

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

**INHIBICION DE LA PARED CELULAR DE HONGOS  
COMO UN MECANISMO DE ACCION ANTIFUNGICA  
DE ALGUNAS LEGUMINOSAS**

**INFORME DE TESIS**

**Presentado por**

*Flor de María León Flores*

**Para optar el título de  
QUIMICA BIOLOGA**

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
Biblioteca Central

**GUATEMALA, ABRIL DE 1997**

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

Decano	Lic. Jorge Rodolfo Pérez Folgar
Secretario	Lic. Oscar Federico Nave Herrera
Vocal I	Lic. Miguel Angel Herrera Gálvez
Vocal II	Lic. Gerardo Leonel Arroyo Catalán
Vocal III	Lic. Rodrigo Herrera San José
Vocal IV	Br. Ana María Rodas Cardona
Vocal V	Br. Hayro Oswaldo García García

06

T (1755)

C. 4

## DEDICO ESTE ACTO

- A D'OS** Por cuanto me has alegrado, oh Jehová, con tus obras; en las obras de tus manos me gozo.  
Por cuanto me has rodeado de tu amor y tu gracia que has puesto en mi ser.
- A MIS PADRES** Carlos León Avendaño y Carmen Alicia de León Flores, gracias por su amor, comprensión y apoyo en todo momento.
- A MIS HERMANOS** Yohanda, Bertha Alicia, Carlos, Joi Sen, Tai San y Yohan Cai Din, por su amor y cariño.
- A MI NOVIO** Erick Fabián, gracias por su amor, comprensión y atención en todo momento.
- A MIS SOBRINOS** Bertha María Yohanda, Luis Carlos y Joi Sen Jireh, por su amor.
- A MIS PASTORES** Edmundo Madrid y Ana de Madrid, Edmundo Guillén y Berlín de Guillén, Rony Madrid y Ninoshka de Madrid, por su apoyo y ejemplo espiritual.
- A MIS CUÑADOS** Oscar René, José Luis, Oscar Abel, Maggi y Nora Emilia.
- A MIS TIOS** Agradeciendo su cariño.
- A MIS COMPAÑEROS** Dina Aracely, Sandra Inés, Claudia Regina, Claudia y Helga.

## AGRADECIMIENTOS

- A: Lic. Armando Cáceres Estrada, por su asesoría y constante apoyo brindado durante la elaboración de este trabajo y docencia.
- A: Licda. Elsa Jauregui, por su comprensión, ayuda y especial atención a los problemas en el desarrollo de la parte experimental de la tesis.
- A: José Pérez, por su ayuda y colaboración.
- A: Laboratorio de Productos Fitofarmacéuticos - FARMAYA- por el financiamiento y la colaboración en el desarrollo de mi tesis.
- A: Licda. María del Carmen Bram, por su asesoría, comprensión, ayuda y especial atención en el desarrollo de tesis y docencia.

## **AGRADECIMIENTOS**

- A: Lic. Armando Cáceres Estrada, por su asesoría y constante apoyo brindado durante la elaboración de este trabajo y docencia.
- A: Licda. Elsa Jauregui, por su comprensión, ayuda y especial atención a los problemas en el desarrollo de la parte experimental de la tesis.
- A: José Pérez, por su ayuda y colaboración.
- A: Laboratorio de Productos Fitofarmacéuticos - FARMAYA- por haberme permitido hacer uso del equipo e instalaciones para la realización de la parte experimental de tesis y al programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo CYTED, por la metodología y cepas proporcionadas.
- A: Licda. María del Carmen Bram, por su asesoría, comprensión, ayuda y especial atención en el desarrollo de tesis y docencia.

## INDICE

	Páginas
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCION	2
3. ANTECEDENTES	3
4. JUSTIFICACIONES	26
5. OBJETIVOS	27
6. HIPOTESIS	28
7. MATERIALES Y METODOS	29
8. RESULTADOS	34
9. DISCUSION DE RESULTADOS	37
10. CONCLUSIONES	39
11. RECOMENDACIONES	40
12. REFERENCIAS	42
13. ANEXOS	51

## 1. RESUMEN

El presente estudio se llevó a cabo con el propósito de confirmar la actividad antifúngica *in vitro* de siete plantas de la familia leguminosae (*C. grandis*, *C. occidentalis*, *C. alata*, *H. courbanil*, *D. robinoides*, *G. sepium* y *T. indica*) probada anteriormente por medio de métodos de dilución en placa con pozos para hongos filamentosos y métodos de dilución y siembra por estrías para levaduras. Se usó el método de difusión con disco para *N. crassa*. Los extractos se prepararon por maceración y recambio de dos volúmenes de etanol ó metanol a las 24 horas.

Se llevaron a cabo cuatro fases experimentales, la primera consistió en la confirmación antifúngica de las siete plantas mencionadas anteriormente. Para confirmar la actividad antifúngica *in vitro* se escogieron las especies causantes mayormente de infecciones dérmicas en Guatemala; tres dermatofitos (*Epidermophyton floccosum*, *Microsporum gypseum* y *Trichophyton rubrum*), dos levaduras (*Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*) y un hongo oportunista (*Aspergillus flavus*).

De las siete plantas en estudio, todas mostraron actividad contra algún hongo: *C. grandis*, *C. occidentalis*, *C. alata*, *H. courbanil*, *D. robinoides*, *G. sepium* y *T. indica*. Solamente *G. sepium* y *P. piscipula* mostraron actividad antifúngica *in vitro* contra todos los hongos exceptuando *Aspergillus flavus*.

En la segunda fase se determinó la concentración mínima inhibitoria de los extractos de las plantas con actividad antifúngica, los cuales mostraron actividad en 2.22 mg/dl. En la tercera fase se estableció un bioensayo para *Neurospora crassa* IM 70, ATCC 9279 que permitiera determinar si la actividad antifúngica de las leguminosas era a través de la inhibición de la síntesis de la pared celular. Por lo que de las siete plantas en estudio, solamente *C. grandis* tuvo inhibición a través de la síntesis de la pared celular, por consiguiente se finalizó la cuarta fase determinando su CIM, la cual fue de 100 mg/dl. El análisis estadístico de los resultados se realizó por medio de un análisis binomial: siendo las variables: éxito= no hay crecimiento (+), fracaso=crecimiento (-), inhibición de la síntesis de la pared celular=zonas moteadas (+) y no hay inhibición de la síntesis de la pared celular=zonas claras (-).

## 2. INTRODUCCION

Guatemala es un país con una gran diversidad genética vegetal y cultural, por lo que el uso de las plantas medicinales está ampliamente difundido en el país. Por su clima tropical se favorece el desarrollo de múltiples enfermedades infecciosas, particularmente las de la piel y mucosas, que son frecuentes en todo el mundo. Debido a las deficientes condiciones educacionales, sanitarias y ambientales, las infecciones dermatomucosas son de carácter endémico en la mayoría de los países en desarrollo. Las micosis son frecuentes en nuestro medio, por lo que constituyen un problema de salud debido a su alta morbilidad. Las micosis mas comunes son las producidas por un grupo de hongos llamados dermatofitos, que se caracterizan por ser queratolíticos. En las micosis sistémicas se incluye a la aspergilosis, considerada como micosis oportunista, producida por cierto número de especies de *Aspergillus*, caracterizada por afectar el tracto respiratorio, con producción de bronconeumonía necrosante o formación de granulomas pulmonares.

*Neurospora crassa* es un microorganismo de crecimiento rápido, sus células hifales son multinucleadas, su micelio está pigmentado, se ha encontrado un medio de composición química mínima para cultivarlo, con sacarosa como fuente de carbono y nitrato de potasio como fuente de nitrógeno. Cuando *N. crassa* es adulto presenta una pared celular con inhibidores hifales altos.

Las especies de leguminosas han evolucionado como producto de los diferentes ambientes, por acción de la naturaleza y del hombre, así como por las diferentes políticas económicas que han adoptado los países en su afán por mejorar los cultivos, con una aplicación científica para aliviar y curar las enfermedades existentes. La falta de validación por métodos farmacológicos ha sido una limitante para que la fitoterapia tenga lugar como una práctica de la ciencia médica. En los últimos años se han ejecutado estudios de tamizaje de plantas leguminosas, usadas para el tratamiento de afecciones de la piel, lo cual han demostrado que ejercen actividad antimicótica contra *C. albicans*, *C. neoformans*, *A. flavus*, *E. floccosum*, *M. gypseum* y *T. rubrum*. En el presente trabajo de investigación se confirmó la actividad antimicótica de siete plantas usadas para el tratamiento de infecciones micóticas. Usando un método de dilución en placa con pozos para hongos filamentosos, un método de dilución y siembra por estrías para levaduras y un método de difusión con disco para *N. crassa*, para así poder confirmar actividad antifúngica y evaluar acción contra la pared celular de *N. crassa*.



### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1. HONGOS PATOGENOS AL HOMBRE

##### 3.1.1. Candidosis

###### 3.1.1.1. Definición

La candidosis es una micosis aguda o crónica, superficial o diseminada causada por especies del género *Candida*. Es considerada una micosis oportunista, debido a que los agentes etiológicos residen inofensivamente en el organismo del hospedero y la invasión de los tejidos se produce por una alteración de los mecanismos de defensa e inmunidad [1].

###### 3.1.1.2. Agentes etiológicos

*Candida albicans* es el agente etiológico que se aísla con más frecuencia en casos de candidosis, pero otras levaduras del género (*C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. pseudotropicalis*, *C. stellatoidea* y *C. tropicalis*), también pueden causar candidosis [2]. Las candidas son organismos confinados a reservorios humanos y animales, pero frecuentemente se aíslan del suelo, alimentos y ambiente hospitalario [3].

###### 3.1.1.3. Tipos y características clínicas

La candidosis oral afecta a todas las edades, principalmente a recién nacidos que se infectan en la vagina materna, donde la levadura es abundante al final del embarazo. Se caracteriza por placas o parches de pseudomicelio y epitelio descamado, con mínima erosión, pero que sangra con facilidad [4]. Es una infección oportunista que afecta al 50 por ciento de pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) [5]. El incremento de esta infección se debe al uso de antibióticos y drogas inmunosupresoras, debilitamiento por radiación, cáncer con quimioterapia, transplante de órganos, diabetes mellitus y defectos en la inmunidad celular.

#### 3.1.1.4. Tratamiento

El tratamiento indicado para la infección por *C. albicans* es el que utiliza antimicóticos poliénicos e imidazoles [6]. La nistatina fue el primer agente antimicótico que se uso comercialmente, es producido por *Streptomyces noursei* y posee actividad contra un gran rango de hongos. Se presenta en crema, ungüento, polvos (100,000 U/g), solución oral (100,000 U/ml) y tabletas vaginales (500,000 U) [7,8]. Tiene uso tópico para tratamiento activo y profilaxis de infección por Candidosis de la boca, piel, uñas, tracto gastrointestinal, vejiga urinaria y vagina [8].

Además la anfotericina B es un polieno producido por *Streptomyces nodosus*, que se administra para candidosis sistémica. Actúa aumentando la permeabilidad de la membrana celular de los hongos, lo que les hace perder sustancias vitales para su metabolismo y funciones celulares como potasio, aminoácidos y purinas [6]. Se presenta en ampollas de 50 mg. por vía intravenosa. La candicidina es un hapteno derivado de *Streptomyces* sp.; se ha utilizado solamente para uso tópico en infecciones vaginales. Entre otros tratamientos encontramos: Clotrimazol, Ketoconazol, Miconazol y Fluorocitocina [8].

#### 3.1.2. Criptococosis

##### 3.1.2.1. Definición

Es una infección micótica subaguda o crónica, que compromete primariamente el cerebro y meninges que puede afectar los pulmones, piel u otras partes del cuerpo. Es provocada por una especie única de microorganismos del tipo de la levadura, el *Cryptococcus neoformans* [9].

##### 3.1.2.2. Agentes etiológicos

Se han descrito cuatro serotipos de *C. neoformans*:: A, B, C y D, de distribución geográfica diferente. Se ha propuesto obtener con los serotipos B y C una especie aparte, *C. bacillisporus*. [10]. No obstante no hay diferencias en la enfermedad que producen ni en respuesta a la terapéutica entre ambas especies. En varias ocasiones otras especies de *Cryptococcus* han producido enfermedad. *C. neoformans* ha sido recuperado de frutas, leche, estiércol de paloma, suelo, piel y mucosas del hombre [11].

