positivo en el caso de la concentración de 100  $\mu\text{g/mL}$ . Una vez aumentamos la concentraciones por sobre los 400  $\mu\text{g/mL}$ , isonordrimenona comienza a mostrar cierto grado de actividad generando inhibición del desarrollo de la biopelícula hasta un 22,1% a la concentración de 800  $\mu\text{g/mL}$  (porcentaje de crecimiento igual a 77,9%), presentado aquí isonordrimenona su mayor acción. Sin embargo a la concentración mayor utilizada, 1600  $\mu\text{g/mL}$ , sólo se obtiene un porcentaje de inhibición igual a un 16,9% (porcentaje de crecimiento igual a un

## CAPITULO 4.0: RESULTADOS

83,1%). Es por ello que al igual que en el caso de *C. parapsilosis* en este caso no es posible obtener una MIC<sub>50</sub> con las concentraciones utilizadas. Por otro lado es importante destacar una vez más que a pesar de presentar una actividad relativamente baja sobre la biopelícula de *C. glabrata*, el efecto que muestra isonordrimenona es mucho mayor a los presentados por los antifúngicos de uso común donde tanto anfotericina B como fluconazol no presentan actividad sobre este microorganismo a la concentración de 1600 µg/mL permitiendo el crecimiento de la biopelícula de hasta un 131% en el primero de los casos y de un 177% en el segundo de ellos.



**Figura 20.** Efecto de isonordrimenona sobre biopelícula de *C. glabrata*. N de Experimentos = 2. Réplicas por experimento = 8. \*=P<0,05



### 5.0 DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados obtenidos y si analizamos cada uno de los compuestos utilizados podemos observar lo siguiente:

#### 5.1 POLIGODIAL

Al analizar el efecto de poligodial sobre la biopelícula de las distintas especies del género *Candida*, podemos ver que al exponer estas especies al metabolito existe una clara inhibición del desarrollo de la levadura. En *C. albicans*, ya en estado plactónico, poligodial presenta una elevada actividad generando inhibición completa a una concentración de 16 µg/mL lo que claramente se correlaciona con lo expuesto por otros autores previamente (Derita, M. G. *et al.* , 2009; Lee, S. H. *et al.* , 1999).

A partir de lo descrito anteriormente, y en conjunto con los resultados obtenidos nos damos cuenta que la actividad de poligodial sobre la biopelícula de *C. albicans* es relativamente alta, con una concentración incluso menor a 25 µg/mL, cuantificado con tinción de cristal violeta, se obtiene una inhibición del crecimiento microbiano en un 50% (MIC<sub>50</sub>), y con concentraciones que van entre 50 µg/mL y 100 µg/mL es posible generar inhibición de un 80 % de la biopelícula (MIC<sub>80</sub>). Sin embargo, a medida que vamos aumentando las concentraciones del compuesto, sólo es posible generar una inhibición de la biopelícula hasta de un 85%, ocurriendo esto a una concentración del metabolito de 100 µg/mL. Esta gran actividad por parte de poligodial pudiera deberse a los sitios de unión en los cuales actúa. Se ha descrito previamente que este compuesto realiza su acción sobre las membranas plasmáticas actuando principalmente como surfactante en la interfase proteína-lípido y en las proteínas integrales, generando desnaturalación de éstas (Kubo, I. *et al.* , 2001). Por otra parte, se ha visto que poligodial presenta efecto sobre la bomba ATPasa mitocondrial disminuyendo la producción de ATP, generando un aumento de la permeabilidad de membrana, un aumento del consumo de ATP y una disminución del pH interno mitocondrial (Lunde, C. S. y Kubo, I., 2000) y junto con ello la inhibición de la cadena transportadora de electrones desde el succinato al oxígeno (Castelli, M. V. *et al.* , 2005) todo lo anterior, con la consiguiente destrucción del microorganismo.

Por su parte, frente a la biopelícula de *C. parapsilosis*, poligodial exhibe nuevamente una actividad elevada generando inhibición del 50% del desarrollo de la levadura a concentraciones menores a los 25 µg/mL (MIC<sub>50</sub>). Resultados previos

## CAPITULO 5: DISCUSIÓN

publicados por otros autores, sobre el efecto del compuesto en el estado planctónico de la levadura, reafirman esta gran actividad de poligodial. En ellos se establece que la MIC<sub>80</sub> correspondería a 0,0312 µg/mL (Montenegro Venegas, I. J., 2013).

Por otro lado, en ambos casos toma realce la significativa actividad que presenta poligodial en relación a fluconazol, donde ya previamente se ha descrito resistencia a este compuesto por parte de *C. albicans* y *C. parapsilosis* por mecanismos asociados a modificación de los blancos, además de la generación de bombas de eflujo (Cuellar-Cruz, M. *et al.*, 2012; Mukherjee, P. K. y Chandra, J., 2004; Tobudic, S. *et al.*, 2012).

Frente a la biopelícula de *C. glabrata*, poligodial presenta un mayor efecto. Previo a la mínima concentración utilizada en el estudio, ya se genera inhibición del 50% de crecimiento (MIC<sub>50</sub>) y entre las concentraciones de 25 µg/mL y 50 µg/mL esta inhibición llega hasta un 80% (MIC<sub>80</sub>), para finalmente con 100 µg/mL prácticamente inhibir la totalidad del desarrollo microbiano, presentando una destrucción de un 98,6% de la biopelícula. Este dato es de suma relevancia ya que se ha visto un gran aumento de infecciones por *C. glabrata* asociado a la resistencia que esta especie presenta principalmente a fluconazol (Colombo, A. L. *et al.*, 2013; Denardi, L. B. *et al.*, 2015; Onyewu, C. *et al.*, 2003). En nuestro caso fluconazol sólo generó inhibición de la biopelícula en un 54% a una concentración de 1600 µg/mL, por lo cual poligodial demostró tener mayor actividad con mucho menos concentración del compuesto.

En el caso de la acción de poligodial sobre la biopelícula de *C. krusei* se observa una actividad relativamente baja por parte del compuesto, ya que sólo es capaz de generar una inhibición del desarrollo microbiano hasta un 32,1% sin llegar a presentar, por tanto, una disminución del crecimiento de un 50% (MIC<sub>50</sub>) con las concentraciones utilizadas en este estudio. Esto contrasta en cierta forma con resultados obtenidos por otros autores en los cuales la actividad de poligodial es mucho mayor generando una inhibición completa con una concentración de 6,25 µg/mL (Lee, S. H. *et al.*, 1999), sin embargo como hemos planteado antes, en el estudio desarrollado por Lee *et al.*, se analizó el crecimiento de la levadura en estado planctónico y no sésil, como es el caso de la biopelícula, lo que hace que la levadura sea más sensible y esté más expuesta a la acción del metabolito. Desde este punto de vista lo interesante en este caso es que se presenta de todas formas cierta susceptibilidad por parte del microorganismo a poligodial. Esto último toma mucha relevancia tomando en cuenta la elevada resistencia que exhibe la biopelícula de *C. krusei* a los antifúngicos de uso común como son anfotericina B y fluconazol, efecto que incluso se muestran en nuestros datos donde estos compuestos no presentaron actividad a la mayor concentración utilizada en el estudio (1600 µg/mL) permitiendo que la levadura creciera hasta en un 123,3%

## CAPITULO 5: DISCUSIÓN

en el primero de los casos y de un 203,2% en el segundo respecto de del control positivo.

Finalmente en el caso de la biopelícula de *C. dubliniensis*, poligodial nuevamente presenta una actividad leve a moderada generando inhibición del desarrollo fúngico de hasta un 50% (MIC<sub>50</sub>) entre las concentraciones de 50 µg/mL y 100 µg/mL. Estos datos se añaden a los obtenidos en otros estudios que indican que la acción de poligodial sobre esta especie de levadura en estado planctónico, es muy elevada necesitando sólo 0,032 µg/mL para generar inhibición total del crecimiento (Montenegro Venegas, I. J., 2013).

De esta forma es posible determinar con certeza que poligodial es un potente antifúngico frente a distintas especies del Género *Candida* tanto *albicans* como no *albicans*. Junto con ello hemos podido determinar que en todos los casos la actividad que poligodial presenta es siempre mayor a lo mostrado por los antifúngicos de uso común a nivel intrahospitalario y que fueron utilizados en este estudio como son anfotericina B y fluconazol.

