

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

ACTIVIDAD DE DIECISIETE EXTRACTOS DE DOCE PLANTAS
NATIVAS GUATEMALTECAS CONTRA *Fonsecaea pedrosoi*

Informe de Tesis

Presentado por

NANCY ELIZABETH DEL CID ALDANA

Para optar al Título de

Química Bióloga

Guatemala, febrero de 2005.

INDICE

I.	RESUMEN	3
II.	INTRODUCCIÓN	4
III.	ANTECEDENTES	6
	A. CROMOBLASTOMICOSIS	6
	B. PLANTAS NATIVAS GUATEMALTECAS	15
IV.	JUSTIFICACIÓN	32
V.	OBJETIVOS	33
VI.	HIPÓTESIS	34
VII.	MATERIALES Y MÉTODOS	35
VIII.	RESULTADOS	42
IX.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	45
X.	CONCLUSIONES	46
XI.	RECOMENDACIONES	47
XII.	REFERENCIAS	48

I. RESUMEN

La cromoblastomycosis es una micosis subcutánea, causada por hongos saprófitos del suelo y hasta el momento el único agente causal reportado en Guatemala es *Fonsecaea pedrosoi*. La infección por este hongo resulta de su implantación traumática en la piel y la enfermedad confinada especialmente a miembros inferiores, se caracteriza por presentar la formación de verrugas y nódulos cutáneos que pueden alcanzar una altura de 1 a 2 cm. sobre la superficie de la piel, dando el aspecto de floretes de coliflor.

Su tratamiento consiste en procedimientos invasivos quirúrgicos y en drogas poco selectivas como la Anfotericina B, sola o combinada con 5-Fluorocitosina y otras drogas que están siendo evaluadas actualmente.

A nivel mundial las enfermedades causadas por hongos han ido en aumento y la terapéutica se ha visto limitada por varios factores: por un lado la falta de entera efectividad de los fármacos así como de los efectos adversos que producen y por otro, la resistencia de los hongos reportada cada vez con mayor frecuencia. Por tal motivo, es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas antifúngicas.

En el presente estudio se realizó el tamizaje de la actividad antifúngica *in vitro* de doce plantas nativas guatemaltecas seleccionadas por referencia de su uso etnomédico en afecciones subcutáneas sugestivas de esta micosis o en base a antecedentes de actividad contra bacterias y hongos filamentosos.

En Guatemala no se había estudiado la actividad antifúngica *in vitro* de especies vegetales contra *Fonsecaea pedrosoi*, por lo que se adaptó la metodología de tamizaje de extractos etanólicos de las plantas descrita por Brancato & Golding y modificada por MacRae para hongos filamentosos. El hongo mostró un crecimiento máximo en agar Sabouraud sin aditivos en 23 días.

El extracto etanólico de la hoja de *Lippia graveolens* demostró actividad contra *F. pedrosoi* a una Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de 0.1 mg/mL. Esto sugiere una actividad interesante y potencial que justifica estudios ulteriores como fraccionamiento guiado, identificación de su principio activo y estudios clínicos.

II. INTRODUCCIÓN

La cromoblastomicosis es una micosis subcutánea que resulta de la implantación traumática del hongo en la piel. También se le conoce como dermatitis verrucosa, la cual está limitada al tejido cutáneo y subcutáneo, presentando una hiperplasia caracterizada por la formación de verrugas y nódulos cutáneos que pueden alcanzar de 1 – 2 cm por arriba de la superficie de la piel, dando el aspecto de floretes de coliflor. La enfermedad está confinada especialmente a piernas y pies, pero puede presentarse en manos, orejas, pecho, abdomen y otras superficies.

La cromoblastomicosis es causada por hongos saprófitos del suelo de la familia de los dematóceos. En Guatemala el único agente causal que ha sido informado es *Fonsecaea pedrosoi*, un hongo dimórfico que en su fase saprofitica o miceliar presenta micelio septado y se diferencia de las otras especies por su tipo de esporulación; crece lentamente a una temperatura óptima de 25°C. Su fase parasítica puede observarse en muestras clínicas y se caracteriza por presentar células divididas en varios planos de color café conocidas como células escleróticas, células fumagoides o esclerotes de Medlar.

El diagnóstico se basa en las características clínicas de la lesión y en el análisis micológico. El tratamiento de esta micosis consiste en procedimientos invasivos quirúrgicos y en drogas poco selectivas como la Anfotericina B, sola o en combinación con 5-Fluorocitosina y otras drogas que están siendo estudiadas actualmente.

Si se toma en cuenta que las enfermedades causadas por hongos han ido en aumento y que los fármacos no son completamente efectivos, aparte de ser altamente tóxicos, se requiere una intensa búsqueda en la naturaleza de nuevas alternativas de tratamiento.

El uso de plantas como medicamentos se remonta a la antigüedad. En Guatemala se han estudiado innumerables plantas y se han editado varios libros sobre plantas nativas consideradas medicinales. Por otro lado se han llevado a cabo estudios para investigar sus actividades antimicrobianas incluyendo actividades contra dermatofitos, causantes de micosis superficiales. Es evidente la importancia de la investigación de plantas en la búsqueda de actividad antifúngica contra agentes de micosis subcutáneas como lo es la causada por *Fonsecaea pedrosoi*.

El propósito del presente estudio fue la búsqueda de actividad antifúngica de extractos de plantas, utilizando como blanco aislamientos de especímenes clínicos de

Fonsecaea pedrosoi como agente de cromblastomicosis.

En el estudio fueron incluidos diecisiete extractos de doce plantas nativas guatemaltecas que se seleccionaron ya sea por referencia de su uso etnomédico en afecciones subcutáneas sugestivas de esta micosis o en base a antecedentes de actividad antimicrobiana en estudios previos.

III. ANTECEDENTES

A. CROMOBLASTOMICOSIS

1. Definición

La cromoblastomicosis también conocida como cromomicosis o dermatitis verrucosa; es una micosis subcutánea que se caracteriza por el desarrollo de una lesión en el sitio de inoculación, la cual resulta de la implantación traumática del agente etiológico en la piel (1-5).

El tipo de enfermedad provocada depende del huésped, sus defensas y la virulencia relativa del agente infectante (2).

2. Etiología

Los agentes etiológicos de la cromoblastomicosis son hongos saprofitos del suelo, de la familia *Dematiaceae* de los Hyphomycetes (2). Los principales agentes etiológicos de la cromoblastomicosis son *Fonsecaea pedrosoi*, *F. compactum*, *Phialophora verrucosa* y *Cladosporium carrionii* (1 - 3,5 - 7).

Las estructuras de estos hongos, como el micelio, sus conidios, las células escleróticas presentan una pigmentación y los colores varían desde el pardo claro hasta un café oscuro.

3. Características

a. Agentes etiológicos

- *Fonsecaea pedrosoi*

Morfología de la colonia: En cultivo crece muy lentamente (aunque con más rapidez que *F. compactum*), produce una colonia de color pardo negruzco, negro grisáceo, verde oliva grisáceo o negro. La textura es aterciopelada vellosa y la superficie varía de plana a apilada y plegada. En algunas cepas se presenta radiaciones o disposición en zonas (1-4).

Morfología microscópica: Se observa tres tipos de esporulación: cladosporium, acroteca y algunas veces fialófora; la proporción varía de una cepa a otra y depende del medio que se utiliza (2).

- *Fonsecaea compacta*

Morfología de la colonia: En cultivo crece muy lento, produce una colonia plegada, apilada, quebradiza, de color negro olivo negruzco y desarrolla una pelusa negra pardusca al pasar el tiempo. No se puede distinguir con la de *Fonsecaea pedrosoi* (2,4).

Morfología microscópica: Se observa con mayor magnitud el tipo de esporulación fiálofora (6).

- *Phialophora verrucosa*

Morfología de la colonia: En cultivo crece con lentitud, desarrolla una colonia gris olivo oscuro a negra, que al comienzo tiene forma de domo y después se vuelve aplanada. Algunas cepas están apiladas y plegadas o tienen surcos radiales. Un micelio aéreo gris, termina por cubrir la colonia; ésta es compacta, resistente y coreácea (2,4).

Morfología microscópica: Se producen fiálides con morfología bien definida: en forma de frasco o de vaso, a lo largo de la hifa vegetativa. Los conidios son producidos en sucesión, pero no unidos en cadenas (2).

- *Cladosporium carrionii*

Morfología de la colonia: Crece lentamente, produce una colonia compacta, pequeña, lisa o con pliegues, de color olivo oscuro-negro. Bordes intactos y marginados por hifas negras sumergidas (2,4).

Morfología microscópica: Se encuentra casi exclusivamente el tipo de esporulación cladosporium (2).

b. Tipos de Esporulaci3n

- Tipo Fial3fora

En este tipo hay una c3lula conidi3gena distinta denominada fi3lide, la cual se encuentra terminalmente a lo largo del micelio. Esta estructura tiene forma de frasco, con base redondeada, oval o alargada, cuello estrecho y un orificio que puede tener un collar3n. Los conidios se forman en el extremo del frasco y son expulsados a trav3s del cuello. Los conidios son ovales, de paredes gruesas y hialinas.

- Tipo Acroteca

Los conidi3foros son sencillos y a veces no se diferencian de las hifas vegetativas. Los conidios ovales son producidos en forma irregular en el extremo y a lo largo de los lados del conidi3foro.

- Tipo Cladosporium

En este tipo de conidiaci3n hay un tallo 3nico que sirve como conidi3foro, el cual esta alargado en el extremo distal en donde se forman dos o m3s conidios. Estos, a su vez, mediante brotes forman conidios secundarios en sus polos distales.