*C. neoformans* fue aislado por primera vez en 1894 del zumo de duraznos, por Sanfelice. Se pensó erróneamente que la fuente de infección en el hombre y los animales era endógena, hasta que Emmons, en 1950, comunicó el aislamiento de cepas virulentas de *C. neoformans* del suelo de corrales. En 1955 produjo un nuevo informe sobre la frecuente asociación de cepas virulentas con los excrementos de palomas, indicando que mientras no se descubrieran otras fuentes de infección, el contacto con los mismos era la más importante en el hombre y los animales [12].

### 3 1.2.3. Tipos y características clínicas

Existe una estrecha relación entre la infección criptocócica y las enfermedades debilitantes como la leucemia y el linfoma maligno, y la terapéutica inmunosupresora que a veces es necesaria en estos casos y en algunas otras enfermedades [13].

Los síntomas de la criptococosis pulmonar primaria carecen de valor diagnóstico porque se observa un cuadro de infección subaguda con fiebre escasa, tos leve [14], dolor de pecho, producción de esputo pleurítico, disnea, raras veces sudores nocturnos y malestar [13].

La criptococosis cutánea usualmente está acompañada de una infección sistémica [15,16] y probablemente está precedida por infección respiratoria, pero se han encontrado casos en los que no se ha diagnosticado lesión pulmonar preexistente. Las lesiones de la mucosa pueden ocurrir por vía hematógena o por extensión de la lesión cutánea y se caracterizan por nódulos, granulomas o úlceras superficiales en la superficie de la mucosa oral o nasal [17].

Las complicaciones en huesos y articulaciones son importantes ya que pueden asociarse a infección en el pulmón, en el bazo y en el hígado. Las lesiones en hueso ocurren en aproximadamente el 10 por ciento de los casos reportados de criptococosis, los síntomas son dolor e hinchazón que pueden durar varios meses, las lesiones se extienden lentamente; la multiplicación del hongo contribuye a la formación de pus viscoso donde éste puede ser aislado fácilmente [17]. La infección más frecuente causada por *C. neoformans* es meningitis, el cual es aislado en líquidos cefalorraquídeos. En la meningitis bacteriana generalmente el líquido cefalorraquídeo es purulento, con un recuento de leucocitos aumentado (por lo común más de 1.000/mm<sup>3</sup>, predominio de células polimorfonucleares y reducción de la concentración de glucosa en líquido medular [13,18].

#### 3.1.2.4. Tratamiento

La nistatina y los derivados imidazoles son usados para infecciones superficiales [17], la anfotericina B y la 5-fluorocitosina han sido empleados para infecciones sistémicas. Una combinación de 5-fluorocitosina y anfotericina B dan buenos resultados contra la criptococosis [17,18,19].

En estudios recientes, se ha considerado a la anfotericina B como un estándar de oro de la terapia antifúngica, especialmente para las micosis sistémicas [20]. La 5-fluorocitosina es capaz de curar meningitis criptocócica, una infección que es invariablemente fatal si no es tratada [19]. Posee un espectro más limitado de actividad que la anfotericina B y está asociada a supresión de la médula ósea y disfunción hepática [14,18]. Los agentes antifúngicos derivados de imidazoles, son activos *in vitro* contra un amplio rango de hongos que causan infecciones superficiales, mucocutáneas y sistémicas [14,18,21].

#### 3.1.3. Aspergilosis

##### 3.1.3.1. Definición

*Aspergillus* es uno de los contaminantes más comunes y molestos que se encuentran en el laboratorio, pueden producir lesiones granulomatosas inflamatorias o crónicas en los bronquios o los pulmones, a menudo con diseminación hematógena a otros órganos.

##### 3.1.3.2. Agentes etiológicos

En el laboratorio clínico el *Aspergillus* se aísla en casi todos los medios de cultivo para hongos donde crece rápidamente. El abundante micelio aéreo se hace polvoriento y pigmentado a medida que van produciendo conidios, que son característicos de cada especie. El *A. fumigatus* es la especie patógena más común, comparada con *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus* y *A. nidulans*. Tienden a reproducirse en forma asexual o anamórfica que es el estado que induce la enfermedad y la que se observa en tejidos y cultivos.[17,22].

### 3.1.3.3. Tipos y características clínicas

La respuesta patológica de los diferentes miembros del género *Aspergillus* varían en su severidad y desarrollo clínico. Su toxicidad es causada por ingestión de alimentos contaminados con micotoxinas y otros metabolitos producidos por *Aspe: gillus*, provocando alergia y secuela a la presencia de conidios o el crecimiento transitorio del hongo en las cavidades del cuerpo.

Además causa infección superficial de senos paranasales, canal exterior de la oreja y menos frecuente en piel quemada, uñas y otros [17,22].

### 3.1.3.4. Tratamiento

Las formas alérgicas de aspergilosis se han tratado con corticoides y antimicóticos. El cromoglicato disódico también disminuye los síntomas [23].

El tratamiento del aspergiloma varía considerablemente según su severidad. Los pacientes asintomáticos no justifican tratamiento, mientras que otros pacientes requieren resección quirúrgica. Se ha aconsejado el uso de anfotericina B y 5-fluorocitosina y se ha sugerido lavado pulmonar para facilitar la penetración de la droga en la cavidad. Se instituye anfotericina B en forma acelerada tan pronto como se diagnóstica aspergilosis invasiva. La aspergilosis superficial localizada se trata con nistatina [23].

### 3.1.4. Dermatofitos

#### 3.1.4.1. Definición

Como dermatofitos se conoce a un grupo de hongos patógenos de la piel, que causan infecciones crónicas y en algunos casos requieren tratamientos prolongados con drogas antimicóticas, de alto costo y a veces poco efectivas. Con los nombres de dermatofitosis, tiña, jiole, rasquiña o sarna (término que se usa indistintamente para describir sarcoptosis), se conocen popularmente a las afecciones de la piel sugestivas de infección micótica, que por sus características biológicas y ecológicas se presentan con frecuencia en áreas tropicales [2].

#### 3.1.4.2. Agentes etiológicos

Los dermatofitos son un grupo de hongos que infectan la piel, el cabello y las uñas, en un arreglo anatómico regional. Se conocen tres géneros con capacidad para infectar al hombre: *Epidermophyton*, *Microsporum* y *Tricophyton*, que incluyen 39 especies y cuatro variedades. Cinco especies ocasionan la mayoría de las tiñas del mundo, las otras especies son de baja infectividad, siendo, endémicas en sitios particulares o en extinción. Los dermatofitos son el único grupo entre los hongos que infectan al hombre y que han evolucionado hacia un parasitismo obligado, se conocen especies antropofílicas, zoofílicas y geofílicas [24].

#### 3.1.4.3. Tipos y características clínicas

Las afecciones producidas por hongos son muy frecuentes en la piel, causando micosis superficiales y sistémicas, dependiendo del estrato afectado [2].

Los climas tropicales son propicios para su desarrollo, por lo que Guatemala reúne las condiciones que facilitan su crecimiento, aumentando la frecuencia de su presencia en diferentes partes del cuerpo, principalmente en la planta del pie y espacios interdigitales [24].

Las micosis se dividen dependiendo del área afectada en: Micosis superficiales, cutáneas, subcutáneas y sistémicas. En el caso de las micosis cutáneas, afecta la capa germinativa de la piel; generalmente los pacientes presentan ardor, prurito, piquetazos, pápulas, vesículas, descamación o pústulas, es decir, lo que se le llama borde activo, que es un crecimiento concéntrico a la lesión [25].

En el caso de las infecciones producidas por dermatofitos o tiñas, estas son cutáneas por lo que se clasifican de acuerdo a la región anatómica afectada así: *Tinea pedis* o pie de atleta, *Tinea unguium* o onicomycosis, *Tinea manum* o tiña de la mano, *Tinea capitis* o tiña de la cabeza y *Tinea cruris* o tiña inguinal [24].

#### 3.1.4.4. Tratamiento

La absorción de fármacos por la piel, depende de la difusión y evaporación del agua. La principal barrera es la epidermis, que contiene queratina y actúa como una membrana celular. Los fármacos entran a diferentes velocidades, dependiendo del coeficiente lípido-agua; los iones hidrosolubles y moléculas polares casi quedan excluidos. Hay una gran variedad de medicamentos, fungicidas y fungistáticos

[26,27]. En casos de infecciones diseminadas y oportunistas, puede usarse la anfotericina B [28]. El ácido indecilenico, haloprogin, clorhidrato de clorimidazol y diclorato de diamatozol, son de aplicación tópica. Como fungicidas se usan el ácido benzoico y salicilico, clortrimazol en bajas concentraciones (canestén, ketoconazole, miconazole, tolnaftato) y micostatin [2].

### 3.2. LAS LEGUMINOSAS COMO FUENTE DE ANTIMICOTICOS

#### 3.2.1. Importancia de las leguminosas

Las leguminosas son una fuente importante de nutrientes y proveen proteínas suplementarias a dietas basadas en cereales [17]. La proteína se encuentra principalmente en los cotiledones en una concentración del 17 al 40 por ciento. También son una fuente de fósforo, hierro, calcio, vitaminas del complejo B, ácido ascórbico y vitamina A [29,30,31].

El valor biológico de las proteínas depende del contenido de aminoácidos esenciales, los cuales deben estar presentes en una concentración óptima para que la proteína pueda ser utilizada en forma completa [32]. Varios investigadores han comprobado que la metionina y la cisteina son los aminoácidos más limitantes de la proteína del frijol. También se ha encontrado en cantidades limitantes: Leucina y triptófano cuando se compara con el patrón de referencia de la FAO [33]. El valor biológico de las proteínas del frijol se encuentra entre el 62 por ciento y 88 por ciento y aumenta significativamente cuando se agrega metionina [30].

La familia *Leguminosae* ocupa el segundo lugar en abundancia entre los angiospermas, comprende 600 géneros y más de 13,000 especies. Corresponden a esta familia muchas plantas productoras de drogas más importantes en comparación con otras familias [34]. Las leguminosas constituyen una de las familias naturales, reorganizables, por su follaje y su fruto. Influye mucho en las plantaciones del hombre, tanto por sus propiedades farmacológicas, como por el alimento que proporciona, además de la utilización de la madera para diferentes manufacturas [35].

### 3.2.2. Leguminosas con actividad antimicótica

A lo largo de los años se han estudiado las plantas por sus cualidades y características especiales que poseen y por lo mismo se les ha clasificado en familias, en géneros y especie de la planta. Además se ha recopilado información referente al uso popular que se le da a cada planta y la parte a emplear [36].

La familia Leguminosae, se ha dividido en tres subfamilias, designados por grupos según corresponda su orden como: Grupo I, Mimosaoideae; Grupo II, Caesalpinoideae; Grupo III, Papilonoideae. Corresponden a estos grupos alrededor de 37, 740 y 133 géneros respectivamente [35].

#### 3.2.2.1. Familia: Caesalpiniaceae

##### 3.2.2.1.1. *Cassia grandis* L.

Entre sus nombres vulgares encontramos: carao, bucut, cañafístula, caragüe, mucut, santal.

Arbol grande, de hasta 30 m de alto, ramas extensas, piloras, corona redondeada o esparcida, tronco de hasta 1 m de diámetro; corteza escamosa, fibrosa, café. Hojas pinnadas, pecíolo corto; folíolos oblongos. Flores rosadas o blancas. Fruto en vaina cilíndrica, negruzco, leñoso, indehisciente, 30-80 cm de largo, septado, pulpa azucarada. Semillas numerosas. Nativo de Centro América, Caribe y norte de Sur América en terrenos abiertos, bordes de caminos y pastizales hasta 900 msnm. En Guatemala crece en Alta Verapaz, Escuintla, Jutiapa, Petén, Retalhuleu, Santa Rosa y Suchitepéquez [35]. El cáliz tiene cinco sépalos desiguales; cinco pétalos alternos con los sépalos, diez estambres libres. En el centro del receptáculo está el ovario estipitado.