Finalmente es importante hacer notar que a medida que aumentamos la concentración de poligodial por sobre los 200 µg/mL se produce una reducción del efecto inhibitorio que este compuesto genera en las biopelículas de todas las especies de *Candida* utilizadas en este estudio. Probablemente lo que esté ocurriendo es una inhibición por saturación del metabolito impidiendo que poligodial atraviese libremente por el Biofilm. Esto se condice por lo expresado previamente por otros autores quienes observaron que en el caso de fluconazol entre las concentraciones de 256 µg/mL y 1024 µg/mL, solamente 56 µg/mL ingresan al interior de la biopelícula (Chandra, J. *et al.*, 2003)

### 5.2 NORDRIMENONA

Trabajos asociados a nordrimenona y su acción como antifúngico existen muy pocos sólo los desarrollados por el Dr. Ivan Montenegro en su tesis doctoral. En ella se especifica el efecto de este compuesto sobre el estado planctónico de levaduras del género *Candida*. En la publicación se deja de manifiesto que nordrimenona presenta elevada actividad sobre *C. albicans* (2 µg/mL), *C. glabrata* (8 µg/mL), *C. dubliniensis* (0,0312 µg/mL) y baja actividad frente a *C. parapsilosis* (>16 µg/mL) y sin datos sobre su efecto en *C. krusei* (Montenegro Venegas, I. J., 2013). Tomando en cuenta estos datos y los obtenidos por nosotros, podemos observar que al enfrentar este compuesto a la biopelícula de *C. albicans* la actividad que se presenta es bajísima prácticamente a todas las concentraciones no sobrepasa un 25% de inhibición de la

## CAPITULO 5: DISCUSIÓN

biopelícula fúngica. El mayor efecto se logra a una concentración de 800 µg/mL con una actividad que genera destrucción de un 30,8% de la biopelícula previamente formada. Es posible por tanto establecer una elevada resistencia por parte de la levadura contra nordrimenona en contraposición a lo determinado por Montenegro *et al.*, 2013 en el estado planctónico. Esta diferencia pudiera deberse principalmente al hecho intrínseco de generación de multirresistencia asociado a la formación de biopelículas fúngicas, principalmente en aquellas cepas que son provenientes de infecciones intrahospitalarias, las cuales estarían generando protección frente a la acción de los antifúngicos de uso clínico (Donlan, R. M. y Costerton, J. W., 2002).

Por otra parte, en cuanto a la acción de nordrimenona sobre la biopelícula de *C. parapsilosis* se observa una actividad antifúngica disminuida. Como se presentó en los resultados, la mayor actividad se logra a la concentración de 25 µg/mL, sin embargo a esta concentración el porcentaje de inhibición de la biopelícula no logra sobrepasar un 39,4%, por lo tanto es imposible determinar MIC<sub>50</sub> con las concentraciones del compuesto estudiadas. Importante es hacer notar el "efecto rebote" que se genera al enfrentar la biopelícula de *C. parapsilosis* a la acción de nordrimenona. A medida que vamos aumentando las concentraciones del compuesto, la actividad de este es cada vez menor, hasta lograr que a la concentración mayor utilizada (1600 µg/mL) no exista actividad o esta se vea inhibida permitiendo de esta forma que la biopelícula se siga desarrollando hasta alcanzar valores por sobre el 100% del control positivo de crecimiento. La posible causa del aumento de resistencia de la biopelícula de *C. parapsilosis* pudiera deberse al incremento de la capacidad de adhesión en medios con alto contenido de glucosa como es el caso del RPMI, característica propia de esta especie (Nosek, J. *et al.*, 2009).

Por su parte, si analizamos la acción de nordrimenona sobre la biopelícula de *C. glabrata* nuevamente se observa una actividad reducida por parte del compuesto, lo que claramente no se condice con lo expuesto por Montenegro, I. *et al.* (2013). En su trabajo el Dr. Montenegro establece que a una concentración de 8 µg/mL se genera la inhibición completa de la levadura en estado planctónico (MIC<sub>100</sub>). En contraposición a ello, nuestros resultados nos muestran que tomando en cuenta todas las concentraciones estudiadas el porcentaje de inhibición de la biopelícula no sobrepasa un 10%. Dentro de las razones probables de este resultado pudiera ser, la formación en multicapas sumado al elevado contenido de proteínas y carbohidratos que contiene esta especie en la matriz formando la biopelícula, en comparación con otras especies del género *Candida* (Silva, S. *et al.*, 2009).

Por otro lado cuando observamos la acción de nordrimenona sobre la biopelícula

## CAPITULO 5: DISCUSIÓN

de *C. krusei* nos danos cuenta de la elevada actividad que presenta este compuesto. Entre las concentraciones que van desde los 100 µg/mL hasta los 200 µg/mL se genera inhibición del 50% del crecimiento fúngico (MIC<sub>50</sub>), mientras que entre las concentraciones de 200 µg/mL y 400 µg/mL es posible obtener una inhibición del crecimiento de la biopelícula de hasta un 80% (MIC<sub>80</sub>). Estos datos revisten relevancia ya que prácticamente no existen resultados previos sobre el efecto de nordrimenona sobre la biopelícula y sobre el estado planctónico de *C. krusei*. Junto con ello, la presente investigación es un aporte al conocimiento sobre la biopelícula de esta especie, que hasta la fecha es precario. Al realizar la comparación de nuestro compuesto con los antifúngicos de uso común vemos que nordrimenona presenta una actividad mucho mayor a lo que se observa tanto con fluconazol como con anfotericina B. En el primero de los casos vemos que fluconazol, Al-Fattani y col. publicaron un efecto que generaba una sobrevida de un 47,8% (Al-Fattani, M. A. y Douglas, L. J., 2004) , porcentaje similar al obtenido por nosotros para el mismo antifúngico. Por otro lado nosotros obtuvimos un porcentaje de crecimiento frente a anfotericina B, a la concentración mayor de 1600 µg/mL, del 95,3% lo que se contradice con lo obtenido por otros autores previamente con un MIC<sub>100</sub> igual a 16,12 µg/mL (Brilhante, R. S. et al., 2015) y de 18 µg/mL (Del Pozo, J. et al., 2008) diferencias que pudieran estar dadas por la cepa fúngica utilizada por nosotros, las cuales fueron aislados clínicos y que por lo tanto estas presentan mayor resistencia.

Al observar el efecto de nordrimenona sobre la biopelícula de *C. dubliniensis*, vemos que este compuesto presenta una actividad muy elevada. Entre las concentraciones de 25 µg/mL y de 50 µg/mL es posible generar inhibición de un 50% del crecimiento microbiano (MIC<sub>50</sub>). Esta capacidad de eliminación de la biopelícula, a medida que aumentamos las concentraciones es cada vez mayor, hasta obtener entre las concentraciones 100 µg/mL y 200 µg/mL inhibición del crecimiento de la biopelícula fúngica por sobre un 80% (MIC<sub>80</sub>) presentándose además a 200 µg/mL la mayor actividad por parte de nordrimenona frente a la biopelícula de *C. dubliniensis*. De esta manera queda muy claro que a pesar que *C. dubliniensis* presenta características muy similares *C. albicans* en cuanto a la composición química de su membrana y masa de la biopelícula (Alnuaimi, A. D. et al. , 2013), la sensibilidad de cada una es distinta ya que como podemos ver frente a nordrimenona, la biopelícula de *C. albicans* es muy resistente, en cambio la biopelícula de *C. dubliniensis* es muy sensible. Toma mucha relevancia entonces, la significativa actividad que presenta nordrimenona sobre la biopelícula de *C. dubliniensis* respecto de los antifúngicos de uso común anfotericina B y fluconazol, en ellos se observa a la concentraciones de

1600 µg/mL sólo logran generar una inhibición de hasta un 89% en el primero de los casos y de un 48% en el segundo, valores muy por debajo de los porcentajes exhibidos por nortrimenona a mucho menor concentración (porcentaje de inhibición de 95,2% a 200 µg/mL).

### 5.3 ISONORDRIMENONA

Trabajos sobre este metabolito no existen previamente, sólo los realizados por Montenegro *et al.* el año 2013 sobre cepas de *Candida sp.* en estado planctónico. En cuanto a los resultados obtenidos por este compuesto, podemos establecer lo siguiente:

Al observar el efecto de isonordrimenona sobre la biopelícula de *C. albicans*, el compuesto presenta una mediana actividad generando inhibición de un 50% del crecimiento microbiano (MIC<sub>50</sub>) entre las concentraciones de 400 µg/mL y 800 µg/mL, fenómeno que se suma a la elevada actividad que presenta sobre el microorganismo en estado planctónico, con un MIC<sub>80</sub> de 2 µg/mL (Montenegro Venegas, I. J., 2013). Esto nuevamente destaca por sobre los antifúngicos de uso común anfotericina B y fluconazol quienes mostraron una actividad prácticamente nula. En el caso de anfotericina B se ha reportado una concentración mínima de erradicación de la biopelícula a 2900 µg/mL (Del Pozo, J. L. *et al.*, 2011) lo que concuerda con nuestros resultados donde a la concentración máxima utilizada, 1600 µg/mL, existe sólo una inhibición de un 17,5%. Por su parte en el caso del fluconazol a la misma concentración de 1600 µg/mL, se reduce un 39% el desarrollo de la biopelícula (viabilidad de un 61%), algo similar a lo reportado por otros autores que han obtenido una viabilidad de un 80% (Al-Fattani, M. A. y Douglas, L. J., 2004). Esto adquiere mucha relevancia ya que al comparar estos resultados con isonordrimenona vemos que a la misma concentración, es decir 1600 µg/mL, nuestro compuesto genera una inhibición de un 55,1% y a la concentración de mayor actividad (800 µg/mL) el porcentaje de inhibición es de un 65,7%. Es decir frente a esta especie isonordrimenona presenta mayor actividad a menor concentración.