Fonsecaea pedrosoi y *Fonsecaea compactum* forman principalmente una esporulaci3n tipo cladosporium y rara vez acroteca y fial3fora. *Cladosporium carrionii* tiene esporulaci3n exclusiva de tipo cladosporium y *Phialophora verrucosa* esporulaci3n s3lo del tipo fial3fora (1,2).

4. Ecolog3a

Los agentes causantes de la cromoblastomycosis, han sido aislados de la vegetaci3n en descomposici3n, la madera en putrefacci3n y en el humus de los bosques (1- 4,7,8).

5. Distribución

Es una micosis que no tiene una zona endémica establecida, pero la mayoría de casos se dan en climas de los trópicos y subtrópicos (2-4,7-9).

La mayoría de casos de cromoblastomicosis son reportados en el sexo masculino, del área rural que se encuentra entre los 30 y 50 años de edad, esto se debe a que los varones tienen más contacto con el suelo y se predisponen a sufrir de heridas durante su trabajo (1-4,7).

En Guatemala el único agente causal informado es *Fonsecaea pedrosoi* (1). La cromoblastomicosis a través de los años se ha colocado en los tres primeros lugares de frecuencia dentro de las micosis subcutáneas (10).

Actualmente ocupa el tercer lugar de frecuencia dentro de las micosis subcutáneas (Comunicación personal Licenciada Logemann).

6. Características Clínicas

La lesión se presenta en el sitio en donde se sufrió el traumatismo. Al empezar la enfermedad, la lesión se presenta pequeña, elevada, eritematoide, con pápulas no pruriginosas. En la mayoría de casos la lesión se presenta escamosa. Al pasar el tiempo las lesiones se elevan 1 a 3 cm sobre la superficie de la piel, son pedunculadas y verrugosas y se asemejan a los flósculos o florecillas de coliflor (1,2,4,5).

La enfermedad se mantiene localizada en el sitio del traumatismo. Al parecer no existe ningún malestar del paciente. Sin embargo en algunas ocasiones puede haber una infección secundaria provocada por bacterias, lo que provoca una falta de drenaje linfático que puede ocasionar una elefantiasis en el paciente. No existe invasión en huesos o músculos, ni formación de fístulas (2,4).

La mayoría de casos reportados suelen localizarse en las extremidades inferiores, pero pueden localizarse también en brazos y pecho, entre otras (2).

7. Diagnóstico

a. Examen directo

Si el material a examinar se trata de secreción purulenta sólo es necesario hacer una preparación en fresco para buscar células fumagoides, además de hifas que pueden verse muy deformadas. Si se trata de raspados de piel, costras, desechos aspirados y material de biopsia es necesario adicionarle hidróxido de potasio (KOH) al 20% en busca de hebras de hifas pigmentadas de color pardo, ramificadas (de 2 a 6 μm de ancho) y cuerpos escleróticos (de 4 a 12 μm) (1- 6).

b. Cultivo

Se pueden utilizar medios selectivos que contengan Cicloeximida y Cloranfenicol (Sabouraud más antibióticos). Los cultivos deben de incubarse a una temperatura de 25°C, descartando como negativo si no hay crecimiento en 3 semanas (1,2,5).

c. Identificación

La identificación específica es la taxonómica, por lo que se determinan los tipos y porcentaje de conidios presentes y los detalles precisos de la producción de conidios (2,5).

8. Diagnostico diferencial

La cromoblastomicosis debe diferenciarse de tuberculosis verrucosa, epitelioma y leishmaniasis, entre otras (4).

9. Pronóstico

Las micosis subcutáneas son graves en cuanto a pronóstico y tiene limitaciones en cuanto al tratamiento y posibilidades de curación (11).

Es común que la cromoblastomicosis persista localizada y no debilite al paciente. Existe la posibilidad de una infección secundaria provocando una falta de drenaje linfático y elefantiasis, lo que puede causar problemas al paciente (4).

10. Tratamiento

En las primeras etapas de la enfermedad, el tratamiento más confiable es la escisión quirúrgica, electrodesecación o la criocirugía (2,4,12,13).

En los casos más avanzados, se ha utilizado gran variedad de antimicóticos, presentando baja selectividad y alta toxicidad, como por ejemplo la Anfotericina B (14).

Los protocolos de tratamiento consisten en la administración de uno o varios antimicóticos obteniéndose resultados satisfactorios.

El tratamiento de elección actualmente es la 5-Fluorocitosina, aunque ha fracasado en la enfermedad de curso crónico. Ha sido también utilizada en combinación con Anfotericina B en donde se observa retraso en el desarrollo de resistencia hacia la 5-Fluorocitosina y permite el uso de dosis más bajas de Anfotericina B (14 – 17).

Alió y colaboradores en un estudio realizado en Venezuela encontraron que la combinación de Itraconazol y 5-Fluorouracilo resultaba positiva en el tratamiento de la cromoblastomycosis (18).

En otros estudios realizados se ha utilizado Terbinafina sola o en combinación con 5-Fluorocitosina e Itraconazol observándose también buenos resultados (12,13,19-22).

a. Anfotericina B

La Anfotericina B es un antibiótico polieno aislado de la cepa de *Streptomyces nodosus*.

- Mecanismo de acción

Los antibióticos polienos se fijan firmemente al ergosterol de la membrana celular del hongo con lo que se altera la permeabilidad de la membrana, lo que podría explicar la formación de poros en membranas artificiales y provoca que la célula pierda las macromoléculas y los iones causando la muerte (14 – 17).

- Dosis

Este puede administrarse intravenosamente y solamente el 10% de la bioactividad se retiene en el plasma. En el caso de adultos es necesario disolver la droga en 500 mL de dextrosa líquida al 5% y debe aplicarse en intervalos de 4 a 6 horas. La dosis depende de cada paciente, puede darse 0.2 mg/Kg de peso al día, pudiendo aumentarse progresivamente a 0.4 mg, 0.6 mg, 0.8 mg y 1 mg/Kg de peso al día. Siendo la dosis óptima de 35 mg por Kg de peso, en un tiempo de seis a doce semanas hasta cuatro meses. (1,17,23,24).

- Efectos secundarios

La Anfotericina B no es 100% efectiva y puede causar efectos secundarios como tromboflebitis, fiebre, escalofríos, anorexia, cefalea, náuseas, vómitos, entre otros. El daño más importante es la vasoconstricción y lesión de las membranas lisosómicas de las células de los túbulos renales (1,17,23,24).

b. 5-Fluorocitosina

También conocida como Flucitosina, es una pirimidina fluorada, antimetabolito de la citosina y con estructura química similar al 5-Fluorouracilo.

- Mecanismo de acción

Su acción se basa en que penetra a la célula fúngica por medio de la permeasa de citosina e inhibe la síntesis de ARN por la acción de una desaminasa de citosina; se convierte en 5-Fluoruracilo, lo que provoca que el código genético sea leído en forma equivocada y detiene el crecimiento de la célula; un segundo mecanismo de acción ocurre a través de otro metabolito que es el monofosfato de 5-fluorodeoxiuridina, que inhibe la timidato sintetasa y bloquea la síntesis de DNA (1,15,16).

- Dosis

La dosis oral recomendada es de 100 a 150 mg/Kg de peso al día, divididas en 4 dosis, durante 4 o más semanas, se absorbe bien y se distribuye en los tejidos, incluyendo el líquido cefalorraquídeo en donde la concentración del fármaco es de 60-80% de los valores séricos, que tienden a aproximarse a 50 µg/mL (1,17).

- Efectos secundarios

Los efectos secundarios son pocos, pero puede causar náuseas, vómitos, enterocolitis y depresión de la médula ósea, leucopenia y trombocitopenia (1,15,16).

c. Itraconazol

Es un compuesto triazólico de segunda generación, derivado del dioxolano con un átomo adicional de nitrógeno (1).

- Mecanismo de acción

Estudios *in vitro* han demostrado que inhibe el citocromo P-450 que interviene en la síntesis de ergosterol, afectando la permeabilidad de la membrana de la célula micótica, lo que provoca la muerte (15).

- Dosis

La dosis oral recomendada es de 200 mg al día, incrementando la dosis de 100 a 100 mg hasta llegar a un máximo de 400 mg al día. El Itraconazol tiene una vida media en el plasma de treinta horas después de administrada (15,17).

- Efectos secundarios

El Itraconazol puede causar carcinogénesis y efectos teratógenos, entre otros (17).

d. Terbinafina

Es un compuesto alilamino sintético (17).

- Mecanismo de acción

La Terbinafina obstruye la biosíntesis de los esteroides de la célula fúngica inhibiendo la escualeno-epoxidasa, en un estadio temprano, lo que lleva a un déficit de ergosterol y a una acumulación intracelular de escualeno, que conlleva a la muerte celular (17).

- Dosis

La dosis recomendada varía según la edad del paciente, de la indicación y la gravedad de la infección, se recomienda 250 mg al día en personas adultas y en menores dosis en niños (17).

- Efectos secundarios

Puede causar pérdida de apetito, dispepsia, náuseas, dolor abdominal, diarrea, exantema, artralgia, mialgia y disfunción hepatobiliar, entre otras (17).

B. PLANTAS NATIVAS GUATEMALTECAS

Desde hace muchos siglos se ha utilizado como materia prima las plantas, con el fin de preparar pócimas o remedios para curar las más diversas dolencias y enfermedades. En la antigüedad sólo se disponía de la naturaleza para hacer dichos remedios, pero en la actualidad se han desarrollado estudios científicos en donde se identifica el principio activo que posee la planta y se desarrolla industrialmente (25,26).

A pesar de esto muchas estructuras elucidadas en los estudios son muy complejas por lo que es difícil su procesamiento industrial, por lo que el extracto de la planta con actividad antimicrobiana se utiliza como fitofármaco (27,28).