La decocción de hojas, fruto y corteza es utilizada por vía tópica. Se prepara un unguento de las hojas para el tratamiento de afecciones de la piel y mucosas [35,38,39,40,41,42]. De las raíces se extrae un líquido antiséptico que se utiliza para la curación de heridas [40,43]. A las hojas y fruto se les atribuye propiedad antimicótica, antiséptica [40,41,44,45,46]. La raíz exhala un olor fétido; puesta en maceración en alcohol rinde un líquido antiséptico, propio para la curación de las heridas.

La información sobre la composición química de esta especie es muy escasa. Las hojas contienen antraquinonas (aloe-emodina) [47]. Estudios de la



actividad antimicótica *in vitro* demuestran que la cocción de las hojas tiene actividad contra *Epidermophyton floccosum*, *Microsporium gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* var. *algonosa*, *T. mentagrophytes* var. *granular* y *T. rubrum*; la concentración mínima inhibitoria es de 300-500 mg; presenta tanto actividad fungicida como fungistática [48]. La actividad antifúngica se debe, en parte, a su contenido de aloe-modina, una antraquinosa acídica, peso molecular 270, cristal anaranjado que ha demostrado actividad contra líneas celulares tumorales [49].

### 3.2.2.1.2. *Cassia occidentalis* L.

Entre sus nombres vulgares encontramos: frijolillo, moquillo, comida de murciélago, cimarrón, hediondio, habilla, furrusca, bruca hembra, lengua de pájaro.

Hierba anual o perenne comúnmente de 1 metro o más, pecíolo con glándulas en la base, folíolos de 4 a 6 pares ovalados-lanceolados, agudos o acuminados de 3-7 cm, hojas de 10-30 cm; flores con pétalos de 2 cm, amarillos; vaina café oscuro, semillas ovales, café-olivo de 3-4 mm de largo [35,50].

Crece en bosques secos a húmedos; a veces a lo largo de caminos o cultivos, o cultivados a menos de 1,400 metros sobre el nivel del mar o menos. Distribuida desde el Sur-este de Estados Unidos, Antillas, México, Centroamérica, parte tropical de Sur América y trópicos del Viejo Mundo. En Guatemala se han descrito en Alta Verapaz, Chiquimula, El Progreso, Escuintla, Guatemala, Izabal, Jutiapa, Petén, Retalhuleu y Zacapa [35,50].

La decocción de las hojas se utilizan para el tratamiento de úlceras, eccemas, tiñas y otras afecciones de la piel [35,50,51]. Las semillas se utilizan para el tratamiento de tiña [52]. Un polvo amarillento de las semillas contiene crisorobina, que ha demostrado actividad antiinflamatoria para el tratamiento de psoriasis y otras afecciones crónicas de la piel. La decocción de las hojas tiene actividad contra *E. floccosum*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*, la CIM es de 200-400 mg y se demostró actividad fungicida.

Las semillas contienen crisofanol y biantraquinona [66] además contienen glucosidos flavónoides, fitosteroles y crisofanol, emodina, fisción y derivados [54]. La raíz contiene flavonoides, fitosteroles y antraquinonas casiolina, fisción, emodina, crisofanol, islandicina, helmistoporina y xantonina [54].

Estudios microbiológicos demuestran que la planta entera posee propiedades antiinflamatorias y antihepatotóxicas; las hojas y tallos tienen propiedades hipotensoras. La hoja y semilla muestran propiedades antibióticas. La

hoja tiene actividad cardiotoxica por vía oral en el conejo. La vaina fresca es tóxica para el ganado; con signos de degeneración muscular, toxicidad hepática y renal [54].

#### 3.2.2.1.3. *Cassia alata* L.

Entre sus nombres vulgares encontramos: barajo, sambrán, pricto, sambrán, boroja, tarantana, guacamaya, tortuga.

Arbusto pequeño, generalmente de 2-6 m de altura, ramas densas, pilosas, vellosas; estipular lanceolado de 1 cm de longitud, ó menos, persistente, deja de ser largo y glandular al crecer [35]. Hojas alternas; el vértice es romo llevando una espina que se hace la continuación del nervio medio, bordes lisos. Flores de color amarillo y sus semillas son lineares y numerosas. Además su tallo es leñoso.

Planta originaria de lugares sólidos, pastosos, como en las costas de Guatemala, que crece en Yucatán, Belice, Alta Verapaz, Izabal, Jutiapa, Santa Rosa, Escuintla, etc. Además son cultivadas en Costa Rica y Sur de Florida. *C. alata* es usada para tratar pacientes que padecen de tinea, usando la cocción de la hoja [50]. Empleandolo como extracto; ayuda para infecciones por bacterias Gram positivo y micobacterias [40].

#### 3.2.2.1.4. *Tamarindus indica* L.

Entre sus nombre vulgares encontramos: liyá, iyá, jolomocox, ucá, hierba de San Juan, anisillo, cuahiyautli, curucumín, hierbanis, periquillo, yahutli.

Arbusto muy aromático. Hojas opuestas, sésiles, lineares u oblongo-lanceoladas. Cabezuelas florales pequeñas con fuerte olor a anís, en densas o abiertas cimas, de 9-10 mm de diámetro; flores del disco de 5-7 corolas de 5-6 mm [55,56,57,58].

Nativa de Asia tropical; crece en pastos abiertos y bosques de pino y encino, algunas veces en laderas rocosas secas, en alturas de 1,000-2,000 msnm. Abundante en la época de lluvia, desaparece durante la época seca; debe cosecharse al inicio de la floración. En Guatemala crece en Alta Verapaz, Chimaltenango, Guatemala, Huehuetenango, Jalapa, Petén, Quetzaltenango, Quiché, Sacatepéquez, San Marcos y Escuintla [50,56].

El uso medicinal de la decocción de las hojas y sumidades floridas está muy difundido en toda la población, principalmente en mordeduras de culebras. Toda la planta lo utilizan como repelente para mosquitos, pulgas y otros insectos

[56,58,60,61]. La pulpa del fruto se usa para tinea. La cocción de hojas y corteza se usa para sarampión. En el estudio de la actividad antimicótica se encontró que la tintura del fruto no tiene actividad contra *C. albicans* [48]. El extracto etanólico tiene actividad contra *T. mentagrophytes* y *T. rubrum* [54]. La cocción del fruto demostró actividad contra *E. floccosum* y *M. canis* [53].

La planta contiene tres resinas ácidas, ácido gálico, glucosa, dextrina, pectrina, pectina, taninos, goma y sales minerales [50,59,60,61]. Las hojas y flores contienen aceite esencial compuesto de limoneno(16.5%),  $\beta$ -ocimeno(13.8%) y  $\beta$ -cariofileno(28.0%), mirceno(4-5%), tagetona(5,6 octen-4-ona 2,6 dimetil), dihidrotagetona, tetrahidrotagetona(2,6 dimetil-4-octanona), estragol, éter metílico de eugenol, linalool, alilanol, anetol y dos componentes no identificados de peso molecular 152 y 204 [62,63]; alcaloides, cumarinas (herniarina o 7-metoxicumarina), flavonas, glucósidos, lactonas, quinonas, saponinas, leucoantocianinas, quercetagetina, patoletina, poliacetilenos, glicósidos cianogénicos y derivados de tiofeno  $\alpha$ -tertienilo, 5-(3-buten-1-inil)-2-2'butienilo, 1-2-dimetoxi-4 (2-propenil)-benceno [63]. La semilla contiene alcaloides no identificados.

En un modelo *in vivo*, se demostró que una pomada a base de la tintura alcohólica disminuye el tiempo de curación de la queratoconjuntivitis, experimentalmente inducida en la cornea del cobayo por *S. dysenteriae*, por lo que inhibe su crecimiento. La actividad antibiótica se atribuye al  $\alpha$ -tertienilo que se ha descrito en varias especies de *Tagetes* y a la herniarina.

### 3.2.2.2. Familia: Papilionaceae

#### 3.2.2.2.1. *Diphysa robinoides* Benth.

Entre sus nombres vulgares encontramos: guachipilín, much, palo amarillo, susuc, zusuc, guachepil, chililcoi.

Arbol de 5-20 m de alto; tronco grueso, ramas glabas. Foliolos 9-15, ovales u obovados. Racimos florales, 4-5 cm de largo, pocas flores, pedicelo 4-6 mm de largo. Legumbre de 6-11 cm de largo, 2 cm de ancho. Semillas café claro, 6 mm de largo, 3 mm de ancho.

Nativo del sur de México y Centro América, en bosques secos o húmedos de tipo tropical perennifolio y subcaducifolio, laderas o lugares rocosos de 600-2,500 msnm. En Guatemala se ha descrito en Alta Verapaz, Baja Verapaz, Chiquimula,

Huehuetenango, Jutiapa, Quetzaltenango, Quiché, Retalhuleu, Sacatepéquez, San Marcos y Suchitepéquez [35].

La infusión de las hojas y corteza de las tres especies de *Dyphysa* se usan indistintamente con fines medicinales por sus propiedades cicatrizantes y sudoríficas [39]. La infusión de las hojas se usa para el tratamiento de infecciones dermatomucosas (abscesos, conjuntivitis, heridas abiertas, leishmaniasis, llagas, tineas) [38]. A la hoja y corteza se le atribuye propiedad cicatrizal [39,50]. La cocción de *D. robinoides* es activa contra *E. floccosum*, *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*; CIM de 300 mg para *T. mentagrophytes*, es fungistática. La actividad antifúngica se atribuye a isoflavonas, stilbene y chamaejasmina [67].

Hay poca información sobre la composición química de ambas especies. La madera y corteza de *D. robinoides* contiene derivados furanoides; las hojas, terpenoides ( $\beta$ -sitosterol) [68], benzopironas [(-)-4-o-metilglabridina y (-)-o-metilpreglabridinal] y flavonoides (difisola, 4-metil éter de diphysolona, ferreirina, kievitona), isoflavanos y trans-stilbence (ent-3,3',4,5,5-pentahidroxistilbence), aproximadamente el tres por ciento de peso seco [69,70].

Estudios de la actividad antifúngica demuestran que la decocción de las hojas de *D. robinoides* mostró actividad contra *E. floccosum*, *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*; CIM de 300 mg para *T. mentagrophytes* y actividad fungistática [48].

#### 3.2.2.2.2. *Gliricidia sepium* (Jacq.) Steud. (flora)

Entre sus nombres vulgares encontramos: madre cacao, kante, kansim, madera negra, madriao, matasarna, sacyab, yaite.

Arbol de 10 m de alto, copa extendida o piramidal, tronco de 30 cm de diámetro, corteza café oscuro. Hojas deciduas, lanceoladas. Flores en racimos, densamente floreados; cáliz puberulento o glabro, corolas rosadas o blancas. Vaina de la semilla café oscuro, glabra, oblonga, blanca, 10-22 cm de largo y 1-2 cm de ancho. Semillas lenticulares, café oscuro, 1 cm de largo.

Nativo de la América tropical en laderas hasta 1,600 msnm, se ha introducido en todo el mundo tropical. En Guatemala se encuentra en: Alta y Baja Verapaz, Chiquimula, Escuintla, Huehuetenango, Izabal, Jutiapa, Petén, Retalhuleu, Sacatepéquez, Santa Rosa, Suchitepéquez y Zacapa [35,50,71,72].

El cocimiento de las hojas y corteza se usan para tratar afecciones de la piel (erupciones, erisipela, impétigo, gangrena, granos, jiole, gonorrea, quemaduras,

picaduras de insectos) [28,61,62,65,74,75,77]; la hoja fresca o cocida se aplica tópicamente sobre el impétigo y otras enfermedades de la piel [55,78,79].

A las hojas y corteza se le atribuye propiedad antiséptica, cicatrizante [50,80,81,82]. El estudio de la actividad antifúngica demuestra que la tintura de las hojas no tienen actividad contra *C. albicans*; la decocción de las hojas tiene actividad contra *M. canis* y *T. mentagrophytes*, con CIM de 100-200 mg, demostrándose actividad fungicida y fungistática [83].

El tamizaje fitoquímico de las hojas indica: alcaloides no cuaternarios, saponinas, esteroides insaturados, flavonoides y polifenoles [84]. El duramen contiene flavonoides (isoflavanes, 2-butin flavanona), isoflavan fenólico, isoflavona (gliricidin 6a), dehidroflavol (sepiol 7a) y B-hidroxihidrochalcona (glicerol 9a) [50,85]. Las hojas y corteza contienen flavonoides (2-O-metilsepiol, sepiol, 7,3,4-trihidroflavanona, robinetina) [30], así como ácidos O-cumarínico y melilótico y cumarinas [84].

