


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



**Evaluación de la actividad antifúngica *in vitro* de extractos etanólicos de plantas
de uso medicinal en Guatemala**

Yilka Azucel Quiñónez Mizrahí

Química Bióloga

Guatemala, marzo de 2014

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

**Evaluación de la actividad antifúngica *in vitro* de extractos etanólicos de plantas
de uso medicinal en Guatemala**

Informe de Tesis

Presentado por

Yilka Azucel Quiñónez Mizrahí

Para optar por el Título de

Química Bióloga

Guatemala, marzo de 2014

JUNTA DIRECTIVA

Oscar Manuel Cobar 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. Lourdes Virginia Nuñez Portales	Vocal IV
Br. Julio Alberto Ramos Paz	Vocal V

ACTO QUE DEDICO

- A Dios** Por estar conmigo en todo momento, por ser mi fortaleza, refugio y fiel amigo y por enseñarme que con fe todo es posible.
- A mis Padres** José Luis Quiñónez y Elizabeth Mizrahí de Quiñónez, porque siempre han estado ahí para mí; creyendo, confiando y apoyándome. Por su ejemplo de vida, consejos y amor incondicional, éste logro no es solo mío es de ustedes también. Los AMO.
- A mi Esposo** Elder Nelson Santos, por su amor, paciencia, dedicación y apoyo incondicional en todos estos años. Gracias, Te amo mi amor.
- A mis Hijos** David Isaac y Pablo Josué, por ser mi mayor motivación para culminar mis estudios y por darme siempre esa fortaleza para seguir adelante.
- A mis Hermanos** José Luis, Omar Enrique, Yany Elizabeth, por sus consejos, por su cariño, por estar siempre ahí para mí, por brindarme siempre ánimo. Los AMO.
- A mi Familia** A mi abuela, gracias por su cariño y cuidados, a mi suegra Alba Mérida, gracias por todo su apoyo en estos últimos años y alegrarse de nuestros éxitos.
- A mis Amigos** Por su amistad, animo, apoyo y compañía en las diferentes etapas de nuestras vidas, aquellos que me han brindado su amistad incondicional y que estarán toda la vida gracias por los momentos que compartimos, Dios les bendiga.

AGRADECIMIENTOS

Universidad de San Carlos de Guatemala

A esta magnífica casa de estudios, por darme la oportunidad de formarme como profesional.

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

La que me albergó en sus aulas, en donde mi formación académica se fue formando poco a poco hasta convertirme en una profesional.

Escuela de Química Biológica

Por brindarme todos los conocimientos necesarios para llegar a convertirme en Química Bióloga.

A mi Asesor

Lic. Armando Cáceres por sus conocimientos, apoyo, comprensión, tiempo y dedicación durante la realización de la investigación. Gracias.

A mi Revisora

Licda. Isabel Gaitán por su tiempo y valiosos aportes realizados a mi investigación. Muchas Gracias.

Laboratorio Candelaria y INDERMA

Por su colaboración para la realización de esta investigación.

Depto. Citohistología

Por permitirme realizar mi investigación en sus instalaciones.

INDICE

1. RESUMEN	6
2. INTRODUCCIÓN	8
3. ANTECEDENTES	10
3.1 Generalidades de las micosis	10
3.2 Hongos oportunistas	11
3.3 Hongos del estudio	12
3.4 Tratamiento antifúngico	16
3.5 Etnobotánica	20
3.6 Plantas seleccionadas para el estudio	22
3.7 Técnicas de evaluación de la actividad antifúngica	31
4. JUSTIFICACIÓN	34
5. OBJETIVOS	35
6. HIPÓTESIS	36
7. MATERIALES Y MÉTODOS	37
7.1 Universo	37
7.2 Muestra	37
7.3 Recursos	37
7.4 Métodos	40
7.5 Diseño experimental	45
8. RESULTADOS	46
9. DISCUSION DE RESULTADOS	51
10. CONCLUSIONES	56
11. RECOMENDACIONES	57
12. REFERENCIAS	58
13. ANEXOS	71

1. RESUMEN

Las infecciones por hongos incluyen a un grupo homogéneo de microorganismos que tienen la capacidad para colonizar los tejidos queratinizados; estas incluyen una amplia variedad de enfermedades que afectan integumentos y sus apéndices (pelo, uñas y piel). Las infecciones micóticas de la piel son patologías observadas frecuentemente en la clínica. Los tratamientos generalmente tienen un costo económico considerable, observando en ocasiones recidivas debido a resistencia de los patógenos hacia los fármacos. Por lo tanto, es necesario buscar tratamientos alternativos que sean eficaces y de costo relativamente económico.

El propósito de este estudio fue evaluar la actividad antifúngica *in vitro* de cinco plantas nativas de uso popular en Guatemala, las cuales fueron la corteza de *Byrsonima crassifolia* (Nance), la hoja de *Cassia reticulata* (Barajo), la hoja de *Litsea guatemalensis* (Laurel), la hoja de *Solanum nigrescens* (Quilete) y el rizoma de *Smilax domingensis* (Zarzaparrilla), sobre los principales hongos que afectan a la población guatemalteca, con el fin de determinar la actividad de cada extracto sobre las cepas aisladas y la concentración inhibitoria mínima de los extractos efectivos.

Se utilizaron seis cepas de hongos dermatofitos los cuales fueron, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton tonsurans*, un hongo filamentoso el cual fue *Aspergillus flavus* y dos levaduras de la especie *Candida albicans*. Estos hongos fueron aislados de muestras clínicas provenientes de ceparios de Micología, Candelaria e Instituto de Dermatología y Cirugía de la Piel (INDERMA). Los resultados indican dos extractos activos, el extracto etanólico de *Byrsonima crassifolia* (Corteza), para las dos cepas de *Candida albicans* las cuales presentaron una CIM de 0.0312 y 0.0625 mg/mL y *Trichophyton mentagrophytes* una CIM de 0.0625 mg/mL; y el extracto etanólico de *Smilax domingensis* (Rizoma), presentó actividad inhibitoria solamente para las dos cepas de *Candida albicans* con una CIM de 0.312 y 0.0078 mg/mL. Según el diseño estadístico, se realizó la prueba de hipótesis binomial ($p=0.0312$).

Ninguno de los extractos etanólicos evaluados contra los hongos *Aspergillus flavus*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton tonsurans* inhibieron su crecimiento significativamente ($p < 0.05$). Los resultados de este estudio contribuyen a la información sobre la actividad antifúngica de las especies vegetales *Byrsonima crassifolia* y *Smilax domingensis* y confirmar la actividad antifúngica presentada en estudios anteriores.

2. INTRODUCCIÓN

Guatemala es un país con una gran diversidad genética y cultural, por lo que el uso de las plantas medicinales está ampliamente difundido en el país; desde la antigüedad ha venido siendo utilizada como medicina natural; debido al clima tropical del país se favorece el desarrollo de múltiples enfermedades infecciosas, particularmente que atacan la piel y mucosas (Cáceres, López, Girón, & Logemann, 1991; Rippon, 1990).

Las infecciones de la piel son enfermedades comunes en los países en desarrollo, ocasionadas por los hongos filamentosos y dermatofíticos que es un grupo de huéspedes homogéneo de hongos queratinófilos y causan una gran variedad de cuadros clínicos, incluyen una amplia variedad de enfermedades que afectan integumentos y sus apéndices, pelo, uñas y piel, son especialmente preocupantes en las zonas tropicales, especialmente en los niños y personas inmunosuprimidas (Rippon, 1990).

El hombre desde su origen, ha utilizado distintas plantas medicinalmente como materia prima, con el fin de preparar remedios para curar diversas afecciones en los seres humanos. A través de encuestas etnobotánicas y revisión de la literatura se han detectado más de 100 plantas de ser utilizadas en Guatemala para tratar afecciones producidas por agentes causales, siendo los más comunes *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum* (Cáceres, 1996; Cáceres, *et al.*, 1991a).

Las plantas son utilizadas como una opción para tratar ciertas afecciones de la piel y mucosas, y esto se debe primordialmente al alto costo de la medicina y a los efectos colaterales indeseables de estos medicamentos.

En este estudio se evaluó la actividad inhibitoria de las plantas nativas de uso popular en Guatemala contra hongos de muestras clínicas, en la que se realizó un tamizaje cualitativo para los hongos dermatofitos, filamentosos y un tamizaje cualitativo y cuantitativo para las

levaduras. La importancia de este estudio, radica en la comprobación de la actividad antifúngica y la Concentración inhibitoria mínima (CIM) de cinco extractos etanólicos (*Byrsonima crassifolia*, *Cassia reticulata*, *Litsea guatemalensis*, *Solanum nigrescens*, *Smilax domingensis*) contra cepas aisladas de pacientes (*Aspergillus flavus*, *Candida albicans*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton tonsurans*) y así poder determinar la actividad de extractos contra cepas silvestres.

3. ANTECEDENTES

3.1 Generalidades de las micosis

Las micosis superficiales se producen por contacto directo con el hongo o con una persona o animal infectado, afecta piel, anexos y mucosas según la localización, se manifiestan por afección pilar engrosamiento ungueal o por eritema y descamación son de evolución subaguda o crónica mas o menos pruriginosa (Arena, 2003).

Los hongos endógenos se encuentran en mucosas o tegumentos de individuos sanos y solo en condiciones especiales del pacientes cuando se encuentran inmunosuprimidos se convierten en patógenos en los seres humanos (Arena, 2003; Del Palacio, Garaul, & Cuetara, 2002).

Candidiasis que es mucho mas frecuente en la población y predomina en zonas tropicales y se considera como las mas frecuentes de las enfermedades por hongos, afecta a sujetos de cualquier edad, raza o sexo así como de cualquier medio socioeconómico u ocupación (Arena, 2003; De la Calle-Rodríguez, Santa-Vélez, & Cardona-Castro, 2012).

La candidiasis son infecciones primarias o secundarias ocasionadas por levaduras endógenas y oportunistas y pueden afectar piel y mucosas y estructuras profundas y órganos internos, las manifestaciones clínicas son localizadas, diseminadas o sistémicas, las alteraciones histopatológicas varían desde inflamación hasta supuración o granuloma, la evolución es aguda, subaguda o crónica (Arena, 2003).

Existe una gran variedad de géneros y especies de microorganismos capaces de causar infecciones en el hombre; los mas frecuentes son *Aspergillus flavus*, *Candida albicans*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton tonsurans* (Arena, 2003).

Estos microorganismos están asociados a una gran variedad de cuadros cutáneos que van desde crónicos hasta moderados y pueden presentar inflamación y pueden confundirse con eccemas y psoriasis, por lo cual su estudio permitirá la confirmación de estos dermatofitos (De la Calle-Rodríguez, *et al* 2012; Palacio, Garaul, & Cuetara, 2002).

3.2 Hongos oportunistas

Desde hace varios años se utiliza el término para designar a un grupo de infecciones por hongos que viven normalmente como saprobios en el ambiente o cavidades naturales de los seres humanos siempre ha existido una relación con el ser humano y los microorganismos y nos hemos encontrado expuestos a ellos desde hace miles de años y que han causado serios daños a la salud. Los microorganismos saprófitos ha pesar de desarrollarse dentro del hospedero, no producen daño alguno e incluso pueden ser beneficiosos, pero algunas veces dependiendo del hospedero, en especial en pacientes inmunocomprometidos con enfermedades de base severas, terapias prolongadas, o bien, con factores predisponentes al desarrollo de estas infecciones y con riesgo de posterior infección fúngica invasiva por lo que han emergido como una importante causa de morbi-mortalidad (Arena, 2003; Del Palacio, *et al.*, 2002).

Los agentes productores de este variado espectro de afecciones incluyen un amplio espectro de géneros y especies que año a año se va incrementado considerablemente. Estos son saprofitos de suelo, agua, aire y vegetales, abundan en restos de materia orgánica en descomposición y anteriormente consideradas inocuos, contaminantes de laboratorio o a procesos industriales (Del Palacio, *et al.*, 2002).

Estos hongos que se comportan como comensales para el hombre formando parte de su flora normal de la piel, mucosas, tracto digestivo o respiratorio, o bien, por aquellos que integran la micótica ambiental (suelo, agua, aire), estos hongos dependiendo de las oportunidades que le brinde el hospedador, como el de disminuir su capacidad defensiva, pueden colonizar, infectar y producir enfermedad y en ocasiones y según el estado inmunitario pueden invadir tejidos y producir alteraciones que pueden llevar a la muerte (Arena, 2003).

Dentro de las micosis oportunistas se encuentran la *Candidiasis*, *Aspergillosis*, *Hialohifomicosis*, *Feohifomicosis*, *Zigomicosis* e infecciones por otros hongos levaduriformes, siendo las tres primeras las de mayor importancia (Arena, 2003; Ozaeta, Guancín, & Flores, 2008).

3.3. Hongos del estudio

3.3.1 *Aspergillus flavus*

Hongo filamentoso oportunista que causa el 95% de las infecciones, pueden causar enfermedades pulmonar alergia o invasora, aspergiloma, y otros órganos o localizarse como onicomycosis, queratitis y micetoma. Los hongos del género *Aspergillus* son omnipresentes que viven como saprofitos en el suelo, vegetales en descomposición y cualquier tipo de materia orgánica, como pintura fresca, alimentos enlatados abiertos, *Aspergillus flavus* se desarrolla sobre granos produce hepatotoxinas y aflatoxinas carcinógenas (Arena, 2003).

Las colonias son de color verde-amarillo, la textura de las colonias es pulverulenta con surcos radiales, rugosos o granulados, ocasionalmente algodonosas en el centro o margen de la colonia, el reverso de la colonia es incoloro. Los conidióforos no ramificados de pared gruesa, hialinos, rugosos, de ≥ 1 mm de longitud y de 10 a 20 μm de diámetro. Las vesículas son globosas o subglobosas de 10 a 65 μm de diámetro produciendo fiáldes uniobiserialadas alrededor de la vesícula. Los conidios son de color verde amarillentos, lisos o finamente rugosos, esféricos o subesféricos con un diámetro de 3.5 a 4.5 μm de diámetro (Guevara, Urcia, & Casquero, 2007).