Muchos de los principios activos de las plantas pueden encontrarse en su raíz, hojas, corteza, tallo, flores y fruto, de donde deben extraerse para ser utilizadas.

La fitoterapia al pasar los años esta siendo más aceptada, lo cual se debe a que la industria desarrolla productos artificiales que son nocivos para la salud, por lo que las personas se inclinan nuevamente al uso de materia de origen vegetal por la virtud curativa que posee, además de fomentar y vigorizar las fuerzas del cuerpo para poder defenderse de cualquier posible enfermedad (25,26,29).

En Guatemala a partir de 1927 se dio inicio a la recopilación y documentación sobre plantas nativas medicinales. Existen instituciones encargadas de realizar estudios *in vitro*, en donde se determinan efectos tóxicos, propiedades antibacterianas, antifúngicas y antiparasitarias. Dentro de estas instituciones se encuentra la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, Universidad del Valle de Guatemala, Centro de Estudios Mesoamericanos sobre Tecnología apropiada –CEMAT- y el Laboratorio de Productos Fitofarmacéuticos –FARMAYA- (30-32).

En el presente estudio se han elegido diecisiete extractos de doce plantas nativas guatemaltecas, seleccionadas ya sea por referencia de su uso etnomédico en afecciones subcutáneas sugestivas de esta micosis o en base a antecedentes de actividad antimicrobiana en estudios previos.

1. *Cornutia pyramidata* L.

a. Familia

Verbenaceae

b. Sinónimos

C. grandifolia var. *intermedia* Moldenke

C. latifolia Moldenke in FEDE, Rep.

C. latifolia f. *alba* Moldenke

C. lilacina var. *velutina* Moldenke

C. pyramidata var. *isthmica* Moldenke

Hosta latifolia HBK

Hosta pyramidata A. Dietr

c. Nombre común

Flor lila (Guatemala), hoja de zope (Izabal), lat-che (Maya, Petén).

d. Descripción taxonómica

Arbusto o árbol débil de 12 m de alto, el tronco de hasta 15 cm de diámetro, densamente ramificado pubescente, puberulento o tomentoso. Hojas con pecíolos de 0.5 – 3.0 cm de largo, elípticas, elípticas-ovaladas o totalmente ovaladas de 4 – 20 cm de largo, 4 – 14 cm de ancho agudas o acuminadas, usualmente atenuadas en la base; ambas superficies densamente pubescente o puberulento o en la parte inferior tomentosa, inflorescencia terminal o subterminal paniculada de 10 - 40 cm de largo, 5 - 10 cm de ancho, pedicelos y pedúnculos densamente pubescente en la cima, pobremente poco pubescente o puberulento. Cáliz cupuliforme en el anthesis de 1 - 3 mm de largo densamente pubescente, truncado, algunas veces dentado. El fruto pateliforme o cupular, corola azul o púrpura poco pubescente o puberulento, el tubo de 7 - 11 mm de largo, 1 - 2.2 mm de ancho, el labio inferior del limbo usualmente de la mitad de tamaño del tubo o menor. Ovario pubescente. Fruto subgloboso puberulento

o pubescente de 3 - 6 mm de largo (33).

e. Hábitat y fitogeografía

Se desarrolla en bosques o como maleza en áreas húmedas o mojadas, a una altitud de 100 - 1,500 msnm. México, Honduras y Nicaragua. En Guatemala se ha descrito en Alta Verapaz, Chimaltenango, Chiquimula, El Progreso, Escuintla, Guatemala, Izabal, Petén, Quetzaltenango, Sacatepéquez, San Marcos, Santa Rosa, Sololá, Suchitepéquez y Zacapa (33).

f. Usos populares

Se utiliza la decocción de la raíz en crisis de nervios. La decocción de hojas se utiliza para dolores de cuerpo, inflamación del bazo, diabetes, flujos vaginales. En estudios recientes se ha demostrado su actividad antiprotozoaria para el tratamiento de paludismo y leishmania (34-37).

2. *Hypericum uliginosum* HBK

a. Familia

Clusiaceae

b. Sinónimos

H. paucifolium Wats

H. pratense Cham. & Schlecht

c. Nombre común

Mil flores (fide Aguilar), retij (Cobán, Quecchí), ruda de monte.

d. Descripción taxonómica

Planta que sale de una raíz perpendicular o de algunas gruesas, erecto, simple o usualmente ramificada, cerca de 50 cm de alto o menos; las hojas son lineales o cerca de la linealidad, de 1 - 2 cm de largo, agudo u obtuso,

apiculada, angosta cerca de la base, un nervio, punticulado, se observa pálido en la parte de abajo, usualmente plano pero algunas veces revoluta; flores usualmente numerosas, se encuentran en ramas secundarias, sésiles o casi sésiles; sépalos lineales-lanceolados, largos-atenuados, estriados; pétalos de color amarillo profundo, un poco menos largos que los sépalos; cerca de 20 estambres libres; 3 estilos; cápsula oblonga de 5 - 6 mm de largo, agudo, con una celda; semillas muy numerosas de escasamente 0.5 mm de largo, de color café suave (38).

e. Hábitat y fitogeografía

Se desarrolla en laderas abiertas, en bosques de pino, roble, Cupressus o Alnus, muchas veces crece en lugares húmedos y frecuentemente en lugares secos, a una altitud de 3,400 msnm o menos. El Salvador, Nicaragua, Costa Rica y Panamá. En Guatemala se ha descrito en Alta Verapaz, Baja Verapaz, El Progreso, Chiquimula, Zacapa, Jalapa, Jutiapa, Guatemala, Sacatepéquez, Chimaltenango, Sololá, Quiché, Huehuetenango, Totonicapán, Quetzaltenango y San Marcos (32).

f. Usos populares

Se utiliza en medicina doméstica, para aliviar diarrea, resfriados, neumonía. Se le han reconocido propiedades antipiréticas, antidiabéticas, es un colagogo (38,39).

3. *Lippia graveolens* HBK

a. Familia

Verbenaceae

b. Sinónimos

Goniostachyum graveolens Small

Lantana origanoides Mart & Gal

Lippia berlandieri Schauer

c. Nombre común

Orégano.

d. Descripción taxonómica

Arbusto delgado de hasta 2 m de alto, las ramas con pubescencia cortopilosa; hojas con pecíolos de 5 - 10 cm de largo, las láminas oblongas a elípticas u ovado a ovado-oblongas, 2 - 4 cm de largo, usualmente obtusas o redondeadas en el ápice, algunas veces agudo, redondeadas o subcortadas en la base, densamente suave-pilosas en el haz, suave al tacto, glandular y densamente tomentosa o pilosa en el envés, el margen finamente crenado; pedúnculos 2 - 6 en la axila de la hoja, 4 - 12 mm de longitud; flores en espigas subglobosas a oblongas, 4 - 12 mm de largo, brácteas 4 gruesas, ovado a lanceoladas, agudas, glandulares y densamente pilosas; cáliz 1 - 2 mm de largo, glandular y viloso; corola blanca, el tubo estrigoso, 3 - 6 mm de largo (40).

e. Hábitat y fitogeografía

Se desarrolla en pendientes pedregosas, en campos abandonados en planicies; a una altitud de 350 msnm o menos. México en el estado de Texas, Estados Unidos y Nicaragua. En Guatemala se ha descrito en Petén y Zacapa (40).

f. Usos populares

La decocción o infusión de hojas se utiliza para tratar anemia, enfermedades gastrointestinales y respiratorias, entre otros.

Tópicamente para la cicatrización de heridas, llagas e inflamaciones de la garganta; en baños para fortalecer niños debilitados, para aliviar gripe, prurito (picazón) y sarna; en cataplasmas para madurar abscesos, calmar neuralgias y aliviar induraciones en la piel. La planta fresca macerada se

utiliza para dolores reumáticos; la maceración alcohólica contra ataques epilépticos (30).

4. *Quercus crispifolia* Trelease

a. Familia

Fagaceae

b. Sinónimos

Q. amphioxys Trelease

Q. incrassata Trelease

c. Nombre común

Encino, roble, roble amarillo.

d. Descripción taxonómica

Árbol mediano o grande tomentoso al principio y luego glabrado grisáceo o café-rojizo con lenticelos prominentes o inconspicuos; vástagos de 5 - 6 mm de largo. Oblongo-fusiforme, agudo café claro, glabroso, ciliado. Hojas delgadas pero duras desde 10 hasta 15 - 20 cm y raramente 25 cm de largo de 3 - 5 cm hasta 7.5 cm de ancho oblongolanceoladas o lanceoladas-lineares, acuminada a atenuada o flagelada la base curva o redonda o raramente subcordada, la parte superior lustrosa glabrosa o pubescente en la base, la superficie inferior es similar pero más pubescente en la base, la inervación lateral es de 15 - 20 en cada lado. Pecíolos de 5 a raramente 10 mm de largo, rojo oscuro en la base. Fruto bienal ovalado de 25 - 30 mm de largo al inicio pubescente y cuando madura se convierte en glabrado y café (41).

e. Hábitat y fitogeografía

Se desarrolla en bosques montañosos húmedos o mojados, a una altitud de 1,300 - 2,700 msnm. Chiapas y El Salvador. En Guatemala se ha descrito

en Alta Verapaz, Chiquimula, Jalapa y San Marcos (41).

f. Usos populares

Se emplea el cocimiento de las hojas y la corteza, para tratar las afecciones gastrointestinales como diarreas crónicas, disentería, gastritis y vómitos. También es indicado en las hemorragias de nariz, menstruaciones excesivas, mal de orín, flujos vaginales, anemia y resfríos. Se utiliza tópicamente para desinfectar heridas, fístulas, úlceras, para detener sangrado de heridas y hemorroides sangrantes; en lavados vaginales elimina la leucorrea y contra el sudor de los pies. Excelente astringente (42).

