

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central figure, likely a saint or historical figure, seated on a throne. Above the figure is a crown. The seal is surrounded by Latin text: "CONSPICUA CAROLINA ACADEMIA COACTEMALENSIS INTER" at the top and "SACETERAS ORBIS" on the left and "ULTRA" on the right. There are also two banners with the words "PLUS" and "ULTRA" on them.

**INHIBICIÓN DE MICROORGANISMOS CAUSALES DE INFECCIONES
SUBDÉRMICAS POR PLANTAS NATIVAS DE USO MEDICINAL**

**KARLA MARÍA LANZ ROMERO
KEVIN ALEXANDER ORTIZ BARRIENTOS
EDWIN ARIEL PÉREZ MINERA
ADOLFO CESAR SANTIZO ESTRADA**

Químicos Biólogos

Guatemala, Agosto de 2012

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a large, circular emblem in the background. It features a central figure holding a staff, surrounded by various symbols including a castle, a lion, and a cross. The Latin motto "SALUTEM ALTIUS" is inscribed on a banner held by the central figure. The outer ring of the seal contains the text "UNIVERSITAS CAROLINA GUATEMALENSIS" and "ACADEMIA COACTEMALITENSIS INTER".

**INHIBICIÓN DE MICROORGANISMOS CAUSALES DE INFECCIONES
SUBDÉRMICAS POR PLANTAS NATIVAS DE USO MEDICINAL**

Seminario de Tesis

Presentado Por

KARLA MARÍA LANZ ROMERO

KEVIN ALEXANDER ORTIZ BARRIENTOS

EDWIN ARIEL PÉREZ MINERA

ADOLFO CESAR SANTIZO ESTRADA

Para optar al título de

Químicos Biólogos

Guatemala, Agosto de 2012

JUNTA DIRECTIVA

Oscar Cóbar Pinto, Ph.D.	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto, M.A.	Secretario
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal I
Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares	Vocal II
Lic. Luis Antonio Gálvez Sanchinelli	Vocal III
Br. Fausto René Beber García	Vocal IV
Br. Carlos Francisco Porras López	Vocal V

ACTO QUE DEDICAMOS

A DIOS:

Por estar siempre con nosotros y llenarnos de amor, bendiciones, inspiración, sabiduría y conocimiento.

A NUESTROS PADRES:

Por su ejemplo de vida, consejos y amor incondicional, éste triunfo es de ustedes. Esperamos que el sueño que empezó un día dándonos la oportunidad de estudio se vea reflejado.

A NUESTROS HERMANOS:

Por compartir este éxito en nuestras vidas, por todo el cariño y apoyo que nos han brindado esperamos ser un buen ejemplo en sus vidas.

A NUESTRAS FAMILIAS:

Por también ser parte de nosotros, nuestra formación como personas y alegrarse de nuestros éxitos.

A NUESTROS AMIGOS:

Por su amistad, apoyo, ánimo y compañía en las diferentes etapas de nuestra vida y sobre todo por los buenos momentos compartidos.

AGRADECIMIENTOS

A Dios el creador de toda la vida y el universo.

A la Universidad de San Carlos de Guatemala, Nuestra Alma Mater por darnos la oportunidad de haber cursado nuestra carrera en sus magnas aulas.

A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia por la formación profesional.

A todos nuestros profesores, en especial a todos los del Departamento de Citohistología, gracias por compartirnos todo su conocimiento.

A nuestro asesor el Lic. Armando Cáceres por su dirección, experiencia, enseñanzas, paciencia, consejos y el tiempo brindado para la realización de este estudio.

A nuestra revisora Licda. María Luisa García por sus sugerencias brindadas que enriquecieron este estudio.

A Licda. María Eugenia Paredes, Jefa de Escuela de Química Biológica, por su apoyo.

ÍNDICE

I.	AMBITO DE INVESTIGACION	01
II.	RESUMEN	02
III.	ANTECEDENTES	04
	A. Patologías microbianas subcutáneas	04
	1. Cromblastomicosis	04
	2. Actinomicetoma	11
	3. Esporotrocosis	20
	4. Eumicetoma	29
	B. Medicina Natural	34
	1. Medicina tradicional	34
	2. Etnobotánica y Etnofarmacología	34
	3. Fitoterapia	34
	4. Fitoterapia en Guatemala	35
	C. Especies Vegetales	35
	1. Selección de plantas en el estudio	35
	2. <i>Lippia graveolens</i> HBK	36
	3. <i>Senna alata</i> L.	38
	4. <i>Bouyeria huanita</i> (Lex.) Hemsl	40
	5. <i>Diphysa robinoides</i> Benth	41
	6. <i>Hymenaea courbaril</i> L.	43
	7. <i>Senna occidentales</i> L.	45
	8. <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	47
	9. <i>Solanum nigrescens</i> Mart. & Gal	49
	10. <i>Piper jacquemontianum</i> Kunth	51

11. <i>Byrsonima crassifolia</i> (L.) Kunth	53
D. Evaluación de la susceptibilidad a antimicrobianos <i>in vitro</i>	55
1. Métodos de difusión	56
2. Métodos bioautográficos	57
3. Métodos de dilución	57
4. Métodos de proporción y de relación de resistencia	58
5. Métodos de prueba-E	59
6. Método colorimétrico de MTT	59
7. Método de Brancato & Golding modificado	60
IV. JUSTIFICACIÓN	61
V. OBJETIVOS	62
VI. HIPOTESIS	63
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	64
VIII. RESULTADOS	77
IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	84
X. CONCLUSIONES	93
XI. RECOMENDACIONES	94
XII. REFERENCIAS	95
XIII. ANEXOS	115

I. ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN

La presente investigación se enfocará en comprobar el posible efecto inhibitorio de extractos vegetales contra microorganismos causantes de infecciones subcutáneas como parte de un programa de investigación de la actividad inhibitoria de agentes causales de dichas infecciones por especies vegetales nativas llevado a cabo en el Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad San Carlos de Guatemala desde el año 2003.

Este estudio complementará investigaciones realizadas con anterioridad, en las cuales se ha demostrado actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de *Diphysa robinoides*, *Hymenaea courbaril*, *Lippia graveolens*, *Phaseolus vulgaris*, *Senna occidentalis* y el extracto metanólico de *Piper jacquemontianum*, para tener información de importancia en el país contra este tipo de afecciones subcutáneas poco comunes pero de interés médico por su cronicidad, permitiendo así el desarrollo de productos naturales con efecto inhibitorio. Estos productos son de mayor accesibilidad para las poblaciones rurales del país y no presentan los efectos secundarios, costos o duración del tratamiento tan prolongados como los presentados por las drogas de venta comercial.

II. RESUMEN

Las infecciones subcutáneas incluyen un grupo heterogéneo de microorganismos que se desarrollan en el sitio del trauma subcutáneo. La infección evoluciona lentamente mientras el agente etiológico sobrevive y se adapta al ambiente adverso que presenta el tejido del hospedero. La farmacoterapia para el tratamiento de las infecciones subcutáneas es a menudo poco efectiva y con variedad de efectos adversos indeseables, por lo que se buscan nuevas alternativas fitoterapéuticas que reduzcan al máximo estos efectos, que sean seguras y efectivas.

El propósito de este estudio es la búsqueda y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de diez plantas nativas guatemaltecas las cuales han sido seleccionadas en base a sus antecedentes etnomédicos y en estudios previos en los que se han demostrado actividad antimicrobiana contra especímenes clínicos de infecciones subcutáneas: la bacteria *Nocardia brasiliensis* y los hongos *Fonsecaea pedrosoi*, *Madurella grisea*, *Sporothrix schenckii* y *Pyrenochaeta romeroi*.

Para la evaluación de la actividad antifúngica de los extractos contra los hongos se realizó un bioensayo de tamizaje utilizando la metodología descrita por Brancato y Golding (1983) modificada por McRae (1988) y colaboradores; y para la actividad antibacteriana de los extractos contra los hongos se realizó un bioensayo de tamizaje utilizando la metodología descrita por Mitcher (1972) modificada y validada por Morales (2010). Como resultado se obtuvieron cuatro extractos activos significativamente ($p < 0.05$) contra la bacteria *N. brasiliensis* (*Hymenaea courbaril*, *Senna alata*, *Diphysa robinoides* y *Senna occidentalis*) las cuales presentaron una concentración inhibitoria mínima de 0.0625, 0.125, 0.5 y 1 mg/ml respectivamente. Cinco extractos activos significativamente ($p < 0.05$) contra el hongo *M. grisea* (*Lippia graveolens*, *S. alata*, *S. occidentalis*, *Byrsonima crassifolia* y *Phaseolus vulgaris*) las cuales presentaron una concentración mínima inhibitoria (CIM) de 0.0078125, 0.5, 0.5, 1 y 1 mg/ml respectivamente. Seis extractos activos contra el hongo *P. romeroi* (*D. robinoides*, *L. graveolens*, *Bourreria huanita*, *H. courbaril*, *S. occidentalis* y *S. alata*) las cuales presentaron una CIM de 0.0625, 0.0625, 0.25, 0.25, 0.25 y 1 mg/m respectivamente. Ninguno de los extractos evaluados contra *F. pedrosoi* y *S. schenckii* inhibieron su crecimiento significativamente ($p > 0.05$).

Los resultados de este estudio validan el uso popular de las especies vegetales que presentaron actividad antimicrobiana, en especial la planta *L. graveolens* con la cual se obtuvo un CIM de 0.0078125 mg/ml, por lo que se recomienda determinar sus sustancias activas e identificar la composición molecular de las mismas para su futura aplicación clínica.

III. ANTECEDENTES

A. Patologías microbianas subcutáneas

1. Cromoblastomicosis

a) 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 (Dubos, 1998; Logemann, 1995; Rippon, 1990).

El tipo de enfermedad provocada por hongos filamentosos de la familia *Dematiaceae* depende del huésped, sus defensas y la virulencia relativa del agente infectante (López, & Méndez, 2007).

La infección puede extenderse y causar deformación del área afectada y en casos raros causar elefantiasis por compresión de los ganglios linfáticos (Rippon, 1990).

Fue descrita por primera vez por Pedroso en 1911, y señalada en Brasil por Max Rudolph en 1914. Sin embargo, el término cromoblastomicosis no fue usado sino hasta el año 1922 en Brasil por Terra y colaboradores. Esta denominación, que persiste por la costumbre, ha sido objetada porque los hongos productores de la afección no producen esporas, ni formación de blastosporas en su vida parasitaria, por lo que la designación correcta debería ser cromomicosis (Anaissi, McGinnis, & Pfaller, 2003; Moreira, Díaz, Moredo, Pérez, & De la Torre, 2005).

b) Etiología

Los agentes etiológicos de la cromoblastomicosis son hongos feoides (dermatiáceos), saprofitos del suelo, dimórficos de la familia *Dematiaceae* de los Hyphomycetes. Los principales agentes etiológicos de la cromoblastomicosis son *F. pedrosoi*, *F. compactum*, *Phialophora verrucosa*,

Cladosporium carrionii, *Cladophialophora arxii*, *Rhinocladiella aquaspersa*, *Expohiala spinifera*, *Wangiella dermatitidis* y *Botryomyces caespitosus* (Anaissi, McGinnis, & Pfaller, 2003; López, & Méndez, 2007).

c) Características de *F. pedrosoi*

i) Morfología de la colonia: En cultivo crece muy lentamente, 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. Su temperatura óptima es a 25°C (Dubos, 1998; Logemann, 1995; Rippon, 1990).

ii) Morfología microscópica: Se observan 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. *F. pedrosoi* en su fase saprofitica o fase micelial, tiene micelio septado. En su fase parasítica se caracteriza por presentar células fumagoides patognomónicas de la cromoblastomicosis. Si la muestra proviene de material costroso, es posible observar micelio tabicado café pardo (Logemann, 1995; Murray, Rosenthal, & Pfaüer, 2005; Rippon, 1990; Zacchino, & Gupta, 2007).

d) Ecología

Los agentes causantes de la cromoblastomicosis, han sido aislados de la vegetación en descomposición, la madera en putrefacción y en el humus de los bosques y el 70% se encuentra en climas tropicales y subtropicales (Anaissi, McGinnis, & Pfaller, 2003; Logemann, 1995; López, & Méndez, 2007).

e) Epidemiología

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 heridas durante su trabajo. Se cree que la producción de hormonas en el ser humano protege o favorece el desarrollo de los hongos, esto fue demostrado por Hernández-Hernández, *et al*, que demostró el efecto inhibitorio de la progesterona y testosterona en el crecimiento de *F. pedrosoi*, *C. carrionii*, y *P. verrucosa* (Dubos, 1998; Jawetz, Melnick, & Adelberg, 1982; Logemann, 1995).

La cromoblastomycosis ocurre con igual frecuencia en persona de Europa, Asia, Latinoamérica, y Africa. Se realizó un estudio comparando a personas sanas con personas que presentaban la enfermedad y se demostró que las personas con cromoblastomycosis son 10 veces más propensas a tener el Antígeno de Histocompatibilidad HLA-A29. La cromoblastomycosis a través de los años se ha colocado en los primeros lugares de frecuencia dentro de las micosis subcutáneas en América latina y Europa (López, & Méndez, 2007). En Guatemala el único agente causal informado es *F. pedrosoi* (Ortiz, 1992).

f) Características clínicas

La lesión se presenta en el sitio donde se sufrió el traumatismo transcutáneo, la cual vehiculiza la fase saprofítica del hongo causal. 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 (Arenas, 2003; Estrada, Arenas, Vega, & Bonifaz, 2003; Dubos, 1998; Logemann, 1995).

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 (Dubos, 1998; Rippon, 1990).

La mayoría de casos reportados suelen localizarse en las extremidades inferiores, empezando con un crecimiento radial que empieza en la pierna o tobillo, que se extiende al dorso del pie para

luego subir hasta la rodilla, además pueden localizarse también en brazos y pecho, entre otras (López, & Méndez, 2007).

g) Diagnóstico

La cromoblastomycosis se diagnostica mediante estudios histológicos y micológicos (examen en fresco y cultivo). Además, las biopsias son sumamente útiles y permiten descartar otros padecimientos verrucosos (Arenas, 2003; Estrada *et al.*, 2003; Murray, Rosenthal, & Pfäuer, 2005).

i) Examen histopatológico: De las lesiones, se destacan la hiperplasia pseudoepiteliomatosa de la epidermis y el infiltrado linfomononuclear de la dermis; este último puede hacerse absceso y granuloma, con células gigantes (Yegres, & Yegres, 2005).

ii) 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 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) (Logemann, 1995; Rippon, 1990).

iii) 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, por lo general los agentes patógenos crecen a los 10 días al formar colonias de color verde fuerte y luego un color negro (López, & Méndez, 2007).

iv) Identificación: La identificación específica es la taxonómica, se hace de manera microscópica identificando las estructuras asexuales por lo que se determinan los tipos y porcentaje de conidios de cadena larga, cadena corta y los filioconidios presentes (Logemann, 1995; Rippon, 1990; López, & Méndez, 2007).

h) Diagnóstico diferencial

La cromoblastomycosis debe diferenciarse de la tuberculosis verrucosa, epiteloma y leishmaniasis, entre otras (Dubos, 1998).

i) Pronóstico

Las micosis subcutáneas son graves en cuanto a pronóstico y tiene limitaciones en cuanto al tratamiento y posibilidades de curación. Es común que la cromoblastomycosis persista localizada y no debilita al paciente. Existe la posibilidad de una infección secundaria provocando una falta de drenaje linfático y elefantiasis, lo que puede causar problemas al paciente (Yegres *et al.*, 2005).

Existen factores que determinan la recuperación del paciente como: sus condiciones socioeconómicas, la adherencia al tratamiento y la resistencia del medicamento, así como también complicaciones eventuales que pueden darse (López, & Méndez, 2007).

j) Tratamiento

En las primeras etapas de la enfermedad, el tratamiento más confiable es la escisión quirúrgica, electrodesecación o la criocirugía. En los casos más avanzados, se ha utilizado gran variedad de antimicóticos, presentando baja selectividad y alta toxicidad, como por ejemplo la anfotericina B (Bonifaz, Carrasco-Gerard, & Saúl, 2001; Gupta, Taborda, & Sanzovo, 2002).

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, itraconazol o tiabendazol, en donde se observa retraso en el desarrollo de resistencia hacia la 5-fluorocitosina y permite el uso de dosis más bajas de los fungicidas mencionados (López, & Méndez, 2007).

i) 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 (Smith, & Reynard, 1995; Teixidor, & Masso, 1998).

- Dosis: este puede administrarse intravenosamente y solamente el 10% de la bioactividad se retienen 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/kg de peso, en un tiempo de seis a doce semanas hasta cuatro meses (Logemann, 1995; Teixidor, & Masso, 1998).

- 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 (Logemann, 1995; Teixidor, & Masso, 1998).

ii) 5-fluorocitosina: También conocida como flucitosina, es una pirimidina fluorada, antimetabolito de la citosina y con estructura química similar al 5-fluorouracilo (Logemann, 1995).

- 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-fluorouracilo, 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 ADN (Darzung, 2002; Logemann, 1995; Teixidor, & Masso, 1998).

- Dosis: la dosis oral recomendada es de 50 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 (López, & Méndez, 2007).

- Efectos secundarios: los efectos secundarios son pocos, pero puede causar náuseas, vómitos, enterocolitis y depresión de la médula ósea, leucopenia y trombocitopenia (Darzung, 2002; Logemann, 1995; Teixidor, & Masso, 1998).

iii) Itraconazol: Es un compuesto triazólico de segunda generación, derivado del dioxolano con un átomo adicional de nitrógeno (Logemann, 1995).

- 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 (Darzung, 2002).

- 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 (Darzung, 2002; Smith, & Reynard, 1995).

- Efectos secundarios: el itraconazol puede causar carcinogénesis y efectos teratógenos, entre otros (Smith, & Reynard, 1995).

iv) Terbinafina: Es un compuesto alilamino sintético.

- Mecanismo de acción: la terbinafina obstruye la biosíntesis de los esteroides de la célula fúngica inhibiendo la escualeno-epoxidasa, en un estadio temprano que lleva a un déficit de ergosterol y a una acumulación intracelular de escualeno, con lo cual se provoca la muerte celular (Smith, & Reynard, 1995).

- Dosis: la dosis recomendada varía según la edad del paciente, de la indicación y la gravedad de la infección, se recomiendan de 250 a 500 mg al día en personas adultas y en menores dosis en niños (López, & Méndez, 2007).

- Efectos secundarios: puede causar pérdida de apetito, dispepsia, náuseas, dolor abdominal, diarrea, exantema, artralgia, mialgia y disfunción hepatobiliar, entre otras (Smith, & Reynard, 1995).

2. Actinomicetoma

a) Definición

“Síndrome anatomoclínico de tipo inflamatorio crónico, que depende de la inoculación traumática exógena de actinomicetos aerobios. Se caracteriza por aumento de volumen, deformación del área y fístulas que drenan exudado seroso o purulento donde se encuentra el parásito formando granos” (Arenas, 2003, p. 128).

b) Etiología

Son producidos por bacterias del orden de los Actinomycetales, géneros *Nocardia*, *Actinmadura* y *Streptomyces*. Los agentes más frecuentemente implicados en el actinomicetoma de granos blancos amarillentos son *N. brasiliensis*, *N. asteroides*, *N. caviae*, *N. transvalensis*, *Streptomyces somaliensis* y *Actinomadura madurae*, y el único causante de actinomicetomas de granos rojos es *Actinomadura pelletri* (Restrepo, Robledo, Leiderman, Restrepo, Botero, & Bedoya, 2003).

Estos microorganismos están caracterizados por la producción de estructuras filamentosas, delgadas, ramificadas y Gram positivo; algunos son parcialmente ácido alcohol resistentes, los cuales no forman parte de la microbiota normal ni de la piel, tracto respiratorio o gastrointestinal; resultan de la exposición ambiental ya sea por inhalación y/o inoculación en la piel (Horowitz, 2009).

c) Características de *N. brasiliensis*

i) Apariencia macroscópica: Las colonias en agar nutritivo son de color anaranjado sucio, granuladas, acumuladas con hifa aérea escasa y blanca en los bordes. Sobre agar nitrato glicerol las colonias son acumuladas, de color coral con micelio aéreo escaso en los márgenes (Berd, 1973; Mishra, Gordon, & Barnett, 1980).

ii) Apariencia microscópica: Presenta filamentos ramificados formando micelio extensivo sobre la mayoría de los medios, alrededor de 1 μm de diámetro. La fragmentación empieza en el centro de la colonia después de alrededor de 4 días de incubación y produce células bacilares y cocoides irregulares. El micelio vegetativo de color amarillo-anaranjado a café con hifa aérea delgada y blanca sobre la superficie (Berd, 1973; Mishra *et al.*, 1980).

Existen métodos actuales como análisis de ADN, ribotipificación y análisis de cromatografía líquida de alta definición de los ácidos micólicos de las paredes celulares que nos permite identificar más de 12 especies (Horowitz, 2009).

d) Ecología

Los microorganismos causales viven como saprófitos en la naturaleza, en el suelo o en los vegetales. Se han acumulado evidencias que indican que, a veces *Nocardia* es un miembro saprófito de la microbiota del tracto respiratorio (al menos de forma transitoria); ya que algunos pacientes sin evidencias de clínicas de nocardiosis pueden tener cultivos de esputo positivos para *Nocardia*. Este microorganismo predomina en clima tropical húmedo con precipitación pluvial de 600 a 2000 mm (McNeil, & Brown, 1994; Saubolle, & Sussland, 2003).

e) Epidemiología

El género *Nocardia* se encuentra distribuido en todo el mundo. Son parte importante de la microbiota del suelo normal. Usualmente asociado con el agua. También pueden estar asociados a la descomposición de plantas, polvo y aire. Se encuentra sobre todo en una banda transversal

que sigue el Trópico de Cáncer. En 1963, se obtuvieron datos de la distribución geográfica mundial de 854 casos; fueron actinomicetomas en 60% y eumicetomas en 40% (Arenas, 2003; Saubolle *et al.*, 2003).

En Latinoamérica el agente prevalente causante de actinomicetomas es *N. brasiliensis* cuando en el África es *S. somaliensis*. Se ha reportado un predominio en el sexo masculino, en proporción de 4:1. La edad promedio de presentación es entre los 16 a 45 años. El tiempo de evolución es muy variable, el cual va desde los 2 meses hasta los 54 años, pero generalmente es de dos a tres años. Los pacientes con esta afección poseen historial de heridas traumáticas menores. Siendo la mayoría localizadas en los pies, aunque las manos, el cuello y la cara también son afectadas. El caminar descalzo puede ser el modo más común de adquisición de esta enfermedad, ya que esto expone el pie a heridas traumáticas en suelos contaminados (Arenas, 2003; McNeil *et al.*, 1994).

La distribución en Latinoamérica de los casos reportados posicionan a México como el país con el mayor número de casos reportados (84.94%), le sigue Guatemala (3.86%), Venezuela (3.21%) y Brasil (2.84%). También se han reportado casos en Estados Unidos, Ecuador, Argentina, Costa Rica, Uruguay, Cuba y Panamá (Serrano, Horacio, & Beaman, 2005).

Un estudio realizado en Guatemala reportó 8 casos de micetoma, estudiados en los Hospitales Generales de Enfermedad Común y Accidentes del Instituto Guatemalteco de Seguridad Social, en pacientes del sexo masculino con edades promedio de 40 años; de 1989 a 1993. Cuatro de los casos fueron actinomicetomas por *N. brasiliensis* (50%), 4 eumicetomas: 2 por *M. grisea* (25%), 1 por hongo productor de grano negro (12.5%) y 1 por hongo productor de grano blanco (12.5%), en estos últimos no se pudo identificar la especie (Chang, & Ranero, 1994).

f) Características clínicas

El actinomicetoma presenta una lesión de tipo inflamatorio, generalmente acompañada de infecciones secundarias; es destructivo e invade los huesos desde etapas muy tempranas de la infección (Arenas, 2003).

El cuadro clínico característico está constituido por un aumento de volumen del área afectada (a menudo asintomático), de consistencia leñosa, que con el tiempo desarrolla nódulos, abscesos y fístulas que drenan pus, en el que se pueden identificar granos, a veces a simple vista y en otros en el estudio micológico directo en el microscopio (Arenas, 2003; Restrepo *et al.*, 2003).

La lesión inicial se observa como un absceso granulomatoso con reacción inflamatoria que contiene gránulos, los cuales son infectivos del microorganismo. La enfermedad generalmente afecta el pie y los miembros inferiores, pero pueden localizarse en cualquier región del cuerpo. Se han observado micetomas en otros sitios como la región torácica, los miembros superiores, el cuello, el abdomen y la cabeza (Welsh, Vera-Cabrera, & Salinas-Carmona, 2007)

Producen lesiones que no son dolorosas. En las etapas de mayor evolución de la enfermedad se puede presentar un dolor a veces intolerable; esto debido a daños de los nervios, causados por la reacción del tejido fibroso, o también por lesiones arteriales. Otras causas de la presencia de dolor pueden ser causadas por los procesos de expansión ósea debida al granuloma (Berd, 1973; McNeil *et al.*, 1994; Saubolle, & Sussland, 2003).

N. brasiliensis suele producir micetomas con inflamación intensa, orificios fistulosos abundantes, de gran tamaño. Estos micetomas son masas embebidas de filamentos y material intracelular. Los granos del actinomicetoma causados por *N. brasiliensis* suelen ser de color blanco amarillento con un tamaño de 20-200 μm , de forma reniforme, de consistencia blanda con presencia variable de clavos (Saubolle, & Sussland, 2003; Welsh *et al.*, 2007).

g) Diagnóstico

El estudio bacteriológico-micológico directo con hidróxido de potasio o agua destilada, nos permite identificar los "granos" del micetoma. Los actinomicóticos están formados por hifas microsifonadas y una sustancia que las amalgama en forma de grano (micro colonia) (Serrano, & Sandoval, 2003).