El análisis proximal de 100 g de las hojas frescas contienen: 52 calorías, agua(84.7g), proteínas(2.4g), grasa (0.5g), calcio(17mg), carbohidratos(11.9g), fibra (1.3g), cenizas(0.5g), fósforo(34mg), hierro(0.8mg), tiamina(0.14mg), riboflavina(0.08mg), niacina(1.0mg) y ácido ascórbico(12mg) [86].

La decocción de las hojas es activa contra *Microsporium canis* y *Trichophyton mentagrophytes*, con CIM de 100 mg y actividad fungicida y fungistática [48]. La maceración hidroalcohólica de las hojas es activa contra *Neisseria gonorrhoea* y un espectro de inhibición de 80 por ciento de cepas patógenas [69].

### 3.2.2.3. Familia: Fabaceae

#### 3.2.2.3.1. *Piscidia piscipula* Sarj.

El nombre vulgar es: barbasco. Arbol de 15 m. de alto, corteza agrietada, resistente, olor desagradable. Hojas bipinnadas, 5-11 foliolos opuestos, elípticos, 4-13 cm. de largo. Flores rosadas con líneas rojas, 1.5 cm, de largo. Fruto en vaina, 2-8 cm. de largo. Semillas glabras, anchas, delgadas, onduladas, amarillas, 7-12 mm de ancho. Nativo del sur de México, Centro América y el Caribe hasta 300 msnm. En Guatemala se ha descrito en Alta y Baja Verapaz, Escuintla, Petén [35].

Las hojas cocidas se usan para tratar enfermedades de la piel (llagas y úlceras) [82,87]. En estudios de la actividad antimicótica demostró que la decocción

de las hojas de *P. piscipula*, inhiben dermatofitos. La CIM de *P. piscipula* se encuentra entre 300-500 mg, presentando actividad fungicida y fungistática.

La composición química de *P. piscipula* indica que todo árbol, pero principalmente la corteza, contiene ictinona, ácido piscídico, piscidina y rotenona [50], así como  $\beta$ -sitosterol, ácidos cerotínico, esteárico, mánico, succínico, erético, tartárico y citrónico; sumatrol, lisetina, pisceritrona, piscinina, miletona, isomelitona, jamaicina, aceite volátil, taninos y resinas [88].

Estudios de la actividad antifúngica demuestran que la decocción de las hojas de *Piscidia piscipula* inhibe a *Epidermophyton florccosum*, *Microsporum canis*, *M. gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* var. *algodonosa*, *T. mentagrophytes* var. *granulare*, *T. rubrum* [48].

### 3.3. TECNICAS PARA DEMOSTRAR LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *IN VITRO*

#### 3.3.1. Pruebas de difusión

Estas pruebas dependen de la habilidad de los compuestos a difundirse a través del agar y mientras más soluble en agua sea un compuesto más se difundirá. Un compuesto con una pequeña zona de inhibición no necesariamente es menos activo que un compuesto con una zona de inhibición grande.

En pruebas con drogas antifúngicas pueden utilizarse microorganismos indicadores. El crecimiento de microorganismos indicadores, sembrados uniformemente y proporcionalmente sobre la superficie del agar nutritivo es inhibido por una droga y difundido radialmente por depósitos de una solución estándar [89].

##### 3.3.1.1. Método de difusión con disco

Los procedimientos para los métodos de difusión en disco, se deben preparar diluciones de la droga a una concentración por mililitro 30 veces el contenido requerido por el disco. Impregnando los discos de 9 mm preesterilizados y almacenarlos en contenedores bien tapados a 4°C [89].

Seguidamente se debe dispersar el agar fundido en cajas de petri y dejarlo solidificar. Inoculando 2.0 ml de agua destilada estéril o solución salina con el microorganismo a investigar. Se debe ajustar la turbides de esta preparación a 0.5 de

Mc Farland. Con un hisopo estéril rayar uniformemente en tres direcciones la superficie del medio con la suspensión preparada. Al encontrarse exceso de la suspensión se remueve el hisopo presionándolo un poco en los lados del tubo, antes de sembrarlo. después que el inóculo se ha secado (3 a 5 minutos) se colocan los discos en el agar con pinzas flameadas y presionándolo suavemente para asegurar el contacto. Inocular inmediatamente las cajas o dentro de 30 minutos a 30°C [90,91].

Las cajas deben ser observadas primero a las 24 horas de incubación y a las 48 horas hacer las lecturas finales. Medir cada halo de la zona de inhibición de la caja en estudio [91].

### 3.3.1.2. Método de difusión en agar

Al encontrar crecimiento del organismo indicador sembrado uniformemente sobre la superficie del agar nutritivo este es inhibido proporcionalmente por la difusión radial de la droga al exterior del depósito de solución estándar y la muestra colocada en la superficie del agar [89].

Se debe vertir en la caja el agar no inoculado, dejándolo solidificar. Luego se agrega una capa de agar conteniendo 0.5 ml de caldo de cultivo del microorganismo en estudio. Seguidamente se debe hacer un pozo en el agar, con un metal o cilindro de porcelana estéril de 1 cm de diámetro. Pipetear 0.2 ml de muestra en el pozo, sellando el fondo del pozo con una gota de agar fundido para prevenir el arrastre del fluido del pozo. Mantener las placas por 1 o 2 horas a temperatura ambiente para permitir la predifusión, incubándolas a 27°C por 48 horas. Al encontrarse un crecimiento rápido del organismo indicador, las zonas pueden ser medidas entre 6 y 8 horas de incubación.

### 3.3.2. Pruebas de dilución

Son empleadas para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y se realizan tanto en caldo como en agar indicando la susceptibilidad de un microorganismo en estudio. En esta prueba se utilizan cantidades específicas del extracto o antimicrobiano en concentraciones decrecientes en caldo o en el agar. Para ello se deben considerar varios factores como: El medio en el cual se realizan las pruebas, el procedimiento de dilución, estabilidad del extracto vegetal, tamaño del inóculo, rapidez de crecimiento de los microorganismos y periodo de incubación. Ya que cualquier variante en estos factores influye en las pruebas, obteniéndose quizá

resultados que no estén de acuerdo con los métodos. Por lo cual deberán tomarse en consideración para minimizar los errores: Cultivos puros, diluciones adecuadas y medios de cultivo adecuados y estables [92].

#### 3.3.2.1. Método de dilución en caldo

Provee una valoración cuantitativa *in vitro* de la mínima concentración inhibitoria (CIM) de un agente antifúngico para un microorganismo específico [90].

En 12 tubos estériles se agrega 5.0 ml de caldo apropiado del tubo 2 al 12. Luego agregar 5.0 ml de la solución de la droga a los tubos 1 y 2, mezclar y diluir para agregar la droga. Descartar 5.0 ml del último tubo. De estas diluciones pueden obtenerse alícuotas para control de contaminación de la dilución seriada. Inocular e incubar a 30°C por 48 horas [90]. Después de 24 a 48 horas de incubación, la CIM es observada como el tubo que tenga la concentración más débil de droga capaz de inhibir el crecimiento [89].

#### 3.3.2.2. Método de dilución en agar

En este método se deben preparar diluciones de la droga en caldo apropiado diez veces la concentración final deseada. Luego agregar las diluciones en un proporción de 1:10 en espacios estériles de agar fundido [90].

Como el volumen es repartido por replicadores mecánicos es aproximadamente de 0.001 a 0.0003 ml. Esta prueba puede incluir un par de placas libres de droga para control, la cual una puede ser inoculada antes y la otra inoculada después con un microorganismo control apropiado de resistencia conocida. Seguidamente se incuba a 30°C. El tiempo de incubación debe ser controlado por una aparición de crecimiento en las placas control libres de droga. Los resultados deben ser leídos solo donde las colonias de crecimiento son claramente visibles en estas placas. La CIM debe ser definida como la más baja concentración de droga que impide el crecimiento de colonias macroscópicas visibles [90].

### 3.4. IMPORTANCIA DE LA PARED CELULAR

La microestructura de todos los hongos incluye una pared celular única, membrana celular, y citoplasma que contiene un retículo endoplásmico, núcleos, nucléolos, vacuolas de depósito mitocondrias y otras organelas [93].



### 3.4.1. Pared Celular

La pared celular es un componente extremadamente importante de un hongo, proporciona rigidez y fuerza, y protege a la membrana celular de un shock osmótico. Dado que la pared determina la forma de cualquier hongo, el proceso de morfogénesis micótica (por eje:, esporulación o dimorfismo levadura-hongo) debe involucrar cambios en la pared celular [93].

#### 3.4.1.1. Composición

Del 80 al 90% de la pared celular son hidratos de carbono, se encuentra un número relativamente bajo de polisacáridos en la pared, entre ellos encontramos: Quitina, Quitosano, Celulosa,  $\beta$ -glucano,  $\alpha$ -glucano, Manosa.

El análisis antigénico de la pared celular se ha convertido en una herramienta poderosa para la clasificación y estudio de la evolución y de la relación filogenética de los hongos. Aproximadamente el 10% de la pared celular de los hongos consiste en proteínas y glucoproteínas. Estas proteínas incluyen enzimas involucradas en el crecimiento de la pared, ciertas enzimas "extracelulares" y proteínas estructurales que participan de la unión cruzada de las cadenas de polisacáridos. La concentración de proteínas de la pared es mayor cerca de la membrana celular, poseen gran cantidad de aminoácidos con azufre y uniones disulfuro [93].

#### 3.4.1.2. Ultraestructura

La capa más compacta está más cerca de la membrana celular, y la capa o capas externas tiende a ser más amorfa, menos organizada y menos compacta. La pared celular de algunos hongos contiene microfibrillas estrechamente entretejidas embebidas en una matriz polisacárida amorfa [93].

#### 3.4.1.3. Métodos de estudio

La pared celular de los hongos puede estudiarse *in situ* por diversas técnicas: 1) digestión enzimática selectiva de los componentes superficiales expuestos; 2) análisis inmunológicos de antígenos externos (p. ej., anticuerpos fluorescentes, aglutinación); 3) incorporación y localización de precursores marcados de la pared celular (marcación asociada a células; autorradiografía); 4) susceptibilidad a degradación química selectiva

(p. ej., solubilidad en ácidos o álcalis calientes); 5) tinciones histoquímicas, y 6) unión a lectina [93].

#### 3.4.1.4. Biosíntesis de polisacáridos

La quitina es un componente mayor de la pared celular de muchos hongos. Es un homopolímero de N-acetilglucosamina (NAGA) y como la celulosa, a la cual se asemeja estructuralmente, es insoluble en agua y forma disposiciones cristalinas de cadenas paralelas.

La polimerización de la quitina es mediada por la enzima quitinasintetasa, que se localiza en la membrana celular. El dador de aminoazúcares, la uridina-difosfo-N-acetil-glucosamina (UDP-NAGA), deriva de novo de fructosa 6-fosfato y glutamina. En el siguiente tipo general de reacción la enzima es aloestéricamente activada por formación de complejos con UDP-NAGA y el polímero preexistente de quitina se elonga en una unidad monomérica a medida que se agrega un aminoazúcar.

La quitina-sintetasa existe en estado latente (zimógeno) y es activada por proteólisis parcial.

La síntesis de glúcidos sigue el mismo tipo general de reacción. La enzima involucrada es la glúcido-sintetasa, se requiere  $Mg^{++}$  y el UDP sirve como portador para el monómero de D-glucosa. En la síntesis de manosa, se produce guanosin-difosfomanosa en el citoplasma y es transferida a un portador lípido, fosfato de poliprenolmanosa. Es probable que la síntesis de manosa ocurra en el retículo endoplásmico y que las unidades monómeras sean transportadas hacia la pared celular vía el intermedio lipídico.

En la pared celular, dos cadenas de manosa están unidas a un péptido. La manosa-sintetasa requiere  $Mn^{++}$  [93].

