


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 of a man on horseback, holding a staff. Above him is a crown. To the left and right are two pillars with the words 'PLUS' and 'ULTRA' respectively. The outer ring of the seal contains the Latin text 'LETTERAS OPTIS CONSPICUA CAROLINA ACADEMIA COACATEMALIENSIS INTER'.

**Actividad antifúngica del extractos etanólico de hoja y rizoma de
Valeriana prionophylla, colectadas en dos regiones de Guatemala**

José Daniel García Chután
QUÍMICO BIÓLOGO

Guatemala, octubre 2013

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

**Actividad antifúngica del extractos etanólico de hoja y rizoma de
Valeriana prionophylla, colectadas en dos regiones de Guatemala**

INFORME DE TESIS

Presentado por

José Daniel García Chután

Para optar el título de

QUÍMICO BIÓLOGO

Guatemala, octubre 2013

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. Rodrigo José Vargas Rosales	Vocal III
Br. Fayver Manuel de León Mayorga	Vocal IV
Br. Maily Graciela Córdova Audón	Vocal V

DEDICATORIA

A DIOS por su bendición y oportunidad de llegar a este logro, me encontraste, me atraíste a ti, me diste un propósito, ME DISTE DE NUEVO LA VIDA. A Ti primeramente dedico este triunfo. *Honor y Gloria solo a Ti Señor.*

A mis padres, Juan Ramón y Elsa Aurora gracias. Sin ustedes no hubiese logrado esto. A su esfuerzo y dedicación sea dedicado este logro. *Los amo viejitos, lo logre.*

A mi esposa e hijo, Mayra y Ángel. Gracias mi amor, por tu apoyo y ánimo. Tú me empujaste a lograr esto. *A ti con ETERNO AMOR.* Angelito a ti, *“todo lo puedes lograr mi hijo, todo”*

A mis hermanos, Patty y Manolo. Mis amigos de toda la vida. *Los amo, gracias.*

A mis amigos, Eswin, Henry, Cinthya, Rolando, Jonathan. Gracias por esos hermosos años de estudios, son *testigos de lo sufrido que ha sido.*

A mi asesor Lic. Armando Cáceres, gracias por su paciencia, su dedicación, sus enseñanzas, pero por sobre todo... su paciencia.

A mi querida Universidad de San Carlos de Guatemala, por brindarme años de enseñanza, *Id y enseñad a todos.*

INDICE

Resumen	1
Introducción	3
Antecedentes	5
A. Fitoterapia	5
B. Valeriana	5
1. Valeriana en Guatemala	5
2. <i>Valeriana prionophylla</i> Stadl.	6
3. Descripción botánica	6
4. Hábitat	7
5. Usos medicinales	8
6. Forma de obtención agrícola	8
7. Composición química	9
8. Farmacología experimental y clínica	10
C. Micosis	13
1. Micosis superficiales	13
2. Micosis sistémicas	16
3. Micosis oportunistas	16
4. Tratamiento general	20
Justificación	23
Objetivos	25
Hipótesis	26
Materiales y métodos	27
D. Universo	27
E. Muestra	27

F. Materiales	27
G. Métodos	29
1.Obtención de extractos	29
2.Obtención de cepas	29
3.Evaluación de la actividad antifúngica	29
4.Evaluación de la actividad antifúngica contra hongos levaduriformes	31
5.Determinación de la concentración inhibitoria Mínima (CIM) de los resultados positivos	32
6.Diseño estadístico	32
Resultados	34
Discusión de resultados	36
Conclusiones	38
Recomendaciones	39
Anexos	40
Referencias	41

I. RESUMEN

Las micosis son afecciones de curso subagudo o crónico que involucran el tejido cutáneo o subcutáneo. Los hongos endógenos se encuentran en las mucosas o tegumentos en individuos sanos y solo en estados especiales del huésped.

Los tratamientos de elección comúnmente usados contra estas infecciones son el yoduro de potasio y la anfotericina B, el primero para esporotricosis cutánea y linfocutánea, y el segundo en los casos de diseminación a órganos internos. Aunque se ha reportado la efectividad de ambos medicamentos, su uso prolongado produce efectos secundarios severos, algunos de los cuales son irreversibles en el paciente.

Valerina prionophylla es una especie utilizada popularmente por su propiedad como sedante, así como en compresas para curar contusiones, heridas, llagas y raspones, y actualmente también como antimicrobiano.

En la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, de la Universidad de San Carlos de Guatemala se han realizado varios estudios sobre la actividad de *V. prionophylla* como antimicótico, sin embargo se hace necesario profundizar en la capacidad de *V. prionophylla* como agente antimicótico.

Para este estudio se utilizaron tres muestras provenientes de tres distintos lugares del país, una de cada area; las plantas ensayadas fueron *V. prionophylla* (hoja y raíz) cultivadas en Ixchiguan, San Marcos; *V. prionophylla* (hoja y rizoma) cultivada en Nebaj, Quiche; *V. prionophylla* (hoja y rizoma, tallo subterráneo) cultivada en Concepción Tutuapa, Totonicapan. Se ensayó finalmente un total de 6 extractos etanólicos.

Estos extractos se obtuvieron moliendo la parte a utilizar de la planta, la cual se pesó y se colocó en el percolador con alcohol al 90%; la solución que se obtuvo del percolador pasó el rotavapor para desecarla y obtener el rendimiento del extracto.

El tamizaje antifúngico se realizó utilizando Agar planta (agar Sabraud + extracto de la planta, utilizando los seis extractos anteriormente obtenidos).

El tamizaje antifúngico mostro que los extractos de *V. prionophylla* a una concentración de 1mg/ml no presenta actividad contra los hongos evaluados, considerando como punto de corte una concentración de 1mg/ml, tanto los hongos de fase micelias como los de fase levaduriforme no fueron susceptibles a los extractos ($p > 0.50$).

II. INTRODUCCIÓN

Las micosis son infecciones causadas por hongos microscópicos, según su localización pueden ser: superficiales (cutáneas y mucosas) que son usualmente limitadas a tejidos de la piel, pelo y uñas, no invadiendo tejidos vivos y que son producidas por hongos dermatofitos; subcutáneas de tipo inflamatorio crónico, por lo general, se adquieren del ambiente y el hongo penetra por un traumatismo afectando piel, tejido celular, a menudo huesos y en ocasiones viseras y por oportunistas las cuales son infecciones por hongos que viven normalmente como saprobios en el ambiente o cavidades naturales de seres humanos, se convierten en patógenas en pacientes inmunodeficientes (Arenas, 2008).

Las plantas han formado la base de los sistemas tradicionales de medicina, los cuales han existido por cientos de años. Estos sistemas continúan desarrollando actualmente un papel esencial en la salud, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que aproximadamente el 80% de los habitantes a nivel mundial han utilizado la medicina tradicional en sus cuidados de salud (Laza, Rodríguez & Cabrera, 2003).

La producción, procesamiento y comercialización de fitoterapéuticos constituye una opción con gran potencial de desarrollo en América Latina, donde se concentra la mayor diversidad vegetal del planeta. Se estima que aproximadamente unas 10,000 especies contienen principios activos con fines terapéuticos (Piedrasanta, 2007). El género *Valeriana* lo constituyen cerca de 200 especies de las cuales 12 se han descrito en Guatemala. (Standley & Steyermark, 1977)

La mayor aplicación de la valeriana es como sedante, especialmente como un potente sustituto de sedantes sintéticos fuertes, los cuales pueden causar una severa dependencia (Cáceres, 1993).

En la Universidad de San Carlos de Guatemala se han realizado estudios que han determinado actividad fungicida de varios extractos etanólicos, provenientes de una gran

variedad de plantas, en uno de estos estudios realizados por Gaitán en el 2005 en la Facultad de ciencias Químicas y Farmacia, se determinó la actividad antifúngica de 17 extractos de 12 plantas nativas guatemaltecas contra *Sporothrix schenckii* tanto en su fase miceliar como levaduriforme; obteniéndose que 3 de los 12 extractos utilizados, incluido *Valeriana prionophylla* (raíz), presentaban actividad positiva contra cualquiera de las dos fases.

El objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad de extractos etanólicos de hoja y raíz de *V. prionophylla* de distintas procedencias (San Marcos y Quiché) contra agentes causales de micosis superficiales (*Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Micosporum gypseum*), micosis oportunistas (*Candida albicans*, *Candida tropicales*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*). La evaluación se realizó enfrentando los hongos causantes de la micosis con los extractos de las plantas donde se determinó su eficacia para inhibir el crecimiento del hongo, tanto los de fase levaduriforme como los de fase miceliar.

III. ANTECEDENTES

A. FITOTERAPIA

La Fitoterapia (*phytos* = vegetal) es el tratamiento de enfermedades con plantas medicinales. La parte activa de la planta medicinal está formada por numerosos componentes y su acción farmacológica la mayoría de las veces es superior a la que se obtiene con los principios activos aislados, es decir sus componentes actúan sinérgicamente. Estos principios activos han sido estudiados y extraídos por diferentes métodos (Houghton, 1997).