3.3.2 *Candida* spp.

La Candidiasis representa una enfermedad oportunista y la infección puede ser primaria o secundaria ocasionada por un miembro del género *Candida*. Las manifestaciones clínicas son variadas, desde aguda, subaguda y crónica a episódica, la infección puede localizarse en la boca, garganta, piel, cuero cabelludo, vagina, dedos de las manos, uñas, bronquios, etc. Puede causar irritación, inflamación a supuración crónica y aguda (Rippon, 1990).

Candida albicans es un hongo polimórfico debido a que puede presentar morfología levaduriforme o bien crecer como hongo filamentoso formando hifas verdaderas, este hongo presenta levaduras ovaladas o globosas, gemantes con tamaños distintos, además puede presentar pseudomicelio y micelio verdadero, es un hongo de crecimiento rápido de 24 a 48 horas, que crece perfectamente a 27°C y a 37°C (Logemann, 1995).

Su colonia es de color crema, pastosa y lisa, en algunas cepas dentro del medio de cultivo se puede observar la presencia de raicillas que salen del reverso de la colonia lo cual es bastante característico de *Candida albicans* (De la Calle-Rodríguez, *et al.*, 2012; Logemann, 1995).

La morfología no es concluyente por lo que es necesario realizar pruebas como la producción de tubos germinales, formación de clamidosporas y la asimilación de carbohidratos por la técnica del auxonograma de carbono (Logemann, 1995).

3.3.3. Dermatofitos

Son hongos filamentosos, queratinofílicos pertenecientes a la clase Eumycetes, con tres géneros que se agrupan según su hábitat: los antropofílicos, que causan infección en el ser humano, los zoofílicos, asociados con animales y los geofílicos, que se relacionan con material queratináceo. Los dos primeros infectan el estrato córneo y se consideran parásitos obligados (De la Calle-Rodríguez, *et al.*, 2012)

Según la Organización Mundial de la Salud los dermatofitos son un grupo de hongos filamentosos constituido por tres géneros (*Epidermophyton*, *Trichophyton* y *Microsporum*) que comprenden 40 especies (Del Palacio, *et al.*, 2002).

Con el fin de determinar la frecuencia de las infecciones debidas a hongos dermatofitos se han realizado estudios en diferentes centros hospitalarios en Guatemala para ampliar más la información epidemiológica sobre los dermatofitos y sus agentes etiológicos (Martínez, Matta, Carias, Porrás, Logemann, & Arenas, 2012).

3.3.4 Género *Trichophyton*

El género *Trichophyton* afecta de varias formas, principalmente las manos, uñas, cabeza, cuerpo, y puede afectar ha niños y adultos (Arena, 2003).

Este género presenta una serie de características como; colonias con aspecto de cera, planas o algodonosas, blancas, rosáceas, amarillentas, crema o marrón, el reverso puede ser crema, marrón, rojo, violeta o amarillo y se producen mediante macro y microconidias táticas terminales o a ambos lados de hifas septadas indiferenciadas. Las macroconidias tienen dos o más células generalmente de pared fina y lisa, hialinas con forma cilíndrica. Las microconidias son hialinas y de pared lisa y fina unicelulares con forma ovoide, o piriforme (De la Calle-Rodríguez, *et al.*, 2012; Ozaeta, *et al.*, 2008). Incluyen los siguientes géneros:

- *Trichophyton mentagrophytes*

Este género posee múltiples variedades morfológicas, las cepas antropófilas que presentan crecimiento moderado de 7 a 10 días, y su colonia en medio Sabouraud a 25°C, en su superficie es granulosas o algodonosas de color blanco cremoso y purulentas, con márgenes radiados; en el reverso hay color rojo o café marrón y se observa abundancia de microconidios esféricos y cilíndricos de paredes delgadas y frecuentemente se observan hifas en espiral (Arena, 2003).

- *Trichophyton rubrum*

Esta especie es la más frecuente con morfología microscópica variable, presenta un crecimiento moderado de 14 días y su colonia en medio Sabouraud a 25°C, genera colonias de color blanco, algodonosas, con un pigmento rojizo o rojo oscuro en el reverso, algunas cepas producen un pigmento melanoide que se difunde en el medio, presentan también cepas granulosas y plegadas, los microconidios pueden ser numerosas o escasos, son ovales y nacen a los lados de las hifas pectinadas (Arena, 2003).

- *Trichophyton tonsurans*

Esta especie esta en aumento por infecciones, presenta crecimiento moderado de 4 a 14 días, y su colonia en medio Sabouraud a 25°C, da lugar a colonias pulverulentas que se

pliegan, el color de la superficie puede ser blanco, gris, o amarillo, por lo general presenta un color café marrón oscuro en el reverso. Las macroconidias son numerosas y de tamaño variable, nacen a los lados de las hifas o en brazos cortos, se disponen en ángulos rectos, son comunes las clamidosporas e infrecuente los microconidios de paredes delgadas y lisas con algunas hifas en espiral (Arena, 2003).

3.3.4 Género *Microsporum* spp.

Es un hongo filamentoso queratinófilo incluido en el grupo de dermatofitos, el hábitat natural de algunos de los *Microsporum* spp. es de suelo, afectan principalmente a animales y humano, *Microsporum* spp. tiene la capacidad de degradar la queratina y por lo tanto puede residir en la piel y la cabeza y raras veces en las uñas y sigue siendo invasivo. Presentan crecimiento moderado a rápido entre 6 a 10 días, presentan color blanco amarillento a café, poseen escasos microconidios y macroconidias (Skerlev, & Miklič, 2010). Incluye los siguientes géneros:

- *Microsporum canis*

Se caracteriza por colonias de crecimiento rápido entre 5 a 8 días y su colonia en medio Sabouraud a 25°C, se puede apreciar una colonia blanca algodonosa, radiada de superficie plana y abundantes hifas aéreas que dan un aspecto veloso al reverso presenta un color amarillo naranja a café, se observa macroconidias fusiformes con doble pared en los macroconidias, se puede observar hifas en raqueta pectinadas y clamidoconidios (Arena, 2003; Logemann, 1995).

- *Microsporum gypseum*

Es el dermatofito geofílico causante de tinea corporis y capitis de mayor importancia el cual desarrolla colonias de crecimiento rápido y su colonia en medio Sabouraud a 25°C de color canela o ante y textura pulverulenta, presenta microconidios fusiformes con puntas romas, no presenta doble pared, aparentemente sus septos van de pared a pared, presenta macroconidios escasos, piriformes, adheridos a lo largo del micelio (García, Ruiz, García, & Linares, 2004; Logemann, 1995).

3.3.5 Género *Epidermophyton*

Afecta con mayor frecuencia la piel y en casos raros las uñas, no hay informes de daño a nivel de piel cabelluda, dentro de este género únicamente hay una especie de interés médico la cual es *Epidermophyton floccosum* (Logemann, 1995).

- *Epidermophyton floccosum*

Es un hongo dermatofito antropofílico, que se relaciona más frecuentemente con tiñas de la ingle, se caracteriza por colonia radiada y finamente pulverulenta de crecimiento rápido 5 a 8 días y su colonia en medio Sabouraud a 25°C, es de color verdoso (caqui), y en el centro puede presentar un penacho blanco algodonoso. Microscópicamente presenta macroconidios septados en forma de mazo y dispuestos en grupos o aislados, se puede observar clamidosconidios aislados o en cadena (Arena, 2003; Logemann, 1995).

3.4 Tratamiento antifúngico

Es toda sustancia que tiene la capacidad de evitar el crecimiento de algunos tipos de hongos, o cualquier sustancia capaz de producir una alteración en las estructuras de una de una célula fúngica que consiga inhibir su desarrollo, alterando su viabilidad o capacidad de supervivencia, directa o indirectamente, lo que facilita el funcionamiento de los sistemas de defensa del huésped. (Carrillo, Brió, & Quindós, 2001; Bodey, 1992)

3.4.1 Compuestos azólicos

- Definición

Los compuestos azólicos son compuestos sintéticos que se pueden clasificar como imidazoles o triazoles, de acuerdo con el número de átomos de nitrógeno en el anillo azólico de cinco elementos, según se indica más adelante. Los imidazoles constan de cetoconazol, miconazol y clotrimazol. Estos últimos dos fármacos se usan ahora sólo para el tratamiento tópico. Los compuestos triazólicos incluyen itraconazol, fluconazol, voriconazol y posaconazol (Carrillo, Brió, & Quindós, 2001; Bodey, 1992).

- Mecanismo de acción

La actividad antimicótica de los fármacos azólicos es producto de la disminución de la síntesis de ergosterol por inhibición de las enzimas del citocromo p450 del hongo. La toxicidad selectiva de los fármacos azólicos es producto de su mayor afinidad por enzimas del citocromo p450 micóticas que de las humanas. Los imidazoles muestran un menor grado de selectividad que los compuestos triazólicos, lo que contribuye a su mayor incidencia de interacciones farmacológicas y efectos secundarios. La resistencia a los compuestos azólicos ocurre por mecanismos múltiples (Carrillo, *et al.*, 2001; Katzung, *et al.*, 2010).

Cada vez se informa de cifras más altas de cepas resistentes, lo que sugiere que el uso creciente de este fármaco para profilaxis y tratamiento puede estar produciendo selección de resistencia farmacológica clínica en ciertos contextos (Bodey, 1992; Rueda, 2002).

- Uso clínico

El espectro de acción de los medicamentos azólicos es amplio e incluye levaduras del género *Candida*, micosis endémicas (blastomicosis, coccidioidomicosis, histoplasmosis), dermatofitosis y, en el caso de itraconazol y voriconazol, incluso aspergilosis. También son útiles en el tratamiento de microorganismos intrínsecamente resistentes a la anfotericina B, como *Pseudallescheria boydii* (Bodey, 1992; Rueda, 2002).

- Interacciones farmacológicas

Todos los fármacos azólicos afectan al sistema de enzimas del citocromo p450 en los mamíferos hasta cierto grado y, en consecuencia, son susceptibles a interacciones farmacológicas (Rueda, 2002).

3.4.2 Cetoconazol

El cetoconazol fue el primer fármaco azólico oral introducido al uso clínico. Se distingue de los compuestos triazólicos por su mayor propensión a inhibir las enzimas del citocromo P450 en mamíferos; es menos selectivo para el P450 de los hongos que los compuestos azólicos más nuevos (Bailey, Krakovsky, & Rybak, 1990; Rueda, 2002).

El cetoconazol es eficaz en el tratamiento de las infecciones cutáneas causadas por hongos del género *Epidermophyton*, *Microsporum* y *Trichophyton*. Las infecciones de la piel lampiña a menudo responden a una dosis diaria oral de 200 mg en dos a tres semanas. La piel palmar y plantar tiene respuesta mas lenta y a menudo requiere de cuatro a seis semanas a dosis a 200 mg cada 12 h. Las infecciones de cabello y uñas pueden requerir todavía más tiempo antes de resolverse, con observación de bajas tasas de curación para la tiña de la cabeza (Bailey, *et al.*, 1990; Katzung, *et al.*, 2010).

3.4.3 Itraconazol

El itraconazol es un triazol emparentado con el cetoconazol, se administra por vía oral o tópica, la absorción del fármaco aumenta por la presencia de alimentos y un pH gástrico bajo. Como otros derivados azólicos liposoluble, interactúa con enzimas microsómicas hepáticas, aunque en menor grado que el cetoconazol. Una importante interacción farmacológica es la disminución de la biodisponibilidad del itraconazol cuando se administra en combinación con rifamicinas (rifampicina, fabutina, rifapentina). No afecta la síntesis de esteroides de los mamíferos y sus efectos en el metabolismo de otros medicamentos con depuración hepática son muchos menores que los de cetoconazol (Del Pilar, 2000; Davey, 1990; Bailey, *et al.*, 1990).

Si bien el itraconazol muestra potente actividad antimicótica, su eficacia puede ser limitada por la menor biodisponibilidad. Las fórmulas más nuevas, incluso un líquido oral y una presentación intravenosa, han hecho uso del ciclodextrano como molécula portadora para aumentar la solubilidad y biodisponibilidad. Tiene mala penetración en el líquido cefalorraquídeo. El itraconazol es un compuesto azólico ideal para el tratamiento de enfermedades por hongos dimorfos de *Histoplasma*, *Blastomyces* y *Sporothrix*, *Aspergillus* sp, se usa ampliamente en el tratamiento de las dermatofitosis y onicomicosis (Davey, 1990; Queiroz-Telles, McGinnis, Salkin, & Graybill, 2003).

3.4.4 Fluconazol

Muestra un alto grado de hidrosolubilidad y buena penetración al líquido cefalorraquídeo, su biodisponibilidad oral es alta. Las interacciones farmacológicas son también menos frecuentes porque el fluconazol tiene el efecto más débil de todos los

compuestos azólicos sobre las enzimas microsómicas hepáticas. Por su menor interacción con enzimas hepáticas y mejor tolerancia gastrointestinal, el fluconazol tiene el índice terapéutico más amplio de los compuestos azólicos, que permite una dosificación más intensiva en diversas infecciones micóticas. El fármaco está disponible en forma oral e intravenosa y se utiliza a dosis de 100 a 800 mg/día. El fluconazol es el compuesto azólico ideal para el tratamiento y la profilaxis secundaria de la meningitis criptocócica (Del Pilar, 2000; Gubelin, De la Parra, & Giesen, 2011).