#### 3.4.1.5. Biosíntesis de la pared celular

La pared celular de los hongos es sintetizada *in situ*, entre la membrana y la pared existente. En el caso de las hifas, es probable que las vesículas apicales contengan los componentes de la maquinaria sintética, el material precursor de la pared, enzimas biosintéticas, enzimas líticas y cofactores. Se cree que la enzima lítica son transportadas hacia el sitio de crecimiento de novo, donde clivan uniones glucosídicas de los polisacáridos. Menos se sabe de la biosíntesis de la pared celular

Los tejidos de mamíferos carecen de las enzimas para degradar los polisacáridos de la pared, "aclaramas" del cuerpo en forma muy lenta. La retención de material de la pared luego de infección micótica indudablemente contribuye en la patogenicidad de la infección [93].

### 3.5. TECNICAS PARA DETERMINAR EL MECANISMO DE ACCION ANTIFUNGICO.

3.5.1. Ensayos con células enteras: Esta consiste en retar *C. albicans*, *Aspergillus niger* y *Saccharomyces cerevisiae* en caldo o agar.

3.5.2. Ensayos de células blanco enteras (pared celular):

- Regeneración protoplásmica (ensayos con *N. crassa*) y
  - Mutantes osmóticos para inhibición del crecimiento de hifas.
- [58,94].

3.5.3. Ensayos con cepas de ingeniería genética: Se llevan a cabo con una sobreproducción de proteínas y una resistencia a compuestos que específicamente inhiben las enzimas [95].

3.5.4. Ensayos *in vitro*:

- Síntesis de  $\beta$ -glucano [95].
- Síntesis de quitina [95].
- Síntesis de manoproteínas.
- Modificación de proteínas covalentes (fenólicos y alcaloides).
- Ruptura de componentes de la membrana (lípidos, liberación de ácidos grasos y moléculas detergentes: Saponinas).

3.5.5. Ensayos con cepas de *Neurospora crassa*:

Cuando *N. crassa* crece en presencia de ciertos inhibidores de pared celular, el crecimiento hifal se inhibe y el hongo cultivado crece como protoplasto.

La síntesis de b-(1,3)-Glucano no es inhibida competitivamente por papulacandis y echinocandis (descubierto en productos naturales en el año de 1970).

Papulacandi esta lleno de ácidos derivados de la disociación de b-(1,4)-galactosilglucosa, mientras echinocandis esta lleno de ácidos derivados de hexapeptidos cíclicos. Papulacandis y echinocandis pueden tener diferentes sitios de dirección en la síntesis de glucano, las levaduras son resistentes para los echinocandis y susceptible para papulacandis. Echinocandis tiene actividad fungicida [96].

Son solubles en agua dos derivados semisintéticos, uno de echinocandi b y el otro de pneumocandi Ao, la cual tienen actividad *in vitro* e *in vivo* contra especies de *Candida*, *P. carinii* puede actualmente desarrollarse clínicamente. *In vitro* b-(1,3)-glucan sintetasa como con *C. albicans*, *A. fumigatus* y *Neurospora crassa* tienen que estar desarrollándose para investigaciones más adelante [96].

### 3.6. ENSAYOS DE *NEUROSPORA CRASSA* PARA LA DETERMINACION DEL MECANISMO DE ACCION

#### 3.6.1. Morfología de *Neurospora crassa* IM70 ATCC 9279

Son ectosporados hermafroditas y heterotálicos. El elemento femenino está representado por los protoperitecios, en cada uno de los cuales se halla un ascogonio multinucleado [97]. Los ascogonios producen largas ramas hifales que funcionan como tricoginos. No se forman anteridios. Los elementos masculinos están representados por microconidios producidos en cadenas sobre microconidióforos, pero casi cualquier elemento hifal, tal como un conidio o un tubo germinativo, puede proveer de núcleos a los tricoginos receptores. Así, en esta especie encontramos la degeneración de los órganos sexuales masculinos y la delección de la función sexual en partes menos especializadas del talo [98].

Los peritecios maduros son de color oscuro, piriformes y rostrados y contienen numerosos ascos octosporados, pero en la madurez no hay paráfisis. Las esporas son castaño-oscuros o negras, con estrías sobre la pared externa que caracterizan el género *Neurospora* y le dan su nombre. Al principio uninucleadas, las ascosporas finalmente contienen dos núcleos haploides hermanos. En cada asco, cuatro ascosporas son de una cepa, y cuatro, de la otra [97].

### 3.6.2. Fisiología de *Neurospora crassa*:

*Neurospora crassa* (Familia Ostosporasordariceae), es un organismo de crecimiento rápido. Las células hifales son multinucleadas. El micelio incluye hifas ramificadas multinucleadas y conidios asexuales en el extremo de los conidióforos libre<sup>s</sup> así como también el micelio está pigmentado, la cantidad del pigmento varía según el sustrato. Se ha encontrado un medio de composición química mínima para cultivarlo, con sacarosa como fuente de C y KNO<sub>3</sub> como fuente de N. Se agregan sales inorgánicas y biotina, incluyendo los llamados elementos vestigiales. El pH se ajusta a 6.5. Este medio favorece la reproducción sexual [9].

### 3.6.3. Base del ensayo con *N. crassa*

Cuando *N. crassa* crece en presencia de ciertos inhibidores de pared celular, el crecimiento hifal se inhibe y el hongo cultivado crece como protoplasto. Esta característica se ha utilizado para establecer procedimientos simples dirigidos contra células blanco completas y para descubrir inhibidores de la pared celular. A pesar que se ha usado el término "protoplasto", posiblemente, estas células no sean protoplastos sino más bien hifas pequeñas altamente ramificadas.

Discos de papel filtro impregnados con extractos se colocan en placas de agar inoculadas con esporas de *N. crassa*, las zonas de los discos que muestran inhibidores de la pared celular aparecen moteados u opacos en apariencia, mientras que los controles crecen como una hifa blanca normal. Los agentes antifúngicos que no interactúan con la pared celular (nistatina y ketoconozoles) producen unas zonas de inhibición claras.

### 3.6.4. Ensayos de síntesis del $\beta$ -glucano

La pared celular de los hongos como por ejemplo de *C. albicans* se encuentra constituida por varios componentes como: Manoproteínas,  $\beta$ -glucano, etc., que tienen marcada diferencia con las células humanas, de allí su importancia como blanco específico.

Las infecciones micóticas por *C. albicans* y otros hongos producen serios riesgos a individuos inmunocomprometidos. La pared celular le sirve como una barrera protectora, que requiere para su crecimiento y viabilidad de hongos. El (1,3)- $\beta$ -glucano es un componente de la pared celular de *C. albicans*. La síntesis y

ensamble de  $\beta$ -(1,3)-glucano, es un proceso que involucra varios componentes: (EC 2.4.1.34), es una proteína integral de la membrana plasmática y las proteínas catalizan polimerización de UDP-Glc en  $\beta$ -(1,3)-glucano. La enzima es regulada por UDP periférica, ligada a la proteína debido a que el mecanismo de regulación es desconocido por de pronto.

El glucano sintetizado no está presente mas allá de los eucariotes, por lo que representa un ideal blanco para agentes antifúngicos. Los papulacandis y echinocandis son compuestos de productos naturales que inhiben la biosíntesis de glucano.

Los papulacandis son disacáridos espirocíclicos acétilados, mientras que los echinocandis pertenecen a la clase de lipopéptidos cíclicos. Ambos tienen buena actividad in vivo contra *C. albicans*, pero solo los echinocandis tienen buena demostración in vivo con actividad en animales modelos.

Al tener directamente alto un microtítulo se ve protegida la estabilidad de detectar inhibidores de  $\beta$ -(1,3)glucógeno de *C. albicans*. Los ensayos son compatibles con extractos de plantas, microbianos y componentes químicos puros.

#### 4. JUSTIFICACIONES

Las condiciones climáticas del país favorecen el desarrollo de infecciones micóticas, entre los agentes más comunes encontramos: *C. albicans*, *C. neoformans*, *A. flavus*, *E. floccosum*, *M. gypseum*, *T. rubrum*, siendo afectados principalmente los niños, mujeres en edad fértil, pacientes inmunosuprimidos debido a trasplante de órganos y en pacientes con tratamiento prolongado de antibióticos de amplio espectro.

Es necesario disponer de una quimioterapia barata y accesible para tratar pacientes afectados por hongos, ya que hoy en día resulta ser de muy alto costo los productos farmacéuticos y no está al alcance de la mayoría de población.

De los estudios anteriores se ha demostrado que algunas leguminosas como carao, frijolillo, guachipilin, madre de cacao, barajo, barbasco y tamarindo, poseen acción antifúngica. Esta actividad puede ser causada por varios mecanismos, pero, atendiendo a la especificidad de la síntesis de la pared celular fúngica, fue conveniente determinar si esta actividad era causada por inhibición de la síntesis de pared celular de *N. crassa*; ya que a una alta acción antifúngica a nivel de la pared celular, esta planta llega a ser una buena droga, por lo que no va a causar ningún daño en el ser humano, ya que las células humanas carecen de pared celular.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. OBJETIVO GENERAL:

5.1.1. Estudiar la actividad antimicótica de las leguminosas usadas medicinalmente en Guatemala.

### 5.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS:

5.2.1. Confirmar la actividad antifúngica de extractos de leguminosas con actividad probada previamente y determinar la concentración inhibitoria mínima.

5.2.2. Establecer un procedimiento para *Neurospora crassa* IM 70, ATCC 9279 que permita determinar si la actividad antifúngica de las leguminosas es por inhibición de la síntesis de la pared celular.

5.2.3. Determinar el efecto inhibitorio de los extractos vegetales contra la cepa de *N. crassa* y su concentración inhibitoria mínima.



## **6. HIPOTESIS**

De las siete leguminosas con acción antifúngica por lo menos una actúa por inhibición de la síntesis de pared celular en el modelo de *N. crassa* IM 70, ATCC 9279.

## 7. MATERIALES Y METODOS

### 7.1. UNIVERSO DE TRABAJO:

Plantas usadas popularmente en Guatemala, para el tratamiento de afecciones de la piel que han demostrado actividad antifúngica en estudios previos.

Como muestra de trabajo se utilizaron extractos etanólicos concentrados de siete plantas de la familia Leguminosae usadas popularmente en Guatemala para el tratamiento de afecciones cutáneas y mucocutáneas que han demostrado actividad antifúngica (Anexo 1).

### 7.2. RECURSOS:

#### 7.2.1. Humanos

Investigadora: Flor de María León Flores.

Asesor: Lic. Armando Cáceres Estrada.

#### 7.2.2.. Físicos

##### 7.2.2.1. Equipo:

Autoclave

Incubadora

Homogenizador

Balanza analítica

##### 7.2.2.2. Materiales

Papel filtro Whatman No.1

Frascos de vidrio color ámbar

Hisopos estériles

Gradillas

Asas

Cajas de petri

Agitadores de vidrio

Viales de vidrio

Pipetas de vidrio  
Pipetas automáticas  
Beakers de 10-250 ml  
Erlenmeyers de 500 ml  
Balón de fondo plano de 1000 ml  
Molino manual  
Manguera plástica  
Papel Schullicher & Schuell 903

7.2.2.3. Reactivos

Proteasa, peptona  
Extracto de levadura  
Maltosa y sucrosa  
Agar

**7.3. METODOLOGIA:**

**7.3.1. Elaboración del extracto vegetal**

7.3.1.1. Se investigó bibliografía sobre plantas leguminosas (Anexo 1) usadas en el tratamiento de afecciones cutáneas.

7.3.1.2. Se recolectó, herborizó y clasificó la botánica de las plantas de acuerdo con la metodología específica, en los laboratorios de FARMAYA.

7.3.1.3. Preparación de las plantas recolectadas:

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

7.3.1.3.2. Se almacenaron los órganos pulverizados en bolsas plásticas selladas para prolongar su conservación.

7.3.1.4. Preparación de la extracción:

7.3.1.4.1. Se agregaron 10 g del polvo de cada órgano de las plantas a 90 ml de una solución hidroalcohólica al 50 por ciento.

7.3.1.4.2. Se dejaron en reposo durante 3 días con recambio a temperatura ambiente en frascos de color ámbar con agitación diaria.

7.3.1.4.3. Se filtraron las maceraciones por medio de gravedad a través de papel filtro Whatman No.1 y se almacenó el filtrado en frascos estériles color ámbar.