En *N. brasiliensis* y *N. asteroides* vemos frecuentemente clavas en la periferia. En el estudio anatomopatológico podemos observar un proceso granulomatoso agudo y crónico, en el que a menudo encontramos el "grano" rodeado por este tipo de reacción celular inflamatoria. Si las hifas que lo componen son microsifonadas, su etiología es bacteriana en el 98% de los casos. Un ensayo inmunoenzimático puede detectar de 25 a 26 antígenos kDA, el cual se puede usar para confirmar el diagnóstico de *N. brasiliensis* (Welsh *et al.*, 2007).

Los nódulos linfáticos que drenan desde el área afectada por el actinomicetoma, pueden frecuentemente observarse aumentados de tamaño con una hiperplasia de tipo reactivo, la cual presenta una infiltración por células plasmáticas. En algunos casos se presentan cuerpos de Russell. Esto puede estar relacionado a una respuesta a los antígenos que llegan a los nódulos desde los granos que se encuentran en la lesión primaria, pero también la presencia de infecciones secundarias puede ser un factor para que se den estos cambios celulares. En algunos casos la metástasis de los microorganismos hacia los nódulos puede causar linfadenitis que se puede acompañar de la presencia de procesos fistulosos. La linfadenitis ha sido observada más frecuentemente en casos de actinomicetoma debido a *N. brasiliensis*, el análisis de los nódulos y la piel, es el principal método de diagnóstico para la infección nocordial (Dodiuk, Cohen, Ziv, Lee, Chazan, Sahfer *et al.*, 2010).

El actinomicetoma produce lesiones a nivel de los huesos, las cuales se caracterizan por su carácter lítico, que conllevan a una destrucción del tejido óseo y así mismo a la nueva formación de tejido óseo. Se pueden observar la presencia de cavidades en el tejido óseo, algunas aisladas y simples o también y más comúnmente se observan de formas múltiples, pequeñas y numerosas. Estas cavidades no presentan márgenes definidos. Los estudios radiográficos de la parte afectada pueden mostrar la presencia de una reacción periostal y se puede visualizar partes de hueso neoformado y así mismo la presencia de formaciones de tipo asteroide. La observación de este tipo de formaciones, así como la presencia del triángulo de Codaman, puede simular cambios radiográficos que se pueden confundir con un sarcoma osteogénico (Serrano, & Sandoval, 2003).

i) El cultivo: Los granos (microcolonias) constituyen la fuente fundamental del material para el cultivo; éstos deben estar libres de contaminación. Así mismo, se pueden usar para el

cultivo las secreciones filantes (serosanguinolentas) del área afectada. El cultivo generalmente se puede realizar en agar sangre de carnero al 5%, agar chocolate y agar BACTEC, aunque hay especies fastidiosas que deben sembrarse en medios especiales, como, agar saboraud con antibiótico, Lowestein-Jensen y/o Thayer-Martin modificado; el crecimiento es de 2 a 3 semanas, incubándose a 30 ó 37°C. También pueden incubarse en atmósfera de CO₂. En el crecimiento obtenido se observa, en el caso de *N. brasiliensis*, colonias blanco-amarillentas, yesosas, de aspecto de cotufas de maíz. La bacteria es Gram-positivo y ácido-alcohol resistente (variable); *N. brasiliensis* hidroliza la caseína y licúa la gelatina. Estas dos últimas características la diferencian del resto de los actinomicetos causantes de micetoma. Son importantes también el cultivo a diferentes temperaturas, así como el estudio de la actividad proteolítica, la utilización de azúcares y la de compuestos nitrogenados (Dodiuk *et al.*, 2010).

ii) Histopatología: El diagnóstico histopatológico del actinomicetoma se basa en el estudio del grano presente en la lesión y en la observación del tipo de reacción del tejido afectado. El tipo de reacción del tejido generalmente no es específica para la especie de actinomiceto patógeno causante de la lesión por lo que no debe considerarse como una característica segura para el diagnóstico histológico del actinomicetoma (Serrano, & Sandoval, 2003; Dodiuk *et al.*, 2010)

Los granos de *Nocardia*, cuando son coloreados con hematoxilina-eosina se observan generalmente como granos pequeños de color eosinófilo, se presentan como estructuras ramificadas de tipo filamentoso y segmentadas, que se pueden observar en la periferia del grano, conformando una especie de corona radiada. No se observa la presencia de cemento. La periferia del grano tiene forma de orla y con la presencia de células con formas de mazos “club shape” y rodeados por un infiltrado celular de polimorfonucleares leucocitos. Los granos se observan embebidos en microabscesos, ocupando la parte central de los mismos (Serrano, & Sandoval, 2003).

iii) Reacción del tejido afectado: Alrededor del grano no se observan espacios, se observa la presencia de numerosos neutrófilos y no se observa tejido de granulación, se pueden llegar a observar algunos macrófagos y escasas células plasmáticas. No se observan células gigantes, el

tipo de reacción tisular es característico de una inflamación del tipo agudo. Puede observarse un ligero aumento de la vascularidad y un pequeño grado de fibrosis a nivel periférico de la lesión. Los granos de *Nocardia* son Gram positivo y se pueden observar los elementos celulares filamentosos ramificados, septados, así como formas celulares bacilares o cocoidales. Los granos de *Nocardia* se colorean de manera poco intensa con la técnica de Zielh Neelsen y se logra mejor con la técnica de Kinyoun para ácido-alcohol resistencia. Los granos de *Nocardia* no se colorean con la técnica del PAS, ni con la de impregnación por plata de Gomori (Serrano, & Sandoval, 2003).

h) Diagnóstico diferencial

Lo más importante es la diferenciación de otros padecimientos fistulosos con granos o sin ellos, como por ejemplo los paramicetomas, seudomicetomas, seudomicetomas dermatofíticos y las bolas fúngicas (Arenas, 2003).

i) Pronóstico

Los actinomicetomas de corta evolución y sin afección ósea cuando responden bien al tratamiento médico. Cuando no se da tratamiento o la especie bacteriana posee resistencia a esta, el pronóstico es malo ya que la evolución es progresiva, lenta y el proceso se extiende en la superficie y la profundidad. La localización podálica es la de peor pronóstico ya que es la más expuesta a movimientos y traumatismos, lo cual facilita la diseminación a ganglios inguinales, en el abdomen es más benigno (Arenas, 2003; Pang, Jashin, Huang, & Tying, 2004).

Hay minusvalidez si no se corrige la pérdida de la función. En pacientes graves las complicaciones, el deterioro del estado general y el detrimento social ponen en peligro la vida (Arenas, 2003).

j) Tratamiento

El actinomicetoma se trata utilizando sulfonamidas. Puede ser utilizado el trimetoprim sulfametoxazol o durante varios meses la combinación de sulfonamidas con estreptomycin.

Asímismo, puede combinarse con clofazimina, rifampicina, tetraciclinas, minociclina o isoniazida. Se recomienda el uso de amoxicilina con ácido clavulánico en los pacientes que no responden a la terapéutica convencional (Arenas, 2003).

Después de administrarse cualquiera de las combinaciones citadas deberá continuarse el tratamiento con dapsona por tiempo prolongado; en los casos avanzados se recomienda el tratamiento de por vida para evitar las recidivas, a menos que haya alguna contraindicación como el aumento de la concentración de las enzimas hepáticas o la intolerancia a la dapsona, en cuyo caso esta debe de ser sustituida por minociclina o rifampicina (Guerrant, Walker, & Willer, 2002; Torres, Vásquez, Moreno, & Arenas, 2008).

i) Trimetoprim sulfametoxazol: El trimetoprim/sulfametoxazol (también conocido con el nombre de cotrimoxazol o TMP-SMX) es la asociación del trimetoprim y del sulfametoxazol en una proporción fija de 1:5. Esta proporción ocasiona unas concentraciones plasmáticas en la proporción 1:20 que es la que produce una óptima actividad antibacteriana. Tanto el trimetoprim como el sulfametoxazol son, individualmente, fármacos antibacterianos eficaces de la familia de los antagonistas del folato (Smith, & Reynard, 1995).

- Mecanismo de acción: es generalmente bactericida actuando al inhibir enzimas secuenciales que intervienen en la síntesis del ácido fólico bacteriano. El sulfametoxazol es estructuralmente parecido al ácido p-aminobutírico (PABA) inhibiendo de forma competitiva la formación del ácido fólico a partir del PABA. Por su parte, el trimetoprim se une a la enzima dihidrofolato reductasa, lo que impide la formación del ácido tetrahidrofólico a partir del dihidrofolato. El ácido tetrahidrofólico (THF) es la forma activa del ácido fólico sin el cual la bacteria no puede sintetizar timidina, lo que conduce a una interferencia en la síntesis de los ácidos nucleicos y de las proteínas. Al actuar mediante estos dos mecanismos diferentes, la combinación trimetoprim-sulfametoxazol es sinérgica frente a un gran número de bacterias (Smith, & Reynard, 1995).

- Dosis: la dosis de elección es de 40/8 mg/kg/día por 6 meses a 2 años (Serrano, Sandoval, & Beaman, 2007).

- Efectos secundarios: las reacciones adversas más comunes son la anorexia, las náuseas y los vómitos que usualmente disminuyen con el tiempo, pero que ocasionalmente pueden requerir tratamiento médico. Otras reacciones adversas son la diarrea, glositis, estomatitis, y dolor abdominal. También se han descrito hepatitis con elevación de las enzimas hepáticas, ictericia, necrosis hepática y pancreatitis (Smith, & Reynard, 1995).

ii) Estreptomicina: Fue el primer antibiótico descubierto del grupo de los aminoglucósidos. Es un antibiótico bactericida de espectro reducido, derivado de la actinobacteria *Streptomyces griseus* (Smith, & Reynard, 1995).

- Mecanismo de acción: ejerce su efecto a través de la fijación a la unidad 30S ribosomal, interfiriendo la formación del complejo entre el ARNm y la unidad 30S. Esto inhibe la síntesis de proteínas, esto altera la lectura del ADN y la formación de proteínas útiles. La actividad de este fármaco es bactericida (Smith, & Reynard, 1995).

- Dosis: para el tratamiento de actinomicetoma se ha recomendado una dosis de 1 g/día durante un mes, luego la misma dosis cada tercer día (Serrano *et al.*, 2007).

- Efectos secundarios: algunos de los efectos secundarios descritos son ototoxicidad, sordera, parestesia bucal, neuropatía periférica, neuritis óptica, escotoma y dermatitis exfoliativa (Smith, & Reynard, 1995).

iii) Amoxicilina con ácido clavulánico: Es un antibiótico semisintético derivado de la penicilina. Se trata de una aminopenicilina que actúa contra un amplio espectro de microorganismos, tanto Gram positivos como Gram negativos (Smith, & Reynard, 1995).

- Mecanismo de acción: inhibe la conexión entre las cadenas lineares del peptidoglicano que forman la mayor parte de las paredes de los microorganismos Gram positivos. Al impedir que la pared celular se construya correctamente, la amoxicilina ocasiona, en último término, la lisis de la bacteria y su muerte. Mientras que el ácido clavulánico actúa inhibiendo las penicilasas producidas por las bacterias (Smith, & Reynard, 1995).

- Dosis: se administra 500 mg/125 mg cada 8 a 12 horas, durante tres a seis meses. Esta dosis solo se administra a pacientes que no responden al tratamiento convencional (Smith, & Reynard, 1995).

- Efectos secundarios: los efectos secundarios más frecuentes son los asociados a reacciones de hipersensibilidad y pueden ir desde un salpullido sin importancia a serias reacciones anafilácticas. Se ha descrito eritema multiforme, dermatitis exfoliativa, rash maculopapular con eritema, vasculitis y urticaria (Smith, & Reynard, 1995).

3. Esporotricosis

a) Definición

Es una infección fúngica crónica, que se caracteriza por la presencia de nódulos cutáneos o subcutáneos ulcerados, eritematosos y/o verrucosos, con frecuencia asociada a afectación linfática nodular. La vía de entrada del hongo es generalmente por inoculación cutánea, aunque en ocasiones se da por vía inhalatoria causando una neumonitis granulomatosa con frecuencia cavitada (Rippon, 1990).

También puede haber diseminación hematogena con posterior localización osteoarticular, en el sistema nervioso central, aparato genitourinario y ojos en el huésped inmunocompetente (Logemann, 1995).

b) Etiología

La esporotricosis está ocasionada por el hongo *Sporothrix schenckii*. El descubrimiento de este microorganismo se dio en 1898 por Schenk cuya figura sirvió como inspiración para dar el nombre a este microorganismo (Gates, 2004). *Sporothrix cyanescens*, es un organismo saprófito el cual ha sido comentado como causa de infección en al menos un paciente inmunocomprometido (Tambini, Farina, Fiocchi, Dupont, Guého, Delvecchio *et al.*, 1996).

La esporotricosis se ha asociado con dos variedades, la variedad *schenckii* que tiene como secuencias características 18S ARNr (Kawasaki, & Ishizaki, 1998), y con la variedad *lurieii*, que *in-vivo* produce células muriformes que hacen que se confunda con cromoblastomicosis (Padhye, Kaufman, Durry, Banerjee, Jindal, Talwar, & Chakrabarti, 1992; Marimon, Gené, Cano, & Guarro, 2008).

c) Características de *Sporothrix schenckii*

S. schenckii es un hongo dimórfico, que crece en forma filamentosa en el ambiente y en forma de levadura a 37°C en tejidos. Las cepas aisladas en la naturaleza varían en su capacidad de crecer a 37°C, por lo que la infección podría ser un proceso de selección de aquellas cepas que crecen a mayores temperaturas y adaptarse al tejido animal (Pang *et al.*, 2004).

La forma filamentosa presenta colonias de crecimiento lento (3-5 días) inicialmente claras, húmedas o levaduriformes, que posteriormente se convierten en colonias duras y arrugadas de color marrón o negro en su totalidad o por zonas, debido a la producción de conidias pigmentadas (Ramos-e-Silva, Vasconcelos, Carneiro, & Cestari, 2007).

En el examen microscópico, se observan hifas delgadas de 1-2 μm de diámetro, con conidióforos perpendiculares cuyo extremo distal se dilata formando una vesícula denticulada, de la que nacerán simpoidalmente conidias hialinas de 2-3 μm x 3-6 μm que se agrupan en forma de ramillete o margarita. A medida que el cultivo envejece, la conidiación aumenta y aparecen conidias sésiles a lo largo de los conidióforos e incluso hifas no diferenciadas. Algunas cepas forman conidias de mayor tamaño, triangulares, pigmentadas y de pared gruesa, más resistentes. La forma levaduriforme se observan levaduras ovales o en forma de cigarro, con varias gemaciones (Ramos-e-Silva *et al.*, 2007).

d) Ecología

Se aísla del suelo y las plantas, por lo que aquellos trabajos que impliquen su manipulación predisponen a la infección, el hongo tiene la capacidad de sobrevivir a temperaturas de 26-27°C,

en presencia de materia orgánica (Da Rosa, Scrofeneker, Vettorato, Gervini, Vettorato, & Weber, 2005).

La infección se produce por inoculación del hongo en la piel, generalmente a través de objetos contaminados. Con frecuencia se encuentra en la historia clínica antecedentes de arañazos con plantas con espinas, fundamentalmente rosales, madera, juncos, paja, o la manipulación de pajares o cobertizos, hierba, armadillos, etc (Villagrán, 1991).

e) Epidemiología

S. schenckii se encuentra ampliamente distribuido alrededor del mundo, con focos endémicos en distintos países, con mayor prevalencia en países tropicales y subtropicales como México, Guatemala y Colombia. En México es la causa más frecuente de micosis subcutáneas, observándose principalmente en manipuladores de hierbas. En Uruguay, la mayoría de los casos está relacionada con la casa del armadillo, en cuyas madrigueras se ha aislado el hongo. En Brasil es una enfermedad frecuente en manipuladores de paja. En Guatemala la predisposición para adquirir la enfermedad se asocia a la agricultura. En el resto de lugares se debe a exposición ocupacional por jardinería y agricultura (Rippon, 1990; Ramos-e-Silva *et al.*, 2007).

La esporotricosis puede presentarse en todas las edades y afecta principalmente a los hombres en una proporción de 3:1 por el riesgo de exposición, pero puede variar dependiendo del país (Rippon, 1990).

En 1978 el primer caso de esporotricosis reportado para Guatemala fue en la Laguna de Ayarza en el Departamento de Santa Rosa, área endémica de *S. schenckii*. Además se ha establecido otros focos endémicos en los Departamentos de San Marcos y Chimaltenango (Logemann, 1995).

Se han realizado varios estudios epidemiológicos donde se ha determinado que la esporotricosis es la micosis subcutánea más frecuente en Guatemala, con un predominio del sexo masculino; la agricultura constituye el principal riesgo de exposición. El dato más reciente es de 1991 donde se

reportaron 285 casos confirmados por el Laboratorio de Micología de la Policlínica del Instituto Guatemalteco de Seguridad Social (IGSS) y el Servicio de Micología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala (Logemann, 1995).

f) Características clínicas

Se pueden presentar varias formas clínicas de esporotricosis entre las más importantes están:

i) Forma linfocutánea: Es la variante más frecuente, representa entre el 46% y 92% de todos los casos. Se inicia en el lugar de la inoculación traumática, con la aparición de una lesión nodular eritematosa, generalmente sin dolor, que crece durante días o semanas. El tiempo de incubación es de aproximadamente de 1 a 4 semanas, pero en algunos casos puede llegar a ser de meses. Las lesiones pueden ser lisas o verrucosas pero con tendencia a la ulceración, supuración y desarrollo de bordes eritematosos de 2 a 4 centímetros de diámetro; la localización más frecuente es en las extremidades inferiores y superiores, aunque pueden presentarse en cualquier lugar, pueden desarrollarse adenopatías regionales o locales, sobre todo en la forma de linfocutánea facial (Zhang, Xu, Zhang, Jiang, Zhou, Li, & Zhang, 2011).

A pesar de que la lesión inicial que puede persistir como única, después de unas semanas la tendencia es el desarrollo de otras lesiones secundarias, pequeñas por toda la línea linfática. Con evolución ulcerosa, granulomatosa y de descarga purulenta (Pang *et al.*, 2004).

ii) Forma cutánea diseminada: Es una de las formas más raras de observar. Inicialmente se trata de lesiones eritematosas, supurativas y ulcerativas que posteriormente se vuelven quistes y nódulos. Se localizan fundamentalmente en boca, faringe, cuerdas vocales y nariz. Las lesiones son típicamente dolorosas a diferencia de la forma cutánea y con tendencia al sangrado (Zhang *et al.*, 2011).

iii) Forma extracutánea: Es la forma más rara y difícil de diagnosticar en la fase temprana y es causada por la inhalación de esporas o por diseminación hematogena. La afectación osteoarticular es la forma más frecuente de esporotricosis extracutánea; se caracteriza por una

artritis destructiva con lesiones osteolíticas, tendosinovitis y periosteítis. Las localizaciones más frecuentes son las articulaciones mayores de las extremidades: mano, codo, tobillo y rodilla (Zhang *et al.*, 2011).

Generalmente afecta a una única articulación, en un 48% de los casos, también se observan lesiones dérmicas o subcutáneas. Clínicamente cursa con inflamación, dolor, limitación motora progresiva y, con frecuencia, derrame articular. La sintomatología sistémica es escasa y aparte de la elevación de la velocidad de eritrosedimentación no existen otros datos de laboratorio de interés. Para llegar al diagnóstico son necesarios cultivos repetidos del líquido articular y cultivo y examen histopatológico de la biopsia sinovial, que revela inflamación granulomatosa (Zhang *et al.*, 2011; Pang *et al.*, 2004).

La segunda afección es la ocular la cual no se acompaña de otra localización de esporotricosis en un 70% de los casos y se observa en un 50% de los casos de esporotricosis diseminada. Se caracteriza por la presencia de lesiones ulcerativas y gomosas, con un curso similar a la esporotricosis cutánea (Zhang *et al.*, 2011).

La afectación meníngea es una localización poco frecuente. Clínicamente se manifiesta como una meningitis crónica con cefalea, confusión y pérdida de peso, pleocitosis en el líquido cefalorraquídeo, aumento de las proteínas e hipogluorraquia. Los cultivos de líquido cefalorraquídeo pueden ser negativos, por lo que en ocasiones es necesario realizar cultivos repetidos de volúmenes considerables de líquido y estudio serológico para llegar al diagnóstico (Zhang *et al.*, 2011; Morris-Jones, 2002)

iv) Forma pulmonar: Es típica de varones entre 30-60 años. Aproximadamente un tercio de los pacientes son alcohólicos y es muy similar el cuadro al que presenta la tuberculosis pulmonar. La inhalación de conidias de *S. schenckii* puede dar lugar a dos tipos de afectación pulmonar: cavitación crónica o adenopatías primarias. Aunque puede ser asintomática, la forma pulmonar presenta cavitación unilateral o bilateral con fibrosis. Inicialmente cursa con tos productiva, febrícula, astenia y/o pérdida de peso. Sin tratamiento, la enfermedad puede permanecer estacionaria pero la tendencia es hacia la progresión con aumento de las

cavitaciones, necrosis caseosa, alteración de la función pulmonar y, en ocasiones, diseminación a otros órganos (Zhang *et al.*, 2011).

Para el diagnóstico de esporotricosis pulmonar es necesario la confirmación por cultivo y estudio serológico. En el examen microscópico directo del esputo o BAL pueden observarse células levaduriformes características. En algunos pacientes es necesario cultivos repetidos de esputo para llegar al diagnóstico. La prueba cutánea de la esporotriquina, antígeno de la pared celular, suele ser positiva en los pacientes con esporotricosis pulmonar. Los estudios serológicos mediante técnicas de inmunodifusión, fijación de complemento y aglutinación son también útiles para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad (Zhang *et al.*, 2011).

v) Forma visceral diseminada: La esporotricosis diseminada que afecta a varios órganos es infrecuente y generalmente se observa en pacientes con enfermedades de base como diabetes, tratamiento prolongado con corticoides, neoplasias, sarcoidosis, enfermedades hematológicas, infección por VIH y alcoholismo. La esporotricosis en pacientes inmunocompetentes es generalmente de diseminación linfática, lenta y localmente progresiva. Cuando existe una diseminación en la sangre, puede haber afectación multiorgánica con numerosas lesiones e incluso hemocultivos positivos. Por lo general, las lesiones se localizan en piel, huesos y músculos, pero pueden afectarse otros órganos como tracto genitourinario, sistema nervioso central, hígado, bazo, páncreas, miocardio y tiroides. Clínicamente se caracteriza por fiebre de 39°C o superior, anorexia, pérdida de peso, dolor y limitación articular. Como alteraciones analíticas puede hallarse anemia, leucocitosis y aumento de la velocidad de eritrosedimentación. La infección no tratada es fatal. Los cultivos de las lesiones cutáneas y de las articulaciones suelen ser positivos; los hemocultivos y los cultivos de la médula ósea raramente lo son. Los pacientes inmunocomprometidos que únicamente presenten la forma cutánea deben ser estudiados para descartar otras localizaciones. Además, ante todo hemocultivo positivo para *S. schenckii* debe descartarse esporotricosis diseminada (Zhang *et al.*, 2011).

g) Diagnóstico

Para el diagnóstico definitivo de la micosis, hay que identificar el hongo por medio de un examen microscópico de la muestra, ya sea pus, fluido sinovial, esputo, sangre o fragmento del tejido. El cultivo positivo de cualquier lugar es diagnóstico de infección, a pesar de que se han descrito casos de colonización cutánea (Ramos-e-Silva *et al.*, 2007).

Para el cultivo, se recomienda la utilización de un medio base como agar Sabouraud dextrosa con antibióticos (micocel) o papa dextrosaa 25°C, para el crecimiento de la forma filamentosa y de un medio enriquecido como infusión de cerebro y corazón (BHI por su siglas en inglés) o agar sangre a 37°C, para el crecimiento de la forma levaduriforme. Generalmente se observa crecimiento a los 3-5 días de incubación, aunque los cultivos deben incubarse durante tres semanas antes de darse como negativos (Morris-Jones, 2002).

También se puede hacer el examen directo utilizando hidróxido de potasio, para resaltar algunas características peculiares de cuerpos asteroides para la identificación. El examen directo ayuda al diagnóstico en un 85.7% de los casos, con la posterior identificación el diagnóstico alcanza un 95.2% de especificidad (Ramos-e-Silva *et al.*, 2007).

La demostración del dimorfismo permite confirmar la identificación de especie de *S. Schenckii*; para ello el hongo debe inocularse en un tubo con agar sangre inclinado en ambiente húmedo a 37°C. Debe tenerse en cuenta que, en ocasiones, la conversión a la fase levaduriforme sólo se observa en los bordes de las colonias (Ramos-e-Silva *et al.*, 2007).

i) Diagnóstico serológico: Las cepas de *S. schenckii* de origen humano o animal o del suelo, son antigénicamente similares. Para las pruebas serológicas se utilizan antígenos procedentes de estas cepas (Ramos-e-Silva *et al.*, 2007).

La prueba cutánea de la esporotriquina consiste en la inyección intradérmica de una dilución al 1:1.000 de levaduras tratadas con el calor. La reacción se considera positiva con la aparición de una induración de 5 mm después de 24 horas (Morris-Jones, 2002).

En cuanto a la detección de anticuerpos, las técnicas más sensibles y específicas son las de aglutinación, como las pruebas de latex, también las pruebas de inmunodifusión y las pruebas de ELISA. La inmunodifusión es positiva en cualquier forma de esporotricosis extracutánea y sólo en un 50% de los casos de esporotricosis cutánea. Se consideran útiles tanto para el diagnóstico como para el control del tratamiento (Morris-Jones, 2002).

h) Diagnóstico diferencial

El diagnóstico diferencial debe establecerse con tuberculosis, criptococosis, histoplasmosis, nocardiosis, leishmaniosis e infecciones por micobacterias atípicas (especialmente, *Mycobacterium kansasii* y *M. marinum*) (Pang *et al.*, 2004).

i) Tratamiento

Los yoduros son una terapia eficaz y barata para la forma cutánea, siendo el tratamiento de elección. Se inicia con 1 ml de una solución saturada de yoduro potasio, tres veces al día vía oral. La dosis se incrementa gradualmente a 1,5 ml/día (3-5 gotas/dosis/día), hasta llegar a 25-40 gotas tres veces al día en niños y 40-50 en adultos (Ramos-e-Silva *et al.*, 2007; Kaufman, 1999).