El fluconazol es el fármaco de uso más frecuente para el tratamiento de la candidosis mucocutánea. Su actividad contra hongos dimorfos se limita a coccidioidosis y en particular a infección meníngea, donde la dosis alta de fluconazol a menudo obvia la necesidad de uso de la anfotericina B intratecal. Se ha demostrado que el uso profiláctico del fluconazol disminuye las enfermedades micóticas en individuos que recibieron trasplantes de médula ósea y pacientes con sida (Del Pilar, 2000; Gubelin *et al.*, 2011).

3.4.5 Voriconazol

El voriconazol está disponible en presentaciones intravenosa y oral. La dosis recomendada es de 400 mg/día. El fármaco se absorbe bien por vía oral, con una biodisponibilidad que rebasa 90% y muestra menos unión a proteínas que el itraconazol. Su metabolismo es predominantemente hepático. El voriconazol es un inhibidor de la CYP3A4 de mamífero importante en clínica. Como resultado, se requiere disminución de la dosis de varios medicamentos cuando se inicia voriconazol, e incluyen ciclosporina, tacrolímús e inhibidores de la reductasa de 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) que es una enzima que controla la cantidad de síntesis de colesterol. (Cuenca-Estrella, & Rodríguez-Tudela, 2003; Gubelin *et al.*, 2011).

Las toxicidades observadas incluyen exantema y aumento de enzimas hepáticas, los trastornos visuales son frecuentes y ocurren en el 30% de los pacientes que reciben voriconazol intravenoso e incluyen visión borrosa y cambios de color o la brillantez. Estos cambios visuales suelen presentarse inmediatamente después de una dosis de voriconazol y se resuelven en 30 minutos. Puede observarse dermatitis por fotosensibilidad en pacientes que reciben el tratamiento crónico oral (Cuenca-Estrella, & Rodríguez-Tudela, 2003). El

voriconazol es similar al itraconazol en su espectro de acción, con actividad excelente contra *Candida* sp y hongos dimorfos, el voriconazol es menos toxico que la anfotericina B y constituye el tratamiento ideal de la aspergilosis invasora (Gubelin *et al.*, 2011).

3.4.6 Posaconazol

El posaconazol es el triazol más reciente en recibir autorización de unos en Estados Unidos. Esta disponible sólo en fórmula oral líquida y se usa a dosis de 800 mg/día dividida en tres o cuatro tomas. La absorción mejora cuando se toma con alimentos ricos en grasa. El posaconazol se distribuye con rapidez en los tejidos y da como resultado cifras tisulares altas, pero concentraciones séricas relativamente bajas. No se han comunicado aún cambios visuales pero sí interacciones farmacológicas con cifras mayores de sustratos de la CYP3A4, como tacrolímús y ciclosporina (Carrillo, *et al.*, 2001; Gubelin *et al.*, 2011).

El posaconazol es el miembro de la familia de compuestos azólicos de espectro más amplio con actividad contra la mayor parte de levaduras del género *Candida* y *Aspergillus*. Es el único compuesto azólico con actividad significativa contra los fármacos causales de la actinomicosis o mucormicosis. Actualmente tiene autorización como tratamiento de rescate en la aspergilosis invasora, así como para la profilaxis de infecciones micóticas durante la quimioterapia de inducción por leucemia y para pacientes de trasplante halógeno de médula ósea con enfermedad de injerto contra hospedador (Carrillo, *et al.*, 2001).

3.5 Etnobotánica

La Etnobotánica es una parte de la ciencia botánica que recoge los saberes referidos a los usos de las plantas por las comunidades humanas, estudia el uso popular de la flora o naturaleza a una región particular para usos medicinales, comestibles o utilitarios. La Etnobotánica es una disciplina auxiliar de la Botánica que estudia las relaciones entre las plantas y los seres humanos. La etnobotánica contribuye a recoger la información acerca de las relaciones y saberes que son elaborados por la comunidad humana con respecto al uso de las plantas (Mellen, 1974).

3.5.1 Medicina Tradicional en Guatemala

Las civilizaciones que habitaron el continente americano antes de la conquista europea tenían amplios conocimientos científicos y tecnológicos. Los primeros españoles en llegar mostraron su asombro ante lo avanzado de la medicina autóctona en estas latitudes, particularmente la herbolaria, que era una especialidad entre los aztecas y otros pueblos mesoamericanos (Villatoro, 1984; Girón, 1966).

La importancia de la medicina tradicional, se pone de manifiesto al comprobar que en la actualidad constituye una práctica vigente por una población mayoritaria que por razones económicas o socioculturales buscan en ella, alivio o solución a sus diferentes problemas de salud-enfermedad (Villatoro, 1984).

3.5.2 Estudios etnobotánicos en Guatemala

En el libro sobre la “Geografía de la República de Guatemala”, se hace una amplia descripción sobre la riqueza natural de nuestro país, y su importancia económica, incluyendo un listado de aproximadamente mil plantas de uso medicinal (Mejía, 1927).

En 1940 Dieseldorff describe la flora medicinal del departamento de Alta Verapaz, haciendo un interesante esfuerzo por clasificarla y anotar su uso, nombre y lengua kekchí (Diesseldorff, 1940). Posteriormente Roque profundiza sobre los principales usos de la flora médica del país (Roque, 1941). Ippisch aporta interesantes detalles sobre las principales fuentes económicas y medicinales del país (Ippisch, 1943).

En 1976 el Centro Mesoamericano de Estudios Sobre Tecnología Apropriada (CEMAT), inicia con las actividades de detección etnobotánica en lo referente a las plantas medicinales en Guatemala en una forma sistémica, impulsando desde sus inicios por parte de científicos y técnicos nacionales en el desarrollo sostenible y conservación del ambiente y los recursos naturales (Villatoro, 1984).

Se ha realizado estudios sobre la medicina tradicional en Guatemala en las que se realizaron encuestas sobre plantas medicinales realizadas en mercados municipales en diferentes regiones del país, presentando un informe sobre las plantas más comúnmente utilizadas por las comunidades en las regiones del país, a partir de estas encuestas se elaboró una lista básica de las plantas de uso popular, además de presentar varios estudios realizados por otros investigadores sobre el uso de plantas medicinales (Cáceres, & Sapper, 1977).

En 1984, se publica una breve descripción botánica de sesenta y tres especies vegetales, en donde hace mención a los usos medicinales de varias de las plantas que describe, también publica un estudio sobre Loranthaceas, en donde recomienda que se hagan estudios sobre las propiedades curativas de las mismas (Pöll, 1984).

En 1988 se realizó un trabajo sobre plantas medicinales y alimenticias en la región semiárida del nororiente de Guatemala, en el cual se presentan los usos de setenta y nueve especies vegetales (Ronquillo, Melgar, Carrillo & Martínez, 1988). Según Cáceres & Samayoa (1990), por detección etnobotánica y revisión bibliográfica demuestra que hay por lo menos disientas veintitrés plantas que se utilizan para tratar infecciones en Guatemala.

Las plantas constituyen la herramienta principal para la práctica de la medicina natural. Existe un inventario nacional con alrededor de mil cuatrocientas 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 doscientos (Cáceres, 1996).

3.6 Plantas seleccionadas para el estudio

Debido a que han demostrado actividad antifúngica, antimicrobiana y otras cualidades terapéuticas se escogieron las siguientes cinco plantas nativas de uso popular en Guatemala:

3.6.1 *Byrsonima crassifolia* Kunth

- Familia: *Malpighiaceae*

- Nombres populares

Nance, chi, craboo, nanche, nanzin, tapal, zacpah (Cáceres, 2009).

- Descripción botánica

Es un árbol tropical de la familia Malpighiaceae de 3-10 m de alto, copa redondeada extendida, tronco recto, corteza café, rugosa, rosada por dentro, hojas siempre verdes, opuestas, ovaladas, de 5-20 cm de largo, puntiagudas. Flores de 5 pétalos, anaranjadas o amarillas, numerosas en grupos (Cáceres, 2009; Martínez-Vázquez, González-Esquinca, Cazares-Luna, Moreno, & García-Argaez, 1999).

- Hábitat

En Guatemala se ha descrito en Alta Verapaz, Baja Verapaz, Chiquimula, El Progreso, El Quiché, Escuintla, Huehuetenango, Izabal, Jalapa, Petén, Quetzaltenango, Retalhuleu, San Marcos, Santa Rosa, Suchitepéquez y Zacapa. Crece en un clima cálido y húmedo, tropical o subtropical, suelo rocoso, arenoso y alcalino, se propaga por semilla. Ampliamente distribuido en varias regiones de México, Centro y América del Sur, se ha utilizado con fines medicinales desde tiempos prehispánicos por diversos grupos étnicos por ejemplo los indios de Oaxaca y los zoques, tzeltales y tzotziles pueblo de Chiapas, México (Cáceres, 1996; Martínez-Vázquez, *et al.*, 1999).

- Usos y propiedades medicinales

La corteza y las flores se usan por vía oral para tratar afecciones respiratorias, digestivas, dolor de muelas, hemorragias, mordedura de culebra, parásitos y favorecer el parto y la expulsión de la placenta, y producción de leche, úlceras. El fruto se utiliza para tratar fiebres y las semillas para la disentería, por vía tópica se usa para tratar afecciones dermatomucosas, se le atribuye la propiedad acaricida, antifúngica, antineurálgica, emenogoga, febrífuga, galactogoga y tónica (Cáceres, 2009; Martínez-Vázquez, *et al.*, 1999).

- Farmacología experimental

Estudios antimicrobianos demuestran que el extracto acuoso de hojas, corteza y raíz es activo contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. La tintura de corteza es activo contra *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Candida albicans*. La decocción de corteza es activa contra *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton. rubrum* (Cáceres, 2009; Geiss, Heinrich, Hunkler, & Rimpler, 1994).

- Composición química

La corteza contiene taninos, glucósidos, saponinas, sesquiterpenlactonas y triterpenos, flavonoides y derivados piperólico podría ayudar en la modulación y motilidad gastrointestinal con la reducción de los efectos secundarios anticolinérgicos, además, algunos triterpenos de *Byrsonima crassifolia* se ha informado de efectos antiinflamatorio, los fenoles y los galos flavonoides son antioxidantes antiséptico y inmunomoduladores (Bejar, Reyes-Chilpa, & Jimenez-Estrada, 2000; Cáceres, 2009).

Las hojas contienen saponinas, esterole insaturados, cadernólidos, bufadienólicos, flavonoides (catechina, epicatechina, guayaverina, hiperina, quecetina, galoilgalactósido), leucoantocianinas, taninos, polifenoles, triterpenoides, terpenos, éster aromático y glicolípidos (Cáceres, 2009).

La composición química de la fruta de nance incluye un gran número de azúcares, proteínas, minerales, vitamina C, riboflavina, grasas, fibras y aceites volátiles. La composición de los aceites volátiles incluyen una alta concentración de 2-butanona, y hexanoato de etilo, una cantidad media de etano 1,1-dietoxi, cantidades pequeñas de 2-butanol, n-hexanal, furfural, 2 heptanona, hept-3-eno-2 ona, acetato de etilo, butirato de etilo, metil hexanoato, butil hexanoato, octanoato de etilo, hexanoato de hexilo, decanoato de etilo, etilo cinamato, etilo dodecanoato, tetradecanoato de etilo, 1-metoxi 1-etoxi etano, y trazas de terpineno, nona-2-eno-4-ona, isoamilbutirato y octanoato de metilo (Bejar, *et al.*, 2000).

3.6.2 *Litsea guatemalensis* Mez

- Familia: *Lauraceae*

- Nombres populares

Laurel, agurel, laurelillo, spac-tzé, sufricalla, zit-zuch (Cáceres, 2009).

- Descripción botánica

Es un árbol de 6 m de alto, ramas delgada, café, hojas coriáceas, pecíolo 1.5 cm de largo, elíptico-lanceoladas, 8 cm de largo, agudas en la base, lustrosas glabras. Flores auxiliares, pedúnculo simple, solitarias, 15 mm de largo, 5-11 flores, se ha caracterizado por la presencia de tricomas largos y rectos (Cáceres, 2009; Jimenez-Perez, & Lorea-Hernández, 2008).

- Hábitat

El género incluye aproximadamente seiscientos veinte dos especies, distribuidas en países diferentes, sobre todo en las zonas tropicales y subtropicales. El género es representado por doce especies de América del Norte y cuatro especies de México y América Central (Simão da Silva, *et al.*, 2012; Jimenez-Perez, & Lorea-Hernández, 2008).

Es endémico en Guatemala, crece en bosques abiertos de pino y matorrales de 1,500-3,150 msnm; descrito en Chimaltenango, Guatemala, Jalapa, Sacatepéquez y Solola (Standley & Williams, 1964; Cáceres, 2009).

- Usos y propiedades medicinales

En la medicina popular, esta planta se utiliza para tratar la fiebre, escalofríos, artritis, e infecciones del aparato digestivo, sistema respiratorio, carencia de leche en la madre e hinchazón, tópicamente se usa en lavados y baños para cansancio, úlceras, piernas hinchadas epilepsia, se le atribuye propiedades aromáticas, antiséptica astringente, balsámica, carminativa, emenagoga, emoliente, estimulante febrífuga y pectoral (Cáceres, 2009).

- Farmacología experimental

Presenta actividad antibacterial, antifúngica, antioxidante y propiedades antidepressivas. Estudios antifúngico demuestran que la tintura de las hojas de *Litsea guatemalensis* presenta moderada actividad contra *Candida albicans*, *Epidermophyton floccosum* y *Microsporium canis* (Cáceres, 2006).

Posee actividad en procesos inflamatorios por varios constituyes como pinocembrina, que presenta actividad anti-inflamatoria, además de proporcionar neuroprotección contra lesión isquémica cerebral en ratas, la escopoletina, que ha demostrado ser igualmente beneficioso como un posible agente preventivo y terapéutico para las enfermedades gastrointestinal, enfermedades inflamatorias del esófago, y el 5,7,3',4'- tetrahidroxisoflavolina, que presenta actividad inflamatoria y antinociceptiva, en la intervención terapéutica, inflamación y el dolor (Simão da Silva, *et al.*, 2012).