La fitoterapia está enraizada en la tradición médica como un complemento para el tratamiento y prevención de enfermedades, incluso en unos casos con validación científica.

Las investigaciones y pruebas clínicas dan soporte a este uso fitofarmacéutico y aunque el uso de extractos trae consigo un leve espectro de efectos no deseados, como lo puede ser fiebre, este solo se ha informado en algunos casos. Por sobre eso se ha encontrado que el uso fitofarmacéutico tiene como objetivo sustituir el tratamiento a largo término en enfermedades crónicas, así como el seguimiento en tratamiento y en profilaxis contra infecciones, enfermedades metabólicas y degenerativas (Cravotto, 2010).

B. VALERIANA

1. Valeriana en Guatemala

En la familia Valerianaceae se han descrito alrededor de 11 géneros, con más de 300 especies que crecen principalmente en climas templados y regiones tropicales; en los trópicos americanos, sobre todo en las altas montañas.

De esta familia solo un género se ha descrito en Guatemala, *Valeriana*, se trata de un genero con quizás 200 especies, que se encuentra en todos los continentes, excepto en Australia. De este género 12 especies se han descrito en Guatemala y al menos 6 se usan medicinalmente en la región: *Valeriana ceratophylla* HBK, *V. dondollana* Cardn., *V. edulis* Nutt, *V. paniculada* Ruis & Pavon, *V. scorpioides* DC, *V. sorbifolia* HBK (Cáceres, 2006).

Es conocida con el nombre común de pericón de monte en la flora de Guatemala. Es propia de bosques de pinos, húmedos, abiertos o prados húmedos alpinos o bien de hendiduras de acantilados rocosos. Crece en Chimaltenango, Guatemala, Huehuetenango, Quetzaltenango, Sacatepéquez, San Marcos, Sololá y Totonicapan. También crece en México y Costa Rica (Standley & Steyermark, 1977).

V. prionophylla es la mas común y de mayor comercialización en el mercado, pero existen otras especies de plantas que no pertenecen a esta familia que también se conocen en Guatemala como valerianas, entre ellas *Perezia nudicaulis* Gray. (Asteraceae), *Vetiveria zizanioides* L. (Poaceae) y *Chaptalia nutans* (L.) Polak (Astereaceae). Su contenido de valepotriatos y su actividad antimicrobiana fueron evaluados recientemente (Cruz, Cruz & Cáceres, 2005).

2. *Valeriana prionophylla* Standl.

- a) Familia: Valerianaceae
- b) Nombre científico: *Valeriana prionophylla*.
- c) Nombre Común: Valeriana
- d) Otros nombres populares: Raíz de gato, raíz de oso, mazaanes, ucuares (Cáceres, 1996).

3. Descripción botánica

- a) Raíz: principal larga, a menudo ramificada; tallo de 10-80 cm de largo y 1-2 cm de grueso, dispersamente piloso o casi glabroso con los nodos pilosos productor de estolones subterráneos de los que salen múltiples raíces.

- b) Tallo: hueco, acanalado, 70-170 cm de alto.
- c) Hojas: predominantemente basales, usualmente numerosas y de aspecto algo cespitoso; los bordes no divididos, oblongolineares a espatulados, principalmente de 3-30 cm de largo y de 0.5-3 cm de ancho, obtusas, atenuadas en la base subpeciolar, los márgenes son, cerrado-dentados, undulado-dentados, crenados o raramente enteros, usualmente ciliados, glabrosos a pilosos; hojas caulinares, en pares de 2 o 3, principalmente de 2-20 cm de largo, usualmente sésiles, algunas veces corto-pecioladas (Standley & Steyermark, 1977).
- d) Flores: se disponen en corimbos o panículas terminales y son, usualmente, pequeñas y numerosas.
- e) Cáliz: se encuentra por debajo del ovario y forma un pequeño, a veces dentado, borde que es poco notable en el momento de la floración de 9-12 segmentos (Cáceres, 1996).
- f) Corola: es usualmente monopétala, tubular en la base, con cinco lóbulos extendidos. Siempre hay menos estambres que lóbulos en la corola 1.5-3 mm de largo, blanco, rosado o violeta pálido.
- g) Estambres: dirigidos hacia afuera, las anteras apareciendo 4 lobadas, la teca sulcada, el estilo dirigido hacia afuera, aquenios de 2-3 cm de largo, lisos o transversalmente rugosos.
- h) Fruto: es pequeño, seco y de aspecto de semilla, con una única semilla suspendida del extremo.

Muchas especies de *Valeriana* han sido usadas para medicina, las especies salvajes incluso son consideradas más fuertes que las variedades de jardín. La especie más común para propósitos medicinales es *Valeriana officinalis* L. (Letchamo, 2004).

4. Hábitat

Nativa de Europa y Asia septentrional, naturalizada en el noreste de América, se encuentra en lugares húmedos y umbrosos, crece silvestre o cultivada en clima templado o de montaña, en bosques hasta de 2,100 msnm (Letchamo, 2004).

5. Usos medicinales

La infusión y tritura de raíz se usan para tratar afecciones nerviosas (agotamiento, baile de San Vito, convulsiones, epilepsia, histeria, insomnio, mareos, nerviosismo, neurastenia), catarro, fiebre, resfrío, reumatismo, infección renal, problemas cardíacos y afecciones digestivas.

La decocción de raíz se aplica tópicamente en cataplasmas o compresas para cura contusiones, heridas, llagas y raspones, así como para resolver tumores o enfermedades de los ojos, administrada como enema se utiliza para tratar afecciones intestinales.

Se le atribuye propiedad antibacteriana, anodino, anticaspa, carminativa, depurativa, diurética, espasmolítica, estomáquica, expectorante, hepatoprotectora, hipnótica hipotensora, sedante, sudorífica, tónica, tranquilizante y vulneraria (Cáceres, 1993).

6. Forma de obtención agrícola

El género *Valeriana* es muy común en la mayor parte del mundo, muy cultivada través de Europa, India, América, Japón y México, pero más intensamente en Inglaterra, Bélgica, Holanda, Rusia y Alemania. El material que se usa medicinalmente en Mesoamérica es importado de Estados Unidos o Europa o bien proviene de miembros del género *Valeriana* y que se asume tienen composición parecida y efectos farmacológicos similares; el género *Valeriana* tiene cerca de 200 especies, 12 se han descrito en Guatemala (Standley & Steyemark, 1997).

Adaptable a varios tipos de suelo, prefiere lugares frescos y húmedos (600-700 mm/año). Se propaga por semilla (1,000 semillas pesan 0.46 g) o división de pies. La semilla tiene poder germinativo de 65% a 20°C durante 16-20 días en oscuridad; para pies madres se usan los de más de un año, pueden dar de 10 a 20 plantas cada uno. Se trasplantan a 60-80 cm entre surcos 30-40 cm entre planta, requieren mucho cuidado y

humedad, fertilizar orgánica y químicamente. Adicionar nitrógeno es importante para su cultivo, los fertilizantes que contienen nitrógeno, fósforo y potasio pueden incrementar significativamente el peso de la raíz. Las principales enfermedades de la planta son producidas por Septorios y Oidium. La plana se corta a los dos años, se extraen los rizomas en otoño, lava y seca inmediatamente pero lentamente (40-50°C). Se espera rendimiento de 12-18 ton/ha de raíces frescas, la pérdida de peso al secarlas es de 65% (Cáceres, 2006).

7. Composición química

a) Terpenoides: aceites volátiles derivados de la vía del mevalonato y consisten en unidades de 5 carbonos con múltiples ramificaciones, consisten en una mezcla de monoterpenos y sesquiterpenos. Los monoterpenoides incluyen principalmente al borneol y sus ésteres isovaléricos y acetílicos. Los sesquiterpenos pueden constituir casi la totalidad de los aceites volátiles. Todos los derivados sesquiterpenos tienen cierta actividad sedante. Dentro de los sesquiterpenos del aceite esencial merece especial mención el ácido valérico y otros varios compuestos con la misma estructura básica de este.

b) Valepotriatos: terpenoides no volátiles son posibles responsables de la actividad sedante de la planta (dada la frecuente observación de la discrepancia entre la cantidad de aceites volátiles presentes en un extracto y su efecto sedante).

c) Alcaloides: son compuestos nitrogenados y aminoácidos presentes en pequeñas cantidades en *Valeriana*.

d) Fenilpropanoides: Constituyen importantes metabolitos secundarios de las plantas con flores. En *Valeriana*, se habían encontrado 4 clases de fenilpropanoides como constituyentes relativamente menores y, hasta hace algunos años, no se había demostrado que jugaran un papel significativo en alguno de los efectos farmacológicos de extracto. Los fenilpropanoides son constituyentes del aceite esencial, lignanos, flavonoides y compuestos relacionados (Rojas, 2003).