El itraconazol, a dosis de 100-200 mg/día, se ha mostrado eficaz en el tratamiento de la esporotricosis y debe considerarse de elección en caso de desarrollo de alergia a los yoduros, lenta respuesta al tratamiento o fracaso terapéutico (índice de curación del 90-100%, duración del tratamiento 3-6 meses). También se puede usar ketaconazol a dosis de 200-400 mg/día y fluconazol a dosis 200-600 mg/día (López, & Méndez, 2007).

Debido a su gran costo no debe ser elegido como tratamiento inicial para la esporotricosis cutánea. El ketoconazol no dado buenos resultados para estas formas de esporotricosis, la anfotericina B es demasiado tóxica (López, & Méndez, 2007).

La forma osteoarticular puede responder a la anfotericina B, pero en un 20-30% de los casos se observa recaída o progresión de la enfermedad. La recaída es frecuente y estos pacientes deben

tratarse durante períodos de tiempo prolongados. Aunque su papel terapéutico no está aclarado, en ocasiones se ha administrado la anfotericina intrarticular o se ha asociado desbridamiento quirúrgico. El yoduro de potasio generalmente es ineficaz, con una respuesta del 33%. En estudios recientes se obtienen respuestas del 75% con itraconazol a dosis iniciales de 600 mg/día y tratamiento de mantenimiento con dosis de 400 mg/día durante al menos un año. El ketoconazol (400-800 mg/día) y fluconazol (200-400 mg/día), parecen menos eficaces. Debido a que tiene una menor toxicidad que la anfotericina B y es efectivo a dosis mejor toleradas que el ketoconazol, el itraconazol debe ser el tratamiento de elección (Kaufman, 1999; Ramos-e-Silva *et al.*, 2007).

La respuesta de la esporotricosis pulmonar al tratamiento con yoduros es escasa (24% de curaciones). Con la anfotericina B como terapia única tampoco se obtiene buena respuesta (35% de curaciones). Cuando se realiza tratamiento conjunto con resección pulmonar y anfotericina B preoperatoria, se obtienen curaciones en el 75% de los casos. El fracaso terapéutico está con frecuencia asociado a resección incompleta. Existen escasos datos sobre la utilidad de los azoles en el tratamiento de la esporotricosis pulmonar, la respuesta oscila entre el 30 y el 50%, generalmente es lenta, la recaída frecuente y se requieren dosis de 400 mg/día durante largos períodos de tiempo (Kaufman, 1999; Ramos-e-Silva *et al.*, 2007).

En el tratamiento de la meningitis y de otros pacientes con enfermedad grave, el tratamiento inicial debe ser siempre la anfotericina B, aunque se han descrito cepas de *S. schenckii* resistentes a la anfotericina. La esporotricosis extracutánea en los pacientes inmunodeprimidos a menudo responde a la anfotericina, aunque la recaída es frecuente. En las formas no meníngeas puede plantearse el tratamiento de mantenimiento con itraconazol, una vez el paciente hayasuperado la fase aguda-crítica (Kaufman, 1999; Ramos-e-Silva *et al.*, 2007).

4. Eumicetoma

a) Definición

Lesión aguda, subaguda o crónica que afecta el tejido cutáneo, subcutáneo y puede extenderse al hueso. Se origina después de un traumatismo y la lesión se inicia en el sitio de inoculación, extendiéndose a áreas adyacentes, presentado la triada de tumefacción, fístula y gránulos (Logemann, 1995).

b) Etiología

Los agentes del micetoma pueden ser actinomicetos (Actinomycetoma) y hongos (Eumicetoma). Los causantes del eumicetoma son hongos de los géneros *Acremonium*, *Fusarium*, *Madurella*, *Pseudallescheria*, *Pyrenochaeta* y *Leptospaeria*, entre otros (Arenas, 2003; Logemann, 1995; Welsh *et al.*, 2007)

c) Características

i) *M. grisea*

- Granos: los granos son negros, redondos o lobulados. Su tamaño es hasta de 1 mm; la consistencia es suave es un principio, luego se vuelve dura y quebradiza. La sustancia de cemento es de color pardo, está limitado a los bordes externos de los gránulos. El centro se ve hueco, en secciones, y está compuesto de una red micelial laxa, hialina. Estas células son pequeñas (1-3 μm) y su espectro es el de una cadena de células de gemación (Rippon, 1995).

- Morfología de la colonia: las colonias son de crecimiento lento, a temperatura de 30°C. Son oscuras, plegadas, con desarrollo veloso, de color canela a gris en la superficie. Puede desarrollar picnidios cuando se cultiva en medios pobres en nutrientes como el agar Czapek-Dex o agar papa-zanahoria, que simulan *P. romeroi* (Logemann, 1995; Rippon, 1990).

ii) *P. romeroi*

- Granos: presenta gránulos blando, negros y de forma tubular, su tamaño varia de 0.5 a 1.5mm. Hay una red central de hifas y una gruesa banda de células poligonales infladas en las aéreas periféricas. El borde externo está compuesto por células negras hinchadas (Rippon, 1990).
- Morfología de la colonia: es vellosa, lanosa y de color negro grisáceo; la periferia es de color claro. El hongo crece con rapidez a temperatura de 30°C. Se producen picnidios osteolados de color negro parduzco cuyo tamaño es de 40-100 µm x 50-130 µm. están cubiertos por un sombrerillo rígido, redondo, oscuro. Las picnidiosporas son elípticas, hialinas de color amarillo oscuro y su tamaño promedio es de 1.5-2 µm. nacen en cadenas o en fiálides dentro de los picnidios (Logemann, 1995).

d) Epidemiología

El eumicetoma predomina en África, Asia, especialmente en India, mientras que el actinomicetoma es más común en Centroamérica, Venezuela, Brasil, el medio este, Pakistan y Banlgadesh; en México el eumicetoma representa menos del 2% del micetoma (Arenas, 2003; Pang *et al.*, 2004).

Predomina en el sexo masculino, con proporción de 4:1; se presenta en más de 60% en campesinos que están expuestos a los agentes causales, la edad promedio de presentación es entre los 16-45 años (Arenas, 2003).

e) Características clínicas

El eumicetoma tiende a ser más localizado, con curso crónico. Los actinomicetomas son de evolución rápida y con tendencia a diseminarse al hueso. Si el causante es un miembro del género *Nocardia*, puede extenderse al sistema nervioso central, pudiendo causar la muerte (Logemann, 1995).

Suele afectar una región específica; el sitio más frecuente son las extremidades inferiores. Predomina en el pie aunque puede observarse en cualquier otra localización (pierna, rodilla, muslo, mano, antebrazo, brazo, hombro, pared abdominal, región preesternal, dorso y rara vez la cara o cabeza) (Arenas, 2003).

El síndrome se caracteriza por aumento de volumen, deformación de la región y muchos orificios fistulosos, sitios de salida de exudado seropurulento donde se encuentran los llamados “granos” (Arenas, 2003).

f) Diagnóstico:

i) Análisis de laboratorio: Se inicia con una buena toma de muestra. Esta puede ser material purulento o una biopsia (Logemann, 1995).

Examen microscópico inicial: Directo o con KOH al 10% para buscar gránulos. Se debe observar las características de estos (color, grosor de los filamentos que los forman, presencia de clavos, clamidoconidios). El grosor de los filamentos es lo que hace la diferencia entre los gránulos actinomicéticos y los gránulos fúngicos (Welsh *et al.*, 2007).

Cultivo: Se realiza en agar Sabouraud con antibióticos, Sabouraud simple y agar Lowenstein Jensen, incubados a 35 a 37°C, durante 7 a 10 días (Welsh *et al.*, 2007).

ii) Cortes histopatológicos: Teñido con PAS y que de esta manera se puede apreciar mucho mejor la morfología y características del gránulos. Deben cultivarse pequeños fragmentos de biopsia en los medios antes de mencionados (Logemann, 1995).

iii) La ultrasonografía puede demostrar lesiones tempranas y dar cierta información sobre los tejidos inflamados y la extensión del micetoma (Logemann, 1995).

g) Diagnóstico diferencial

Lo más importante es la diferenciación tuberculosis, osteomielitis, coccidioidomicosis, sporotricosis y otras infecciones fúngicas (Welsh *et al.*, 2007).

h) Pronóstico

Sin tratamiento o con resistencia a este, el pronóstico es malo para la función ya que la evolución es progresiva, lenta y el proceso se extiende en la superficie y la profundidad. Hay minusvalidez si no se corrige la pérdida de la función, o después de la amputación. En pacientes graves; las complicaciones, el deterioro del estado general y detrimento social, ponen en peligro la vida; ciertos casos extremos son letales (Rippon, 1990).

i) Tratamiento

Si el agente causal es un hongo, la respuesta terapéutica es nula por lo que el tratamiento de elección es la cirugía, una extirpación completa elimina el proceso y no da metástasis ni recidivas (Logemann, 1995).

i) Ketoconazol: Este medicamento se usa para tratar infecciones fúngicas que pueden diseminarse a diferentes partes del cuerpo. El ketoconazol pertenece a los antifúngicos llamados imidazoles (Martínez, Carnoturía, Castro, Muñio, & Torres, 1998).

- El mecanismo de acción de este antibiótico es mencionado con anterioridad.
- Dosis: 200 a 400 mg/día, durante 12-18 meses (Arenas, 2003; Wiley, 1980).
- Efectos secundarios: hipersensibilidad, daño en el hígado, depresión, salpullido, urticarias, prurito, dificultad para respirar (Wiley, 1980).

ii) Itraconazol: Es introducido en el tratamiento de las micosis sistémicas en 1992. Compuesto triazólico de segunda generación, derivado del dioxolano (Logemann, 1995; Lumbreras, Lizasoain, & Aguado, 2003).

- El mecanismo de acción de este antibiótico es mencionado con anterioridad.
- Dosis: 200 mg una o dos veces al día durante cuatro a ocho meses; se ha utilizado con magníficos resultados en dosis de 300 mg/día. Si bien no se conoce con exactitud el tiempo de tratamiento, se recomienda el triple de tiempo necesario para obtener la negatividad clínica y micológica (Lumbreras *et al.*, 2003).
- Efectos secundarios: puede causar pérdida de apetito, salpullido, urticarias, insuficiencia cardíaca congestiva (Darzung, 2002; Martínez *et al.*, 1998).

iii) Miconazol: Es un derivado imidazólico surgido al principio de 1970, está disponible de forma parenteral (Martínez *et al.*, 1998).

- Mecanismo de acción: inhibe la C-14 α demetilación del lanosterol de la membrana fúngica al unirse a una de las enzimas del citocromo P-450 (C-14 α desmetilasa), que lleva a la acumulación de C-14 α metil esteroides y reducen la concentración de ergosterol, un esteroide esencial para la integridad de la membrana citoplasmática fúngica (Arenas, 2003; Lumbreras *et al.*, 2003).
- Dosis: se usan dosis de 15 mg/día y está disponible en solución parenteral al 1% (Martínez *et al.*, 1998).
- Efectos secundarios: puede causar náuseas, vómitos, diarreas, prurito, flebitis, taquicardia y arritmias (Martínez *et al.*, 1998).

B. Medicina natural

1. Medicina tradicional:

Con la aparición de los productos sintéticos, los productos de origen vegetal pasaron a un segundo plano, hasta que en las últimas décadas el retorno hacia el uso de los productos de origen natural en terapéuticas se ha visto favorecido por un mayor conocimiento de las propiedades de los productos naturales, el desarrollo de nuevas formas para su preparación y administración. Actualmente, existe una base científica que apoya la eficacia en muchos productos fitoterapéuticos para determinadas indicaciones (Vanaclocha, & Cañigüeral, 1998; Martín, 2004).

2. Etnobotánica y etnofarmacología:

La etnobotánica se define como el estudio de las relaciones recíprocas entre el hombre y la vegetación, aunque también se vincula con el estudio del uso de las plantas en las sociedades tradicionales. Es el aprovechamiento de los recursos naturales por parte de las poblaciones locales, tanto nativas como de una determinada región. Comprende la colecta, documentación y preservación de la cultura popular relacionada con las plantas que curan y las prácticas medicinales, agrícolas y holísticas involucradas (Cáceres, 1996; Vanaclocha, & Cañigüeral, 1998).

3. Fitoterapia:

La fitoterapia es la ciencia que estudia la utilización de los productos de origen vegetal con finalidad terapéutica (Cáceres, 1996; Martín, 2004).

La base de los medicamentos fitoterapéuticos son las drogas vegetales y los diferentes tipos de productos que de ellas se obtienen. Los principios activos son las sustancias responsables de la acción farmacológica. La fitoterapia utiliza, por tanto, drogas vegetales, extractos de dichas drogas o sustancias activas aislados de las mismas. Estos productos deben ser convenientemente

preparados, dándoles la forma farmacéutica más adecuada para su administración al paciente. La eficacia se consigue solo con el uso adecuado de los preparados fitoterapéuticos, tanto en lo que se refiere a las indicaciones como a la forma de administración (Cáceres, 1996; Martín, 2004).

Al igual que en todos los medicamentos, en los preparados fitoterapéuticos es necesario garantizar su calidad, seguridad y eficacia. La estandarización de estos productos medicinales mediante bioensayos y pruebas fisicoquímicas, provee confiabilidad en su uso (Cáceres, 1996; Martín, 2004).

4. Fitoterapia en Guatemala

Las plantas constituyen la herramienta principal para la práctica de la medicina natural. Existe un inventario nacional con alrededor de 1,400 plantas medicinales reportadas, con información recabada en la mayor parte de departamentos de Guatemala por el Instituto Indigenista Nacional (IIN), el Centro Mesoamericano de Estudios sobre Tecnología Apropriada (CEMAT), Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola (ICTA), Facultad de Agronomía de la USAC (FAUSAC) y Centro de Estudios Conservacionistas (CECON). De estas plantas medicinales, se comercializan alrededor de 200 (Cáceres, 1996).

C. Especies vegetales

1. Selección de plantas en el estudio.

Se incluyen en el estudio 10 plantas nativas de Guatemala, las cuales fueron seleccionadas ya sea por su uso popular como medicina natural en el tratamiento de infecciones subcutáneas o bien en base a antecedentes de actividad antimicrobiana en estudios previos.

La información presentada en la Anexo 1 demuestra que para cada extracto utilizado todavía no hay actividad demostrada contra algunos de los microorganismos utilizados en la presente investigación. Por lo que se decidió completar los estudios realizados previamente y de esta forma establecer el espectro de la actividad de dichos extractos sobre los microorganismos

causantes de infecciones subcutáneas utilizados en el estudio, que permita concluir esta fase preliminar y publicar los resultados. Las especies escogidas se presentan a continuación.

2. *Lippia graveolens* HBK

a) Familia

Verbenaceae.

b) Nombres comunes

Hierba dulce, salve real, orégano, salvia, epazote, epazotl, romerillo de monte, xaak-il-ché, xak'il-ché, sacmumutz, ananté (Duke, & Ottesen, 2008).

c) Distribución geográfica

Nativa desde Baja California y sur de Texas hasta Nicaragua, se encuentra en bosques secos y montes espinosos subtropicales, en pendientes pedregosas muy secas, en matorrales húmedos o secos y planicies hasta 350 msnm. En Guatemala se ha descrito en El Progreso, Peten y Zacapa, se ha cultivado en Chimaltenango y Escuintla (Martínez, 1992; Morton, 1981; Orellana, Guerra, Cruz, & Cáceres, 2004).

d) Descripción botánica

Esta planta es un arbusto caducifolio, muy ramificado, que generalmente llega a alcanzar hasta 2.50 m, de altura y 1.20 m, de diámetro de cobertura foliar; aunque en la generalidad de los casos, las poblaciones silvestres bajo aprovechamiento miden de 0.70 a 1.20 m, de altura y de 0.30 a 0.80 m, de diámetro de cobertura, esto dependiendo de las condiciones específicas de desarrollo y de la edad de la planta. La producción de follaje de las poblaciones naturales de orégano, se inicia dos semanas después de presentarse las primeras lluvias de temporal, concluyéndose la formación total de follaje unas seis semanas después de haberse iniciado los

brotos vegetativos. La floración se inicia unas 7 semanas después de haberse iniciado la formación del follaje, produciéndose una excesiva cantidad de flores, las cuales solamente llegan a la madurez el 65%, dentro de las condiciones normales de crecimiento, sus flores tienen la característica de presentar el fenómeno de autopolinización el polen cae sobre el estigma produciéndose la fertilización antes que la flor está regulada por el fotoperiodo, la temperatura, los elementos nutritivos, las condiciones físicas del suelo y el agua. La capsula se empieza a formar de 15 a 20 días después de la floración, posteriormente se madura coincidiendo esta con el amarillamiento y caída de las hojas, por lo que la capsula se abre y expulsa la semilla, variando el periodo de acuerdo a la zona ecológica (Duke, & Ottesen, 2008).

e) Usos medicinales

Por su similitud aromática con el orégano europeo se dice que actúa como tónico general, antiséptico, digestivo, espasmolítico, carminativo, expectorante, antiséptico de las vías respiratorias y emenagogo; tópicamente es analgésico, cicatrizante, antiséptico y antifúngico. Está indicado su uso por vía oral en el tratamiento de inapetencia, digestiones lentas, meteorismo, tos irritativa, faringitis, sinusitis y bronquitis (Duke, & Ottesen, 2008).

f) Actividad antimicrobiana demostrada

Se ha demostrado que los extractos de las hojas son activos contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *S. pyogenes*, pero inactiva contra *Haemophilus influenzae*; la infusión de hojas demostró actividad contra los mismos microorganismos. Estudios antifúngicos demuestran que los extractos con diclorometano y etanol son activos contra *Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporium gypseum* y *Trichophyton rubrum*, pero inactivos contra *Cryptococcus neoformans* (Dabroyd, 1994; Mendoza, 1995; Salgueiro, Cavaleiro, Goncalves, & Proenca, 2003).

El aceite esencial de esta planta ha sido reconocida como un importante agente antioxidante, con actividad antimicótica contra *N. brasiliensis*, *F. pedrosoi* y *S. schenckii*. Con una concentración

inhibitoria mínima de >1-0.125 mg/ml, 0.1 mg/ml y 0.25 mg/ml respectivamente (Del Cid, 2005; Ortíz, 2006; Gaitán, 2005; Morales, 2011). Contra *Rhizopus stolonifer* y *Colletotrichum gloeosporioides* presentando una inhibición del 100%, y contra *Penicillium digitatum* presentó una inhibición del 97.5%, *R. stolonifer* presentó mayor inhibición con *L. graveolens* con solvente hexánico, mientras que *C. gloeosporioides* y *P. digitatum* con extractos etanólicos (Jasso, Rodríguez, Hernández, Aguilar, Sáenz, & Villareal, 2011).

Se ha demostrado actividad antifúngica contra *S. schenckii* y *F. pedrosoi* con una concentración inhibitoria mínima de 25 µg/ml y 100 µg/ml respectivamente (Gaitán, Paz, Zacchino, Tamayo, Giménez, Pinzón *et al.*, 2011).

3. *Senna alata* L. (sinónimo: *Cassia alata* L.)

a) Familia

Caesalpinaceae.

b) Nombres comunes

Barajo, taratana (tabasco), flor del secreto, gajagua, hierba de la playa, laureno, lucetema (Standley, & Steyemark, 1946).

c) Distribución geográfica

Nativa de bosques húmedos de tierras bajas desde el sur de México hasta la región norte de Sur América. En Guatemala se ha descrito en tierras costeras de ambos océanos (Cáceres, 2006). También se encuentra en el área del Caribe y en países e islas tropicales (Hennebelle, Weniger, Joseph, Sahrpaz, & Bailleul, 2009).

d) Descripción botánica

Arbusto de 1 a 2 m de largo o mayor, ramas pubescentes o glabrada, lanceoladas, atenuadas de 1 a 2 cm de largo. Hojas largas formadas por hojas más pequeñas de 6 a 12, dispuestas en pares, oblongas u oblongas-ovaladas de 5 a 15 cm de largo, 3 a 8 cm de ancho, redondeadas en el ápice y la base, puberulenta esparcida o glabrada. Flores amarillas en racimos, usualmente del largo de las hojas o mayores, planta muy florida. Pedicelos cortos ovalados u oblicuos, el tubo de 7 a 11 cm de largo, 1 a 2.2 mm de ancho, el labio inferior del limbo generalmente es de la mitad del tamaño del tubo o menor. Ovario pubescente. Fruto glabroso, puberulento o pubescente de 3 a 6 mm de largo (Standley, & Steyemark, 1946).

e) Usos medicinales

Tiene amplio uso tradicional para el tratamiento de diversas afecciones dérmicas como dermatitis, pie de atleta, herpes zoster, eccema, micosis y en inflamaciones. La decocción y unguento de las hojas se usa para el tratamiento de tinea, prurito y otras enfermedades cutáneas, reumatismo, enfermedades venéreas y mordeduras de culebras; por vía tópica se le atribuye actividad antifúngica, insecticida y cicatrizante. También es utilizado como tratamiento contra diabetes y malaria (Fiallo, & Vásquez, 1992; Cáceres, 2006; Hennebelle *et al.*, 2009).

f) Actividad antimicrobiana demostrada

El extracto etanólico de las hojas posee actividad antiestamínica y analgésica. También se le atribuye actividad antimicrobiana contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. albus*, *S. epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *B. coagulans*, *B. megaterium*, *Lactobacillus casei*, *Micrococcus luteus*, *M. roseus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris*; *T. rubrum*, *Aspergillus niger*, *Microsporum canis*, *M. gypseum*, *Fusarium solani*, *Cladosporium werneckii*, *C. albicans*, *Trichophyton menthagrophytes* var. *interdigitale*, *T. menthagrophytes* var. *menthagrophytes*. También ha demostrado actividad contra *Trichomonas vaginalis*. El jugo de las hojas ha sido usado eficazmente en el tratamiento de pacientes con pitiriasis versicolor. La infusión de hojas presenta importante actividad laxante

comparable al fitomedicamento de referencia (*Cassia acutifolia* L.) (Fiallo, & Vásquez, 1992; Cáceres, 2006; Ibrahim, & Osman, 1995; Khan, Kihara, & Omoloso, 2001).

S. alata ha demostrado actividad contra *Epidermophyton flavus* ATCC 9170 con una concentración mínima inhibitoria de 500 µm/ml. También actividad contra *T. vaginalis* (Svetaz, Zuljan, Derita, Petenatti, Tamayo, Cáceres *et al.*, 2010).

4. *Bourreria huanita* (Lex.) Hemsl.

a) Familia

Borraginaceae.

b) Nombres comunes

Esquisuchil, esquisucha, oreja de león o árbol del hermano Pedro (Aguilar, 1982).

c) Distribución geográfica

Se encuentra en México, Guatemala, El Salvador y Costa Rica. Crece en bosques húmedos a una altura de 2,100 msnm en Guatemala, en los departamentos de Alta Verapaz, El Quiché, Izabal, Jutiapa, Quetzaltenango, Sacatepéquez (Aguilar, 1982).

d) Descripción botánica

Árbol esencialmente glabro, hojas con peciolo de 1 a 3 cm de largo, las hojas glabras o con escasos pelos cortos en los peciolo y costados. Elíptico-oblongadas, raramente ovaladas, mayormente de 6 a 12 cm de largo por 3 a 8 cm de ancho. Obtusas a redondeadas o acuminadas en el ápice, ampliamente redondeadas y algunas veces oblicuas en la base, sus márgenes son entres y con 7 a 9 pares de nervios laterales. Cimas de 8 cm de largo y ancho, usualmente muy floreadas, las flores pueden ser sésiles o en pedicelo de 1 a 6 cm de largo, cáliz campanulado de

6-8 mm de largo, apiculado en el brote, glabro por fuera, blando y con un tomento corto en el interior, 5 lóbulos de 1.2 mm de largo, triangulares, la corola es blanca de unos 2 cm de longitud, en forma de tubo que apenas excede al cáliz, el limbo es de 2 a 3 cm de ancho, los estambres son largos y alargados, ovoides y cuando están secos son de unos 12 mm de largo por 17 mm de ancho (Standley, & Steyermark, 1946; Aguilar, 1982).

e) Usos medicinales

En la época contemporánea se ha estudiado que en la Antigua Guatemala y pueblos vecinos, se utiliza para calmar dolores, como sedante y relajante, para enfermedades cardíacas (taquicardia y dolor pectoral), afecciones de las vías respiratorias, infecciones gastrointestinales y para problemas de presión arterial. Su uso como sedante también se conoce en Baja Verapaz, la Ciudad capital, Escuintla y Chiquimula (Standley, & Steyermark, 1946; Aguilar, 1982).

f) Actividad antimicrobiana demostrada

Efusiones hechas con la flor de esta planta han sido aplicadas para tratar cualquier tipo de quemaduras, rash o ampollas en la cara o cualquier parte del cuerpo. Estudios han demostrado que el extracto etanólico de las flores no posee actividad antimicrobiana contra *N. brasiliensis* y *S. schenckii* (Orellana, 1987). Por el contrario estudios recientes demostraron actividad sobre *S. schenckii* y *F. pedrosoi* con una concentración mínima inhibitoria de 12.5 µg/ml y 25 µg/ml respectivamente (Ortíz, 2006; Gaitán *et al.*, 2011; Morales, 2011).