5. *Salvia lavanduloides* HBK

a. Familia

Lamiaceae

b. Sinónimos

No encontrados

c. Nombre común

Salvia de monte (fide Aguilar).

d. Descripción taxonómica

Hierba delgada, el tallo puede encontrarse solitario o en conjunto, recto, de 1 metro o menos de largo, ramas simples o muy esparcidas; hojas con pecíolo corto, angosto elíptico-oblongo o lanceolado, de 3 - 9 cm de largo, la base puede ser aguda u obtusa, aguda o atenuada, el margen serrulado, en la haz es pubescente o glabroso de un color que va de verde a verdoso; en el envés suele ser más pubescente y de color grisáceo a blanquecino; cerca de 12 verticilos floreados, formando espinas de 3 - 12 cm de largo y 1.5 cm de diámetro; las flores sésiles o casi sésiles; el cáliz en la flor tiene de 4 - 5.5 mm

de largo y raramente llega a medir 7 mm de largo, blanquecino y densamente peluda a cercanamente glabrosa; la corola posee un color que va de azul intenso a azul pálido y violeta; el tubo de 3.5 - 4.5 mm de largo, el labio superior de 2 - 2.5 mm de largo y densamente tomentoso, el labio inferior de 3 - 5 mm de largo (33).

e. Hábitat y fitogeografía

Se desarrolla en laderas herbosas o en lugares abiertos, en bosques de pino o roble, generalmente en algunos lugares secos. A una altitud de 1,500 - 3,800 msnm. Centro y Sur de México y Honduras. En Guatemala se han descrito en Baja Verapaz, Zacapa, Jalapa, Santa Rosa, Guatemala, Sacatépequez, Chimaltenango, Sololá, Quiché, Huehuetenango, Totonicapán, Quetzaltenango y San Marcos (33).

f. Usos populares

Se utiliza, para aliviar el dolor de vientre, dolores menstruales, dolor de estomago, padecimientos digestivos, dolor de vesícula, dolor de muelas, contrarresta la tos y la tos ferina. Antipirético (43).

6. *Senna alata* L

a. Familia

Caesalpiniaceae

b. Sinónimos

Cassia alata L.

Herpetica alata Raf. Sylva Tell.

c. Nombre común

Barajo, moco.

d. Descripción taxonómica

Arbusto de 1 – 2 m de largo, pero algunas veces mayor; ramas pubescentes o glabradas, lanceoladas, atenuadas de 1.2 cm de largo. Hojas largas formadas por hojas más pequeñas de 6 - 12 en pares oblongas u oblongas-ovaladas de 5 - 15 cm de largo y 3 - 8 cm de ancho, redondeadas en el ápice y la base, esparcidas pubescente o glabrada. Flores amarillas en racimos, usualmente del largo de las hojas o mayores, muy floreada. Pedicelos cortos, vástagos ovalados u oblicuos obtusos de 1 - 1.5 cm de largo, sépalos de 1cm de largo, pétalos de 2 cm de largo o menores, 10 estambres 7 de los cuales son perfectos, los otros reducidos. Legumina lineal de 10 - 15 cm de largo, vástago de 1.5 cm lustroso, longitudinalmente descendente; semillas numerosas, de color café de 5 mm de largo (44).

e. Hábitat y fitogeografía

Se desarrolla en áreas húmedas o mojadas, a pocos metros sobre el nivel del mar. México, Honduras, Nicaragua, Costa Rica, Panamá y Sur América. En Guatemala se ha descrito en Izabal y probablemente en algunas zonas bajas (44).

f. Usos populares

Para aliviar picadura de gusano u otras enfermedades cutáneas, reumatismo, dolor de estómago, enfermedades venéreas, mordedura de serpiente. La infusión de hojas tiene efectos antihelmínticos, fungicidas, insecticida y posiblemente pesticida (44,45).

7. *Smilax domingensis* Willd

a. Familia

Smilacaceae

b. Sinónimos

Smilax lanceolata L.

c. Nombre común

Zarzaparrilla.

d. Descripción taxonómica

Glabras completamente. Tallos teretes, escasamente armados en la parte inferior con agujones robustos recurvados, inermes en la parte superior. Hojas de 6 – 15 cm de largo y 1.5 – 10 cm de ancho, 1.4 – 6 veces más largas que anchas, ovadas, lanceoladas-ovadas, o lanceoladas, cartáceas, inermes, 5 nervias desde la base, las nervaduras primarias prominentes en el envés, no impresas en el haz, el par exterior submarginal, las nervaduras secundarias conspicuas, algo prominentes, reticuladas, el ápice brevemente acuminado o breviscupidado, la base aguda, en margen entero; pecíolos de 0.5 – 2 cm, umbelas estaminadas solitarias; pedúnculo 1 – 5 mm, más corto que el pecíolo subyacente terete o algo aplanado. Umbelas pistiladas solitarias; pedúnculo 1 – 5 mm, más corto que el pecíolo subyacente, subterete. Pétalos de las flores estaminados de 4 – 6 mm; filamentos de 2 – 4 mm, anteras de 1 – 2 mm, pétalos de las flores pistiladas de 4 mm. Bayas de 7 – 10 mm, rojas purpúreas o negras (46).

e. Hábitat y fitogeografía

Se desarrolla en bosques húmedos, a una altitud cercana a los 1,200 msnm. México, Honduras, El Salvador, Costa Rica y Panamá. En Guatemala se ha descrito en Alta Verapaz, Baja Verapaz, Izabal, Zacapa, Escuintla y Sacatepéquez (41).

f. Usos populares

Tiene propiedades curativas para curar enfermedades cutáneas como la sarna, enfermedades reumáticas, afecciones renales. El rizoma se utiliza para el tratamiento de anemia, afecciones gastrointestinales, hinchazón, malaria, dolor de riñones, enfermedades de la sangre y venéreas, posee propiedades

antiinflamatorias, antifúngicas, antipruríticas, antiséptico, entre otros (30).

8. *Solanum americanum* Miller

a. Familia

Solanaceae

b. Sinónimos

S. nigrescens Mart & Gal

S. nodiflorum Jacq

c. Nombre común

Hierba mora (Chimaltenango; Jutiapa), macúy (Alta Verapaz), quilete (Santa Rosa).

d. Descripción taxonómica

Hierba de 1m de alto o menos, los tallos jóvenes son cercanamente glabroso, con pelo encorvado; hojas solitarias o en pares, de diferentes tamaños, similares en forma, son completas o con borde sinuado dentado, son lanceoladas u obaladas, su largo va de 3.5 - 14 cm y 1.5 - 5.5 cm de ancho, ápice agudo, base atenuada, son pilosas o glabras en la haz y el envés; pecíolos de 5 - 30 mm de largo; inflorescencia lateral e internodal, racemiforme, pedunculada, pocas flores; pedúnculos de 5 - 25 mm de largo; pedicelo de 5 - 10 mm de largo; cáliz de 1 - 2 mm de largo, lóbulos ovalados, agudos; corola blanca, limbo partido cerca de la base de 1.5 - 2 mm de ancho; lóbulos externamente papilados, de 2 - 3 mm de largo; filamentos de 0.3 - 0.5 mm de largo, ciliados; anteras de 1.5 - 2 mm de ancho; estigma de 2.5 - 3.5 mm de largo, excediendo los estambres, densamente pubescentes; ovario glabroso; fruto globoso, negro al madurar de 4 - 8 mm de diámetro; semillas cerca de 1 mm de largo (47).

e. Hábitat y fitogeografía

Se desarrolla en maleza o sembradíos, a una altitud de 350 - 1,500 msnm. En Guatemala se ha descrito en Petén, Alta Verapaz, Zacapa, Baja Verapaz, Sacatepéquez, Chimaltenango, Huehuetenango, Jutiapa, Santa Rosa, Escuintla, Retalhuleu y San Marcos (47).

f. Usos populares

Las hojas y las semillas se utilizan para enfermedades gastrointestinales y respiratorias, anemia, cirrosis, dolor de muelas, escorbuto, hinchazón, meningitis, nerviosismo, paludismo, presión alta, retención urinaria, reumatismo. La decocción de hojas se utiliza por vía tópica en el tratamiento de afecciones dermatomucosas (acné, tiñas, pústulas, entre otras) (30).

9. *Sterculia apetala* Jacq

a. Familia

Esterculiaceae

b. Sinónimos

Helicteres apetala Jacq.

S. carthaginensis Cav.

c. Nombre común

Castaño, bellota.

d. Descripción taxonómica

Árbol de 30 m de alto, con una depresión, densamente frondoso y el tronco es usualmente limpio y grueso; las hojas con pecíolos muy grandes se caen, de 15 - 50 cm de ancho o muy largas, membranosas, con 5 lóbulos, en la base tiene forma acorazonada, glabrada, en el envés son tomentosas cuando son jóvenes pero se convierten en glabradas, lóbulos rodeados, el ápice puede

ser de redondeado a subagudo; paniculas muy floreadas, abiertas o densas, igual o menores que los pecíolos; cáliz abierto acampanado, 2.5 - 3 cm de ancho, de color amarillo entre pringado y púrpura fuerte; los carpelos de las frutas son de 10 cm de largo aproximadamente, afuera tomentoso, con pelo, sésiles; semillas de 2 cm de largo, lustrosas de color castaño (48).

e. Hábitat y fitogeografía

Se desarrolla en bosques o laderas húmedas o mojadas, a una altitud de 300 msnm o menos. México, Honduras, Nicaragua, Costa Rica, Panamá y Norte de Sur América. En Guatemala se ha descrito en Pétén, Alta Verapaz, Zacapa, El Progreso, Santa Rosa, Escuintla, Suchitepéquez, Retalhuleu y San Marcos (48).

f. Usos populares

Las flores se utilizan como pectoral, antiasmático y para afecciones catarrales, a las hojas se les atribuye propiedades antirreumáticas. La decocción de la raíz y las hojas son un remedio contra la Malaria (49,50).