Los estudios más extensos sobre el género *Valeriana* se han realizado en base a *V. officinalis* donde encontramos que su raíz contiene aceite esencial de composición bastante compleja (0.3-1%), contiene acetato de bornilo, β -cariofileno, α - y β -pineno, valeranona, valeranal, β -ionona, isovalato de eugenil, isbalerato de isoeugenilo, alcohol pachouli, valerianol, borneol, camfeno, β -bisaboleno, leedlo, ácido isovalérico, terpinoleno, alcaloides (actidina, valerianita, valerina, catinina), iridoles (valepotriatos, didovaltratos, isovaltratos), colina (3%), metil 2-pirrolil cetona, ácido caféico y clorogénico, β -sitosterol, taninos y gomas. El aceite de corteza de raíz contiene ácidos orgánicos (acético, fórmico, valérico), alcaloides (cainina, valerianita), borneol, formato de bornilo, camfeno, pineno. Las flores contienen proteína (19%) y grasa (30-34%).

En peso seco contiene un total de aminoácidos libres de 33.2mmol/kg, constituido por ácido γ -aminobutírico (3.6 mmol/kg), arginina (15.5 mmol.kg), glicina (5.7 mmol/kg), alanina (2.0mmol.kg), asparagina (1.4 mmol/kg) y triptófano (0.4 mmol/kg) (Cáceres, 2006).

La composición de *V. prionophylla* se supone equivalente o al menos similar a la de *V. officinalis*, aunque no se tienen datos publicados al respecto (Holzmann, Cechinel Filho, Mora, Cáceres, Martínez, Cruz, *et al*, 2011).

Se ha realizado una comparación química y de rendimiento del aceite esencial de hoja y raíz de *V. prionophylla* procedente de Totonicapán y San Marcos, donde determinó que el aceite esencial obtenido de hoja y raíz procedente de Totonicapán presenta mayor cantidad de principios activos con 63.3% de ácido valérico, comparado con el procedente de San Marcos el cual presentó 20.2% de ácido valérico (Piedrasanta, 2007).

8. Farmacología experimental y clínica

Las diferentes especies de *Valeriana* y sus extractos primariamente se usan como ansiolíticos e inductores del sueño. Se han hecho estudios electrofisiológicos, de unión a

receptor y otros, para demostrar esta actividad. Se ha demostrado que el extracto acuoso de *V. officinalis* disminuye la recaptación del ácido gamma amino butírico, esta actividad se atribuye tanto a los valepotriatos como a los componentes del aceite esencial (Fernandez, Wasowski, Paladini & Marder, 2006).

Estudios farmacológicos con la infusión de raíz demuestran que tiene actividad hemostática, ya que aumenta la velocidad de coagulación en experimentos agudos y crónicos, pero es inactiva en un modelo como hipotensiva por vía intravenosa en perros. (Cerruti, 2000) En el íleon y estómago de caballo se demuestra potente actividad espasmolítica. El extracto acuoso administrado por incubación gástrica a ratones no produjo efecto hipoglucémico (Cáceres, 2004).

Estudios antimicrobianos demuestran que la tintura de raíz es inactiva contra *S. enteritidis*, *S. typhi*, *S. dysenteriae*, *S. flexneri*; el extracto alcohólico es activo contra *M. tuberculosis* H37R. El extracto alcohólico de flores es activo contra *Fusarium oxysporum*, pero es inactivo contra *A. fumigatus*, *A. niger*, *Botrytis cinerea*, *C. albicans*, *Penicillium digitatum*, *Sacharomyces pastorianus*, *Thyrophus nigricans*, *T. mentagrophytes*.

Más recientemente se han descrito una serie de flavonoides que pudieran tener una participación en la actividad farmacológica de Valeriana, se presume que presentan actividad depresora sobre el sistema nervioso central (SNC) (Marder, Viola, Wasowski, Fernández, Medina & Paladini, 2003).

La información sobre *V. prionophylla* es escasa y se refiere únicamente a material colectado en Guatemala, donde sobresalen los siguientes estudios:

Se han publicado hallazgos acerca la presencia de ciertos lignanos con actividad antioxidante y relajante vascular en *V. prionophylla* de Guatemala (Piccinelli, Arana, Cáceres, di VillaBlanca, Sorrentino & Rastrelli, 2004).

En 2005, Cruz E. publicó un ensayo clínico en el que evaluó la efectividad de *V. prionophylla* como inductora del sueño. Entre sus conclusiones indica que *V. prionophylla* disminuyó significativamente la latencia del sueño, disminuyó el número de veces que los pacientes despertaron durante la noche y mejoró significativamente la calidad del sueño (Cruz, Cruz & Cáceres, 2005).

Cruz y colaboradores (2005), indica que el extracto de *V. prionophylla* presenta una concentración inhibitoria mínima de 0.25 mg/dL contra *Cryptococcus*.

En otro estudio Gaitán (2005), indican que *V. prionophylla* tiene actividad contra *Sporothrix Schenckii*, habiendo tenido una actividad inhibitoria contra la fase levaduriforme a una concentración de 0.5 mg/mL y contra la fase micelial a una concentración de 0.025mg/ml.

Calderón y colaboradores (2006) estudiaron la actividad citotóxica de extractos de *V. prionophylla* de Quiché en cultivos de líneas celulares de cáncer de mama, pulmón y sistema nervioso central.

Finalmente Can Macu (2007) realizó un tamizaje antibacteriano *in vitro* de extractos de *V. prionophylla* procedentes de 13 regiones del altiplano Guatemalteco, en dicha investigación se encontró la actividad moderada de *V. prionophylla* frente a varias bacterias.

Diez valepotriatos han mostrado actividad contra el hongo patógeno de las plantas *Cladosporium cucumerinum*. El valtrato 3 fue activo a 1 µg y también mostró inhibición significativa a bajas dosis sobre otros hongos tales como *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* y *Trichopyton mentagrophytes*. El valtrato 3 y el dihidrovaltrato 5 también fueron activos contra otros patógenos de las plantas y los valepotriatos se mostraron promisorios como un nuevo grupo de compuestos fungicidas (Can Macu, 2007).

Holzmann y colaboradores (2012) realizaron estudio para evaluar el comportamiento y los efectos farmacológicos de los extractos hidroetanolicos de *V. prionophylla*, demostrando los efectos sedantes y depresivos del sistema nervioso que poseen estos extractos.

C. MICOSIS

Las infecciones causadas por hongos microscópicos se llaman micosis. Los agentes causales de las micosis son alrededor de 100 y estos pueden ser de origen endógeno o exógeno. Los hongos endógenos se encuentran en las mucosas o tegumentos en individuos sanos y solo en estados especiales del huésped. Los hongos exógenos viven fuera del ser humano o los animales.

Según la localización, las micosis se clasifican en cuatro grandes grupos: superficiales, subcutáneas, sistémicas y por oportunistas (Arenas, 2008).

1. Micosis superficiales

Generalmente llamadas dermatomicosis son infecciones usualmente limitadas a tejidos de la piel, pelo y uñas. Los agentes causales se clasifican en micosis superficiales que comprenden tres géneros anamórfos: *Trichophyton*, *Microsporum* y *Ephidermophyton* (Suton, Fotherfill & Rinaldi, 1998).

a) *Trichophyton* sp.

i. Hábitat: *Trichophyton* es un dermatofito que habita la tierra, los seres humanos y los animales. Relacionado a sus hábitats naturales, el género incluye especies antropofílicas, zoofílicas, y geofílicas. Algunas especies son cosmopolitas, otros tienen una distribución geográfica restringida.