5. *Diphysa robinoides* Benth

a) Familia

Fabaceae.

b) Nombres comunes

Guachipilín, palo amarillo, much (Estrada, Méndez, Salinas, & Villareal, 2004).

c) Distribución geográfica

Se encuentra desde el sur de México hasta Panamá. En Guatemala crece en bosques húmedos o secos, es frecuente en colinas abiertas o en lugares rocosos. Por lo que crece en departamentos como Alta Verapaz, Baja Verapaz, Chiquimulilla, Jutiapa, Sacatepéquez, Retalhuleu, Quetzaltenango, San Marcos, Quiché, Huehuetenango (Stanley, & Steyermark, 1946).

d) Descripción botánica

Árbol de 5 a 9 m de altura, pero se encuentran hasta de 23 m de altura con un tronco delgado y ramas ferruginosas, cortas, glabras o estrigosas. Foliolos 9 a 19, oblongos, 7 a 15 mm de largo, glabros redondeados en el ápice, obtusos a la base, glabros. Con 9 a 15 hojas por rama, ovales de 1.5 a 3.5 cm de largo. Ramas de 4 a 7 cm de longitud, poco floreadas. Racimos florales de 3 a 5 cm de largo, 1 a 4 flores; brácteas oblanceoladas, obtusas, 3 mm de largo; cáliz glabro, tubo de 5 mm de largo; corola amarilla brillante, de 1 cm de largo. El fruto con foliolos abultados, vainas reticuladas de 6 a 11 cm de longitud y 2 cm de ancho. Las semillas son café claro de 6 mm de largo y 3 mm de ancho (Stanley, & Steyermark, 1946).

e) Usos medicinales

La infusión de hojas y corteza se usan indistintamente con fines medicinales por sus propiedades cicatrizantes, anticonvulsivas, antisépticas, desinflamantes y sudoríficas. La infusión de hojas se usa para el tratamiento de diarrea, disentería, amigdalitis, asma, infecciones dermatomucosas como abscesos, conjuntivitis, heridas abiertas, leishmaniasis, llagas y tineas, anemia (Arnason, Uck, Lambert, & Hebda, 1980).

f) Actividad antimicrobiana demostrada

Estudios recientes demostraron actividad antibacteriana de extractos etanólicos *in vitro* contra *S. typhi*, *S. flexneri*, *S. aureus* y *S. pneumoniae*. La maceración etanólica de las hojas inhibe el crecimiento de *N. gonorrhoea* y tiene un espectro de inhibición de 80% de las cepas recientemente aisladas (Cáceres, & Samayoa 1989; Cáceres, Samayoa, & Fletes, 1990b; Cáceres, Cano, Samayoa, & Aguilar, 1990a; Cáceres, Álvarez, Ovando, & Samayoa, 1991b).

Estudios de la actividad antifúngica demuestran que la decocción de las hojas inhibe *E. floccosum*, *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*; con un CIM de 300 mg/dl para y actividad fungistática. (Cáceres, López, Girón, & Logemann, 1991c). La actividad antibacteriana se atribuye a isoflavonas, stilbene y una biflavona (chamaejasmina) que han mostrado actividad contra *S. aureus*, *Mycobacterium smegmatis* y *C. albicans* (Castro, 1986).

6. *Hymenaea courbaril* L.

a) Familia

Fabaceae.

b) Nombres comunes

Guapinol, copinol, palo colorado, pac, pacay (Petén), pacoj (Alta Verapaz), hoja de cuchillo (Jutiapa) locust (Belice), árbol de pinole, algarrobo (Colombia) (Estrada *et al.*, 2004).

c) Distribución geográfica

Sureste de México, América Central, norte de Brasil, Bolivia y Perú. En el país se encuentra principalmente en laderas o planicies secas, en Alta Verapaz, Baja Verapaz, El Progreso, Escuintla, Guatemala, Huehuetenango, Izabal, Jutiapa, Petén, Quetzaltenango, Retalhuleu, San Marcos y Santa Rosa (Stanley, & Steyermark, 1946).

d) Descripción botánica

Árbol hasta de 30 m de alto. Tronco de 2 m de ancho. La corteza es delgada, color pardo cenizo. Las hojas son compuestas, semideciduas, alternas, con un par de folíolos (ovados, oblicuos, gruesos y coráceos), dispuestas en espiral. Las flores son pocas o numerosas, blancas, grandes, olorosas en panículos densos, los pedicelos cortos y gruesos. El fruto es una vaina áspera, café oscura de 10 a 15 cm de largo, dura, con dos o más semillas aplanadas, rodeadas de una pulpa pulvorulenta, el polvo es dulce y comestible, el fruto es de 5.15 cm de largo, 3.8 a 5 cm de ancho y 2.5 cm de grosor (Stanley, & Steyermark, 1946).

e) Usos medicinales

La corteza y un poco de canela en decocción son tomadas como expectorantes. El cocimiento de la corteza se recomienda en casos de diarrea y disentería, es vermífugo y vermícida, se usa para desórdenes hepáticos, es purgante y actúa como sedante. La resina se quema y se aspira el humo para úlceras y heridas. El conocimiento de la fruta se usa como remedio para hipertensión y reumatismo, fiebre y escalofríos. El puré o pasta del polvo inmaduro de la fruta es aplicado en quemaduras. El agua de la corteza es utilizada para tratar los riñones (Aguilar, 1966; Martínez, 1969; Cáceres, & Samayoa, 1990; Duke, & Ottesen, 2008; Suarez, 2008).

f) Actividad antimicrobiana demostrada

La actividad antibacteriana fue investigada en el extracto etanólico, siendo activa a una concentración de 50.0 mg/ml para *B. subtilis*. El extracto de material vegetal fue activo a la misma concentración contra *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus* (Verpooter, & Dihal, 1987). Fue encontrada actividad antifúngica en la resina (3.0 mg/ml) para hongos fitopatógenos y así mismo fueron activos los extractos de las partes aéreas (5.0 mg/ml) contra *A. niger* (Arrhenius, 1993).

Las hojas y corteza contienen taninos. El principal constituyente de la resina del tronco es un diterpeno labdenólico; la resina de las hojas contiene cariofinelo y alfa y beta selineno. Se han

reportado flavonoides, terpenoides y esteroides en diferentes partes. Las semillas contienen 9% del aceite fijo (Arrhenius, 1993).

7. *Senna occidentalis* L. (sinónimo: *Cassia occidentalis* L.)

a) Familia

Caesalpinaceae.

b) Nombres comunes

Cafecillo, candelilla chica, cornezuelo, fríjol cimarrón, fríjol del monte, habilla bicho, hediondia, hediondilla, mano de muerto, vainilla, ventosa (Morton, 1981).

c) Distribución geográfica

Originaria de México. Habita en climas cálido, semicálido y templado desde el nivel del mar hasta los 1400 m. Presente a orillas de caminos, asociada a vegetación perturbada de manglar, dunas costeras, bosques tropicales caducifolio, subcaducifolio, subperennifolio y perennifolio, bosque espinoso, matorral xerófilo, pastizal, bosque mesófilo de montaña, bosques de encino y de pino (Morton, 1981).

d) Descripción botánica

Hierba monocárpica gruesa y subarbusto débil, 0.4 a 1.2 m de alto, de apariencia glabra. Hojas mayormente 11 a 25 cm de largo; folíolos 4 ó 5 pares en la mayoría de las hojas, los del par distal, lanceolados – u ovalados – acuminados de 4 a 10 cm de largo y 1 a 3.5 de ancho. Sépalos de 6 a 9 mm, pétalos 5, de hasta 2 cm, amarillos; Legumbre (fruto) linear, plana de 8 a 13 cm de largo y 0.7 a 0.9 de ancho; de 30 o más semillas (House, & Lagos-Witte, 1995; Stevens, Ulloa, Pool, & Montiel, 2001).

e) Usos medicinales

La hoja tiene actividad depurativa, colagoga y laxativa, lo que explica por su composición química (Pousset, 1989; Gupta, 1995). La hoja es el órgano con mayor actividad antimicrobiana (Del Aguila, 1992), y con un efecto antiinflamatorio (Sadique *et al.*, 1987). La actividad antiinflamatoria de la hoja, a dosis de 1000 mg/kg fue demostrada en el edema de la pata de rata inducida por la carragenina (Sadique *et al.*, 1987; Gupta, 1995).

El polvo de *S. occidentalis*, administrado por vía intragástrica al adulto humano, a la concentración de 10.0 mg/ml, inhibe la hemólisis (Sadique *et al.*, 1987). Se considera que la planta entera posee propiedades antiinflamatorias y antihepatotóxicas. Hojas y tallos muestran asimismo propiedades hipotensoras (Feng, Haynes, Magnus, Plimer, & Sherratt, 1964; Jiu, 1966; Subbarao, & Gupta, 1978; Dabral, & Sharma, 1983; Gupta, 1995).

f) Actividad antimicrobiana demostrada

Cáceres *et al.* (1988) reportaron que la decocción de la hoja tiene actividad inhibitoria de 4 dermatofitos que son: *E. floccosum*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes* var. *algodonosa* y *T. mentagrophytes* var. *granulare*. *T. rubrum*. También ha demostrado tener actividad contra *Fonsecaea pedrosoi* (Suárez, 2008).

Tiene actividad antihelmíntica (Budhiraja, & Garg, 1973; Gupta, 1995). Las hojas y semillas muestran propiedades antimicrobianas. La hoja muestra una actividad cardiotóxica por vía oral en el conejo (Gaind, 1966; O'Hara, & Pierce, 1974; Subbarao, & Gupta, 1978; Gupta, 1995; Yadav, Arya, Yadav, Panghal, Kumar, & Dhankhar, 2010).

Se ha demostrado que el extracto de *S. occidentalis* tiene actividad contra diferentes microorganismos como *Corynebacterium diphtheriae*, *Mucor* sp., *Neisseria* sp., *Salmonella* sp., *A. niger*, *Salmonella enteritidis*, *S. aureus* y actividad negativa contra *E. coli* y *Shigella dysenteriae* en concentraciones bajas. En otros estudios con extractos de la hoja, flor, semillas y la corteza se demostró actividad contra *P. aeruginosa*, *Bacillus cerus*, *S. aureus*, *P. mirabilis*,

E.coli, *C. albicans*, *A. niger*, *A. flavus* y *Fusarium oxysporum*, lo cual demostró actividad antimicrobiana significativa con todos los microorganismos y con zonas de inhibición comparadas con ampicilina y gentamicina (Yadav *et al.*, 2010).

8. *Phaseolus vulgaris* L.

a) Familia

Fabaceae.

b) Nombres comunes

Fríjol breve, fríjol coloradito, fríjol cuarentano, fríjol enreda, fríjol isiche colorado, fríjol de mata, fríjol natulame, fríjol negro de bola, fríjol negro chimbo, fríjol palmero, fríjol pascua, fríjol torito, fríjol vaquero, fríjol de vara, bull, buul, tzajalchenec, isiche colorado (Bolaños, 1991).

c) Distribución geográfica

Nativa de los trópicos de América (Bolaños, 1991). Habita en climas cálido, semicálido, semiseco, seco y templado, desde casi el nivel del mar hasta los 2500 m. Cultivado en terrenos de monocultivo o huertos familiares. Asociado a bosques tropicales caducifolio, subcaducifolio, subperennifolio y perennifolio; bosques de encino, pino y mixto de pino-encino (Argueta, Cano, & Rodarte, 1994).

d) Descripción botánica

Hierba de vida corta, enredada en forma de espiral en algún soporte, o erecta en forma de arbusto, con algunos pelillos. De hasta 40 cm de alto los tipos arbustivos y de hasta 3 m de largo las enredaderas. En la base de las hojas sobre el tallo se presenta un par de hojillas (llamadas estípulas), estriadas; las hojas son alternas, pecioladas, compuestas con 3 hojitas (llamadas foliolos) ovadas a rómbicas, con el ápice agudo; en la base de cada foliolo se encuentra un par de

diminutas estípulas (llamadas estipelas). El cáliz es un tubo campanulado que hacia el ápice se divide en 5 lóbulos, 2 de los cuales se encuentran parcialmente unidos; la corola rosa-púrpura a casi blanca, de 5 pétalos desiguales, el más externo es el más ancho y vistoso, llamado estandarte, en seguida se ubica un par de pétalos laterales similares entre sí, llamados alas y por último los dos más internos, también similares entre sí y generalmente fusionados forman la quilla que presenta el ápice largo y torcido en espiral y que envuelve a los estambres y al ovario; estambres 10, los filamentos de 9 de ellos están unidos y 1 libre; ovario angosto, con 1 estilo largo y delgado, con pelos hacia el ápice, terminado en un estigma pequeño. Los frutos son legumbres lineares, de hasta 20 cm de largo, a veces cubiertos de pelillos; semillas globosas, variables (Soriano, & Rojas, 1996).

e) Usos medicinales

Extractos acuosos y salinos de la semilla cruda provocan aglutinación de glóbulos rojos, blancos y linfocitos humanos, e inhiben la actividad de la tripsina. Las semillas se inactivan al cocerse ya que el calor destruye los componentes activos (Argueta *et al.*, 1994).

En relación con la semilla cruda, se ha demostrado un efecto abortivo en ratas preñadas, un efecto de anti-implantación del óvulo fecundado debido a una fracción proteica, una acción antiestrogénica en ratón infante debido a un extracto etanólico. Varios estudio describen el efecto hiperglicémico e hipercolesterolémico que provoca la ingestión de la semilla cruda en animales, y las acciones contrarias con las semillas cocidas, acciones también descritas en el hombre (Argueta *et al.*, 1994).

f) Actividad antimicrobiana demostrada

Extractos de la semilla presentaron una actividad anti *Schistosoma mansoni* y la decocción de la semilla inhibió la expresión del antígeno de la hepatitis en cultivo de virus de la hepatitis B. Otros efectos ejercidos por la semilla incluyen el citotóxico sobre células de sarcoma humano (Yoshida), mitogénico en conejos, al incrementar el número de linfocitos y linfoblastos,

antioxidante y una débil actividad antitiroidal en el hombre, al medir la captación de yodo por la tiroides (Argueta *et al.*, 1994).

De la vaina, el extracto metanólico ejerce una actividad mutagénica en *S. typhi* TA98 y TA100; sin embargo, el jugo obtenido de la vaina presentó una actividad antimutagénico en *S. typhi* TA1538, aunque se requirió de activación metabólica; el extracto acuoso inhibió la formación de peróxido lipídico. Un extracto acuoso de la raíz ejerció una actividad antinematodo contra *Heterodera glycines* (Argueta *et al.*, 1994).

El extracto de *P. vulgaris* demostró actividad antimicótica contra *F. pedrosoi* con una concentración mínima inhibitoria de 1 mg/ml (Suárez, 2008).

9. *Solanum nigrescens* Mart. & Gal

a) Familia

Solanaceae.

b) Nombres comunes

Hierba mora, macuy, quilete, quequeste, matafas, bocano, tonchichi o tomatillos del diablo (Morales, Ollgaard, Kvist, Borchsenius, & Balslev, 2006).

c) Distribución geográfica

Nativa de México a Costa Rica. Crece en matorrales y bosques mixtos de 1,500 - 3,900 msnm. En Guatemala se ha descrito en Chiquimula, El Progreso, Escuintla, Huehuetenango, Quetzaltenango, Sacatepéquez, Sololá y San Marcos (Gentry, & Stanley, 1974).

d) Descripción botánica

Hierba erecta de 0.5 a 2 m de alto, tallo piloso. Las hojas se presentan en pares o solitarias, 3 a 18 cm de largo, diferentes en tamaño, forma lanceolada u ovaladas, ápice acuminado, base atenuada. Pecíolo 5 a 35 mm de largo; inflorescencias intermodal, racemiforme; pedúnculos 1 a 3 cm de largo; cáliz 1 a 1.5 mm de largo, lobulado; corola blanca o lila, mancha oscura en la base; filamentos ciliados; anteras 3 a 4 mm largo; ovario glabro. Los frutos son globosos, primero verdes y negros al madurar, 4 a 8 mm de diámetro; semillas pequeñas de 1 mm de largo (Gentry, & Stanley, 1974).

e) Usos medicinales

Las hojas y el fruto cocidos poseen un amplio uso medicinal. La decocción de hojas se usa por vía tópica para el tratamiento de abscesos, acné, dermatitis, eczema, erisipela exantema, heridas, leucorrea, llagas, mezquinos, pústulas, tiña, úlceras y vaginitis. (Instituto Indigenista Nacional, 1978; Linares, Flores, & Bye, 1988; Girón, Freire, Alonzo, & Cáceres, 1991).

Por vía oral se usa en el tratamiento de asma, amigdalitis, anemia, cirrosis (Mendieta, & del Amo, 1981), cólico, diarrea, dolor de muela, escorbuto, estreñimiento, gastritis, hinchazón, meningitis, nerviosismo, paludismo (Linares *et al.*, 1988), presión alta, retención urinaria, reumatismo, tos ferina, y úlcera gástrica.

Se le atribuye propiedad aperitiva, calmante, depurativa, diurética, desinflamante, emoliente, febrífuga, mineralizante, reconstituyente, sedante y vulneraria (Linares *et al.*, 1988; Girón *et al.*, 1991).

f) Actividad antimicrobiana demostrada

Estudios antibacterianos *in vitro* demuestran que la decocción de las hojas de ambas especies tienen actividad antibiótica. Esta actividad se ha demostrado contra *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *S. pyogenes*. (Cáceres, Girón, Alvarado, & Torres, 1987; Cáceres *et al.*, 1990b; Cáceres *et al.*,

1991b). Estudios antimicóticos *in vitro* demuestran que la decocción y la maceración hidroalcohólica de las hojas de ambas especies tiene actividad contra *C. albicans* y *C. neoformans* (Cooney, 1991).

Un ensayo clínico en 50 pacientes con candidosis vaginal se demostró que el grupo experimental tratado con óvulos de *S. nigrescens* tiene un comportamiento estadísticamente similar al tratado con óvulos de nistatina. (Girón, Aguilar, Cáceres, & Arroyo, 1988). La actividad dermatofítica de la decocción de las hojas posee una CIM de 100 a 300 mg, demostrándose actividad fungicida (Cáceres, *et al.*, 1991c).

La actividad antibiótica del género *Solanum* se atribuye a la Solanina, un alcaloide esteroideal básico, de peso molecular 559, con actividad fungicida e insecticida (Berdy, Aszalos, Botian, & McNitt, 1982)

10. *Piper jacquemontianum* Kunth

a) Familia:

Piperaceae.

b) Nombre común

Cordoncillo, poozuyaax (Cleaves, 2001).

c) Distribución geográfica

Nativa de Guatemala y Belice. En Guatemala se ha descrito en los departamentos de Alta Verapaz, Petén e Izabal en bosques o matorrales húmedos o lluviosos, algunas veces en bosque de pino o en pantanos de Mancarúa (Standley, & Steyermark, 1946; Cleaves, 2001).

d) Descripción botánica

Arbusto comúnmente de aproximadamente 2 m de altura, las ramas jóvenes densamente hispidulosas o hírtulas, algunas veces glabras con la edad u ocasionalmente casi glabras desde el principio; pecíolos mayormente de 1 cm de largo o menos, algunas veces más largo en las hojas bajas, rígidos, densamente hispidulosos o raramente glabros; láminas de las hojas ovado-oblongadas u ovado elípticas, mayormente de 12 a 20 cm de largo y de 4.5 a 9 cm de ancho, ápice abruptamente acuminado o largamente acuminado, muy desigual en la base y más o menos oblicua, usualmente redondeado o más o menos cordado en un lado y obtuso en el otro, un lado más decurrente que el otro, gruesas y firmes, muy lustrosas en el haz y con frecuencia lustrosas en el envés, un poco más pálidas en el envés, cuando se secan se tornan verde grisácea o algunas veces negruzca, con puntos pelúcidos finos, glabras en el haz, suaves al tacto, hispidulosas en el envés, especialmente en los nervios, con pelos sórdidos subadpresos, ásperos al tacto, penninervadas, usualmente 3 nervios en cada lado, nervios arqueados, ascendentes, los superiores nacen en o por arriba de la mitad de la lámina, las venas son prominentes en el envés, laxamente reticuladas; pedúnculos cortos, gruesos, densamente puberulentos o hispidulosos; espigas erectas, mayormente de 5 a 7 cm de largo y de 3 a 4 mm de grosor, obtusas, gruesas; las brácteas con pubescencia densa (Standley, & Steyermark, 1946).

e) Usos medicinales

En Guatemala se utiliza para bajar la fiebre, para granos, para la tos y para aliviar el dolor de cabeza y de cuerpo, para el dolor del corazón, para la presión (Lot, & Chieng, 1986; Cleaves, 2001).

f) Actividad antimicrobiana demostrada

Estudios farmacológicos demuestran que el aceite esencial a 0.1 mg/ml tiene actividad contra *M. smegmatis* y *B. subtilis*, actividad citotóxica contra *Artemia salina* a 0.5 mg/ml y actividad insecticida contra *Anopheles albimanus* y *A. aegypti* hasta el tercer estadio (Cruz, 2005).

El extracto de *P. jacqueumontianum* ha demostrado actividad contra *F. pedrosoi* con una concentración mínima inhibitoria de 1 mg/ml (Morales, 2011).

11. *Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth

a) Familia

Malpighiaceae.

b) Nombre común

Changunga, changungo, chengua (Mich.); chi (l. maya, Yuc.); huizaa (l. zapoteca, Oax.; Mamiñña (l. chinanteca, Oax.); nance, nanche, nanchi, nanantze (Gro.); nance agrio (Gro., Tab.); nancis; nanche amarillo (Pue.); nanche dulce (Oax.); nandzin (l. zoque, Chis.); nantzincuhuitl, nanzinxócotl (l. náhuatl) (Medina, Salazar, & Gomez, 2004).

c) Descripción botánica

Árbol pequeño y torcido o arbusto perennifolio (caducifolio en bosques secos), de 3 a 7 m (hasta 15 m) de altura con un diámetro a la altura del pecho de hasta 30 cm. Copa amplia y abierta o irregular. Hojas alargadas, decusadas, simples; láminas de 5 a 15 cm de largo por 2 a 7.5 cm de ancho, elípticas con el margen entero; verde oscuras y casi glabro en el haz y verde amarillentas grisáceas pubescentes en el envés. Tronco tortuoso. Ramas ascendentes y frecuentemente ramificadas desde el suelo. Corteza externa escamosa desprendiéndose en pedazos rectangulares, gris parda a moreno clara. Interna de color crema rosado, cambiando a pardo rosado, fibrosa, amarga. Flores en racimos o panículas estrechas terminales de 5 a 15 cm de largo, pubescentes; flores actinomorfas, de color amarillo-rojizo, de 1.5 cm de diámetro; cáliz verde, con 6 a 10 glándulas sésiles; 5 pétalos redondeados. Frutos en infrutescencias péndulas de 10 a 15 cm de largo; drupas globosas, de 1.7 a 2 cm de diámetro, amarillentas a ligeramente anaranjadas, con una abundante carne agrídulce rodeando a un hueso grande y duro. Una semilla por fruto (Nava, & Useanga, 1980).

d) Distribución geográfica

Nativa de México, Centro, Sur América y el Caribe en bosques secos de pino-encino y de clima tropical hasta 1800 msnm. En Guatemala se ha descrito en Alta Verapaz, Baja Verapaz, Chiquimula, El Progreso, El Quiche, Escuintla, Huehuetenango, Izabal, Jutiapa, Jalapa, Peten, Quetzaltenango, Retalhuleu, San Marcos, Santa Rosa, Suchitepéquez y Zacapa (Gentry, & Stanley, 1974).

e) Usos medicinales

En Guatemala la parte que más se usa en la medicina popular es la corteza, ya que por sus propiedades astringentes se emplea en cocimiento como antidiarréico (se toma como agua de uso); también se utiliza para infecciones en la matriz e inflamación en los ovarios y otros tipos de desórdenes digestivos como disentería y dolor de estómago (Nava, & Useanga, 1980; Medina *et al.*, 2004).

f) Actividad antimicrobiana demostrada

Estudios de la actividad antibacteriana *in vitro* demuestran que la maceración hidroalcohólica de la corteza es activa contra enterobacterias (*S. typhi*, *S. flexneri*), *S. pneumoniae* y *S. pyogenes*. 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 (López, 1992).

Estudios de la actividad antifúngica demuestran que la maceración hidroalcohólica de la corteza tiene actividad contra *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* y *C. stellatoidea*, con un CIM de 1-2 mg. La decocción de la corteza tiene actividad contra 6 dermatofitos ensayados, *E. floccosum*, *Microsporum canis*, *M. gypseum* y *T. mentagrophytes* var. *algonosa*, (Cáceres, López, Girón, & Logemann, 1991a). En un estudio de confirmación con cinco órganos de la planta, se demostró que la corteza es la que tiene mayor actividad y el etanol el mejor disolvente por actividad y rendimiento del extracto (6.8%); las bacterias más sensibles fueron *P. aeruginosa*,

S.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 (López, 1992).

D. Evaluación de la susceptibilidad a antimicrobianos in vitro

El estudio de la sensibilidad de los microorganismos es necesario porque el espectro de actividad de los antimicrobianos es limitado y las bacterias tienen capacidad para desarrollar resistencia. Para ello es necesario conocer los conceptos concentración mínima inhibitoria (CIM), que es la mínima cantidad de antimicrobiano capaz de impedir el crecimiento de un microorganismo en unas condiciones normalizadas; y concentración mínima bactericida (CMB), que es la mínima cantidad de antimicrobiano capaz de destruir el 99.9% de una muestra inoculada en unas condiciones normalizadas (García, & Picazo, 1999).

El estudio de la CIM es el que se realiza de forma habitual en los laboratorios de microbiología. Para llevarlos a cabo se utilizan procedimientos de referencia y cepas de control que proporcionan a estos métodos unos resultados reproducibles comparables y que permiten clasificar los microorganismos en diferentes categorías: a) sensible: cuando la CIM de un microorganismo se puede conseguir in vivo con dosis terapéuticas y la experiencia ha demostrado su eficacia; b) resistente: cuando el microorganismo no es inhibido por las concentraciones normalmente se pueden obtener; c) intermedio: cuando las bacterias se inhiben a concentraciones que no se alcanzan con dosis terapéuticas pero que pueden alcanzarse con dosis más altas sin que sean tóxicas o cuando el antibiótico se encuentra a altas concentraciones en el lugar de la infección, generalmente en las vías de eliminación (García, & Picazo, 1999).