En el caso de *C. parapsilosis* la actividad de isonordrimenona es bajísima, sólo podemos observar algo del efecto del metabolito a los 1600 µg/mL donde se obtiene una inhibición de la biopelícula ya formada de un 40,6% (viabilidad de un 59,4%), aun así el hecho de presentar algo de actividad es importantísimo más aún cuando podemos ver, a partir de los resultados obtenidos para los antifúngicos de uso común, que el efecto de estos es mucho menor en las mismas condiciones. En el caso de

## CAPITULO 5:DISCUSIÓN

fluconazol tenemos que la viabilidad de la biopelícula es superior al 100 % de control lo que se confirma con valores obtenidos por otros autores, que también observan que a la concentración mayor no es posible generar algún tipo de efecto sobre el desarrollo de la biopelícula de *C. parapsilosis* (Kuhn, D. M. *et al.* , 2002). De la misma forma podemos ver que el efecto de anfotericina B también es prácticamente nulo, concordando con otros autores quienes reportaron la cantidad de 6670 µg/mL para generar inhibición completa de la biopelícula por parte de este antifungico (Del Pozo, J. L. *et al.* , 2011).

Finalmente, isonordrimenona, frente a la biopelícula formada por *C. glabrata*, tiene una actividad muy baja a la concentración mayor utilizada de 1600 µg/mL, generando destrucción de la biopelícula en aproximadamente un 17%. Sin embargo, este resultado aun así es mucho más que lo obtenido por los antifúngicos de uso común ya que para fluconazol como para anfotericina B, a la misma concentración, el porcentaje de viabilidad fue superior respecto del 100 % correspondiente al control positivo, mostrando de esta forma que a esa concentración hay nula actividad sobre la biopelícula de *C. glabrata*. Estos datos son concordantes con lo publicado previamente por otros autores donde para anfotericina B, Del Pozo *et al.* reportaron valores por sobre los 4000 µg/mL para generar inhibición de la biopelícula (Del Pozo, J. L. *et al.* , 2011) y para fluconazol como es sabido también se han descrito resistencia intrínseca a este antifúngico por parte de *C. glabrata* debido a la generación de bombas eflujo, liberación de enzimas que degradan al metabolito o inhibición de genes que estimulan la producción de ergosterol, que es el sitio e unión del Fluconazol (Inigo, M. *et al.* , 2012; Silva, S. *et al.* , 2012).

Con todos los datos expuestos anteriormente sumado a los resultados publicados previamente por Montenegro I. *et al.* (2013) podemos establecer como poligodial conjuntamente con nordrimenona e isonordrimenona presentan variados y muy interesantes efectos sobre la biopelícula de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. dubliniensis*, todo lo cual nos hace pensar en estos compuestos como una excelente alternativa en el tratamiento principalmente de infecciones intrahospitalarias asociadas a la presencia de estos organismos fúngicos.



## 6.0 CONCLUSIONES

Frente a todo lo expuesto previamente podemos concluir lo siguiente:

- Se desarrollaron cultivos de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis* y *C. krusei* de modo que estos desarrollaran biopelículas fúngicas
- Poligodial es un potente antifúngico sobre las biopelículas de *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. glabrata* y presenta una baja actividad sobre las biopelículas de *C. krusei* y *C. dubliniensis*
- Nordreminona es un compuesto con baja actividad antifúngica sobre las biopelículas de *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. glabrata* y presenta un potente efecto sobre las biopelículas formadas por *C. krusei* y *C. dubliniensis*
- Isornodreminona es un potente antifúngico con una elevada acción sobre la biopelícula de *C. albicans*, pero presenta una acción reducida sobre biopelículas de *C. parapsilosis* y *C. glabrata*
- Poligodial, nordrimenona e isnordrimenona presentan una mayor actividad que los antifungicos usados comúnmente en infecciones intrahospitalarias anfotericina B y fluconazol

## CAPITULO 7: BIBLIOGRAFÍA

*CAPITULO 7.0*  
*BIBLIOGRAFÍA*

## 7.0 BIBLIOGRAFÍA

Al-Fattani, M. A.y Douglas, L. J. (2004). **"Penetration of Candida biofilms by antifungal agents."** Antimicrob Agents Chemother 48(9): 3291-3297.

Almeida, R. S., Wilson, D.y Hube, B. (2009). **"Candida albicans iron acquisition within the host."** FEMS Yeast Res 9(7): 1000-1012.

Alnuaimi, A. D., O'Brien-Simpson, N. M., Reynolds, E. C.y McCullough, M. J. (2013). **"Clinical isolates and laboratory reference Candida species and strains have varying abilities to form biofilms."** FEMS Yeast Res 13(7): 689-699.

Alves, T. M., Silva, A. F., Brandao, M., Grandi, T. S., Smania, E., Smania Junior, A.y Zani, C. L. (2000). **"Biological screening of Brazilian medicinal plants."** Mem Inst Oswaldo Cruz 95(3): 367-373.

Anke, H.y Sterner, O. (1991). **"Comparison of the antimicrobial and cytotoxic activities of twenty unsaturated sesquiterpene dialdehydes from plants and mushrooms."** Planta Med 57(4): 344-346.

Barrero, A. F., Oltra, J. E., Alvarez, M., Raslan, D. S., Saude, D. A.y Akssira, M. (2000). **"New sources and antifungal activity of sesquiterpene lactones."** Fitoterapia 71(1): 60-64.

Brilhante, R. S., Caetano, E. P., de Oliveira, J. S., Castelo-Branco Dde, S., Souza, E. R., de Alencar, L. P., Cordeiro Rde, A., Bandeira Tde, J., Sidrim, J. J.y Rocha, M. F. (2015). **"Simvastatin inhibits planktonic cells and biofilms of Candida and Cryptococcus species."** Braz J Infect Dis 19(5): 459-465.

Bruder-Nascimento, A., Camargo, C. H., Sugizaki, M. F., Sadatsune, T., Montelli, A. C., Mondelli, A. L.y Bagagli, E. (2010). **"Species distribution and susceptibility profile of Candida species in a Brazilian public tertiary hospital."** BMC Res Notes 3: 1.

## CAPITULO 7: BIBLIOGRAFÍA

Carneiro, H. A., Coleman, J. J., Restrepo, A. y Mylonakis, E. (2011). **"Fusarium infection in lung transplant patients: report of 6 cases and review of the literature."** Medicine (Baltimore) 90(1): 69-80.

Cassone, A., Simonetti, N. y Strippoli, V. (1973). **"Ultrastructural changes in the wall during germ-tube formation from blastospores of Candida albicans."** J Gen Microbiol 77(2): 417-426.

Castelli, M. V., Lodeyro, A. F., Malheiros, A., Zacchino, S. A. y Roveri, O. A. (2005). **"Inhibition of the mitochondrial ATP synthesis by polygodial, a naturally occurring dialdehyde unsaturated sesquiterpene."** Biochem Pharmacol 70(1): 82-89.

CLSI (2008). **"Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard. M27-A3."** CLSI. Wayne.

Cohen, B. E. (1998). **"Amphotericin B toxicity and lethality: a tale of two channels."** Int. J. Pharm 162: 95-106.

Colombo, A. L., Garnica, M., Aranha Camargo, L. F., Da Cunha, C. A., Bandeira, A. C., Borghi, D., Campos, T., Senna, A. L., Valias Didier, M. E., Dias, V. C. y Nucci, M. (2013). **"Candida glabrata: an emerging pathogen in Brazilian tertiary care hospitals."** Med Mycol 51(1): 38-44.

Colombo, A. L. y Guimaraes, T. (2003). **"[Epidemiology of hematogenous infections due to Candida spp]."** Rev Soc Bras Med Trop 36(5): 599-607.

Colombo, A. L., Nucci, M., Park, B. J., Nouer, S. A., Arthington-Skaggs, B., da Matta, D. A., Warnock, D., Morgan, J. y Brazilian Network Candidemia, S. (2006). **"Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers."** J Clin Microbiol 44(8): 2816-2823.

## CAPITULO 7: BIBLIOGRAFÍA

Cuellar-Cruz, M., Vega-Gonzalez, A., Mendoza-Novelo, B., Lopez-Romero, E., Ruiz-Baca, E., Quintanar-Escorza, M. A. y Villagomez-Castro, J. C. (2012). **"The effect of biomaterials and antifungals on biofilm formation by Candida species: a review."** Eur J Clin Microbiol Infect Dis 31(10): 2513-2527.

Chandra, J., Kuhn, D. M., Mukherjee, P. K., Hoyer, L. L., McCormick, T. y Ghannoum, M. A. (2001a). **"Biofilm formation by the fungal pathogen Candida albicans: development, architecture, and drug resistance."** J Bacteriol 183(18): 5385-5394.

Chandra, J., Mukherjee, P. K., Leidich, S. D., Faddoul, F. F., Hoyer, L. L., Douglas, L. J. y Ghannoum, M. A. (2001b). **"Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro."** J Dent Res 80(3): 903-908.

D' Acunto, M. (2001). **"Total synthesis of terpenoidic unsaturated dialdehydes and evaluation of their activity towards TRP receptors** Ph.D. Thesis, Università Degli Studi di Salerno, Italia, 2011."

Da Matta, D. A., de Almeida, L. P., Machado, A. M., Azevedo, A. C., Kusano, E. J., Travassos, N. F., Salomao, R. y Colombo, A. L. (2007). **"Antifungal susceptibility of 1000 Candida bloodstream isolates to 5 antifungal drugs: results of a multicenter study conducted in Sao Paulo, Brazil, 1995-2003."** Diagn Microbiol Infect Dis 57(4): 399-404.