- Composición química

Contiene sustancias biológicamente activas, con más de doscientos sesenta y dos compuestos que incluyen amidas, alcaloides, flavonoides, butanolides, butenolactones, esteroides, monoterpenos, sesquiterpenos, triterpenos, y ácidos grasos. Su aceite esencial se compone principalmente de monoterpenos oxigenados (1,8-cineol, α -terpineol y linalool, además de los hidrocarburos monoterpenos (α -pineno, limoneno y γ terpineno) y sesquiterpenos (E-nerolidol, β -cariofileno y β -óxido de cariofileno) (Agrawal, Choudhary, Sharma, & Dobhal, 2011; Simão da Silva, *et al.*, 2012; Vallverdú, Cruz, Cáceres, & Cañigüeral, 2005).

3.6.3 *Smilax domingensis* Willd.

- Familia: *Smilacaceae*

- Nombres populares

Zarzaparrilla, bejuco de la vida, cocolmea, china root, diente de chuco, palo de la vida (Cáceres, 2009).

- Descripción botánica

Es glabra, tallo rollizo con aguijones recurvados, hojas 1-6 veces más largas que ancha, ovadas, 5 nervios desde la base, umbelas estaminadas y pistiladas solitarias, pedúnculo más corto que el pecíolo, bayas 7-10 mm, rojas, rizoma leñoso (Cáceres, *et al.*, 2012).

- Hábitat

Smilacaceae es una familia que representada por el único género *Smilax* con cerca de doscientos cincuenta especies en todo el mundo presentes con veinte seis especies en Mesoamérica, ampliamente utilizado desde la antigüedad, es nativa de América tropical, que crece en las tierras bajas, en los bosques húmedos. En Guatemala se ha descrito en Alta Verapaz, Izabal, Petén, San Marcos y Santa Rosa, Progreso, Izabal, Jalapa, Jutiapa, Huehuetenango, Retalhuleu, Suchitepéquez (Cáceres, 1996; Cáceres, *et al.*, 2012).

- Usos y propiedades medicinales

Se usa para tratar anemias, afecciones digestivas, hinchazón, malaria, dolor de riñones, enfermedades de la sangre y enfermedades venéreas, hepatitis, reumatismo y tumores, antiinflamatoria, antifúngica, antiséptica, se utiliza como diurético y tónico. Se aplica tópicamente para tratar afecciones ateromatosas (alergia, eccema, liquen plano, tinea, psoriasis) (Cáceres, *et al.*, 2012).

- Farmacología experimental

La tintura del rizoma de *Smilax domingensis* es activa contra bacterias Grampositivo y Gramnegativo, la decoración y el extracto metanólico son activos contra *Candida albicans*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis* y *Trichophyton mentagrophytes*. El extracto etanólico tiene actividad antioxidante y hepatoprotectora, estudios clínicos con 50 pacientes con candidiasis vaginal demuestran que los óvulos de tintura se comportan de forma similar a la Nistatina, en otro ensayo se probó una crema a base de tintura en trabajadores que presentaban pie de atleta en todos se comprobó la infección por dermatofitos y levaduras y se demostró mejora (Cáceres, 2009; Cáceres, *et al.*, 2012).

- Composición química

El principal componentes encontrados y compartidos por la mayoría de las especies del género son las saponinas esteroidales, fitoesteroles y triterpenoides, pero la especie de *Smilax domingensis* presenta raíces largas y rizoma pequeño, contiene alcaloides, aceite esencial, saponinas, esteroides, flavonoides, leucoantocianinas, taninos, polifenoles, resinas, β -sitosterol, ácido sasápico, polifenoles y estigmasterol (Cáceres, *et al.*, 2012).

3.6.4 *Cassia reticulata* Willd.

- Familia: *Fabaceae-Caesalpinioidea*

- Nombres populares

Barajo, palo de jiote, varajilla, sambran, majaguillo, matapasto, matapasto grande, bajagua, galve, galve arisco, galvecillo, caballo, martingalvis, dorancé (Cristancho, Mejía, & Acosta, 2008; Trujillo, & Madrigal, 2005).

- Descripción botánica

Arbusto arborecente de 2-8 m, casi totalmente puberulentos, hojas en su mayoría de 25-70 cm de largo, folíolos 7-13 pares, más grandes distalmente, oblongos u oblongo, ramas gruesas, puberulentas o glabras; sus flores en panículas de racimos terminales cada una cubierta por un cono de brácteas imbricadas amarillo-anaranjado, racimos incurvados, con numerosas flores (Trujillo, & Madrigal, 2005).

- Hábitat

En bosques, ribieras y playas; con frecuencia se establece en el agua, en lugares abiertos, en tierras bajas macrotérmicas, húmedas y algunas veces con maleza que forma extensos matorales (Trujillo, & Madrigal, 2005).

- Usos y propiedades medicinales

La infusión de la hojas se utiliza como analgésico, como antipirética, las hojas y flores

se usan para el dolor de estomago, se utiliza obstrucciones del higado, para tratar el reumatismo y en irregularidades menstruales, la decocción de la hoja es efectiva contra hongos y daños en la piel (Dos Santos, & Vasconcelos, 2008; Muñoz, *et al.*, 2010).

- Farmacología experimental

El extracto de las hojas y flores tienen actividad antibacteriana, antifúngica, antiviral, hipoglicémica, antihistamínicas y insecticidas, estas sustancias han sido sistemáticamente para su uso terapéutico potencial (De Souza, Lima, Martins, & Salem, 2011).

Se ha utilizado en forma tradicional y empírica para tratar la diabetes tipo I y tipo II, en la que se ha demostrado que existe disminución en los niveles de glicemia, lo cual significa que la planta podría disminuir la glicemia en humanos (Cristancho, *et al.*, 2008).

- Composición química

Las antraquinonas son el mayor grupo de quinonas naturales, presentan actividades biológicas importantes y su presencia se ha reportado en casi todas las especies de *Cassia* estudiadas, *Cassia reticulata*, que describe el aislamiento y la identificación, alcaloides, taninos, glicósidos cardiotónicos, saponinas, antraquinonas (crisofanol), esteroides, triterpenos, sesquiterpenlactonas y flavonoides (Dos Santos, & Vasconcelos, 2008).

3.6.5 *Solanum nigrescens* Mart. & Gal.

- Familia: *Solanaceae*

- Nombres populares

Quilete, macuy, hierba mora, imut (Cáceres, 2009).

- Descripción botánica

Hierba de 0.5 a 2 m de alto, tallo piloso, hojas en pares o solitarias, diferentes en tamaño, similares en forma, lanceoladas, de 3-18 cm. de largo, ápice acuminado, base atenuada. Inflorescencia intermodal, racemiforme, cáliz lobulado, corola blanca o lila, mancha

oscura en la base, filamentos ciliados, ovario glabro, fruto globoso y semillas pequeñas (Gentry & Stanley, 1974).

- Hábitat

Es nativa de México a Costa Rica, crece en matorrales y bosques mixtos de 1500-3900 msnm. En Guatemala se ha descrito en Chiquimula, El progreso, Escuintla, Huehuetenango, Quetzaltenango, Sacatepéquez, Sololá y San Marcos. También se ha encontrado en el sureste de Estados Unidos de América, Chile y Argentina. Está presente en climas cálido, semiseco y templado desde el nivel del mar hasta los 3000 m. Se encuentra asociada a vegetación perturbada de bosque tropical perennifolio, matorral xerófilo, bosques de encino, de pino y mixto de pino-encino (Gentry & Stanley, 1974; Linares, Flores, & Byre, 1988; Argueta, 1994).

- Usos y propiedades medicinales

La decocción y tintura son activas contra *Candida albicans* y *Candida neoformans*, esta planta inhibe el 66% de las cepas *Candida albicans* aisladas en lesiones diferente región anatómica, la decocción es antidematofítica (Cáceres, *et al.*, 1991b).

- Farmacología experimental

La actividad alcaloide de *Solanum nigrescens* se le atribuye la actividad fúngica *Candida albicans*, insecticida e antiinflamatoria, además tiene una importante actividad analgésica y sedante; al parecer estas acciones las ejerce sobre las placas motoras sensitivas terminales, siendo de gran valor en la práctica clínica. También actúa de manera eficaz en los procesos dolorosos estomacales, con una eficacia igual o superior a otros medicamentos conocidos (Argueta, 1994; Cáceres, *et al.*, 1991a).

La decocción y tintura de hojas tiene efecto antimicótico contra *Candida albicans* y *Candida neoformans*, los extractos metanólicos de hojas secas de *Solanum nigrescens* tienen efecto inhibitorio sobre *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*, así como las hojas secas con etanol tienen propiedades antibióticas, se usan contra afecciones dematomucosas (Cáceres, *et al.*, 1991a; Girón, *et al.*, 1988).

- Composición química

Presenta alcaloides, esteroides policíclicos insaturados, saponinas, azúcares 2-desoxigenados, taninos, cardenólidos, ácido málico, riboflavina, tiamina, ácido ascórbico y sales minerales, la actividad antifúngica se le atribuye a la cantalosaponina (Argueta, 1994; He, *et al.*, 1994).

3.7 Técnicas de evaluación de la actividad antifúngica

3.7.1 Métodos de dilución

Las pruebas de dilución son utilizadas principalmente para determinar la Concentración mínima inhibitoria (CIM) de un extracto o de una sustancia pura. El método consiste en que a un cultivo del microorganismo en estudio se le inoculen cantidades específicas del antibiótico, preparado en concentraciones decrecientes en caldo o agar por la técnica de dilución seriada (Mahaffey, *et al.*, 1996).

- Dilución en caldo

En este método de dilución, 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. La concentración mínima del antibiótico que no muestre crecimiento es la medida del efecto antifúngico del mismo sobre el microorganismo (Mahaffey, *et al.*, 1996).

- Dilución en agar

Es considerado el método de referencia. En este método, se preparan diluciones de antibiótico y se mezclan con un determinado volumen de agar, para obtener las concentraciones deseadas. Estas son inoculadas con el microorganismo en estudio y luego incubadas para examinar si el organismo crece o no en cada una de las placas, con lo cual se

determina la concentración inhibitoria mínima para el antibiótico. Este método tiene la ventaja de que es simple y pueden ensayarse agentes solubles e insolubles en agua (Johnson, 2007).

3.7.2 Difusión en Disco

Tiene la característica de no requerir una dispersión homogénea en agua del extracto a probar, se utiliza un disco, agujero o un reservorio cilíndrico. El reservorio que contiene la muestra a probar se pone en contacto con un medio inoculado y después del período de incubación, el diámetro de la zona clara alrededor del reservorio (diámetro de inhibición) es medido. Este método fue originalmente diseñado para monitorear la cantidad de sustancias con características de antibióticos presentes en extractos crudos. Los métodos de difusión son muy utilizados en la investigación a pesar de ciertas dificultades, puesto que son modelos de baja credibilidad para muestras que sean de difícil difusión en el medio no existiendo relación entre el poder de difusión y la actividad antimicrobiana (Knapp & Moody, 1992

3.7.3 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 agar Sabouraud, inocular en medio de esporulación (Takashio), incubar a 27°C por 21 días, coleccionar las esporas, contarlas, estandarizar suspensiones de 1×10^5 esporas/mL y almacenar en viales estériles en refrigeración. Preparar caja de agar Sabouraud con 1.0 mg/ml del extracto o fracción; perforar cuatro agujeros de 5 mm de diámetro, inocular 30 µL de la suspensión de esporas e incubar a 27°C por 14 días. Por último se mide el diámetro (D) del halo de crecimiento en mm (Brancato, *et al.*, 1983; Véliz, Cruz, Gómez, García, Álvarez, Cáceres *et al.*, 2006).

3.7.4 Método de microdilución en placa

Este método fue aprobado por el Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), como un estándar para la medición de la susceptibilidad de bacterias y hongos hacia los agentes antibacterianos y antifúngicos. El Instituto de Estándares Clínicos de Laboratorio (CLSI),

desarrolló los Estándares de Referencia que describen detalladamente los parámetros experimentales para la correcta realización de CIM por microplacas, de esta forma, una mayor exactitud y reproducibilidad de los resultados (CLSI, 2002; CLSI, 2008; Lacasa, Mazuelos, & Espinel-Ingroff, 2997).

En este método se utilizan microplacas que contienen diferentes concentraciones de un determinado antibiótico. El organismo en estudio es inoculado en los diferentes pocillos de la microplaca y luego se examina si el organismo crece o no en cada una de las placas (Kollef, 2003).

Para inducir la formación de conidias y esporangiosporas todos los hongos deben ser cultivados en un medio específico (Sabouraud de doble concentración) y alcanzar una concentración de 5×10^4 células/mL y logrando bajo estos rangos resultados reproducibles de CIM. La interpretación de resultados se realiza visualmente en términos de turbidez (Lacasa, Mazuelos, & Espinel-Ingroff, 2997).

3.7.5 Método colorimétrico de Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazol (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 se produce una destrucción del anillo tetrazolio, formando cristales púrpura insolubles (Formazán), que después de ser solubilizados puede emplearse como una medida indirecta de viabilidad. y pueden medirse por espectrofotometría o de forma visual. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular (Burlingame, *et al.*, 1973; Rex, *et al.*, 2000; Brancato, *et al.*, 1983).

4. JUSTIFICACIÓN

En Guatemala, el clima tropical, las condiciones de vida de los habitantes favorecen las enfermedades de la piel y las mucosas, por esta razón las micosis superficiales de dermatofitos y levaduras son muy frecuentes, y se han convertido en un serio problema a nivel de salud.

Aunque pareciera estar disponibles muchas drogas para el tratamiento de micosis superficiales, estas suelen presentar efectos colaterales indeseables, como fiebre, anorexia, cefalea y náuseas, entre otros, o bien ser muy tóxicas; algunas son fungistáticos y no fungicidas. Por lo tanto, la búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento es importante ya que se necesita una sustancia activa que reduzca al máximo los efectos secundarios producidos por el tratamiento prolongado y que sea seguro y efectivo.

En la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, se han llevado a cabo estudios que tratan sobre la búsqueda de propiedades antifúngicas de plantas nativas en Guatemala, en las cuales algunas de ellas han demostrado actividad antifúngica en estudios anteriores utilizando la técnica macrométrica.

Este estudio permitió comprobar la actividad inhibitoria de cinco extractos de plantas nativas contra dermatofitos y levaduras por medio de la técnica micrométrica en placa, ya que es un método más confiable que el tradicional, así mismo los resultados obtenidos nos darán una mayor contribución al uso popular de las plantas medicinales en Guatemala. Se evaluó la actividad antifúngica y determino la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los extractos etanólicos de *Byrsonima crassifolia* (Corteza), *Cassia reticulata* (Hoja), *Litsea guatemalensis* (Hoja), *Solanum nigrescens* (Hoja) y *Smilax domingensis* (Rizoma) que presentaron actividad positiva contra cepas clínicas aisladas de pacientes, *Aspergillus flavus*, *Candida albicans*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton tonsurans*, y así poder determinar que dichas plantas se puedan utilizar como medicina natural y si no han adquirido algún tipo de resistencia y así facilitar el tratamiento de la población afectada en Guatemala

5. OBJETIVOS

5.1 General

Evaluar la actividad antifúngica *in vitro* de extractos etanólicos de plantas de uso medicinal en Guatemala.

5.2 Específicos

- 5.2.1 Determinar la actividad antifúngica de los extractos *Byrsonima crassifolia*, *Cassia reticulata*, *Litsea guatemalensis*, *Solanum nigrescens*, *Smilax domingensis*.
- 5.2.2 Establecer la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los extractos con resultados positivos.

6. HIPÓTESIS

Al menos una de las especies vegetales investigadas tiene actividad antifúngica significativa contra cepas clínicas de los hongos filamentosos, dermatofitos y levaduras.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Universo

Extractos etanólicos de plantas medicinales usadas popularmente en el tratamiento de infecciones dérmicas.

7.2 Muestra

Extractos etanólicos de las especies *Byrsonima crassifolia*, *Cassia reticulata*, *Litsea guatemalensis*, *Solanum nigrescens*, *Smilax domingensis*.

7.3 Recursos

7.3.1 Humanos

Tesista: Br. Yilka Azucel Quiñónez Mizrahí

Asesor: Lic. Armando Cáceres Estrada

Revisora: Lic. Isabel Gaitán

7.3.2 Recursos institucionales

- Laboratorio de Bioensayos Departamento de Citohistología, Escuela de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
- Laboratorio de Micología “Candelaria”.
- Laboratorio Dermatológico “INDERMA”.

7.3.3 Recursos materiales

Equipo

- Autoclave
- Balanza analítica
- Campana bacteriológica
- Estufa
- Incinerador

- Microscopio
- Refrigeradora 4 °C
- Vortex o agitador
- Incubadora a 27 °C
- Micropipeteadores automáticos unicanal
- Micropipeteadores automáticas multicanal
- Espectrofotómetro tipo lector ELISA con diferentes longitudes de onda
- Termómetro
- Impresora
- Computadora

Reactivos

- Agar Sabouraud
- Caldo Sabouraud doble
- Sulfato de Sodio (Na_2SO_4)
- Fosfato de Potasio monobásico (KH_2PO_4)
- Agua desmineralizada
- Buffer de Fosfatos
- Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio (MTT)
- Fluconazol
- Dextrosa
- Dimetil sulfóxido estéril (DMSO)
- Etanol 50%
- Etanol 70%
- Solución salina estéril
- Alcohol
- Aceite mineral
- Estándar de MacFarland 0.5

Materiales

- Asa bacteriológica en punta y en argolla
- Cajas de petri 100 x 15 mm
- Cámara de Neubauer
- Tubos Eppendorf 1.5 mL
- Erlenmeyer de 250 y 500 mL
- Gradillas
- Guantes desechables
- Papel mayordomo
- Papel parafilm
- Pinzas
- Imanes
- Tubos de vidrio con tapón de rosca 5 y 15 mL
- Placas con fondo en U de 96 pozos estériles
- Tips blancos y azules
- Jabón de manos
- Bolsas ziploc
- Algodón
- Gasa estéril
- Probetas

Cepas Clínicas

- *Aspergillus flavus*
- *Candida albicans*
- *Epidermophyton floccosum*
- *Microsporum canis*
- *Microsporum gypseum*
- *Trichophyton mentagrophytes*
- *Trichophyton rubrum*
- *Trichophyton tonsurans*

Extractos etanólicos

- *Byrsonima crassifolia* (Corteza)
- *Cassia reticulata* (Hoja)
- *Litsea guatemalensis* (Hoja)
- *Solanum nigrescens* (Hoja)
- *Smilax domingensis* (Rizoma)

7.4 Métodos

7.4.1. Recolección de muestra

Se recolectó dos especies vegetales que fueron tomadas desde su lugar de procedencia, *Cassia reticulata* se recolectó en Samayac, Suchitepéquez y *Solanum nigrescens* en Chimaltenango.

7.4.2 Obtención de los extractos

- Se secó el material vegetal en el horno, se molió y se tamizó el material por percolación con etanol.
- En un percolador previamente limpio y seco, se colocó un poco de algodón en la parte inferior y papel filtro de acuerdo al diámetro del percolador.
- Se pesó la cantidad de material vegetal a utilizar de acuerdo al tamaño del percolador.
- Se humedeció la cantidad de material vegetal con el disolvente adecuado para la extracción, utilizando un vaso precipitador.
- Se transfirió todo el material al percolador y se agregó disolvente hasta cubrir el material vegetal.
- Se dejó reposar el tiempo necesario para llevar a cabo la extracción, esto dependió del material vegetal, el disolvente y la temperatura de trabajo.
- Se abrió la llave de la parte inferior y se dejó gotear el líquido a una velocidad adecuada.
- Se recogió el líquido en un vaso de precipitador (erlenmeyer), se añadió suficiente disolvente extra, según se necesitó, hasta obtener el volumen de disolvente

agregado al inicio.

- Se colocó la solución obtenida en un balón, colocando el balón en el rotavapor.
- Se procesó la solución obtenida en el rotavapor a una temperatura de 45°C, hasta obtener el extracto.
- Se realizó el mismo procedimiento para el segundo material vegetal.
- Se guardaron los extractos en la desecadora hasta que llegaron a la sequedad.

7.4.3 Microdilución en placa: Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos de plantas contra hongos filamentosos y dermatofitos

La actividad contra hongos filamentosos se determinó por el método de referencia de actividad antifúngica de Brancato & Golding (1993), modificado por MacRae y colaboradores (1988). Que consiste en purificar el hongo en agar Sabouraud, según sea el crecimiento de cada hongo, luego se inoculó en medio Takashio (Sabouraud modificado para producción de conidias) estos se incubaron a 27°C por 21 días.

- Suspensión de conidias
 - Se preparó medio Takashio (Sabouraud modificado) con 0.6 g dextrosa, 0.3 g de NaSO₄, 0.3 g de KH₂PO₄, 0.03 g de peptona y 6.0 g de agar-agar.
 - Se disolvió 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.
 - Se sembró en este medio los hongos a ensayar que fueron previamente aislados; e incubar a 27°C durante veintiún días hasta obtener un crecimiento homogéneo (colonias uniformemente desarrolladas en el área de inoculó).
 - Se agregó a cada tubo 2 mL de agua destilada estéril y se desprendió el hongo con ayuda de un asa bacteriológica. La solución se filtro con la ayuda de un embudo y gasa estéril.
 - El material obtenido se trasvasó ha viales con tapón de rosca para luego agitar y contar conidias en cámara de Neubauer.

- La suspensión de conidias preparada presentó una concentración entre 1×10^4 y 1×10^8 conidias/mm³ (solución madre).
- Esta solución se almacenó, de acuerdo al tipo de hongo trabajado:
 - Dermatofitos: almacenamiento entre 4-8°C por varios días
 - Filamentosos: almacenamiento a -18°C.

- Preparación del extracto
 - Los extractos trabajados presentaron una concentración de 50 mg/mL, es decir se pesaron 50 mg de extracto en balanza analítica con 1 mL de DMSO para obtener una solución madre.
 - Se preparó caldo Sabouraud doble en tubos de 3 mL.
 - Previo a la inoculación en las placas, se ajustó la solución madre a una concentración de 5×10^4 células/mL.
 - Se tomaron 960 µL de caldo Sabouraud doble y 40 µL de la solución madre.

- Inoculación de las microplacas
 - Se elaboró un esquema de inoculación, con las cepas clínicas con cinco replicas, en placas de fondo en U, las cuales se encontraron distribuidas en filas designadas con letras (A-H) y 12 columnas numeradas.
 - Se añadieron 100 µL del extracto disuelto en el caldo Sabourand de concentración doble y 100 µL de suspensión del hongo a una concentración 5×10^4 células/mL.
 - Se añadieron 100 µL del antifúngico comercial llamado Fluconazol y 100 µL de suspensión del hongo a una concentración 5×10^4 células/mL.
 - Se añadieron 100 µL agua estéril (Control de esterilidad) y 100 µL de suspensión del hongo a una concentración 5×10^4 células/mL.
 - Se añadieron 100 µL Caldo Sabouraud (Control de crecimiento) y 100 µL de suspensión del hongo a una concentración 5×10^4 células/mL.
 - Se incubaron las placas a 31 °C.
 - Filamentosos: 72 hrs.
 - Dermatofitos: 7 días.

- Interpretación de resultados

Se llevo a cabo por la presencia de micelio indicó actividad negativa del extracto, y ausencia de micelio actividad positiva del extracto (Paz, 1998).

7.4.4 Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos de plantas contra hongos levaduriformes.

- Preparación del extracto

- Se pesaron 50 mg de extracto en balanza analítica con 1 mL de DMSO, para presentar una concentración de 50 mg/mL, y para obtener una solución madre.
- Se agregó Caldo Sabouraud doble en tubos de 3 mL.
- Se tomaron 960 µL de caldo sabouraud doble y 40 µL de la solución madre.

- Preparación del inóculo

- Se inocularon las cepas de *Candida albicans* por cuarenta y ocho horas, para obtener crecimiento.
- Se preparó una suspensión con solución salina para el inóculo con turbidez equivalente al Standard 0.5 de McFarland.

- Inoculación en placas

- Se elaboró un esquema de inoculación, con las cepas clínicas con cinco réplicas, en placas de fondo en U, las cuales se encontraron distribuidas en filas designadas con letras (A-H) y doce columnas numeradas.
- Se añadieron 100 µL del extracto disuelto en el caldo Sabourand de concentración doble y 100 µL de suspensión de la levadura.
- Se añadieron 100 µL del antifúngico comercial llamado Fluconazol y 100 µL de suspensión de la levadura.
- Se añadieron 100 µL de agua estéril (Control de esterilidad) y 100 µL de suspensión de la levadura.
- Se añadieron 100 µL caldo Sabouraud (Control de crecimiento) y 100 µL de suspensión de la levadura.

- Se incubaron las placas a 31°C, por veinticuatro horas.
- Interpretación de resultados

La presencia de turbidez en comparación con los controles, indicara actividad negativa del extracto y la ausencia de turbidez actividad positiva (Paz, 1998).
- Preparación del revelador

Se utilizó MTT como revelador, a una concentración de 0.4 mg/mL de MTT disuelto en un buffer de fosfatos (PBS). Se utilizó inmediatamente después de preparado para evitar la reacción a la luz.

 - La placa previamente incubada se le agregó 50 µL de revelador MTT a todos los pozos de la placa.
 - Se incubó por dos horas a 31°C en cámara húmeda y se leyó a una absorbancia de 492 nm con un filtro diferencial de 630 nm.
- Interpretación de resultados

Presencia de actividad antifúngica: absorbancia mayor de -0.02 ± 0.04 nm.

7.4.5 Determinación de la CIM

- Se añadió 200 µL del extracto disuelto en DMSO en la fila A.
- Se agregaron en todos los pozos, a excepción de la fila A, 100 µL de caldo Sabouraud doble.
- Se arrastró 100 µL del pozo 1A hacia el pozo 1B y así sucesivamente hasta llegar al pozo 1H. Finalmente del pozo 1H se tomó 100 µL de la suspensión y se descartó. De esa manera se obtuvo en la columna 1 con todas las diluciones del extracto a utilizar en miligramos/mililitro: 1.0, 0.50, 0.250, 0.125, 0.0625, 0.0312, 0.0156, 0.0078, 0.0039, 0.00195, 0.00097, 0.00049 y todos los pozos tendrán un volumen total de 100 µL.
- Se añadió 100 µL de la suspensión del hongo en todas las filas de la placa (A-H) y las columnas a utilizar.

- Se incubaron a 31°C por veinticuatro horas para los hongos levaduriformes de siete a catorce días a 31°C para los hongos dermatofitos.
- Se colocó en la placa los controles respectivos de esterilidad y crecimiento para validar los resultados obtenidos.

7.5 Diseño experimental

Diseño experimental fue totalmente al azar con cinco réplicas para cada tratamiento; las unidades experimentales fueron los hongos y los tratamientos los extractos (Spiegel, 1991).

El análisis de la prueba de hipótesis binomial fue a un nivel de significancia $\alpha=0.05$ de la siguiente manera:

Ho: $p = 0.5$ (No tiene efecto inhibitorio)

Ha: $p > 0.5$ (Si tiene efecto inhibitorio)

Se utilizó una distribución binomial, en donde se consideró que un extracto es bioactivo cuando inhiba cualquiera de los hongos, esperando que las cinco réplicas den el mismo resultado (Spiegel, 1991).