Los métodos más utilizados para la evaluación de la actividad antimicrobiana, incluyendo plantas medicinales, han sido los de difusión y dilución. En ambos casos existen factores tales como: composición del medio de cultivo, microorganismos de prueba, pH y otros que pueden variar los resultados. Estas variaciones se han minimizado trabajando en condiciones estándar. En algunos estudios se han introducido ciertas modificaciones a los métodos, con el fin de mejorar los resultados, pero los principios básicos continúan siendo los mismos (Zacchino, & Gupta, 2007).

1. Método de difusión

Para el método de difusión se utilizan generalmente discos de papel filtro impregnados con las soluciones antimicrobianas a ensayar, éstos se aplican sobre placas de agar inoculadas con el microorganismo de prueba. Al ponerse en contacto los discos con el agar, absorben agua del medio, con lo cual se disuelve la solución y empieza a difundir a través de la capa de agar. Al mismo tiempo que el antibiótico va difundiendo ocurre la multiplicación bacteriana. Durante la fase de crecimiento logarítmico en la que la multiplicación bacteriana ocurre más rápidamente que la difusión del antibiótico las bacterias que no han sido inhibidas seguirán multiplicándose, hasta formar un halo alrededor del disco que puede visualizarse luego de cierto tiempo de incubación. No habrá crecimiento en el área donde el antibiótico esté en concentraciones inhibitorias, por lo tanto, mientras más susceptible sea el microorganismo el diámetro del halo será mayor (Burlingame, & Reddish, 1973; Rex, Alexander, Andes, Arthington-Skaags, Brown, Chaturveli *et al.*, 2000).

Existen distintas metodologías; una de las cuales utiliza un disco de papel de filtro impregnado en la solución de la droga y se colocan directamente sobre la superficie del agar mientras todavía estén húmedos, los discos pueden prepararse con precisión si se agrega una cantidad determinada del agente al papel filtro con una micropipeta pudiéndose calcular así la potencia del disco. También se pueden aplicar los antimicrobianos directamente sobre la superficie de las placas sembradas en forma de gota. Este proceso es más sencillo porque evita los problemas de la difusión planteados por los distintos tipos e papel filtro usados con los discos. El inconveniente es que, según sean las características del disolvente del agente, las gotas pueden ser no uniformes por expandirse en forma desigual. También se pueden aplicar los antimicrobianos en cilindros de cristal o metal los cuales se llenan con la solución formando una columna de líquido en contacto directo con la superficie del medio. De igual manera se pueden realizar pocillos en la superficie del agar y llenarlos con el agente antimicrobiano a ensayar (Burlingame, & Reddish, 1973; Zacchino, & Grupta., 2007).

2. Métodos bioautográficos

Estos métodos permiten combinar la capacidad separativa de la cromatografía en capa delgada con la determinación in situ de la actividad antifúngica de los compuestos de una mezcla de compuestos químicos. Esta metodología consiste en separar por cromatografía en capa fina los componentes de un extracto o sub-extracto y posteriormente “revelar” la placa cromatográfica haciendo crecer un hongo sobre su superficie. De esta manera, los componentes activos de la mezcla son detectados por los halos de inhibición del crecimiento fúngico que ellos producen.

La bioautografía ha sido mencionada como la metodología más eficiente para el descubrimiento de nuevos compuestos antimicrobianos y constituye una herramienta muy útil para guiar el aislamiento de compuestos antifúngicos a partir de mezclas complejas como los extractos vegetales.

Se basa en la capacidad que poseen los compuestos antifúngicos adsorbidos en la fase estacionaria de una placa cromatográfica de difundir a través de un medio acuoso (agarizado o no), que ha sido inoculado con un hongo determinado, hasta ponerse en contacto con el mismo inhibiendo su desarrollo. Podría considerarse a este método como una variante de los métodos de difusión, con la diferencia de que los compuestos a analizar difunden del medio desde la fase estacionaria de una placa cromatográfica y no desde un disco de papel.

Existen distintos tipos:

- a) Bioautografía directa.
- b) Bioautografía en capa de agar.
- c) Bioautografía de contacto (Zacchino, & Grupta, 2007).

3. Método de dilución

Las pruebas de dilución son utilizadas principalmente para determinar la CIM (concentración inhibitoria mínima) de un extracto, aceite esencial o de una sustancia pura. El método consiste

en que a un cultivo del microorganismo en estudio se le inoculan cantidades específicas del antibiótico, preparado en concentraciones decrecientes en caldo o agar por la técnica de dilución seriada. En este método de dilución en líquido, el indicador de inhibición es la turbidez del medio, cuando no existe crecimiento el medio permanece claro, es decir, el antibiótico inhibe al microorganismo; y cuando el antibiótico no tiene ningún efecto entonces hay crecimiento y el medio aparece turbio. El grado de inhibición se relaciona con la turbidez y ésta se mide por espectrofotometría. La concentración mínima del antibiótico que no muestre crecimiento es la medida del efecto bacteriostático del mismo sobre el microorganismo (Burlingame *et al.*, 1973).

En el método de dilución en agar, se preparan diluciones de antibiótico y se mezclan con un determinado volumen de agar, para obtener las concentraciones deseadas. Luego se inoculan los microorganismos a estudiar en diferentes puntos de la placa con asa o aplicador. Se incuban las placas y se toma como punto límite la concentración mínima de antibiótico que produce inhibición completa del crecimiento. Este método tiene la ventaja de que es simple y pueden ensayarse agentes solubles e insolubles en agua; además en una caja de Petri pueden ensayarse con varios microorganismos a la vez (Burlingame *et al.*, 1973; Rex *et al.*, 2000).

4. Métodos de proporción y de relación de resistencia

Han sido descritas dos técnicas para las pruebas de sensibilidad: el método de proporción y el de relación de resistencia. En el primero se determina la proporción exacta del cultivo que es resistente a los agentes antibacterianos. Se realizan varias diluciones del inóculo de la bacteria, estos se añaden al medio de cultivo el cual contiene una concentración estándar de la droga. Seguidamente se efectúan conteos de las colonias bacterianas en los medios que contienen medicamentos y en los que carecen de ellos (Janssen, Scheffer, & Baerheim Svendsen, 1987; Mehaffey, Putnam, Barrett, & Jones, 1996).

En el método de relación de resistencia se compara la sensibilidad de las cepas en estudio con las cepas sensibles estándar. Los inóculos estandarizados de la prueba y los microorganismos control se siembran en un medio sólido que contiene diluciones de medicamentos en concentración crítica. Después de la incubación, la cantidad de desarrollo se registra y se

compara con el desarrollo de los microorganismos estándar. Las concentraciones de medicamentos que causan cantidades similares de inhibición de desarrollo entre los microorganismos de la prueba y los estándares se expresan como una relación. Así de ambos son igualmente sensibles, la relación de resistencia será de uno. En general las cepas con relaciones que son iguales o menores que 1 son consideradas sensibles, en tanto que aquellas con relaciones mayores que 1 se consideran resistentes (Mehaffey *et al.*, 1996, Brancato, & Golding, 1983).

5. Método de prueba – E

En los últimos avances realizados Mehaffey y Biedenbach demostraron, en estudios individuales, que el método de prueba - E el cual consiste en tiras manufacturadas por AB Biodisk y que son impregnadas con la suspensión bacteriana es una prueba bien estandarizada reproducible y exacta (Biedenbach, & Jones, 1996).

El método de E-test es una variable que parece ser práctica para determinar la susceptibilidad de hongos de crecimiento lento y para hongos que son fastidiosos como *S. schenckii*, sin embargo esta técnica ha sido sobrevalorada para realizar este tipo de determinaciones en la actualidad; a pesar de ser una técnica que se realiza fácilmente con agar BHI en concordancia del fabricante con las tiras AMB, FLC, ITC y VRC, obtenidas del disco AB Biodisk, se incuban a 72 horas a 35°C (Gutierrez-Galhardo, Zancopé-Oliveira, Monzón, Rodríguez-Tudela, & Cuenca-Estella, 2009).

6. Método colorimétrico de MTT

El MTT es una sal de tetrazolio con actividad deshidrogenasa color amarillo y soluble en solución salina, que se utiliza para disminuir el tiempo de espera necesario para realizar la lectura del crecimiento del microorganismo. Cuando es reducida por la deshidrogenasa mitocondrial de las células vivas, enzima que cataliza la reducción donde la sal acepta electrones desde NADH^+ y NADPH^+ , se produce una destrucción del anillo tetrazolio, formando cristales púrpura insolubles (Formazán), que después de ser solubilizados, pueden medirse por espectrofotometría o de forma visual. Como NADH^+ y NADPH^+ solamente son producidos por células vivas, la formación de

Formazán puede emplearse como una medida indirecta de viabilidad (Burlingame *et al.*, 1973; Rex *et al.*, 2000; Brancato *et al.*, 1983).

7. Método de Brancato & Golding modificado

Es un método de referencia que fue descrito específicamente para dermatofitos por Brancato & Golding (1983), la modificación fue descrita por MacRae la cual se consiste en usar extractos de plantas naturales, a diferencia de la metodología sin modificación en la que se utilizan extractos químicos. Consiste en purificar los hongos en Mycosel, inocular en medio de esporulación (Takashio), incubar a 25°C por 21 días, colectar las esporas, contarlas, estandarizar suspensiones de 1×10^5 esporas/ml y guardar a 4°C. Preparar cajas de agar Sabouraud con 1.0 mg/ml del extracto o fracción; perforar cuatro agujeros de 8 mm de diámetro, inocular 30 μ L de la suspensión de esporas e incubar a temperaturas que dependen del microorganismo a inocular. Por último se mide el diámetro (D) del halo de crecimiento en mm y comparar con el control negativo con la fórmula: $\% = Dm/Dc \times 100$. Si el porcentaje de inhibición es $>75\%$ el extracto es activo (+), si es $<25\%$ es inactivo (-). (Brancato *et al.*, 1983; Véliz, Cruz, Gómez, García, Álvarez, Cáceres *et al.*, 2006)

IV. JUSTIFICACIÓN

Los microorganismos causantes de infecciones subcutáneas tienen una distribución universal, siendo los más frecuentes en América Latina *F. pedrosoi*, *M. grisea*, *N. brasiliensis*, *S. schenckii*, *P. romeroi* no existiendo datos actuales referentes a su distribución dentro del territorio guatemalteco.

Debido a la baja frecuencia con la que estas infecciones se dan en Guatemala, se conoce muy poco del uso de medicamentos naturales para tratar la infección. Sin embargo a nivel mundial se ha encontrado un incremento de dichas afecciones en los últimos años en la población en general y sobre todo en la población con enfermedades inmunosupresoras.

La importancia de este estudio radica en determinar la actividad inhibitoria de extractos de plantas nativas, los cuales ya demostraron actividad antimicrobiana en estudios anteriores pero sin completarse el espectro de dicha actividad con los microorganismos incluidos en este estudio. Si bien existen tratamientos para todas estas micosis subcutáneas, en su mayoría se usan durante tiempo prolongado, en ocasiones son tóxicos y en general de alto costo y poca accesibilidad para la población.

Por lo que es necesario e importante determinar la actividad antimicrobiana en distintos microorganismos causantes de infecciones subcutáneas, para complementar la información de dichos extractos y así establecer la posible creación de un nuevo fármaco. Además el uso de dichas plantas como medicina natural que facilite el tratamiento de la población infectada en Guatemala.

V. OBJETIVOS

A. Generales:

Determinar la actividad inhibitoria de extractos de plantas nativas con propiedades medicinales sobre microorganismos causales de infecciones subcutáneas

B. Específicos:

1. Establecer la acción inhibitoria de *S. alata*, *D. robinoides*, *H. courbaril*, *S. occidentalis* y *P. vulgaris* sobre *N. brasiliensis*.
2. Establecer la acción inhibitoria de cada extracto sobre *M. grisea* y *P. romeroi*.
3. Establecer la acción inhibitoria de *S. nigrescens* y *P. jacquemontianum* sobre *F. pedrosoi*.
4. Establecer la acción inhibitoria de *S. nigrescens*, *P. jacquemontianum*, *S. occidentalis* y *P. vulgaris* sobre *S. schenckii*.
5. Determinar la concentración mínima inhibitoria de cada extracto positivo para cada microorganismo inhibido.

VI. HIPÓTESIS

De los diez extractos etanólicos de las plantas utilizadas por lo menos uno tiene actividad antimicrobiana contra uno de los agentes causales de infecciones subcutáneas.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Universo y muestra

1. Universo

Plantas nativas guatemaltecas medicinales.

2. Población

Plantas nativas guatemaltecas usadas para afecciones de la piel.

3. Muestra

Nueve extractos etanólicos y un extracto metanólico de las siguientes plantas nativas guatemaltecas consideradas antimicrobianas.

- a) *L. graveolens*
- b) *S. alata*
- c) *B. huanita*
- d) *D. robinoides*
- e) *H. courbaril*
- f) *P. jacquemontianum*
- g) *B. crassifolia*
- h) *S. occidentalis*
- i) *P. vulgaris*
- j) *S. nigrescens*

B. Recursos

1. Humanos

Investigadores:

- Karla Lanz
- Ariel Pérez
- Kevin Ortíz
- Adolfo Santizo
- Asesor: Lic. Armando Cáceres.

2. Físicos

a) Equipo

- Agitador Vórtex
- Autoclave
- Balanza analítica
- Cabina de Flujo Seguridad nivel 2
- Estufa
- Incubadora 25°C
- Incubadora 37°C
- Mechero Bunsen
- Microscopio
- Pipetas automáticas
- Sistema de enfriamiento o circulación de agua
- Refrigeradora
- Rotavapor

b) Reactivos

- Agar-agar
- Agua desmineralizada
- Agua destilada
- Agar Sabouraud
- Alcohol al 70%
- Voriconazol
- Trimetropim Sulfametoxazol
- Dextrosa
- Fosfato diácido de potasio
- Peptona
- Solución salina isotónica
- Sulfato de Sodio

c) Cristalería

- Balón de 1000 ml
- Beaker 250 ml
- Beaker 500 ml
- Campanillas de Durham
- Cámara de Neubauer
- Erlenmeyer de 500 ml
- Erlenmeyer con tapón de rosca 250 ml
- Frascos de vidrio con tapón de rosca
- Pipetas
- Probetas 100 ml
- Tubos de ensayo con tapón de rosca 15 ml
- Varilla de vidrio estéril
- Vaso de precipitar

d) Otros

- Algodón
- Asa de nicromo en espátula o en L
- Asa de nicromo en argolla
- Cajas de Petri
- Cajas de Petri cuatriplate
- Caldo tripticasa soya
- Fósforos
- Molino o cedazo
- Papel filtro
- Papel parafilm
- Percolador
- Regla graduada en milímetros
- Soporte de metal
- Tips amarillos estándar 200 µl
- Tips azules estándar 1000 µl
- Viales

C. Procedimiento

1. Obtención de extractos vegetales etanólicos

Los extractos etanólicos de *P. vulgaris*, *S. nigrescens*, *L. graveolens*, *S. alata*, *B. huanita*, *H. courbaril*, *P. jacquemontianum* y *B. crassifolia* utilizados en el estudio fueron proporcionados por el Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología de la Escuela de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Los extractos de *S. occidentalis* y *D.*

robinioides fueron obtenidos por la técnica de percolación de la planta seca con etanol al 70% y concentración en rotavapor del material.

2. Obtención de aislamientos de *F. pedrosoi*, *S. schenckii*, *M. grisea*, *P. romeroi* y *N. brasiliensis*.

Las cepas de *F. pedrosoi*, *S. schenckii*, *M. grisea* y *P. romeroi* fueron donadas por el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia y posteriormente reaislada en el Departamento de Citohistología.

Y la cepa de *N. brasiliensis* fue donada por el Laboratorio Candelaria y posteriormente reaislada en el Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

3. Ensayo de validación del método de actividad antimicrobiana.

a) Ensayo de validación del método de actividad antifúngica *F. pedrosoi*, *S. schenckii*, *M. grisea* y *P. romeroi*.

i) Preparación del medio de cultivo

- Preparar una solución madre del control positivo: Voriconazol (10 mg/ml)
- Realizar una curva a partir de un punto de corte de 16 µg/ml con 2 puntos debajo del corte y 2 puntos encima del mismo, con una base exponencial de cinco.
- Preparar tubos con 13.5 ml de agar Sabouraud.
- Esterilizar los tubos en autoclave y dejar enfriar a 50°C para luego agregar 1.5 ml de las solución de Voriconazol, para obtener concentraciones de 0.64 µg/ml, 3.2 µg/ml, 16 µg/ml, 80 µg/ml y 400 µg/ml.

- Verter la solución y el medio en cajas de Petri estériles, dejar solidificar e incubar a 36°C durante 24 horas para comprobar compatibilidad
- Guardar en refrigeración hasta su uso.

ii) Preparación del inóculo

- Preparar medio Takashio (Sabouraud modificado para la 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

- Disolver en 300 ml de agua desmineralizada y verter 6 ml en tubos con tapón de rosca, esterilizar en autoclave y dejar solidificar con el mayor declive posible. Incubar 48 horas a 25°C para descartar contaminación.
- Sembrar en este medio los hongos a ensayar e incubar a 27°C durante 21 días hasta obtener un crecimiento homogéneo.
- Agregar a cada tubo 2 ml de agua destilada estéril y desprender el hongo con ayuda de una varilla.
- Trasvasar el material obtenido a viales con tapa de rosca. Agitar 1 minuto en agitador hacer conteo de esporas en cámara de Neubauer.

- Realizar una suspensión a 100 esporas/ μl ó 1×10^5 esporas/ml (aproximadamente 10 esporas/cuadrante) y almacenar en viales estériles en refrigeración.

iii) Inoculación de hongo

- En cada caja de Petri con agar-Voriconazol abrir cuatro agujeros con campanillas de Durham de 5 mm de diámetro. En forma equidistante.
- Tomar 30 μl de la suspensión de esporas y depositar en los agujeros. Incubar a 27°C por 14 días.
- Realizar un total de cuatro repeticiones en la misma forma, se utilizará como control negativo una caja con agar Sabouraud.
- Las cajas control negativo constituyen cajas de Sabouraud (13.5 ml) con 1.5 ml de alcohol al 70%. Es decir que llevan el mismo procedimiento que se emplea para realizar cajas de agar-planta solamente que en lugar de llevar la suspensión con el extracto, llevan etanol al 70%.

iv) Lectura e interpretación de los resultados

- Medir el diámetro de la colonia del hongo en mm.
- Calcular el porcentaje de inhibición, comparando el diámetro contra el de las colonias en las cajas control.
- Tomar como positivos los extractos que reducen el diámetro de la colonia en un 75%.

b) Ensayo de validación del método de actividad antibacteriana de *N. brasiliensis*

i) Preparación del medio de cultivo

- Preparar una solución madre del control positivo: trimetoprim sulfametoxazol (5.27 mg/100 ml).
- Realizar una curva con un punto de corte de 2/38 µg/ml, con dos puntos por debajo y dos puntos por encima del mismo con una base exponencial de diez.
- Preparar tubos con 13.5 ml de agar Sabouraud.
- Esterilizar los tubos en autoclave y enfriar a 50°C para luego agregar 1.5 ml de la solución de trimetoprim/sulfametoxazol, para obtener concentraciones de 1/475, 1/95, 2/38, 5/19, 25/19 µg/ml respectivamente.
- Verter la solución y el medio en cajas de Petri estériles, dejar solidificar e incubar a 36°C de 24-18 horas para comprobar esterilidad.
- Guardar en refrigeración hasta el momento de uso.

ii) Preparación del inóculo

- Preparar el caldo Sabouraud.
- Servir 15 ml de caldo Sabouraud en erlenmeyer de 25 ml con agitador magnético y esterilizar en autoclave.
- Sembrar con un asa en argolla los aislamientos clínicos de *N. brasiliensis* a ensayar, en los 15 ml de caldo Sabouraud ya estéril, e incubar a 37°C durante 3 días hasta obtener un

crecimiento homogéneo de la bacteria, la incubación realizarla sobre un agitador magnético.

- Realizar un estándar de McFarland 0.5 con caldo Sabouraud.

iii) Inoculación

- Realizar cinco estrías de la suspensión en las cajas con Agar-trimetoprim sulfametoxazol.
- Incubar las cajas a 35°C por 3 días en agitación constante.
- Como control negativo utilizar una caja con agar Sabouraud y etanol al 50%.
- Como control positivo utilizar una caja con agar Sabouraud con una suspensión de Trimetoprim/sulfametoxazol.

4. Evaluación de la actividad antifúngica de *F. pedrosoi*, *S. schenckii*, *M. grisea* y *P. romeroi*.

a) Preparación del medio de cultivo para hongos filamentosos

i) Pesar 0.04 g de extracto de planta y se disolverá en 4 ml de alcohol al 50%, para crear una concentración 10 mg/ml.

ii) Preparar tubos con 13.5 ml de agar Sabouraud, esterilizar durante 15 minutos a 121°C, dejar enfriar a 50°C

iii) Agregar 1.5 ml del extracto de planta a probar, creando un dilución 1:10. Agitar. Teniendo una concentración final de 1 mg/ml.

iv) Verter en cajas de Petri estériles, dejar solidificar e incubar a 36°C durante 24 horas para comprobar esterilidad.

v) Luego guardar en refrigeración hasta el momento de su uso.

b) Preparación de inóculo de hongos filamentosos

i) Preparar medio Takashio (Sabouraud modificado para la 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

ii) Disolver en 300 ml de agua desmineralizada y verter 6 ml en tubos con tapón de rosca, esterilizar en autoclave y dejar solidificar con el mayor declive posible. Incubar 48 horas a 25°C para descartar contaminación.

iii) Sembrar en este medio los hongos a ensayar e incubar a 27°C durante 21 días hasta obtener un crecimiento homogéneo.

iv) Agregar a cada tubo 2 ml de agua destilada estéril y desprender el hongo con ayuda de una varilla.

v) Trasvasar el material obtenido a viales con tapa de rosca. Agitar 1 minuto en agitador hacer conteo de esporas en cámara de Neubauer.

vi) Realizar una suspensión de 100 esporas/μl ó 1x10⁵ esporas/ml (aproximadamente 10 esporas/cuadrante) y almacenar en viales estériles en refrigeración.

c) Inoculación de hongos filamentosos en placa

i) En cada caja de Petri con agar-planta abrir cuatro agujeros con campanillas de Durham de 5 mm de diámetro en forma equidistante.

ii) Tomar 30 μ l de la suspensión de esporas y depositar en los agujeros. Incubar a 27°C por 14 días.

iii) Realizar un total de cuatro repeticiones en la misma forma.

iv) Como control negativo utilizar cajas de agar Sabouraud (13.5 ml) con 1.5 ml de alcohol al 70%. Utilizar el mismo procedimiento que se emplea para realizar cajas de agar-planta, solamente sustituir la suspensión del extracto de la planta por etanol al 70%.

d) Lectura e interpretación de los resultados

i) Medir el diámetro de la colonia del hongo en mm.

ii) Calcular el porcentaje de inhibición, comparando el diámetro contra el de las colonias en las cajas control.

iii) Tomar como positivos los extractos que reducen el diámetro de la colonia en un 75%.

5. Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de *N. brasiliensis*

a) Preparación del medio de cultivo agar-planta

i) Preparar tubos con 13.5 ml de agar Sabouraud.

ii) Esterilizar los tubos en autoclave y dejar enfriar a 50°C para luego agregar 1.5 ml del extracto de la planta a ensayar (concentración de 10 mg/ml). Agitar para obtener posteriormente una concentración final de 1 mg/ml.

iii) Verter el extracto y el medio en cajas de Petri estériles, dejar solidificar e incubar a 36°C de 24-48 horas para comprobar esterilidad.

iv) Guardar en refrigeración hasta el momento de uso.

b) Preparación del inóculo

i) Preparar el caldo Sabouraud

ii) Servir 15 ml de caldo Sabouraud en erlenmeyer de 25 ml con un agitador magnético y esterilizar en autoclave.

iii) Sembrar con un asa en argolla las cepas de *N. brasiliensis* a ensayar e incubar a 37°C durante 3 días, hasta obtener un crecimiento homogéneo sobre un agitador magnético.

iv) Realizar un estándar de McFarland 0.5 con caldo Sabouraud

c) Inoculación

i) Realizar cinco estrías de la suspensión de *N. brasiliensis* en las cajas con Agar-planta.

ii) Incubar las cajas a 35°C por 3 días en agitación constante.

iii) Como control negativo utilizar una caja con agar Sabouraud y etanol al 50%.

iv) Como control positivo utilizar una caja con agar Sabouraud con una suspensión de Trimetoprim/sulfametoxazol.

- d) Lectura e interpretación de los resultados
- i) Evaluar las cajas buscando crecimiento
- ii) Interpretar de la siguiente forma:
 - Actividad negativa: crecimiento en el agar planta.
 - Actividad positiva: no hay crecimiento en el agar planta.

A los extractos evaluados que presentaron actividad contra *N. brasiliensis*, realizar el mismo procedimiento en cuanto a la preparación del inóculo, siembra e interpretación de resultados con la variante de que la preparación del medio de cultivo o agar planta se llevó a cabo realizando diluciones iniciales de 1.0, 0.5, 0.25 mg/ml en delante de cada extracto, según fue necesario, hasta establecer la concentración inhibitoria mínima (CIM).

D. Diseño estadístico

1. Tipo de estudio

Se realizó un estudio casi-experimental sin aleatorización, en el cual se realizó una prueba de hipótesis binomial. Para los extractos que presentaron efecto inhibitorio significativo, se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM).

2. Variables de interés

- a) Variable dependiente: Plantas nativas guatemaltecas
- b) Variable independiente: Actividad antibacteriana de los extractos seleccionados.

3. Número de réplicas

Para la prueba de hipótesis binomial, se requirió 5 réplicas como mínimo para un nivel de significancia $\alpha = 0.05$ (según la tabla de distribución binomial), esperando que las 5 réplicas dieran el mismo resultado. Para el análisis de CIM, se realizó 5 réplicas para cada ensayo y se interpretó de la misma manera, sin embargo, para el estudio de hongos se hicieron 20 réplicas, mientras que *N. brasiliensis* solamente el mínimo de 5.