De Almeida Alves, T. M., Ribeiro, F. L., Kloos, H. y Zani, C. L. (2001). **"Polygodial, the fungitoxic component from the Brazilian medicinal plant Polygonum punctatum."** Mem Inst Oswaldo Cruz 96(6): 831-833.

Del Pozo, J. L., Frances, M. L., Hernaez, S., Serrera, A., Alonso, M. y Rubio, M. F. (2011). **"Effect of amphotericin B alone or in combination with rifampicin or clarithromycin against Candida species biofilms."** Int J Artif Organs 34(9): 766-770.

## CAPITULO 7: BIBLIOGRAFÍA

Denardi, L. B., Mario, D. A., Loreto, E. S., Santurio, J. M.y Alves, S. H. (2015). **"Synergistic effects of tacrolimus and azole antifungal compounds in fluconazole-susceptible and fluconazole-resistant *Candida glabrata* isolates."** Braz J Microbiol 46(1): 125-129.

Derita, M., Montenegro, I., Garibotto, F., Enriz, R. D., Fritis, M. C.y Zacchino, S. A. (2013). **"Structural requirements for the antifungal activities of natural drimane sesquiterpenes and analogues, supported by conformational and electronic studies."** Molecules 18(2): 2029-2051.

Derita, M. G., Leiva, M. L.y Zacchino, S. A. (2009). **"Influence of plant part, season of collection and content of the main active constituent, on the antifungal properties of *Polygonum acuminatum* Kunth."** J Ethnopharmacol 124(3): 377-383.

Diomedi, A. (2004). **"Nuevos antifúngicos: Las equinocandinas."** Rev. Chil. Infect. 21(2): 89-101.

Donlan, R. M.y Costerton, J. W. (2002). **"Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms."** Clin Microbiol Rev 15(2): 167-193.

Douglas, J. L. (2004). **"Candida biofilms and their role infection."** Trends in Microbiol 11: 30-36.

Douglas, L. J. (2003). **"Candida biofilms and their role in infection."** Trends Microbiol 11(1): 30-36.

Ghannoum, M. A.y Rice, L. B. (1999). **"Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance."** Clin Microbiol Rev 12(4): 501-517.

Giolo, M. P.y Svidzinski, T. I. (2010). **"Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnostico laboratorial da candidemia."** Bras Patol Med Lab 46(3): 225-234.

## CAPITULO 7: BIBLIOGRAFÍA

Godoy, P., Tiraboschi, I. N., Severo, L. C., Bustamante, B., Calvo, B., Almeida, L. P., da Matta, D. A.y Colombo, A. L. (2003). "**Species distribution and antifungal susceptibility profile of Candida spp. bloodstream isolates from Latin American hospitals.**" Mem Inst Oswaldo Cruz 98(3): 401-405.

Guirao-Abad, J. P., Gonzalez-Parraga, P.y Arguelles, J. C. (2015). "**Strong correlation between the antifungal effect of amphotericin B and its inhibitory action on germ-tube formation in a Candida albicans URA(+) strain.**" Int Microbiol 18(1): 25-31.

Hawser, S. P.y Douglas, L. J. (1995). "**Resistance of Candida albicans biofilms to antifungal agents in vitro.**" Antimicrob Agents Chemother 39(9): 2128-2131.

Hoareau, L.y DaSilva, E. J. (1999). "**Medicinal plants: a re-emerging health aids.**" E. J .B 2: 56-70.

Inigo, M., Peman, J.y Del Pozo, J. L. (2012). "**Antifungal activity against Candida biofilms.**" Int J Artif Organs 35(10): 780-791.

Jansen, B. J.y de Groot, A. (2004). "**Occurrence, biological activity and synthesis of drimane sesquiterpenoids.**" Nat Prod Rep 21(4): 449-477.

Kojic, E. M.y Darouiche, R. O. (2004). "**Candida infections of medical devices.**" Clin Microbiol Rev 17(2): 255-267.

Kruppa, M. (2009). "**Quorum sensing and Candida albicans.**" Mycoses 52(1): 1-10.

Kubo, I., Fujita, K.y Lee, S. H. (2001). "**Antifungal mechanism of polygodial.**" J Agric Food Chem 49(3): 1607-1611.

Kuhn, D. M., George, T., Chandra, J., Mukherjee, P. K.y Ghannoum, M. A. (2002). "**Antifungal susceptibility of Candida biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins.**" Antimicrob Agents Chemother 46(6): 1773-1780.

## CAPITULO 7: BIBLIOGRAFÍA

Kuhn, D. M.y Ghannoum, M. A. (2004). **"Candida biofilms: antifungal resistance and emerging therapeutic options."** Curr Opin Investig Drugs 5(2): 186-197.

Lee, S. H., Lee, J. R., Lunde, C. S.y Kubo, I. (1999). **"In vitro antifungal susceptibilities of Candida albicans and other fungal pathogens to polygodial, a sesquiterpene dialdehyde."** Planta Med 65(3): 204-208.

Lewis, K. (2001). **"Riddle of biofilm resistance."** Antimicrob Agents Chemother 45: 99-107.

Lewis, R. E., Wiederhold, N. P.y Klepser, M. E. (2005). **"In vitro pharmacodynamics of amphotericin B, itraconazole, and voriconazole against Aspergillus, Fusarium, and Scedosporium spp."** Antimicrob Agents Chemother 49(3): 945-951.

Liu, J. Y., Chen, W. T., Ko, B. S., Yao, M., Hsueh, P. R., Hsiao, C. H., Kuo, Y. M.y Chen, Y. C. (2011). **"Combination antifungal therapy for disseminated fusariosis in immunocompromised patients : a case report and literature review."** Med Mycol 49(8): 872-878.

Lunde, C. S.y Kubo, I. (2000). **"Effect of polygodial on the mitochondrial ATPase of Saccharomyces cerevisiae."** Antimicrob Agents Chemother 44(7): 1943-1953.

Maimone, T. J.y Baran, P. S. (2007). **"Modern synthetic efforts toward biologically active terpenes."** Nat Chem Biol 3(7): 396-407.

McCallion, R. F., Cole, A. L., Walker, J. R., Blunt, J. W.y Munro, M. H. (1982). **"Antibiotic substances from New Zealand plants. II. Polygodial, an anti-Candida agent from Pseudowintera colorata."** Planta Med 44(3): 134-138.

Montanari, C. A.y S., V. d. (2001). **"Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais."** Quim. Nova 24: 105-111.

## CAPITULO 7: BIBLIOGRAFÍA

Montenegro, I., Pino, L., Werner, E., Madrid, A., Espinoza, L., Moreno, L., Villena, J. y Cuellar, M. (2013). **"Comparative study on the larvicidal activity of drimane sesquiterpenes and nordrimane compounds against *Drosophila melanogaster* til-til."** Molecules 18(4): 4192-4208.

Montenegro, I., Tomasoni, G., Bosio, C., Quinones, N., Madrid, A., Carrasco, H., Olea, A., Martinez, R., Cuellar, M. y Villena, J. (2014). **"Study on the cytotoxic activity of drimane sesquiterpenes and nordrimane compounds against cancer cell lines."** Molecules 19(11): 18993-19006.

Montenegro Venegas, I. J. (2013). **Estudio comparativo de actividades biológicas para metabolitos secundarios y derivados sintéticos desde *Drimys winteri* forst.** , Universidad Técnica Federico Santa María y Universidad de Valparaíso. Doctorado en Ciencias Mención Química: 251.

Mukherjee, P. K. y Chandra, J. (2004). **"Candida biofilm resistance."** Drug Resist Updat 7(4-5): 301-309.

NCCLS (2002). **"Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidialforming filamentous fungi. Approved standard NCCLS M38-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards."** Wayne.

Nosek, J., Holesova, Z., Kosa, P., Gacser, A. y Tomaska, L. (2009). **"Biology and genetics of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*."** Curr Genet 55(5): 497-509.

Nucci, M. y Anaissie, E. (2007). **"Fusarium infections in immunocompromised patients."** Clin Microbiol Rev 20(4): 695-704.

O'Toole, G. A. (2011). **"Microtiter dish biofilm formation assay."** J Vis Exp(47).

Onyewu, C., Blankenship, J. R., Del Poeta, M. y Heitman, J. (2003). **"Ergosterol biosynthesis inhibitors become fungicidal when combined with calcineurin inhibitors against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei*."** Antimicrob Agents Chemother 47(3): 956-964.

## CAPITULO 7: BIBLIOGRAFÍA

Pappas, P. G., Kauffman, C. A., Andes, D., Benjamin, D. K., Jr., Calandra, T. F., Edwards, J. E., Jr., Filler, S. G., Fisher, J. F., Kullberg, B. J., Ostrosky-Zeichner, L., Reboli, A. C., Rex, J. H., Walsh, T. J., Sobel, J. D. y Infectious Diseases Society of, A. (2009). **"Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America."** Clin Infect Dis 48(5): 503-535.

Pierce, C. G., Uppuluri, P., Tummala, S. y Lopez-Ribot, J. L. (2010). **"A 96 well microtiter plate-based method for monitoring formation and antifungal susceptibility testing of Candida albicans biofilms."** J Vis Exp(44).

Quindos, G., Villar-Vidal, M. y Eraso, E. (2009). **"Activity of micafungin against Candida biofilms."** Rev Iberoam Micol 26(1): 49-55.

Ramage, G., Mowat, E., Jones, B., Williams, C. y Lopez-Ribot, J. (2009). **"Our current understanding of fungal biofilms."** Crit Rev Microbiol 35(4): 340-355.

Raut, J. S., Shinde, R. B., Chauhan, N. M. y Karuppayil, S. M. (2013). **"Terpenoids of plant origin inhibit morphogenesis, adhesion, and biofilm formation by Candida albicans."** Biofouling 29(1): 87-96.

Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Benink, H. A., Worzella, T. J. y Minor, L. (2004). **Cell Viability Assays. Assay Guidance Manual. G. S. Sittampalam, Coussens, N. P., Nelson, H., Arkin, M., Auld, D., Austin, C., Bejcek, B., Glicksman, M., Inglese, J., Iversen, P. W., Li, Z., McGee, J., McManus, O., Minor, L., Napper, A., Peltier, J. M., Riss, T., Trask, O. J., Jr. and Weidner, J. Bethesda (MD).**

Rusu, E., Radu-Popescu, M., Pelinescu, D. y Vassu, T. (2014). **"Treatment with some anti-inflammatory drugs reduces germ tube formation in Candida albicans strains."** Braz J Microbiol 45(4): 1379-1383.

Saito, M. L. (1990). **"Estudo da atividade inseticida de algumas especies vegetais."** EMBRAPA- CNPMA: 23-30.

## CAPITULO 7: BIBLIOGRAFÍA

Sanglard, D., Ischer, F., Parkinson, T., Falconer, D. y Bille, J. (2003). **"Candida albicans mutations in the ergosterol biosynthetic pathway and resistance to several antifungal agents."** Antimicrob Agents Chemother 47(8): 2404-2412.

Sanglard, D., Kuchler, K., Ischer, F., Pagani, J. L., Monod, M. y Bille, J. (1995). **"Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in Candida albicans isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters."** Antimicrob Agents Chemother 39(11): 2378-2386.

Schofield, D. A., Westwater, C., Paulling, E. E., Nicholas, P. J. y Balish, E. (2003). **"Detection of Candida albicans mRNA from formalin-fixed, paraffin-embedded mouse tissues by nested reverse transcription-PCR."** J Clin Microbiol 41(2): 831-834.

Shinobu, C., SFY, O., F, B., L, F., RM, P., TIE, S. y MEL, C. (2007). **"Lack of Association Between Genotypes and Virulence Factors in C. albicans Strains Isolated From Vaginal Secretion."** Braz J Microbiol 38: 467-471.

Silva, S., Henriques, M., Martins, A., Oliveira, R. y Williams, D. (2009). **"Biofilms of non- Candida albicans Candida species: quantification, structure and matrix composition."** Med Mycol 47: 681-689.

Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D. W. y Azeredo, J. (2012). **"Candida glabrata, Candida parapsilosis and Candida tropicalis: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance."** FEMS Microbiol Rev 36(2): 288-305.

Silver, L. L. y Bostian, K. A. (1993). **"Discovery and development of new antibiotics: the problem of antibiotic resistance."** Antimicrob Agents Chemother 37(3): 377-383.

Taniguchi, M., Adachi, T., Oi, S., Kimura, A., Katsumura, S., Isoe, S. y Kubo, I. (1984). **"Structure-activity relationship of the Warburgia sesquiterpene dialdehydes."** Agric. Biol. Chem. 48: 73-78.

## CAPITULO 7: BIBLIOGRAFÍA

Tavanti, A., Pardini, G., Campa, D., Davini, P., Lupetti, A. y Senesi, S. (2004). **"Differential expression of secretory aspartyl proteinase genes (SAP1-10) in oral *Candida albicans* isolates with distinct karyotypes."** J Clin Microbiol 42(10): 4726-4734.

Tobudic, S., Kratzer, C., Lassnigg, A. y Presterl, E. (2012). **"Antifungal susceptibility of *Candida albicans* in biofilms."** Mycoses 55(3): 199-204.

Van der Linden, J. W., Snelders, E., Kampinga, G. A., Rijnders, B. J., Mattsson, E., Debets-Ossenkopp, Y. J., Kuijper, E. J., Van Tiel, F. H., Melchers, W. J. y Verweij, P. E. (2011). **"Clinical implications of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*, The Netherlands, 2007-2009."** Emerg Infect Dis 17(10): 1846-1854.

Vandebroek, I., Calewaert, J. B., De jonckheere, S., Sanca, S., Semo, L., Van Damme, P., Van Puyvelde, L. y De Kimpe, N. (2004). **"Use of medicinal plants and pharmaceuticals by indigenous communities in the Bolivian Andes and Amazon."** Bull World Health Organ 82(4): 243-250.

Vinsonneau, C., Benyamina, M., Baixench, M. T., Stephanazzi, J., Augris, C., Grabar, S., Paugam, A. y Wassermann, D. (2009). **"Effects of candidaemia on outcome of burns."** Burns 35(4): 561-564.

Watanabe, T., Takano, M., Murakami, M., Tanaka, H., Matsuhisa, A., Nakao, N., Mikami, T., Suzuki, M. y Matsumoto, T. (1999). **"Characterization of a haemolytic factor from *Candida albicans*."** Microbiology 145 ( Pt 3): 689-694.

Wroblewska, M. M., Swoboda-Kopec, E., Rokosz, A., Krawczyk, E., Marchel, H. y Luczak, M. (2002). **"Epidemiology of clinical isolates of *Candida albicans* and their susceptibility to triazoles."** Int J Antimicrob Agents 20(6): 472-475.

Yunes, R. A., Pedrosa, R. C. y Filho, C. (2001). **"Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil."** Quim. Nova 24: 147-152.

Zhang, X. (2002). **"Estrategia de la OMS sobre Medicina Tradicional."** Genebra: Organización Mundial da Saúde.

## CAPITULO 7: BIBLIOGRAFÍA

Zhao, L. X., Li, D. D., Hu, D. D., Hu, G. H., Yan, L., Wang, Y. y Jiang, Y. Y. (2013). **"Effect of tetrandrine against *Candida albicans* biofilms."** PLoS One 8(11): e79671.

## ANEXO N°1 TABLAS

**TABLA 2.** Efecto de poligodial sobre *C. albicans* en estado planctónico al cabo de 24 horas de tratamiento

CONCENTRACIÓN DE POLIGODIAL µg/mL (24 HORAS)												
<i>Candida albicans</i> (1:100)	C.E	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0312	C.C
A	0,470	0,483	0,567	0,518	0,566	0,731	0,667	0,622	0,734	0,613	0,773	0,800
B	0,457	0,453	0,545	0,625	0,645	0,680	0,701	0,664	0,662	0,701	0,665	0,790
C	0,452	0,466	0,553	0,601	0,675	0,681	0,667	0,663	0,678	0,673	0,670	0,837
D	0,465	0,466	0,573	0,682	0,576	0,662	0,684	0,680	0,664	0,671	0,653	0,774
E	0,457	0,463	0,533	0,680	0,644	0,654	0,650	0,664	0,651	0,670	0,649	0,785
F	0,493	0,435	0,510	0,681	0,642	0,711	0,745	0,672	0,659	0,734	0,679	0,821
G	0,472	0,461	0,563	0,602	0,628	0,773	0,735	0,728	0,715	0,768	0,682	0,857
H	0,458	0,453	0,504	0,562	0,640	0,760	0,634	0,720	0,700	0,701	0,710	0,830
PROM	0,466	0,460	0,544	0,619	0,627	0,707	0,685	0,677	0,683	0,691	0,685	0,812
D.S	0,013	0,014	0,037	0,026	0,061	0,045	0,039	0,034	0,030	0,047	0,040	0,029
CORREG	0,000	0,000	0,078	0,153	0,162	0,241	0,220	0,211	0,217	0,226	0,220	0,346
CV	0,028	0,030	0,068	0,042	0,097	0,063	0,057	0,050	0,044	0,067	0,059	0,036
%	0,0	0,0	22,5	44,3	46,6	69,6	63,5	61,0	62,8	65,2	63,4	100,0

**TABLA 3.** Efecto De poligodial sobre biopelículas de *C. albicans* cuantificación mediante ensayo de MTT

POLIGODIAL A <i>Candida albicans</i> CON MTT												
	1600	800	400	200	100	50	25	10	AB	FLUC	+	-
A	0,650	0,770	0,763	0,747	0,831	0,725	0,854	1,319	0,874	0,840	0,969	0,210
B	0,660	0,635	0,631	0,720	0,630	0,599	0,711	1,309	0,836	0,672	0,959	0,241
C	0,577	0,559	0,588	0,611	0,523	0,539	0,644	1,348	1,008	0,646	0,809	0,263
D	0,617	0,586	0,589	0,606	0,548	0,491	0,550	1,774	0,945	0,728	0,901	0,279
E	0,580	0,600	0,560	0,540	0,545	0,535	0,560	1,000	0,446	0,406	0,950	0,115
F	0,341	0,388	0,390	0,352	0,373	0,322	0,350	1,036	0,529	0,504	0,693	0,108
G	0,320	0,337	0,311	0,312	0,319	0,320	0,389	0,930	0,526	0,496	0,588	0,102
H	0,333	0,333	0,315	0,319	0,304	0,269	0,319	0,900	0,435	0,398	0,537	0,069
PROM	0,510	0,526	0,518	0,526	0,504	0,475	0,547	1,202	0,700	0,586	0,801	0,173
D.S	0,151	0,157	0,163	0,177	0,190	0,158	0,188	0,295	0,238	0,160	0,174	0,083
CORREG	0,336	0,353	0,345	0,353	0,331	0,302	0,374	1,029	0,527	0,413	0,627	0,000
CV	0,296	0,299	0,314	0,337	0,377	0,334	0,343	0,245	0,341	0,272	0,217	0,481
%	53,6	56,2	55,0	56,2	52,7	48,1	59,6	164,0	83,9	65,8	100,0	0,0

## ANEXOS

**TABLA 4.** Efecto de poligodial sobre biopelículas de *C. albicans* cuantificación mediante tinción con Cristal Violeta.