10. *Tabebuia rosea* Bertol

a. Familia

Bignoniaceae

b. Sinónimos

Couralia rosea Donn

Tecoma evania Donn

Tecoma rosea Bertol

c. Nombre común

Matilisguate, maqueliz (Petén), macuelizo, fresno (Huehuetenango).

d. Descripción taxonómica

Árboles de 30 m de alto aproximadamente, con tronco grueso que alcanza 1 m de diámetro, la copa es esparcida o redondeada, la corteza es gruesa de color café claro, posee fisuras, la corteza interna es de color café; ramas glandulares; las hojas son usualmente 5, con pecíolo largo, subcoriacea, 10 -25 cm de largo, elípticas-oblongas a elípticas ovaladas, en la base es aguda, completa, las axilas de los nervios laterales con glándulas nunca barbado; inflorescencia larga y abierta; cáliz bilabiado de 1.5 - 2 cm de largo, cerrado en el botón, densamente glandular; corola de 6 - 8 cm de largo, variando en color, de rosa profundo a púrpura y raramente blanco, glabroso; ovario glandular; cápsulas de 30 cm de largo y 12 mm de grosor, atenuado en cada extremo, densamente glandular (51).

e. Hábitat y fitogeografía

Se desarrollan en bosques húmedos, en laderas abiertas o en planicies del pacífico, a una altitud de 1,200 msnm o menos. México, El Salvador, Honduras, Panamá y Venezuela. En Guatemala se ha descrito en Petén, Alta Verapaz, Baja Verapaz, El Progreso, Izabal, Zacapa, Jutiapa, Santa Rosa, Escuintla, Guatemala, Sololá, Suchitepéquez, Retalhuleu, San Marcos y Huehuetenango (51).

f. Usos populares

En Guatemala, la decocción de la corteza es utilizada como remedio para la anemia, el constipado, flujos vaginales, toda la planta es utilizada en decocción, interna y externamente como antídoto para las mordeduras de serpiente. A la decocción de hojas, flores y raíz se le atribuye propiedades febrífugas, analgésicas y sudoríficas (50).

11. *Tithonia diversifolia* Hemsl

- a. Familia
Asteraceae

- b. Sinónimos
Mirasolia diversifolia Hemsl
T. diversifolia var. *glabriuscula* Blake

- c. Nombre común
Mirasol (Alta Verapaz, Chiquimula, Santa Rosa), k'onon, q'il, sun (Quechí, Alta Verapaz), quil (Suchitepéquez), quil amargo (Guatemala), saján grande (Jutiapa).

- d. Descripción taxonómica
Planta herbacea o arbusto de 1.5 - 4 m de alto, ramas fuertes, al principio hispido-pilosa o subtomentosa, con la edad siempre son glabras o cercanas a esto. Hojas alternadas de 7 - 20 cm de largo y 4 - 20 cm de ancho; con lóbulos prominentes de 3 - 5. Los bordes son crenados-aserrados, tuberculados-hispidulosos abajo, usualmente densamente pilosa o glabrada ancho de 1.5 - 4 cm, flores de 12 - 14 amarillo claro o naranja de 3 - 6 cm de largo, corolas discoides de 8mm de largo, amarillas lanceolada en el ápice, 1.5 - 2.5 cm de largo (52).

- e. Hábitat y fitogeografía
Se desarrolla en laderas húmedas o mojadas, o en lugares abandonados, a una altitud de 200 - 2,300 msnm. México, Honduras, El Salvador, Costa Rica y Panamá. En Guatemala se han descrito en Alta Verapaz, Chimaltenango, Chiquimula, Escuintla, Guatemala, Jutiapa, Quetzaltenango, San Marcos, Sacatepéquez, Santa Rosa, Sololá y Suchitepéquez (52).

f. Usos

La decocción de las hojas, es usado para remedio de la malaria, también es utilizado para el eczema.

12. *Valeriana prionophylla* Standl

a. Familia

Valerianaceae

b. Sinónimos

V. pumilio Standl. & L.

V. skutchii Standl.

c. Nombre común

Pericón de monte (Huehuetenango)

d. Descripción taxonómica

El tallo es de 10 - 80 cm de alto, muchas veces es dividido o dentado, piloso o glabroso, los nudos pilosos; hojas predominantemente basales, usualmente numerosas y aparecen cespitosas, no tienen división, oblongo-lineales a espatuladas, de 3 - 30 cm de largo y de 0.5 - 3 cm de ancho, obtusa, atenuada en la parte subpeciolar de la base, márgenes dentados, serrulados, ondulados y raramente completo, usualmente ciliadas, glabroso hasta piloso, salen del tallo en 2 - 3 pares, 2 - 20 cm de largo, usualmente sésiles, algunas veces el pecíolo es corto; inflorescencias largas-pedunculadas, las flores numerosas dispuestas en agregados dicasios, densos o difusos; bracteadas lineales; limbo del cáliz con 9 - 11 segmentos; corola rotada de 1.5 - 3 mm de largo, blanca, rosada o violeta pálido, glabroso; estambres exsertos, en las anteras aparecen 4 lóbulos; estilo excerto; aquenios 2 - 3 mm de largo, paralelos o transversalmente rugosos, glabrosos o pilosos, las costillas adaxiales usualmente conspicuas (30,53).

e. Hábitat y fitogeografía

Se desarrolla en bosques húmedos de pino, en prados húmedos o en riscos o grietas de lugares secos, algunas veces crece sobre la piedra caliza. A una altitud de 2,100- 4,200 msnm. México en el estado de Chiapas y Costa Rica. En Guatemala se ha descrito en Chimaltenango, Guatemala, Huehuetenango, Quetzaltenango, Sacatepéquez, San Marcos, Sololá y Totonicapán (53).

f. Usos populares

Se utiliza como sedante, se le han atribuido propiedades antibacterianas, además de propiedades curativas en heridas y llagas (30,54).

IV. JUSTIFICACIÓN

La cromoblastomycosis es una micosis subcutánea causada por el hongo *Fonsecaea pedrosoi*, la cual es tratada con Anfotericina B, 5-Fluorocitosina y otros antifúngicos, que no han demostrado ser cien por ciento efectivos, sumado a que pueden causar reacciones secundarias tóxicas al cuerpo humano. Dentro de las reacciones secundarias causadas por la Anfotericina B están la tromboflebitis, fiebre, escalofríos, anorexia, cefalea, náuseas y vómitos. El daño más importante es la vasoconstricción y lesión de las membranas lisosómicas de las células de los túbulos renales. La 5-Fluorocitosina puede además causar náuseas, vómitos, enterocolitis, depresión de la médula ósea, leucopenia y trombocitopenia.

En Guatemala, la cromoblastomycosis es un problema que afecta principalmente a los trabajadores del campo, predominando en el sexo masculino mayor de cincuenta años. Se estima que dentro de las micosis subcutáneas, la cromoblastomycosis ocupa el tercer lugar de frecuencia.

En la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala se han llevado a cabo trabajos que tratan sobre la búsqueda de propiedades antibacterianas y antifúngicas de ciertas plantas nativas guatemaltecas contra agentes patógenos. Sin embargo, no se habían realizado estudios de propiedades antifúngicas contra agentes causales de micosis subcutáneas, como la cromoblastomycosis causada por *Fonsecaea pedrosoi*.

Teniendo en cuenta que en la actualidad las infecciones causadas por hongos han ido en aumento, el limitado número de antimicóticos y la alta toxicidad de los protocolos de tratamiento, se considera de suma importancia realizar estudios para buscar dentro de la flora guatemalteca nuevas alternativas para el tratamiento de estas patologías. Lo anterior con fines no solo de fitoterapia, sino para la elucidación posterior estructural de la molécula con actividad, proporcionando otra alternativa para síntesis de nuevos medicamentos.

V. OBJETIVOS

A. OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad antifúngica de diecisiete extractos de doce plantas nativas guatemaltecas contra micosis subcutáneas.

B. OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Adaptar el método de tamizaje *in vitro* para actividad antifúngica de hongos filamentosos y utilizarlo para el óptimo crecimiento de hongos causantes de micosis subcutáneas.
2. Evaluar actividad antifúngica *in vitro* de diecisiete extractos etanólicos de doce plantas nativas guatemaltecas contra *Fonsecaea pedrosoi*.
3. Determinar la concentración inhibitoria mínima de los extractos, que tengan actividad contra *Fonsecaea pedrosoi*.

VI. HIPÓTESIS

Por lo menos uno de los extractos de la doce plantas nativas guatemaltecas utilizadas tiene actividad antifúngica contra *Fonsecaea pedrosoi*.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. UNIVERSO Y MUESTRA

1. Universo

Plantas nativas guatemaltecas.

2. Muestra

Diecisiete extractos etanólicos de doce plantas nativas guatemaltecas consideradas como medicinales.

B. RECURSOS

1. Humanos

El estudio fue realizado por la Br. Nancy Elizabeth Del Cid Aldana, con la asesoría de la Licenciada Margarita Paz de Ramírez.