4. Análisis de datos

Se realizó una prueba de hipótesis binomial donde:

$H_0: p \leq 0.5$ (No tiene efecto)

$H_a: p > 0.5$ (Si tiene efecto)

Se determinó que para rechazar “ H_0 ” y concluir que el extracto tiene efecto se debía tener 5 éxitos en el caso de *N. brasiliensis* y 15 éxitos en el caso del estudio con los hongos, al nivel $\alpha = 0.05$ seleccionado.

VIII. RESULTADOS

A. Extractos

Los extractos etanólicos de *B. huanita*, *B. crassifolia*, *H. courbaril*, *L. graveolens*, *P. vulgaris*, *P. jacquemontianum*, *S. alata* y *S. nigrescens* utilizados en el presente estudio fueron proporcionados por el Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología de la Escuela de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia (Cuadro 1). Los extractos de *D. robinoides* y *S. occidentalis* fueron obtenidos por la técnica de percolación de la planta seca con etanol al 70% y concentración en rotavapor del material con recuperación del disolvente; se obtuvo un porcentaje de rendimiento de 12.1% y 13.92% respectivamente (Cuadro 2).

Cuadro 1. Descripción de los extractos evaluados durante el estudio

Planta	Procedencia	Nombre común	Parte	Numero de Voucher
<i>Bourreria huanita</i>	Antigua Guatemala, Sacatepéquez	Esquisuchil	Flores	895
<i>Byrsonima crassifolia</i>	Samayac, Suchitepéquez	Nance	Corteza	31
<i>Diphysa robinoides</i>	Samayac, Suchitepéquez	Guachipilin	Hoja	1156
<i>Hymenaea courbaril</i>	Villa Canales, Guatemala	Guapinol	Hoja	1173
<i>Lippia graveolens</i>	Sierra de las Minas	Orégano	Hoja	604
<i>Phaseolus vulgaris</i>	San Cristobal, Alta Verapaz	Frijol breve	Hoja	---
<i>Piper jacquemontianum</i>	Cobán, Alta Verapaz	Cordoncillo	Hoja	1069
<i>Senna alata</i>	Samayac, Suchitepéquez	Barajo	Hoja	154
<i>Senna occidentalis</i>	Samayac, Suchitepéquez	Frijolillo	Hoja	1155
<i>Solanum nigrescens</i>	San Pedro, Sacatepéquez	Macuy	Hoja	391

Fuente: Datos experimentales, realizados en el Departamento de Citohistología, USAC. 2011-2012

Cuadro 2. Porcentajes de Rendimiento de los extractos evaluados en el estudio

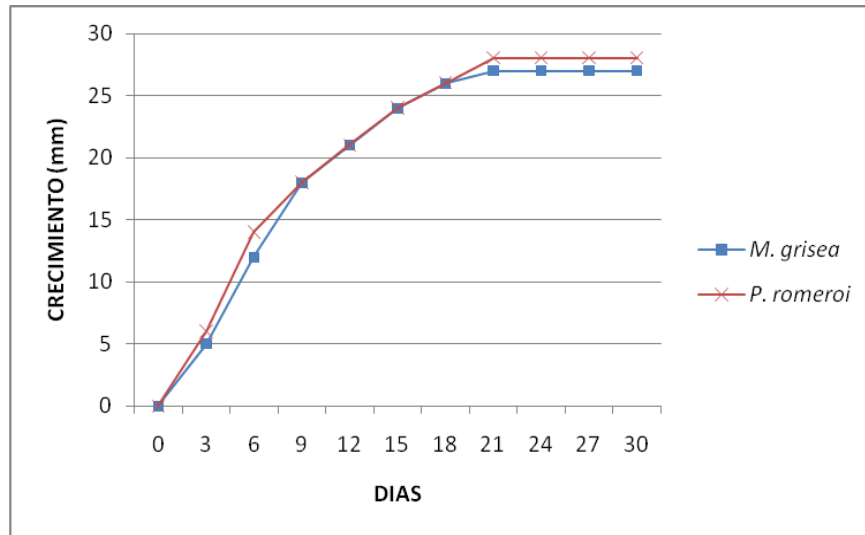
Planta	Disolvente	% Rendimiento
<i>Bourreria huanita</i>	Etanólico	25.30
<i>Byrsonima crassifolia</i>	Etanólico	29.50
<i>Diphysa robinoides</i>	Etanólico	12.1
<i>Hymenaea courbaril</i>	Etanólico	ND
<i>Lippia graveolens</i>	Etanólico	9.20
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Etanólico	0.10
<i>Piper jacquemontianum</i>	Metanol	11.00
<i>Senna alata</i>	Etanólico	17.50
<i>Senna occidentalis</i>	Etanólico	13.92
<i>Solanum nigrescens</i>	Etanólico	28.30

Fuente: Datos experimentales, realizados en el Departamento de Citohistología, USAC. 2011-2012

B. Estandarización de la metodología

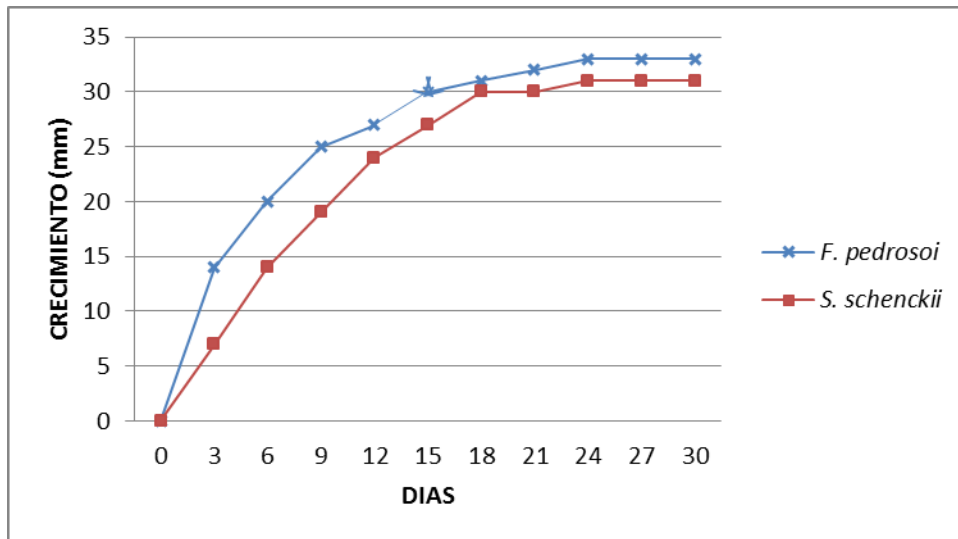
El método para hongos filamentosos descrito por Brancato & Golding (1983) modificado por MacRae *et al.* (1988) fue adaptado para el crecimiento de los hongos causantes de infecciones subcutáneas, como *F. pedrosoi*, *M. grisea*, *P. romeroi* y *S. schenckii*. Los resultados de la curva de crecimiento a 27°C, demostraron que *M. grisea* y *P. romeroi* presentaron un crecimiento máximo a los 21 días de incubación (Gráfica 1) y *F. pedrosoi* y *S. schenckii* a los 24 días (Gráfica 2). En el caso de *N. brasiliensis* se empleó la técnica desarrollada por Mitcher (1972) modificada y validada por Morales (2010) en la cual la lectura de crecimiento/inhibición de *Nocardia* se realizó a los 15 días de incubación a 27°C.

Grafica 1. Curva de Crecimiento de la fase miceliar de *Madurella grisea* y *Pyrenochaeta romeroi*



Fuente: Datos experimentales, realizados en el Departamento de Citohistología, USAC. 2011-2012*

Grafica 2. Curva de Crecimiento de la fase miceliar de *Fonsecaea pedrosoi* y *Sporothrix schenckii*



Fuente: Datos experimentales, realizados en el Departamento de Citohistología, USAC. 2011-2012*

*Los valores utilizados para graficar fueron las medidas de los diámetros obtenidas por las colonias.

C. Validación de la metodología

La CIM (punto de corte) de los controles positivos se determinó mediante diluciones seriadas de los antimicrobianos. Como se observa en el Cuadro 3 la CIM para la bacteria *N. brasiliensis* con trimetoprim/sulfametoxazole fue de 15.625/78.125 µg/ml.

En el caso de los ensayos antifúngicos se utilizó voriconazol (antifúngico de amplio espectro, que ha demostrado actividad en estudios anteriores); para *F. pedrosoi*, *M. grisea*, *P. romeroi* y *S. schenckii*, las CIM fueron 3.2, 3.2, 0.64 y 400 µg/ml respectivamente.

Cuadro 3. CIM de las drogas conocidas contra los microorganismos ensayados.

Microorganismo	Voriconazol µg/ml	Trimetropim/Sulfametoxazol µg/ml
<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	3.2	
<i>Madurella grisea</i>	3.2	
<i>Nocardia brasiliensis</i>		15.625/78.125
<i>Pyrenochaeta romeroi</i>	0.64	
<i>Sporothrix schenckii</i>	400	

Fuente: Datos experimentales, realizados en el Departamento de Citohistología, USAC. 2011-2012

D. Actividad antimicrobiana

La determinación de la actividad antimicrobiana se describe en el Cuadro 4. Los extractos de *D. robinoides*, *H. courbaril*, *S. alata* y *S. occidentalis* presentaron actividad antibacteriana significativa a una concentración de 1 mg/ml contra *N. brasiliensis*. *P. vulgaris* fue el único extracto que no presentó actividad a una concentración de 1 mg/ml contra esta bacteria.

El tamizaje anti fúngico de los extractos de *B. crassifolia*, *L. graveolens*, *P. vulgaris*, *S. alata* y *S. occidentalis*, demostró actividad significativa contra *M. grisea* a una concentración de 1 mg/ml. Los extractos restantes, *B. huanita*, *D. robinoides*, *H. courbaril*, *P. jacquemontianum* y *S. nigrescens* no presentaron actividad antifúngica significativa a la concentración estudiada.

Los extractos de *D. robinoides*, *H. courbaril*, *L. graveolens*, *S. alata* y *S. occidentalis* presentaron actividad antifúngica significativa a una concentración de 1 mg/ml contra *P. romeroi*. En el caso de los extractos restantes, *B. crassifolia*, *B. huanita*, *P. vulgaris*, *P. jacquemontianum* y *S. nigrescens* no hubo ninguna actividad significativa ($p>0.05$) a la concentración estudiada.

Se evaluaron los extractos de *P. jacquemontianum* y *S. nigrescens* pero no presentaron ninguna actividad significativa contra *F. pedrosoi*. Ninguno de los cuatro extractos evaluados, *P. jacquemontianum*, *P. vulgaris*, *S. nigrescens* y *S. occidentalis*, presentó actividad significativa contra *S. schenckii*.

Cuadro 4. Resultado del tamizaje antimicrobiano

Especie	<i>N. brasiliensis</i>	<i>M. grisea</i>	<i>P. romeroi</i>	<i>F. pedrosoi</i>	<i>S. schenckii</i>
<i>Bourreria huanita</i>	- ^e	- ⁱ	+ ⁱ	- ^b , + ^h	- ^b , + ^h
<i>Byrsonima crassifolia</i>	- ^e	+ ⁱ	- ⁱ	- ^f	- ^f
<i>Diphyssa robinoides</i>	+ ⁱ	- ⁱ	+ ⁱ	- ^c	+ ^g
<i>Hymenaea courbaril</i>	+ ⁱ	- ⁱ	+ ⁱ	+ ^c	+ ^g
<i>Lippia graveolens</i>	+ ^e	+ ⁱ	+ ⁱ	+ ^{a, b}	+ ^{b, d}
<i>Phaseolus vulgaris</i>	- ⁱ	+ ⁱ	- ⁱ	+ ^c	- ⁱ
<i>Piper jacquemontianum</i>	+ ^e	- ⁱ	- ⁱ	- ⁱ	- ⁱ
<i>Senna alata</i>	+ ⁱ	+ ⁱ	+ ⁱ	- ^a	- ^d
<i>Senna occidentalis</i>	+ ⁱ	+ ⁱ	+ ⁱ	+ ^c	- ⁱ
<i>Solanum nigrescens</i>	- ^e	- ⁱ	- ⁱ	- ⁱ	- ⁱ

Fuente: Datos experimentales, realizados en el Departamento de Citohistología, USAC. 2011-2012

(-) Actividad negativa, crecimiento a una concentración de 1 mg/ml.

(+) Actividad positiva, inhibición a una concentración de 1 mg/ml.

Datos Obtenidos por ^aDel Cid, 2005; ^bOrtiz, 2006; ^cSuárez, 2008; ^dGaitán, 2005; ^eMorales, 2011; ^f Marchorro, 2009; ^gGarcía 2009; ^h Gaitán, 2011; ⁱDatos del presente estudio

E. Concentracion Mínima Inhibitoria (CIM)

Para los extractos con un resultado positivo en el tamizaje antimicrobiano para *N. brasiliensis*, se determinó la CIM de cada uno. Como se observa en el Cuadro 5, de los cinco extractos

ensayados cuatro tuvieron actividad significativa *H. courbaril* (0.0625 mg/ml), *S. alata* (0.125 mg/ml), *D. robinoides* (0.5 mg/ml) y *S. occidentalis* (1 mg/ml).

Cuadro 5. Resultados de la CIM de cinco extractos contra *Nocardia brasiliensis*.

Especie	CIM mg/ml	Valor P
<i>Diphysa robinoides</i>	0.5	0.0312
<i>Hymenaea courbaril</i>	0.0625	0.0312
<i>Phaseolus vulgaris</i>	>1	>0.05
<i>Senna alata</i>	0.125	0.0312
<i>Senna occidentalis</i>	1	0.0312
Trimetropim/Sulfametoxazol	0.0015/0.0078	<0.0312

Fuente: Datos experimentales, realizados en el Departamento de Citohistología, USAC. 2011-2012

Para los extractos con resultado positivo en el tamizaje antimicrobiano para *M. grisea*, se determinó la CIM para cada uno. Como se observa en el cuadro 6, las CIM de los cinco extractos que tuvieron actividad significativa en el tamizaje fueron, *L. graveolens* (0.0078125 mg/ml), *S. alata* (0.5 mg/ml), *S. occidentalis* (0.5 mg/ml), *B. crassifolia* (1 mg/ml) y *P. vulgaris* (1 mg/ml).

Cuadro 6. Resultados de la CIM de diez extractos contra *Madurella grisea*.

Especie	CIM mg/ml	Valor P
<i>Bourreria huanita</i>	>1	>0.05
<i>Byrsonima crassifolia</i>	1	0.0312
<i>Diphysa robinoides</i>	>1	>0.05
<i>Hymenaea courbaril</i>	>1	>0.05
<i>Lippia graveolens</i>	0.0078125	0.0312
<i>Phaseolus vulgaris</i>	1	0.0312
<i>Piper jacquemontianum</i>	>1	>0.05
<i>Senna alata</i>	0.5	0.0312
<i>Senna occidentalis</i>	0.5	0.0312
<i>Solanum nigrescens</i>	>1	>0.05
Voriconazol	0.0032	<0.0312

Fuente: Datos experimentales, realizados en el Departamento de Citohistología, USAC. 2011-2012

Para los extractos con resultado positivo en el tamizaje antimicrobiano para *P. romeroi*, se determinó la CIM para cada uno. Como se observa en el Cuadro 7, la CIM de los seis extractos tuvieron actividad significativa en el tamizaje fueron, *D. robinoides* (0.0625 mg/ml), *L. graveolens* (0.0625 mg/ml), *B. huanita* (0.25 mg/ml), *H. courbaril* (0.25 mg/ml), *S. occidentalis* (0.25 mg/ml) y *S. alata* (1 mg/ml).

Cuadro 7. Resultados de la CIM de diez extractos contra *Pyrenochaeta romeroi*.

Especie	CIM mg/ml	Valor P
<i>Bourreria huanita</i>	0.25	0.0312
<i>Byrsonima crassifolia</i>	>1	>0.05
<i>Diphysa robinoides</i>	0.0625	0.0312
<i>Hymenaea courbaril</i>	0.25	0.0312
<i>Lippia graveolens</i>	0.0625	0.0312
<i>Phaseolus vulgaris</i>	>1	>0.05
<i>Piper jacquemontianum</i>	>1	>0.05
<i>Senna alata</i>	1	0.0312
<i>Senna occidentalis</i>	0.25	0.0312
<i>Solanum nigrescens</i>	>1	>0.05
Voriconazol	0.0064	<0.0312

Fuente: Datos experimentales, realizados en el Departamento de Citohistología, USAC. 2011-2012

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente estudio se analizó la capacidad inhibitoria de 10 extractos de plantas contra *N. brasiliensis*, *S. schenckii*, *F. pedrosoi*, *M. grisea* y *P. romeroi*, debido a la necesidad de encontrar alternativas terapéuticas menos tóxicas, más eficientes y de mayor disponibilidad. En este estudio se evaluaron plantas que fueron seleccionadas basándose principalmente en el registro de actividad antibacteriana y antifúngica reportada en estudios anteriores (Anexo 1) (Del Cid, 2005; Gaitán, 2005; Ortiz, 2006; Suárez, 2008; García, 2009; Morales, 2011).

Las extractos vegetales incluidos en este estudio fueron: extracto etanólico de hoja de *D. robinoides*, *H. courbaril*, *L. graveolens*, *P. vulgaris*, *S. alata*, *S. nigrescens* y *S. occidentalis*, extracto etanólico de flor de *B. huanita* y *B. crassifolia* y extracto metanólico de hoja de *P. jacquemontianum*.

En las curvas de crecimiento se observó que para *M. grisea* y *P. romeroi* el crecimiento óptimo fue a los 21 días de incubación con agar Sabouraud sin ningún aditivo a 27°C (Grafica 1). Para *F. pedrosoi* y *S. schenckii* el crecimiento fue a los 24 días (Grafica 2); lo cual permitió estandarizar el tiempo de crecimiento máximo de los hongos. El bioensayo de la fase miceliar fue una adaptación de la metodología de Brancato & Golding modificado por MacRae *et al.* (1988). para hongos filamentosos. Con *N. brasiliensis* se utilizó la metodología de Mitcher (temperatura de 37°C durante 3-5 días) (Mitscher, Leu, Bathala, Wu, Beal, & White, 1972).

En la validación de la metodología se utilizaron dos antimicrobianos que son efectivos contra los microorganismos utilizados en el estudio; trimetoprim/sulfametoxazole para la bacteria *N. brasiliensis*, la CIM fue 15.625/78.125 µg/ml. En el caso de ensayos fúngicos se utilizó Voriconazol, antifúngico de amplio espectro, que ha demostrado actividad en tesis anteriores; las CIM fueron 0.64 µg/ml para *P. romeroi*, 3.2 µg/ml para *F. pedrosoi*, 3.2 µg/ml para *M. grisea* y 400 µg/ml para *S. schenckii* (Cuadro 3). Se utilizaron estos antimicrobianos a las concentraciones anteriormente descritas con el fin de que en cada bioensayo se corriera un control positivo, para

verificación de la prueba. Así como un control negativo, el cual consistía en un agar Sabouraud sin ningún aditivo para evitar falsos negativos, además para tener un patrón de comparación del halo de crecimiento y así poder medir la inhibición del extracto.

En el Cuadro 4 se observan los resultados del tamizaje de la actividad antimicrobiana de los 10 extractos, en donde se evidencia que la actividad de los extractos es positiva (inhibición de crecimiento del microorganismo) o negativa (crecimiento del microorganismo).

El extracto de *L. graveolens*, fue el que presentó mejor actividad antimicrobiana significativa ($p=0.0312$) en todos los bioensayos realizados, inhibiendo a *N. brasiliensis*, *S. schenckii*, *F. pedrosoi*, *M. grisea* y *P. romeroi*, variando en la CIM para cada uno de ellos, como se observa en los Cuadros 4, 6 y 7 a pesar de que el porcentaje de rendimiento del extracto usando etanol al 70% como disolvente, fue de 9.20%. Este porcentaje es bastante bajo en comparación de otros estándares de porcentajes de rendimiento establecidos para *L. graveolens* (Pascual, Slowing, Sánchez, Mata, Carretero, & Villar, 2001). Por lo que podemos suponer que uno o varios de los componentes de la planta obtenidos con el disolvente utilizado presentan una alta actividad antimicrobiana y podrían ser tomados en cuenta para la búsqueda de las sustancias activas.

En otros estudios se han identificado dichos componentes, entre los cuales podemos mencionar: aceites volátiles (carvacrol, timol, 1,8 cineol, etc.), taninos, alcaloides y flavonoides. De los metabolitos mencionados anteriormente los que poseen actividad antimicrobiana de importancia son los grupos químicos de la familia de flavanoides (Ortiz, 2006). Estos compuestos activos pueden actuar como antimicrobianos bajo distintos mecanismos de acción como: Inhibiendo el citocromo P450 dependiente de 14 lanosterol demetilasa, la enzima requerida para la síntesis de ergosterol, enzima que es importante en la producción y mantenimiento de la pared celular fúngica, alterando así su permeabilidad y como consecuencia produciendo la pérdida de elementos intracelulares (Bidart, 2004).

Otro posible mecanismo antimicrobiano es la inhibición de la biosíntesis de triglicéridos y fosfolípidos o la inhibición de la actividad enzimática oxidativa y peroxidativa, lo que conlleva a

la acumulación de concentraciones tóxicas de peróxido de hidrógeno, que contribuyen al deterioro de los órganos subcelulares y a la necrosis celular (Bidart, 2004).

En estudios previos se ha probado la actividad antifúngica de la planta *L. graveolens*; Pozatti *et al.* (2008) probó el aceite esencial de la planta contra especies del género *Candida* resistentes y no resistentes a fluconazol y demostró ser el extracto con mejor actividad con CIM's entre 200 y 800 µg/ml; Dal Pozzo *et al.* (2011) utilizó aceites esenciales de varias plantas naturales siendo la mayoría carvacrol, timol y cinamaldehído, contra especies del género *Staphylococcus* y el extracto de *L. graveolens*, presentó la mejor actividad antibacteriana nuevamente. Sin embargo a pesar que los extractos de esta planta han presentado una excelente actividad antifúngica y antibacteriana contra distintos microorganismos, no se ha estudiado actividad alguna contra microorganismos de infecciones subcutáneas. Por lo que la actividad demostrada contra estos patógenos es de importancia científica, para la búsqueda de nuevos tratamientos. Sin embargo, previo a la utilización de la planta hay que profundizar y establecer cual es el principio activo responsable de la inhibición, para poder utilizar dicha molécula en la fabricación de nuevos medicamentos.

En el caso de *S. alata* como se puede observar en los resultados en los Cuadros 4-7; presentó actividad antimicrobiana significativa ($p=0.0312$) en los 3 microorganismos en los cuales fue ensayado el extracto, *N. brasiliensis*, *M. grisea* y *P. romeroi* podemos deducir que los componentes de este extracto obtenidos en etanol tienen la capacidad de inhibir a estos tres microorganismos. El porcentaje de rendimiento que se obtuvo de esta planta es del 17.5%, un porcentaje un tanto bajo comparado con los demás extracto que presentaron porcentaje por encima de esta cifra. A pesar de que este porcentaje se considera bajo, fue lo suficientemente efectivo para cumplir con la inhibición. En trabajos realizados con anterioridad con *S. alata* se ha determinado que posee compuestos tales como los sesquiterpenos y algunos compuestos fenólicos de aceites volátiles que se han obtenido de las hojas de esta planta que poseen actividad inhibitoria en bacterias gram negativo y gram positivo. Estudios anteriores establecen que la actividad antibacteriana puede ser atribuida al kaempferol y a la aloe-emodina como fue demostrado en tamizajes realizados con extractos de *S. alata* contra cepas de *S. aureus* meticilino resistente (Hazni, Ahmad, Hitotsuyanagi, Takeya, & Choo, 2008).

La actividad antifúngica por su parte puede ser atribuida a la presencia de antraquinonas, como la aloe-emodina, siendo esta la antraquinona derivada más activa en *S. alata* contra hongos dermatofitos: *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* y *E. floccosum* (Fuzellier, Portier, & Lectard, 1982).

El extracto de *B. huanita* presentó actividad variable, con actividad significativa ($p=0.032$) contra el hongo *P. romeroi* y no presentando actividad significativa ($p>0.05$) contra *M. grisea*. A pesar del alto porcentaje de rendimiento obtenido (25.30 %) los compuestos contenidos en el extracto etanólico no fueron de una elevada actividad antifúngica significativa ($p>0.05$). En un estudio llevado a cabo por Ortiz (2006), se estimó que el extracto etanólico y sus particiones hexánicas, clorofórmicas, de acetato de etilo y acuosas de la flor de *B. huanita* no poseían actividad antifúngica contra los hongos *F. pedrosoi* y *S. schenckii*, pero en un estudio posterior se demostró lo contrario al encontrar actividad antifúngica del extracto etanólico de la flor de esta planta contra estos hongos (Gaitán *et al.*, 2011).

Es importante mencionar que *B. huanita* demostró actividad antibacteriana, especialmente contra *E. coli*, pero no demostró actividad contra bacterias gram positivo ni contra *N. brasiliensis* (Cruz, 2008; Morales, 2011). El análisis fitoquímico de la flor de la planta demostró la presencia de flavonoides, taninos, alcaloides y aceites volátiles, pero la actividad antifúngica presentada por la planta aún no se le ha atribuido a ninguno de estos compuestos (Ortiz, 2006).