POLIGODIAL A <i>Candida albicans</i> CON CRISTAL VIOLETA												
	1600	800	400	200	100	50	25	AB	FLUC	POS	POL	NEG
A	0,300	0,402	0,264	0,165	0,162	0,286	0,344	0,334	0,262	0,593	0,130	0,105
B	0,321	0,216	0,193	0,190	0,177	0,219	0,312	0,548	0,285	0,466	0,126	0,104
C	0,319	0,221	0,219	0,175	0,172	0,273	0,377	0,706	0,315	0,726	0,108	0,077
D	0,350	0,233	0,214	0,243	0,261	0,284	0,335	0,688	0,367	0,703	0,104	0,103
E	0,329	0,221	0,268	0,180	0,269	0,242	0,301	0,774	0,283	0,685	0,103	0,106
F	0,341	0,245	0,220	0,171	0,194	0,264	0,277	0,822	0,230	0,777	0,108	0,092
G	0,351	0,268	0,181	0,235	0,184	0,284	0,219	0,929	0,268	0,826	0,110	0,080
H	0,365	0,350	0,221	0,164	0,160	0,234	0,247	0,627	0,052	0,544	0,118	0,078
PROM	0,335	0,270	0,223	0,190	0,197	0,261	0,302	0,679	0,258	0,665	0,113	0,093
D.S	0,021	0,069	0,030	0,031	0,043	0,026	0,052	0,182	0,092	0,122	0,010	0,013
CORREG	0,241	0,176	0,129	0,097	0,104	0,168	0,208	0,585	0,165	0,572	0,020	0,000
FINAL	0,221	0,156	0,109	0,077	0,084	0,147	0,188	0,565	0,144	0,552	0,000	0,000
CV	0,063	0,257	0,137	0,164	0,219	0,099	0,173	0,268	0,359	0,183	0,090	0,140
%	40,1	28,3	19,8	14,0	15,2	26,7	34,1	102,4	26,2	100,0	0,0	0,0

**TABLA 5.** Efecto de poligodial sobre biopelículas de *C. parapsilosis*

EFECTO DE POLIGODIAL SOBRE BIOPELÍCULA DE <i>Candida parapsilosis</i>												
	1600	800	400	200	100	50	25	AB	F	POS	POL	NEG
A	0,344	0,314	0,308	0,245	0,204	0,223	0,237	0,372	0,412	0,634	0,111	0,092
B	0,316	0,279	0,299	0,220	0,200	0,193	0,187	0,277	0,261	0,299	0,101	0,090
C	0,295	0,267	0,290	0,253	0,193	0,195	0,190	0,282	0,296	0,303	0,090	0,091
D	0,309	0,260	0,304	0,264	0,189	0,206	0,193	0,331	0,285	0,358	0,094	0,097
E	0,282	0,269	0,285	0,233	0,214	0,219	0,189	0,320	0,242	0,247	0,095	0,096
F	0,300	0,298	0,279	0,241	0,200	0,200	0,208	0,307	0,330	0,290	0,109	0,100
G	0,330	0,307	0,292	0,242	0,196	0,199	0,207	0,312	0,317	0,285	0,103	0,095
H	0,280	0,303	0,269	0,229	0,168	0,173	0,201	0,282	0,319	0,475	0,116	0,092
PROM	0,307	0,287	0,291	0,241	0,196	0,201	0,202	0,310	0,308	0,361	0,102	0,094
D.S	0,022	0,021	0,013	0,014	0,013	0,016	0,016	0,032	0,052	0,130	0,009	0,003
CORREG	0,213	0,193	0,197	0,147	0,101	0,107	0,107	0,216	0,214	0,267	0,008	0,000
FINAL	0,205	0,185	0,188	0,139	0,093	0,099	0,099	0,208	0,205	0,259	0,000	0,000
CV	0,073	0,072	0,045	0,057	0,069	0,078	0,082	0,102	0,168	0,360	0,089	0,037
%	79,0	71,3	72,7	53,5	36,0	38,1	38,3	80,3	79,3	100,0	0,0	0,0

**TABLA 6.** Efecto de poligodial sobre biopelículas de *C. glabrata*

EFECTO DE POLIGODIAL SOBRE BIOPELÍCULA DE <i>Candida glabrata</i>												
	1600	800	400	200	100	50	25	AB	FLUC	POS	POL	NEG
A	0,254	0,276	0,176	0,135	0,131	0,167	0,187	0,234	0,181	0,286	0,142	0,075
B	0,274	0,236	0,174	0,115	0,149	0,140	0,172	0,229	0,209	0,291	0,150	0,080
C	0,251	0,197	0,181	0,140	0,120	0,146	0,168	0,253	0,175	0,281	0,138	0,067
D	0,231	0,234	0,212	0,132	0,124	0,136	0,165	0,316	0,222	0,295	0,119	0,098
E	0,242	0,213	0,205	0,136	0,111	0,155	0,190	0,261	0,187	0,399	0,142	0,067
F	0,420	0,225	0,209	0,159	0,150	0,119	0,205	0,248	0,294	0,344	0,141	0,065
G	0,256	0,205	0,202	0,154	0,155	0,134	0,233	0,292	0,262	0,358	0,113	0,090
H	0,411	0,220	0,186	0,149	0,130	0,149	0,175	0,260	0,236	0,289	0,104	0,094
PROM	0,292	0,226	0,193	0,140	0,134	0,143	0,187	0,262	0,221	0,318	0,131	0,080
D.S	0,077	0,024	0,016	0,014	0,016	0,015	0,023	0,029	0,042	0,044	0,017	0,013
CORREG	0,213	0,146	0,114	0,061	0,054	0,064	0,107	0,182	0,141	0,238	0,052	0,000
FINAL	0,161	0,095	0,062	0,009	0,003	0,012	0,056	0,131	0,090	0,187	0,000	0,000
CV	0,263	0,108	0,080	0,100	0,119	0,101	0,122	0,112	0,190	0,137	0,127	0,165
%	86,3	50,7	33,2	4,8	1,4	6,5	29,9	69,9	48,0	100,0	0,0	0,0

**TABLA 7.** Efecto de poligodial sobre biopelículas de *C. krusei*

EFECTO DE POLIGODIAL SOBRE BIOPELÍCULA DE <i>Candida krusei</i>												
	1600	800	400	200	100	50	25	AB	F	POS	POL	NEG
A	0,309	0,305	0,265	0,267	0,206	0,191	0,213	0,239	0,360	0,213	0,161	0,105
B	0,319	0,404	0,384	0,368	0,208	0,214	0,227	0,313	0,371	0,263	0,152	0,131
C	0,351	0,421	0,319	0,436	0,216	0,208	0,280	0,302	0,407	0,231	0,121	0,109
D	0,399	0,415	0,364	0,349	0,233	0,215	0,320	0,334	0,423	0,359	0,175	0,110
E	0,331	0,437	0,348	0,397	0,265	0,244	0,293	0,369	0,383	0,265	0,134	0,156
F	0,343	0,311	0,319	0,363	0,234	0,260	0,240	0,289	0,339	0,333	0,136	0,121
G	0,235	0,223	0,321	0,316	0,233	0,243	0,199	0,191	0,308	0,181	0,130	0,119
H	0,251	0,221	0,332	0,263	0,221	0,222	0,192	0,207	0,299	0,211	0,239	0,109
PROM	0,317	0,342	0,332	0,345	0,227	0,225	0,246	0,281	0,361	0,257	0,156	0,120
D.S	0,053	0,089	0,036	0,060	0,019	0,023	0,047	0,063	0,044	0,062	0,038	0,017
CORREG	0,197	0,222	0,212	0,225	0,107	0,105	0,126	0,161	0,241	0,137	0,036	0,000
FINAL	0,161	0,186	0,176	0,189	0,071	0,069	0,090	0,125	0,205	0,101	0,000	0,000
CV	0,168	0,260	0,108	0,175	0,084	0,101	0,191	0,223	0,122	0,241	0,243	0,140
%	159,7	184,3	173,8	187,0	70,3	67,9	88,6	123,3	203,2	100,0	0,0	0,0

