

905

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

**EFFECTO DE EXTRACTOS CON ACTIVIDAD ANTIFUNGICA SOBRE PROTOPLASTOS DE
*Neurospora crassa***

INFORME DE TESIS

**PRESENTADO POR
Claudia Regina Morales Ortíz**

**Para optar al título de
Químico Biólogo**

Guatemala, mayo de 1998.

**JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

Decano	Lic. Jorge Rodolfo Pérez Folgar
Secretario	Lic. Oscar Federico Nave Herrera
Vocal I	Lic. Miguel Angel Herrera Galvez
Vocal II	Lic. Gerardo Leonel Arroyo Catalan
Vocal III	Lic. Rodrigo Herrera San Jose
Vocal IV	Br. Herberth Raul Arevalo Alvarado
Vocal V	Br. Manola Anleu Fortuny

ACTO QUE DEDICO

A DIOS	Creador de Vida
A MIS PADRES	Miguel Angel Morales y Marta Estela Ortíz de Morales
A MIS HERMANOS	Miguel Emili, Miguel Angel y Flor de María Morales Ortíz.
A MIS ABUELOS	Miguel Angel Morales, María Maltez de Morales y María del pilar Aguilar.

AGRADECIMIENTOS

Al Lic. Armando Cáceres Estrada por haber contribuido activamente en mi formación profesional.

Al Lic. Roberto Benavides por su amistad y consejos brindados durante mis años de estudio.

Al Laboratorio de productos Fitofarmacéuticos FARMAYA, S.A. por permitirme ingresar y trabajar en sus instalaciones. A todo el personal que labora en FARMAYA por su colaboración.

A La familia Meneses Molina por el cariño y confianza hacia mi persona.

INDICE

1.	Resumen	1
2.	Introducción	2
3.	Antecedentes	3
4.	Justificaciones	20
5.	Objetivos	21
6.	Hipotesis	22
7.	Materiales y métodos	23
8.	Resultados	28
9.	Discusión de resultados	30
10.	Conclusiones	33
11.	Recomendaciones	34
12.	Referencias	35
13.	Anexos	45

1. RESUMEN

El presente trabajo se realizó con el propósito de demostrar por medio de ensayos *in vitro* la acción antifúngica de los extractos etanólicos obtenidos de determinados órganos de las plantas: *Bixa orellana*, *Byrsonima crassifolia*, *Eupatorium semialatum*, *Lippia graveolens*, *Psidium guajava*, *Smilax lundellii*, *Wigandia urens* var. *caracasana*, *Solanum americanum* y contra los hongos *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton rubrum* y los hongos oportunistas *Aspergillus flavus*, *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans* causantes frecuentes de infecciones de la piel y mucosas.

El trabajo se dividió en dos etapas; en la primera se confirmó la actividad antifúngica *in vitro* de plantas que habían demostrado actividad en estudios anteriores. De las ocho plantas en estudio en todas se confirmó la actividad antifúngica, excepto contra *A. flavus*.

En la siguiente etapa se estableció el bioensayo de formación de protoplastos de *Neurospora crassa* IM 70 ATCC 9279 el que permite determinar si el mecanismo de acción del extracto induce la inhibición de la síntesis de la pared celular del mismo. De las ocho plantas en estudio únicamente *W. urens* var. *caracasana* y *S. lundellii* inhibieron la síntesis de pared celular.

El análisis estadístico de los resultados se realizó por medio de un análisis binomial, siendo las variables: éxito: inhibición (+), fracaso: crecimiento (-).

2. INTRODUCCION

Las infecciones que afectan la piel son muy comunes dentro de la población guatemalteca por las condiciones ambientales particulares y la falta de educación sanitaria, entre los causantes más frecuentes de dichas infecciones están los hongos *Trichophyton rubrum*, *Mycrosporium canis* y *Epidermophyton floccosum*, encontrándose algunos hongos oportunistas, entre ellos *Candida albicans* - que ocupa el primer lugar - seguido por *Cryptococcus neoformas* y *Aspergillus flavus* .

La población que más frecuentemente padece estas infecciones no cuenta con los recursos económicos para cubrir sus necesidades de salud, sobre todo porque los antifúngicos son caros, de uso prolongado y algunos tienen efectos secundarios en el ser humano, lo que hace necesario el estudio de alternativas terapéuticas seguras y que sean de fácil acceso a la población.

El presente estudio pretende comprobar la actividad antifúngica de extractos vegetales (*Bixa orellana*, *Byrsonima crassifolia*, *Eupatorium semialatum*, *Lippia graveolens*, *Psidium guajava*, *Smilax lundelli*, *Solanum americanum* y *Wigandia urens* var. *caracasana*) y establecer si el mecanismo de acción induce la inhibición de la síntesis de la pared celular. Para ello se usará el ensayo del hongo *Neurospora crassa* IM70 ATCC 9279, el cual forma esporas que al ser enfrentadas contra inhibidores de la síntesis de pared celular presentan una inhibición del crecimiento de las hifas, dando como resultado protoplastos que se pueden poner de manifiesto por procedimientos *in vitro*. El que un extracto vegetal tenga actividad antifúngica por un procedimiento dependiente o la inhibición de la pared celular es un buen indicador de baja toxicidad en el humano.

3. ANTECEDENTES

3.1. Monografía de las plantas a utilizar

Se han hecho varios estudios sobre plantas usadas popularmente para el tratamiento de infecciones y que contienen principios antimicrobianos que ejercen acción contra la vida y desarrollo de microorganismos responsables de infecciones cutáneas. Entre las más importantes tenemos:

3.1.1. Familia Asteraceae

3.1.1.1. *Eupatorium semialatum* Benth.

3.1.1.1.1. Nombres comunes: Bacché, Baqcé, Barretillo, Chicajol, Hoja Lisa.

3.1.1.1.2. Descripción botánica y hábitat: Arbusto de 1.5-6 m de altura, raíces semileñosas y ramificadas. Hojas gruesas, opuestas, angostamente lanceoladas, 4-12 cm de ancho, ápices agudos, más o menos serradas, verde oscuro con vellosidades. Inflorescencias en racimos o cabezuela de 6-7 mm de largo, redondeados, muy ramificados con vellosidades café. Flores fragantes, menudas, blancas o rosadas nacarado (1,2). Nativo del sur de México y Centro América. En Guatemala se ha descrito en los departamentos de Alta Verapaz, Baja Verapaz, Chimaltenango, Chiquimula, El Progreso, Guatemala, Jalapa, Quetzaltenango, San Marcos y Zacapa (1,2).

3.1.1.1.3. Usos tradicionales: La decocción de las hojas se utiliza popularmente en Guatemala, especialmente en Alta Verapaz, para tratar la diabetes (3),

enfermedades gastrointestinales (dolores de estómago, inflamación intestinal) (4,5), dolor de cabeza, cuerpo y huesos, enfermedades de la sangre y de los riñones, inflamación del hígado, paludismo, tos y tosferina (4,6,7). Se dice que es magnífico para el tratamiento de cólico en la medicina veterinaria (8).

3.1.1.1.4. Estudios realizados como biocida: Los extractos de las hojas tienen actividad antimicótica contra *E. floccosum*, *M. gypseum* y *T. rubrum* con una concentración inhibitoria mínima (CIM) de 5 mg/ml; contra *C. albicans* tiene una CIM de 10 mg/ml (8).

3.1.1.1.5. Composición química: No se han realizado estudios sobre la composición química.

3.1.2. Familia: Bixaceae

3.1.2.1. *Bixa orellana* L.

3.1.2.1.1. Nombres Comunes: Achiote, Achiote Colorado, Bicha, Cuajachote, kurub, Xayau (quekch').

3.1.2.1.2. Descripción botánica y hábitat: Arbol de 3-9 m de altura. Hojas verdes, delgadas, acorazonadas u ovaladas, 8-20 cm de largo y 4-15 cm de ancho. Flores blancas o lila de cáliz peludo. Cápsula de la semilla de 3-4 cm de largo, ovoides o cónicas, café rojizo o amarillo. Nativo del continente americano. Se cultiva por su producción de colorante en Alta Verapaz, Baja Verapaz, Chimaltenango, Chiquimula, El Progreso, Escuintla, Izabal, Jutiapa, Quetzaltenango, Sacatepéquez, Santa Rosa y Zacapa (9).