2. Físicos

a. Equipo

- Agitador Vortex
- Autoclave
- Balanza analítica
- Campana de flujo laminar
- Estufa
- Incubadora a 25°C
- Mechero Bunsen
- Microscopio
- Pipetas automáticas
- Refrigeradora

b. Reactivos

- Agar definido Takashio (Agar-Agar, Dextrosa, Na_2SO_4 , KH_2PO_4 , Peptona)
- Agua desmineralizada
- Agua destilada
- Agar Sabouraud
- Agar Micosel
- Alcohol al 50%
- Alcohol al 70%
- Anfotericina B
- Fenol al 5%

c. Cristalería

- Beaker de 250 mL y 500 mL
- Campanillas de Durham
- Erlenmeyer 500 mL
- Erlenmeyer con tapón de rosca 250 mL
- Frascos de vidrio con tapón de rosca
- Pipetas
- Probeta 100 mL
- Tubos de ensayo con tapón de rosca 15 mL
- Varilla de vidrio estéril

d. Otros

- Algodón
- Asa de nicromo en espátula o en L
- Cajas de Petri
- Fósforos
- Tips amarillos estándar 200 μL
- Tips azules estándar 1000 μL

C. PROCEDIMIENTO

1. Selección de plantas en el estudio

En el estudio fueron incluidas doce plantas nativas guatemaltecas, seleccionadas ya sea por su uso etnomédico en afecciones subcutáneas sugestivas de esta micosis o en base a antecedentes de actividad antimicrobiana en estudios previos.

De las doce plantas a estudiar fueron utilizados uno o más extractos de diferentes partes, como se detalla en la siguiente tabla:

No	PLANTA	NOMBRE COMUN	PARTE UTILIZADA	PROCEDENCIA
1	<i>Cornutia pyramidata</i>	Flor lila	hoja	Cobán, Alta Verapaz
2	<i>Hypericum uliginosum</i>	Mil flores	hierba	Tacaná, San Marcos
3	<i>Lippia graveolens</i>	Orégano	hoja	Las Minas, Alta Verapaz
4	<i>Quercus crispifolia</i>	Encino	tallo	Las Minas, Alta Verapaz
			hoja	Las Minas, Alta Verapaz
5	<i>Salvia lavanduloides</i>	Salvia de monte	hoja - flor	Tacaná, San Marcos
6	<i>Senna alata</i>	Barajo	hoja	Samayac, Mazatenango
7	<i>Smilax domingensis</i>	Zarzaparilla	hoja	Samayac, Mazatenango
			tallo	Samayac, Mazatenango
			raíz	Samayac, Mazatenango
			fruto	Samayac, Mazatenango
8	<i>Solanum americanum</i>	Macúy	hoja	Samayac, Mazatenango
9	<i>Sterculia apetala</i>	Castaño	hoja	Flores, Petén
			corteza	Flores, Petén
10	<i>Tabebuia rosea</i>	Matiliguat	hoja	Jalapa, Jalapa
11	<i>Tithonia diversifolia</i>	Mirasol	tallo	Samayac, Mazatenango
12	<i>Valeriana prionophylla</i>	Pericón de monte	raíz	Nebaj, Quiché

2. Obtención de extractos vegetales etanólicos

La parte utilizada de cada planta a estudiar fue molida, pesada y colocada en el percolador, cubriéndola con alcohol al 90%; la solución que se obtuvo de la percolación se concentró en el rotavapor. El concentrado fue trasvasado, desecado y pesado para obtener el porcentaje de rendimiento del extracto.

3. Obtención de aislamientos de *Fonsecaea pedrosoi*

Fueron utilizados tres aislamientos de especímenes clínicos de *Fonsecaea pedrosoi* causante de cromoblastomicosis, de los cuales dos fueron donados por el Servicio de Micología, del Departamento de Microbiología (F 2.1 y F 2.2) y uno por el Laboratorio Clínico Popular (LABOCLIP) No. 37530, de la Escuela de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Fonsecaea pedrosoi fue utilizado en su fase miceliar.

4. Evaluación de Actividad Antifúngica

Se utilizó como método de referencia de actividad antifúngica el de Brancato & Golding modificado por Mac Rae descrito para dermatofitos, utilizando como control positivo la Anfotericina B, en una concentración de 1mg/mL en donde mostró una actividad antifúngica positiva *in vitro* (55,56).

a. Preparación de medio de cultivo para hongos filamentosos

- Se pesó 0.04 gramos de extracto de planta y se disolvió en 4 ml de alcohol al 50% (concentración de 10mg/mL).
- Se preparó tubos con 13.5 mL de agar Sabouraud, se esterilizó y se dejó enfriar a 50°C.
- A los tubos de Agar Sabouraud fueron agregados 1.5 mL de extracto de la planta a estudiar para obtener una concentración final de 1 mg/mL de agar-extracto.
- La mezcla fue vertida en cajas de petri estériles, se dejó solidificar y fueron incubados a 36°C durante 24 horas para comprobar esterilidad.

- Fueron guardados en refrigeración hasta el momento de su uso.
- b. Preparación de inóculo de hongos filamentosos
- Fue preparado medio Takashio (Sabouraud modificado para producción de esporas) con los siguientes reactivos: Dextrosa 0.6 g; NaSO₄ 0.3 g; KH₂PO₄ 0.3 g; Peptona 0.3 g; Agar-Agar 6.0 g. Se disolvió en 300 mL de agua desmineralizada y se vertieron 10 mL en tubos con tapón de rosca, se esterilizó en autoclave, y se dejó solidificar con el mayor declive posible. Se incubó 48 horas a 27°C para descartar contaminación.
 - Los hongos fueron sembrados en este medio y se incubaron a 27°C durante 23 días, hasta obtener un crecimiento homogéneo.
 - Luego de los 23 días se le agregó a cada tubo 2 mL de solución salina estéril desprendiendo el hongo con ayuda de una varilla estéril.
 - El material obtenido fue transvasado a viales con tapa de rosca. Fueron agitados durante 1 minuto en vortex y se hizo un conteo de esporas en cámara de Neubauer.
 - La suspensión fue llevada a 100 esporas/μL que es igual a 1×10^5 esporas/ml (aproximadamente 10 esporas/cuadrante) y se almacenaron en viales estériles en refrigeración.
- c. Inoculación de hongos filamentosos en placa
- En cada caja con agar-extracto fue abierto un agujero, con campanillas de Durham de 5 mm de diámetro.
 - Fueron tomados 30 μL de la suspensión de esporas y se depositaron en el agujero. Las cajas fueron incubadas a 27°C por 23 días.
 - Fueron hechas ocho repeticiones de la misma forma.
 - Se utilizó como control negativo una caja con agar Sabouraud y alcohol al 50% (1mg/mL) y como control positivo una caja con agar Sabouraud y Anfotericina B (1mg/mL).

- d. Lectura e interpretación de los resultados
- El diámetro de la colonia del hongo fue medido en milímetros.
 - Se calculó el porcentaje de inhibición, comparando el diámetro de las colonias de cajas de agar-extracto, contra el de las colonias de las cajas control.
 - Fueron tomados como positivos los extractos que redujeron en un 75% el diámetro de la colonia.

D. DISEÑO ESTADÍSTICO

1. Tipo de estudio

Experimental. Diseño no probabilístico, por conveniencia. La determinación y detección de la concentración de los extractos de las plantas que muestren actividad antifúngica se basó en una concentración de 1mg/mL. En los casos en que los extractos mostraron una actividad antifungica positiva se hicieron concentraciones de agar-extracto decrecientes (0.5, 0.25, 0.125, 0.1, 0.05 mg/mL), para determinar la concentración inhibitoria mínima.

2. Variables de interés

a. Variable independiente

Plantas nativas guatemaltecas.

b. Variable dependiente

Actividad anti *Fonsecaea pedrosoi* de extractos etanólicos de las 12 plantas nativas guatemaltecas seleccionadas.

3. Validación del método

Para validar los ensayos fue realizada una curva de crecimiento del hongo, en agar Sabouraud con alcohol al 50%, con lo que se demostró un 100% de crecimiento de *Fonsecaea pedrosoi* en 23 días (control negativo). Por otro lado fue

utilizado agar Sabouraud con Anfotericina B (control positivo), a una concentración de 1 mg/mL lo que demostró un 100% de actividad antifúngica (control positivo). Cada ensayo fue realizado ocho veces.

E. ANÁLISIS DE DATOS

Los resultados medidos son:

Actividad antifúngica positiva (Actividad a una concentración menor de 1 mg/mL): cuando el extracto reduzca el diámetro de la colonia en un 75%, comparándolo con el control negativo

Actividad antifúngica negativa (Actividad a una concentración mayor de 1 mg/mL): cuando el extracto permita el crecimiento de la colonia en más del 25% del control negativo

VIII. RESULTADOS

A. Obtención de extractos

Se prepararon diecisiete extractos etanólicos de doce plantas nativas guatemaltecas utilizadas popularmente en medicina natural, obteniéndose el porcentaje de rendimiento de cada extracto etanólico, en base a su peso inicial de materia vegetal seca y el peso final del extracto.