**TABLA 8.** Efecto de poligodial sobre biopelícula de *C. dubliniensis*

EFECTO DE POLIGODIAL SOBRE BIOPELÍCULA DE <i>Candida dubliniensis</i>												
	1600	800	400	200	100	50	25	AB	F	POS	POL	NEG
A	0,597	0,592	0,522	0,46	0,317	0,398	0,44	0,284	0,567	0,523	0,167	0,103
B	0,522	0,488	0,446	0,38	0,305	0,312	0,325	0,258	0,457	0,543	0,134	0,108
C	0,516	0,468	0,502	0,401	0,266	0,339	0,407	0,285	0,543	0,526	0,131	0,144
D	0,602	0,553	0,485	0,423	0,333	0,403	0,418	0,311	0,577	0,529	0,126	0,11
E	0,565	0,474	0,419	0,37	0,329	0,38	0,455	0,261	0,437	0,54	0,13	0,152
F	0,555	0,436	0,442	0,402	0,341	0,404	0,494	0,295	0,493	0,547	0,13	0,13
G	0,458	0,42	0,468	0,354	0,411	0,365	0,304	0,235	0,444	0,515	0,141	0,099
H	0,407	0,396	0,321	0,348	0,316	0,337	0,409	0,315	0,489	0,554	0,248	0,103
PROM	0,528	0,478	0,451	0,392	0,327	0,367	0,407	0,281	0,501	0,535	0,151	0,119
D.S	0,068	0,066	0,062	0,037	0,041	0,035	0,064	0,028	0,055	0,013	0,041	0,021
CORREG	0,409	0,360	0,332	0,274	0,209	0,249	0,288	0,162	0,382	0,416	0,032	0,000
FINAL	0,377	0,328	0,300	0,241	0,176	0,216	0,256	0,130	0,350	0,384	0,000	0,000
CV	0,128	0,138	0,138	0,095	0,125	0,095	0,157	0,098	0,110	0,025	0,274	0,173
%	98,2	85,3	78,1	62,9	46,0	56,4	66,6	33,8	91,2	100,0	0,0	0,0

**TABLA 9.** Efecto de nordrimenona sobre biopelícula de *C. albicans*

EFECTO DE NORDIMENONA SOBRE BIOPELÍCULA DE <i>Candida albicans</i>												
	1600	800	400	200	100	50	25	AB	FLUC	POS	NOR	NEG
A	0,400	0,360	0,416	0,426	0,434	0,414	0,455	0,409	0,439	0,546	0,133	0,113
B	0,430	0,379	0,395	0,446	0,492	0,441	0,471	0,418	0,365	0,407	0,126	0,104
C	0,390	0,300	0,339	0,321	0,323	0,459	0,396	0,355	0,320	0,506	0,104	0,096
D	0,423	0,420	0,449	0,474	0,452	0,466	0,438	0,441	0,436	0,378	0,108	0,105
E	0,386	0,422	0,401	0,403	0,493	0,455	0,468	0,349	0,460	0,439	0,114	0,102
F	0,452	0,497	0,505	0,524	0,571	0,520	0,514	0,385	0,552	0,686	0,141	0,121
G	0,489	0,492	0,452	0,529	0,481	0,460	0,549	0,339	0,555	0,601	0,119	0,111
H	0,465	0,395	0,471	0,489	0,460	0,476	0,518	0,323	0,386	0,690	0,133	0,120
PROM	0,429	0,408	0,429	0,452	0,463	0,461	0,476	0,377	0,439	0,535	0,122	0,109
D.S	0,037	0,066	0,052	0,069	0,070	0,030	0,049	0,042	0,084	0,130	0,013	0,009
CORREG	0,320	0,299	0,320	0,343	0,354	0,352	0,367	0,268	0,330	0,426	0,013	0,000
FINAL	0,307	0,286	0,306	0,329	0,341	0,339	0,354	0,255	0,317	0,413	0,000	0,000
CV	0,087	0,161	0,121	0,153	0,151	0,065	0,103	0,112	0,191	0,243	0,108	0,081
%	74,4	69,2	74,1	79,7	82,6	82,1	85,7	61,8	76,7	100,0	0,0	0,0

**TABLA 10.** Efecto de nordrimenona sobre biopelícula de *C. parapsilosis*

EFECTO DE NORDRIMENONA SOBRE BIOPELÍCULA DE <i>Candida parapsilosis</i>												
	1600	800	400	200	100	50	25	AB	FLUC	POS	NOR	NEG
A	0,715	0,669	0,628	0,689	0,528	0,522	0,513	0,649	0,794	0,769	0,116	0,111
B	0,766	0,621	0,560	0,524	0,522	0,630	0,507	0,567	0,755	0,603	0,109	0,113
C	0,778	0,676	0,579	0,586	0,494	0,494	0,471	0,578	0,750	0,715	0,100	0,107
D	0,667	0,607	0,572	0,546	0,569	0,659	0,419	0,497	0,708	0,628	0,105	0,105
E	0,758	0,864	0,590	0,610	0,545	0,762	0,421	0,574	0,663	0,736	0,096	0,103
F	0,796	0,741	0,626	0,796	0,741	0,656	0,426	0,660	0,810	0,767	0,103	0,110
G	0,791	0,678	0,610	0,753	0,556	0,723	0,506	0,583	0,694	0,716	0,104	0,109
H	0,995	0,730	0,636	0,765	0,623	0,780	0,469	0,702	0,850	0,686	0,098	0,105
PROM	0,783	0,698	0,600	0,659	0,572	0,653	0,467	0,601	0,753	0,703	0,104	0,108
D.S	0,096	0,081	0,029	0,106	0,078	0,104	0,040	0,065	0,063	0,061	0,006	0,003
CORREG	0,675	0,590	0,492	0,551	0,464	0,545	0,359	0,493	0,645	0,595	0,004	0,000
FINAL	0,679	0,594	0,496	0,555	0,468	0,549	0,363	0,497	0,649	0,599	0,000	0,000
CV	0,122	0,117	0,048	0,161	0,136	0,159	0,086	0,108	0,084	0,086	0,062	0,032
%	113,5	99,3	82,9	92,7	78,2	91,8	60,6	83,1	108,4	100,0	0,0	0,0

**TABLA 11.** Efecto de nordrimenona sobre biopelícula de *Candida glabrata*

EFECTO DE NORDRIMENONA SOBRE BIOPELÍCULA DE <i>Candida glabrata</i>												
	1600	800	400	200	100	50	25	AB	FLUC	POS	NOR	NEG
A	0,320	0,297	0,311	0,428	0,368	0,420	0,438	0,325	0,478	0,536	0,092	0,093
B	0,487	0,381	0,375	0,284	0,351	0,357	0,394	0,307	0,322	0,383	0,091	0,095
C	0,484	0,380	0,401	0,344	0,350	0,394	0,416	0,369	0,413	0,403	0,092	0,091
D	0,544	0,387	0,469	0,302	0,367	0,312	0,371	0,402	0,460	0,364	0,098	0,103
E	0,524	0,466	0,416	0,337	0,327	0,379	0,421	0,306	0,481	0,388	0,091	0,093
F	0,271	0,410	0,565	0,461	0,421	0,454	0,493	0,320	0,541	0,477	0,097	0,094
G	0,341	0,450	0,531	0,401	0,468	0,403	0,292	0,323	0,370	0,416	0,102	0,107
H	0,405	0,446	0,401	0,378	0,344	0,361	0,354	0,322	0,259	0,293	0,105	0,115
PROM	0,422	0,402	0,434	0,367	0,375	0,385	0,397	0,334	0,416	0,408	0,096	0,099
D.S	0,102	0,054	0,084	0,061	0,047	0,043	0,060	0,034	0,094	0,073	0,005	0,009
CORREG	0,323	0,303	0,335	0,268	0,276	0,286	0,299	0,235	0,317	0,309	0,003	0,000
FINAL	0,326	0,306	0,338	0,271	0,279	0,289	0,301	0,238	0,320	0,312	0,000	0,000
CV	0,243	0,135	0,193	0,167	0,125	0,112	0,152	0,101	0,225	0,179	0,056	0,087
%	104,7	98,3	108,4	87,0	89,4	92,8	96,7	76,5	102,6	100,0	0,0	0,0

**TABLA 12.** Efecto de nordrimenona sobre biopelícula de *C. krusei*

EFECTO DE NORDRIMENONA SOBRE BIOPELICULA DE <i>Candida krusei</i>												
	1600	800	400	200	100	50	25	AB	F	POS	NOR	NEG
A	0,206	0,138	0,193	0,168	0,213	0,204	0,220	0,248	0,158	0,246	0,131	0,106
B	0,198	0,248	0,174	0,161	0,139	0,215	0,215	0,238	0,168	0,272	0,104	0,104
C	0,237	0,136	0,154	0,169	0,237	0,218	0,244	0,238	0,177	0,249	0,114	0,111
D	0,248	0,137	0,175	0,167	0,231	0,231	0,250	0,241	0,189	0,256	0,139	0,111
E	0,231	0,246	0,149	0,166	0,227	0,233	0,238	0,241	0,185	0,235	0,171	0,106
F	0,303	0,235	0,162	0,178	0,239	0,231	0,243	0,236	0,191	0,238	0,222	0,104
G	0,250	0,134	0,153	0,143	0,236	0,229	0,251	0,242	0,175	0,214	0,122	0,103
H	0,208	0,256	0,150	0,170	0,226	0,215	0,235	0,230	0,174	0,240	0,183	0,104
PROM	0,235	0,191	0,164	0,165	0,219	0,222	0,237	0,239	0,177	0,244	0,148	0,106
D.S	0,034	0,059	0,016	0,010	0,033	0,010	0,013	0,005	0,011	0,017	0,040	0,003
CORREG	0,129	0,085	0,058	0,059	0,112	0,116	0,131	0,133	0,071	0,138	0,042	0,000
FINAL	0,087	0,043	0,016	0,017	0,070	0,074	0,089	0,091	0,029	0,096	0,000	0,000
CV	0,144	0,309	0,095	0,062	0,152	0,047	0,056	0,022	0,063	0,069	0,272	0,030
%	91,0	45,0	16,2	17,8	73,6	77,2	92,9	95,0	30,2	100,0	0,0	0,0