3.1.2.1.3. Usos tradicionales: La maceración y decocción de semillas con azúcar se toma para eliminar la astenia, debilidad (10), diabetes, gripe (11), enfermedades de transmisión sexual (10,11), diarrea, ictericia, hemorroides y oliguria (12). Las semillas hervidas con leche alivian las torceduras y traumatismos (10,13). La decocción de la raíz se utiliza para aliviar ictericia y oliguria (12,11). Las hojas molidas liberan una pequeña cantidad de goma que se toma como diurético, purgante y para tratar la gonorrea. El aceite de las semillas se usa en Centro América en el tratamiento de la lepra. A las semillas se les atribuye propiedad afrodisíaca (15,16), a las hojas actividad antiinflamatoria, diurética, emenagoga (10), emética y hepatotropa (12).

3.1.2.1.4. Estudios realizados contra bacterias y hongos: La maceración etanólica de la raíz posee actividad contra *Salmonella typhi*, no así contra *E. coli*, *Salmonella enteriditis*, *Shigella. dysenteriae* y *Shigella flexneri* (16). Los extractos etanólicos al 50-80 por ciento de la hoja y corteza de *B. orellana* mostraron una CIM de 10 mg/ml contra *E. floccosum*, *M. gypseum* y *T. rubrum* (17). La infusión de hoja presentó acción inhibitoria *in vitro* contra *Trichomonas vaginalis* (18).

3.1.2.1.5. Composición química: El extracto acuoso de la pulpa roja de la semilla contiene 1,000-2,000 UI/g de vitamina A, proteínas, β -caroteno y otros carotenoides, entre los cuales los más abundantes son bixina y norbixina (10). En las hojas se informa la presencia de algunos alcaloides supuestamente tóxicos no caracterizados, flavonoides y un hidrocarburo sesquiterpénico tetracíclico llamado ishwarano (6).

3.1.3. Familia Malpighiaceae

3.1.3.1. *Byrsonima crassifolia* HBK.

3.1.3.1.1. Nombres comunes: Nance, Chi, Craboo, Nanche, Nanzón, Tapal, Zacpah.

3.1.3.1.2. Descripción botánica y hábitat: Arbol de 3 a 10 m de altura de corteza áspera y verrugosa. Las hojas son siempre verdes de 4 a 15 cm de ancho y de 5 a 20 cm de largo de forma oval o elíptica, su ápice es puntiagudo y la base redondeada. La fruta es globular, de 8 a 12 mm de ancho, de color amarillo-café, con carnosidad blanca, de jugo ácido y olor parecido a chinche. Nativo de México, Centro, Sur América y el Caribe. En Guatemala se ha descrito en Alta Verapaz, Baja Verapaz, Chiquimula, El Progreso, El Quiché, Escuintla, Huehuetenango, Izabal, Jalapa, Jutiapa, Petén, Quetzaltenango, Retalhuleu, San Marcos, Santa Rosa, Suchitepéquez y Zacapa (19-21).

3.1.3.1.3. Usos tradicionales: El cocimiento de la corteza y flores se usa para tratar enfermedades respiratorias (amigdalitis, asma, bronquitis, fiebre, tos) (20,22,24) digestivas (cólico, diarrea, disentería, estreñimiento, indigestión) (25,26) y dermatomucosas (estomatitis, leucorrea, piodermia, tinea, úlcera) (7,16,22,27,28).

3.1.3.1.4. Estudios realizados contra bacterias y hongos: La actividad antibacteriana *in vitro* demuestra que la maceración hidroalcohólica de la corteza es activa contra enterobacterias (*S. typhi*, *S. flexneri*) (26,30), *Streptococcus pneumoniae* y *S. pyogenes* (16,32,33). En estudios posteriores se confirmó la actividad contra

estas bacterias, los disolventes que mejor extraen la actividad son etanol y acetona y la CIM del extracto acetónico para *S. pyogenes* fue de 1 mg/ml (27).

Estudios de la actividad antifúngica demuestran que la maceración hidroalcohólica de la corteza tienen actividad contra *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* y *C. stellatoidea*, con una CIM de 1-2 mg/ml (33). La decocción de la corteza tiene actividad contra seis dermatofitos ensayados, con una CIM de 200 mg/ml (34). Se confirmó que el extracto etanólico tiene actividad contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *S. flexneri* y *S. pyogenes*; en la confirmación antidermatofítica, tanto la corteza como los frutos secos fueron activos contra tres dermatofitos patógenos al hombre (35).

3.1.3.1.5. Composición química: La corteza tiene 20-30% de taninos, 2.7% de ácido oxálico y glucósidos (5,6); tamizaje fitoquímico de las hojas indica saponinas, esteroides insaturados, cardenólicos, bufadienólicos, flavonoides, leucoantocianinas, taninos, polifenoles (36) y triterpenoides (birsonimol) (36).

3.1.4. Familia Myrtaceae

3.1.4.1 *Psidium guajava* L.

3.1.4.1.1. Nombres comunes: Guayaba, Cak, Ch'amxuy, Coloc, Patá, Posh (37).

3.1.4.1.2. Descripción botánica y hábitat: Arbol de 10 m de alto, tronco de 20-25 cm de diámetro, corteza suave, produce escamas que caen. Hojas verdes elípticas u oblongas, 5-15 cm de largo, múltiples venas horizontales conspicuas. Flores axilares blancas, 3-4 cm de ancho. Frutos aromáticos, cáscara amarilla, semillas color café

claro, 3-5 mm de largo, redondas y duras. Nativo de América tropical. En Guatemala se encuentra en todo el país, particularmente en Baja Verapaz, Chimaltenango, Chiquimula, Jutiapa, Santa Rosa y Suchitepéquez (37).

3.1.4.1.3. Usos tradicionales: A las hojas y corteza se les atribuye propiedad antibacteriana, antiemética, antiinflamatoria, antihelmíntica, antiséptica, antitusiva, astringente, carminativa, espasmolítica y tónica (6,12,23). El fruto se usa para aliviar la congestión respiratoria, se le atribuye propiedad astringente, febrífuga y desinflamante (3,6,38); por vía tópica se recomienda para tratar afecciones de la piel y lengua inflamada (12). La decocción de hojas y corteza se usa para tratar enfermedades dermatomucosas (fístulas, leucorrea, piodermia, raspones, tinea, úlcera) y diabetes (39).

3.1.4.1.4. Estudios realizados contra bacterias y hongos: Estudios antibacterianos *in vitro* demuestran que la tintura de las hojas es activa contra *S. dysenteriae*, *E. coli*, *S. typhi*, *S. aureus*, *S. pneumoniae* (16,27), *S. flexneri* y *P. aeruginosa* (40). Estudios antifúngicos *in vitro* demuestran que la tintura de las hojas tiene actividad contra *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* y *C. stellatoidea* con una CIM de 1-2 mg/ml (33). La decocción de las hojas se tiene actividad únicamente contra *E. floccosum* de seis dermatofitos patógenos ensayados (34). El extracto acuoso de raíz y hojas es antibacteriano (41), actividad atribuida a los flavonoides (avicularina, guayaverina y quercetina) (42,43).

3.1.4.1.5. Composición química: Toda la planta es rica en taninos (hojas, 9-12%; corteza, 26-32%) (44). El aceite esencial contiene hidrocarburos sesquiterpénicos triterpenoides, flavonoides, leucocianidina y derivados de ácido gálico. La corteza contiene hasta un 10% de elagitaninos (45). El fruto es rico en ácido ascórbico y

taninos, contiene proteína, carbohidratos, grasas digeribles (45). La raíz contiene leucocianidina, esteroides y ácido gálico (46).