Tabla 1
Rendimiento del proceso de extracción de las plantas

PLANTA	NOMBRE COMUN	PARTE UTILIZADA	No. DE HERBARIO**	% DE RENDIMIENTO
<i>Cornutia pyramidata</i>	Flor lila	hoja	724	15.60
<i>Hypericum uliginosum</i>	Mil flores	hierba	970	19.50
<i>Lippia graveolens</i>	Orégano	hoja	604	9.20
<i>Quercus crispifolia</i>	Encino	tallo	754	16.81
		hoja	754	5.60
		hoja - flor	735	17.70
<i>Salvia lavanduloides</i>	Salvia de monte	hoja - flor	735	17.70
<i>Senna alata</i>	Barajo	hoja	154	17.77
<i>Smilax domingensis</i>	Zarzaparilla	hoja	662	34.10
		tallo	662	40.40
		raíz	662	21.59
		fruto	662	57.52
<i>Solanum americanum</i>	Macúy	hoja	294	6.72
<i>Sterculia apetala</i>	Castaño	hoja	280	10.22
		corteza	280	23.56
<i>Tabebuia rosea</i>	Matilisguate	hoja	343	10.14
<i>Tithonia diversifolia</i>	Mirasol	tallo	684	11.39
<i>Valeriana prionophylla</i>	Pericón de monte	raíz	906	37.00

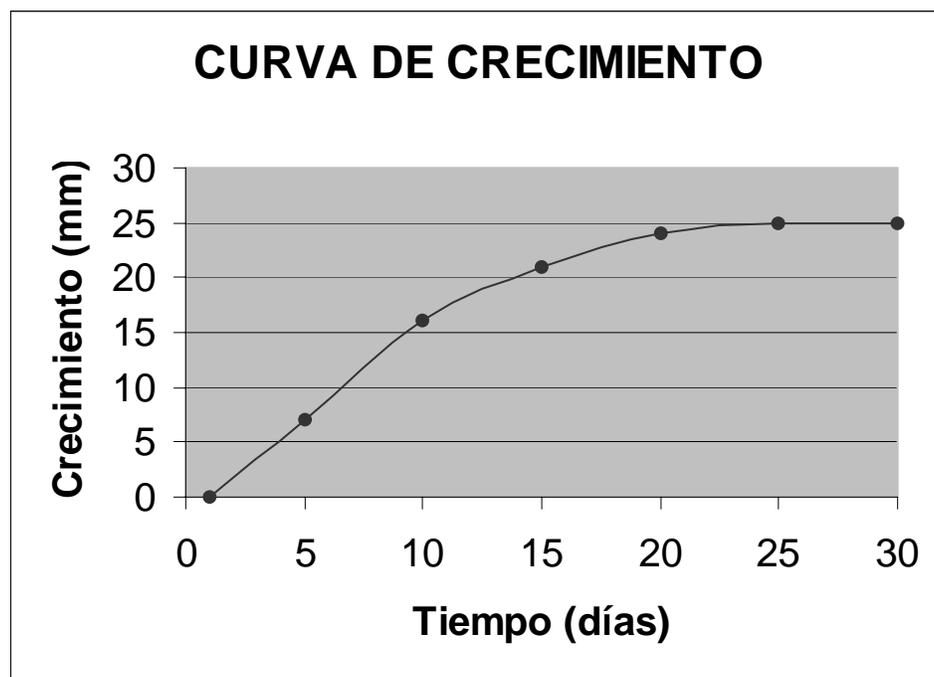
** Fuente: FARMAYA

B. Validación del método

El método de Brancato & Golding modificado por MacRae, estaba descrito para el crecimiento *in vitro* de hongos dermatofitos, por lo que fue necesario adaptar el método para hongos subcutáneos.

El método fue adaptado haciendo una curva de crecimiento de *Fonsecaea pedrosoi*, en donde se determinó que el hongo llegaba a su crecimiento máximo a los 23 días después de ser inoculado, como se muestra en la Grafica 1.

Grafica 1
Curva de Crecimiento *Fonsecaea pedrosoi*



C. Actividad antifúngica

En el tamizaje preliminar se observó que solamente el extracto de *Lippia graveolens* (hoja), presentó actividad contra *Fonsecaea pedrosoi*. Mientras que los otros extractos, *C. pyramidata* (hoja), *H. uliginosum* (hierba), *Q. crispifolia* (tallo y hoja), *S. lavanduloides* (hoja/flor), *S. alata* (hoja), *S. domingensis* (hoja, tallo, raíz y fruto), *S. americanum* (hoja),

S. apetala (hoja y corteza), *T. rosea* (hoja), *T. diversifolia* (tallo) y *V. prionophylla* (raíz), no presentaron actividad contra *Fonsecaea pedrosoi*.

Estos resultados se observan en la Tabla 2

Tabla 2
Tamizaje de la actividad antifúngica (1mg/mL)
Fonsecaea pedrosoi

PLANTA	PARTE UTILIZADA	F 2.1	F 2.2	37530
<i>Cornutia pyramidata</i>	hoja	> 1 (-)	> 1 (-)	> 1 (-)
<i>Hypericum uliginosum</i>	hierba	> 1 (-)	> 1 (-)	> 1 (-)
<i>Lippia graveolens</i>	hoja	< 1 (+)	< 1 (+)	< 1 (+)
<i>Quercus crispifolia</i>	tallo	> 1 (-)	> 1 (-)	> 1 (-)
	hoja	> 1 (-)	> 1 (-)	> 1 (-)
<i>Salvia lavanduloides</i>	hoja - flor	> 1 (-)	> 1 (-)	> 1 (-)
<i>Senna alata</i>	hoja	> 1 (-)	> 1 (-)	> 1 (-)
<i>Smilax domingensis</i>	hoja	> 1 (-)	> 1 (-)	> 1 (-)
	tallo	> 1 (-)	> 1 (-)	> 1 (-)
	raíz	> 1 (-)	> 1 (-)	> 1 (-)
	fruto	> 1 (-)	> 1 (-)	> 1 (-)
<i>Solanum americanum</i>	hoja	> 1 (-)	> 1 (-)	> 1 (-)
<i>Sterculia apetala</i>	hoja	> 1 (-)	> 1 (-)	> 1 (-)
	corteza	> 1 (-)	> 1 (-)	> 1 (-)
<i>Tabebuia rosea</i>	hoja	> 1 (-)	> 1 (-)	> 1 (-)
<i>Tithonia diversifolia</i>	tallo	> 1 (-)	> 1 (-)	> 1 (-)
<i>Valeriana prionophylla</i>	raíz	> 1 (-)	> 1 (-)	> 1 (-)

Al extracto que demostró actividad contra *Fonsecaea pedrosoi*, se le determinó la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) obteniéndose como resultado que *L. graveolens* (hoja) demuestra actividad antifúngica a una concentración de 0.1 mg/mL.

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En la gráfica No. 1 se encuentra la curva de crecimiento de *Fonsecaea pedrosoi* en agar Sabouraud sin aditivos, en donde se observa que el hongo llega a un crecimiento máximo a los 23 días.

Según el método de Brancato & Golding modificado por MacRae, el tiempo de incubación para el crecimiento de hongos dermatofitos es de aproximadamente 15 días, por lo que fue necesario prolongar el tiempo de incubación hasta 23 días para que *Fonsecaea pedrosoi*, que es un hongo subcutáneo, llegara a crecimiento máximo, ya que los hongos subcutáneos tienen crecimiento *in vitro* más lento que los dermatofitos.

En la Tabla No. 2 se presentan los resultados obtenidos del tamizaje de los 17 extractos contra *Fonsecaea pedrosoi*, encontrándose que solo el extracto de *Lippia graveolens* (hoja) presenta actividad a una concentración de 0.1 mg/mL, la cual es una actividad interesante y potencial que justifica estudios ulteriores como fraccionamiento guiado, identificación de su principio activo y estudios clínicos con la fase parasítica del hongo (células fumagoides), debido a que esta fase es encontrada en las muestras clínicas.

Este resultado justifica el hecho que esta planta es usada popularmente para la cicatrización de heridas y llagas, probablemente contribuyendo con su actividad antimicrobiana. Es importante notar que el extracto presenta actividad contra los tres diferentes aislamientos del hongo (F2.1, F2.2 y 37530). En esta especie se han identificado componentes químicos como el carvacrol y eucaliptol, los cuales podrían ser los responsables de la actividad antifúngica contra *F. pedrosoi*, ya que han demostrado tener actividad fungicida contra otro tipo de hongos levaduriformes como *Candida albicans* (57,58).

Se esperaba que otros extractos como *Q. crispifolia*, *S. alata*, *S. domingensis*, *S. americanum*, *T. diversifolia* y *V. prionophylla* presentaran actividad antifúngica, debido a que se utilizan popularmente para aliviar enfermedades cutáneas.

A pesar de la diversidad de flora que existe en nuestro país, es difícil encontrar un tratamiento alternativo para la cromoblastomycosis, dentro de la naturaleza.

X. CONCLUSIONES

1. *Fonsecaea pedrosoi* tiene un crecimiento máximo en agar Sabouraud sin aditivos a los 23 días.
2. El extracto etanólico de *Lippia graveolens* (hoja) es el único de los diecisiete extractos de las doce plantas nativas guatemaltecas estudiadas que posee actividad antifúngica contra *Fonsecaea pedrosoi*.
3. El extracto etanólico de *Lippia graveolens* (hoja) presentó una Concentración Inhibitoria Mínima de 0.1 mg/mL.

XI. RECOMENDACIONES

1. Efectuar el mismo tamizaje con otras plantas utilizadas popularmente para las afecciones subcutáneas, para proporcionar nuevas alternativas de tratamiento para la cromoblastomycosis.
2. Hacer estudios en donde se utilice la fase parasítica del hongo (células fumagoides o esclerotes de Medlar) para conocer si los extractos actúan de igual manera en la fase micelial que en la saprofitica.
3. Realizar fraccionamiento guiado de el extracto de *Lippia graveolens* con diferentes solventes para iniciar el estudio fitoquímico y definir a que grupo de moléculas pertenece el principio activo con actividad antifúngica.