**TABLA 13.** Efecto de nordrimenona sobre biopelícula de *C. dubliniensis*

EFECTO DE NORDRIMENONA SOBRE BIOPELICULA DE <i>Candida dubliniensis</i>												
	1600	800	400	200	100	50	25	AB	F	POS	NOR	NEG
A	0,563	0,25	0,271	0,271	0,305	0,279	0,371	0,338	0,333	0,266	0,24	0,117
B	0,255	0,348	0,267	0,273	0,333	0,354	0,353	0,247	0,251	0,413	0,285	0,131
C	0,395	0,341	0,391	0,279	0,335	0,373	0,377	0,294	0,342	0,41	0,278	0,109
D	0,574	0,405	0,333	0,292	0,296	0,339	0,302	0,273	0,375	0,413	0,248	0,109
E	0,332	0,254	0,306	0,255	0,284	0,316	0,368	0,268	0,35	0,396	0,160	0,111
F	0,292	0,277	0,291	0,258	0,316	0,297	0,324	0,255	0,327	0,452	0,308	0,108
G	0,291	0,360	0,277	0,255	0,270	0,294	0,334	0,258	0,315	0,386	0,289	0,106
H	0,298	0,489	0,229	0,243	0,316	0,267	0,357	0,263	0,369	0,472	0,263	0,119
PROM	0,375	0,341	0,296	0,266	0,307	0,315	0,348	0,275	0,333	0,401	0,259	0,114
D.S	0,126	0,081	0,049	0,016	0,023	0,037	0,026	0,029	0,039	0,062	0,046	0,008
CORREG	0,261	0,227	0,182	0,152	0,193	0,201	0,235	0,161	0,219	0,287	0,145	0,000
FINAL	0,116	0,082	0,037	0,007	0,048	0,056	0,089	0,016	0,074	0,142	0,000	0,000
CV	0,337	0,239	0,166	0,060	0,074	0,119	0,075	0,107	0,116	0,153	0,177	0,073
%	81,7	57,4	25,9	4,8	33,8	39,4	62,9	11,0	52,0	100,0	0,0	0,0

**TABLA 14.** Efecto de isonordrimenona sobre biopelícula de *C. albicans*

EFECTO DE ISONORDRIMENONA SOBRE BIOPELICULA DE <i>Candida albicans</i>												
	1600	800	400	200	100	50	25	AB	FLUC	POS	ISO	NEG
A	0,287	0,230	0,306	0,252	0,292	0,291	0,388	0,273	0,231	0,383	0,165	0,115
B	0,227	0,263	0,285	0,395	0,379	0,369	0,305	0,347	0,328	0,341	0,180	0,104
C	0,210	0,241	0,247	0,284	0,341	0,444	0,389	0,399	0,342	0,394	0,115	0,106
D	0,204	0,184	0,240	0,295	0,253	0,369	0,340	0,310	0,336	0,292	0,129	0,115
E	0,275	0,205	0,246	0,232	0,365	0,420	0,399	0,344	0,223	0,343	0,174	0,114
F	0,239	0,205	0,298	0,302	0,276	0,394	0,422	0,306	0,259	0,339	0,145	0,172
G	0,191	0,196	0,279	0,253	0,353	0,410	0,296	0,203	0,193	0,317	0,148	0,135
H	0,235	0,195	0,269	0,227	0,269	0,429	0,412	0,271	0,213	0,310	0,140	0,135
PROM	0,234	0,215	0,271	0,280	0,316	0,391	0,369	0,307	0,266	0,340	0,150	0,125
D.S	0,034	0,027	0,025	0,054	0,049	0,048	0,049	0,059	0,061	0,035	0,022	0,022
CORREG	0,109	0,090	0,147	0,156	0,192	0,266	0,244	0,182	0,141	0,215	0,025	0,000
FINAL	0,084	0,065	0,122	0,131	0,167	0,241	0,219	0,157	0,116	0,190	0,000	0,000
CV	0,144	0,126	0,092	0,194	0,155	0,124	0,132	0,194	0,228	0,103	0,149	0,180
%	44,1	34,3	64,0	68,5	87,5	126,7	115,2	82,5	61,0	100,0	0,0	0,0

**TABLA 15.** Efecto de isonordrimenona sobre biopelícula de *C. parapsilosis*

EFECTO DE ISONORDRIMENONA SOBRE BIOPELICULA DE <i>Candida parapsilosis</i>												
	1600	800	400	200	100	50	25	AB	FLUC	POS	ISO	NEG
A	0,452	0,496	0,552	0,598	0,600	0,614	0,578	0,606	0,716	0,614	0,104	0,098
B	0,348	0,381	0,463	0,458	0,522	0,504	0,555	0,526	0,601	0,495	0,098	0,130
C	0,321	0,323	0,486	0,458	0,472	0,459	0,667	0,491	0,692	0,667	0,091	0,092
D	0,336	0,359	0,464	0,465	0,476	0,455	0,463	0,511	0,686	0,595	0,096	0,091
E	0,403	0,424	0,414	0,401	0,421	0,450	0,458	0,459	0,584	0,538	0,090	0,091
F	0,346	0,492	0,404	0,424	0,429	0,425	0,490	0,472	0,760	0,630	0,087	0,091
G	0,324	0,565	0,407	0,573	0,437	0,517	0,557	0,467	0,477	0,361	0,103	0,090
H	0,391	0,401	0,490	0,446	0,539	0,655	0,474	0,559	0,630	0,483	0,085	0,097
PROM	0,365	0,430	0,460	0,478	0,487	0,510	0,530	0,511	0,643	0,548	0,094	0,098
D.S	0,046	0,081	0,051	0,070	0,062	0,083	0,073	0,051	0,090	0,100	0,007	0,013
CORREG	0,268	0,333	0,363	0,380	0,390	0,412	0,433	0,414	0,546	0,450	0,000	0,000
FINAL	0,268	0,333	0,363	0,380	0,390	0,412	0,433	0,414	0,546	0,450	0,000	0,000
CV	0,126	0,189	0,111	0,146	0,128	0,163	0,137	0,099	0,139	0,182	0,076	0,138
%	59,4	73,9	80,5	84,5	86,5	91,6	96,1	91,9	121,2	100,0	0,0	0,0

**TABLA 16.** Efecto de isonordrimenona sobre biopelícula de *C. glabrata*

EFECTO DE ISONORDRIMENONA SOBRE BIOPELICULA DE <i>Candida glabrata</i>												
	1600	800	400	200	100	50	25	AB	FLUC	POS	ISO	NEG
A	0,353	0,289	0,327	0,288	0,308	0,439	0,503	0,299	0,487	0,447	0,114	0,097
B	0,298	0,292	0,363	0,325	0,338	0,362	0,417	0,312	0,387	0,359	0,090	0,097
C	0,267	0,279	0,318	0,315	0,397	0,315	0,322	0,316	0,438	0,292	0,103	0,143
D	0,272	0,273	0,352	0,338	0,344	0,376	0,324	0,369	0,427	0,277	0,097	0,106
E	0,266	0,272	0,264	0,306	0,301	0,317	0,318	0,357	0,379	0,290	0,090	0,229
F	0,256	0,294	0,245	0,304	0,358	0,343	0,283	0,380	0,486	0,289	0,094	0,129
G	0,250	0,239	0,236	0,346	0,350	0,298	0,267	0,443	0,461	0,220	0,214	0,171
H	0,253	0,245	0,256	0,335	0,448	0,314	0,292	0,409	0,438	0,301	0,135	0,181
PROM	0,277	0,273	0,295	0,320	0,356	0,346	0,341	0,361	0,438	0,309	0,117	0,144
D.S	0,034	0,021	0,051	0,020	0,048	0,046	0,080	0,050	0,040	0,067	0,042	0,047
CORREG	0,133	0,129	0,151	0,176	0,211	0,201	0,197	0,217	0,294	0,165	0,000	0,000
FINAL	0,133	0,129	0,151	0,176	0,211	0,201	0,197	0,217	0,294	0,165	0,000	0,000
CV	0,124	0,076	0,171	0,062	0,134	0,134	0,234	0,140	0,092	0,217	0,358	0,326
%	80,3	77,9	91,4	106,2	127,9	121,9	119,0	131,0	177,8	100,0	0,0	0,0