7.3.1.4.4. Se concentraron los filtrados en rotavapor y luego se colocaron en un desecador hasta obtener la consistencia deseada y almacenaron a temperatura ambiente.

### **7.3.2. Preparación del agar Sabouraud modificado para la producción de esporas**

7.3.2.1. Se pesó: dextrosa, 0.6 g; sulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), 0.3 g; fosfato diácido de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), 0.3 g; peptona, 0.3 g y agar agar 6 g.

7.3.2.2. Se agregaron todos los reactivos a 300 ml de agua destilada en un Erlenmeyer, se mezcló bien y disolvió en caliente.

7.3.2.3. Se esterilizó a  $121^\circ\text{C}$  por 15 minutos.

7.3.2.4. Se vertió en botellas para cultivos celulares, se incubó y observó que no existiera contaminación.

7.3.2.5. Se sembró en botellas los hongos de interés para la producción de esporas [89,127,128].

### **7.3.3. Preparación de suspensión de esporas**

7.3.3.1. Se inoculó en tubos de ensayo para cultivo, de aproximadamente 20 cm cuadrados colonias características del hongo, se incubaron a  $27^\circ\text{C}$  por 2-3 semanas.

7.3.3.2. Se agregó al cultivo puro del hongo 3 ml de agua estéril.

7.3.3.3. Se levantó con una varilla de vidrio todo el crecimiento y se colocó en un tubo con tapón de rosca.

7.3.3.4. Se agregaron perlas de vidrio estériles y se agitó fuertemente durante 1 minuto en un agitador vortex.

### **7.3.4. Actividad antifúngica**

7.3.4.1. Se mezcló 1.5 ml del extracto vegetal con 13.5 ml de agar Sabouraud. Preparación de controles con actividad antimicótica para el hongo que se deseaba estudiar. Controles: Un fármaco (Itraconazol 12.5 mg) y agar Sabouraud sin extracto.

7.3.4.2. Se incubaron las cajas, se observó si hay contaminación y se descartaron las cajas con crecimiento microbiano. Se refrigeraron a 4°C hasta el momento de su uso.

7.3.4.3. Se hicieron cuatro agujeros equidistantes en las cajas de agar preparadas con la boca de una campanilla de Durham de un diámetro de 6 mm de acuerdo a una plantilla.

7.3.4.4. Se sacaron de la refrigeradora los viales conteniendo las esporas del hongo se agitaron vigorosamente y colocaron 30 µl en cada agujero, se tapó la caja (no voltear hasta el día siguiente) e incubó a 27°C por 14 días.

7.3.4.5. Se midió el halo de crecimiento en mm [89,128].

### 7.3.5. Ensayo de esporas de *N. crassa*

Se autoclaveó el medio para discos (Anexo 2), permitiendo que se enfriará 40°C en un baño de agua, se añadieron 100 ml de inculo de esporas por 100 ml del medio para los discos y agitó suavemente, luego se vertieron los medios en cajas de petri (=50 ml por 140 mm de diámetro de las cajas), dejando que los medios se solidificaran. Aplicando los discos de filtro de 6 mm impregnados con los extractos vegetales para controles: usando discos de nistatina.

Se incubó por un día a temperatura ambiente con luz. Las zonas de inhibición fueron examinadas macroscopicamente como una zona moteada. Microscópicamente los hongos aparecieron como forma de estrellas o coral.

### 7.3.6. Diseño experimental:

7.3.6.1. Tamizaje de extractos concentrados:

Se elaboró un diseño por conveniencia que incluye cuatro repeticiones, una por cada uno de los macerados vegetales en la misma caja. Al tener todas las réplicas positivas (+) se concluyó que la planta sí tiene efecto ( $p < 0.05$ ), de lo contrario se tomaron como negativas (-) o sea que no tuvo efecto ( $p > 0.05$ ).

Fue un ensayo binomial ( 2 respuestas= + ó -)

Ho:  $p=q$  (probable éxito=probable fracaso) = No efecto.

Ha:  $p \neq q$  (probable éxito > probable fracaso) = Sí efecto.

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

Las plantas que presentaron un halo de inhibición mayor ó igual al setenta y cinco por ciento se tomaron como negativas y las que presentaron un halo menor del setenta y cinco por ciento se tomaron como positivas, de acuerdo a la fórmula siguiente:

$$\% = \frac{\text{Media de la muestra} \times 100}{\text{Media del control}}$$

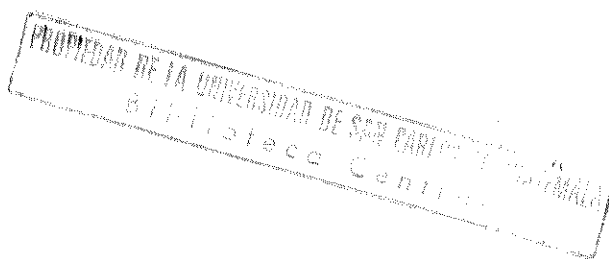
De igual forma se trabajó para calcular la CIM (se detuvo al haber un fracaso como mínimo).

Los extractos utilizados fueron: *C. grandis*, *C. occidentalis*, *C. reticulata*, *D. robinoides*, *G. sepium*, *P. piscipula* y *T. indica*, plantas que son medicinales usadas popularmente en el tratamiento de afecciones de la piel y que han demostrado actividad contra hongos como *C. albicans*, *C. neoformans*, *Aspergillus* sp. y dermatofitos por el método de dilución en agar.

#### 7.3.6.2. Mecanismo de acción de *N. crassa*:

En el presente estudio se utilizaron 10 cajas de petri inoculadas con *N. crassa* IM 70, ATCC 9279, en cada una de ellas se colocaron los 4 discos impregnados con 5 mg de cada extracto etanólico y un disco impregnado con etanol como blanco. La colocación de los discos fue completamente al azar. Se hicieron 5 repeticiones, colocando los discos en la misma caja.

Todas las plantas mostraron acción antifúngica, pero únicamente el extracto de *C. grandis* inhibió la síntesis de pared celular observándose macroscopicamente una zona moteada alrededor del disco impregnado con esta. En vista que la respuesta también es categórica (+ ó -), el diseño fue el mismo que el usado para la Ira. fase.



## 8. RESULTADOS

Se confirmó la actividad antimicótica *in vitro* de siete plantas, que son tradicionalmente usadas para el tratamiento de infecciones micóticas que han demostrado actividad antifúngica.

En los resultados obtenidos del tamizaje (10 mg/ml) de las pruebas con cuatro repeticiones cada una y teniendo como unidad de medida la inhibición de 75 por ciento de crecimiento como positivo y teniendo que  $p < 0.05$  si las cuatro repeticiones son positivas, se encontró que de las siete plantas en estudio, *C. occidentalis* y *C. alata* mostraron actividad contra *E. floccosum*, *M. gypseum* y *T. rubrum*; *C. grandis* y *P. piscipula* (c) mostraron actividad contra *C. albicans*, *C. neoformans*, *E. floccosum*, *M. gypseum* y *T. rubrum*; *D. robinoides* y *T. indica* mostraron actividad contra *E. floccosum* (tabla 1).

TABLA 1

### ACTIVIDAD ANTIFUNGICA DE LAS LEGUMINOSAS EN ESTUDIO

PLANTA	Microorganismos*					
	A	B	C	D	E	F
<i>C. occidentalis</i>	-	-	-	+	+	+
<i>C. alata</i>	-	-	-	+	+	+
<i>C. grandis</i>	-	+	-	+	+	+
<i>G. sepium</i>	+	+	-	+	+	+
<i>P. piscipula</i> (h)	-	+	-	-	-	-
<i>P. piscipula</i> (c)	+	+	-	-	-	-
<i>D. robinoides</i>	-	-	-	-	-	-
<i>T. indica</i>	-	-	-	-	-	-

\*A: *C. albicans*; B: *C. neoformans*; C: *A. flavus*; D: *E. floccosum*; E: *M. gypseum*; F: *T. rubrum*.

Nota: + = actividad  
- = no actividad

Para *C. occidentalis*, *C. alata*, *P. piscipula* (c,h) se utilizó como disolvente etanol al 95%, para *C. grandis* etanol al 50%, para *G. sepium* etanol al 70% y para *D. robinoides* y *T. indica* metanol en los recambios a las 24 horas.

El hongo mayormente inhibido por los extractos vegetales fue *E. floccosum* el cual fue inhibido por seis de las siete plantas en estudio, seguido de *M. gypseum*, *T. rubrum* y *C. neoformans* que fueron inhibidos por cuatro plantas. Los otros hongos fueron inhibidos por dos plantas excepto *A. flavus* el cual no fue inhibido por ninguna planta.

En la evaluación de la CIM, se encontró que *C. occidentalis* muestra actividad hasta 1.25 mg/dl contra *T. rubrum* y *E. floccosum*. *C. alata* tiene actividad hasta una concentración de 1.25 mg/dl contra *E. floccosum*. *C. grandis* tiene actividad hasta una concentración de 1.0 mg/dl contra *C. neoformans*. *G. sepium* tiene actividad hasta una concentración de 1.25 mg/dl contra *C. neoformans*, *E. floccosum* y *T. rubrum*. *P. piscipula* (h) tiene actividad hasta una concentración de 1.25 mg/dl contra *C. neoformans* y *E. floccosum*. *P. piscipula* (c) tiene actividad hasta una concentración de 1.25 mg/dl contra *C. neoformans*, *E. floccosum* y *M. gypseum*. *D. robinoides* y *T. indica* tiene actividad hasta una concentración de 2.25 mg/dl contra *E. floccosum*. (tabla 2).

TABLA 2

**CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA DE LA ACTIVIDAD ANTIFUNGICA DE SIETE LEGUMINOSAS.**

PLANTA	HONGO	CONCENTRACION mg/dl				
		10	5	2.5	1.25	0.6
<i>C. occidentalis</i>	<i>E. floccosum</i>	+	+	+	+	-
	<i>T. rubrum</i>	+	+	+	+	-
<i>C. alata</i>	<i>E. floccosum</i>	+	+	+	+	-
<i>C. grandis</i>	<i>E. neoformans</i>	+	+	+	+	-
<i>G. sepium</i>	<i>C. neoformans</i>	+	+	+	+	-
	<i>E. floccosum</i>	+	+	+	+	-
	<i>T. rubrum</i>	+	+	+	+	-
<i>P. piscipula</i> (h)	<i>C. neoformans</i>	+	+	+	-	-
	<i>E. floccosum</i>	+	+	+	-	-
<i>P. piscipula</i> (c)	<i>C. neoformans</i>	+	+	+	-	-
	<i>E. floccosum</i>	+	+	+	-	-
	<i>M. gypsem</i>	+	+	+	-	-
<i>D. robinoides</i>	<i>E. floccosum</i>	+	+	+	-	-
<i>T. indica</i>	<i>E. floccosum</i>	+	+	+	-	-



Así también se determinó si la actividad antifúngica era a través de la inhibición de la síntesis de la pared celular. De las siete plantas en estudio solamente *C. grandis* tuvo actividad a través de la inhibición de la síntesis de la pared celular, mostrando zonas moteadas y al resto de las plantas se les observaron zonas claras o sea que no hubo inhibición de síntesis de la pared celular. *C. grandis* tiene actividad hasta una concentración de 100 mg/dl contra *Neurospora crassa*. (tabla 3).

TABLA 3

**INHIBICION DE LA PARED CELULAR DE *N. CRASSA* POR LAS  
LEGUMINOSAS EN ESTUDIO**

PLANTA	CONCENTRACION mg/dl		
	200 mg	100 mg	50 mg
<i>C. occidentalis</i>	-	-	-
<i>C. alata</i>	-	-	-
<i>C. grandis</i>	+	+	-
<i>G. sepium</i>	-	-	-
<i>P. piscipula</i> (h)	-	-	-
<i>P. piscipula</i> (c)	-	-	-
<i>D. robinoides</i>	-	-	-
<i>T. indica</i>	-	-	-

Para la impregnación de los discos, se utilizaron como solventes para homogenizar la muestra (extracto de la planta) etanol al 95% para *C. occidentalis*, *C. alata*, *P. piscipula*, *C. grandis*, *G. sepium* y DMSO para *D. robinoides* y *T. indica*.