XII. REFERENCIAS

1. Logemann HK. Manual Práctico de Micología Médica. Guatemala: Bayer, 1995. 227p. (p.83 - 87).
2. Rippon JW. Micología Médica; Hongos y Actinomicetos patógenos. 3 ed. México: Interamericana, McGraw-Hill, SA de CV, 1990. 854p. (p. 229 - 273).
3. Anaissi EJ, McGinnis MR, Pfaller MA. Clinical Mycology. USA:Churchill Livingstone, 2003. 608p. (p. 482 – 485).
4. Dubos R. Bacterial and Mycotic of microorganism. 3 ed. USA: Lippincott Company, 1958. 820p. (p. 613 – 615).
5. Micosis. Disponible en: [http://www. Geocities.com/ralv7/micosis.htm](http://www.Geocities.com/ralv7/micosis.htm): marzo 2002.
6. Benecke, ES. Medical Micology Manual. USA: Burgess Publishing Co, 1970. 226p (p. 118 – 122).
7. Jawetz E, Melnick J, Adelberg E. Review of Medical Microbiology. USA: Lange medical Publications, 1982. 553p. (p. 291 – 293).
8. Howard DH. Fungi Pathogenic of Humans and Animals. USA: Marcel Dekker Inc, 1983. 652p. (p. 228 – 230).
9. McGinnis M, D'Amato R, Geoffrey A. Pictorial handbook of Medically Important Fungi and Aerobic Actinomycetes. USA: Land Praeger Publishers, 1982. 160p. (p. 60 – 65).

10. Ortiz Herrera, Jorge Luis. Prevalencia de Micetoma, Esporotricosis y Cromomicosis: Estudio retrospectivo, realizado en la Clínica de Dermatología del Hospital Nacional Pedro de Betancourt de la Antigua Guatemala, Enero 1990-Agosto 1992. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Medicas), 1992. 25p.
11. Enfermedades micóticas de la piel. Disponible en: http://www.eprodig.com/dermlink/Paginas/consejos_enfermedades_micoticas_hm: Marzo 2001.
12. Gupta AK, Taborda PR and Sanzovo AD. Alternate web and combination itraconazole and terbinafine therapy for chromoblastomycosis caused by *Fonsecaea pedrosoi* in Brazil. *Med Mycol.* 2002; 40(5):529-534.
13. Bonifaz A, Carrasco-Gerard E and Saul A. Chromoblastomycosis: clinical and mycologic experience of 51 cases. *Mycoses.* 2001;44(1-2):1-7.
14. Teixidor JR \$ Masso JG. *Medicina Interna*. 1ª edición. Tomo I. Barcelona: 1998. 1938p. (p. 1816 – 1817).
15. Karzung BG. *Farmacología Básica y Clínica*. 6 ed. México: Manual Moderno, 2002. 1346p (p. 915 – 922).
16. Smith CM \$ Reynard AM. *Farmacología*. Argentina, Buenos Aires: Medico Panamericano, 1995. 1135p (p. 839 – 849).
17. Physicians GenRx. *The Complete drug reference*. USA: Mosby, 1996. 2130p (p. 112 – 114, 1198, 1199, 1963, 1964).
18. Alio AB, *et al.* Cromomicosis: Uso del tratamiento combinado de Itraconazol y 5-fluorouracilo en *Fonseca pedrosoi* e Itraconazol y Criospray en *Exophiala*

- jeanselmei* var *Lecanii-Corni*. *Derm. Venez*, 2001;39:11-15.
19. Sevigny GM and Ramos-Caro FA. Treatment of chromoblastomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi* with low-dose terbinafine. *Cutis*. 2000;66(1):45-46.
 20. Esterre P, Jahevitra M and Andriantsimahavandy A. Humoral immune response in chromoblastomycosis during and after therapy. *Lab Inmuno*. 2000;7(3):497-500.
 21. Perez A. Terbinafine: broad new spectrum of indications in several subcutaneous and systemic and parasitic diseases. *Mycoses*. 1999;42:111-114.
 22. Tahuma H, et al. Case report. A case of chromoblastomycosis effectively treated with terbinafine. Characteristics of chromoblastomycosis in the Kitasato region, Japan. *Mycoses*. 2000;43(1-2):79-83.
 23. Wiley John. Antifungal Chemotherapy Department of Bacteriology. USA: D.C.E. Speller, 1980. 446p (p. 8, 22 – 25).
 24. Anfotericina B, Disponible en:
www.viatusalud.cm/documento.asp?ID=6412&alias=ANFOTERICINA%20B#indice:
marzo 2004.
 25. Flores R. Atlas de las Plantas medicinales y Curativas; La salud a través de las plantas. Barcelona: Cultural, S.A, 1997. 111p. (p. 2 – 6).
 26. Girón LM, et al. Anticandidal activity of plants used for the treatment of vaginitis in Guatemala and clinical trial of a *Solanum nigrescens* preparation. *J Ethnopharma*. Guat, 1988;22:307-313.
 27. He X, et al. An Antifungal compound from *Solanum nigrescens*. *J. Ethnopharma*. Jap,1994;43:173-177.

28. Robson N, Robson E. *Maravillas Botánicas*. Madrid: LIBSA, 1991. 83p.
29. Treben M. *Plantas Medicinales: Consejos para prevenir y curar enfermedades*. Barcelona: Blume S.A, 1989. 208p. (p. 10 – 15).
30. Cáceres A. *Plantas de uso medicinal en Guatemala*. Guatemala: Editorial Universitario, 1996. 402p. (p. 279, 280, 373 – 376).
31. Naranjo P. *Medicina Indígena y Popular de America Latina y Medicina Contemporánea*. Guatemala: Instituto Indigenista Nacional, Vol. XIII, 1978. 617p.
32. Cáceres A., Saravia A. *Actividad Abtifúngica de plantas de uso medicinal en Guatemala*. Guatemala: Editorial Universitario (Cuaderno de Investigación 7-92, Dirección General de Investigación, DIGI, USAC) 1993. 89p.
33. Standley PC, Williams LO. *Flora of Guatemala*. Fieldiana:Botany. Vol.24. Part IX. No. 3-4, 1973. 417p. (p. 196 – 198, 289 – 291)..
34. Robineau L. *Farmacopea Caribeña*. Martinique: Editorial Emile Désormeaux, 1996 (p. 113-114).
35. Comerford SC. *Medicinal plants of two Mayan healers from San Andrés, Petén, Guatemala*: *Econ Bot*, 1996;50:327-336.
36. Guevara CI. *Plantas Medicinales Utilizadas por los Itzaes, San José, Petén, Guatemala*: Asociación Bioitza, 2001. 118p.
37. *Cornutia pyramidata*. Disponible en: www.mapn.org/guatemala02-ec.htm: Marzo 2002.

38. Standley PC, Williams LO. Flora of Guatemala. Fieldiana:Botany. Vol.24. Part VII. No. 1, 1961. 281p. (p. 51 – 53).
39. Ramírez UR, et al. Vegetales empleados en medicina tradicional Norperuana. Banco Agrario del Perú NACL. Universidad de Trujillo. Trujillo, Perú, 1988. 54p.
40. Standley PC, Williams LO. Flora of Guatemala. Fieldiana:Botany. Vol.24. Part IX. No. 1-2, 1970. 236p. (p. 211 – 214).
41. Standley PC, Steyermark JA. Flora of Guatemala. Fieldiana:Botany. Vol.24. Part III. 1952. 431p. (p. 94 – 97, 382 – 385).
42. Pequeño Diccionario On Line de las Plantas Medicinales. Disponible en: <<http://plantas.Metropoliglobal.com>>: marzo 2002.
43. House PR; Lagos-Witte S, et al. Plantas Medicinales comunes de Honduras. UNAH/CIMN-H/CID/CHR/GTZ, Tegucigalpa, 1995. 407p.
44. Standley PC, Williams LO. Flora of Guatemala. Fieldiana:Botany. Vol.24. Part V, 1950. 432p. (p. 109 – 112).
45. James AO. Isthmian. Ethnobotanical Dictionary. 3 ed. Scientifica Publisher. India, 1986. 41p.
46. Davidse SC. Flora Mesoamericana. México: UNAM 1995. Vols. VI, vol. I. 4200p. (p. 21).
47. Gentry JL Jr, Standley PC. Flora of Guatemala. Fieldiana:Botany. Vol 24. Part X. No. 1-2, 1974. 152p. (p. 104 – 107).

48. Standley PC, Steyermark JA. Flora of Guatemala. Fieldiana:Botany. Vol.24. Part VI. 1949. 438p. (p. 419 – 420).
49. Girón LM, et al. Ethnobotanical survey of the medical flora used by the Caribs of Guatemala. J. Ethnopharmacology 1991;34:173-187.
50. Morton JF. Atlas of Medicinal Plants of Middle America. Springfield: Charles C. Thomas Publisher, 1981. 1420p.
51. Standley PC, Williams LO, Nash D. Flora of Guatemala. Fieldiana:Botany. Vol 24. Part X. No 3-4. 1974. 465p. (p. 225 – 226).
52. Nash D, Williams LO. Flora of Guatemala. Fieldiana:Botany. Vol 24. Part XII. 1976. 603p. (p. 324 – 327).
53. Nash D, Dieterle J. Flora of Guatemala. Fieldiana:Botany. Vol 24Part XI. No 4. 1976. 431p. (p. 302 – 303).
54. Goncibat OR. Pesque la Calma. Prensa Libre. Año LII; No.16,915: 59-60.
55. Cáceres A. Manual de Procedimientos del Proyecto Biodiversidad Tropical de Centro América. Organización de Estados Americanos. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, 1999. 17p.
56. Janssen AM, Scheffer JJC and Svendsen A. Screening for Antifungal Activity of Nineteen Latin American Plants. Phytotherapy research. 1998;12:427-430.
57. Componentes químicos *Lippia graveolens*: Disponible en: <www.cendoc@xolo.conabio.gob.mx>: Agosto 2004.

58. Componentes químicos *Lippia graveolens*: Disponible en:
www.intcomex.com.mx/agrodonpablo/componentes.html : Agosto 2004.