Al utilizar el extracto de *D. robinoides* en los bioensayos se observó que el extracto demostró tener actividad significativa ($p=0.0312$) contra *N. brasiliensis* y *P. romeroi* como se observa en los Cuadros 4, 5 y 7. Debido a la actividad antimicrobiana que demostró tener el extracto, se puede suponer que la planta posee algún compuesto con actividad inhibitoria tanto contra bacterias, como en el caso de *N. brasiliensis*, como contra hongos, tal el caso de *P. romeroi* se sabe que algunos de los compuestos activos presentes en el extracto de *D. robinoides* son flavonoides como las antraquinonas (Anaissi, McGinnis, & Pfaller, 2003), compuestos que como se mencionó al principio pueden ser los responsables de la propiedad antifúngica actuando contra la pared celular ó a su acción antioxidante. Además, debe tenerse en cuenta que las condiciones ambientales generan cambios morfológicos y de desarrollo en la pared celular, por lo que la

respuesta es distinta ante mecanismos de acción, adsorción o absorción de dichos compuestos (Figueroa, 1991; Anaissi, McGinnis, & Pfaller, 2003).

El extracto de *H. courbaril* demostró actividad significativa ($p=0.0312$) contra el hongo *P. romeroi* y la bacteria *N. brasiliensis*, pero no inhibió significativamente ($p>0.05$) al hongo *M. grisea*; como se observa en los Cuadros 4-7. Las hojas de esta planta contienen taninos, cariofileno y α y β selineno. Se han reportado flavonoides, terpenoides y esteroides, siendo los flavonoides astilbina y el sitosterol de importancia en las hojas de esta planta (López, & Schiff, 1976). Con anterioridad se ha demostrado que la astilbina actúa inhibiendo el crecimiento de bacterias gram positivo y gram negativo. Esta actividad es atribuida a la estructura de la molécula la cual contiene la presencia de grupos hidroxilo en la posición 3', 4', 5 y 7, los cuales se encuentran presentes en los flavonoides con actividad antibacteriana (Moulari, Pellequer, Lboutounne, Girard, Chaumont, Mollet, & Muyard, 2006).

También se ha demostrado el efecto antifúngico de la planta contra hongos causantes de infecciones subcutáneas como *S. schenckii* y *F. pedrosoi* (García, 2009; Suárez, 2008). El óxido de cariofileno, un sesquiterpeno, y el sitosterol, un flavonoide, son los compuestos a los cuales se les ha atribuido la actividad antifúngica. Se sabe que el sitosterol actúa inhibiendo el desarrollo del tubo germinal del hongo evitando de esta manera la propagación del hongo (Aderiye, Ogundana, Adesanya, & Roberts, 1989) mientras que el óxido de cariofileno solamente se sabe que es producido de su precursor, el cariofileno, cuando la planta se encuentra ante una infección fúngica, desconociéndose el mecanismo por medio del cual actúa (Arrhenius, 1993). El estudio llevado a cabo por García (2009) demostró que la planta es activa contra la fase micelial del hongo *S. schenckii* pero no contra su fase levaduriforme, lo afirma que una buena parte de la actividad es llevada a cabo por el sitosterol (ya que en las levaduras no se elongan los tubos germinales). Esto indica que el sitosterol actúa a través de algún mecanismo que ejerce su efecto en la pared del hongo el cual no tiene efecto en el hongo *M. grisea*.

El extracto de la hoja *S. occidentalis*, presentó actividad antimicrobiana significativa ($p=0.0312$) en tres de los cuatro bioensayos realizados (Cuadros 4-7). El porcentaje de rendimiento obtenido fue de 13.92 %, lo cual indica una recuperación intermedia de los componentes de la planta.

Dentro de los compuestos aislados de las hojas de *S. occidentalis* se puede mencionar una mezcla de C-flavonoides de apigenina, dentro de ellos posiblemente vitexina, 7-heterosido de vitexina, 1,8-dihidroxi-3-metil antraquinona y emodina así como sus glicósidos (Yadav, Arya, Yadav, Panghal, Kumar, & Dhankhar, 2010). También se ha encontrado 1,1-bi-4, 4', 5, 5'-tetrahidroxi-2, 2'-dimetil antraquinona así como la flavolona metterucinol-7-O- α -Lramnósido. Otros compuestos observados son alcaloides, flavonoides, taninos, flovataninos, tetrahidro antraceno, senósidos, germicrisona y occidentalininas A y B (Yadav *et al.*, 2010; Jain, Sharma, Jain, & Mittal, 1998).

A pesar de ello la composición de las plantas varía según la región ya que en plantas de Nigeria el extracto etanólico de la hoja no presenta flavonoides (Ogunkunle, & Ladejobi, 2006). El mecanismo de acción por medio del cual la familia Caesapiniaceae, a la cual pertenece *S. occidentalis*, ejerce su efecto antimicrobiano puede ser explicado en términos de su habilidad para ocasionar la fuga de sodio y potasio. La eficacia de *S. occidentalis* puede ser el resultado del daño e inactivación de enzimas debido a la fuga de estas iones. El sodio y el potasio son conocidos por afectar los balances osmóticos en la célula y su fuga puede causar lisis celular. Estos iones también es sabido que activan enzimas las cuales son catalizadores orgánicos que regulan las reacciones bioquímicas (Oladunmoyem, Akinyosoye, & Adetuyi, 2006).

La investigación científica sobre *S. occidentalis* sugiere un gran potencial biológico de esta planta. Se cree fuertemente que la información detallada como se presenta en los estudios realizados sobre las propiedades biológicas y diversos fitoquímicos de los extractos podrían proporcionar evidencia detallada para el uso de esta planta a diferentes medicamentos. Las variaciones fitoquímicas y la eficacia de los valores medicinales de *S. occidentalis* dependen de la ubicación geográfica y las estaciones del año. Al mismo tiempo, el extracto orgánico y acuoso de *S. occidentalis* podría ser más explotado en el futuro como una fuente de compuestos fitoquímicos útiles para la industria farmacéutica (Yadav *et al.*, 2010)

P. vulgaris presentó actividad antifúngica significativa ($p=0.0312$) en uno de los cuatro bioensayos realizados; inhibió a *M. grisea* con un CIM de 1 mg/ml (Cuadro 6) y en estudios anteriores ha demostrado actividad antimicótica contra *F. pedrosoi* con una concentración

mínima inhibitoria de 1 mg/ml (Suárez, 2008). *P. vulgaris* contiene pequeños péptidos de 45-54 aminoácidos que juegan un papel importante en la defensa a infecciones fúngicas. Los cuales tienen receptores que identifican los esfingolípidos de la membrana fúngica, creando un daño irreversible, modificando la permeabilidad de la membrana. Dicho péptido, llamado PuD₁, inhibe a diferentes concentraciones a levaduras de *Candida* sp., *Kluyveromyces marxianus* y *S. cerevisiae*; también hongos fitopatógenos como *Fusarium* sp. Y *Rizoctonia solani* (Games, Santos, Mello, Diz, Carvalho, Souza-Filho, *et al.*, 2008). Estudios han demostrado que *P. vulgaris* contiene proteínas como defensinas, proteínas que inactivan ribosomas, proteínas tipo cinasas y un péptido llamado vulgarinina con actividad antifúngica (Wu, Sun, Zhang, Wang, & Bun, 2011; Wong, & Bun, 2005). No todos los disolventes separan los mismos componentes de las plantas, en este caso el etanol que fue utilizado para hacer el extracto de *P. vulgaris*, se sabe que es pobre para separar taninos, los cuales en estudios anteriores fueron fraccionados a partir de extractos acetónicos y obtuvieron actividad antibacteriana muy efectiva con CIMs <250 µg/ml (Amarowicz, Dykes, & Pegg, 2008), razón por la cual pudieron no tener actividad significativa (p>0.05) contra *N. brasiliensis*.

S. nigrescens, un ensayo clínico demostró que óvulos de *S. nigrescens* y óvulos de nistatina poseen comportamientos beneficiosos similares contra *C. albicans* (Girón, Aguilar, Cáceres, & Arroyo, 1988). Se han aislados algunos compuestos químicamente activos que podrían explicar algunas de las cualidades que se le atribuyen. Entre estos se encuentran alcaloides como la alfa-solalina, la solasodina, la solasonina; glucoalcaloides, alkaminas, esteroides, saponinas, azúcares desoxigenadas y leucoantocianina. Se demostró que un glucósido espirostanolico específico aislado de la especie *S. nigrescens*, la cantalasaponina-3, demostraba actividad antifúngica *in vitro* (He, Mocek, Floss, Caceres, Girón, Buckley, *et al.*, 1994). Otro estudio demuestra que la actividad antibiótica del género *Solanum* se atribuye a la Solanina, un alcaloide esteroide básico, de peso molecular 559, con actividad fungicida e insecticida (Berdy, Aszalos, Botian, & McNitt, 1982). *S. nigrescens* no tuvo actividad contra ninguno de los microorganismos utilizados en el estudio, aun teniendo un porcentaje de rendimiento de 28.3%, relativamente alto (Cuadro 1). Esto se debe a que la actividad fungicida demostrada, de la decocción de las hojas posee una CIM de 100 a 300 mg (Cáceres *et al.*, 1991c) y en el estudio se hizo desde 1 mg/ml, el cual es muy bajo, para que presentara actividad antimicrobiana.

En el caso de *P. Jacquemontianum*, no presento ninguna actividad ya que no inhibió significativamente ($p > 0.05$) ninguno de los cuatro hongos, como se puede observar en el Cuadro 4. En estudios anteriores se han realizados tamizajes fitoquímicos identificando metabolitos secundarios de la planta como alcaloides, flavonoides, antraquinonas, saponinas, principios amargos, aceites volátiles, cumarinas (Gómez, 2008). De los extractos estudiados solo han presentado actividad antibacteriana, eso explicaría por qué solo ha inhibido a la bacteria *N. brasiliensis* (Morales, 2011). Cabe pensar que los compuestos de esta planta no poseen la potencia necesaria como para inhibir el crecimiento fúngico, ya que los mecanismos de defensa de estos microorganismos es más fuerte que los de las bacterias (Véliz, Cruz, Gómez, García, Álvarez, Cáceres *et al.*, 2006).

Por último el extracto de corteza de *B. crassifolia*, demostró tener actividad significativa ($p = 0.032$) contra *M. grisea*, con un CIM de 1 mg/ml, por lo que se puede suponer que en el extracto únicamente se logró separar componentes antifúngicos que inhibieron solamente el crecimiento de *M. grisea*. Para este extracto se obtuvo un porcentaje de rendimiento de 29.50%, el más alto de todos los extractos usados en la investigación. El análisis fitoquímico de las raíces de *B. crassifolia* ha demostrado la presencia de taninos glicósidos, flavonoides, saponinas y terpenos (Martínez, Gonzales, Cazares, Moreno, & García, 1999), aunque bien solo el triterpeno β amyrina y 1,2-di-O-palmitoil-3-O-(6-sulfo-alfa-D-quinovopiransil)-glicerol han sido aislados. Se le atribuye la acción antimicrobiana al triterpeno β amyrina. En los últimos años se ha logrado desarrollar con éxito derivados de este triterpeno natural. Las modificaciones producidas por la adición de grupos sustitutos en la molécula de β amyrina han logrado afectar las propiedades fisicoquímicas de la molécula como lo son la densidad electrónica y su propiedad hidrofóbica, pero la propiedad antifúngica continúa estando restringida a la molécula original, Esta actividad fue evaluada contra diferentes especies de *Candida* sp. (Johann, Soldi, Lyon, Pizzolatti, & Resende, 2007).

No se ha logrado explicar completamente el mecanismo de acción, por lo que se especula que involucra la ruptura de la membrana, ya que los compuestos lipofílicos y sus grupos funcionales interfieren con la estructura de la proteína enzimática. Adicionalmente también se cree que podría involucraren la inhibición de la síntesis de la 1,3-beta-D-glucan, la cual participa en la

síntesis de la pared celular del hongo (Lima, Paulo, & Giesbrecht, 1992; Onishi., Thompson, Curotto, Dreikorn, Rosenbach, Douglas, *et al.*, 2000).

Infecciones subcutáneas son tratadas comúnmente hoy en día, drogas sintéticas presentan efectividad contra dichas infecciones, pero una nueva amenaza ha emergido debido a la aparición de cepas resistentes a dichos fármacos y el descubrimiento de nuevos antimicrobianos podrían ser necesarios (Wong, & Bun, 2005). Por lo que los compuestos activos de las plantas que presenten actividad antimicrobiana pueden ser candidatos para el surgimiento de nuevos tratamientos y se recomienda continuar con estudios y comprobar los posibles efectos adversos, ya que podrían ser que sean mejor que los antifúngicos sintéticos de elección.

X. CONCLUSIONES

1. De los cinco extractos ensayados contra *N. brasiliensis* cuatro tuvieron actividad antibacteriana significativa ($p=0.032$) con CIM variables para cada uno de ellos; *H. courbaril* (0.0625 mg/ml), *S. alata* (0.125 mg/ml), *D. robinoides* (0.5 mg/ml) y *S. occidentalis* (1 mg/ml).
2. De los diez extractos ensayados contra *M. grisea*, cinco tuvieron actividad antifúngica significativa ($p=0.032$) con CIM variables para cada uno de ellos; *L. graveolens* (0.0078125 mg/ml), *S. alata* (0.5 mg/ml), *S. occidentalis* (0.5 mg/ml), *B. crassifolia* (1 mg/ml) y *P. vulgaris* (1 mg/ml).
3. De los diez extractos ensayados contra *P. romeroi*, seis tuvieron actividad antifúngica significativa ($p=0.032$) con CIM variables para cada uno de ellos; *D. robinoides* (0.0625 mg/ml), *L. graveolens* (0.0625 mg/ml), *B. huanita* (0.25 mg/ml), *H. courbaril* (0.25 mg/ml), *S. occidentalis* (0.25 mg/ml) y *S. alata* (1 mg/ml).
4. De los dos extractos ensayados contra *F. pedrosoi*, ninguno tuvo actividad antifúngica significativa ($p>0.05$).
5. De los cuatro extractos ensayados contra *S. schenckii*, ninguno tuvo actividad antifúngica significativa ($p>0.05$).
6. *L. graveolens* presentó una excelente actividad antimicrobiana significativa ($p=0.032$) inhibiendo a todos los microorganismos, en especial a *M. grisea* a una CIM de 0.0078125 mg/ml.

XI. RECOMENDACIONES

1. Determinar la sustancia activa de *L. graveolens*, por fraccionamiento bioguiado.
2. Profundizar los estudios farmacológicos de *L. graveolens* para su aplicación clínica.
3. Determinar los posibles efectos adversos o tóxicos en el uso terapéutico de *L. graveolens*.
4. Determinar las propiedades antimicrobianas de los extractos con actividad positiva contra microorganismos nuevos con el fin de establecer su espectro de acción.
5. Utilizar nuevas plantas nativas del país, para determinar si tienen efecto inhibitorio contra microorganismos causantes de infecciones subcutáneas, para así poder contar con más materia prima, para la creación de nuevos fármacos.

XII. REFERENCIAS

- Aderiye, B. I., Ogundana, S. K., Adesanya, S. A., & Roberts, M. F. (1989). The effect of β -sitosterol on spore germination and germ-tube elongation of *Aspergillus niger* and *Botryodiplodia theobromae*. *International Journal of Food Microbiology*, 8, 73-78.
- Aguilar, J. (1982). *Catálogo de los Árboles de Guatemala*. Guatemala, Guatemala: USAC.
- Aguilar, J. I. (1966). *Relación de unos Aspectos de la Flora Útil de Guatemala*. Guatemala, Guatemala: Ministerio de Agricultura.
- Alio, A. B., Castro, S., Mendoza, M., Hernández, I., Díaz, E., Cavallera, E., et al. (2001). Cromomicosis: Uso del tratamiento combinado de itraconazol y 5 fluorouracilo en *Fonseca pedrosoi* e itraconazol y criospray en *Exophiala jeanslemei* var. *lecanii-Corni*. *Dermatología Venezolana*, 39(1), 11-15.
- Amarowicz, R., Dykes, G.A., & Pegg, R.B. (2008). Antibacterial activity of tannin constituents from *Phaseolus vulgaris*, *Fagopyrum esculentum*, *Corylus avellana* and *Juglans nigra*. *Fitoterapia*, 79, 217-219.
- Anaissi, E. J., McGinnis, M. R., & Pfaller, M. A. (2003). *Clinical Mycology*. Washington D. C.: Churchill Livingstone.
- Arenas, G. (2003). *Micología Médica Ilustrada*. (2da. ed.). México D. F., México: McGraw-Hill Interamericana.
- Argueta, A., Cano, L., & Rodarte M. (1994). *Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana II*. México D.F., México: Instituto Nacional Indigenista.
- Arnason, T., Uck, F., Lambert, J., & Hebda, R. (1980). Maya medicinal plants of San Jose Succotz, Belize. *Journal of Ethnopharmacology*, 21, 345-364.

- Arrhenius, S., & Langenheim, J. H. (1993). Inhibitory effects of *Hymenaea* and *Copaifera* leaf resins on the leaf fungus, *Pestolitia subcuticularis*. *Biochemical Systematics and Ecology*, *11*(4): 361-366.
- Barret, M. (2004). *The Handbook of Clinically Tested Herbal Remedies*. Nueva York: The Haworth Herbal Press.
- Berd, D. (1973). Laboratory identification of clinically important aerobic actinomycetes. *Applied Microbiology*, *25*(4), 665-681.
- Berdy, J., Aszalos, A., Botian, M., & Mcnitt, K. (1982). *CRC Handbook of Antibiotic Compounds*. Boca Ratón, CRC Press.
- Beyra, A., & Reyes, G. (2004) Revisión taxonómica de los géneros *Phaseolus* y *Vigna* (*Leguminosae-Papilionoideae*) en Cuba. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, *61* (2), 135-154.
- Bidart, T. (2004). Rol de voriconazol y caspofungina en terapia Antifúngica. *Revista Chilena de Infectología*, *21*(1), 13-19.
- Biedenbach, D., & Jones, R. (1996). Comparative assessment of E - test for testing susceptibilities of *Neisseria gonorrhoeae* to penicillin, tetracycline, ceftriaxone, cefotaxime and ciprofloxacin: Investigation using SIO (K) Review Criteria Recommended by the Food and Drug Administration. *Journal of Clinical Microbiology*, *34*, 3214-3217.
- Bolaños, A. (1991). Frijol. *Programa de Hortalizas MAG. P.323-326. Aspectos técnicos sobre cuarenta y cinco cultivos agrícolas de Costa Rica. Boletín Técnico N°74*. San José, Costa Rica: MAG, Dirección General de Investigación y Extensión Agrícola.
- Bonifaz, A., Carrasco-Gerard, E., & Saul, A. (2001). Chromoblastomycosis: Clinical and mologic experience of 51 cases. *Mycoses*, *44* (1-2), 1-7.

- Brancato, F., & Golding, N. (1983). The diameter of the mold colony as a reliable measure of growth. *Mycologia*, 45(6), 848-862.
- Budhiraja, R., & Garg, K. (1973). Antihelmintic activity of *Cassia occidentalis*. *Indian Journal of Pharmacology*, 35(1), 44-45.
- Burlingame, E., & Reddish, G. (1973) Laboratory methods for testing fungicides used in the treatment of epidermophytoses. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 14, 649-665.
- Cáceres, A., *et al.*, (1994). 10 años del CYTED, pp. 212
- Caceres, A., & Samayoa, B. (1989). *Tamizaje de la actividad antibacteriana de plantas usada en Guatemala para el tratamiento de afecciones gastrointestinales*. Guatemala: USAC. p.51.
- Cáceres, A. (1996). *Plantas de Uso Medicinal en Guatemala*. Guatemala, Guatemala. Editorial Universitaria.
- Cáceres, A. (2006). *Vademecum Nacional de Plantas Medicinales*. Guatemala, Guatemala: Ministerio de Educación.
- Cáceres, A., López, B. R., Girón, M. A., & Logemann, H. (1991a). Plants used in Guatemala for the treatment of dermatomucosal infections. 1: Screening of 38 plant extracts for anticandidal activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 33, 277-283.
- Cáceres, A., & Girón, L. (2002). Desarrollo de medicamentos fitoterápicos a partir de plantas medicinales en Guatemala. *Revista de Fitoterapia*. 2(1), 41-46.
- Cáceres, A., & Samayoa, B. (1990). Tamizaje de la actividad antibacteriana de plantas usadas en Guatemala para el tratamiento de afecciones gastrointestinales. Guatemala, Guatemala: DIGI, USAC.

- Cáceres, A., Alvarez, A. V., Ovando, A. E., & Samayoa, B. (1991b). Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases 1. Screening of 68 plants against Gram positive bacteria. *Journal of Ethnopharmacology*, *31*, 193-208.
- Cáceres, A., Cano, O., Samayoa, B., & Aguilar, L. (1990a). Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 1. Screening of 84 plants against enterobacteria. *Journal of ethnopharmacology*, *30*, 55-73.
- Cáceres, A., Girón, L. M., Alvarado, S. R., & Torres, M. F. (1987). Screening of antimicrobial activity of plants popularly used in Guatemala for the treatment of dermatomucosal diseases. *Journal of ethnopharmacology*, *20*, 223-237.
- Cáceres, A., López, B. R., Girón, M. A., & Logemann, H. (1991c). Plants used in Guatemala for for the treatment of dermatophytic infections. Screening for antimycotic activity of 44 plant extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, *31*, 263-279.
- Cáceres, A., Samayoa, B., & Fletes, L. (1990b). Actividad antibacteriana de plantas usadas en Guatemala para el tratamiento de infecciones. Cuadernos de investigación No. 4-90. Guatemala DIGI/USAC, p 41-42.
- Castro, O. (1986). Isoflavans and a stilbene from wood of decay-resistant tropical tree *Diphyssa robinoides*. *Journal of Natural Production*, *49*, 680-683.
- Ceron, C. E. (2006). Plantas medicinales de los Andes ecuatorianos. *Botánica Económica de los Andes Centrales*, *2006*, 285-293.
- Chang, P., & Ranero, J. L. (1994). Micetoma. *Revista de Medicina Interna*, *5*(1), 27-30.
- Cleaves, C. (2001). *Etnobotánica médica participativa en siete comunidades de la zona de influencia del parque nacional Laguna Lachuá, Cobán, Alta Verapaz, Guatemala*. Tesis de

graduación para optar al Título de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala, Guatemala.

Cooney, G. (1991). *Fungicidal activity of a Solanum plant extract from Guatemala*, C. A. *Abstracts*. Washington: Pharmacy World Congress.

Crombrinck, S., Regnier, T., & Kamatou, G. P. (2011). In vitro activity of eighteen essential oils and some major components against common postharvest fungal pathogens of fruit. *Industrial Crops and Products*, 33, 344-349.

Cruz, S. (2005). *Caracterización de aceites esenciales y evaluación de la actividad biocida de 5 especies nativas de Piperaceas*. Tesis de Especialización para optar al Título de MUPLAM, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala, Guatemala.

Cruz, S. (2008). Caracterización química y evaluación de la actividad biológica de *Bourreria huanita* (Llave & Lex.) Hemsl. (Esquisuchil) y *Litsea guatemalensis* Mez. (Laurel). Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

Da Rosa, A., Scroferneker, M., Vettorato, R., Gervini, R., Vettorato, G., & Weber, A., (2005). Epidemiology of Sporotrichosis: A study of 304 cases in Brazil. *Journal of American Academy of Dermatology*, 52(3), 451-459.

Dabral, P. K., & Sharma, A. B. (1983). Evaluation of the role of Rumalaya and Geriforte in chronic arthritis a preliminary study. *Probe*, 22(2), 120-127.

Dal Pozzo, M., Viégas, J., Flores, D., Rossatto, L., Soares, I.H., Hartz S., *et al.* (2011). Antimicrobial activities of essential oils extracted from spices against *Staphylococcus spp.* isolated from goat mastitis. *Ciencia Rural, Santa Maria*, 41(4), 667-672.

- Darzung, B.G. (2002) *Farmacología Básica y Clínica*. (6ta. Ed.) México D. F, México: Manual Moderno.
- Del Aguila, P. (1992). Estudio integral de la actividad antimicrobiana de *Cassia occidentalis* L. y *Cassia grandis*. Plantas usada popularmente en el tratamiento de afecciones cutáneas. Fondos de Infrormacion. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Quimicas y Farmacia.
- Del Cid, N. E. (2005). Actividad de diecisiete extractos de doce plantas nativas guatemaltecas contra *Fonsecae pedrosoi*. (Tesis de Licenciatura). Universidad San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- Dodiuk-Gad, R., Cohen, E., Ziv, M., Lee, H., Chazan, B., Shafer, J., *et al.* (2010). Cutaneous nocardiosis: report of two cases and review of the literature. *International Journal of Dermatology*, 49, 1380-1385.
- Dubos, R. (1998). *Bacterial and Mycotic of Microorganism*. (3ra.ed.). Washington D. C.: Lippincott Company.
- Duke, J., & Ottesen, A. (2008). *Duke's Handbook of Medical Plants of Latin America*. Washington D. C.: CRC Press.
- Estrada, E., Méndez, C., Salinas, A., & Villareal, J. (2004). Leguminosas del centro del estado de Nuevo León, México. *Anales del Instituto de Biología, Serie Botánica*, 75(1), 73-85.
- Estrada, G., Arenas, R., Vega, E., & Bonifaz, A. (2003). Cromoblastomicosis: un caso por *Fonsecaea pedrosoi* con filamentación in vivo y tratamiento combinado con itraconazol y criocirugía. *Dermatología Cosmética y Medicina Quirúrgica*, 1, 40-45.