- ii. Etiología: hongo antropofílico que provoca lesiones, tanto *endothrix* como *ectothrix*, en el pelo. Agente más común de dermatofitosis: *tinea pedis*, *tinea corporis* y onicomicosis. Para adquirir la enfermedad se precisa contacto con la fuente: suelo, humanos o animales, también puede transmitirse de una persona a otra por fomites. *Trichophyton rubrum* es el agente causal más común de la dermatofitosis en todo el mundo (Arenas, 2008).
- iii. Características macroscópicas: el crecimiento de las colonias de *Trichophyton* sp. es de lenta a moderadamente rápida, su textura es de algodonosa a aterciopelada. El color es blanco a amarillo brillante, o rojo violeta al frente, el reverso es pálido, amarillo, café o rojo pardo.
- iv. Características microscópicas: se pueden observar hifas septadas y hialinas, conidióforos, micro y macroconidias, y arthroconidios. También se pueden producir clamidiosporas. Los conidióforos están pobremente diferenciados por la hifa. Los microconidios son piriformes, numerosos, solitarios o agrupados (Larone, 2002).
- v. Patogenia: infecta el cabello, la piel y las uñas. Similar a los otros dos géneros, *Trichophyton* es un hongo filamentosos queratinofílico. Tienen capacidad para invadir los tejidos queratinizados y la posesión de varias enzimas, tales como ácidos, proteinasas, elastasas, keratinasas, y otras proteinasas son los principales factores de virulencia de estos hongos. La especie *Trichophyton* pueden causar infecciones invasivas en huéspedes inmunodeficientes (Logemann, 1995).
- vi. Cuadro clínico: agente más común de *tinea pedis*, *tinea corporis* y onicomicosis, produce lesiones eritematosas, poco inflamatorias, pruriginosas que pueden ser rebeldes al tratamiento. Son lesiones que cursan de un modo crónico y sin tendencia a la curación espontánea. Su presencia en cuero cabelludo o barba es excepcional. *Trichophyton rubrum* es el agente causal más frecuentemente aislado en la onicomicosis lateral distal subungueal y en la proximal subungueal. Asimismo, *T. mentagrophytes* es

el hongo más frecuentemente aislado en la onicomicosis blanca superficial (Cáceres, 1996).

b) *Microsporum* sp.

i. Hábitat: mientras el hábitat natural de algunos de las especies de *Microsporum* es la tierra (especies geofílicas), otros son primariamente afectos a varios animales (especies zoofílicas) o humanos (especies antropofílicas). Algunas especies son aisladas de cultivos de tierra y humanos. La mayoría de *Microsporum* son ampliamente distribuidas en el mundo mientras algunas tienen una distribución geográfica distribuida. *Microsporum* es el estado asexual de el hongo y la fase teleomorfa es referido como genero *Arthroderma* (Larone, 2002).

ii. Etiología: *Microsporum* es un hongo queratinofílico filamentoso incluido en el grupo de dermatofitos, ataca pelo, piel y uñas de hombre y animales. Los agentes etiológicos de patología humana son: *M. canis*, *M. gypseum*, *M. audouinii*, *M. ferrugineum*, *M. nanum*, *M. cookei*, *M. distortum*, *M. vanbreuseghemii*. Las especies geofílicas se adquieren a través de contacto con el suelo. Las especies zoofílicas se transmiten desde el animal infectado. Directa o indirecta (a través de fomites) de persona a persona de transmisión es motivo de preocupación para especies antropofílicas. Puede observarse transporte asintomático (Logemann, 1995).

iii. Características macroscópicas: en cultivo *Microsporum* se desarrolla con micelio aéreo algodonoso, lanudo, enmarañado o polvoriento cuyo color varía desde blanco a matices de pardo, dependiendo de la especie.

iv. Características microscópicas: la pared espinosa de los macroconidios caracteriza al género. Esta espora puede ser pequeña (dos lóculos) o grande (6-12 lóculos), fusiforme u oval, de pared gruesa o delgada; a los lados de las hifas, sésiles sobre cortos esterigmas,

nacen pequeños microconidios en maza de 3 a 6 micras. Se pueden encontrar hifas en raqueta o en forma de peine, cuerpos nodulares y clamidiosporas.

- v. Patogenia: *Microsporum* es uno de los tres géneros que causa dermatofitosis. Dermatofitosis es un término general utilizado para definir la infección en pelo, piel o uñas relacionado con alguna de las especies dermatofitas. Tanto la enzima queratinasa, proteinasas y elastasas del hongo pueden actuar como factores de virulencia.

- vi. Cuadro clínico: en particular las especies de *Microsporum* mayormente infecta el cabello y la piel, con excepción de *Microsporum persicolor* que no infecta el pelo. Las infecciones de las uñas son muy raras. La patogénesis de la infección depende del reservorio natural de la especie. Algunos emiten fluorescencia verde con luz de Wood. En la piel, aparece el hongo solo como elementos miceliales ramificados, segmentados que no pueden diferenciarse de *Trichophyton* y *Epidermophyton* (Larone, 2002).

2. Micosis sistémicas

En las micosis sistémicas las esporas del hongo penetran por inhalación (coccidioidomicosis, histoplasmosis, paracoccidioidomicosis, blastomicosis), después ocurre colonización y en la mayoría de personas de áreas endémicas hay una infección pulmonar asintomática, en un porcentaje pequeño se produce micosis pulmonar primaria (neumonía aguda) que se acompaña de síntomas generales. En ambos casos hay curación o pueden evolucionar a una enfermedad pulmonar crónica; es rara la diseminación a cualquier otro órgano o sistema, en especial hígado y bazo o la reactivación endógena. La inoculación cutánea primaria es excepcional, se presenta como una lesión granulomatosa local acompañada de adenopatía (Arenas, 2008).

3. Micosis por oportunistas

El término de micosis oportunistas se usa para designar a un grupo de infecciones por hongos que viven normalmente como saprobios en el ambiente o cavidades naturales de

seres humanos, son termotolerantes y tienen capacidad de presentar cambios bioquímicos y morfológicos en contacto con personas que tienen defectos en sus mecanismos de defensa. Los hongos clásicos son *Candida*, *Aspergillus*, *Cyptococcus neoformans* y *Zigomyces* (Arenas, 2008).

a) *Candida* sp.

i. Hábitat: *Candida* es una levadura y la mayor causa de micosis oportunistas a nivel mundial. Es además un frecuente colonizador de piel y membranas mucosas humanas. *Candida* es un miembro de la flora normal de piel, boca, vagina y heces. Ya sea como patógeno y un colonizador, es encontrado en el ambiente, particularmente en flores, agua y suelo. Mientras la mayoría de especies del género *Candida* son mitospóricas, algunos tienden a ser teleomórficos y producen esporas sexuales.

ii. Etiología: los agentes causales son levaduras anascosporadas, cuyo estado anamorfo, pertenece a la subdivisión Deuteromycotina, y su estado teleomorfo puede ser Ascomycotina. El género *Candida* incluye alrededor de 154 especies. Agregado a estas, seis son más frecuentemente aisladas en infecciones humanas. Mientras *Candida albicans* es la especie más abundante y significativa, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, y *Candida lusitanae* son también aisladas como agentes causantes de infecciones *Candida*. Muy importante, estas han tenido un reciente incremento en infecciones conjuntas a *Candida* no *albicans*, además como *Candida glabrata* y *Candida krusei*. Pacientes que han recibido un tratamiento profiláctico con fluconazol son particularmente un riesgo para desarrollo de infecciones por cepas de *Candida krusei* y *Candida glabrata* fluconazol-resistente (Suton, 1998).

iii. Características macroscópicas: los hongos crecen rápidamente a 37°C y en 24-48 horas se obtienen colonias lisas, blandas, brillantes, de color blanco o ligeramente beige; con el tiempo se hacen plegadas, rugosas o membranosas y a simple vista se observa el micelio sumergido.

- iv. Características microscópicas: en el examen microscópico se encuentran microorganismos unicelulares esféricos u ovoides, de paredes delgadas; de 4-10 micras de diámetro, gemantes con pseudomicelio o micelio escaso o ausente. La presencia de filamentos es característico del género *Candida* (Arenas, 2008).
- v. Patogenia: estos hongos son oportunistas y se convierten en patógenos cuando hay alteraciones de la inmunidad celular, como en inmunodeficientes. La gravedad de la infección depende sobre todo de las alteraciones primarias del huésped mas que las propiedades patógenas del hongo.
- vi. Cuadro clínico: infecciones causadas por especies de género *Candida* son en general referidas como candidiasis. El espectro clínico de la candidiasis es extremadamente diverso. Casi cualquier órgano o sistema en el cuerpo puede ser afectado. Candidiasis pueden ser superficiales y locales o profundas y diseminadas. Infecciones diseminadas surgen por un esparcido hematógeno desde la localización infectada primaria. *C. albicans* es la especie mas patógena y mas comúnmente encontradas entre todas.

b) *Aspergillus sp.*

- i. Hábitat: *Aspergillus* es un hongo filamentoso, cosmopolita y ubicuo encontrado en la naturaleza. Es comúnmente aislado de suelo, en plantas y ambientes internos. Mientras el estado teleomórfico puede ser descrito solamente para algunas especies del género *Aspergillus* (Arenas, 2008).
- ii. Etiología: el género *Aspergillus* incluye arriba de 185 especies, de las cuales alrededor de 20 especies han sido reportados como un agente causante de infecciones oportunistas en hombres. Entre estos *Aspergillus fumigates* es la especie mas comúnmente aislada, seguido por *Aspergillus flavus* y *Aspergillus niger*. *Aspergillus clavatus*, el grupo *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus terreus*,

Aspergillus ustus, y *Aspergillus versicolor* son entre las otras especies comúnmente aisladas como patógenos oportunistas (Suton, 1998).

- iii. Características macroscópicas: el cultivo se realiza en condiciones habituales sin cicloheximida, a 25-37°C; se ha recomendado el medio de Czpek para estandarizar los aislamientos. Las colonias crecen con rapidez en 3-4 días, son de color blanco, verde, amarillo, café, o rojizo y puede haber difusión de pigmento al medio de cultivo. La superficie es aterciopelada, granulosa o polvorienta; los márgenes son bien delineados o difusos e irregulares. Estos hongos se identifican por el aspecto y la pigmentación de la colonia (Arenas, 2008).
- iv. Características microscópicas. en el estudio microscópico es bien importante la reproducción asexual, que se caracteriza por la presencia de “la cabeza aspergilar”, constituida por: a) el conidioforo, filamento largo y hialino, con o sin tabiques, a veces ramificado, termina en una dilación o vesícula; nace en una hifa vegetativa, esta base del conidioforo puede ser hialina o pigmentada, lisa o rugosa, y se llama célula pie. b) la vesícula, que tiene diferente forma y tamaño, y en la que se disponen hileras de fialides; puede ser hemisférica, globosa o elíptica en clava; la pared quizá sea delgada o gruesa y casi nunca hay tabique que las separe del conidioforo; c) fialides, en forma de botella, nacen directamente de la vesícula; también pueden nacer células estériles llamadas métulas (Larone, 2002).
- v. Patogenia: los hongos del género *Aspergillus* son omnipresentes y oportunistas que viven como saprofitos en el suelo, vegetales en descomposición, y cualquier tipo de materia orgánica. Las especies que actúan como patógenas son termotolerantes. Los conidios penetran por inhalación dado su tamaño y sus propiedades aerodinámicas y llegan a partes distales del pulmón. Las modalidades clínicas dependen de la transformación del hongo de saprofito en parásito (Popoca, Villarreal-Ortega & Aguilar-Contreras, 1996).

Se consideran factores de virulencia: crecimiento a 37°C; producción de enzimas proteolíticas, presencia de antígenos con actividad tipo proteasa, es un potente inhibidor de fagocitosis de macrófagos, posee fosfolípidos que inhiben la activación del complemento.

vi. Cuadro clínico: las especies del género *Aspergillus* son bien conocido por jugar un rol en tres diferentes escenarios en hombres: (1) infecciones oportunistas; (2) estados alérgicos; y (3) toxinas. La inmunosupresión es el mayor factor de predisposición para desarrollar infecciones oportunistas (Arenas, 2008).

4. Tratamiento general

a) Anfotericina B

i. Mecanismo de acción: la membrana de la célula fúngica se altera y se pierden las macromoléculas celulares y los iones, lo que origina un daño irreversible. La resistencia a este fármaco se puede deber a una disminución en la cantidad de ergosterol de la membrana o a una modificación en su estructura.

ii. Dosis: este medicamento se debe almacenar en refrigeración y protegido de la luz, al menos hasta que se comience a administrar. Se debe administrar intravenosamente con suero con dextrosa al 5% cada 4 a 6 horas, iniciando con una dosis de 0.5 mg/kg peso hasta alcanzar una dosis de 1 mg/kg, durante 2 a 3 días por un período de hasta 4 meses (Datzung, 2002).

iii. Efectos secundarios: provoca trastornos gastrointestinales (anorexia, vomitos y diarrea); renales (nefrotoxicidad e hipocalcemia); hemáticos (anemia normocítica sin reticulocitosis ni hiperplasia medular); generales (escalofríos y fiebres) y locales (tromboflebitis de la vena inyectada).

No se debe emplear en afecciones avanzadas. Se absorbe poco o nada por vía oral. Si no se termina el tratamiento no se eliminara la infección.

b) Yoduro de potasio (KI)

- i. Mecanismo de acción: el KI no tiene acción directa contra, ya que se ha demostrado que el hongo puede crecer en medios de cultivo con altas concentraciones de yoduro de potasio. Se asume, más bien, que su acción es indirecta, facilitando así los procesos de inmunidad celular o general (Arteche, Vanaclocha & Guenechea, 1999).
- ii. Dosis: administración de una solución saturada de yoduro de potasio (23 g / 100 ml de agua) tres veces por vía oral; se aumenta la dosis hasta 3 ó 4 ml tres veces al día durante tres a cuatro semanas, siendo la dosis óptima de 4 a 6 g por día en el adulto y de 1 a 3 g en los niños.
- iii. Efectos secundarios: produce exantema, salivación, lagrimeo, náuseas, vómitos, gastritis, rinitis, faringolaringitis y bronquitis (Fernandez-Torres, Vazquez-Veiga, Llovo, Pereiro & Guarro, 2000).

c) 5-fluorocitocina

- i. Mecanismo de acción: penetra a la célula fúngica por medio de la permeasa de citosina e inhibe la síntesis del ácido ribonucleico (ARN) por acción de una desaminasa de citosina. Intracelularmente es convertida a 5-fluorouracilo y en trifosfato de fluororidina. La sustitución del uracilo por 5-fluoruracilo y el fosfato de fluororidina, inhibe la síntesis de ácido desoxiribonucleico (ADN) y del ARN respectivamente, alterando la síntesis protéica, llevando a la célula fúngica a la muerte (Arteche, *et al* , 1999)

ii. Dosis: se puede administrar en forma oral, intravenosa o tópica. Por vía intravenosa se recomienda una dosis de 100 a 150 mg/kg de peso, por 1-2 meses. Tiene actividad antifúngica en una dosis de 100 mg/L (Brooks, Butel & Ornston, 1996).

iii. Efectos secundarios: reacciones adversas en insuficiencia renal, hematológicas (glucopenia con neutropenia, trombocitopenia y eosinofilia); gastrointestinales (nausas y diarreas); hepáticas (eleva las transaminasas y la fosfatasa alcalina); cutáneas (alergias con erupciones morbiliformes) (Brooks, *et al*, 1996). Posee una eventual resistencia en caso de abandono.

d) Otros

Otros antimicóticos de utilidad en el tratamiento de la esporotricosis son los triazoles, principalmente el itraconazol, activo en todas las formas de esporotricosis pero por su alto costo sólo se emplea en formas diseminadas. La dosis promedio empleada es de 200 mg diarios que pueden administrarse por varios meses. No se recomienda el uso del ketoconazol por su pobre respuesta y su potencial hepatotóxico. El fluconazol es también efectivo en las formas graves de esporotricosis, utilizándose dosis de 200 a 400 mg diarios, hasta por seis meses (1). Griseofulvin es de espectro reducido y de acción fugistática, por lo que solo detiene el crecimiento del hongo pero no lo elimina, se toma durante varios meses, hasta que se cae por la descamación de la piel (Datzung, 2002).

III. JUSTIFICACIÓN

Las micosis son infecciones causadas por hongos microscópicos, son comúnmente padecidas por las poblaciones de los países tropicales y subtropicales. Son clasificadas según su localización en micosis superficiales, principalmente (*Microsporum* y *Trichophyton*) micosis subcutáneas (*Sporotrix schenkii*, *Fonseca pedosoi*), micosis por oportunistas (*Candida* sp., *Aspergillus* sp.) y micosis sistémicas (no tratadas en esta investigación).

Aún con la efectividad de los medicamentos actuales, el uso prolongado de varios de estos puede producir efectos secundarios severos, algunos de los cuales son irreversibles en el paciente.

La búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento para las micosis es una consecuencia de la necesidad de un medicamento que reduzca o elimine todo efecto secundario a su uso prolongado, a la falta de diferentes opciones de tratamiento y a la necesidad de un medicamento seguro. Es por esto que la búsqueda de la actividad antifúngica es de importancia, ya que en esta puede encontrarse una opción terapéutica adecuada, que además tendría la ventaja de una mayor disponibilidad del producto y un precio más accesible al paciente.

Valerina prionophylla es una especie utilizada popularmente por su propiedad como sedante, así como en compresas para curar contusiones, heridas, llagas y raspones, y actualmente también como antimicrobiano.

En la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, de la Universidad de San Carlos de Guatemala se han realizado varios estudios sobre la actividad de *Valerina prionophylla*, tanto hojas y raíces, como antimicótico determinando actividad contra *Sporotrix schenkii*. Sin embargo no existe ningún estudio que evalúe hoja como un subproducto de *V. prionophylla* y compare la variación de la actividad de extractos tanto de raíz como de

hoja, de *Valeriana prionophylla* colectada en dos regiones de Guatemala (San Marcos y Quiche) y contra un grupo de hongos y levaduras principales agentes causales de las diferentes tipos de micosis más comunes.

El presente estudio evaluó la actividad antifúngica de extractos etanólicos de *Valeriana prionophylla*, tanto de raíz como de hoja, colectadas en dos regiones de Guatemala (San Marcos y Quiche) contra hongos y levaduras comparando si existe variación en la actividad entre ambas muestras, debido a una diferencia de principios activos como los mostrados por Piedrasanta (2007).

IV. OBJETIVOS

A. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antifúngica del extractos etanólico de hoja y rizoma de *V. prionophylla*, colectadas en dos regiones de Guatemala (San Marcos y Quiche).

B. OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Demostrar la actividad antifúngica *in vitro* de los extracto de la raíz y hojas de *V. prionophylla* sobre hongos dermatofitos, levaduras y hongos filamentosos.
2. Determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de los extractos que salieran positivos.
3. Comparar la actividad antifúngica de especies provenientes de San Marcos y del Quiche para seleccionar el mejor cultivar.

V. HIPOTESIS

Las hojas y raíces de *V. prionophylla* colectadas en San Marcos y Quiché tiene actividad contra hongos patógenos presentes en el estudio.

VI. MATERIALES Y METODOS

A. UNIVERSO

Especies de *V. prionophylla* de diferentes localidades de Guatemala.

B. MUESTRA

Hoja y raíz de *V. prionophylla* procedentes de San Marcos y de Quiche.

C. MATERIALES

Reactivos

- Agar Saboraud
- Alcohol al 50%
- Dextrosa
- Etanol al 50%
- Fosfato diácido de potasio
- Peptona
- Sulfato de sodio
- Caldo Saboraud
- Etanol al 50%
- Solución salina

Materiales

- Cajas de petri simples
- Cámara de Neubauer
- Campanillas de Durham

- Papel parafilm
- Pipetas automáticas
- Puntas amarillas de 200 μ L
- Puntas azules de 1000 μ L
- Regla graduada en milímetros
- Tubos con tapón de rosca de 15 mL
- Viales de 1.5 ml
- Asa de nicromo
- Cajas de petri cuadrilate
- Tubos de tapón de rosca de 15 mL

Equipo

- Agitador
- Autoclave
- Incubadora a 27°C
- Incubadora a 37°C
- Refrigeradora 5°C

Cepas

Trichophyton rubrum ATCC 113200

Trichophyton mentagrophytes ATCC 9972

Micosporum gypseum ATCC 1152000

Candida albicans ATCC 10231

Candida tropicalis ATCC 1312000

Candida krusei

Candida glabrata

Candida parapsilosis

Aspergillus flavus ATCC 204304

Aspergillus niger ATCC 9029

Aspergillus fumigatus ATCC 26934

D. MÉTODOS

1. Obtención de extractos etanólicos

Los extractos etanólicos de *Valeriana prionophylla* fueron proporcionados por el Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala. El extracto se obtuvo moliendo la parte a utilizar de la planta, la cual se pesó y se colocó en el percolador con alcohol al 90%; la solución que se obtuvo del percolador pasó por el rotavapor para luego desecarlo y obtener el rendimiento del extracto.

2. Obtención de cepas

Se utilizaron aislamientos de especímenes clínicos de *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* proporcionados por el Cepario de Area de Micología del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala y cepas ATCC de *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *M. gypseum*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus*, proporcionados por el Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

3. Evaluación de la actividad antifúngica contra hongos filamentosos

Se utilizó como método de referencia de la actividad antifúngica el de Brancato y Holding modificado por MacRae (Brancato & Golding 1953)

- a) Preparación del medio de cultivo para hongos filamentosos
 - Se preparó tubos con 13.5 ml de agar Sabouraud

- Se esterilizó, se dejó enfriar a 50°C y agregó 1.5 ml de extracto de la planta a probar. La concentración final fue de 1 mg/ml.
- Se vertió en cajas de Petri estériles, se dejó solidificar e incubó a 36°C durante 24 horas para chequear esterilidad.
- Se guardó en refrigeración hasta el momento de su uso.

b) Preparación de inóculo de hongos filamentosos

- Se preparó medio Takashio (Sabouraud modificado para producción de esporas) con los siguientes reactivos: Dextrosa 0.6 g; Na₂SO₄ 0.3g; KH₂PO₄ 0.3 g; Peptona 0.3 g; Agar-agar 6.0 g. Se agregó a 300 ml de agua, disolvió, se vertió 6 ml en tubos con tapón de rosca, se esterilizó en autoclave y dejó solidificar con el mayor declive posible. Incubar 48 horas a 25°C para descartar contaminación.
- Se sembró en este medio los hongos a ensayar e incubó a 25°C durante 21 días hasta obtener un crecimiento homogéneo (aproximadamente 15 días)
- Se agregó a cada tubo 2 ml de agua destilada estéril y desprendió el hongo con ayuda de una varilla.
- Se trasvasó el material obtenido a viales con tapa de rosca. Se agitó 1 minuto en vórtex e hizo un conteo de esporas en cámara de Neubauer.
- Se llevó la suspensión a 100 esporas/μl, que es igual a 1×10^5 esporas/ml (aproximadamente 10 esporas/cuadrante) y almacenó en viales estériles en refrigeración.

c) Inoculación de hongos filamentosos en placa

- Se hicieron cuatro agujeros en forma equidistante en las cajas con agar planta, con campanillas de Durham de 5 mm de diámetro.
- Se tomó 30μl de la suspensión de esporas y depositó en los agujeros. Incubar a 25 °C por 14 días.

- Se realizaron 4 repeticiones en total en la misma forma, usar una caja con agar Sabouraud y etanol al 50 % como control negativo; y como control positivo una caja con agar Sabouraud y anfotericina B (1 mg/ml)

d) Lectura e interpretación de los resultados

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

4. Evaluación de la actividad antifúngica contra hongos levaduriformes

a) Preparación del medio de cultivo para hongos levaduriformes

- Se preparó tubos con 9.0 ml de agar Saburaud.
- Se esterilizó, dejó enfriar a 50°C y agregó 1.0 ml de extracto de la planta a probar. Agitar.
- Se vertió en cajas de Petri estériles, se dejó solidificar e incubó a 37°C durante 24 horas para chequear esterilidad.
- Se guardó en refrigeración hasta el momento de su uso.

b) Preparación del inóculo para hongos levaduriformes

- Se sembró el micelio del hongo en cajas de Petri con agar Saburaud, incubar a 37°C en jarra con candela (ambiente de 5 % de CO₂) durante 3 a 5 días. Observar crecimiento de levaduras al microscopio.

c) Inoculación de levaduras en placa

- Se inoculó con un asa de nicromo las levaduras en las cajas con agar-planta haciendo 4 inoculaciones.
- Se incubó a 37°C durante 3 a 5 días.

- Para el control negativo, se sembró por estrías la levadura en una caja con agar Sabraud sin extracto.

d) Lectura e interpretación de resultados

- Se observó el crecimiento de la levadura en el medio:
Crecimiento positivo: NO ACTIVIDAD
Crecimiento negativo: ACTIVIDAD ANTILEVADURA

5. Determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de los resultados positivos

Inicialmente a una dosis de Tamizaje (1mg/ml) y posteriormente la CIM con valores decrecientes de 0.5, 0.25, 0.125mg/ml.

6. Diseño Estadístico

a) Tipo de estudio

Experimental

b) Muestra

Extractos de hoja y raíz de *V. prionophylla* procedente de San Marcos y de Quiche.

c) Diseño experimental

Totalmente al azar; para ello se realizaron 5 replicas en cada ensayo.

d) Tipo de muestreo

No probabilístico

e) Variable de interés

Dependiente: Actividad antifúngica contra los hongos utilizados

Independiente: *V. prionophylla* colectada en dos regiones diferentes.

f) Variable de control

Control positivo: agar Sabouraud con anfotericina B

Control negativo: agar Sabouraud con etanol al 50 %.

g) Análisis de resultados

Prueba de hipótesis binomial

p = probabilidad de éxito (inhibición)

q = probabilidad de fracaso (no inhibición)

H_0 : $p \leq 0.50$ (no tiene efecto)

H_a : $p > 0.50$ (si tiene efecto)

Para rechazar H_0 se espera que TODOS los ensayos sean éxitos (inhibición), con 5 réplicas $p = 0.0312$.

CIM: Indicar que con los extractos y hongos que hubo inhibición significativa se diluirán a 0.5, 0.25, 0.125ml y el procedimiento estadístico es igual.

VI. RESULTADOS

El extracto se obtuvo moliendo la parte a utilizar de la planta, la cual se pesó y se colocó en el percolador con alcohol al 90%; la solución que se obtuvo del percolador pasó el rotavapor para luego desecarlo y obtener el rendimiento del extracto.

Se realizó tamizaje antifúngico utilizando Agar planta (agar Saburaud + extracto de la planta). Se utilizan extractos, uno tanto de raíz como de hoja de cada uno de los tres tipos de *V. prionophylla* cultivada en el mismo número de regiones de Guatemala, teniendo 6 extractos en total.

El tamizaje antifúngico mostro que los extractos de *V. prionophylla* a una concentración de 1mg/ml no presenta actividad contra los hongos evaluados.

Estos extractos se enfrentaron con los hongos filamentosos y levaduras a evaluar, inicialmente con hongos oportunistas como lo muestra la Tabla 1, posteriormente con hongos causantes de micosis superficiales, Tabla 2 y finalmente contra hongos levaduriformes, Tabla 3.

Tabla 1

Tamizaje antifúngico de extracos de hoja y raíz de tres cultivos de *V. prionophylla* contra hongos oportunistas

<i>V. prionophylla</i> (región)	Parte	<i>A. niger</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. fumigatus</i>
Nebaj, Quiche	Hoja	-	-	-
	Rizoma	-	-	-
Concepción Tutuapa,	Hoja	-	-	-
	Totonicapán Rizoma	-	-	-
Ixchiguan, San Marcos	Hoja	-	-	-
	Raiz	-	-	-

(-) Actividad negativa ($p > 0.050$)

Tabla 2

Tamizaje antifúngico de extractos de hoja y raíz de tres cultivos de *V. prionophylla* contra hongos causantes de micosis superficiales

<i>V. prionophylla</i> (región)	Parte	<i>M. gypseum</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. rubrum</i>
Nebaj, Quiche	Hoja	-	-	-
	Rizoma	-	-	-
Concepción Tutuapa, Totonicapán	Hoja	-	-	-
	Rizoma	-	-	-
Ixchiguan, San Marcos	Hoja	-	-	-
	Raiz	-	-	-

(-) Actividad negativa ($p > 0.050$)

Tabla 3

Tamizaje antifúngico de extractos de hoja y raíz de tres cultivos de *V. prionophylla* contra hongos levaduriformes

<i>V. prionophylla</i> (región)	Parte	<i>C. glabrata</i>	<i>C. kruseii</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. Tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
Nebaj, Quiche	Hoja	-	-	-	-	-
	Rizoma	-	-	-	-	-
Concepción Tutuapa, Totonicapán	Hoja	-	-	-	-	-
	Rizoma	-	-	-	-	-
Ixchiguan, San Marcos	Hoja	-	-	-	-	-
	Raiz	-	-	-	-	-

(-) Actividad negativa ($p > 0.050$)

VII. DISCUSION DE RESULTADOS

En el presente estudio se determinó la actividad contra once hongos, tanto de fase levaduriforme como miceliar, de extractos etanólicos de hoja y raíz de tres cultivares de *V. prionophylla*.

El bioensayo de la fase miceliar fue una adaptación de la metodología de Brancato & Goldin modificada por MacRae para hongos filamentosos una vez obtenido el crecimiento óptimo de hongos con fase miceliar, sembrando los hongos en medio Takashio para la inducción de esporas. Posteriormente se sembraron las esporas en agar Saboraud y se realizaron mediciones del diámetro de la colonia cada 3 días, durante 27 días.

Tres plantas provenientes de tres distintos lugares del país; las plantas ensayadas fueron *Valeriana prionophylla* (hoja y raíz) cultivadas en Ixchiguan, San Marcos; *V. prionophylla* (hoja y rizoma) cultivada en Nebaj, Quiche; *V. prionophylla* (hoja y rizoma) cultivada en Concepción Tutuapa, Totonicapan. Se ensayó finalmente un total de 6 extractos etanólicos.

En las Tablas 1, 2 y 3 se muestran los resultados del tamizaje de la actividad antifúngica de los extractos, considerando como punto de corte una concentración de 1mg/ml. Tanto los hongos de fase miceliar como los de fase levaduriforme no fueron susceptibles a los extractos ($p > 0.050$).

En base a la bibliografía podemos inferir que una composición de valerioporiatos de *V. prionophylla* así como ácido isovalérico, 3-metilvalérico, ácido alil isovalerato valérico, ácidos 3-metil-2-oxo valérico, glucoronidina y morfina 3-hidroxibromazepan, aunque son activos en el Sistema Nervioso Central, no han sido activos contra los hongos levaduriformes y filamentosos en este estudio. (Holzmann, *et al.* 2011)

De igual forma los terpenoides, componente en los aceites, los cuales actúan de manera directa en la pared celular inhibiendo la síntesis de los glucanos a través de la inactivación de la enzima 1,3-beta-glucano sintetasa. (Romero, Cantón, Pemán & Gobernado, 2005)

Como se muestra en las tablas de 1 – 3 no hubo actividad de los extractos contra los hongos evaluados por ser complejos y adicionalmente poseer diversos mecanismos de resistencia entre las que encontramos la pared celular compuesta de polisacáridos, proteínas, lípidos, iones inorgánicos.

Del mismo modo se tiene el conocimiento de que los sesquiterpenos con esqueleto de isocariolano representan potenciales compuestos antifúngicos debido a que poseen analogía estructural con algunos metabolitos fitotóxicos.(Racero, González Collado & Macias, 2004)

La comprensión de los mecanismos de inhibición podrían encaminar las investigaciones hacia la obtención de productos biofungicidas provenientes de vegetales. Se están realizando estudios que nos permitirán identificar los principios activos responsables de estos efectos.

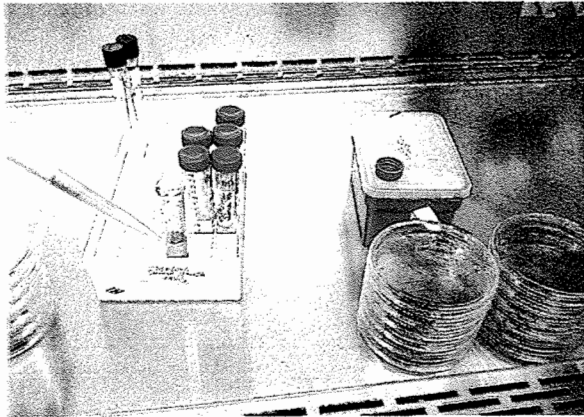
VIII. CONCLUSIONES

- A. Los extractos de *V. prionophylla* no presentaron actividad antifúngica significativa ante hongos filamentosos y levaduriformes ($p>0.05$).
- B. Las moléculas activas en el SNC, no presentan actividad antimicrobiana.

IX. RECOMENDACIONES

- A. Evaluar diversas fracciones de *V. prionophylla* contra otros hongos para descartar la actividad antifúngica de Valeriana.
- B. Determinar en qué fases fúngicas tiene actividad los extractos, para obtener un perfil de trabajo de estos extractos.

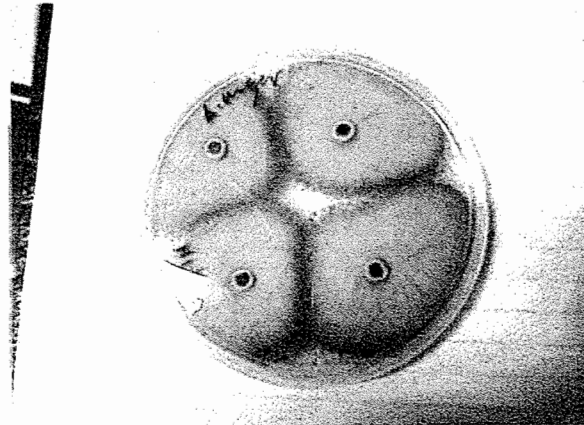
IX. ANEXOS



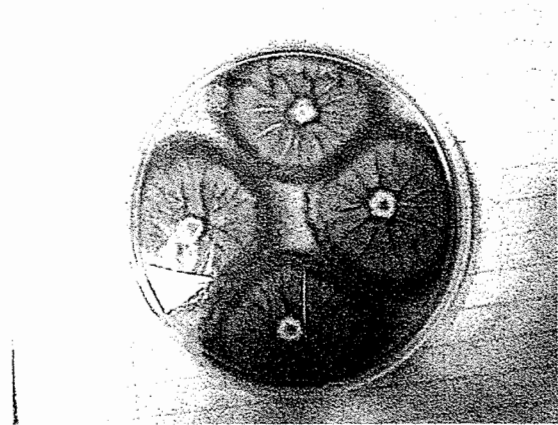
Preparación de medios con extracto etanólico



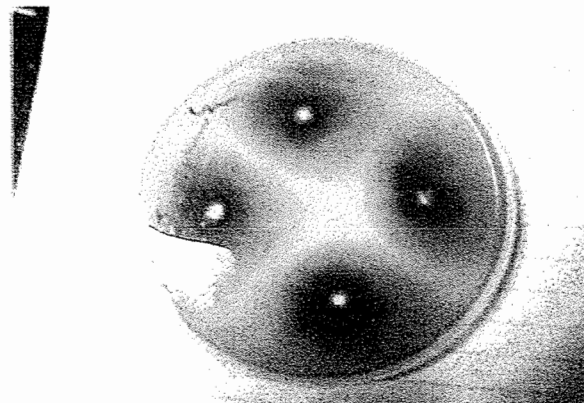
Cepas en medio Takashio



No presencia de inhibición *A. Niger*



No presencia de inhibición *A. fumigatus*



No presencia de inhibición *T. rubrum*

X. REFERENCIAS

- Arenas, R. *Micología Medica Ilustrada*. (3a.ed.) México: McGraw-Hill, 2008. 401p. (p.15-170).
- Arteche, A., Vanaclocha, B. & Guenechea, J.I. (1999). *Fitoterapia. Vademecum de Prescripción. Plantas medicinales*. (3ª ed). Barcelona Editorial Masson..
- Brancato, F. & Golding, N.S. (1953). The diameter of a mold colony as a reliable measure of growth. *Mycology*, 45,848-864
- Brooks, G., Butel, J.S. & Ornston LN. (1996). *Microbiologia Medica de Jawetz Melnick y Adelberg*. México, DF.. Manual Moderno.
- Cáceres, A., (1999). *Manual de Procedimientos del proyecto Biodiversidad tropical Centroamericana*. Organización de Estados Americanos (-OEA-).
- Cáceres, A. (2006). *Vademecum Nacional de Plantas Medicinales*. Guatemala.
- Cáceres, A., Saravia, A. (1993). *Actividad antifúngica de plantas de uso medicinal en Guatemala*. Guatemala: Editorial Universitaria (Cuaderno de investigación 7-92, Dirección General de Investigación DIGI, USAC).
- Cáceres, A. (1996). *Plantas de uso medicinal en Guatemala*. Guatemala: Editorial Universitaria.
- Cruz, E. (2005) Evaluación clínica de la efectividad de *Valeriana prionophylla* como inductora del sueño. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia)
- Cruz, A., Cruz, S. & Cáceres, A., (2005). Evaluación de la actividad biocida e identificación química de valepotriatos en cuatro especies reconocidas popularmente en Guatemala como valeriana. *Revista Científica Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia*, 3,43-48.
- Calderón, I., Correa-Arroyo, M.D., Tamayo-Castillo, G., Cáceres, A., Pinzón, R., Gimenez, A., *et al.* (2006). Screening of Latin American plants for citotoxic activity. *Pharmaceutical Biology*, 44,130-140.
- Can Macu, E.M. (2007). Tamizaje antibacteriano in vitro de los extractos etanólicos de las hojas y raíces de especímenes de *Valerina prionophylla* Standl. Procedentes de

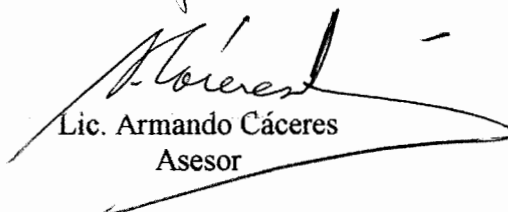
- 13 regiones del altiplano guatemalteco. Guatemala: Universidad de San Carlos, Tesis. (Maestría Multidisciplinaria en Producción y Uso de Plantas Medicinales. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). 33p.
- Datzung, B.G. (2002). *Farmacología básica y clínica*. (8ed.) México: El Manual Moderno
- Fernández, S., Wasowski, C., Loscalzo, L.M., Granger, R.E., Johnston, G.A., Paladini, A.C., & *et al.* (2006) Central nervous system depressant action of flavonoid glycosides. *European Journal of Pharmacology*, 539, 168-176.
- Fernández, S., Wasowski, C., Paladini, A.C. & Marder, M. (2004). Sedative and sleep-enhancing properties of linarin, a flavonoid-isolated from *Valeriana officinalis*. *Pharmacology Biochemistry & Behaviors*, 77, 399-404.
- Francis, A.J. & Dempster, R.J. (2002). Effect of valerian, *Valeriana edulis*, on sleep difficulties in children with intellectual deficits: randomised trial. *Phytomedicine*, 9, 272-279.
- Fernandez-Torres, B., H. Vazquez-Veiga, X. Llovo, M. Pereiro, Jr., and J. Guarro. (2000). In vitro susceptibility to itraconazole, clotrimazole, ketoconazole and terbinafine of 100 isolates of *Trichophyton rubrum*. *Chemotherapy*, 46, 390-394.
- Gaitán, I. (2005) *Actividad de doce plantas nativas guatemaltecas contra Sporothrix schenckii*. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala. Tesis.
- Hobbs, C. (1989). Valerian a literature review. *HerbalGram. The Journal of the American Botanical Council*, 21,24
- Holzmann, I., Cechinel Filho, V., Mora, T.C., Cáceres, A., Martínez, J.V., Cruz, S.M., *et al.* (2011). Evaluation of Behavioral and Pharmacological Effects of Hydroalcoholic Extract of *Valeriana prionophylla* Standl. From Guatemala. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011, 9.
- Dweck, A.C. (1997). Valerian, The Genus. En Houghton (ed) *Valerian. Medicinal an Aromatic Plants – Industrial Profiles* (pp.1-21). London: Harwood Academic Publishers,.
- Larone D.H. (2002). Medically important fungi; a guide o to identification. (p.183-243).4.ed. Washington. ASM,Press,

- Laza, L.D., Rodríguez, I. & Cabrera S.G. (2003). Descubrimiento y desarrollo de agentes cancerígenos derivados de plantas medicinales. *Revista Cubana Plantas Medicinales*.
- Letchamo, W., Ward, W., Heard, B. & Heard D. (2004). Essential oil of *Valeriana officinalis* L. cultivars and their antimicrobial activity as influenced by harvesting time under commercial organic cultivation. *Journal of Agric Food Chem*, 16, 3915-3919.
- Logemann, H. (1995). *Manual Práctico de Micología Médica*. Guatemala: Bayer. 227p.
- Marder, M., Viola, H., Wasowski, C., Fernández, S., Medina, J.H. & Paladini, A.C. (2003) 6-Methylapigenin and hesperidin: new valeriana flavonoids with activity on the CNS. *Pharmacology Biochemistry & Behaviors*, 75, 537-545.
- Minotto, R., Bernardi, C.D., Mallmann, L.F. & Edelwis M.I. (2001). Chromoblastomycosis: a review of 100 cases in the state of Rio Grande, Brasil. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 44, 585-592.
- Piccinelli, A., Arana, S., Cáceres, A., di Villa Blanca, R., Sorrentino, R. & Rastrelli, L. (2004). New lignans from the roots of *Valeriana prionophylla* with antioxidative and vasorelaxan activities. *Journal of Natural Products*, 67, 1135-1140.
- Piedrasanta, R.B. (2007). *Comparación Química y de rendimiento del aceite esencial de hoja y raíz de Valeriana prionopylla de dos diferentes localidades de Guatemala*. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Tesis. (Maestría Multidisciplinaria en Producción y Uso de Plantas Medicinales. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia).
- Popoca, J, Villarel-Ortega, M.L, Aguilar-Contreras, A. (1996). *Extractos de algunas plantas medicinales como antitumorales*. Primer Congreso Nacional de Plantas Medicinales de México, 84-5.
- Rivera, M.J. (2007). *Actividad de seis extractos de hierbas usadas medicinalmente contra Fonsecaea Pedrosoi Y Sporothrix Schenckii*: Universidad de San Carlos Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). 49p.

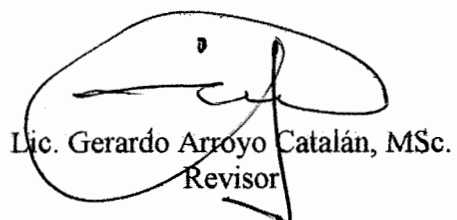
- Rojas, R., Bustamante, B., Bauer, J., Fernández, I., Albán, J & Lock O. (2003). Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 88, 199-204.
- Standley, P.C. & Steyermark, J.A.(1952). Flora of Guatemala, Fieldiana, Botany, 24, 348–352,
- Suton, D.A., Fothergill, A.W. & Rinaldi M.G. (1998). Guide to Clinical Sinificant Fungi. Williams & Wilkins



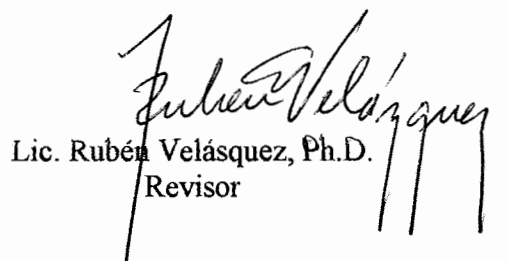
José Daniel García Chután
Autor



Lic. Armando Cáceres
Asesor



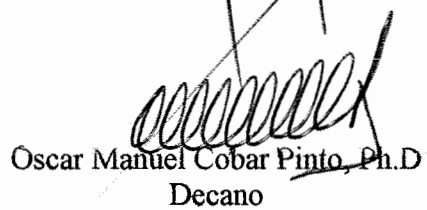
Lic. Gerardo Arroyo Catalán, MSc.
Revisor



Lic. Rubén Velásquez, Ph.D.
Revisor



Licda. María Eugenia Paredes, MA.
Directora



Oscar Manuel Cobar Pinto, Ph.D
Decano