Con cinco réplicas, se espera que para rechazar Ho, se tenga los cinco éxitos (inhibición).

Se realizó la CIM de los extractos que presentaron efecto inhibitorio en la fase de tamizaje, el diseño y el análisis estadístico fue el mismo para cada dilución (cinco réplicas y prueba binomial).

8. RESULTADOS

En el presente estudio se investigaron cinco plantas estudiadas previamente por su actividad antifúngica, usadas popularmente por la población para afecciones dérmicas. Los extractos etanólicos de *Byrsonima crassifolia*, *Litsea guatemalensis* y *Smilax domingensis* 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).

Cuadro 1. Descripción de las plantas evaluadas en el estudio

Familia	Nombre Científico	Nombre común	Parte de la Planta	Procedencia
Malpighiaceae	<i>Byrsonima crassifolia</i> Kunth.	Nance	Corteza	Samayac, Suchitepéquez
Fabaceae	<i>Cassia reticulata</i> Willd.	Barajo	Hoja	Samayac, Suchitepéquez
Lauraceae	<i>Litsea guatemalensis</i> Mez.	Laurel	Hoja	Tecpán, Chimaltenango
Solanaceae	<i>Solanum nigrescens</i> Mart. & Gal.	Quilete	Hoja	Tecpán, Chimaltenango
Smilacaceae	<i>Smilax domingensis</i> Willd.	Zarzaparilla	Rizoma	Samayac, Suchitepéquez

Fuente: Datos experimentales, realizados en el Departamento de Citohistología, USAC. 2012-2013

Los extractos de *Cassia reticulata* y *Solanum nigrescens* fueron preparados 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 18.35% y 13.00 % respectivamente (Cuadro 2).

Cuadro 2. Porcentaje de rendimiento de los extractos etanólicos

Nombre Científico	Parte	Numero de Herbario*	Rendimiento (%)
<i>Byrsonima crassifolia</i>	Corteza	31	29.50
<i>Cassia reticulata</i>	Hoja	1101	18.35
<i>Litsea guatemalensis</i>	Hoja	894	26.00
<i>Solanum nigrescens</i>	Hoja	1111	13.00
<i>Smilax domingensis</i>	Rizoma	662	34.1

Fuente: Datos experimentales, realizados en el Departamento de Citohistología, USAC. 2011-2013

* Herbario CFEH de Laboratorio Farmaya

Se utilizaron seis hongos dermatofitos, un hongo filamentoso y dos levaduras provenientes de aislamientos clínicos de pacientes debidamente identificados, procedentes de los ceparios Candelaria e INDERMA (Cuadro 3).

Cuadro 3. Tipo de hongo, aislamiento y procedencia

Hongos	Lugar de Aislamiento	Procedencia
<i>Aspergillus flavus</i>	Uña de mano	Laboratorio Candelaria
<i>Candida albicans</i>	Secreción vaginal	Laboratorio Candelaria
<i>Candida albicans</i>	Uña de mano	Laboratorio Candelaria
<i>Epidermophyton floccosum</i>	Uña de pie	Laboratorio Candelaria
<i>Microsporium canis</i>	Cabeza	Laboratorio Candelaria
<i>Microsporium gypseum</i>	Brazo	Laboratorio Candelaria
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Mano	Laboratorio Candelaria
<i>Trichophyton rubrum</i>	Piel del pie	Laboratorio Candelaria
<i>Trichophyton tonsurans</i>	Piel cabelluda	Laboratorio INDERMA

Fuente: Datos obtenidos en ceparios 2011-2012.

Para darle validez al procedimiento se realizó un estudio de la relación dosis-efecto empleando para esto un antifúngico comercial de amplio espectro, fluconazol, en el que la actividad se determinó mediante diluciones seriadas. Los seis hongos dermatofitos, un hongo filamentoso y dos levaduras. como se puede observar en el Cuadro 4, para el hongo filamentoso *Aspergillus flavus*, y el hongo dermatofito *Epidermophyton floccosum* el fluconazol presentó actividad a una CIM de 0.125 mg/mL, para los dermatofitos *Microsporium canis* y *Microsporium gypseum*, la CIM fue de 0.0625 mg/mL, para *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans* y los hongos levaduriformes *Candida albicans* 290, *Candida albicans* 597, la CIM fue de 0.0078 mg/mL en cada bioensayo se realizaron corridas de controles positivos y negativos respectivamente.

Cuadro 4. CIM del fluconazol contra los hongos en estudio

Hongos	CIM mg/mL
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	0.0078
<i>Trichophyton rubrum</i>	0.0078
<i>Trichophyton tonsurans</i>	0.0078
<i>Candida albicans</i> 597	0.0078
<i>Candida albicans</i> 290	0.0078
<i>Microsporium canis</i>	0.0625
<i>Microsporium gypseum</i>	0.0625
<i>Aspergillus flavus</i>	0.125
<i>Epidermophyton floccosum</i>	0.125

Fuente: Datos experimentales realizados en el Departamento de Citohistología, USAC. 2013.

En el Cuadro 5, se presentan los resultados obtenidos experimentalmente en el tamizaje antifúngico de los extractos de *Byrsonima crassifolia*, *Cassia reticulata*, *Litsea guatemalensis*, *Solanum nigrescens* y *Smilax domingensis* contra cepas clínicas de dermatofitos y levaduras provenientes de pacientes. Los extractos que presentaron actividad antifúngica fueron *Byrsonima crassifolia* y *Smilax domingensis*.

Cuadro 5. Tamizaje de extractos etanólicos (1 mg/mL contra hongos y levaduras)

Hongos	<i>Byrsonima crassifolia</i>	<i>Cassia reticulata</i>	<i>Litsea guatemalensis</i>	<i>Solanum nigrescens</i>	<i>Smilax domingensis</i>
<i>Aspergillus flavus</i>	-	-	-	-	-
<i>Epidermophyton floccosum</i>	-	-	-	-	-
<i>Microsporium canis</i>	-	-	-	-	-
<i>Microsporium gypseum</i>	-	-	-	-	-
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	+	-	-	-	-
<i>Trichophyton rubrum</i>	-	-	-	-	-
<i>Trichophyton tonsurans</i>	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i> 290	+	-	-	-	+
<i>Candida albicans</i> 597	+	-	-	-	+

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente, n=5

(+) = Ausencia de crecimiento o actividad positiva

(-) = Crecimiento o ausencia de actividad

En el Cuadro 6, se presenta la CIM de los extractos evaluados frente a cepas clínicas de dermatofitos y levaduras, en donde se puede observar que los extractos etanólicos con mayor actividad fueron *Byrsonima crassifolia* que presentó una CIM de 0.0625 mg/mL para *Trichophyton mentagrophytes* y para *Candida albicans* 597 y *Candida albicans* 290 una CIM de 0.0312 y 0.0625 mg/mL; y *Smilax domingensis* que presentó una CIM para *Candida albicans* 597 y *Candida albicans* 290 de 0.0078 y 0.0312 mg/mL.

Cuadro 6. CIM de extractos con actividad antifúngica positiva (mg/mL)

Cepas	<i>Byrsonima crassifolia</i> CIM (mg/mL)	<i>Smilax domingensis</i> CIM (mg/mL)
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	0.0625	NSR
<i>Candida Albicans</i> 597	0.0312	0.0078
<i>Candida Albicans</i> 290	0.0625	0.0312

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente n=5 (p=0.0312) NSR: No se realizó

En el Cuadro 7, se observan los resultados del tamizaje de actividad antifúngica de extractos etanólicos contra hongos levaduriformes utilizando como revelador el MTT por medio del espectrofotómetro, donde los extractos etanólicos de *Byrsonima crassifolia*, *Cassia reticulata*, *Litsea guatemalensis*, *Solanum nigrescens* y *Smilax domingensis*, contra las dos cepas de *Candida albicans* 290 y 597, provenientes de aislamiento de pacientes, ninguno de los cinco presentó actividad inhibitoria positiva para dichas levaduras.

Cuadro 7. Tamizaje de actividad inhibitoria de extractos etanólicos contra hongos levaduriformes utilizando como revelador el MTT por el espectrofotómetro

Dermatofitos	<i>Byrsonima crassifolia</i>	<i>Cassia reticulata</i>	<i>Litsea guatemalensis</i>	<i>Solanum nigrescens</i>	<i>Smilax domingensis</i>
<i>Candida albicans</i> 290	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i> 597	-	-	-	-	-

Fuente: Datos experimentales

(-) = Negativo

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente estudio se analizó la capacidad antifúngica de los extractos de corteza de *Byrsonima crassifolia* (nance), hoja de *Cassia reticulata*, hoja de *Litsea guatemalensis*, hoja de *Solanum nigrescens* y rizoma de *Smilax domingensis* (Cuadro 1); cinco plantas de uso popular para el tratamiento de afecciones dérmicas. Estas plantas fueron seleccionadas basándose en el registro de actividad antifúngica y antibacteriana reportadas en estudios anteriores (Anexo 1) en la que presentaron actividad positiva para los géneros *Epidermophyton*, *Microsporum* y *Trichophyton* (Cáceres, *et al.*, 1991a; Girón, *et al.*, 1988; Svetaz, *et al.*, 2010).

Las cepas del estudio provienen de aislamientos clínicos, de las cuales se desconoce su susceptibilidad hacia los metabolitos secundarios presentes en las plantas utilizadas en este estudio. Se eligieron cepas de hongos que comúnmente causan micosis superficiales (*Aspergillus flavus*, *Candida albicans* cepas 290 y 597, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton tonsurans*).

En la validación de la metodología para la evaluación de la actividad antifúngica por medio del método micrométrico en placa se utilizó el fluconazol, el cual es un antifúngico de amplio espectro, con el que se evaluó la relación dosis-efecto del antifúngico contra todas las cepas a diferentes concentraciones; encontrándose que el fluconazol presentó una CIM de 0.0125 mg/mL frente a *Aspergillus flavus* y *Epidermophyton floccosum*, así también el fluconazol presentó una CIM de 0.0625 mg/mL para *Microsporum canis* y *Microsporum gypseum*; y para *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans* y *Candida albicans* 290 y *Candida albicans* 597 fue de 0.0078 mg/mL (Cuadro 4). Se utilizó fluconazol ya que presenta buena actividad antimicótica contra la mayoría de hongos superficiales, además de ser un antifúngico que presenta un efecto mas débil a todos los compuestos azólicos sobre las enzimas hepáticas y una mejor tolerancia, además de presentar un índice terapéutico mas amplio (Del Pilar, 2000). Para validar el bioensayo de actividad

antifúngica se determinó la relación dosis-efecto con el fluconazol 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 para evitar tener falsos positivos. El mecanismo de acción del fluconazol se basa en la inhibición de la enzima 14-demetilasa, esta inhibición se produce al formarse un complejo del azol con una parte del citocromo p-450 del hongo, el bloqueo de esta enzima impide la conversión de lanosterol en ergosterol, que es un componente fundamental de la membrana citoplasmática del hongo, esta inhibición produce una alteración de la fluidez y permeabilidad de la membrana produciendo una acumulación de peróxidos que dañan el crecimiento y la replicación celular del hongo y provocan la muerte (Bailey, Krakovsky, & Rybak, 1990).

Existen otros mecanismos de acción que presentan los antifúngicos que se utilizan actualmente en el que actúan sobre la pared celular y el núcleo de la célula del hongo, lo hacen inhibiendo la síntesis de los glucanos a través de la inactivación de la enzima 1,3-beta-glucano sintetasa o por medio de la fluocitosina el cual impide la síntesis de la proteína fúngica por lo que los hace incapaz de soportar el estrés osmótico y muere el hongo (Gubelin, De la Parra, & Giesen, 2011; Carrillo, *et al.*, 2001).

De las cepas evaluadas con los extractos vegetales únicamente el dermatofito *Trichophyton mentagrophytes* fue inhibido por el extracto de corteza de *Byrsonima crassifolia* y ambas cepas de *Candida albicans* (290 y 597) fueron inhibidas por la corteza de *Byrsonima crassifolia* y el extracto de rizoma de *Smilax domingensis*.

El tamizaje de la actividad antilevaduras se realizó por el método colorimétrico utilizando MTT que permite determinar la viabilidad celular con base a la coloración producida por la apertura del anillo de las sales de tetrazolio que se lleva a cabo en el interior de las mitocondrias de las células vivas, por acción de la enzima succinato deshidrogenasa. Al observar los resultados obtenidos en el método macrométrico (cualitativo) y el microcolorimétrico (cuantitativo) se logró determinar que ninguno de los extractos evaluados cuantitativamente presentó actividad inhibitoria significativa para las levaduras *Candida albicans* 290 y 597, caso contrario en el tamizaje cualitativo en la que se pudo determinar que la corteza de *Byrsonima crassifolia* y el rizoma de *Smilax domingensis* presentaron actividad

inhibitoria para las levaduras *Candida albicans* 290 y 597. Los resultados obtenidos en ambas metodologías por medio del método cualitativo y el cuantitativo, no fueron los esperados en ambas metodologías ya que los resultados de esta última no fueron satisfactorios esto se debió a que el método cualitativo es mucho más simple en su realización comparada con el método cuantitativo utilizando como revelador el MTT, ya que este necesita condiciones de esterilidad más rigurosas que el método cualitativo, teniendo en cuenta que una contaminación microbiana en el material utilizado o en las soluciones del extracto pueden dar falsos negativos, así como el tiempo adicional de incubación en cámara húmeda a 31C° que requiere para esta metodología, ya que el reactivo de MTT vira en presencia de metabolitos activos.

La CIM del extracto de la corteza de *Byrsonima crassifolia* (nance) contra *Trichophyton mentagrophytes* fue de 0.0625 mg/mL y para las cepas *Candida albicans* 290 y 597 fue de 0.0312 y 0.0625 mg/mL. El extracto del rizoma de *Smilax domingensis* (zarzaparrilla) presentó una CIM de 0.0078 y 0.0312 mg/mL con ambas cepas de *Candida albicans*, al relacionar estos resultados con los del fluconazol se puede observar que el fluconazol presenta concentraciones inhibitorias menores (CIM) comparadas con los extractos evaluados contra los hongos (Cuadro 4,6), por lo que podemos concluir que el fluconazol presenta mejor actividad inhibitoria ya que inhibe el crecimiento a una menor concentración que los extractos que presentaron actividad positiva contra los hongos anteriormente descritos.

La actividad que presentaron los extractos de corteza de *Byrsonima crassifolia* y el rizoma de *Smilax domingensis* pudieran indicar que los compuestos activos presentes en los extractos de las plantas actúen inhibiendo la síntesis de ergosterol o de otros esteroides de la pared celular de los hongos lesionando de esta forma su integridad y alterando la permeabilidad por lo que se produce la pérdida de elementos intracelulares, se sabe que algunos de los componente activos presentes en los extractos como los flavonoides, taninos y triterpeno, pueden ser responsables de la propiedades antifúngicas actuando bajo el mecanismo anterior y teniendo como consecuencia un desbalance electrolítico y que ocasiona la muerte del hongo (Chiocchio, & Matkovic, 2011; Kause, *et al.*, 1999; Pandey, & Rizvi, 2009).

El análisis fitoquímico de las raíces de *Byrsonima crassifolia* ha demostrado la presencia de taninos glicósidos, flavonoides, saponinas, terpenos y una nueva serie de glicolípidos (Martínez, Gonzales, Cazares, Moreno, & García, 1999; Rastrelli, *et al.*, 1996), además se han identificado dos triperpenos, α y β -amirina (Fernández, *et al.*, 2004) a la que se le atribuye la acción antifúngica al triterpeno β -amirina, este actúa siguiendo diversos mecanismos de dependencia de su naturaleza fisicoquímica de la molécula como lo son la densidad electrónica y su propiedad hidrofóbica además tiene acción depresora sobre la tensión superficial, el cual cuando tiene lugar en el entorno de la célula bacteriana o fúngica, alterando la selectividad de la membrana citoplasmática para intercambio de sustancias y provocar la muerte (Johann, Soldi, Lyon, Pizzolatti, & Resende, 2007; Pelczar, & Reid, 1992).

Los principales componentes encontrados y compartidos por la mayoría de las especies (*Smilacaceae*) son las saponinas esteroides, fitosteroles, y triterpenoides (Cáceres *et al.*, 2012) la actividad antifúngica, antimicrobianas se atribuyen a la parillina (Cáceres, 2009), aunque se desconoce exactamente su mecanismo de acción. La actividad antifúngica antimicrobiana y antitumorales se atribuye a las saponinas, en particular a la sarsasapogenina y parrillina (Cáceres, 2009).

Para los demás extractos etanólicos (*Cassia reticulata*, *Litsea guatemalensis*, *Solanum nigrescens*), no presentaron actividad contra las cepas clínicas de *Aspergillus flavus*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans* y *Candida albicans*, esto se pudo deber ha que estas cepas se encuentran expuestas a una cantidad de agentes nocivos, que permite que estas produzcan cambios o mutaciones en su información genética, además que las cepas estudiadas anteriormente fueron cepas de colección por el departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia y las cepas obtenidas en este estudio son cepas silvestres aisladas de afecciones, por lo que pudieran tener mayor vitalidad que las cepas de colección, igualmente la falta de éxito en la actividad de los extractos se

pudo deber a numerosos factores relacionados con el huésped o la cepa, ya que estas infecciones son tratadas comúnmente por drogas sintéticas que presentan efectividad contra dichas infecciones, pero una nueva amenaza ha emergido debido a la aparición de cepas resistentes que les permitan tener resistencia o que los pacientes alguna vez pudieron tener algún tipo de tratamiento antifúngico y no lo finalizaron y la cepa se volvió mucho más resistente a los extractos estudiados. Se concluye que los compuestos activos de las plantas que presentan actividad antifúngica pueden ser candidatos para el surgimiento de nuevos tratamientos y se recomienda continuar con estudios que contribuyan a validar su uso popular.

10. CONCLUSIONES

- De los cinco extractos ensayados contra *Trichophyton metagrophytes*, únicamente la corteza de *Byrsonima crassifolia* presentó actividad antifúngica significativa ($p=0.0312$) con CIM de (0.0625 mg/mL).
- De los cinco extractos ensayados contra las levaduras de *Candida albicans* 290 y 597, dos extractos tuvieron actividad antifúngica significativa ($p=0.0312$) con CIM variables para cada uno de ellos; la corteza de *Byrsonima crassifolia* (0.0312 y 0.0625 mg/mL) y el rizoma de *Smilax domingensis* (0.0078 y 0.00312 mg/mL).
- Los extractos etanólicos con base en la CIM más efectivos encontrados en este estudio fueron el de la corteza de *Byrsonima crassifolia* y el rizoma de *Smilax domingensis*, el extracto que presentó mayor actividad antifúngica significativa inhibiendo a un dermatofito y a dos levaduras fue el extracto de *Byrsonima crassifolia*

11. RECOMENDACIONES

- Determinar la sustancia activa de la corteza de *Byrsonima crassifolia* y el rizoma de *Smilax domingensis*, por fraccionamiento bioguiado para determinar mejor la biodisponibilidad y farmacodinámica.
- Profundizar los estudios farmacológicos y toxicológicos de *Byrsonima crassifolia* y *Smilax domingensis*, para su aplicación clínica, y poder ser utilizados como un producto farmacológico para toda la población con afecciones superficiales en la piel.
- Determinar las propiedades antifúngicas de los extractos con actividad positiva para los extractos de la corteza *Byrsonima crassifolia* y el rizoma de *Smilax domingensis* contra hongos de importancia clínica, con el fin de establecer su espectro de acción.
- Continuar con el tamizaje de nuevas plantas nativas en el país, para determinar si tienen efecto inhibitorio contra microorganismos causantes de infecciones dermatofíticas, para así poder contar con más materia prima, para la creación de nuevos fármacos.

12. REFERENCIAS

- Argueta A. (1994). Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Instituto Nacional Indigenista. Primera Edición. México.
- Agrawal, N., Choudhary, A., Sharma, M., & Dobhal, M. (2011). Chemical constituents of plants from the genus *Litsea*. *Chemistry & Biodiversity*, 8, 223-224.
- Anchek, M. (1948). identification of the antibiotic substance from *Cassia reticulata* as 4,5-dihidroxyanthraquinone-2-carboxylic acid. *The New York Botanical Garden*. 169-177.
- Arana, M. & Ortiz, N. (2012). Inhibición por extractos vegetales de uso medicinal de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* multi-resistentes. Tesis de graduación:Químicas Biólogas. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala.
- Arena R. (2003). Micología Médica Ilustrada. (2da. ed.). México D.F., México: McGraw-Hill, Interamericana.
- Bailey, E., Krakovsky, D., & Rybak. M. (1990). The triazole antifungal agents: a review of itraconazole and fluconazole. *Pharmacotherapy*, 10, 146- 153.
- Bejar, E., Reyes-Chilpa, R., & Jimenez-Estrada, M. (2000). Bioactive compounds from selected plants used in the xvi century mexican traditional medicine. *Studies in Natural Products Chemistry*, 24, 826-828.
- Bodey, G. (1992). Azole antifungal agents. *Clinical Infections Diseases*, 14, 161- 169.
- Brancanto, F., & Golding, N. (1953). The diameter of the mould colony as a reliable measure of growth. *Mycologia*, 45, 848-862.

- 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. (1996). *Plantas de Uso Medicinal en Guatemala*. Guatemala, Guatemala: Editorial Universitaria
- Cáceres, A. (2009). *Vademecum Nacional de Plantas Medicinales*. Guatemala, Guatemala: Ministerio de Educación.
- Cáceres, A., Cruz, S., Martínez, V., & Gattuso, M. (2009). Validación de la actividad biocida e inmunomoduladora del extracto hidroalcohólico del rizoma de *Smilax domingensis* Willd. cultivado en Guatemala. *Revista de Fitoterapia*. 9 (Sup. 1):45
- Cáceres, A., Cruz, S., Martínez, V., Gaitán, I., Santizo, A., Gattuso, S., *et al.* (2012). Ethnobotanical, pharmacognostical, pharmacological and phytochemical studies on *Smilax domingensis* in Guatemala. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 22, 239-244.
- Cáceres, A., Girón, L., Alvarado, S., & Torres, M. (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., Jauregui, E., Ayala, N., Escobar, M., & Arriola, L. (1993a). Plants used in Guatemala for the treatment of dermatomucosal infections. Evaluation of antiyeast activity of 18 American plants. First Central American and National Congress of Micology. Guatemala, August 5-8.
- Cáceres, A., Jauregui, E., Herrera, D., & Logemann, H. (1991b). Plants used in Guatemala for the treatment of dermatomucosal infections. 1:Screening for 38 plant extracts for anticandidal activity. *Journal of Ethnopharmaology*, 33, 277-283.

- Cáceres, A., Jauregui, E., López, B., & Logemann, H. (1993b). Actividad antifúngica de Plantas de uso medicinal en Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala. DIGI. USAC. Guatemala.
- Cáceres, A., López, B., Girón, M., & Logemann, H. (1991a). Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. 1: Screening for antimycotic activity of 44 plantas extracts. *Journal of Ethnopharmaology*, 31, 263-269.
- Cáceres, A., López, B., Juárez, X., del aguila, J., & García, S. (1993c). Plantas used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. 2. Evaluation of antifungal activity of seven American plantas. *Journal of Ethnopharmacology*, 40, 207-213.
- Cáceres, A., & Samayoa, B. (1990). Plantas de uso medicinal en Guatemala: Tamizaje de la actividad antimicrobiana. *Revista USAC*, 9, 55-77.
- Cáceres, A., & Sapper, D. (1977). Estudios sobre la medicina popular en Guatemala. *Medicina Tradicional*, 1, 59-68.
- Carrillo, A., Brió, S., & Quindós, G. (2001). Una nueva generación de fármacos antifúngicos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 8, 2-5.
- Castañeda, C., & Pinto, D. (1981). Recursos Naturales de Guatemala. Guatemala, Guatemala: Editorial Universitaria.
- Castro, L. (2009). Actividad antibacteriana de plantas medicinales en cepas clínicas de enterobacterias productoras de beta-lactamasas de espectro extendido. Tesis de graduación: Maestría Multidisciplinaria en producción y uso de plantas medicinales –MUPLAM Universidad de San Carlos. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Guatemala.

- Chiocchio, V., & Matkovic, L. (2011). Determination of ergosterol in cellular fungi by HPLC, a modified technique. *Journal of the Argentine Chemical Society*, 9, 10-11.
- CLSI, 2002. Clinical and Laboratory Standards Institute, formerly NCCLS, National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast; approved standard. Second edition, document M27-A2. Wayne, Pennsylvania.
- CLSI, 2008. Clinical and Laboratory Standards Institute, National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium forming filamentous fungi. Approved Standard. Second Edition document M38-P. Wayne, Pennsylvania.
- Cristanchol, L., Mejía, G., & Acosta, S. (2008). Estudio preliminar de los efectos hipoglicemiantes de *Senna reticulata* en ratas diabéticas. *Biosalud*, 8, 29-32.
- Cuenca-Estrella, M., & Rodriguez-Tudela, J. (2003). Actividad in vitro de voriconazol frente a hongos patógenos humanos. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*, 2, 34-39.
- Davey, P. (1990). New antiviral and antifungal drugs. *British Medical Journal*, 300, 793-798.
- De la Calle-Rodriguez, N., Santa-Vélez, C., & Cardona-Castro, N. (2012). Factores de virulencia para la infección de tejidos queratinizados por *Candida albicans* y hongos dermatofitos. *Revista CES Medicina*, 26, 44-45.
- Del Palacio, A., Garaul, M., & Cuetara, M.(2002). Tratamiento actual de las dermatofitosis. *Revista Iberoamericana de Micología*, 26, 68-69.

- Del Pilar, M. (2000). Nuevos antimicóticos orales: Alternativas en el tratamiento de las micosis superficiales. *Revista Chilena de Infectología*. 17 (2), 161-166.
- De Souza, J., Lima, A., Martines, E., & Salem, J. (2011). Anti-mycobacterium activity from culture filtrates obtained from the dematiaceous fungus C10. *Journal of Yeast and Fungal Research*, Vol. 2. 39-43.
- Diesseldorff, E. P. (1940). Las plantas medicinales del departamento de Alta Verapaz. *Anuales de la sociedad de Geografía e Historia de Guatemala* 16, 191-206.
- Dos Santos, R., & Vasconcelos, M. (2008). Constituintes químicos do caule de *Senna reticulata* Willd. (Leguminosae). *Química Nova*, 31, 1979.
- Fernández, M.C., Gómez-Serranillos, M.P., Iglesias, I., Cáceres, A., Rodríguez, B., & villar, A.M. (2004). Estudio fitoquímico del extracto diclorometánico de *Byrsonima crassifolia* (L.) H.B.K. *Revista de Fitoterapia* 4, 169-170.
- García, P., Ruiz, J., García, L., & Linares, M. (2004). Dermatofitosis por *Microsporum gypsum*: Descripción de ocho casos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 21, 147.
- Geiss, F., Heinrich, M., Hunkler, D., & Rimpler, H. (1994). Proanthocyanidins with (+) -epicatechin units from *Byrsonima crassifolia* bark. *Phytochemistry*, 39, 635.
- Gentry, J.L. Jr. & Standley P.C. (1974). FLORA OF GUATEMALA. Vol 24, part X, No. 1 and 2. Fieldiana Botany and Field Museum of Natural History. 130-131.
- Girón, J. (1966). Relación de unos aspectos de la flora útil de Guatemala. (2a. Edición.) Tipografía Nacional. Guatemala.
- Girón, L. (1983). Investigación de la inhibición de *Candida albicans* por preparaciones de plantas usadas en la medicina popular. Tesis de graduación para optar al Título de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San

Carlos de Guatemala, Guatemala, Guatemala.

- Girón, L., Aguilar, 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 Ethnopharmacology*, 22, 307-313.
- Goa, K., & Barradell, L. (1995). Fluconazol: Actualización de sus propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas y de su uso en el tratamiento de micosis superficiales y sistémicas graves en pacientes inmunodeprimidos. *Drugs*, 50, 658- 69.
- Graybill, J. (1989). New antifungal agents. *Clinical Microbiology Infectious Diseases*, 8, 402- 412.
- Guevara, M., Urcia, F., & Casquero, J. (2007). Manual de Procedimientos y técnicas de Laboratorio para la Identificación de los principales hongos oportunistas causantes de micosis humana. Ministerio de Salud. Lima Perú.
- Gubelin, W., De la Parra, R. & Giesen, L. (2011). Micosis Superficiales. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 22 (6), 804-812.
- 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.
- Herrera, A., Jiménez, E., Vega, A., Martínez, M., Hernández, M., Zamilpa, A., et al. (2004). Clinical and Mycological Evaluation of Therapeutic Effectiveness of *Solanum chrysotrichum* Standardized Extract on Patients with Pityriasis capitis (Dandruff), A double Blind and Randomized Clinical Trial Controlled with Ketoconazole. *Planta medica*, 70, 1-6.
- Ippisch, F. (1943). Contribución a las investigaciones sobre plantas medicinales y económicas de Guatemala. Guatemala: Dirección General de Agricultura.

- Jauregui, E. (1990). Inhibición in vitro por *Candida albicans* por 10 plantas usadas en el tratamiento de infecciones dermatomucosas. Tesis de graduación para optar al Título de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala, Guatemala.
- Jimenez-Perez, N., & Lorea-Hernández, F. (2008). Identity and delimitation of the American species of *Litsea* Lam. (Lauraceae): a morphological approach. *Plant systematics and evolution*, 28-29.
- 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.
- Johnson, A. (2007). Polymixin B for the treatment of multidrug-resistant. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 160(6), 1206-1215.
- Katzung, B., Masters, S., & Trevor, A. (2010). Farmacología básica y clínica (11a.Ed.). Lange Medical Publications.
- Kause, A., Ossipov, V., Haykioja, E., Lempa, K., Hanhimaki, S., & Ossipov, S. (1999). Multiplicity of biochemical factors determining quality of growing birch leaves. *Ecology*, 120, 102-112.
- Kollef, M. (2003). Appropriate Empirical Antibacterial Therapy for Nosocomial Infections. Getting it Right the First Time. *Journal Drugs*, 63(20), 2157-2168.
- Lacasa, E., Mazuelos, E., & Espinel-Ingroff, A. (2007). Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M4-A). *Revista Iberoamericana de Micología*, 15, 1-3.

- Lanz, K., Ortiz, K., Pérez, E., & Santizo, A. (2012). Inhibición de microorganismos causales de infecciones subdérmicas por plantas nativas de uso medicinal. Tesis de graduación: Químicos Biólogos. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala.
- Linares, E., Flores Peñafiel, B., Byre, R. (1988) Selección de Plantas Medicinales de México. Editorial Limusa, México, p.50.
- Logemann, H. (1995). Manual Práctico de Micología Médica. Guatemala: Bayer.
- Lorenza, C. (2003) Actividad biocida de 6 plantas de uso medicinal en el municipio de tacana san marcos. Tesis de graduación para optar al Título de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala, Guatemala.
- Lumbreras, C., Lizasoain, M., & Aguado, J. M. (2003). Antifúngicos de uso sistémico en Madrid. *Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica*, 21(7), 36680.
- MacRae, W. D., Hudson, J.B., & Towers, G. H. (1988). Studies on the pharmacological activity of Amazonian Euphorbiaceae. *Journal of Ethnopharmacolgy*, 22, 143-172.
- Maldini, M., Montoro, P., & Pizza. (2011). Phenolic compounds from *Byrsonima crassifolia* L. bark: Phytochemical investigation and quantitative analysis by LC-ESI MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 56, 1-6.
- Martínez, A. (2006). Hierba Mora, Chipilín y Jícama. Guatemala: Editorial Serprisa.
- Martínez, E., Matta, V., Carias, J., Porras, C., Logemann, H., & Arenas, R. (2012). Dermatofitos y dermatofitosis: Frecuencia en Guatemala durante el periodo de mayo del 2008 a junio de 2009. *Revista Científica*, 22, 19-20.

- Martínez-Vazquez, M., Gonzalez-Esquinca, A., Cazares-Luna, L., Moreno, M., & García-Argaez, A. (1999). Antimicrobial activity of *Byrsonima crassifolia* (L.) H.B.K. *Journal of Ethnopharmacology*, 66, 79-80.
- Mehaffey, P., Dutnam, S., Barrett, M. & Jones, R. (1996). Evaluation of in vitro spectra of activity of azithromycin, clarithromycin and erythromycin tested against strains of *Neisseria gonorrhoeae* reference agar dilution disk diffusion and E-test methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 4, 479-481.
- Mejía, J. (1927). Geografía de la República de Guatemala. Guatemala: Tipografía Nacional. Muñoz, V., Duchem, E., Wagner, F., Ferreira, M., Serna, E., Torrez, S., *et al.* (2010). Actividad tripanocida in vitro e in vivo de extractos etanólicos de algunas plantas medicinales bolivianas. *Biofarbo*, 18, 69-70.
- Mellen, G. (1974). El uso de las plantas medicinales en Guatemala. *Guatemala Indígena*, 9, 15-22.
- Muñoz, V., Duchem, E., Wagner, F., Ferreira, M., Serna, E., Torrez, S., & *et al.* (2010). Actividad tripanosómica in vitro e in vivo de extractos etanólicos de algunas plantas medicinales bolivianas. *Biofarbo*, 18, 69-71.
- Ortíz, G. (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 graduación: Químico Biólogo. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala.
- Ozaeta, C., Guancín, M., & Flores, P. (2008). Comparación de procedimientos Macro y Micro para Evaluar la Actividad inhibitoria de hongos y levaduras patógenas para el hombre. Tesis de graduación para optar al Título de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala,

Guatemala, Guatemala.

- Pandey, K., & Rizvi, S. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidation Medical Cell Longev*, 2, 270–278.
- Patterson, T. (1999). The role of newer azoles in surgical patients. *Journal of Chemotherapy*, 11, 504-512.
- Paz, M. (1998). Manual de Procedimientos Estandar de Operación. (Publicación Interna). Guatemala: Editorial.
- Pelczar J & Reid D. (1992). Microbiología. Editorial Pueblo y Educación. La Habana.
- Perfect, J., & Schell, W. (1996). The new fungal opportunists are coming. *Clinical Infectious Diseases*, 22, 112- 118.
- Pemán, J., Mazuelos, M., & Rubio, C. (2001). Guía Práctica de identificación diagnóstico en Micología Clínica. *Revista Iberoamericana de Micología*, 18, 11-25.
- Pöll, E. (1984). Plantas comestibles y tóxicas de Guatemala. *Revista Científica*, 1, 13-17.
- Queiroz- Telles, F., McGinnis, M., Salkin, I., & Graybill, J. (2003). Subcutaneous mycoses. *Infectious Disease Clinics*. 17, 59–85.
- Rastrelli, L., De Tomás, N., Berger, I., Cáceres, A., Saravia, A., & De Simone, F. (1996). Glicolípidos from *Byrsonima crassifolia*. *Phytochemistry*, (45), 4, 647-650.
- 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. (1990). Tratado de Micología Médica. (3ra. ed.). México D.F., México: McGraw-Hill, Interamericana.
- Ronquillo, F., Melgar, M., Carrillo, J., & Martínez, A. (1988). Especies vegetales de uso actual y potencial en alimentación y medicina de las zonas semiáridas del nororiente de Guatemala. Cuaderno DIGI. 249 p.
- Roque, J. (1941). Flora Útil Médico-Guatemalteca. Apuntes para la materia Médica de la República de Guatemala. Guatemala: Editorial C.A.
- Rueda, R. (2002). Micosis Superficiales y Dermatomicosis. *Revista Colombia Médica*, 1, (33), 10-16.
- Ruiz, J., & Roque, M. (2009). Actividad antimicrobiana de cuatro plantas del Nor-Oriente peruano. *Ciencia e Investigación*, 12, 41-47.
- San-Blas, G. (1991). Antibióticos antifúngicos: Hacia la búsqueda de antibióticos selectivos. *Revista Iberoamericana, Micología*, 8, 24-34.
- Simão da Silva, K., Klein-Junior, L., Cruz, S., Cáceres, A., Meira, N., Monache, F., *et al.* (2012). Anti-inflammatory and anti-hyperalgesic evaluation of the condiment laurel (*Litsea guatemalensis* Mez.) and its chemical composition. *Food Chemistry* 132, 1980.
- Skerlev, M., & Miklić, P. (2010). The changing face of *Microsporum* spp. infections. *Clinics in Dermatology*, 28, 146-147.
- Spiegel, M. (1991). Estadística. México DF: Editorial McGraw-Hill.
- Standley, P., & Williams, L. (1964). Flora of Guatemala. Fieldiana: Botany 24, 281.
- Svetaz, L., Zuljan, F., Derita, M., Petenatti, E., Tamayo, G., Cáceres, A. *et al.* (2010). Value

- of the ethnomedical information for the discovery of plantas with antifungal properties. A survey among seven Latin American countries. *Journal of Ethnopharmacology*, 127, 137-139.
- Torres-Rodríguez, J. (1992). Antifúngicos de uso sistémico. *Revista Española. Quimioterapia*, 5, 166- 169.
- Torres- Rodríguez, J., Del Palacio, A., Guarro, J., Negroni, R., & Pereiro, M. (1994). *Micología Médica*. Barcelona: Masson.
- Torres-Rodríguez, J., Madrenys, N., Jiménez, T. & Saballs, P. (1997). Concentraciones mínimas inhibitorias de levaduras a cinco antifúngicos utilizando un micrométodo de dilución estandarizado y el E-test. *Revista Iberoamericana de Microbiología*, 14, 115-118.
- Trujillo, S., & Madrigal, B. (2005). *Plantas Antimálaricas de Tumaco*. Costa pacifica, Colombia, Colombia: Editorial Universidad de Antioquia.
- Tucux, V., Mata, M. & Leiva, B. (2012). Evaluación comparativa del contenido fitoquímico y actividad biológica in vitro de *Litsea guatemalensis* colectada en dos regiones y épocas diferentes en Guatemala. Tesis de graduación: Química Farmacéutica. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala.
- Valleverdú, C., Vila, R., Cruz, S., Cáceres, A. & Cañigual. S. (2005). Composition of the essential oil from leaves of *Litsea guatemalensis*. *Flavour and Fragrance Journal*, 20, 415-418.
- Vázquez, E., & Arenas, R. (2008). Onicomycosis en niños. Estudio retrospectivo de 233 casos mexicanos. *Gaceta médica de México*, 144 (1), 7-10.

- 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.
- Villatoro, E. (1984). Etnomedicina en Guatemala. Centro de estudios Folkloricos. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala: Serviprensa.
- Zamilpa, A., Tortoriello, J., Navarro, V., Delgado, G., & Alvarez, L. (2002). Five New Steroidal Saponins from *Solanum crysotrichum* Leaves and Their Antimicotic Activity. *Journal of Natural Products*, (65) 12, 1815-1819.

13. ANEXOS

Anexo 1. CIM de extractos con actividad antifúngica demostrada en estudios anteriores

	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Epidermophyton floccosum</i>	<i>Microsporium canis</i>	<i>Microsporium gypseum</i>	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Byrsonima crassifolia</i>	20 b*	19b*	5a**	3a**	2a**	2a**	11.8b*
<i>Cassia reticulata</i>	ND	ND	21f**	ND	ND	ND	15f**
<i>Litsea guatemalensis</i>	ND	10a**	6a**	ND	ND	ND	8c*
<i>Solanum nigrescens</i>	ND	ND	2a**	4a**	4a**	3a**	30c*
<i>Smilax domingensis</i>	1e	ND	ND	ND	9a**	0.5d	40c*

a. Cáceres, A., López, B., Girón, M., & Logemann, H. (1991a) b. Cáceres, Jauregui, E., Herrera, D., & Logemann, H. (1991b). c. Girón, L., Aguilar, G., Cáceres, A., & Arroyo, G. (1988). d. Svetaz, *et al.* (2010), e. Ozaeta, C., Guancín, M., Flores, P. (2008). f. Ruiz, J., & Roque, M. (2009). *Halo de inhibición en mm **CIM x 100 mg/ml . ND: No hay datos

Anexo 2. Tamizaje de actividad inhibitoria de extractos etanólicos contra hongos levaduriformes utilizando como revelador el MTT por el espectrofotómetro con una absorbancia mayor de -0.02 ± 0.04 nm.

Dermatofitos	<i>Byrsonima crassifolia</i>		<i>Cassia reticulata</i>		<i>Litsea guatemalensis</i>		<i>Solanum nigrescens</i>		<i>Smilax domingensis</i>	
	nm	-	nm	-	nm	-	nm	-	nm	-
<i>Candida albicans</i> 290	0.487 nm	-	0.07 nm	-	0.124 nm	-	0.102 nm	-	0.235 nm	-
<i>Candida albicans</i> 597	0.514 nm	-	0.186 nm	-	0.063 nm	-	0.065 nm	-	0.179 nm	-

Fuente: Datos experimentales n=5 (p=0.0312)

(-) = Negativo

nm= Absorbancia en manómetros