- Feng, P. C., Haynes L. J., Magnus K. E., Plimer, J. R., & Sherratt, H. S. (1962). Pharmacological screening of some West Indians medicinal plants. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 14, 556-561.
- Fiallo, M., & Vasquez, M. (1992). Evaluacion in vitro de plantas usadas en afecciones de la piel: Extractos vegetales antimicóticos y antimicrobianos. Informe TRAMIL. CIBIMA, Facultad de Ciencias, Universidad Autonoma UASD, Santo Domingo, República Dominicana. TRAMIL VI, Basse Terre, Guadeloupe, UAG/enda-caribe.
- Figueroa, L. (1991). Acción antibacteriana de extractos de leguminosas usadas en el tratamiento de diarreas. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). 66p. Anaissi, E., McGinnis, M., & Pfaller, M. (2003). *Clinical Mycology*. USA: Churchill Livingstone, 608p.
- Fuzellier, M., Mortier, F., & Lectard, P. (1982). Antifungal activity of *Cassia alata*. *Annales Pharmaceutiques Francaises*, 40, 357
- Gaind, K. N. (1966). Antibiotic activity of *Cassia occidentalis*. *Indian Journal of Pharmacology*, 29(9), 248-250.
- Gaitan, I. C. (2005). Actividad de doce plantas nativas guatemaltecas contra *Sporothrix schenckii*. Guatemala: Universidad de San Carlos. Tesis de graduación para optar al Título de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala, Guatemala.
- Gaitán, I., Paz, A. M., Zacchino, S. A., Tamayo, G., Giménez, A., Pinzón, R., *et al.* (2011). Subcutaneous antifungal screening of Latin American plant extracts against *Sporothrix schenckii* and *Fonsecaea pedrosoi*. *Pharmaceutical Biology*, 49(9), 907-919.

- Games, P.D., Santos, I., Mello, E.O., Diz, M.S., Carvalho, A.O., Souza-Filho, G.A., *et al.* (2008). Isolation, characterization and cloning of a cDNA *encoding* a new antifungal defensin from *Phaseolus vulgaris* L. seeds. *Peptides*. 29, 2090-2100.
- Garía, A. M. (2009). Inhibición del hongo *Sporothrix schenckii* por especies de leguminosas popularmente usadas en Guatemala para el tratamiento de micosis. Tesis de graduación para optar al título de Química Biológica. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- García, J. A., & Picazo, J. J. (1999). *Microbiología médica*. (5 ed.). Madrid, España: Ediciones Harcourt, S.A.
- Gates, R. H. (2004). *Secretos de las enfermedades infecciosas*. Madrid, España: Elseviere Imprint.
- Gentry, J. L., & Standley, P. C. (1974). Flora of Guatemala. *Fieldiana: Botany*. 24(10), 104-131.
- Girón, L. M., Freire, V., Alonzo, A., & Cáceres, A. (1991). Ethnobotanical survey of the medicinal flora used by the Caribs of Guatemala. *Journal of Ethnopharmacology*.34, 173-187.
- Girón, L., Agilar, G. A., Cáceres, A., & Arroyo, G. L. (1988). Anticandidal activity of plants used for the treatment of vaginitis in Guatemala and clinical trial of a *Solanum nigrescens* preparation. *Journal of Etnopharmacology*, 22, 307-313.
- Gómez, A. L. (2008). Caracterización de extractos y aceites esenciales y evaluación de la actividad biológica de hojas de tres especies Piperáceas (*P. jacquimontianum*, *P. oradendron*, *P. umbellatum*). Tesis de graduación para optar al título de Química Farmaceutica. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.

- Guerrant, R., Walker, D., & Weller, P. (2002). *Enfermedades Infecciosas Tropicales*. Barcelona, España: Elsevier Science.
- Gupta, A. K., Taborda, P. R., & Sanzovo, A. D. (2002). Alternate web and combination itraconazole and terbinafine therapy for Chromoblastomycosis by *Fonsecaea pedrosoi* in Brazil. *Medical Mycology*, 40(5), 529-534.
- Gupta, M. P. (1995). *270 Plantas Medicinales Iberoamericanas*. Bogota, Colombia: Editorial Presencia.
- Gutierrez-Galhardo, M., Zancopé-Oliveira, R., Monzón, A., Rodríguez-Tudela, J., & Cuenca-Estella, M., (2009). Antifungal susceptibility profile in vitro of *Sporothrix schenckii* in two growth phases and by two methods: microdilution and E-test. *Mycoses*, 53, 227-231.
- Hazni, H., Ahmad, N., Hitotsuyanagi, Y., Takeya, K., & Choo, C. (2008). Phytochemical constituents from *Cassia alata* with inhibition against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Planta Medica*, 74, 1802.
- He, X., Mocek, U., Floss, H. G., Caceres, A., Girón, L., Buckley, H., et al. (1994). An antifungal compound from *Solanum nigrescens*. *Journal of Ethnopharmacology*, 43(3), 173-177.
- Hennebelle, T., Weniger, B., Joseph, H., Sahpaz, S., & Bailleul, F. (2009). *Senna alata*. *Fitoterapia*, 80, 385-393.
- Horowitz, E. (2009). Diseases caused by *Nocardia* Species. *Creighton University School of Medicine*, 1-7.
- House, P. R., & Lagos-Witte, S. (1995). *Plantas Medicinales comunes de Honduras*. Honduras, Tegucigalpa: Litografía Lopez.

- Ibrahim, D., & Osman, H. (1995). Antimicrobial activity of *Cassia alata* from Malaysia. *Journal of Ethnopharmacology*, 45, 151-156.
- Instituto Indigenista Nacional (1978). Aspectos de la medicina popular en el área rural de Guatemala. *Guatemala Indígena* 13, 1-16.
- Jain, S.C., Sharma, R.A., Jain, R., & Mittal, C. (1998). Antimicrobial Screening of *Cassia occidentalis* L. *in vivo* and *in vitro*. *Phytotherapy Research*. 12, 200-204.
- James, A. D. (1986). *Isthmian, Ethnobotanical Dictionary*. (3ra.ed.). Scientifica Publisher. India.
- Janssen, A. M., Scheffer, J. J., & Baerheim Svendsen, A. (1987). Antimicrobial activity of essential oils: a 1976-1986 literature review. Aspects of the test methods. *Planta Medica*, 53, 395-398.
- Jasso, D., Rodríguez, R., Hernández, F. D., Aguilar, C. N., Sáenz, A., & Villareal, J. A. (2011). In vitro antifungal activity of extracts of Mexican Chihuahuan Desert plants against postharvest fruit fungi. *Industrial Crops and Products*, 34, 960-966.
- Jawetz, E., Melnick, J., & Adelberg, E. (1982). *Review of Medical Microbiology*. Washington D. C.: Lange medical Publications.
- Jiu, J. (1966). A survey of some medicinal plants of Mexico for selected biological activities. *Lloydia*, 29(3), 250-259.
- Johann, S., Soldi, C., Lyon, J. P., Pizzolatti, M. G., & Resende, M. A. (2007). Antifungal Amyrin derivatives and in vitro inhibition of *Candida albicans* adhesion to human epithelial cells. *Letters in Applied Microbiology*, 45, 148-153.
- Kaufman, C. (1999). Sportrichosis. *Clinical Infectious Diseases*, 29, 231-237.

- Khan, M. R., Kihara, M., & Omoloso, A. D. (2001). Antimicrobial activity of *Cassia alata*. *Fitoterapia*, 72, 561-564.
- Ku, J. (2008). Actividad antimicrobiana de extractos de orégano (*Lippia graveolens*) contra microorganismos fitopatógenos. Tesis de graduación para optar al Título de Ingeniero Agrónomo, Universidad Autónoma de Queretaro, Queretaro, México.
- Lima, E.O.G., Paulo, M.Q., & Giesbrecht, A.M. (1992). In vitro antifungal activity of essential oils against clinical isolates of dermatophytes. *Revista de Microbiología*, 23, 235–238.
- Linares, E., Flores, B., & Bye, R. (1988). *Selección de Plantas Medicinales de México*. México D.F., México: Limusa.
- Logemann, H. K. (1995). *Manual Práctico de Micología Médica*. Guatemala: Bayer.
- Lopez, A., & Schiff, R. (1976) Isolation of astilbin and sitosterol from *Hymenaea courbaril*. *Phytochemistry*, 15, 2027F.
- López, M. B. (1992). Demostración de la actividad antimicrobiana de *Byrsonima crassifolia* y *Malpighi glabra*. Tesis de graduación para obtener el Título de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala, Guatemala.
- López, R., & Méndez, L. J. (2007). Chromoblastomycosis. *Clinics in Dermatology*, 25, 188-194.
- Lot, A., & Chieng, F. 1986. *Manual del Herbario*. México D. F., México: Consejo Nacional de la Flora de México.
- Lumbreras, C., Lizasoain, M., & Aguado, J. M. (2003). Antifúngicos de uso sistémico en Madrid. *Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica*, 21(7), 366-80.

- Macrae, W. D., Hudson, J.B., & Towers, G. H. (1988). Studies on the pharmacological activity of Amazonian Euphorbiaceae. *Journal of Ethnopharmacology*, 22, 143-172.
- Marchorro, S. P. (2007). Detección del actividad Inhibitoria de extractos etanólicos de seis plantas contra *Sporothrix schenckii* y *Fonsecae pedrosoi*. Tesis de graduación para optar al título de Química Biológica. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- Marimon, R., Gené, J., Cano, J., & Guarro, J. (2008). *Sporothrix luriei*: a rare fungus from clinical origin. *Medical Mycology*, 46, 621-625.
- Martín, G. J. (2004). *Ethnobotany*. Londres, Inglaterra. Chapman & Hall.
- Martínez, C. A., Carnot, J., De Castro, R., Muñio, J., & Torres, W. (1998). Tratamiento de las Micosis Profundas. *Acta Medica*, 8(1), 80-85.
- Martínez, M. (1969). *Las Plantas Medicinales de México* (5ta. ed.). México D. F., México: Botas.
- Martínez, M. (1992). *Las Plantas Medicinales de México*. México D. F., México: Editorial Botas.
- McNeil, M., & Brown, J. (1994). The Medically Important Aerobic Actinomycetes: Epidemiology and Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 7(3), 357-417.
- Medina, R., Salazar, S., & Gómez, J. R. (2004). Fruit quality indices in eight nance [*Byrsonima crassifolia* (L.) H. B. K.] selections. *HortScience*, 39(8), 1070-1073.
- Mehaffey, P. C., Putnam, S. D., Barrett, M. S., & Jones, R. N. (1996). Evaluation of in vitro spectra of activity of azithromycin, clarithromycin and erythromycin tested against strains of

- Neisseria gonorrhoeae* by reference agar dilution disk diffusion and E - test methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 4(2), 479-481.
- Mendieta, R. M., & del Amo, S. (1981). *Plantas medicinales del Estado de Yucatán*. Xalapa, México: INIREB.
- Mishra, S., Gordon, R., & Barnett, D. (1980). Identification of Nocardiae and Streptomycetes of Medical Importance. *Journal of Clinical Microbiology*, 11(6), 728-736.
- Mitscher, L.A., Leu, R.P., Bathala, M.S., Wu, W.N., Beal, J.L., & White, R. (1972) Antimicrobial agents from higher plants.I: Introduction, rationale and methodology. *Lloydia*. 35,157-166.
- Morales, J. E. (2011). Detección de la actividad inhibitoria de quince extractos de plantas con actividad antibiótica *Sporothrix schenckii* contra *Nocardia brasiliensis*.(Tesis de Licenciatura). Universidad San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- Morris-Jones, R. (2002). Sporotrichosis. *Clinical and Experimental Dermatology* 27, 427-431.
- Morton, J. F. (1981). *Atlas of Medicinal Plants of Middle America*. Springfield: Thomas.
- Morton, J.F. (1981). *Atlas of Medicinal Plants of Middle America, Bahamas and Yucatán*. Washington D. C.: Charles Thomas.
- Moulari, B., Pellequer, Y., Lboutounne, H., Girard, C., Chaumont, J. P., Millet, J., & Muyard, F. (2006). Isolation and in vitro antibacterial activity of astilbin, the bioactive flavanone from the leaves of *Harunganamada gascariensis* Lam. ex Poir. (*Hypericaceae*). *Journal of Ethnopharmacology*, 106, 272–278.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2006). *Microbiología Médica*. (5ta. ed.). Madrid, España: Elsevier Inc.

- Nash, D. L., & Williams, L. O. (1976). Flora of Guatemala. *Fieldiana Botany*, 24(12), 603.
- Nava, K. G., & Useanga, G. K. (1980). *Estudio Físico y Químico Comparativo de 28 Tipos de Byrsonima crassifolia en el Estado de Veracruz*. México D. F., México: CONAFRUT-SARH.
- Ogunkunle, A. T. J., & Ladejobi, T. A. (2006). Ethnobotanical and phytochemical studies on some species of *Senna* in Nigeria. *African Journal of Biotechnology*, 5, 2020-2023.
- Oladunmoyem, M. K., Akinyosoye, F. A., & Adetuyi, F. C. (2006). Release of sodium and potassium ions by aqueous and ethanolic extract of *Cassia occidentals* on some selected bacteria. *Trends in Applied Sciences Research*, 6(2), 33-35.
- Onishi, M., Thompson, M., Curotto, J., Dreikorn, S., Rosenbach, M., Douglas, C., Abruzzo, G., Flattery, A., *et al.* (2000). Discovery of novel antifungal (1,3)-beta-d-glucan synthase inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44, 368–377.
- Orellana, A., Guerra, R., Cruz, S., & Cáceres, A. (2004). Evaluación agronómica e industrial, producción de semilla y promoción del cultivo de plantas medicinales y aromáticas nativas con potencial de mercado. Informe final AGROCYT 032-2002. Guatemala.
- Orellana, S. (1987). *Indian Medicine in Highland Guatemala*. Washington D. C.: University of New Mexico Press.
- Ortíz, G. H. (2006). Actividad antifúngica de los extractos etanólicos de la flor de *Bourreria huanita* y la hoja de *Lippia graveolens* y sus particiones hexánica, clorofórmica, acetato de etilo y acuosa contra los hongos *Sporothrix schenckii* y *Fonsecaea pedrosoi*. (Tesis de Licenciatura). Universidad San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- Ortiz, J. (1992). 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 a Agosto 1992. Tesis de graduación para optar al Título de Médico y Cirujano, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala, Guatemala.

Padhye, A. A., Kaufman, L., Durry, E., Banerjee, C. K., Jindal, S. K., Talwar, P., & Chakrabarti, A. (1992). Fatal Pulmonary Sporotrichosis caused by *Sporothrix Schenckii* var. *luriei* in India. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(9), 2490-2494.

Palanichamy, S., Bhaskar, E. A., & Nagarajan, S. (1991). Antibacterial activity of *Cassia alata*. *Fitoterapia*, 62(3), 249-52.

Pang, K., Jashin J. W., Huang, D., & Tying, S. (2004). Subcutaneous fungal infections. *Dermatologic Therapy*, 17, 523-531.

Pascual, M.E., Slowing, K., Carretero, E., Sánchez-Mata, D., & Villar, E. (2001). *Lippia*: Traditional uses, Chemistry and Pharmacology: a Review. *Journal of Ethnopharmacology*, 76, 201-214.

Pérez, B., Villavicencio, M., & Ramírez, A. (2003). *Lista de Plantas Útiles del Estado de Hidalgo*. México D. F., México: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

Pomilio, A.B., & Mongelli, E. (2002). Etapas de Screening. *Ciencia Hoy*, 12: 68.

Pousset, J. L. (1989). *Plantes medicinales Africaines*. Paris, Francia: ACCT.

Pozzatti, P., Scheid, L.A., Spader, T., Linde, M., Santurio, J., & Hartz, S. (2008). In vitro activity of essential oils extracted from plants used as spices against fluconazole-resistant and fluconazole-susceptible *Candida* spp. *Journal of Microbiology*, 54, 950-956.

Ramos-e-Silva, M., Vasconcelos, C., Carniero, S., | Cestari, T. (2007). Sporotrichosis. *Clinics in Dermatology*, 25(2), 181-187.

- Restrepo, A., Robledo, J., Leiderman, E., Restrepo, M., Botero, D., & Bedoya, V. (2003). *Enfermedades Infecciosas*. (6ta.ed.) Bogotá, Colombia: Fondo Editorial de la Corporación para Investigaciones Biológicas.
- Rex, J. H., Alexander, B. D., Andes, D., Arthington-Skaags, B., Brown, S. D., Chaturveli, B., *et al.* (2000). Reference Method for Broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(9), 3359–3361.
- Rippon, J. W. (1990). *Micología Médica: Hongos y Actinomicetos Patógenos*. (3 ed.). México: Interamericana, McGraw Hill, S. A.
- Rodríguez, M.L., Fernández, M.B., & Zaragoza, F. (1998). Principios activos de origen natural: flavonoides. *Industria Farmacéutica*. 13(5), 87-92.
- Rojas, R., Bustamante, B., Bauer, J., Fernández, I., Albán, J., & Lock, O. (2003). Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 88(2-3), 199-204
- Rojas, U. (1925). *Elementos de Botánica General*. Guatemala, Guatemala: Tipografía Nacional.
- Sadique, J., Chandra, T., Thenmozhi, V., & Elango, V. (1987). Biochemical modes of action of *Cassia occidentalis* and *Cardiospermum halicacabum* in inflammation. *Journal of Ethnopharmacology*, 19(2), 201-212.
- Salgueiro, L. R., Cavaleiro, C., Goncalves, M. J., & Proenca de Cunha, A. (2003), Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oil of *Lippia graveolens* from Guatemala, *Planta Medica*, 69(1), 80-3.
- Saubolle, M. A., & Sussland, D. (2003). Nocardiosis: Review of Clinical and Laboratory Experience. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(10), 4497-4501.

- Sean, C., & Sweetman, E. D. (2011). *Martindale: The Complete Drug Reference* (37 ed.). Londres, Inglaterra: Pharmaceutical Press.
- Serrano, J. A., & Sandoval, A. A. (2003). El Micetoma. Revision. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 23(1), 70-79
- Serrano, J. A., Sandoval, H. A., & Beaman, B. L. (2007). *Actinomicetoma*. Mérida, Venezuela: Plaza y Valdés Editores.
- Shizahi, H., Kawasaki, M., Aoki, M., Matsumoto, T., Padhye, A. A., Mendoza, M., & Negroni, R. (1998). Mitochondrial DNA analysis of *Sporothrix Schenckii* in North and South America. *Mycopathologia*, 142, 115-118.
- Smith, C. M., & Reynard, A. M. (1995). *Farmacología*. Buenos Aires, Argentina: Médico Panamericano.
- Somchit, M. N., Reezal, I., Elysha, I., & Mutalib, A. R. (2003). *In vitro* antimicrobial activity of ethanol and water extracts of *Cassia alata*. *Journal of Ethnopharmacology*, 84, 1-4.
- Soriano, E., & Rojas, M. (2006) El uso del frijol común (*Phaseolus vulgaris L.*) como planta medicinal. *Tlahui-Medic*, 21, 34-54.
- Speller, D. C. E. (1980). *Antifungal Chemotherapy*. Philadelphia: Wiley Interscience.
- Stanley, P., & Steyermark, J. A. (1946). Flora of Guatemala. *Fieldiana Botany*, 24(5),116-122, 141-142, 245-246, 327-335, 362.
- Stevens, W. D., Ulloa, C., Pool, A., & Montiel, O. M. (2001). Flora de Nicaragua. *Monographs in Systematic Botany from Missouri Botanical Garden*, 85(1): 1-943.

- Suárez, A. B. (2008). Evaluación de actividad contra *Fonsecaea pedrosoi* de siete especies leguminosas popularmente usadas en Guatemala para el tratamiento de infecciones mucocutáneas. Tesis de graduación para optar al título de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala, Guatemala.
- Subbarayo, V. V., & Gupta, M. L. (1978). Changes in serum transaminases due to hepatotoxicity and the role of an indigenous hepatotonic liver. *Yugoslav Physiologic Pharmacology Acta*, 17(2), 175-178.
- Svetaz, L., Zuljan, F., Derita, M., Petenatti, E., Tamayo, G., Cáceres, A., *et al.* (2010). Value of the ethnomedical information for the discovery of plants with antifungal properties. A survey among seven Latin American countries. *Journal of Ethnopharmacology*, 127, 137-158.
- Tambini, R., Farina, C., Fiocchi, R., Dupont, B., Guého, E., Delvecchio, G., *et al.* (1996). Possible pathogenic role of *Sporothrix cyanescens* isolated from a long lesion in a heart transplant patient. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 34(3), 195-198.
- Teixidor, J. R., & Masso, J. G. (1998). *Medicina Interna*. Barcelona, España: Masson.
- Torres, E., Vásquez, M. E., Moreno, G., & Arenas, R. (2008). Micetomas actinomicéticos. Resultados terapéuticos en 15 casos. *Dermatología Revista Mexicana*, 52(2), 65-69.
- Torres-Mendoza, B.M., Vázquez-Valls, E., & Gonzalez-Mendoza, A. (1997). Efecto del yoduro de potasio sobre la respuesta inmune en la esporotricosis. *Revista Iberoamericana de Micología*, 14, 98-100.
- Vanaclocha, B., & Caniguera, S. (1998). *Vademécum de prescripción de plantas medicinales; fitoterapia*. (3 ed.). Barcelona, España: Masson S. A.

- Véliz, R., Cruz, S., Gómez, A., García, V., Álvarez, L., Cáceres, A., *et al.* (2006). *Caracterización de Aceites Esenciales y extractos de ocho especies Mesoamericanas de Piperaceas y evaluación de la actividad biocida para su aprovechamiento como nuevos recursos aromáticos y/o medicinales*. Guatemala, Guatemala: DIGI, USAC.
- Verpoorter, P., & Dihal, P. (1987). Medicinal plants of Surinam IV. Antimicrobial activity of some medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 21(3), 315-318.
- Villagrán, G. E. (1991). Micosis más frecuentes en el Hospital Nacional de Cuilapa. Tesis de Graduación para optar al título de Médico y Cirujano, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala, Guatemala.
- Villamar, A. A., Cano, L. M., Rodarte, M. E., & Gallardo, M. C. (1994). *Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana*. México D.F., México: Instituto Nacional Indigenista.
- Welsh, O., Vera-Cabrera, L., & Salinas-Carmona, M. (2007). Mycetoma. *Clinics in dermatology*, 25, 195-202.
- Wong, J.H., & Bun, T. (2005). Vulgarinin, a broad-spectrum antifungal peptide from haricot beans (*Phaseolus vulgaris*). *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 37, 1626–1632.
- Wu, X., Sun, J., Zhang, G., Wang, H., & Bun, T., (2011). An antifungal defensin from *Phaseolus vulgaris* cv. 'Cloud Bean'. *Phytomedicine*. 18, 104-109.
- Yadav, J. P., Arya, V., Yadav, S., Panghal, M., Kumar, S., & Dhankhar, S. (2010). *Cassia occidentalis* L.: A review on its ethnobotany, phytochemical and pharmacological profile. *Fitoterapia*, 81, 223-230.
- Yegres, N., & Yegres, F. (2005). La endemia de cromomicosis en Venezuela: Una estrategia para su control. *VITAE Academia Biomédica Digital*. 24.

Zacchino, A., & Gupta, M. (2007). *Manual de Técnicas in vitro para la detección de compuestos antifúngicos*. Madrid, España: Editorial y Distribuidora Corpus.

Zacchino, S., & Gupta, M. (2007). *Manual de técnicas in vitro para la detección de compuestos antifúngicos*. Rosario, Argentina: Corpus Editorial y Distribuidora.

Zhang, Y., Xu, X., Zhang, M., Jiang, P., Zhou, X., Li, Z., & Zhang, M. F. (2011). Sporotrichosis: Clinical and Histopathological manifestations. *The American Journal of Dermatopathology*, 33(3), 296-302.

XIII. ANEXOS

Anexo 1

Resultados de la CIM (mg/ml) de plantas nativas parcialmente estudiadas con anterioridad en Guatemala y seleccionadas para completar su información en este Seminario

	Parte	Extracto	A	B	C	D	E
<i>Lippia graveolens</i> HBK	Hoja	Etanólico	>1- 0.125 ⁵	0.1 ^{1,2}	0.25 ^{2,4}		
<i>Senna alata</i> L.	Hoja	Etanólico		>1 ¹	>1 ⁴		
<i>Bourreria huanita</i> (Lex.) Hemsl	Flores	Etanólico	>1 ⁵	>1 ²	>1 ²		
<i>Diphysa robinoides</i>	Hoja	Etanólico		>1 ³	1 ⁷		
<i>Hymenaea courbaril</i>	Hoja	Etanólico		1 ³	0.5 ⁷		
<i>Senna occidentalis</i>	Hoja	Etanólico		1 ³			
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Hoja	Etanólico		1 ³			
<i>Solanum nigrescens</i>	Hoja	Etanólico	>1 ⁵				
<i>Piper jacquemontianum</i>	Hoja	Metanol	1 ⁵				
<i>Byrsonima crassifolia</i>	Corteza	Etanólico	>1 ⁵	>1 ⁶	>1 ⁶		

A: *Nocardia brasiliensis*; B: *Fonsecaea pedrosoi*; C: *Sporothrix schenckii*; D: *Madurella grisea*; E: *Pyrenochaeta romeroi*

Fuente:

¹ Del Cid NE. Actividad de diecisiete extractos de doce plantas nativas guatemaltecas contra *Fonsecaea pedrosoi*. 2005. USAC. Pp 42.

² Ortíz GH. Actividad antifúngica de los extractos etanólicos de la flor de *Bourreria huanita* y la hoja de *Lippia graveolens* y sus particiones hexánica, clorofórmica, acetato de etilo y acuosa contra los hongos *Sporothrix schenckii* y *Fonsecaea pedrosoi*. 2006. USAC; pp 52-53

³ Suárez AB. Evaluación de la actividad contra *Fonsecaea pedrosoi* de siete especies leguminosas popularmente usadas en Guatemala para el tratamiento de infecciones mucocutáneas. 2008. USAC; pp 30-31.

⁴ Gaitán IC Actividad de doce plantas naticas guatemaltecas contra *Sporothrix schenckii*. 2005 USAC; pp 44-47.

⁵ Morales JE. Detección de la actividad inhibitoria de quince extractos de plantas con actividad antibiótica *Sporothrix schenckii* contra *Nocardia brasiliensis*. 2011. USAC.

⁶ Marchorro SP. Detección de la actividad Inhibitoria de extractos etanólicos de sie plantas contra y *Fonsecaea pedrosoi*.

⁷ García AM. Inhibición del hongo *Sporothrix schenckii* por especies de leguminosas popularmente usadas en Guatemala para el tratamiento de micosis. 2009. USAC. pp34.