## 9. DISCUSION DE RESULTADOS

En Guatemala, por su clima tropical favorece el desarrollo de múltiples enfermedades infecciosas, particularmente las de la piel y mucosas. Como consecuencia de las deficientes condiciones educacionales, sanitarias y ambientales, las infecciones dermatomucosas son de carácter endémico, por lo que constituyen un problema de salud.

En la población guatemalteca el uso de las plantas medicinales es una práctica popular, sin embargo es muy escasa la investigación científica que demuestre cuales son los principios activos y en que lugar actúan en el organismo del humano.

Se confirmó la actividad antifúngica de siete plantas medicinales para el tratamiento de infecciones, haciendo uso de un método de dilución en placa con pozos para hongos filamentosos y un método de dilución y siembra por estrías para levaduras. Siendo estos métodos reproducibles y realizando cuatro repeticiones para cada prueba se puede concluir que los extractos de las plantas que tuvieron cuatro repeticiones positivas tienen un efecto inhibitorio *in vitro* sobre el microorganismo contra el cual se probaron, ya que se trabajó estadísticamente con una prueba de hipótesis binomial en la que si  $p < 0.05$  la planta sí tiene efecto y si  $p > 0.05$  la planta no tiene efecto.

De las siete plantas en estudio todas mostraron actividad antifúngica contra algún microorganismo, en concentraciones de 2.5 mg/ml y 1.25 mg/ml, dosis que son lo suficientemente bajas como para ser toleradas por el ser humano y ser efectivas en el tratamiento antifúngico.

Las principales plantas con actividad son: *G. sepium* que tiene fuerte actividad antifúngica ya que inhibió cinco de los seis hongos usados en la prueba, lo cual avala su uso como una medicina interesante que debe estudiarse a mayor profundidad para conocer su potencialidad y limitaciones. *C. grandis* demostró actividad antifúngica contra cuatro de los hongos estudiados.

El resto de las cinco plantas presentaron actividad antifúngica moderada lo que valida en parte la actividad antifúngica atribuida popularmente, aunque su espectro y concentración no son suficientes para ser considerados significativos.

Los resultados obtenidos confirman que las siete (100%) plantas tuvieron alguna actividad antifúngica.

Este trabajo de tesis permitió establecer el procedimiento para *N. crassa* IM 70, ATCC 9279 con el que se puede determinar si la actividad antifúngica de las leguminosas es a través de la inhibición de la síntesis de la pared celular o a través de otro componente del hongo. En el trayecto de la investigación surgieron varios inconvenientes, uno de ellos fue que *N. crassa* es un hongo que fácilmente contamina el ambiente, por lo que se tuvo que trabajar con mucho cuidado y dentro de la campana microbiológica, además es un hongo que crece a las 24 horas y con suficiente luz ya que durante las noches se quedaba con luz artificial, de lo contrario el hongo no crecía como verdaderamente nos interesaba para llevar a cabo el bioensayo. Este procedimiento que se utilizó para determinar si la actividad antifúngica era a través de la inhibición de la síntesis de la pared celular, es muy rápido, eficaz, confiable, económico y nos proporciona resultados satisfactorios, ya que nos pudimos dar cuenta que es un bioensayo que tarda solamente 24 horas y que no se necesita de material y equipo muy sofisticado, por lo cual se recomienda que se sigan realizando estudios, utilizando esta técnica.

En estudios anteriores se ha observado que los dermatofitos se conservan mucho mejor en agua destilada estéril, mientras que las esporas de *N. crassa* en agua destilada llegan a morirse, por lo que se aconseja poder utilizar el amortiguador (  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , glicerol y  $\text{H}_2\text{O}$  destilada ), para poder conservar por mucho mas tiempo las esporas viables.

En el ensayo con *N. crassa* se llegó a determinar el efecto inhibitorio de los extractos vegetales contra la cepa de *N. crassa*. Se utilizaron 10 cajas de petri inoculadas con *N. crassa*, en cada una de ellas se colocaron los cuatro discos impregnados con cada extracto etanólico, un disco con etanol (como blanco) y un disco con nistatina (para validar los resultados) el cual no tiene ningún efecto inhibitorio sobre la pared celular de *N. crassa*. La colocación de los discos fue completamente al azar. Se hicieron 5 repeticiones, colocando los discos en la misma caja.

De las siete plantas en estudio por lo menos una actuó por inhibición de la síntesis de la pared celular en el modelo de *N. crassa* IM 70, ATCC 9279. *C. grandis* mostró claramente la inhibición de la síntesis de la pared celular en *N. crassa*. La pared celular protege a la frágil membrana protoplasmática que esta por debajo de ella, de traumatismos osmóticos y mecánicos.

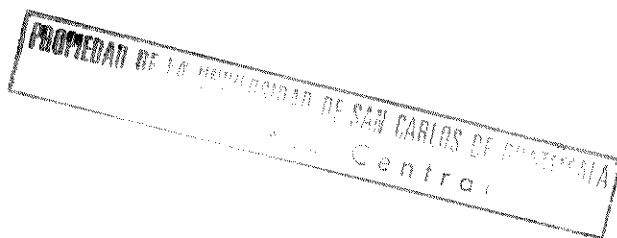
Por lo tanto concluimos que nuestra hipótesis es válida, debido a que de las siete leguminosas con acción antifúngica por lo menos una actuó por inhibición de la síntesis de la pared celular en el modelo de *N. crassa* IM 70, ATCC 9279.

## 10. CONCLUSIONES

1. Se confirmó que *C. occidentalis*, *C. alata*, *C. grandis*, *G. sepium* y *P. piscipula* tienen actividad antifúngica hasta una concentración de 1.25 mg/ml.
2. Se confirmó que *D. robinoides* y *T. indica* tiene actividad contra *E. floccosum* hasta 2.5 mg/ml.
3. *E. floccosum* fue inhibido por los extractos de las siete plantas estudiadas, y *A. flavus* por ninguno de estos.
4. *C. grandis* inhibe la síntesis de la pared celular de *N. crassa*, hasta una concentración de 100 mg/ml.
5. *N. crassa* crece favorablemente con suficiente luz y se conservan sus esporas por mucho tiempo en el amortiguador (  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , glicerol y  $\text{DI H}_2\text{O}$ ).
6. El bioensayo de *N. crassa*, es eficaz, rápido, confiable, económico y nos proporciona resultados satisfactorios.

## 11. RECOMENDACIONES

1. Estudiar la toxicidad de las plantas que mostraron inhibición.
2. Realizar estudios *in vivo* y preclínicos para comprobar la actividad antimicótica de éstas plantas.
3. Estudiar técnicas de cromatografía para aislar los compuestos responsables de la actividad antimicótica.
4. Evaluar las propiedades cicatrizantes y antiinflamatorias de las plantas estudiadas.
5. Llevar a cabo estudios con *N. crassa* con otro tipo de extractos vegetales que proporcionen alternativas terapéuticas inocuas, es decir que no provocan ningún efecto secundario en el ser humano.



## REFERENCIAS

## 12. REFERENCIAS

1. Diamond RD. Mechaniss of host resitence to *Candida albicans*. In: Lennette E et.al. Manual of Clinical Microbiology. Washington: ASM. 1981. pp. 200-203.
2. Emmons CW, Binford CH, Utz JP. Medical Mycology. Philadelphia: Lea & Febiger, 1970. pp.167-181.
3. Wade JC, Schimpff SC. Epidemiology and prevention of candida infectios. In: Bodey GP, Fainstein V. Candidiasis. New York: Raven Press, 1985. pp.1-11.
4. Wilson JW, Plunkett OA. The Fungus Diseases of Man. Los Angeles: University of California Press, 1967. pp.167-177.
5. Jiu J. A survey of some medicinal plants of Máxico for selected biological activities. Lloydia 1986; 29:250-259.
6. Roberts SO. Treatment of superficial and subcutaneous mycoses. In:Antifungal Chemoterapic. London: Academic Press, 1980. pp.225-283.
7. Mejía JV. Plantas medicinales de la República de Guatemala. Guatemala: Tipografía Nacional, 1927. pp.137-163.
8. Utz JP, Drouher E. Treatment of candida infection. In: Bodey GP, Fainstein V. Candidiasis. New York: Reven Press, 1985. pp.253-265.
9. Fetter BF, Klintworth GK, Hendry WS. Mycoses of the central nervous system. USA: Waverly Press, 1967. X+ 2212 p. (p.53-62, 89-123).
10. Gedebush H. Mechanism of action of candidal agent, In:Lennette E et al. Manual of Clinical Microbiology. Washington: ASM. 1981. pp.210-214.

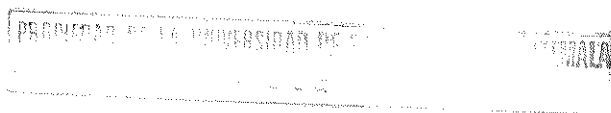
11. Kwon-Chung K.J, Bennett J.E, and Theodore T.S. *Cryptococcus bacillisporus* sp.nov. Serotype B-C of *Cryptococcus neoformans* . Int J Syst Bacteriol 1978; 28:616-620.
12. Logemann HE. Incidencia dermatofítica en Guatemala. Memorias. VI Congreso Centroamericano y II Nacional de Microbiología. Guatemala. 1983. p.C-41.
13. Littman ML, Walter JE. Cryptococcosis: Current status Am J Med 1968; 45:922-932.
14. Conant NF, et. al. Micología. 3ed. México:Interamericana, 1972. XI+592 p.(224-288).
15. Concus AP, et. al. Cutaneous cryptococcosis mimicking molluscum contagiosum in a patient with AIDS. J Infect Rev Dis 1988; 158(4): 897-898.
16. Ahearn DG. Medically important yeast. Ann Rev Microbiol 1978; 32:59-68.
17. Emmons CW, et. al. Medical Mycology. 3a.ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 1977. pp.120-164, 285-299.
18. Kobayashi GS, Medoff G. Antifungal agents: recent developments. Ann Rev Microbiol 1977; 31:291-308.
19. Bennett JE. Flucytosine. Ann Intern Med 1977; 86:311-322.
20. Dismukes WE. Azole antifungals, drugs: old and new.(editorials) Ann Intern Med 1988; 109:177-179.
21. Dupont B, Drochet E. *Cryptococcus meningitis* and fluconazole (letter). Ann Intern Med 1987; 106:778.
22. Balows A. Manual of Clinical Microbiology. 5ta.ed, Washington: American Society for Microbiology, 1991. pp.601-608.



23. Litter, M. *Farmacología Experimental y Clínica*. 7 ed. Buenos Aires: El Ateneo, 1972. p(p.1392-1635).
24. Rippon JW. The changing epidemiology and emerging patterns of dermatophyte species. In: Mc Ginnis MR. *Medical Mycology*. Philadelphia: W B Saunders Co; 1985. Vol I: 208-234.
25. Logeman HE. Incidencia dermatofítica en Guatemala y actualización de Micología Médica, Menorias.III Congreso Nacional de Microbiología. Guatemala. 1986. pp.35-41.
26. Bolivar R, Bodey GP. Candidiasis of gastrointestinal tract. In: Bodey GP, Fainstein V. *Candidiasis*. New York: Raven Press, 1985. pp.181-197.
27. Kinsky S. Antibiotic interaction with model membranes fungus. *Ann Rev Pharmacol* 1970; 10:119.
28. Bezjak V. Standardización of hyphal inoculum of aspergill: for amphotericin B. susceptibility testing *J Clin Microbiol* 1990; 21:509-512.
29. Figueroa LP. Acción antibacteriana de extractos de leguminosas usadas en el tratamiento de diarrea (tesis). Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC. 1991. 67p.
30. Velasquez L. Análisis de la cantidad y composición química de la fibra dietética del frijol negro preparada en forma tradicional (tesis). Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC. 1989. 9p.
31. Layvise M. Effect of interactions of various foods in iron absorption. *Am J Clin* 1968; 21:1175-1188.
32. Fernández R. Factores tóxicos en leguminosas. *Arch Lat Nutr* 1968; 18:205-218.
33. Elías L, Bressani R. Nutritional factors effecting the consumption of leguminous seed. *Arch Lat Nutr* 1974; 24:365-378.