3.1.5. Familia Smilacaceae

3.1.5.1. *Smilax lundellii* Killip & Morton

3.1.5.1.1. Nombres comunes: Zarzaparrilla, Bejuco de la vida, Cocolmecha, Cuculmecha, Diente de Chucho, Palo de la vida.

3.1.5.1.2. Descripción botánica y hábitat: Enredadera de ramas inferiores firmes, robustas, cilíndricas, estriadas, con espinas fuertes, glabras o pilosas, ramas superiores sin espinas, peciolo de 1-2.5 cm de largo, articulados; rizomas leñosos de intenso color rojo. Hojas lanceoladas, verde-café. Pedúnculo fructoso de 7-10 mm de largo. Nativa de México y Centro América. En Guatemala se ha descrito en Alta Verapaz, Izabal, Petén, San Marcos y Santa Rosa (47,48).

3.1.5.1.3. Usos tradicionales: El cocimiento del rizoma se usa vía oral se usa para tratar anemia, afecciones digestivas (diarrea, dolor de estómago, inapetencia) (26,49), diversas afecciones dermatomucosas (alergia, eczema, liquen plano, tinea, psoriasis) (3,6,23,47,50).

3.1.5.1.4. Estudios realizados contra bacterias y hongos: Estudios de la actividad antifúngica *in vitro* demuestran que la decocción y el extracto etanólico del rizoma de *S. lundellii* tiene actividad contra *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* y *C. stellatoidea*, con una CIM de 1-2 mg/ml (51). La decocción del rizoma tiene actividad

contra *E. floccosum* y *T. mentagrophytes* (34). El extracto de hojas es efectivo en el tratamiento de la candidiasis vaginal (52).

3.1.5.1.5. Composición química: El tamizaje fitoquímico preliminar indica la presencia de alcaloides, aceite esencial, esteroides insaturados, glicósidos esteroidales (saponinas, cardenólicos, bufadienólicos), flavonoides, leucoantocininas, taninos, polifenoles, resinas, azúcares y grasas (48). La actividad antimicrobiana se atribuye a las saponinas, pero en particular la sarsasapogenina y parrillina. La parrillina es una saponina neutra, de peso molecular 1,000, con actividad antimicótica (*C. albicans* CIM 16 mg/ml y *Trichophyton* sp. CIM 4 mg/ml) y antitumoral (53).

3.1.6. Familia Solanaceae

3.1.6.1. *Solanum americanum* Miller

3.1.6.1.1. Nombres comunes: Quilete, Macuy, Hierba mora, Chichiquelite.

3.1.6.1.2. Descripción botánica y hábitat: Hierba de 1 m de alto, tallo pubescente. Hojas en pares o solitarias, 3-14 cm de largo, lanceoladas. Flores en cáliz de 1-2 mm, lóbulos ovalados, limbo partido, 5-8 mm de ancho. Frutos globosos, negros al madurar, 4-8 mm de diámetro; semillas pequeñas. Nativa de América. En Guatemala se encuentra en Alta y Baja Verapaz, Chimaltenango, Chiquimula, Escuintla, Guatemala, Huehuetenango, Jutiapa, Petén, Retalhuleu, Sacatepéquez, San Marcos, Santa Rosa, Suchitepéquez y Zacapa (53).

3.1.6.1.3. Usos tradicionales: El cocimiento de hojas y fruto tiene amplio uso medicinal. La decocción de hojas se usa por vía tópica para el tratamiento de

afecciones dermatomucosas (abscesos, acné, dermatitis, eczema, erisipela, exantema, heridas, leucorrea, llagas, mezquinos, pústulas, tinea, úlcera y vaginitis) (3,6,23,29,54,55). Se le atribuye propiedad aperitiva, calmante, sedante y vulneraria (3,6,19,29,55,56). Por vía oral se usa en el tratamiento de asma, amigdalitis, anemia y cirrosis (23).

3.1.6.1.4. Estudios realizados contra bacterias y hongos: Estudios antibacterianos *in vitro* demuestran que la decocción de las hojas tiene actividad antibiótica contra *S. aureus* (30,31). La decocción y la maceración hidroalcohólica de las hojas tiene actividad contra *C. albicans* (57), y *C. neoformans* (58). La decocción de las hojas tiene actividad contra los seis dermatofitos ensayados, la CIM es de 100-300 mg/ml, demostrándose actividad fungicida (34).

3.1.6.1.5. Composición química: Planta de composición compleja, aunque poco estudiada, contiene alcaloides (solasodina, solasonina, glucoalcaloides) y alcalinas (6).

3.1.7. Familia Hydrophyllaceae

3.1.7.1. *Wigandia urens* var. *caracasana* HBK.

3.1.7.1.1. Nombres comunes: Chocón o Tabaco bobo.

3.1.7.1.2. Descripción botánica: Arbusto de 2 a 5 m de alto, tallo herbáceo, con pelusilla blanca, hojas alternas, tallo acanalado, 5-60 cm de largo, indentado en la base, agujas en el peciolo. Flores moradas de 1-2 cm de ancho, 5 estambres. Cápsula oblongo-cónica, 8 mm de largo, bivalva. Semillas numerosas, pequeñas, rugosas, café

(58). Nativo de México a Perú. En Guatemala se encuentra en Alta Verapaz, Chimaltenango, Guatemala, Huehuetenango, Quetzaltenango, Quiché, Sacatepéquez, San Marcos y Santa Rosa (59).

3.1.7.1.3. Usos tradicionales: La infusión de hojas y flores se usa para diarrea, inapetencia e indigestión (3,44).

3.1.7.1.4. Estudios realizados como biocida: La flor demostró la mayor acción antimicótica contra *A. flavus*, *E. floccosum*, *M. gypseum* y *T. rubrum*. El extracto etanólico de la hoja y flor mostraron una CIM de 10 mg/ml contra *E. floccosum*, *M. gypseum* y *T. rubrum* (18).

3.1.7.1.5. Composición química: No se conocen estudios fitoquímicos sobre esta planta.

3.1.8. Verbenaceae

3.1.8.1. *Lippia graveolens* HBK.

3.1.8.1.1. Nombres comunes: Orégano.

3.1.8.1.2. Descripción botánica y hábitat: Arbusto de 2 m con una forma de crecimiento abierta, hojas pequeñas de 3 cm., las flores son blancas, en espigas de 4 cm., toda la planta tiene un olor agradable (20). Es nativa de Guatemala, la encontramos en la aldea Casa de Pinto, (Río Hondo, Zacapa) (20). Se ha adaptado al cultivo en Chimaltenango y Escuintla.

3.1.8.1.3. Usos tradicionales: Popularmente es usada para asma, bronquitis, influenza, laringitis, pleuresía, tuberculosis y enfermedades de la piel. También se le atribuye propiedad anestésica, tranquilizante, antipalúdica y diurética. (20)

3.1.8.1.4. Estudios realizados contra bacterias y hongos: El extracto acuoso de la hoja presentó actividad a 10 mg/ml contra *E. floccosum*, *M. gypseum* y *T. rubrum*. El extracto etanólico inhibió a *M. gypseum* y *T. rubrum* y se logró inhibición de *A. flavus* con una concentración de 10 mg/ml de dicho extracto (60).

3.1.8.1.5. Composición química: Contiene aceite esencial compuesto por carvacrol de color amarillo, olor fuerte y muy picante (61).

3.2. Hongos que serán estudiados en este trabajo

3.2.1. *Candida albicans*

3.2.1.1. Micología: Levaduras elipsoidales de 3 a 6 mm de tamaño, forman parte de la microbiota gastrointestinal. Crece en agar Sabouraud y Mycosel y produce clamidosporas en agar harina de cereal (62).

3.2.1.2. Clínica y epidemiología: Provoca infección a nivel de boca, vagina, piel, uñas, pulmones y otros órganos (63). Su incidencia está siendo grandemente incrementada con el uso de antibióticos de amplio espectro, corticosteroides inmunosupresores y agentes antitumorales. La fungemia ocurre frecuentemente en pacientes con catéter y puede provocar endocarditis o pielonefritis en pacientes que reciben transplantes de órganos (64).

3.2.2. *Cryptococcus neoformans*

3.2.2.1. Micología: Los hongos del género *Cryptococcus* aparecen como células esféricas que se reproducen por gemación, no obstante en determinadas condiciones de cultivo algunos elementos aislados de *C. neoformans* producen estructuras morfológicas que hacen que se incluyan en la clase Basidiomicetes. Todas las cepas producen cápsula y algunas de ellas son mayores que la célula a la que envuelven (65).

3.2.2.2. Clínica y epidemiología: La criptococosis es una infección micótica oportunista subaguda y crónica, que compromete primariamente el cerebro, meninges y los pulmones; a veces puede afectar la piel y otras partes del organismo. El *C. neoformans* fue aislado por Sanfelice en 1894 del zumo de durazno y en 1950 Emmons comunicó el aislamiento de cepas virulentas del suelo de corrales y se determinó que el estiércol de paloma sirve como medio de enriquecimiento (66).

3.2.3. *Aspergillus flavus*

3.2.3.1. Micología: Es un hongo de naturaleza ubicua y es un contaminante frecuente del laboratorio. Crece rápidamente en muchos sustratos naturales y medios de cultivo de laboratorio. El abundante micelio aéreo se hace pulverulento y pigmentado a medida que produce conidias de color amarillo o verde.

3.2.3.2. Clínica y epidemiología: La inhalación de esporas o fragmentos miceliales puede provocar, en ciertos individuos, una respuesta de hipersensibilidad inmediata sin invasión del cuerpo; en ocasiones se observan infecciones clínicas como aspergilosis pulmonar de tipo grave e invasor o la infección generalizada, que se

observa cada vez con mayor frecuencia en pacientes inmunodeprimidos que reciben terapéutica con antibióticos o corticosteroides (66).

3.2.4. *Epidermophyton floccosum*

3.2.4.1. Micología: Es un hongo antropofílico. Al examen directo con hidróxido de potasio al 10% se observan finos filamentos ramificados que forman cadenas delgadas en las lesiones más recientes. La colonia es de color amarillo verdosa, con un centro de color blanquecino, micelio fino, delgado; el reverso de la colonia es de color castaño amarillento, presenta macroconidias en forma de mazo con 1-5 células (67).

3.2.4.2. Clínica y epidemiología: *E. floccosum* es el causante principal de tinea cruris. En Guatemala ocupa el tercer lugar de frecuencia entre las micosis cutáneas, según etiología, como causante de tinea (68).

3.2.5. *Microsporum gypseum*

3.2.5.1. Micología: Colonia color canela de crecimiento rápido aspecto pulverulento y de superficie áspera; en el reverso es de color pardo claro (67). Su identificación se basa en la observación de macroconidias de pared delgada rugosa, elípticas y multitabecadas (67).

3.2.5.2. Clínica y epidemiología: *M. gypseum* ataca la piel, el pelo y uñas. En Guatemala ocupa el quinto lugar de frecuencia entre las micosis cutáneas, según etiología, como causante de tinea (68).

3.2.6. *Trichophyton rubrum*

3.2.6.1. Micología: Colonia algodonosa de crecimiento lento, rosada plana o abultada en el centro, pueden tener mucho o poco micelio. En el reverso es de color rojo oscuro (67).

3.2.6.2. Clínica y epidemiología: Es el causante de tinea pedis, tinea corporis y onicomycosis (68). En Guatemala ocupa el primer lugar en frecuencia entre las micosis cutáneas, según su etiología, como causante de tinea (68).

3.3. Técnicas *in vitro* para demostrar actividad antifúngica

Para el estudio de la acción antifúngica en plantas medicinales se han utilizado métodos de dilución, difusión y, actualmente, bioautográficos. Todos estos métodos se ven influidos por factores como volumen del inóculo, método de extracción, composición del medio de cultivo y temperatura de incubación (69).

Los métodos de difusión se realizan en la superficie del agar y utilizan un disco, agujero o cilindro como reservorio y la muestra no requiere una dispersión en agua. El reservorio contiene la muestra a ser probada, que podrían ser bacterias o levaduras (69).

Los métodos de dilución requieren una dispersión homogénea de la muestra, que puede ser en agua o en agar. Se usan para determinar principalmente los valores de CIM de extractos, aceites o sustancia pura. En la dilución líquida la turbidez se toma como indicador de densidad bacteriana, el grado de inhibición está relacionado con la turbidez del medio y se mide por espectrofotometría. Si se usa la dilución en

agar, una cantidad determinada de la substancia se mezcla con el agar, se deja endurecer y se agrega el microorganismo; si no hay crecimiento la substancia tiene actividad antimicrobiana (69). Mitscher y colaboradores proponen un nuevo método de siembra por estrías en agar para determinar la actividad antimicrobiana (70).

Los métodos bioautográficos se basan en la técnica de difusión en agar; el compuesto antifúngico se transfiere desde una capa de cromatografía a una caja de agar inoculada, las zonas de inhibición se visualizan por reactivos que detectan la actividad de la deshidrogenasa. La ventaja principal es que se tiene una buena indicación sobre la naturaleza química del principio activo (69).

3.4. Técnicas para determinar el mecanismo de acción antifúngico.

Entre las técnicas para determinar el mecanismo de acción antifúngico se pueden mencionar:

- 3.4.1. Ensayos con células enteras (*C. albicans*, *Aspergillus niger* y *Saccharomyces cerevisiae*) en caldo o agar.
- 3.4.2. Ensayos de células blanco enteras (pared celular).
- 3.4.3. Regeneración protoplásmica (ensayos con *N. crassa*).
- 3.4.4. Inhibición del crecimiento de hifas (71).
- 3.4.5. Ensayos con mutantes osmóticos sensibles a temperatura (72).
- 3.4.6. Ensayos inhibiendo el sistema enzimático de síntesis de quitina
- 3.4.7. Ensayos *in vitro*
 - 3.4.7.1. Síntesis de glucógeno
 - 3.4.7.2. Síntesis de quitina
 - 3.4.7.3. Síntesis de manoproteínas

3.5. Ensayo de protoplastos de *Neurospora crassa* IM70, ATCC 9279

3.5.1. Descripción de *N. crassa* : Es un ascomiceto que suele conocerse como moho rojo del pan. Su crecimiento vegetativo se asemeja al de los hongos filamentosos; el micelio incluye hifas ramificadas, multinucleadas y conidios asexuales en el extremo de los conidióforos libres. Se producen esporas sexuales en los ascos después de interacción o entrecruzamiento de dos tipos de gametos (A y a). Microscópicamente se observan numerosos ascos, que son sacos alargados, que contienen disposición lineal de ocho ascosporas que provienen por igual de las cepas originales. La fecundación del gameto femenino se lleva a cabo por cualquier elemento de la hifa de la cepa masculina.

La colonia es vellosa blanca, su reverso naranja pálido. La utilidad de *N. crassa* en la investigación genética proviene de la posibilidad de inducir mutaciones al radiar conidios con rayos X y usar las esporas tratadas. *N. crassa* de tipo silvestre crece en un medio simple que contenga sales minerales, azúcar y biotina. Los mutantes crecerán al fortificar el medio con aminoácidos, purinas y pirimidinas.

3.5.2. Base del ensayo de protoplastos de *N. crassa* IM70, ATCC 9279: Cuando *N. crassa* crece en presencia de inhibidores de la pared celular el crecimiento de la hifas se inhibe y los hongos crecen como "protoplastos". Esto ha sido usado para establecer un ensayo simple en células enteras (71).

Aunque el término protoplastos fue usado en el trabajo original de Fukuda, estas células probablemente no son "protoplastos" sino hifas muy cortas y altamente ramificadas. Los discos impregnados con el extracto se ponen sobre las placas sembradas con esporas de *N. crassa*; las zonas de los discos con inhibidores de la

síntesis de pared celular presentan una apariencia moteada, mientras que los que actúan por otros mecanismos que no inhiben la síntesis de pared celular (nistatina o quetoconazoles) producen zonas claras (71).

La pared celular sirve como barrera protectora y es indispensable para el crecimiento y viabilidad de los hongos. Esta se encuentra formada por manoproteínas, β -glucano, membrana plasmática, etc., componentes que no se encuentran en las células humanas; de allí su importancia como blanco específico. El β -glucano únicamente está presente en eucariotes, por lo que representa un blanco ideal para agentes antifúngicos efectivos pero sin riesgo en el ser humano. La papulacandina, disacárido espirocíclico acetilado, es un compuesto obtenido a partir de productos naturales que inhiben la biosíntesis de β -glucano (71).

4. JUSTIFICACIONES

Guatemala posee gran variedad de plantas medicinales, muchas de éstas son utilizadas para el tratamiento de micosis cutáneas, afecciones que por las condiciones climáticas y socioeconómicas del país son muy comunes dentro de la población tanto rural como urbana. Las drogas a utilizar son de uso prolongado, causan efectos secundarios y en algunos casos resistencia. En los últimos años se han realizado estudios de tamizaje de la actividad antifúngica de plantas usadas con estos fines, con los cuales se ha demostrado que sí existe acción tóxica contra microorganismos patógenos, provocada por los extractos obtenidos de algunas partes de las plantas; ahora queda por determinar a que nivel actúan estos extractos para ejercer su acción.

La pared celular se encuentra en las células fúngicas pero no en las células humanas, por lo que la inhibición de la síntesis de la pared celular es un mecanismo de acción de drogas antifúngicas que no provocaría efectos secundarios en el hombre, dando como resultado un medicamento de uso recomendado. Por esta razón es necesario estudiar entre los extractos vegetales cuales poseen esta actividad ya que obtendríamos medicamentos mas seguros y efectivos.

PROPIEDAD DE
INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
VENEZUELA

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

- 5.1.1. Contribuir a validar la efectividad de las plantas medicinales usadas popularmente para el tratamiento de micosis cutáneas.

5.2. Objetivos Específicos

- 5.2.1. Confirmar la actividad antifúngica contra *C. albicans*, *C. neoformans*, *A. flavus*, *T. rubrum*, *E. floccosum* y *M. gypseum* de los extractos obtenidos de las plantas *B. orellana*, *B. crassifolia*, *E. semialatum*, *L. graveolens*, *P. guajava*, *S. lundellii*, *S. americanum*, *W. urens* var. *caracasana*.
- 5.2.2. Estandarizar el ensayo de formación de protoplastos de *N. crassa* para las condiciones de laboratorio de Guatemala.
- 5.2.3. Determinar si el mecanismo de acción de los extractos vegetales es por inhibición de síntesis de la pared celular.

6. HIPOTESIS

Por lo menos una de las plantas con actividad antifúngica a estudiar, tiene como mecanismo de acción la inhibición de la síntesis de la pared celular.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1. Universo de trabajo

Plantas utilizadas en Guatemala en el tratamiento de micosis cutáneas.

7.2. Muestra

Extractos etanólicos concentrados de nueve plantas usadas popularmente en Guatemala que tienen alguna actividad antifúngica (Anexo 1) y cepa de *N. crassa* IM70 ATCC 9279. que forma protoplastos en condiciones experimentales.

7.3. Recursos

7.3.1. Humanos

Investigadora: Claudia Regina Morales Ortiz

Asesor: Lic. Armando Cáceres Estrada.

7.3.2. Materiales

7.3.2.1. Recursos Físicos

Laboratorio de Productos Fitofarmacéuticos FARMAYA.

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos.

7.3.2.2. Equipo y cristalería

Frascos de vidrio color ámbar	Incubadora
Mechero	Balanza analítica
Campana bacteriológica	Asa de nicromo calibrada
Rotavapor	Estufa eléctrica
Papel filtro Whatman No.1	Autoclave
Filtros Millipore 0.45 mm	Hisopos estériles
Cajas de petri de 100 mm por 15 mm	Gradilla para 24 tubos
Agitadores de vidrio	Pipetas serológicas de 10 ml
Tubos con tapón de rosca	Erlenmeyer de 250 y 500 ml
Micropipetas de 5-40 ml, 40-200 ml	Probeta graduada de 50 ml

7.3.2.3. Medios

Agar Micosel	Agar Muller-Hinton
Agar Sabouraud	Agar Sabouraud Takashio
Caldo Trypticase Soya	Caldo Nutritivo
Medio para discos	

7.4. Procedimiento

7.4.1. Se recolectó, herborizó y clasificó cada una de las plantas.

7.4.2. Se lavó, secó y pulverizó los órganos de las plantas estudiadas.

7.4.3. Se agregó 90 ml de etanol al 50% a 10 gr de órgano de las plantas se dejó en reposo por 24 h. y se realizó cambio del alcohol durante tres días, el cual se extrajo con rotavapor hasta obtener consistencia de melcocha.

7.4.4. Ensayo de la actividad antilevadura

7.4.4.1. Se preparó el medio para levaduras, según el método de Mitscher *et al.* (69): Se utilizó 3.6 ml de Agar Muller-Hinton y se agregó 0.4 ml del extracto de cada planta (dilución 1:10). Se vertió en caja de petri tipo cuadrilate, se incubó a 35°C las que no presentaron contaminación se almacenaron a 4°C.

7.4.4.2. Se Inoculó una asada del cultivo puro microbiano en un tubo con 5 ml de Caldo Tripticasa Soya para *C. albicans* y Caldo Nutritivo para *C. neoformans*. Se incubó a 35 °C durante 48 h, se diluyó 1 ml de la suspensión en 9 ml de agua destilada estéril dilución 1:10 (ADE).

7.4.4.3. Se inocularon dos asadas de la suspensión en cada cuadrante, se dejó reposar durante 5 a 10 minutos y se incubó a 35°C durante 24 h.

7.4.4.4. Interpretación de resultados: Se observó e interpretó así:

No hay crecimiento: Actividad positiva (+ = positivo).

Hay crecimiento homogéneo: Actividad negativa (- = negativo)

Presencia de microorganismos fuera de la inoculación: Contaminación

7.4.5. Ensayo de la actividad antifúngica (hongos filamentosos)

7.4.5.1. Se preparó el Agar planta para hongos, según la Técnica de McRae *et al* (73): Se mezcló 1.5 ml del extracto vegetal con 13.5 ml de agar Sabouraud, se vertió en cajas de petri y se incubó a 27°C.

7.4.5.2. Se obtuvieron esporas del hongo, según el método de Takashio (74): Se preparó Agar Sabouraud modificado según la técnica de Takashio; se inoculó el hongo en estudio y se incubó a 27°C durante 15 días. Se agregó 3 ml de agua estéril a cada caja y se raspó con una varilla de vidrio estéril para hacer una suspensión homogénea del hongo; se mezcló esta suspensión en un Vórtex durante un minuto. Se realizó un conteo de esporas en una cámara de Neubauer para llevarlo a una concentración de 300 esporas/ml. Se almacenó en viales a 4°C hasta su utilización.

7.4.5.3. Se perforaron cuatro pozos de 6 mm de diámetro; se inoculó 30 ml de la suspensión de esporas, de igual manera se inoculó un caja con Agar Sabouraud como control del crecimiento de los hongos en estudio; se incubó a 27°C durante 15 días.

7.4.5.4. Interpretación de resultados: Después de 15 días de incubación, se midieron los diámetros de los halos de crecimiento de las colonias alrededor de cada inóculo, se calculó el porcentaje de inhibición comparando el diámetro de crecimiento de las colonias control y se tomó como positivos aquellos extractos de la planta que redujeron el diámetro de la colonia control en un 75%.

7.4.5.5. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM): la primera concentración fue 10 mg/ml y luego 5, 2.5 y 1.2 utilizando la misma metodología.

7.4.5.6. Ensayo de formación de protoplastos de *N. crassa*: Se autoclaveó el medio para discos (Anexo 2), se dejó enfriar hasta 40°C, se añadió 15 ml de inóculo de esporas a cada 15 ml de medio para discos, se agitó y vertió en cajas de petri, se dejó solidificar. Se aplicó el extracto vegetal en discos de papel filtro de 6 mm de diámetro y se colocaron sobre el medio sólido, se utilizó como control negativo discos con 10 ml de anfotericina B.

7.5. Diseño Estadístico

7.5.1. Número de replicas: Para determinar la inhibición de síntesis de pared celular, se utilizaron por conveniencia cuatro réplicas para cada uno de los macerados vegetales. Al tener todas las réplicas positivas (+) se concluyó que la planta sí tiene efecto ($p < 0.05$), de lo contrario se tomaron como negativas (-) o sea que no tuvo efecto ($p > 0.05$).

7.5.2 Análisis de datos: Los datos fueron analizados mediante una prueba de hipótesis binomial utilizando la hipótesis estadística

$H_0: p = q$ (probabilidad de éxito = probabilidad de fracaso) = No efecto

$H_a: p = q$ (probabilidad de éxito > probabilidad de fracaso) = Sí efecto

Se utilizó como criterio el siguiente

- Todas las réplicas positivas (+) = Sí efecto
- Algunas réplicas negativas (-) = No efecto

Se rechazó H_0 concluyendo que sí tiene efecto. Por lo tanto el criterio de clasificación fue como positivo o negativo, cada ensayo se comparó con un solo control (agar sin extracto) y un fármaco (para validar el bioensayo y por ende los resultados).

8. RESULTADOS

Se confirmó la actividad antifúngica *in vitro* de ocho plantas utilizadas por la población guatemalteca para tratar afecciones de la piel.

La primera fase fue la determinación de la acción antifúngica, usando una concentración de 10 mg/ml, con cuatro repeticiones, tomando como positivos los extractos que inhibieron el crecimiento en un 75% con relación al control negativo; luego se disminuyó la concentración de los extractos positivos hasta que el extracto no presento acción. Los resultados de esta primera fase se observan en el cuadro siguiente:

ACTIVIDAD ANTIFUNGICA DE OCHO EXTRACTOS VEGETALES

Extracto etanólico	Parte Usada	Hongos (CIM) mg/ml					
		A	B	C	D	E	F
<i>Eupatorium semialatum</i>	Hoja	>10	2.5	10	5	5	10
<i>Bixa orellana</i>	Hoja	>10	2.5	10	5	10	10
<i>Wigandia urens</i>	Flor	>10	2.5	10	5	5	10
<i>Byrsonima crassifolia</i>	Corteza	>10	2.5	10	5	5	5
<i>Psidium guajava</i>	Hoja	>10	1.2	10	5	10	10
<i>Smilax lundellii</i>	Rizoma	>10	1.2	5	1.2	1.2	1.2
<i>Solanum americanum</i>	Hoja	>10	1.2	5	1.2	1.2	1.2
<i>Lippia graveolens</i>	Hoja	>10	1.2	5	1.2	1.2	1.2

A: *Aspergillus flavus*, B: *Candida albicans*, C: *Cryptococcus neoformans*, D: *Epidermophyton floccosum*, E: *Microsporum gypseum*, F: *Trichophyton rubrum*.

En la segunda fase del estudio, ya determinada la CIM, se utilizó el ensayo de protoplastos de *N. crassa* IM 70 ATCC 9279 para establecer el mecanismo de inhibición. Los resultado de esta fase se observan en el cuadro siguiente:

MECANISMO DE ACCION DE OCHO EXTRACTOS VEGETALES

Extracto etanólico	Resultado
<i>Eupatorium semialatum</i>	--
<i>Bixa orellana</i>	--
<i>Wigandia urens</i> var. <i>caracasana</i>	+
<i>Byrsonima crassifolia</i>	--
<i>Psidium guajava</i>	--
<i>Smilax lundellii</i>	+
<i>Solanum americanum</i>	--
<i>Lippia graveolens</i>	--

Inhibición con formación de protoplastos (+), Inhibición sin formación de protoplastos (-).

9. DISCUSION DE RESULTADOS

El clima de Guatemala, la mayor parte del año cálido y húmedo, favorece el crecimiento y la propagación de hongos, por lo que la población del área rural esta siendo afectada por enfermedades que afectan la piel y mucosas. Pero los medicamentos de elección no siempre son accesibles por la población que los requiere. Esta población de escasos recursos económicos ha utilizado algunas plantas medicinales, en las que se ha comprobado actividad antifúngica.

Para verificar la actividad antifúngica se utilizó una técnica de dilución e inoculación por estrias para levaduras (69), y por inoculación de esporas en pocillos para hongos filamentosos (73), para dilucidar el mecanismo de acción de los extractos que se investigaron se realizó en ensayo de formación de protoplastos de *N. crassa*. La técnica de demostración y confirmación de la actividad antifúngica de la primera fase para hongos y levaduras resulto ser un método confiable y reproducible. El procedimiento para demostrar el posible mecanismo de acción resulto ser fácil de montar, pero se tuvo algun problema con la estandarización de la observación en los extractos positivos por carecerse de una droga control.

Se verificó que el extracto etanólico de las ocho plantas estudiadas presenta actividad antifúngica. Los extractos utilizados en los ensayos menciondos se efectuaron macerando la parte de planta seleccionada, en etanol y concentrando en rotavapor a consistencia de miel. Al reconstituir estos concentrados nuevamente en etanol no se solubilizaron completamente, debido probablemente a la desnaturalización de proteínas y a que no hubo una extracción previa con solventes menos polares.

La primera concentración ensayada fue de 10 mg/ml para todos los extractos y todos demostraron actividad contra cinco de los seis hongos ensayados, por lo que puede decirse que presentan un amplio espectro de acción. Tres de los extractos de las plantas *S. lundelli*, *S. americanum* y *W. urens* var. *caracasana* presentaron actividad contra los hongos *C. albicans*, *E. floccosum*, *M. gypseum* y *T. rubrum* hasta una concentración de 1.2 mg/ml. Los demás únicamente presentaron actividad antifúngica moderada lo que valida su uso popular, sin embargo, se comprobó que es necesario utilizarlos en una concentración aparentemente elevada.

La segunda fase consistió en la determinación del mecanismo de acción para lo cual se utilizó el ensayo de formación de protoplastos de *N. crassa* con algunas modificaciones. Las modificaciones efectuadas consistieron en utilizar luz artificial para lograr un mejor crecimiento del hongo en el medio; además se modificó el medio utilizando sacarosa en lugar de maltosa y en vez del agar se utilizó agar Sabouraud.

Los resultados obtenidos en el ensayo anterior $p < 0.05$ indican que únicamente dos de los extractos *S. lundelli* y *W. urens* var. *caracasana* inhibieron la síntesis de la pared celular presentando una zona moteada alrededor del disco que contenía el extracto, con lo que se demostró que su mecanismo de acción es la inhibición de la síntesis de la pared celular.

En estudios preliminares realizados paralelamente con este estudio y usando la misma técnica, se demostró que una de las plantas tiene acción similar (75).

El amplio uso de *S. lundelli* por la población en el tratamiento de afecciones de piel causados por hongos y levadura se ha puesto de manifiesto en varias publicaciones (3,6,23,47,50). El hecho que su posible mecanismo de acción sea por inhibición de la

inhibición de la pared celular es muy alentador en la búsqueda de nuevos productos fitofarmacéuticos, ya que esto indicaría una menor posibilidad de toxicidad para las células del huésped en tratamientos prolongados.

W. uresns var. *caracasana* es de menor uso por la población, pero no por eso sus resultados son menos interesantes, ya que es una planta de amplia distribución en el altiplano.

10. CONCLUSIONES

- 10.1. Se verificó que el extracto etanólico de *B. orellana*, *B. crassifolia*, *E. semialatum*, *L. graveolens*, *S. lundellii*, *S. americanum* y *P. guajava* presenta actividad antifúngica.
- 10.2. Los extractos etanólicos de *S. lundellii*, *S. americanum* y *W. urens* var. *caracasana* presentaron actividad antifúngica contra *C. albicans*, *E. floccosum*, *M. gypseum* y *T. rubrum* hasta una concentración de 1.2 mg/ml.
- 10.3. Los extractos etanólicos de las ocho plantas estudiadas durante la investigación no presentan actividad antifúngica contra el hongo *A. flavus*.
- 10.4. La técnica de demostración y confirmación de la actividad antifúngica para hongos filamentosos y levaduras es un método confiable y reproducible.
- 10.5. Los datos de esta investigación confirman la hipótesis planteada ya que los extractos etanólicos de *S. lundellii* y *W. urens* var. *caracasana* presentan como mecanismo de acción la inhibición de la síntesis de la pared celular.
- 10.6. El ensayo de *N. crassa* puede ser exacto y preciso siempre y cuando se cuente con un estándar específico para este mecanismo de acción.

11. RECOMENDACIONES

11.1. Realizar fraccionamiento bioguiado para evaluar el efecto inhibitorio de las fracciones obtenidas del extracto etanólico de *S. lundellii* y *W. urens* var. *caracasana*.

11.2. Determinar el principio activo, y efecto tóxico de los ocho extractos etanólicos estudiados.

11.3. Efectuar estudios *in vivo* que proporcionen mayores bases científicas, previo a los ensayos clínico, que conduzcan a la producción industrial y comercialización de las plantas con acción antifúngica.

11.4. Divulgar la información realizada en esta tesis y otros trabajos para que la población tenga confianza al utilizar la medicina natural y no sea engañada respecto a sus usos.

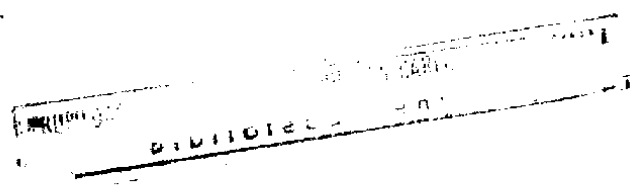
11.5. Realizar extracciones con solventes de menor polaridad en la materia prima vegetal para evitar la presencia de compuestos poco solubles en metanol que aumentan la complejidad química del extracto.

12. REFERENCIAS

1. Clewell AF. Las compuestas de Honduras. Ceiba.1975.19:191-192.
2. Williams LO. Flora of Guatemala. Fieldiana: Botany. 1976. vol 24(12):96-97.
3. Aspectos de la Medicina Popular en el área rural de Guatemala. Guatemala Indígena. 1978. 13:1-616.
4. Nelson CH. Plantas Comunes de Honduras. Tegucigalpa, Ed. Universitaria. 1986. 520p.
5. Mejía JV. Geografía de la República de Guatemala. Guatemala, Tipografía Nacional.1927. 140p.
6. Morton JF. Atlas of Medicinal Plants of Middle America. Springfield, Charles Thomas Publishers. 1981. 1420p.
7. Dieseldorf EP. Las plantas medicinales del departamento de Alta Verapaz. Guatemala, Tipografía Nacional. 1977. 40p.
8. Meza F. Actividad antimicótica de siete plantas nativas de uso medicinal del departamento de Alta Verapaz. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1995. 58p.
9. Standley PC, Williams LO. Flora of Guatemala. Fieldiana: Botany. 1964. 24(7):281p.

10. Robineau L. Towards a Caribbean Pharmacopoeia. Santo Domingo Enda-Caribe, UNAH. 1989. (p.61-65)
11. Sabiduría y Ciencia al servicio de la salud: Primer Congreso de Plantas medicinales. Chile, 90. Prisma Chile Ltda. 1990. 99p.
12. Ayensu ES. Medicinal Plants of the West Indies. Algonac, Reference Publications.1981. 136p.(p.53).
13. Palma LE. Contribución al estudio farmacológico de *Bixa orellana* (achiote) como hipoglucemiente. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1981. 31p.
14. Duke JA. Isthmian Ethnobotanic Dictionary. Thrid Edition. Jodrpus India: Scientific Publishers. 1986. (p.25).
15. Niembro A. Arboles y Arbustos Utiles de México. México, Editorial Limusa. 1990. (p.42)
16. Cáceres A, Samayoa B. Tamizaje de la actividad antibacteriana de plantas usadas para el tratamiento de afecciones gastrointestinales Cuadernos de investigación No. 6-89. Dirección General de Investigación Universidad de San Carlos de Guatemala.1989. 138p.
17. Salvador AL. Confirmación de la actividad antimicrobiana de *Bixa orellana* y *Wigandia urens* var *caracasana* . Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1994. 46p.

18. Cáceres A. *et al.* Actividad antimicrobiana de plantas usadas en Guatemala en el tratamiento de enfermedades de transmisión sexual. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Memorias IV Semana Científica, Facultad de Ciencias Químicas y farmacia) 1990. (p.A-1).
19. FAO. Especies forestales productoras de fruta y otros alimentos. 3 Ejemplos de América latina. Roma FAO. 1987. (p.49-51).
20. Ronquillo FA. *et al.* Especies vegetales de Uso actual y Potencial en alimentación y Medicina de las zonas Subáridas del Nororiente de Guatemala. Guatemala, USAC-DIGI,1989. (p.37-40, 222-223).
21. Standley PC, Steyermark JA. Flora of Guatemala. Fieldiana: Botany. 1946. 24(5)478-479.
22. Martínez M. Plantas Útiles de la Flora Mexicana. México. Ed. Botas.1959. (p.419-420).
23. Mendieta RM, del Amo S. Plantas Medicinales del Estado de Yucatán. Xalapa, INIREB.1981. (p.66, 288,311-312).
24. Nuñez E. Plantas Medicinales de Costa Rica y su Folcklore. San José. Universidad de Costa Rica, 1987. 184p.
25. Arnason T. *et al.* Maya medicinal plants of San Jose Succotz, Belize. J. Ethnopharmacol, 1980. 21:345-364.



26. Altschul S. Drugs and Foods from Little know plants. Cambridge, Harvard University Press.1983. (p.141-142)
27. Cáceres A, Samayoa B, Fletes L. Actividad antibacteriana de plantas usadas en Guatemala para el tratamiento de infecciones comunes. Cuadernos de investigación No. 4-90. Guatemala: Dirección General de Investigación Universidad de San Carlos. 1990. 138p.
28. Duke J. Isthmian Ethnobotanical Dictionary. Jodhpur, Scientific Pub. 1986. (p. 29).
29. Girón LM. Etnobotanical survey of the medicinal flora used by Caribs of Guatemala. J. Ethnopharmacol.1991. 34:173-187.
30. Cáceres A. *et al.* Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 1. Screening of 84 plants against enterobacteria. J. Ethnopharmacol. 1990. 30:55-73.
31. Cáceres A. *et al.* Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases. 1. Screening of 68 plants against enterobacteria. J. Ethnopharmacol. 1991. 31:193-208
32. Madariaga AL. Demostración *in vitro* de *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus pneumoniae* por extractos etanólicos de las plantas *Bougainvillea glabra* Choisy (buganbilia), *Byrsonima crassifolia* L .(nance), *Capraria biflora* L. (té de monte), *Punica granatum* (granado), *Ruta chalepensis* L. (ruda), *Sida acuta* Burm (escobillo), *Sida rhombifolia* (escobillo) y *Solanum torvum* Swartz

- (huiz) Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1992. 53p.
33. Cáceres A. *et al.* Plants used in Guatemala for the treatment of dermatomucosal infections. I: Screening of 38 plant extracts for anticandidal activity. *J. Ethnopharmacol.* 1991. 33:277-283.
 34. Cáceres A. *et al.* Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. 1. Screening for antimycotic activity of 44 plant extracts. *J. Ethnopharmacol.* 1991. 31:263-276.
 35. López MB. Demostración de la actividad antimicrobiana de *Byrsonima crassifolia* y *Malpighia glabra*. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1992. 66p.
 36. Glasby JS. Dictionary of plants Containing Secondary Metabolites. London, Taylor & Francis, 1991. 488p.
 37. McVaugh R. Flora of Guatemala. *Fieldiana: Botany.* 1963. 24(5):206-208.
 38. Gundidza M. Screening of extracts from Zimbabwean higher plants. II; Antifungal properties. *Fitoterapia.* 1986. 57:111-116.
 39. Girón LM. Ethnobotanical survey of the medicinal flora used by the Caribs of Guatemala. *J. Ethnopharmacol.* 1991 34:173-187.

40. Jimenez CA. Contribución a la evaluación biológica de plantas cubanas. II. Rev. Cub. Med Trop. 1979. 3:13-19.D
41. Nickell LG. Antimicrobial activity of vascular plants. Econ. Bot. 1959 13:281-318.
42. Berdy J. *et al* CRC Handbook of Antibiotic Compounds. Boca Raton, CRC Press, 1982. 245p.
43. Hui WH, Arthur HR. Triterpene acid from the leaves of *P. guajava*. In Chemical Abstracts. 1955. 49:122-124.
44. Aguilar JI. Relación de unos Aspectos de la Flora Util de Guatemala. Guatemala, Tip. Nacional. 1966. 345p.
45. Hillis WE. & Yakaki. Phytochemistry. 1974. 13:495.
46. Weniger B. & Robineau L. Elementos para una Farmacopea Caribeña. La Habana, ENDA Caribe-Ministerio de Salud, 1988. (p.219-222).
47. Arriaza DA. Acción diurética y antimicrobiana de algunos vegetales del género Smilax. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1983. 50p.
48. Standley PC, Steyermark JA. Flora of Guatemala. Fieldiana: Botany. 1952. 24(3):92-100.

49. Logan MH. Digestives disorders and plant medicinals in highland Guatemala. *Antropos*. 1973. 68:537-547.
50. Cabrera LG Plantas Curativas de México. México. Ed. Cicerón.1958. (p.266-268).
51. Cáceres A. *et al.* Actividad contra *Vibrio cholerae* de cinco plantas americanas usadas en el tratamiento de infecciones. Memorias. IV Congreso Nacional de Microbiología. 1991. (p.64)
52. Urizar F. Ensayo clínico sobre la efectividad de *Smilax lundelli* en el tratamiento de Candidiasis Vaginal. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Medicas) 1989. 87p.
53. Gentry JL, Standley PC. Flora de Guatemala. *Fieldiana: Botany*. 1974. 24(10):104-131.
54. Linares E. *et al.* Selección de Plantas Medicinales de México. México, Limusa. 1988. (p.50-51).
55. Mejía JV. Geografía de la República de Guatemala. Guatemala. Tipografía Nacional. 1927. 9:99-179.
56. Fichas populares sobre plantas medicinales. 1a. serie (No. 1-40) 2a. ed. Publicación conjunta CEMAT y FARMAYA Guatemala. 1990. 206p.

57. Girón L.M. Investigación de la inhibición de *C. albicans* por preparaciones de plantas usadas en la medicina popular. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de graduación Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1983.
58. Cooney G. *et al.* Fungicidal activity if Solanum plant extrac from Guatemala, C.A. Abstracs. Washington, Pharmacy Worl Congress.1991. (p.52).
59. Gibson DN. Verbenaceae Flora of Guatemala. Fieldiana: Botany. 1970. 24(9): 109-11, 202-215.
60. Mendoza J. Confirmación de la actividad antimicrobiana de tres especies del genero *Lippia*. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1995. 46p.
61. Ippisch F. Contribución a las investigaciones sobre plantas medicinales y económicas de Guatemala. Guatemala, Dirección General de Agricultura 1943. 150p.
62. Koneman EW, Roberts G. Micología. 3 ed. Buenos Aires:Panamericana. 1987. 221p.
63. Koneman EW. *et al* Diagnóstico Microbiológico. Buenos Aires:Panamericana. 533 p.
64. Lennette E. *et al* Manual of Clinical Microbiology. 4ed. USA: American Society for Microbiology. 1986. 1149p.

65. Davis, *et al.* Tratado de Microbiología. 2ed. Mexico. Salvat editores. 1559p.(p.1006-1008)
66. Finegold S. Martin W. Diagnóstico Microbiológico. 6ed. Editorial Médica Panamericana S. A. 1983. 428p.
67. Rippon JW. Medicinal Mycology: pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. 2ed. Philadelphia:Saunders Company. 1982. 842p.
68. Logemann HE, Incidencia dermatofítica en Guatemala revisión de 468 pacientes. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Memorias VI Congreso Centroamericano, II Congreso Nacional de Microbiología) Diciembre 1983.
69. Mitscher A. *et al.* A modern look a folkloric used or antiinfective agents. J Nat Prod. 1987. 50:1025-1040.
70. Snell JS, Gardner P. An antibiotic susceptibility testing trial organised as part of the United Kingdom National External Microbiology Quality Assessment Scheme. J Clin Pathol 1982. 35:1169.
71. Fukuda, 31 st ICAAC Meeting. Poster #211. 1991.
72. Selitrennikoff, Exp. Mycol. 1983. 5:115-161.
73. Mac Rea WD, Hudson JB, Towers GHN. Studies on the pharmacological activity of Amazonian Euphorbiaceae. J. Ethnopharmacol. 1988. 22:143-172.

74. Takashio M, Vroey CD, and Danvanbreoseghem R. Production of macroconidia to *Microsporium ferruginium*. Sabouraud.1970. 7:252-256.

75. León F. Guatemala: Inhibición de la pared celular de hongos como un mecanismo de acción antifúngica de algunas aleguminosas. Universidad de San Carlos, (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1996. 55p.

13. ANEXOS

Anexo No. 1

INFORMACION BOTANICA
DE LAS PLANTAS UTILIZADAS EN EL ESTUDIO

Familia	Nombre científico	Nombre común	Parte
Asteraceae	<i>Eupatorium semialatum</i>	Bacché	Hoja
Bixaceae	<i>Bixa orellana</i>	Achiote	Hoja
Hydrophyllaceae	<i>Wigandia urens</i>	Chocón	Flor
Malpighiaceae	<i>Byrsonima crassifolia</i>	Nance amarillo	Corteza
Malpighiaceae	<i>Malphigia glabra</i>	Nance colorado	Hoja
Myrtaceae	<i>Psidium guajava</i>	Guajava	Hoja
Smiláceae	<i>Smilax lundelli</i>	Zarzaparilla	Raiz
Solanaceae	<i>Solanum americanum</i>	Quilete	Hoja
Verbenaceae	<i>Lippia graveolens</i>	Orégano	Hoja

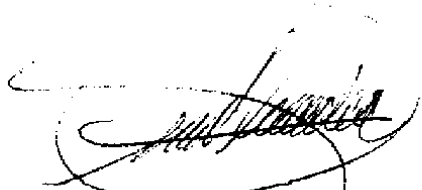
Anexo No. 2

MEDIO UTILIZADO

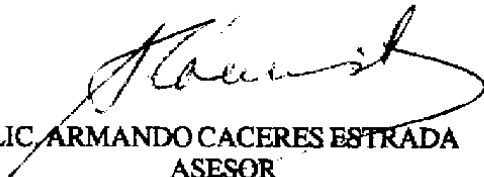
PARA EL ENSAYO DE PROTOPLASTOS DE *N. crassa*

Proteosa peptona	0.5%
Extracto de levadura	0.5%
Maltosa y sucrosa	4.0%
Agar	1.5%

Añadir 100 ml de agua desmineralizada y autoclavar durante 30-45 minutos a 121°C.



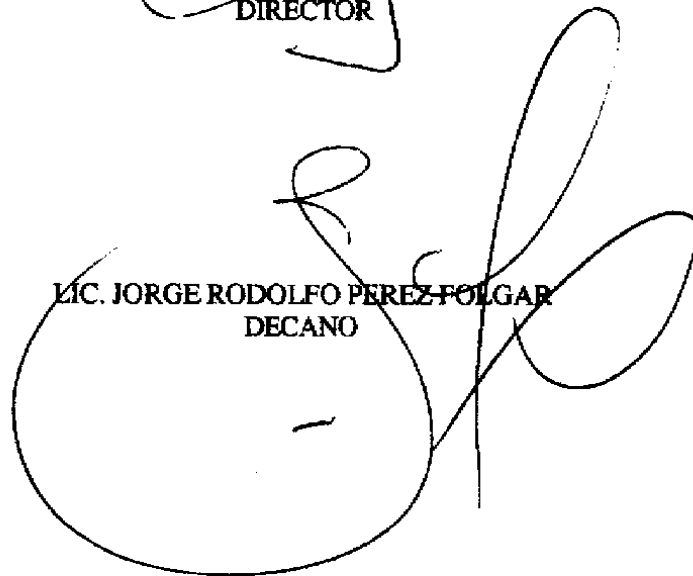
CLAUDIA REGINA MORALES ORTIZ
TESISTA



LIC. ARMANDO CACERES ESTRADA
ASESOR



LIC. GERARDO ARROYO CATALAN
DIRECTOR



LIC. JORGE RODOLFO PEREZ FOLGAR
DECANO