34. Elías L. Effect of cooking and aminoacid supplementation on the nutritive value of black beans Brit. J Nutr 1963; 17:68-78.
35. Standley PC, Steyermark JA. Flora of Guatemala. Fieldiana: Botany. 1946. 24(5):116.
36. Verporte, et. al. Medicinal Plants of Surinam I. Antimicrobial. Activity of Some Medicinal Plants. J Ethnopharmacol 1982; 5:221-226.
37. Trease EG. Farmacognosia. 3 reimp. España: C.E.C.S.A. 1984. p.910 (p.501,856).
38. Altschul S. Drugs and Foods from Little-Known Plants. Cambridge, Harvard University Press, 1983. pp.116.
39. Arnason T. Maya medicinal plants of San Jose Succotz, Belize. J Ethnopharmacol 1980; 21:345-364.
40. Guzmán DJ. Especies Útiles de la flora Salvadoreña. (tomo I). San Salvador: Ministerio de Educación, 1975. pp.43-44.
41. House P, Lagos-Witle S. Manual de 50 plantas Medicinales de Honduras. Tegucigalpa, CONS-H/CIIR/UNAH, 1989. pp.48-49.
42. Nelson CH. Plantas Comunes de Honduras. Tegucigalpa, Ed. Universitaria, 1986. pp.264.
43. Witsberger D. Árboles del Parque Deininger. San Salvador, Ministerio de Educación, 1982. pp.200.
44. Mejía JV. Geografía de la República de Guatemala. Guatemala, Tipografía Nacional, 1927. pp.141.
45. Morton JF. Some folk-medicine plants of Central American markets. Quart J Crud Drug Res 1977; 15:165-192.

46. Nuñez E. Plantas Medicinales de Costa Rica y su Folcklore. San José. Universidad de Costa Rica, 1978. pp.140.
47. Glasby JS. Dictionary of plants Containing Secondary Metabolites. London, Taylor & Francis, 1991. pp.67.
48. Cáceres A, Lopéz BR, Girón MA, Logermam H. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections.1. Screening for antimycotic activity of 44 plant extracts. J Ethnopharmacol 1991; 31:263-275.
49. Bérdy J. Handbook of Antibiotic Compounds. (vol.III, Part 1).Boca Raton CRC Press.1982. pp.70.
50. Tiwari RD, Singh J Phytochem 1977; 167: 1107-08.
51. Soliver-Bever B. Medicinal Plants in tropical West Africa. London: Cambridge University Press, 1986. pp.375.
52. Guzmán A, Manjares A. Estudio del aceite esencial de *Tagetes florida*. Bol. Inst Quim UNAM 1962; 14:48-54.
53. Cáceres A, Jauregui E, Lopéz BR, Logermam H. Actividad antifúngica de plantas de uso medicinal en Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. Centro América. 1993. pp.34.
54. Valle AL. Inhibición de la Infección por *S. dysenteriae* 1 en cornea de cobayo, por extractos de hojas de *Psidium guajava*, *Spondias purpurea* y *Tagetes lucida*. Tesis de Químico Farmaceutico. 1989.
56. Willians, LO. Helenieae. Flora of Guatemala. Fieldana: Botany 1976. 24(12): 382.
57. Linares E, Flores Peñafiel B, Bye R. Selección de plantas medicinales de México. México, Noriega Editores, 1988. pp.68-69.
58. Selitrennikoff. Plant medicinals in Guatemala. Exp Mycol 1983; 5:155-161.



59. Instituto Indigenista Nacional. Aspectos de la medicina popular en el área rural de Guatemala. *Guatemala Indígena* 1971; 6:1-330.
60. Logan MH. Digestive disorders and plant medicinals in Highland Guatemala. *Anthropos* 1973; 68:537-547.
61. Cáceres A, Samayoa B, et. al. Cuadernos de Investigación No.6-89. Guatemala, DIGI-USAC, 1989. p.107.
62. Héthelyi E. GCFMC analysis of essential oils of some *Tagetes* species. In: Bronke, E-J Progress in essential oil research. Berlin, Walter de Gruyter. 1986. pp.131-137.
63. Guzmán A, Manjares A. Estudio del aceite esencial de *Tagetes florida*. *Bol. Inst Quim UNAM* 1962; 14:48-54.
64. Rodríguez E, Mabry TJ. *Tagetes*-Chemical Review *Biol Chem Compos. London Engl Academic* 1975; 2:785-797.
65. House P, Lagos-Witte S. Manual de 50 plantas medicinales de Honduras. Tegucigalpa, CONS-H/CIIR/UNAH, 1989. pp.92-93.
66. Bérdy J. Handbook of Antibiotic Compounds. Vol.VIII, Part I. 1982. pp.361.
67. Castro O. Isoflavans and a stilbene from woods of decay-resistant tropical tree *Diphysa robinoides*. *J Nat Prod* 1986; 49:680-683.
68. Vanbreuseghem R, De Vroey C, Takashio M. Production of macroconidia by *Microsporium ferrugineum* *OTA* 1922; 7:252-256.
69. Cáceres A. Antigonorrhoeal activity of plants used in Guatemala for the treatment of sexually transmitted diseases. *Planta Médica* (sent for publication). 1992.
70. Elías L. Composición Química y valor nutritivo de algunas leguminosas de grano. *Turrialba* 1974; 28:375-380.

71. Niembro A. Arboles y arbustos útiles en México. México, Limusa, 1990. pp.96-96.
72. Williams LO. The useful plants of Central América. Ceiba 1981; 24:3-342.
73. Girón L, Freine V, Alonzo A, Cáceres A. Ethnobotanical survey of the medicinal flora used by the Caribs of Guatemala. J Ethnopharmacol 1991; 34:173-187.
74. Gentry LO, Price MF. Urinary and genital candida infections. In: Bodey GP, Fainstein V. Candidiasis. New York, Raven Press, 1985. pp.169-177.
75. Swett RL. Importance of differential diagnosis in acute vaginitis. Am J Obstet. Gynecol 1983; 152:921-923.
76. Robertson WH. Mycology of vulvovaginitis. Am J Obstet Gynecol 1985; 158:989-991.
77. Medooff G. Treatment of infection causes of candida. In: Lennette E et. al. Manual of Clinical Microbiology. Washington, ASM. 1981. pp.215-217.
78. Duke JA. Ghmny Ethnobotanical Dictionary. Jodhpur, Scientific. Pub., 1986. pp.29.
79. Ainworth G.C, Alfred S. The Fungi. ACADEMIS PRESS. New York and London. Vol.III. 1968. p.299, 345, 362, 450, 457, 687.
80. ACCT. Contribution aus études ethobotaniques et floristiques a la Dominique. Paris, ACCT. 1985. pp.152.
81. Mendieta RM, del Amo S. Plantas medicinales del Estado de Yucatán. Xalapa, INIREB. 1981. pp.158.
82. Ayensu, ED. Medicinal Plants of the Wets Indies. Algonac, Reference Publications, 1981. pp.142-143.

83. Guzmán, N. Determinación de los componentes mayoritarios del extracto de hojas y flores de *T. lucida* Cav. (pericón) soluble en eter de petróleo mediante el uso de cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (tesis). Guatemala, Facultad de CCQQ, 1987.
84. Escobar, N. Flora tóxica de Panamá. Panamá, Ed. Universitaria. 1972. pp.140-142.
85. Orellana SL. Indian Medicine in Highland Guatemala. Albuquerque, University of New México Press, 1987. pp.208.
86. Ronquillo FA, Melgar MF, Carrillo JE, Martínez AB. Especies vegetales de uso actual y potencial en alimentación y medicina de las zonas Subáridas del Nororiente de Guatemala. Guatemala, USAC-DIGI. 1989. pp.67-70.
87. Martínez M. Plantas útiles de la flora Mexicana. México: Ediciones Botas, 1959. 621p.
88. Duke JA. CRC Handboock of Medicinal Herbs. Boca Raton, CRC Press, 1984. 667p.
89. Holt RJ. Laboratory test of antifungal drugs. J Clin Path 1974; 28:767-774.
90. Shadomy S, Ingroff E, Cartwright RY. Laboratory studies with antifungal agents: Susceptibility tests and biossays. 1985. p.991-988.
91. Bauer AW, et. al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. J Clin Path 1966; 36:493-496.
92. Bailey Scott. Diagnóstico Microbiológico. 6ed. Buenos Aires: Panamericana. 1983. p.670.
93. Joklik J. Microbiología de Zinsser. 18 edición. Traductor: Meerross. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana, 1987. pp.1227-1231.
94. Fukuda, 31 st ICAAC Meeting, Poster # 211. 1991.

95. Shan, SIM. Mechanics antifungal. Meeting 1991, Paper-517 Schering-Plough.
96. Nafsika H, Georgopapadakou. Thomas J. Antifungal Agents: Chemotherapeutic Targets and Immunologic Strategies. Rev Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1996; p.279-291.
97. Backus M.P. The mechanics of conidial fertilization in *Neurospora sitophila*. Bull Torrey Bot Club 1939; 66:63-76.
98. Constantine J.A. Introducción a la Micología. EUDEBA. Ed Universidad de Buenos Aires-Viamonte 640 Argentina. 1966. pp. 312-314.

**13. ANEXOS**



### Anexo 1

Plantas usadas popularmente en Guatemala, para el tratamiento de afecciones de la piel

FAMILIA	NOMBRE CIENTIFICO	NOMBRE COMUN	PARTE
Caesalpinoideae	<i>Cassia grandis</i> L.	Cacao	CHR
Caesalpinoideae	<i>Cassia occidentalis</i> L.	Frijolillo	HRS
Caesalpinoideae	<i>Cassia alata</i> L.	Barajo	H
Papilionaceae	<i>Diphysa robinoides</i> Benth.	Guachipilin	CHR
Papilionaceae	<i>Gliricidia sepium</i> Jarq Steud.	Madre cacao	CH
Fabaceae	<i>Piscidis piscipula</i> Sarj.	Barbasco	CH
Fabaceae	<i>Tamarindus indica</i> L.	Tamarindo	F

C= corteza, H= hoja, F= flor, R= raíz, S= semillas

## Anexo 2

### Medio para discos:

Proteosa peptona #3	0.25% (w/w)
Extracto de levadura	0.25% (w/w)
Maltosa y sucrosa	1.0 % (w/w)
Agar	1.5 % (w/w)

Añadir agua en un volumen apropiado y autoclavar a 30-45 minutos a 121°C, 15 PSI.

### Anexo 3

#### Discos

Proteosa peptona	0.5% (w/w)
Extracto de levadura	0.5% (w/w)
Maltosa y sucrosa	4.0% (w/w)
Agar	1.5% (w/w)

Añadir agua estéril con volumen apropiado y autoclavar a 30-45 minutos a 121°C, 15 PSI.

#### Medio Vogels

##### Vogel salado (50 x caldo)

Citrato de sodio, 2H <sub>2</sub> O	64	g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , anhídrido	125	g
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	50	g
Biotina	0.25	g
Solución de elementos trazas	5	ml

Posterior, agregar 375 ml de H<sub>2</sub>O estéril en el orden con el listado conmovido. Después disolver haciendo un volumen final para 500 ml. Esta formado a 50x el caldo de sal. Filtrar y conservar a -20°C.

##### Solución de elementos trazas:

Acido cítrico	2.5	g
ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	2.5	g
FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	1.8	g
CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O	0.125	g
MnSO <sub>4</sub> , 1H <sub>2</sub> O	0.025	g
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub> , anhídridos	0.025	g

MaMoO<sub>4</sub>, 2H<sub>2</sub>O            0.025 g

Disolver cada uno de los alrededores sucesivamente en 47.5 ml de H<sub>2</sub>O estéril moviéndolo a temperatura ambiente. Filtrar y conservar a -21°C.

1x Medio Vogels

Vogels salado (50x)	10 ml
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0.1 g
CaCl <sub>2</sub> , anhidridos	0.05 g
Sucrosa (grado reactivo)	5.0 g
Agar (disco)	7.5 g

Hacer un volumen final de 500 ml con H<sub>2</sub>O estéril. Autoclavear por 45 minutos a 121°C, 15 PSI. Esta prueba entonces se esta usando con la esporulación de *N. crassa*.

Br. Flor de María León Flores  
Autora

Lic. Armando Cáceres  
Aseñor

Lic. Gerardo Arroyo  
Director

Lic. Jorge Rodolfo Pérez Folgar  
Decano

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA