

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

**ACTIVIDAD ANTIFUNGICA DE LOS EXTRACTOS ETANOLICOS DE LA
FLOR DE *Bourreria huanita* Y LA HOJA DE *Lippia graveolens* Y SUS
PARTICIONES HEXANICA, CLOROFORMICA, ACETATO DE ETILO Y
ACUOSA CONTRA LOS HONGOS *Sporothrix schenckii* y *Fonsecaea pedrosoi***

Informe de Tesis

Presentado por

GAUDI HAYDEE ORTIZ BETETA

Para optar al título de

Química Bióloga

Guatemala, octubre de 2006.

INDICE

I.	Resumen	1
II.	Introducción	3
III.	Antecedentes	5
	A. Medicina tradicional	5
	B. Monografía de las plantas en estudio	7
	1. <i>Lippia graveolens</i> HBK	7
	2. <i>Bourreria huanita</i> Hemsl	9
	C. Esporotricosis	11
	D. Cromoblastomicosis	21
	E. Extracción y Caracterización Química	29
IV.	Justificación	35
V.	Objetivos	36
VI.	Hipótesis	37
VII.	Materiales y Métodos	38
	A. Universo de trabajo	38
	B. Recursos	38
	C. Procedimiento	41
	D. Diseño Estadístico de la Investigación	50
VIII.	Resultados	51
IX.	Discusión	58
X.	Conclusiones	61
XI.	Recomendaciones	62
XII.	Referencias	63
XIII.		

I. RESUMEN

Los productos naturales, principalmente los de origen vegetal han sido la principal fuente de agentes terapéuticos de la humanidad durante siglos, constituyendo su uso una costumbre profundamente arraigada en las culturas de los pueblos. En los últimos 20 años ha habido un resurgimiento de la investigación de productos naturales para el descubrimiento y desarrollo de nuevas moléculas de interés farmacéutico. Los productos naturales representan el 50% de las drogas de uso clínico en países en vías de desarrollo.

En el presente estudio se realizó el tamizaje de la actividad antifúngica *in vitro* de dos plantas nativas guatemaltecas de uso etnomédico para afecciones subcutáneas con base en los antecedentes de actividad contra bacterias y hongos filamentosos, con el objeto de contribuir en la identificación de los compuestos activos, mediante el estudio fitoquímico y biológico de los extractos crudos etanólicos de la flor de *Bourreria huanita* (Llave & Lex.) Hemsl. y de la hoja de *Lippia graveolens* L. y sus particiones hexánica, clorofórmica, acetato de etilo y acuosa.

Las micosis subcutáneas son afecciones de curso subagudo o crónico que involucran el tejido subcutáneo y se extiende a lo largo de ganglios linfáticos e incluso pueden afectar órganos internos. Los tratamientos para la cromoblastomicosis y esporotricosis son efectivos, pero su uso prolongado produce efectos secundarios severos, algunos de los cuales son irreversibles (depleción de medula ósea, insuficiencia renal, etc.). Es por esto que con el presente estudio se buscaron nuevas alternativas de tratamiento, con base en la actividad antifúngica que pudieran presentar los extractos y sus particiones de la flor de *B. huanita* y la hoja de *L. graveolens*, como una alternativa para la síntesis de nuevos fármacos o la elaboración de un fitofármaco a partir de los extractos como tal.

El extracto etanólico y las particiones que mostraron resultados positivos fueron los de la hoja de *L. graveolens*. La fase miceliar de *Fonsecaea pedrosoi* fue susceptible al extracto etanólico y su partición clorofórmica a una concentración inhibitoria mínima (CIM) de 1 mg/mL y para la partición hexánica a 0.5 mg/mL. *Sporothrix schenckii* demostró actividad en su fase miceliar a una CIM de 1 mg/mL con las particiones hexánica y clorofórmica y 0.25 con el extracto etanólico. En la fase levaduriforme de *S. schenckii* se presentó actividad de 0.5 mg/mL con la partición hexánica. Para el tamizaje y la CIM se partió de un punto de corte de 1 mg/mL, como lo reportado en la metodología.

A través de ensayos macro y semimicro y cromatografía en capa fina se realizó la caracterización fitoquímica en la que se utilizaron estándares conocidos para comparar los posibles metabolitos presentes en las particiones, a las cuales se les atribuye su actividad farmacológica. Se determinó que las particiones de hoja de *L. graveolens* que demostraron actividad positiva presentaron metabolitos secundarios tales como: aceites volátiles, taninos y flavonoides.

El extracto y las particiones de la flor *B. huanita* no presentaron actividad contra ninguno de los dos hongos ensayados, sin embargo, para contribuir al estudio de esta planta se determinó cualitativamente la presencia de sus metabolitos secundarios, encontrándose entre ellos alcaloides, flavonoides, taninos y aceites volátiles.

Con los resultados anteriores se comprueba la hipótesis planteada, que por lo menos una de las particiones ensayadas presentaron actividad positiva para cualquiera los dos hongos.

II. INTRODUCCIÓN

Las plantas se han empleado con fines curativos desde hace miles de años. En la actualidad se busca el desarrollo de la industria fitoterápica a través del estudio científico del potencial terapéutico de los extractos vegetales utilizados en la medicina popular y más importante aún valorar su inocuidad.

En los últimos 20 años ha habido un resurgimiento en la investigación de productos naturales, debido a la gran diversidad química y biológica del reino vegetal, la cual es una fuente rica y un recurso renovable para el desarrollo de nuevas moléculas de interés farmacéutico. Se estima que más del 90 por ciento de las especies vegetales no han sido estudiadas (1).

Lippia graveolens L. (orégano de monte) y *Bouyeria huanita* Hemsl (esquisuchil), son plantas comúnmente utilizadas en la medicina tradicional y popular, para tratamiento de afecciones de las vías respiratorias, infecciones gastrointestinales, quemaduras, enfermedades cardíacas, tópicamente la decocción se aplica para la cicatrización de heridas, llagas, etc. Estudios preliminares realizados en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, en el año 2004 demostraron actividad contra los agentes causales de micosis subcutáneas *Fonsecaea pedrosoi* y *Sporothrix schenckii* de los extractos crudos de la hoja de *L. graveolens* y la flor *B. huanita* (2).

S. schenckii produce esporotricosis, infección fúngica de curso agudo, subagudo o crónico, que se caracteriza por la presencia de nódulos cutáneos o subcutáneos ulcerosos, eritematosos y/o verrucosos, con frecuencia asociada a afectación linfática nodular. Aunque puede extenderse a áreas adyacentes, rara vez se disemina (3).

La vía de entrada del hongo generalmente es por inoculación cutánea, sin embargo se puede adquirir la infección por inhalación causando una neumonitis granulomatosa con frecuencia cavitada, similar a la tuberculosis. Los medicamentos que se utilizan para el tratamiento de la esporotricosis son el yoduro de potasio y anfotericina B; ambos muy efectivos pero con efectos secundarios muy agresivos que pueden llegar a dañar órganos internos.

La cromoblastomicosis es una micosis subcutánea de curso crónico, que se caracteriza por el desarrollo de una lesión verrucosa en el sitio de inoculación, la cual resulta de la implantación traumática del agente etiológico en la piel (3,4).

Los principales agentes etiológicos de la cromoblastomicosis son cuatro especies conocidas: *Fonsecaea pedrosoi*, *F. compacta*, *Phialophora verrucosa* y *Cladophialophora carrionii* (3-7), siendo *F. pedrosoi* el único agente causal aislado en Guatemala. El tratamiento de esta micosis consiste en procedimientos invasivos quirúrgicos y medicamentos poco selectivos como la anfotericina B y 5-fluorocitosina.

Con frecuencia la investigación de los productos naturales se orienta a la búsqueda de una sola actividad biológica específica lo que no permite identificar otras posibles actividades de importancia (1). Es necesario someter a los extractos de plantas medicinales a ensayos donde sea posible identificar el verdadero potencial biológico de los mismos. Este análisis permite detectar actividades biológicas que pueden ser muy diversas, dar información toxicológica inicial, orientar sobre otras pruebas biológicas que deben de efectuarse con el material de estudio y guía el fraccionamiento químico del extracto según la actividad biológica de las fracciones (8).

El propósito del presente estudio fue realizar un fraccionamiento de los extractos crudos de la flor *B. huanita* y hoja de *L. graveolens*, para la búsqueda de actividad antifúngica *in vitro* contra los hongos *S. schenckii* y *F. pedrosoi*. La evaluación se realizó enfrentando a los hongos con las particiones de las plantas determinándose su eficacia para inhibir el crecimiento de los hongos, a las particiones con actividad positiva se les determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) y tamizaje fitoquímico con el fin de contribuir en la identificación de los compuestos activos responsables de la actividad.

III. ANTECEDENTES

A. Medicina tradicional

1. Definición

La Fitoterapia (*phytos* = vegetal) es el tratamiento de enfermedades con plantas medicinales. La parte activa de la planta medicinal está formada por numerosos componentes y su acción farmacológica la mayoría de las veces, es superior a la que se obtiene con los principios activos aislados, es decir sus componentes actúan sinérgicamente (9).

2. Historia

El hombre ha recurrido al poder curativo de las plantas desde épocas remotas, los médicos egipcios, griegos, chinos, romanos, germanos, aztecas, mayas y de otras muchas civilizaciones, conocían sus efectos benéficos en la salud (9).

La historia oficial de la Fitoterapia se originó hace 3,000 años A.C. hay numerosas referencias y escritos como el papiro egipcio de Ebers, escrito durante la XVIII dinastía de tebas (1.550 A.C.) que contiene numerosas preparaciones medicamentosas a base de vegetales (10).

Con la llegada del Imperio Romano surgen una serie de geniales médicos, entre los que sobresalen Celso, Andrómaco, Escríbonio, Plinio y el más conocido entre los estudiosos de las plantas medicinales, Dioscórides, médico y cirujano durante el mandato de Nerón (50-75 A.C.) se dice que fue el fundador de la materia médica, y el más sobresaliente de los autores que escribieron sobre botánica, ya que durante dieciocho siglos su obra sirvió de base para todos aquellos que se interesaron en el estudio de la Botánica Medicinal (11).

En el siglo XIX, los avances que experimenta la fitoterapia son gracias a los estudios de Darwin y Mendel, que permiten estudiar las plantas desde una perspectiva más profunda, se describen y establecen las causas y efectos. Toda la historia de la medicina está ligada con las plantas medicinales, hasta el siglo XX. Es así como los remedios que hoy se conocen son un poco más que centenarios. Hasta principios del siglo XIX, la materia para los medicamentos provenía de vegetales y animales, no se conocía la síntesis química y fue con

el alemán Wohler Friedrich (1928) quien al sintetizar la urea (a partir del cianato de amonio) dio un giro fundamental que hoy numerosos principios contenidos en las plantas, se sintetizan y forman parte de la farmacopea terapéutica (12-13).

3. Fitoterapia en Guatemala

La medicina tradicional de Guatemala, al igual que en otros lugares del mundo, se remonta a la época antigua. Los mayas descubrieron el uso de muchas plantas curativas (14).

Guatemala a partir de 1927 se dio a la recopilación y documentación sobre plantas nativas medicinales. Existen instituciones como la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, Universidad del Valle de Guatemala, el Centro de Estudios Mesoamericanos sobre Tecnología Apropriada (CEMAT) y el Laboratorio de Productos Fitofarmacéuticos Farmaya que se encargan de realizar estudios *in vitro*, en donde se determinan efectos tóxicos, propiedades antibacterianas, antifúngicas, antiparasitarias, efectos antitumorales de los extractos de las plantas (15-16).

Desde sus inicios la Fitoterapia no ha dejado de progresar; y a pesar de los avances de la ciencia, hoy en día aún no ocupa el lugar que merece dentro del marco de la salud, siendo menospreciada ante las formulas elaboras químicamente. Sin embargo se están desarrollando formulas cada vez más eficaces y perfectamente adaptadas a uno u otro tipo de afección, haciendo de la Fitoterapia una opción más de tratamiento dentro del arsenal de medicamentos (9-11,17).

B. Monografía de las plantas en estudio

1. *Lippia graveolens* HBK.

a. Familia

Verbenaceae

b. Sinónimos

Goniostachyum graveolens Small

Lantana origanoides Mart & Gal

Lippia berlandieri Schauer (15).

c. Nombres comunes

Orégano de monete, Mejorana (15).

d. Descripción botánica

Arbusto delgado de hasta 2m de alto, ramas con pubescencia corto-pilosa, hojas en pecíolos de 5-10 mm de largo, las láminas oblongas, elípticas a ovalado-oblongas, de 2-4cm de largo, usualmente obtusa o redondeadas en el ápice, algunas veces agudas, redondeadas o subcordadas en la base, densamente pilosas en la haz, suaves al tacto, glandular y densamente tomentosa o pilosa en el envés, el borde crenado; 2 a 6 pedúnculos en la axila de la hoja, 4-12 mm de longitud. Flores en espigas subglobosas a oblongas de 4-12 mm de largo, 4 brácteas gruesas, ovado a lanceoladas, agudas, glandulares y densamente pilosas; cáliz de 1-2 mm de largo, glandular y vellosa; corola blanca, el tubo estrioso de 3-6 mm de largo (15).

e. Distribución geográfica

Se desarrolla en pendientes pedregosas, en campos abandonados en planicies; a una altitud de 350 msnm o menos. En Guatemala (en los departamentos de El Progreso, Petén y Zacapa); México; Estados Unidos (Texas) y Nicaragua (18).

f. Usos medicinales

La decocción o infusión de hojas se utiliza para tratar anemia, enfermedades gastrointestinales como amebiasis, cólico, diarrea, disentería, estreñimiento e indigestión, afecciones respiratorias como asma, bronquitis, catarro, influenza, laringitis, pleuresía, resfrío, tos, tuberculosis. Además en la ictericia, amenorrea, dismenorrea y reumatismo. La decocción de las hojas, para la cicatrización de heridas, llagas e inflamaciones de la garganta, en baños para fortalecer niños debilitados, sarna, aliviar prurito en cataplasma para madurar abscesos, calmar neuralgias y aliviar induraciones en la piel. Planta fresca macerada en aceite para dolores reumáticos, la maceración alcohólica contra ataques epilépticos (15-20).

g. Farmacología experimental

Estudios antibacterianos demuestran que la tintura de hojas de *L. graveolens* es activa contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus pyogenes* (15,19). Estudios antifúngicos demuestran que los extractos con diclorometano y etanol son activos contra *Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, *E. floccosum*, *M. gypseum* y *T. rubrum* (15,22). La actividad del extracto diclorometánico contra bacterias es 10 mg/mL y del etanol es 1.75 mg/mL (15). El extracto etanólico de *L. graveolens* tiene una actividad antifúngica para *Sporothrix schenckii* y *Fonsecaea pedrosoi* de 100 µg/mL (2,20). Estudios farmacológicos han determinado que *L. graveolens* posee actividad diurética, por el sinergismo de todos los componentes que posee la planta (21).

h. Composición química

El tamizaje fitoquímico de hojas de *L. graveolens* contiene: aceite esencial (1.8%), glicósidos saponínicos, taninos y triterpenos, celulosa, pigmento y elementos minerales; la corteza y raíz contienen glicósidos saponínicos, aceite esencial y taninos. Las hojas contienen además flavononas (pinocembrina, naringenina) y lapachenol (15).

2. *Bourreria huanita* (Llave & Lex.) Hemsl.

a. Familia

Boraginaceas (23-25).

b. Sinónimos

Bourreria formosa Hemsl

Morelosia huanita Llave & Lex

Bourreria grandiflora Bertol. Fl

Bourreria acimoides (23,26).

c. Nombres comunes

Esquisuchil, Esquisucha, oreja de león o árbol del Hermano Pedro (27).

d. Descripción botánica

Árbol esencialmente glabro, hojas con pecíolos de 1-3 cm de largo, las hojas glabras o con escasos pelos cortos en los pecíolos y costados. Elíptico-oblongas, raramente ovadas, mayormente de 6-12 cm de largo por 3-8 cm de ancho. Obtusas a redondeadas o acuminadas en el ápice, ampliamente redondeadas y algunas veces oblicuas en la base, sus márgenes son enteros y con 7-9 pares de nervios laterales. Cimas de 8 cm de largo y ancho, usualmente muy floreadas, las flores pueden ser sésiles o en pedicelos de 1-6 cm de largo, cáliz campanulado de 6-8 mm de largo, apiculado en el brote, glabro por fuera, blanco y con un tomento corto en el interior, 5 lóbulos de 1.2 mm de largo, triangulares, la corola es blanca de unos 2 cm de longitud, en forma de tubo que apenas excede al cáliz, el limbo es de 2-3 cm de ancho, los estambres son largos y alargados, ovoides y cuando están secos son de unos 12 mm de largo por 17 mm de ancho (18,27).

e. Distribución geográfica

Crece en bosques húmedos a una altura de 2,100 msnm en Guatemala (en los departamentos de Alta Verapaz, El Quiché, Izabal, Jutiapa, Quetzaltenango, Sacatepéquez); México; Honduras; El Salvador y Costa Rica (27).

f. Usos medicinales

En la época contemporánea se ha estudiado que en Antigua Guatemala y pueblos vecinos, se utiliza para calmar dolores, como sedante y relajante, para enfermedades cardíacas (taquicardia y dolor pectoral), afecciones de las vías respiratorias, infecciones gastrointestinales y para problemas de presión arterial. Su uso como sedante también se conoce en Baja Verapaz, la Ciudad capital, Escuintla y Chiquimula (27-28).

g. Estudios etnobotánicos

No se han realizado estudios previos para determinar la actividad farmacológica de *B. huanita*. En 1991, Flores publicó la tesis “Estudio reproductivo y etnobotánico del esquisúchil en Antigua Guatemala y pueblos vecinos”; en donde concluye que dicha planta se utiliza con fines terapéuticos y se utiliza la hoja y la flor. También concluye que hay variabilidad morfológica y que existen dos formas naturales de reproducirse (brotes radiculares y semillas) (29).

h. Composición química

Según la revisión bibliográfica realizada no se encontró información que indique los componentes de *B. huanita* y la actividad biológica de los extractos de esta planta.

C. Esporotricosis

1. Definición

La esporotricosis es una infección fúngica de curso agudo, subagudo o crónico, que se caracteriza por la presencia de nódulos cutáneos o subcutáneos ulcerados, eritematosos y/o verrucosos, con frecuencia asociada a afección linfática nodular, aunque puede extenderse a áreas adyacentes y rara vez se disemina (3).

2. Agente etiológico

Es causada por el hongo dimorfo *Sporothrix schenckii* Hektoen & C.F. Perkins.

Sinónimos:

Sporotrichum Smith

Sporotrichum beurmanni Matruchot y Ramond

S. asteroides Splendore

S. equi Carougeau (30).

La vía de entrada del hongo es generalmente por inoculación cutánea, en ocasiones la inhalación causa neumonitis granulomatosa con frecuencia cavitada, que recuerda a la tuberculosis. También puede haber diseminación hematológica con posterior localización osteoarticular, en el sistema nervioso central, aparato genitourinario y ojos en el huésped inmunocompetente o enfermedad multifocal en el huésped inmunodeprimido. También se han reportado casos de adquirir la enfermedad por manipular pescado, rasguños de gato, mordeduras de loros, perros o picaduras de insectos. El personal con mayor exposición ocupacional son los jardineros, trabajadores de la salud y mineros (4,31).

S. schenckii es un hongo dimórfico, que crece de forma filamentosa a temperaturas 25°C y en forma de levadura a 37°C en medios enriquecidos y en agar Sabouraud. Las cepas aisladas en la naturaleza varían en su capacidad de crecer a 37°C, por lo que la infección podría ser un proceso de selección de aquellas cepas que crecen a mayores temperaturas. La forma filamentosa presenta colonias de crecimiento lento (durante una semana como mínimo) inicialmente claras, húmedas o cremosas, que posteriormente se

convierten en colonias duras y arrugadas de color marrón o negro en su totalidad o por zonas, por la producción de conidias pigmentadas. La coloración puede ser inconstante y variar no sólo entre los aislamientos, incluso perderse tras múltiples pases. En el examen microscópico, se observan hifas delgadas de 1-2 μm de diámetro, con conidióforos perpendiculares cuyo extremo distal se dilata formando una vesícula denticulada, de la que nacerán simpodialmente conidias hialinas de 2-3 μm x 3-6 μm que se agrupan en forma de ramillete o margarita. A medida que el cultivo envejece, la conidiación aumenta y aparecen conidio sésiles a lo largo de los conidióforos e incluso hifas no diferenciadas. Algunas cepas forman conidios de mayor tamaño, triangulares, pigmentadas y de pared gruesa, más resistentes. La morfología saprobia puede estimularse en medio de harina de maíz o Czapek. En la forma levaduriforme se observan levaduras ovoides en forma de puro o cigarro, con varias gemaciones (4-32).

3. Epidemiología

Aunque la esporotricosis es una enfermedad mundialmente extendida, es característica de regiones tropicales y subtropicales como México, Guatemala y Colombia. En México es la causa más frecuente de micosis subcutánea y profunda, observándose, sobretodo, en manipuladores de hierba. En Uruguay, la mayoría de los casos están relacionados con la caza del armadillo, en cuyas madrigueras se aísla el hongo. En Brasil es una enfermedad frecuente entre manipuladores de la paja y, a diferencia de otras zonas, es más frecuente en mujeres. Cabe destacar también la epidemia descrita en las minas de oro de Witwatersrand entre 1941 y 1943, donde la inoculación era a través de roces con los pilares de madera de la mina. En Guatemala la predisposición para adquirir la enfermedad se asocia a la agricultura. En las demás zonas, generalmente se asocia a trabajos de jardinería o agricultura. La esporotricosis puede presentarse a todas las edades y afecta principalmente a varones en una proporción 3:1, por el riesgo de exposición (30,31).

En 1978 el primer caso de esporotricosis reportado para Guatemala fue en la Laguna de Ayarza en el Departamento de Santa Rosa, área endémica de *S. schenckii*. Además se ha establecido otros focos endémicos en los departamentos de San Marcos y Chimaltenango (3,32). Se han realizado varios estudios epidemiológicos donde se ha determinado que la

esporotricosis es la micosis subcutánea más frecuente en Guatemala, con un predominio del sexo masculino; la agricultura constituye el principal riesgo de exposición. El dato más reciente es de 1994 donde se reportaron 285 casos confirmados por el Laboratorio de Micología de la Policlínica del Instituto Guatemalteco de Seguridad Social (IGSS) y el Servicio de Micología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Aunque no existen datos más recientes se considera que el número de casos va en aumento, manteniéndose como primer causa de enfermedad subcutánea a la esporotricosis (3,33).

4. Cuadro clínico

Aunque *S. schenckii* puede causar múltiples síndromes, el más frecuente es la forma cutánea (75% de los casos) que se caracteriza por la aparición de nódulos ulcerativos o verrucosos que afectan la piel, tejido subcutáneo y sistema linfático adyacente.

a. Esporotricosis linfocutánea

La forma cutánea se inicia en el lugar de la inoculación traumática, con la aparición de una lesión papulonodular eritematosa, generalmente indolora, que crece durante días o semanas. El tiempo de incubación es de, aproximadamente, tres semanas, pero en algunos casos puede llegar a ser de meses. Las lesiones pueden ser lisas o verrucosas pero con tendencia a la ulceración, supuración y desarrollo de bordes eritematosos. La localización más frecuente es en las extremidades inferiores, aunque pueden presentarse en cualquier lugar. Pueden desarrollarse adenopatías regionales o locales. A pesar de que la lesión inicial puede persistir como única, la tendencia es al desarrollo de otras lesiones que siguen el trayecto de la diseminación linfática. En los días posteriores a la aparición de la lesión primaria, aparecen múltiples nódulos a lo largo de los vasos linfáticos con una evolución similar a la inicial, pero con tendencia a ser más granulomatosas y persistir durante más tiempo. Puede haber regresión espontánea, si bien existe una tendencia a la cronicidad.

La esporotricosis linfocutánea debe tenerse presente en el diagnóstico diferencial de cualquier afección cutánea que curse con lesiones o úlceras múltiples y diferenciarse de la nocardiosis, leishmaniasis e infecciones por micobacterias atípicas, (especialmente,

Mycobacterium kansasii y *Mycobacterium marinum*). El cultivo es el principal método diagnóstico: los cultivos del drenado de las lesiones en ocasiones son útiles, siendo la muestra más favorable el material de biopsia. El exámen histopatológico puede revelar la presencia de granulomas en la dermis, pero puede ser necesario el exámen de múltiples cortes para visualizar el organismo. Las pruebas serológicas generalmente son negativas en la esporotricosis cutánea.

La forma cutánea llamada fija o en placa no tiene tendencia a extenderse localmente y es característica de áreas endémicas con un elevado porcentaje de la población sensibilizada, pero sin enfermedad. Cursa con el desarrollo de placas eritematosas, ulceradas, infiltradas o verrucosas sin afectación del sistema linfático. Son frecuentes las lesiones satélites de pequeño tamaño. Hay casos descritos de curación espontánea, pero generalmente se trata de lesiones que evolucionan durante meses o incluso años. La forma fija de la esporotricosis puede confundirse con el pioderma bacteriano, los granulomas por agentes extraños, infección inflamatoria por dermatofitos (granuloma de Majocchi), blastomicosis, cromoblastomicosis, lobomicosis y tuberculosis cutánea (4-5).

b. Esporotricosis mucocutánea

Es una enfermedad rara, aunque no es infrecuente como forma secundaria a la diseminación. Inicialmente se trata de lesiones eritematosas, supurativas y ulcerativas que posteriormente se convierten en granulomatosas, vegetativas o papilomatosas. Se localizan fundamentalmente en boca, faringe, cuerdas vocales y nariz. Las lesiones son típicamente dolorosas a diferencia de la forma cutánea y con tendencia al sangrado (30).

c. Esporotricosis extracutánea

La afectación osteoarticular es la forma más frecuente de esporotricosis extracutánea. Se caracteriza por una artritis destructiva con lesiones osteolíticas, tenosinovitis y periosteítis. Las localizaciones más frecuentes son las articulaciones mayores de las extremidades: mano, codo, tobillo y rodilla. Generalmente afecta a una única articulación, es de inicio insidioso y, en un 30% de los casos, también se observan lesiones cutáneas o subcutáneas. Clínicamente cursa con inflamación, dolor, limitación

motora progresiva y, con frecuencia, derrame articular. La sintomatología sistémica es escasa y aparte de la elevación de la velocidad de eritrosedimentación (VSG) no existen otros datos de laboratorio de interés. Para llegar al diagnóstico son necesarios cultivos repetidos del líquido articular y cultivo y exámen histopatológico de la biopsia sinovial, que revela inflamación granulomatosa. Debe establecerse el diagnóstico diferencial con la tuberculosis, gota, artritis reumatoide y sinovitis pigmentada vellonodular. La afectación ocular no se acompaña de otra localización de esporotricosis en un 70% de los casos y se observa en un 50% de los casos de esporotricosis diseminada. Se caracteriza por la presencia de lesiones ulcerativas y gomosas, con un curso similar a la esporotricosis cutánea (5).

La esporotricosis pulmonar es típica de varones entre 30-60 años. Aproximadamente un tercio de los pacientes son alcohólicos y un tercio presentan enfermedad de base como tuberculosis, diabetes, sarcoidosis o tratamiento con corticoides. La inhalación de conidias de *S. schenckii* puede dar lugar a dos tipos de afectación pulmonar: cavitación crónica o adenopatías primarias. Aunque puede ser asintomática, la forma pulmonar con cavitación inicialmente cursa con tos productiva, febrícula, astenia y/o pérdida de peso. A excepción de la elevación de la VSG, no existen otras alteraciones de laboratorio. En la radiografía de tórax se observan inicialmente infiltrados pulmonares que evolucionan hacia la cavitación uni o bilateral, de localización principalmente apical, derrame pleural y adenopatías hiliares. Sin tratamiento, la enfermedad puede permanecer estacionaria pero la tendencia es hacia la progresión con aumento de las cavitaciones, necrosis caseosa, alteración de la función pulmonar y, en ocasiones, diseminación a otros órganos. El segundo tipo de infección pulmonar, se localiza en los gánglios linfáticos traqueobronquiales e hiliares. A pesar de que el crecimiento ganglionar puede causar obstrucción bronquial, esta forma puede permanecer estacionaria e incluso resolverse espontáneamente. El diagnóstico diferencial debe establecerse con micobacteriosis, histoplasmosis y coccidiomicosis. Para el diagnóstico de esporotricosis pulmonar es necesario la confirmación por cultivo y estudio serológico. En el exámen microscópico directo del esputo pueden observarse células levaduriformes características. En algunos pacientes es necesario cultivos repetidos de esputo para llegar al diagnóstico. La prueba cutánea de la esporotriquina, antígeno de la pared celular, suele ser positiva en los pacientes

con esporotricosis pulmonar. Los estudios serológicos mediante técnicas de inmunodifusión, fijación de complemento y aglutinación son también útiles para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad (5,30).

La afección meníngea es una localización poco frecuente. Clínicamente se manifiesta como una meningitis crónica con cefalea, confusión y pérdida de peso, pleocitosis en el líquido cefalorraquídeo, aumento de las proteínas e hipoglicorraquia. Los cultivos de líquido cefalorraquídeo pueden ser negativos, por lo que en ocasiones es necesario realizar cultivos repetidos de volúmenes considerables de líquido y estudio serológico para llegar al diagnóstico. El diagnóstico diferencial debe establecerse con tuberculosis, criptococosis e histoplasmosis (5,34).

d. Esporotricosis multifocal extracutánea

La esporotricosis diseminada que afecta a varios órganos es infrecuente y generalmente se observa en pacientes con enfermedades de base como diabetes, tratamiento prolongado con corticoides, neoplasias, sarcoidosis, enfermedades hematológicas, infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y alcoholismo. La esporotricosis en pacientes inmunocompetentes es generalmente de diseminación linfática, lenta y localmente progresiva. Cuando existe una diseminación hemática, puede haber afección multiorgánica con numerosas lesiones e incluso hemocultivos positivos. Por lo general, las lesiones se localizan en piel, huesos y músculos, pero pueden afectarse otros órganos como tracto genitourinario, sistema nervioso central, hígado, bazo, páncreas, miocardio y tiroides. Clínicamente se caracteriza por fiebre de 39°C o superior, anorexia, pérdida de peso, dolor y limitación articular. Como alteraciones analíticas puede hallarse anemia, leucocitosis y aumento de la VSG. La infección no tratada es fatal. Los cultivos de las lesiones cutáneas y de las articulaciones suelen ser positivos; los hemocultivos y los cultivos de la médula ósea raramente lo son. Los pacientes inmunocomprometidos que únicamente presenten la forma cutánea deben ser estudiados para descartar otras localizaciones. Además, ante todo hemocultivo positivo para *S. schenckii* debe descartarse esporotricosis diseminada (3-5, 30).

5. Diagnóstico

El mejor método diagnóstico es a través de los cultivos del tejido afectado. El exámen microscópico de la muestra es de poco valor debido al escaso número de levaduras presentes, pero puede utilizarse la tinción con Giemsa o calcofluor para la observación. El cultivo positivo de cualquier lugar es diagnóstico de infección, a pesar de que se han descrito casos de colonización cutánea (31).

a. Examen en fresco del material

Observación microscópica de los cuerpos asteroides, que son estructuras formadas por levaduras que presentan el fenómeno de Splendore-Hoeppli (una especie de rayos, dando un aspecto de estrella) (6).

b. Coloración de Giemsa

Levaduras se *S. schenckii*, de forma alargada intra y extracelulares, de 2-10 μm de diámetro. Debe confirmarse con el cultivo, ya que la observación de las levaduras es difícil por la cantidad tan escasa que se encuentra en la muestra (3,5).

c. Cultivo

El material purulento se cultiva en agar Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol, incubado a 27°C durante una semana como mínimo; si después de tres semanas no existe crecimiento característico de la colonia de *S. schenckii* se reporta como negativo (31).

d. Estudios histopatológicos

Presencia de cuerpos asteroides, granulomas con infiltración de linfocitos, células gigantes, fibrosis, y otros cambios celulares (4).

e. Inmunología

Se pueden demostrar aglutininas, fijación del complemento, precipitinas, pero no son pruebas de rutina en los laboratorios. La técnica serológica para el diagnóstico más rápido de esporotricosis son los anticuerpos fluorescentes (35).

6. Tratamiento

Es la única micosis subcutánea que tiene un tratamiento específico y efectivo. Y todas sus formas requieren de tratamiento. El tratamiento clásico para la esporotricosis cutánea sigue siendo la solución saturada de yoduro de potasio. El uso de imidazoles es recomendado como antimicótico alternativo para la mayoría de casos. En la esporotricosis pulmonar y diseminada se utiliza la anfotericina B como tratamiento de elección, ya que es un antimicótico más agresivo que produce una mejor respuesta, este medicamento se puede combinar con otros antimicóticos y antibacterianos, estos últimos utilizados como profilácticos para evitar posibles infecciones bacterianas (5).

a. Yoduro de potasio (KI)

Es el tratamiento de elección específico de la esporotricosis cutánea y linfocutánea. Su acción contra la esporotricosis linfocutánea fue reportado por primera vez en 1903 por Beurmann y Raymond (36).

i. Mecanismo de acción

Su mecanismo de acción es desconocido, no tiene acción directa contra *S. schenckii*, ya que se ha demostrado que el hongo puede crecer en medios de cultivos con altas concentraciones de yoduro de potasio. Se asume que más bien que su acción es indirecta, facilitando los procesos de inmunidad celular o general (3,37).

ii. Dosis

Administración oral de una solución saturada de yoduro de potasio (23 g en 100 mL de agua) tres veces al día; se aumenta la dosis hasta 3 ó 4 mL tres veces al día durante tres a

cuatro semanas; siendo la dosis óptima de 4 a 6 g por día en el adulto y de 1 a 3 g en los niños (38).

iii. Efectos secundarios

Exantema, salivación, lagrimeo, náusea, vómitos, gastritis, rinitis, faringolaringitis, bronquitis (31,36).

b. Anfotericina B

Antimicótico polieno de amplio espectro aislado del hongo *Streptomyces nodosus* en la década de los 50. Se utiliza como el tratamiento inicial para micosis diseminadas y extracutáneas, siendo posteriormente reemplazado por imidazoles.

Administrado en casos de esporotricosis pulmonar o diseminada, o en aquellos en los cuales hay resistencia a otros tratamientos (38-39).

i. Mecanismo de acción

El fármaco se une firmemente al ergosterol en la membrana celular del hongo. Esta unión hace que se provoque la formación de poros, de forma que a través de estos poros escapan sustancias celulares: iones, aminoácidos, glucosa y provoca efecto letal a la célula.

La resistencia a la anfotericina B es una situación poco frecuente, se puede deber a una disminución en la cantidad de ergosterol de la membrana o a una modificación en su estructura (40).

ii. Dosis

Vía de administración intravenosa. Se debe de administrar con suero con dextrosa al 5% durante 4 a 6 horas, iniciando con una dosis de 0.5 mg/kg de peso hasta alcanzar 1 mg/kg, durante 2 a 3 días por un período de hasta 4 meses (39).

iii. Efectos secundarios

Fiebre, escalofríos, anorexia, cefalea, azotemia, nefrotoxicidad, efectos gastrointestinales, anemia normocítica normocrómica, náusea, vómitos, insuficiencia renal;

su administración intratecal causa aracnoiditis, parestias, pérdida de la visión y alteraciones de los esfínteres. A menudo se presenta disminución de la presión arterial (31,39,40).

c. 5-fluorocitosina

Sintetizado por primera vez en 1957 por Duschinsky y colaboradores, como un agente citostático, pero en 1958 se descubrió su actividad citotóxica contra las células fúngicas por el equipo de investigación de Heidelberger. Es un antimicótico oral de amplio espectro, también se puede encontrar disponible en presentación para su administración intravenosa y tópica (36).

i. Mecanismo de acción

La 5-fluorocitosina es una pirimidina fluorinada cuya molécula tiene un átomo de flúor que actúa inhibiendo la síntesis de ácido desoxiribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN) en la célula fúngica. Penetra a la célula fúngica por medio de la permeasa de citosina e inhibe la síntesis de ARN por acción de una desaminasa de citosina. Intracelularmente es convertida en 5-fluorouracilo y en trifosfato de fluororidina. La sustitución del uracilo por 5-fluorouracilo y el fosfato de fluororidina, inhiben la síntesis de ADN y ARN respectivamente, lo que altera la síntesis proteica, llevando a la célula fúngica a la muerte. Al entrar en la célula, esta molécula sufre modificaciones y va hacia la síntesis de ARN, pero origina una fluorouridina aberrante, o sea, genera un ARN mutante, que va a afectar la síntesis proteica, función esencial en las células. Por otra parte, puede inhibir la enzima que permite el paso de uridina a timidina, o timidilato sintetasa, porque el ADN está constituido por timidina y no por uracilo, lo que también afecta la síntesis de ADN, llevando a la célula fúngica a la muerte (3, 39,40).

ii. Dosis

Se puede administrar en forma oral, intravenosa o tópica. Por vía intravenosa se recomienda una dosis de 100 a 150 mg/kg de peso. Tiene actividad antifúngica en una dosis de 100 mg / L (36,40).

iii. Efectos secundarios

Náuseas, vómitos, enterocolitis, tiene una hepatotoxicidad entre el 5 y el 10% dosis dependiente, y depresión de la médula ósea, por lo que no se usa en transplante de médula ósea ni en pacientes con síndrome inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y criptococosis meníngea por la agranulocitosis que produce en el 30% de los pacientes (3,36).

d. Otros antimicóticos

Otros antimicóticos de utilidad en el tratamiento de la esporotricosis son los triazoles, principalmente el itraconazol, activo en todas las formas de esporotricosis pero por su alto costo sólo se emplea en las formas diseminadas. La dosis promedio empleada es de 200 mg diarios que pueden administrarse por varios meses y puede asociarse al yoduro de potasio con buenos resultados. No se recomienda el uso del ketoconazol por su pobre respuesta y su potencial hepatotoxicidad. El fluconazol es también efectivo en las formas graves de esporotricosis, utilizándose dosis de 200 a 400 mg diarios, hasta por seis meses (41).

En los enfermos con SIDA es recomendable la combinación de por lo menos dos antimicóticos; se ha considerado el terbinafine más fluconazol como una buena alternativa (38, 41).

Se han comunicado algunos buenos resultados con griseofulvina; sin embargo son más las publicaciones que refieren fracasos, por lo que en la actualidad no se considera su uso (41).

La combinación de trimetoprim-sulfametoxazol ha sido recomendada para contrarrestar cualquier tipo de infección bacteriana secundaria (41).

D. Cromoblastomycosis

1. Definición

La cromoblastomycosis también conocida como cromomycosis o dermatitis verrucosa; es una micosis de curso crónico, subcutánea que se caracteriza por el desarrollo de una lesión verrucosa en el sitio de inoculación, la cual resulta de la implantación traumática del agente etiológico en la piel (3-5, 42,43).

La lesión puede extenderse y causar deformación del área afectada y en casos raros causar elefantiasis por compresión de los linfáticos. El tipo de enfermedad provocada depende del huésped, sus defensas y la virulencia relativa del agente infectante (4,56).

2. Agentes Etiológicos

Sus agentes causales son hongos feoides (dematiáceos), sapróbios del ambiente y dimórficos. Las especies *Fonsecaea pedrosoi*, *F. compacta* y *Cladophialophora carrionii*, pertenecen a la familia *Herpotrichiellaceae*, orden *Chaetothyriales*, subclase *Chaetothyriomycetidae*, clase *Ascomycetes*, phylum *Ascomycota*. La especie *Phialophora verrucosa* es de clasificación incierta, aunque pertenece a la clase *Ascomycetes*, phylum *Ascomycota* (44).

Las estructuras de estos hongos, como el micelio, los conidios y las células escleróticas presentan una pigmentación que varían de color, desde el pardo claro hasta el café oscuro (42,57).

a. *Fonsecaea pedrosoi* (Brumpt) Negróni

Sinónimos:

Hormodendrum pedrosoi Brumpt

Phialophora pedrosoi Binford (44).

Morfología de la colonia: En cultivo crece muy lentamente, produce una colonia de color pardo negruzco, negro grisáceo, verde oliva grisáceo o negro. La textura es aterciopelada vellosa y la superficie varía de plana a apilada y plegada. En algunas cepas se presenta radiaciones o disposición en zonas (3,43).

Morfología microscópica: Se observa tres tipos de esporulación: cladosporium, rinocladiela (acroteca) y algunas veces fialófora; la proporción varía de una cepa a otra y depende del medio que se utiliza (4,6).

b. *Fonseca compacta* Carrión

Sinónimos:

Hormodendrum compactum Carrión

Phialophora compactum Emmons (33).

Morfología de la colonia: El cultivo crece muy lento, produce una colonia plegada, apilada, quebradiza, de color negro olivo negruzco y desarrolla una pelusa negra pardusca al pasar el tiempo. No se puede distinguir con la de *F. pedrosoi* (4,43).

Morfología microscópica: Se observa con mayor magnitud el tipo de esporulación fiálofora (4).

C. Phialophora verrucosa Medlar

Sinónimos:

Cadophora americana Nannf

P. americana (Nannf) S. Hughes (44).

Morfología de la colonia: En cultivo crece con lentitud, desarrolla una colonia gris olivo oscuro a negra, que al comienzo tiene forma de domo y después se vuelve aplanada. Algunas cepas están apiladas y plegadas o tienen surcos radiales. Un micelio aéreo gris, termina por cubrir la colonia; ésta es compacta, resistente y coreácea (4,43).

Morfología microscópica: Se producen fiálides con morfología bien definida: en forma de frasco o de vaso, a lo largo de la hifa vegetativa. Los conidios son producidos en sucesión, pero no unidos en cadenas (4,59).

d. *Cladophialophora carrionii* (Trejos) de Hoog, Kwon-Chung & McGinnis

Sinónimos:

F. cladosporium Powell (44).

Morfología de la colonia: Crece lentamente, produce una colonia compacta, pequeña, lisa o con pliegues, de color olivo oscuro-negro. Bordes intactos y marginados por hifas negras sumergidas (4,6,43).

Morfología microscópica: Se encuentra casi exclusivamente el tipo de esporulación cladosporium (4).

e. Tipos de Esporulación

Tipo Fialófora

En este tipo hay una célula conidiógena denominada fiálide, la cual se encuentra terminalmente a lo largo del micelio. Esta estructura tiene forma de frasco, con base

redondeada, oval o alargada, cuello estrecho y un orificio que puede tener un collarín. Los conidios se forman en el extremo del frasco y son expulsados a través del cuello. Los conidios son ovales, de paredes gruesas y hialinas (4).

Tipo Rinocladiela

Los conidióforos son sencillos y a veces no se diferencian de las hifas vegetativas. Los conidios ovales son producidos en forma irregular en el extremo y a lo largo de los lados del conidióforo (4,6).

Tipo Cladosporium

En este tipo de conidiación hay un tallo único que sirve como conidióforo, el cual está alargado en el extremo distal en donde se forman dos o más conidios. Estos, a su vez, mediante brotes forman conidios secundarios en sus polos distales (59).

F. pedrosoi, *F. compacta* forman principalmente una esporulación tipo cladosporium y rara vez rinocladiela y fialófora. *C. carrionii* tiene esporulación exclusiva de tipo cladosporium y *P. verrucosa* esporulación sólo del tipo fialófora (3-4,6).

3. Epidemiología

Los agentes causantes de la cromoblastomicosis, han sido aislados de la vegetación en descomposición, la madera en putrefacción y en el humus de los bosques (3,7,43,45). Es una micosis que no tiene una zona endémica establecida, pero la mayoría de casos se dan en climas de los trópicos y subtrópicos (4,7,43-45). La mayoría de casos de cromoblastomicosis son reportados en el sexo masculino, del área rural que se encuentra entre los 30 y 50 años de edad, esto porque los varones tienen más contacto con el suelo y se predisponen a sufrir de heridas durante su trabajo (3-4,43). En Guatemala el único agente causal informado es *F. pedrosoi*. La cromoblastomicosis a través de los años se ha colocado en los tres primeros lugares de frecuencia dentro de las micosis subcutáneas (3,33).

4. Cuadro clínico

La lesión se presenta en el sitio en donde se sufrió el traumatismo. Al empezar la enfermedad, la lesión se presenta pequeña, elevada, eritematoide, con pápulas no pruriginosas. En la mayoría de casos la lesión se presenta escamosa. Al pasar el tiempo las lesiones se elevan 1 a 3 cm sobre la superficie de la piel, son pedunculadas y verrugosas y se asemejan a los flósculos o florecillas de coliflor (3-4,42-43). La enfermedad se mantiene localizada en el sitio del traumatismo. Al parecer no existe ningún malestar del paciente. Sin embargo en algunas ocasiones puede haber una infección secundaria provocada por bacterias, lo que provoca una falta de drenaje linfático que puede ocasionar una elefantiasis en el paciente. No existe invasión en huesos o músculos, ni formación de fistulas (4,43). La mayoría de casos reportados suelen localizarse en las extremidades inferiores, pero pueden localizarse también en brazos y pecho, entre otras (4).

5. Diagnóstico

a. Examen directo

Si el material a examinar se trata de secreción purulenta sólo es necesario hacer una preparación en fresco para buscar células fumagoides o esclerotes de Medlar, además de hifas que pueden verse muy deformadas. Si se trata de raspados de piel, costras, desechos aspirados y material de biopsia es necesario adicionarle hidróxido de potasio (KOH) al 20% en busca de hifas pigmentadas de color pardo, ramificadas (de 2 a 6 μm) (3,6,42).

b. Cultivo

Se pueden utilizar medios selectivos que contengan cicloeximida y cloranfenicol (Sabouraud más antibióticos). Los cultivos deben de incubarse a una temperatura de 25°C, descartando como negativo si no hay crecimiento en 3 semanas (3-4,42).

c. Identificación

La identificación específica es la taxonómica, por lo que se determinan los tipos y porcentaje de conidios presentes y los detalles precisos de la producción de conidios (4,42).

6. Diagnostico diferencial

La cromoblastomicosis debe diferenciarse de tuberculosis verrucosa, epitelioma y leishmaniasis, entre otras (43).

Las micosis subcutáneas son graves en cuanto a pronostico y tiene limitaciones en cuanto al tratamiento y posibilidades de curación (47).

Es común que la cromoblastomicosis persista localizada y no debilite al paciente. Existe la posibilidad de una infección secundaria provocando una falta de drenaje linfático y elefantiasis, lo que puede causar problemas al paciente (43).

7. Tratamiento

En las primeras etapas de la enfermedad, el tratamiento más confiable es la escisión quirúrgica, electrodesecación o la criocirugía (4,43,48,49).

En los casos más avanzados, se ha utilizado gran variedad de antimicóticos, presentando baja selectividad y alta toxicidad, como por ejemplo la anfotericina B (38).

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

El tratamiento de elección actualmente es la 5-fluorocitosina, aunque ha fracasado en la enfermedad de curso crónico. Ha sido también utilizada en combinación con anfotericina B en donde se observa retraso en el desarrollo de resistencia hacia la 5-fluorocitosina y permite el uso de dosis más bajas de anfotericina B (36,38,50).

a. Anfotericina B

Es un antifúngico polieno, descubierto en la década de los 50 como producto de la bacteria *S. nodosus*.

i. Mecanismo de acción

Los antifúngicos polienos se fijan firmemente al ergosterol de la membrana citoplasmática del hongo, con lo que se altera la permeabilidad de la membrana, por la formación de poros, los que permiten la pérdida del contenido citoplasmático (macromoléculas y los iones) causando la muerte de la célula (38,50,51).

ii. Dosis

Este puede administrarse intravenosamente y solamente el 10% de la bioactividad se retiene en el plasma. En el caso de adultos es necesario disolver la droga en 500 mL de dextrosa líquida al 5% y debe aplicarse en intervalos de 4 a 6 horas. Las dosis depende de cada paciente, puede darse 0.2 mg/Kg de peso al día, pudiendo aumentarse progresivamente a 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mg/Kg de peso al día. Siendo la dosis óptima de 35 mg /Kg de peso, en un tiempo de seis a doce semanas hasta cuatro meses (3,50,52,53).

iii. Efectos secundarios

La anfotericina B no es 100% efectiva y puede causar efectos secundarios como tromboflebitis, fiebre, escalofríos, anorexia, cefalea, náuseas, vómitos, nefrotoxicidad, efectos gastrointestinales, entre otros. El daño más importante es la vasoconstricción y lesión de las membranas lisosómicas de las células de los túbulos renales (3,50,52-53).

b. 5-fluorocitosina

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

i. Mecanismo de acción

Su acción se basa en que penetra a la célula fúngica por medio de la citosina permeasa, esta molécula sufre modificaciones y va hacia la síntesis de ARN y origina una fluorouridina aberrante, o sea, genera un ARN mutante, que va a afectar la síntesis proteica; un segundo mecanismo de acción ocurre a través de otro metabolito que es el monofosfato de 5-fluorodeoxiuridina, que inhibe la enzima que permite el paso de uridina a timidina o timidilato sintetasa y bloquea la síntesis de ADN, porque el ADN esta constituido por timidina y no por uracilo (3,36,51).

ii. Dosis

La dosis oral recomendada es de 100 a 150 mg/Kg de peso al día, divididas en 4 dosis, durante 4 o más semanas, se absorbe bien y se distribuye en los tejidos, incluyendo el

líquido cefalorraquídeo en donde la concentración del fármaco es de 60-80% de los valores séricos, que tienden a aproximarse a 50 µg/mL (3,50).

iv. Efectos secundarios

Los efectos secundarios son pocos, pero puede causar náusea, vómitos, enterocolitis y depresión de la médula ósea, leucopenia y trombocitopenia (3,36,51).

c. Itraconazol

Es un compuesto triazólico de segunda generación, derivado del dioxilano con un átomo adicional de nitrógeno (3,55).

i. Mecanismo de acción

Como otros imidazoles, ejerce su efecto alterando la membrana celular del hongo. Estudios *in vitro* han demostrado que inhibe el citocromo P-450 una enzima que es necesaria para la conversión del lanosterol a ergosterol al ser este un componente esencial de la membrana del microorganismo, su déficit produce un aumento de la permeabilidad de esta con la subsiguiente pérdida del contenido celular, lo que provoca la muerte (51,55).

ii. Dosis

La dosis oral recomendada en adultos es de 200 mg al día, incrementando la dosis de 100 en 100 mg hasta llegar a un máximo de 400 mg al día. En adolescentes y niños 5 mg/kg/día en una dosis única al día durante una semana. El Itraconazol tiene una vida media en el plasma de treinta horas después de administrada (50,51).

iii. Efectos secundarios

El Itraconazol puede causar náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal, hipokaliemia, reacciones dermatológicas como rash inespecífico sobre todo en pacientes inmunodeprimidos, prurito, urticaria, síndrome de Stevens-Johnson, mareos, cefaleas, angiodema, anafilaxia, fatiga, hipertensión, reacciones adversas hepáticas, carcinogénesis y efectos teratógenos, entre otros. al menos en un caso se ha observado la potenciación del efecto anticoagulante de la warfarina por el itraconazol, probablemente por desplazamiento

del anticoagulante de las proteínas plasmáticas. Se recomienda precaución al utilizar el itraconazol en pacientes anticoagulados (50,56).

d. Terbinafine

Es un compuesto alilamino sintético (50).

i. Mecanismo de acción

La terbinafine obstruye la biosíntesis del esterol al inhibir la enzima esqualeno-monooxigenasa. La acumulación de esqualeno en la membrana de la célula debilita la membrana de los hongos sensibles, además, la inhibición de la monooxigenasa ocasiona una deficiencia de ergosterol, un componente de la membrana de los hongos, necesario para su crecimiento, y a una acumulación intracelular de esqualeno, que conlleva a la muerte celular (50).

ii. Dosis

La dosis recomendada varía según la edad del paciente, de la indicación y la gravedad de la infección, se recomienda 250 mg al día en personas adultas y en niños mayores de 2 años 125 mg al día, para los niños de menos de 20 kg se sugiere dosis de 62.5 mg al día (50).

iii. Efectos secundarios

Puede causar pérdida de apetito, dispepsia, náuseas, dolor abdominal, diarrea, exantema, artralgia, mialgia, trombocitopenia, neutropenia, linfocitopenia, rash cefalea, mareos y disfunción hepatobiliar, entre otras (50).

E. Extracción y caracterización química

Cuando se realizan investigaciones para buscar o confirmar una actividad biológica es importante la determinación de los constituyentes químicos de la planta. El escrutinio fármaco químico constituye el marco de referencia convencional para el estudio de los principios activos de plantas medicinales. Este enfoque se enmarca en la extracción y

fraccionamiento bioguiado el cual consiste en la preparación de extractos crudos, fracciones obtenidas a partir de dichos extractos y la evaluación de su bioactividad (62).

1. Extracción

Para la investigación fitoquímica y farmacológica es necesario realizar extracciones reproducibles, cuantitativas, estables y eficientes para el efecto que se desea demostrar.

La extracción para tamizaje consiste en realizar una extracción con disolventes con diferentes polaridades, generalmente diclorometano o hexano, éter o etanol y agua. Debido a la toxicidad y efectos farmacológicos de estos disolventes es preciso concentrar los extractos evaporando el disolvente a presión reducida y temperatura controlada (rotavapor) hasta alcanzar una consistencia de miel. En el caso de los extractos acuosos se suele concentrar por medio de liofilización. En esta forma los extractos son más estables y fáciles de almacenar y dosificar (62,64).

a. Esquema extractivo

Puede definirse como una liberación extractiva fraccionada mediante un gradiente de polaridad ascendente. En el proceso de escogencia de un disolvente determinado es necesario considerar aspectos relacionados con la selectividad, facilidad de manipulación, precio, seguridad y riesgos en cuanto a una posible contaminación ambiental. Mediante el uso de este diseño se pretende aprovechar la selectividad y especificidad de los disolventes extractores utilizados (62,64).

b. Tamizaje fitoquímico

Permite determinar cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés, éste se fundamenta en la reacción selectiva de grupos funcionales específicos con reactivos capaces de formar complejos visualizables por el desarrollo de coloraciones características o por la formación de precipitados. Para el análisis fitoquímico preliminar se usan técnicas macro o micrométricas en tubo o capa fina y para el análisis fitoquímico definitivo y elucidación estructural se recurre a técnicas de cromatografía en papel, capa fina (CCF, TLC por sus siglas en inglés Thin Layer Chromatography) o columna, cromatografía líquida

de alta resolución (HPLC), cromatografía de gases, espectroscopia infrarroja, análisis de espectroscopia de masas, técnicas de refracción y cristalografía de rayos X, resonancia magnética nuclear (MNR), etc., pero en todos los casos se recomienda un fraccionamiento bioquímico (61,64,66).

La cromatografía en capa fina es un método simple y eficiente. Este método sirve para identificar las drogas vegetales, sus extractos y tinturas. La respuesta reactiva de estándares conocidos de grupos funcionales particulares se utiliza frecuentemente como medio de comparación (69).

c. Fraccionamiento de extractos

Todos los procesos de separación involucran la división de la mezcla en un número discreto de fracciones. Se refiere a la separación de metabolitos de mezclas de naturaleza química compleja, para obtener fracciones de compuestos afines, con características y propiedades similares. La mayor parte de los métodos de fraccionamiento aprovechan la naturaleza química de los compuestos que se van a separar, específicamente las diferencias en polaridad y acidez-alcalinidad. El fraccionamiento de extractos crudos vegetales implica la utilización de métodos altamente especializados, esto se hace con el propósito de optimizar recursos y técnicas y aumentar la eficiencia de las metodologías. El tipo de fraccionamiento depende de la muestra individual y del objetivo de la separación. Por lo regular, primero se divide en fracciones y posteriormente se procede al análisis de éstas para determinar que fracción contiene el compuesto deseado, para luego determinar su bioactividad (54,60).

d. Partición líquido-líquido

Este método se fundamenta en las diferencias de los coeficientes de reparto de los metabolitos extraídos entre dos líquidos inmiscibles (uno polar y otro apolar). Esta técnica constituye un método de fraccionamiento grueso, que permite obtener extractos selectivamente caracterizables y con una mayor especificidad en lo que a grupos funcionales se refiere (62,64).

2. Evaluación de la actividad biocida:

La actividad biocida se refiere a la capacidad de una sustancia para causar la muerte en determinados organismos, es detectada por medio de una serie de ensayos biológicos *in vitro*.

Esta serie de ensayos biológicos (bioensayos), es decir, fase de pretamizaje es útil para dar una idea preliminar de las potencialidades de un extracto crudo, fracción purificada o principio activo puro de especies vegetales. Las técnicas utilizadas en la fase de pretamizaje pueden tener distintos grados de dificultad en la medida en que se identifican con mayor claridad las potencialidades de las especies en estudio, son relativamente sencillas siempre que no involucren animales; además son baratas, rápidas, reproducibles y permiten evaluar un número grande de muestras (62,65,66).

Estos bioensayos han sido empleados exitosamente en un sinnúmero de estudios realizados alrededor del mundo, en Guatemala en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia para evaluar la actividad biocida de distintas plantas de uso popular en el país (67).

La actividad biocida abarca un amplio espectro de organismos, pero con fines prácticos se remitirá únicamente a la actividad antimicrobiana (antibacteriana y antifúngica), larvicida y citotóxica en las especies vegetales (68-70).

a. Actividad antifúngica

El tamizaje de la actividad antifúngica consiste en poner de manifiesto la inhibición del crecimiento de un hongo, determinada en condiciones estándar con una concentración previamente determinada como punto de corte (entre 500-1000 mg/mL) de un extracto, fracción o compuesto obtenidos de una droga vegetal. Las pruebas se complican por ciertas características de los hongos, como dimorfismo y requerimiento de crecimiento por tiempo prolongado. El crecimiento de hongos filamentosos inoculados en medios de cultivo adecuados es inhibido por las moléculas bioactivas diluidas en el medio de agar (62).

Hay tres métodos para pruebas de susceptibilidad con antifúngicos, dilución en caldo y difusión en agar, todos se basan en los mismos principios de los utilizados para agentes antibacterianos. Para detectar la actividad antilevadura se usa una modificación del método de dilución para antibióticos, que determina la susceptibilidad de los cultivos frente

a discos de papel secante impregnados con preparaciones vegetales. Para investigar la fitoquímica de los compuestos activos puede usarse una técnica bioautográfica que combina TLC y difusión en agar (70).

i. Método de dilución en agar

Se basa en que el crecimiento exponencial de bacterias y hongos susceptibles inoculados en superficie o profundidad en los medios de cultivo adecuados es inhibido por las moléculas bioactivas diluidas en el medio de agar. Este procedimiento ofrece una distribución homogénea del compuesto en el agar y esta basado en el método descrito por Mitscher *et al.*. En este método una cantidad conocida de muestra es diluida en agar, siendo indispensable la dispersión homogénea de la muestra en agua (73-75).

El método de dilución se emplea para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) que se requiere del agente antifúngico para inhibir o matar al microorganismo, es decir, es la concentración más baja en la que no hay crecimiento visible. Esta prueba puede ser en caldo (tubo) y en agar (placa) (64). Se ha utilizado principalmente para determinar los valores de CIM de un extracto, aceite esencial o sustancia pura, así como para el tamizaje preliminar de la actividad antifúngica, además permite evaluar la CIM usando diluciones decrecientes del extracto (71).

El método de dilución es el único método para determinar la concentración bactericida mínima (MBC). El CMB es determinado por subcultivos de los tubos con inhibición en un plato de agar o en medio líquido, cuando el microorganismo no crece, la muestra es un microbicida. La dilución en medio líquido es la técnica más complicada pero, también la más precisa. Se interpreta como resultado positivo, la ausencia del crecimiento de microorganismo (76).

El método de dilución sólido, es parecido al método de dilución en líquido. Este método es rápido y la CIM de un producto puede ser determinada contra seis microorganismos a la vez. Este método permite la inoculación de aproximadamente 20-25 microorganismos en platos estandarizados. El método de Mitscher *et al.*, establece la cantidad de muestra necesaria, la cual no debe ser mayor de 1 mg de muestra en 1 mL del medio de cultivo. Las muestras activas son reensayadas a una concentración de 0.1 mg/mL (68-69,71).

Las ventajas de este método son su simplicidad, sensibilidad, reproducibilidad, rapidez, facilidad de estandarizar y procesar gran cantidad de muestras, además ofrece la posibilidad de usarlo en el estudio de antimicrobianos solubles en agua o muestras insolubles como aceites esenciales, además pueden ser sembrados hasta seis microorganismos en una caja de Petri (71).

ii. Método de difusión

Este procedimiento se basa en el método descrito por Bauer -Kirby y es utilizado para evaluar la actividad antifúngica vegetal (54). Se utiliza un disco, agujero o cilindro como reservorio en el agar, el cual contiene la muestra a ensayar, luego del período de incubación se mide el diámetro de la zona clara alrededor del reservorio (diámetro de inhibición).

El método de difusión se usa como un procedimiento cualitativo, semicuantitativo y a veces cuantitativo, generalmente los microorganismos son categorizados como resistentes, intermedios o susceptibles para cada agente antifúngico. Este método es frecuentemente utilizado en investigación, pero tiene la desventaja de ser poco creíble en casos en los cuales la muestra se difunde con dificultad en el medio por que no existe relación entre el poder de difusión y la actividad antimicrobiana, lo cual fue demostrado por Pellecuer, *et al.* (70,75).

Este método no requiere dispersión homogénea en agua del extracto a evaluar, la cantidad de muestra utilizada en el tamizaje es pequeña y permite probar cinco a seis compuestos contra un organismo, además es el más conveniente para el tamizaje preliminar de sustancias puras (alcaloides, terpenoides, flavonoides, etc.). Los resultados se evalúan de la siguiente manera:

- Crecimiento alrededor del disco: actividad negativa.
- No hay crecimiento a lo largo del disco: actividad positiva, indica inhibición.

Luego se compara con los métodos de dilución (77).

IV. JUSTIFICACIÓN

Los productos naturales, principalmente los de origen vegetal han sido la principal fuente de agentes terapéuticos de la humanidad durante siglos, constituyendo su uso una costumbre profundamente arraigada en las culturas de los pueblos. Es por eso que desde sus inicios la Fitoterapia no ha dejado de progresar, actualmente el estudio de las plantas medicinales ha adquirido importancia. La actividad biocida de los extractos y productos naturales ha expuesto el potencial de las plantas como una fuente de agentes terapéuticos, con fórmulas cada vez más eficaces y perfectamente adaptadas al tratamiento de diferentes afecciones.

La búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento, es una consecuencia de la necesidad de medicamentos que reduzcan o eliminen los efectos secundarios por su uso. Tal es el caso de los medicamentos utilizados para tratamiento de micosis subcutáneas como la esporotricosis producida por *S. schenckii* y la cromoblastomicosis por *F. pedrosoi*; las cuales utilizan medicamentos efectivos, pero altamente tóxicos que pueden producir efectos irreversibles en el paciente por lo prolongado de su administración.

Es por esto que la búsqueda de la actividad antifúngica es de importancia, ya que permite encontrar nuevas opciones de tratamiento obteniéndose un producto de menor toxicidad y de mayor disponibilidad para el paciente. Además los países en vías de desarrollo enfocan sus programas de investigación principalmente en la obtención de medicamentos a partir de los diferentes compuestos extraídos de plantas medicinales autóctonas que no han sido estudiadas, o que han sido parcialmente estudiadas. Siendo este el caso de *L. graveolens* y *B. huanita*, son plantas comúnmente utilizadas en la medicina tradicional y popular, en el tratamiento de afecciones de las vías respiratorias, infecciones gastrointestinales, quemaduras, enfermedades cardíacas, etc.

Estudios preliminares realizados en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia han demostrado la actividad antifúngica contra *F. pedrosoi* y *S. schenckii* de los extractos crudos de la hoja de *L. graveolens* y la flor *B. huanita* en el año 2004. Por lo anteriormente expuesto corresponde ahora realizar un fraccionamiento de estos extractos para contribuir en la identificación de los compuestos activos responsables de la actividad.

V. OBJETIVOS

A. Objetivo general

Determinar la actividad antifúngica de los extractos crudos etanólicos de la flor *B. huanita* y hoja de la *L. graveolens* y sus particiones hexánica, clorofórmica, acetato de etilo y acuosa, contra los hongos *S. schenckii* y *F. pedrosoi*.

B. Objetivos específicos

1. Obtener particiones con disolventes de diferente polaridad a partir de los extractos etanólicos de la flor *B. huanita* y la hoja de *L. graveolens*, para determinar su rendimiento.
2. Evaluar la actividad antifúngica *in vitro* de los extractos etanólicos y sus particiones hexánica, clorofórmica, acetato de etilo y acuosa de la flor *B. huanita* y hoja de *L. graveolens* contra los hongos *S. schenckii* y *F. pedrosoi*.
3. Determinar la concentración inhibitoria mínima de los extractos y las particiones, de las plantas que tengan actividad antifúngica.
4. Caracterizar los metabolitos secundarios presentes en las particiones responsables de la actividad biocida de *B. huanita* y *L. graveolens*, a través del tamizaje fitoquímico.

V. HIPÓTESIS

Por lo menos una de las particiones de los extractos etanólicos de la flor *Bourreria huanita* o la hoja de *Lippia graveolens* posee actividad antifúngica.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Universo de trabajo

1. Universo

Extractos etanólicos de hoja de *L. graveolens* y flor de *B. huanita*.

2. Muestra

Particiones obtenidas con hexano, cloroformo, acetato de etilo y agua a partir de los extractos etanólicos de la hoja de *L. graveolens* y la flor *B. huanita*.

B. Recursos

1. Humanos

Investigadora Bachiller Gaudi Haydee Ortiz Beteta, con la asesoría del Licenciado Armando Cáceres y coasesora Licenciada Sully Margot Cruz.

2. Físicos

a. Equipo

Asa de nicromo

Asperjador

Autoclave

Balanza semianalítica y balanza analítica

Bomba de vacío

Cajas de Petri descartables simples

Cámara de Neubauer

Cámaras de revelado

Campana de extracción de gases

Campana de flujo laminar

Campana bacteriológica

Cromatofolios de Silicagel 60F

Desecadora

Estereoscopio

Estufa eléctrica

Fuente de luz artificial

Incubadora a 25°C y 37°C

Lámpara de luz UV/VIS

Liofilizador

Mechero Bunsen

Microscopio

Pecera pequeña con doble división sin llegar al fondo (área cerrada y área abierta)

Pipetas automáticas

Puntas amarillas y azules (Tips)

Refrigeradora

Rotavapor

Vórtex (agitador)

b. Reactivos

Ácido clorhídrico y sulfúrico

Agar-agar

Agar Saboraud

Agar infusión cerebro corazón (BHI)

Agua destilada

Anfotericina B

Acetato de etilo

Cloroformo

Dextrosa

Etanol

Etanol 70%

Fenol 5%

Fosfato diácido de potasio (KH₂PO₄)

Hexano

Hidróxido de amonio

Metanol

Peptona

Reactivos de Dragendorff, Mayer, Wagner

Sangre de carnero

Solución salina estéril

Sulfato de sodio (Na_2SO_4)

Tolueno-acetato de hidróxido

c. Cristalería

Ampollas de decantación

Vaso de precipitar de 250 mL y 500 mL

Campanillas de Durham de 5 mm de diámetro

Erlenmeyer 500 mL

Erlenmeyer con tapón de rosca 250mL

Frascos de vidrio con tapón de rosca

Pipetas

Probetas 100 mL

Tubos de ensayo con tapón de rosca 15 mL

Varilla de vidrio

Viales de 3 mL

d. Otros

Algodón

Cuaderno

Fósforos

Hojas de papel bond

Marcador

Masking tape

Lapicero

C. PROCEDIMIENTO

1. Selección de las plantas

Las plantas fueron seleccionadas con base en estudios de validación previos.

2. Revisión bibliográfica

3. Obtención del extracto etanólico por percolación con alcohol 95%

Los extractos fueron proporcionados por el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT).

4. Concentración en rotavapor

- a. Se encendió el baño María y se llevo a una temperatura de $40 \pm 1^\circ\text{C}$.
- b. Se engrasó todas las bocas esmeriladas y se armó el rotavapor según el instructivo específico.
- c. Se succionó la solución obtenida del percolador (extracto de planta).
- d. Se conectó la bomba de vacío y el rotavapor y se inició la destilación del extracto con recuperación del disolvente hasta llevar a consistencia semisólida.
- e. Se vertió el extracto concentrado en una caja de Petri de vidrio debidamente tarada y rotulada.
- f. Se colocó en una desecadora durante 7-15 días.
- g. Cuando el extracto tuvo una consistencia sólida, se pasó a viales debidamente tarados y rotulados.
- h. Se calculó el rendimiento del extracto y se guardó en viales a 4°C .

5. Obtención del extracto hexánico, clorofórmico, acetato de etilo, acuoso a partir de partición líquido-líquido

- a. Se disolvió 15 g del extracto etanólico de *B. huanita* y *L. graveolens* en etanol al 70% se realizó una partición líquido-líquido con disolventes de diferente polaridad (hexano, cloroformo, acetato de etilo, agua).
- b. Se eliminó los disolventes por destilación a presión reducida con el fin de concentrar el extracto (ver concentración en rotavapor). El extracto acuoso fue sometido a liofilización.

6. Evaluación de la actividad antifúngica contra hongos filamentosos

Se utilizó como método de referencia la actividad antifúngica de Brancato & Golding modificado por MacRae *et al* descrito para dermatofitos, utilizando como control positivo la anfotericina B, en una concentración de 1mg/mL en donde mostró una actividad antifúngica positiva *in vitro* (60,78).

S. schenckii se utilizó en su fase miceliar y levaduriforme y *F. pedrosoi* solo en su fase miceliar.

a. Preparación del medio de cultivo (agar-planta)

- i. Se prepararon tubos con 13.5 mL de agar Sabouraud.
- ii. Se esterilizaron, dejando enfriar a 50°C para luego agregar 1.5 mL del extracto de la planta a ensayar (concentración de 10 mg/mL). Luego se agitaron. Para obtener una concentración final de 500 mg/mL.
- iii. Luego se vertió en cajas de Petri estériles, dejando solidificar e incubar a 36°C durante 24 horas para comprobar esterilidad.
- iv. Se guardaron en refrigeración hasta el momento de su uso.

b. Preparación del inóculo

- i. Se preparo medio de Takashio (Sabouraud modificado para obtención de esporas) con los siguientes ingredientes: dextrosa 0.6g, Na₂SO₄ 0.3g, KH₂PO₄ 0.3g, peptona 0.3g y 6.0g de agar-agar.
- ii. Se disolvió en 300 mL de agua, se sirvió 10 mL en tubos con tapón rosca, y luego se esterilizó en autoclave y dejando solidificar con el mayor declive posible. Se incubó a 25 °C por 48 horas para descartar contaminación.
- iii. Se sembró en este medio los hongos a ensayar y se incubaron a 27°C durante 21 días hasta obtener un crecimiento homogéneo (aproximadamente 15 días).
- iv. Se agregó a cada tubo 2 mL de agua destilada estéril y se desprendió el hongo con ayuda de un agitador de vidrio.
- v. Se trasvasó el material obtenido a viales con tapón de rosca. Se agitó durante un minuto en vórtex para luego hacer un conteo de esporas en cámara de Neubauer.

vi. La suspensión de esporas preparada fue de 100 esporas/ $\mu\text{L} = 1 \times 10^5$ esp. / mL (aproximadamente 10 esporas por cuadrante).

c. Inoculación del hongo

i. Se abrieron cuatro agujeros en las cajas con Agar planta en forma equidistante utilizando campanillas de Durham de 5 mm de diámetro.

ii. De la suspensión de esporas se tomaron 30 μL y depositaron en los agujeros. Las cajas se incubaron a 27°C por 14 días.

iii. Como control negativo se utilizó una caja con agar Sabouraud y etanol al 50%, donde el hongo creció en un 100%.

d. Interpretación de resultados

i. Los diámetros de las colonias de los hongos fueron medidos en milímetros.

ii. Se calculó el porcentaje de inhibición, comparando el diámetro contra el de las colonias en las cajas de control y la actividad se determinó de la siguiente manera.

iii. Actividad positiva: extractos en los cuales el diámetro de la colonia fue 75% menor al control negativo.

iv. Actividad negativa: extractos en los cuales la colonia creció más del 25% respecto al control negativo.

7. Evaluación de la actividad antifúngica contra hongos levaduriformes

a. Preparación del medio de cultivo (agar-planta)

i. Se preparó agar BHI con 10% de sangre. En cada caja se sirvieron 19 mL de agar y 1 mL del extracto (1 mg/mL). Agitar. La concentración final que se tiene es de 0.5 mg/mL.

ii. Se vertieron en cajas de Petri estériles, se dejó solidificar y se incubó a 37°C durante 24 horas para comprobar esterilidad.

i. Se guardó en refrigeración hasta el momento de usar.

b. Preparación del inóculo para la fase levaduriforme

i. Se prepararon cajas con 20 mL agar BHI con sangre al 10% y se incubaron a 37°C durante 24 horas para comprobar esterilidad.

ii. Para estimar la conversión del hongo de su fase miceliar a la levaduriforme, se sembró en agar BHI con sangre durante 5 días a 37°C, en ambiente de CO₂ y humedad hasta obtener un crecimiento uniforme.

iii. Se prepararon tubos con 5 mL de solución salina estéril y se inoculó la levadura obteniéndose una turbidez de 1 del estándar de MacFarland.

c. Inoculación de levaduras en placa

i. En las cajas con agar-planta se inoculó con el asa de nicromo en argolla la suspensión de levaduras, haciendo ocho estrías en el medio.

ii. Se incubó a 36°C durante 7 días

iii. Para el control negativo se sembró por estrías la levadura en una caja de agar BHI sin extracto y como control positivo una caja con anfotericina B.

d. Interpretación de resultados

i. Se observó el crecimiento de la levadura en el medio y determinó como:

ii. Actividad antilevadura positiva: Ausencia de crecimiento de la levadura en el agar planta.

iii. Actividad antilevadura negativa: Presencia de crecimiento de la levadura en el agar planta (59).

8. Tamizaje fitoquímico de los extracto con actividad biocida a través de ensayos macro y semimicro

La caracterización fitoquímica de los metabolitos secundarios presentes en las fracciones *B. huanita* y *L. graveolens* se realizó por medio de CCF y ensayos macro y semimicro.

En la CCF las fracciones fueron cromatografiadas con las fases móviles adecuadas y caracterizadas por medio de valores R_f y coloraciones obtenidas luego de asperjar con reveladores específicos, mientras que los ensayos macro y semimicro se utilizaron para la caracterización de los metabolitos secundarios presentes en las fracciones de la muestra por medio de la formación de precipitados y complejos coloreados.

a. Investigación de alcaloides

i. Ensayos macro y semimicro: Se pesaron 1g de material vegetal. Se le agregó 2 gotas de solución de hidróxido de amonio al 10% (p/v), luego se añadió 25 mL de metanol al 60°C. Se filtro con papel Whatman No. 1 y se acidifico el filtrado con ácido clorhídrico 2 N. La solución resultante se dividió en cuatro tubos y se evaluó de la siguiente manera:

- Tubo 1: Se agregó 5 gotas del reactivo de Mayer.
- Tubo 2: Se agregó 5 gotas del reactivo de Dragendorff.
- Tubo 3: Se agregó 5 gotas del reactivo de Wagner.
- Tubo 4: Testigo.

Se usó como estándar soluciones al 1% de atropina y papaverina. Se observó durante 2 horas la existencia de precipitados, turbidez o precipitación de complejos en los tubos.

ii. Cromatografía en capa fina: Se peso 1g de material vegetal seco y molido, se agregó 1 mL de hidróxido de amonio al 10% (p/v) y se extrajo con 5 mL de metanol. Se colocó en baño María a 60°C durante 5 minutos. Se filtro y concentro. Luego se aplicó en una placa de sílica gel 60F, utilizando como estándar una solución de atropina y papaverina al 1% en metanol (10 µL).

- Fase móvil: Acetato de etilo-metanol-agua (100:13.5:10), tolueno-acetato de etilo-dietilamina (70:20:10), n-butanol-ácido acético-agua (4:1:1).
- Detección: Reactivo de Dragendorff.
- Identificación: Zonas de color naranja (visible).

b. Investigación de flavonoides y antocianinas

i. Ensayos macro y semimicro: Se extrajo 3g del material vegetal pulverizado con 10 mL de etanol al 80%, se filtro y concentro. Se enfrió a temperatura ambiente y se trituro el residuo con 15 mL de éter de petróleo hasta que la extracción fue incolora. Se disolvió el residuo en 30 mL de etanol al 80%, se filtro y se dividió en 5 tubos:

- Tubo 1: Se agregó 0.5 mL de ácido sulfúrico concentrado.
- Tubo 2: Se agregó 4 gotas de cloruro férrico al 10% (p/v).
- Tubo 3: Se agregó 0.5 mL de ácido clorhídrico concentrado y se calentó en baño María por 5 minutos (Pruebas para leucoantocianinas).

- Tubo 4: Se agregó magnesio metálico y 0.5 mL de ácido clorhídrico concentrado.
- Tubo 5: Testigo.

Se evaluó las siguientes reacciones, cambios de color y/o formación de precipitado comparados con el testigo.

ii. Cromatografía en capa fina: Se extrajo 1g de material vegetal seco y pulverizado con 10 mL de metanol por 5 minutos en baño María a 60 °C. Se filtro la solución y se aplico en una placa de sílica gel 60F. Como estándar se empleo solución de flavonoides al 0.05% en metanol (10 µL).

- Fase móvil: Acetato de etilo ácido fórmico ácido acético glacial agua (100:11:11:27), n-butanol - ácido acético agua (40:10:50).
- Detección: Reactivo de Productos Naturales (NP/PEG).
- ✓ Solución 1: Solución metanólica al 1% de difenilborilxietilamina (NP).
- ✓ Solución 2: Solución etanólica al 5% de polietilenglicol 4000 (PEG).
- Identificación: Fluorescencia intensa en UV a 365 nm.

c. Investigación de antraquinonas

i. Prueba de Börntrager: Se extrajo 3g de material vegetal pulverizado con 10 mL de etanol al 80%, se filtro y se concentro en baño María (60°C). Se disolvió el residuo con 30 mL de agua destilada y se filtró. Luego se extrajo con 10 mL de benceno. A la fase bencénica se le añadió 5 mL de solución de test de amonio y se agito. Se observo cambios de color en la fase alcalino (color rojo, rosado: positivo).

ii. Prueba de Börntrager modificado: Se calentó 0.3g de material vegetal pulverizado con 10 mL de hidróxido de potasio alcohólico 0.5 N y 1 mL de peróxido de hidrógeno al 3% y se calentó por 10 minutos en baño María a 60°C. Se añadió 10 gotas de ácido acético glacial para acidificar. Luego se extrajo con 10 mL de benceno. A la capa bencénica se le adicono 5 mL de solución de prueba de amonio y se agito. Se observo cambios de color en fase alcalina (color rojo, rosado: positivo).

iii. Cromatografía en capa fina: Se extrajo 0.5g de material vegeta seco pulverizado con 5 mL de metanol en baño María a 60°C durante 5 minutos. Se filtro y aplico 10µL en la cromatoplaça de sílica gel 60 F.

- Estándar: Solución al 0.1% en metanol de Antraquinonas (10µL).

- Fase móvil: Acetato de etilo-metanol-agua (100:17:13).
- Detección: Solución etanólica de hidróxido de potasio al 10%.
- Identificación:
 - ✓ Antraquinonas: Zonas rojas en visible y fluorescencia roja en UV a 365 nm.
 - ✓ Antronas y antralonas: Zonas amarillas en visible y fluorescencia amarilla en UV a 365 nm.

d. Investigación de cumarinas

i. Ensayos macro y semimicro: Se midió 5mL de extracto vegetal metanólico. Se agregó 1 mL de agua destilada hirviendo. Con un capilar se aplico 2 manchas en papel filtro. A una mancha se le agregó 1 gota de hidróxido de potasio 0.5 N. Luego se observo bajo luz UV a 365 nm (fluorescencia azul o verde: positivo).

ii. Cromatografía en capa fina: A 1g de material vegetal se le adicionó 10 mL de metanol y se calentó 30 minutos en baño María. Se filtro y evaporo hasta obtener 1 mL. Se aplico 20 µL en una cromatoplaça de sílica gel 60 F. Se utilizo como estándar canela en metanol al 1%.

- Fase móvil: Tolueno-acetato de etilo (93:7).
- Detección: Solución etanólica de hidróxido de potasio al 5 ó 10%.
- Identificación: Fluorescencia azul o verde a 365 nm UV.

e. Investigación de saponinas

i. Prueba de espuma:

- Tubo 1: 100 mg de material vegetal pulverizado y seco.
- Tubo 2: 2 mL de control de saponinas (0.5%).
- Tubo 3: 2 mL de agua.

A cada tubo se adiciono 10 mL de agua destilada. Se calentó en baño María a 60°C durante 30 minutos. Se dejo enfriar, se taparon los tubos, se agitaron vigorosamente 35 segundos. Se dejo reposar los tubos durante 30 minutos. Se observo la formación de capa de espuma. Si una capa de espuma mayor de 3 cm persistente en la superficie líquida después de 30 minutos se presume la presencia de saponinas.

ii. Cromatografía en capa fina: A 2 g de material vegetal seco, se extrajo 10 mL de etanol al 70% con reflujo por 10 minutos. Se evaporó a 5 mL y se aplicó 30 μ L en una cromatoplaca de sílica gel 60 F.

- Estándar de saponinas al 0.1% en metanol (10 μ L).
- Fase móvil: Cloroformo-metanol-agua (64:50:10), n-butanol-ácido acético-agua (50:10:40).
- Detección: Reactivo de sangre. Zonas hemolíticas en fondo rojo.
- (Reactivo de Liebermann-Burchard: UV 365 nm o VIS zonas azules y verdes de saponinas esteroidales, rojas y violetas de triterpenoides).
- Reactivo de Komarowsky: Zonas azules, amarillas y rojas.
- Vainillina ácido sulfúrico y anisaldehído ácido sulfúrico: Zonas azules, violetas, amarillentas.

f. Investigación de principios amargos

i. Cromatografía en capa fina: Se calentó 1g de material vegetal con 10 mL de metanol en baño María a 60°C por 10 minutos. Se dejó evaporar y se filtró a 2 mL. Se aplicó en la cromatoplaca.

- Estándar: Artemisina al 1% en metanol (20 μ L).
- Fase móvil: acetato de etilo-metanol-agua (77:15:8) y cloroformo- metanol (95:5).
- Detección: Vainillina ácido sulfúrico, anisaldehído ácido sulfúrico. Zonas rojas-violetas, cafes-rojas, azules-verdes (visible).
- Reactivo de Liebermann-Buchard: UV 365 nm: Gris, café; VIS: Café oscuro, gris.

g. Investigación de taninos

i. Ensayos macro y semimicro: Se extrajo 10g de material vegetal pulverizado con 30 mL de etanol al 80%, se filtró y dejó evaporar a sequedad. Se añadió 25 mL de agua caliente al residuo y se agitó con varilla y se dejó enfriar. Se agregó 1 mL de solución de cloruro de sodio al 10% y se filtró. Se adicionó 3 mL del filtrado a 4 tubos de ensayo:

- Tubo 1: Testigo.
- Tubo 2: Se agregó 4 gotas de solución de gelatina al 1% (p/v). Se observó la formación de precipitado o flocos evidentes.

- Tubo 3: Se agregó 4 gotas de gelatina-sal (1% de gelatina y cloruro de sodio al 10%). Se observó la formación de precipitado o flocos evidentes.
- Tubo 4: Se agregó 4 gotas de solución de cloruro férrico al 10% (p/v). Se observó coloración negro-azulado tipo pirogalol, coloración grisácea-negro tipo catecol.

h. Investigación de aceites volátiles

i. Cromatografía en capa fina:

- Método A: Se extrajo 1g de material vegetal pulverizado con 10 mL de diclorometano se agito por 15 minutos. Se filtro y se dejo evaporar en baño María (60°C) a sequedad. Se disolvió en 1 mL de tolueno y se aplico 35 μ L en la cromatoplaca de silicagel 60 F.
- Método B: Se peso 18 g de material vegetal y se destilo con arrastre de vapor por 1 hora. Se recolecto el aceite esencial en xileno. Se disolvió la solución de aceite en xileno con tolueno 1:5 y se aplico 5 μ L (1:10) en la cromatoplaca de sílica gel 60 F.
- Estándar: Solución de tolueno 1:30 de metanol, timol, anisaldehído, acetol, 1,8-cineol (3 μ L).
- Fase móvil: Tolueno-acetato de etilo (93:7).
- Detección: Anisaldehído-ácido sulfúrico, vainillina- ácido sulfúrico.

Identificación: Zonas azules verdes, rojas y cafés en visible

9. Diseño estadístico

1. Tipo de estudio

Experimental. Diseño no probabilístico, a conveniencia, en el cual se determinará la actividad biocida (antifúngica) del extracto etanólico de la flor de *B. huanita* y hoja de *L. graveolens* y sus particiones obtenidas por polaridad creciente (hexánica, clorofórmica, acetato de etilo y acuosa).

Para la realización de la actividad antifúngica se utilizará, estadística no paramétrica con criterio de positividad visual (si presentó crecimiento homogéneo hay actividad negativa, ausencia de crecimiento hay actividad positiva) realizando cuatro réplicas por extracto y posteriormente se determinará la concentración mínima inhibitoria (CIM).

La determinación de alcaloides, flavonoides, antocianinas, antraquinonas, cumarinas, saponinas, principios amargos, taninos y aceites volátiles se realizará por medición de R_f, ensayos macro y semimicro de reacciones de coloración y precipitación.

2. Variables de interés

Variable independiente: plantas nativas guatemaltecas

Variable dependiente: actividad antifúngica o antilevadura de los extractos etanólicos y sus particiones.

VIII. RESULTADOS

A. Obtención de particiones

Se prepararon cinco particiones a partir de los extractos crudos de la flor de *B. huanita* y la hoja de *L. graveolens* utilizadas popularmente en medicina natural (hexánicas, clorofórmicas, acetato de etilo, acuosas), obteniéndose el porcentaje de rendimiento de cada uno, a partir de los gramos del extracto etanólico y los gramos de cada una de las particiones obtenidas como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Rendimiento del proceso de partición del extracto crudo de las plantas

Planta	Partición	Peso (g)	Rendimiento (%)
<i>Lippia graveolens</i>	Etanólica	76.60	38.30
	Hexánica	1.38	6.90
	Clorofórmica	13.51	67.55
	Acetato de etilo	0.86	4.30
	Acuosa	0.45	2.25
<i>Bourreria huanita</i>	Etanólica	137.90	25.30
	Hexánica	1.80	9.00
	Clorofórmica	3.00	15.00
	Acetato de etilo	1.20	6.00
	Acuosa	1.07	5.35

B. Actividad antifúngica

En el tamizaje antifúngico preliminar se determinó la actividad de los extractos etanólicos obtenidos y sus respectivas particiones: hexánica, clorofórmica, acetato de etilo y acuosa, contra la fase miceliar de *S. schenckii* y *F. pedrosoi*, en donde se observó que el extracto etanólico y sus particiones hexánica y clorofórmica de la hoja *L. graveolens* demostraron actividad a una concentración de 1 mg/mL. Mientras que las otras particiones de *L. graveolens* (acetato de etilo y acuosa) junto con las particiones de *B. huanita* no presentaron ninguna actividad (Tablas 2 y 3).

Tabla 2. Tamizaje preliminar de la actividad antifúngica contra la fase miceliar y levaduriforme de *Sporothrix schenckii* y la fase miceliar de *Fonsecaea pedrosoi*

Planta	Extracto /Partición	<i>F. pedrosoi</i> miceliar	<i>S. schenckii</i> miceliar	<i>S. schenckii</i> levaduriforme
<i>Lippia graveolens</i>	Etanólica	+	+	-
	Hexánica	+	+	+
	Clorofórmica	+	-	-
	Acetato de etilo	-	-	-
<i>Bourreria huanita</i>	Acuosa	-	-	-
	Etanólica	-	-	-
	Hexánica	-	-	-
	Clorofórmica	-	-	-
	Acetato de etilo	-	-	-
	Acuosa	-	-	-

(+) Actividad positiva a una concentración de 1 mg/mL

(-) Actividad negativa a una concentración de 1 mg/mL

C. Concentración inhibitoria mínima (CIM):

Al extracto y las particiones de *L. graveolens* que presentaron actividad contra la fase miceliar y levaduriforme de *S. schenckii* y contra la fase miceliar de *F. pedrosoi*, se les determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM), obteniéndose un CIM de 1.0 mg/mL para las particiones hexánica y clorofórmica y de 0.25 mg/mL para el extracto etanólico, contra la fase miceliar de *S. schenckii* y para la fase levaduriforme de 0.5 mg/mL para partición hexánica. Con *F. pedrosoi*, el extracto etanólico y su partición clorofórmica presentaron una CIM de 0.5 mg/mL y 1mg/mL para la partición hexánica como se detalla en la Tabla 3.

Tabla 3. CIM del extracto crudo y las particiones de *Lippia graveolens* con actividad a una concentración 1 mg/mL contra la fase miceliar y levaduriforme de *Sporothrix schenckii* y contra la fase miceliar de *Fonsecaea pedrosoi*

Extracto/Partición	<i>S. schenckii</i> levaduriforme	<i>S. schenckii</i> miceliar	<i>F. pedrosoi</i> miceliar
Etanólica		0.25	0.5
Hexánica	0.5	1.0	1.0
Clorofórmica		1.0	0.5

D. Tamizaje fitoquímico

Haciendo uso de ensayos macro, semimicro y cromatografía en capa fina, se encontraron metabolitos secundarios presentes en los extractos etanólicos y sus particiones hexánica y clorofórmica de *L. graveolens*. En las tablas 4 a la 11 se exponen los metabolitos hallados, así como las fases móviles y métodos de detección empleados.

La tabla 4 muestra los resultados de la determinación de alcaloides, donde se pudieron observar una banda para la partición hexánica con un Rf de 0.94, para la partición clorofórmica y el extracto etanólico se observaron dos bandas con Rf de 0.22, 0.90 y de 0.22, 0.88 respectivamente.

Tabla 4. Tamizaje fitoquímico de Alcaloides

Extracto / Partición	Mayer	Dragendorff	Wagner	CCF*
Hexánica	Positivo	Positivo	Positivo	Verde, Rf: 0.94
Clorofórmica	Positivo	Positivo	Positivo	Verde, Rf: 0.90, 0.22
Etanólico	Positivo	Positivo	Positivo	Verde, Rf: 0.88, 0.22

Revelador: Dragendorff. Fase móvil: Tolueno - acetato de etilo - dietilamina (14:4:2).

Estándares: Ajmalina, papaverina, atropina, brucina y reserpina; color naranja en visible.

*Cromatografía de capa fina.

La tabla 5 detalla los resultados obtenidos de la determinación de flavonoides se puede observar que para la partición hexánica solo se mostró una banda con un Rf de 0.90 para la partición clorofórmica hay dos bandas con Rf de 0.80 y 0.91 respectivamente y para el extracto etanólico se obtuvo la separación de cuatro bandas con Rf de 0.19, 0.58, 0.78 y 0.91.

Tabla 5. Tamizaje fitoquímico de Flavonoides

Extracto/ Partición	CCF*
Hexánica	Amarillo verde, Rf: 0.90.
Clorofórmica	Naranja Rf: 0.91 y 0.80
Etánolico	Naranja, verde, Rf: 0.19, 0.58, 0.78 y 0.91

Revelador: NP/PEG. Fase móvil: Acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial- agua (20:2.2:2.2:5.4). Estándares: Ácido clorogénico, color amarillo – verde; Quercetina: color naranja; todos bajo luz UV a 365 nm.

*Cromatografía de capa fina.

En la determinación de antraquinonas se determinó una banda para la partición hexánica y dos bandas para la partición clorofórmica y el extracto etanólico con Rf de 0.92, 0.91, 0.88, 0.92 y 0.88 respectivamente, como se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Tamizaje fitoquímico de antraquinonas

Extracto /Partición	Prueba de Börntrager	CCF*
Hexánica	Negativo	Café verde Rf: 0.92
Clorofórmica	Negativo	Café verde Rf: 0.91 y 0.88
Etanólica	Negativo	Café verde Rf: 0.92 y 0.88

Revelador: Vainillina / ácido sulfúrico Fase móvil: Acetato de etilo – metanol - agua (25:4.3:3.3).

Estándares: Sen, color rojo-verde (Rf: 0.41); bajo luz UV a 365 nm.

*Cromatografía de capa fina.

En la determinación de cumarinas se obtuvo una banda para las particiones hexánica y clorofórmica con Rf de 0.90 para cada uno y dos bandas para el extracto etanólico, con Rf de 0.90 y 0.81, como se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Tamizaje fitoquímico de Cumarinas

Extracto /Partición	Ensayo macro
Hexánica	Café-verde Rf: 0.90 negativo.
Clorofórmica	Incoloro, verde Rf: 0.90 negativo.
Etanólico	Amarillo-verde Rf0.90, incoloro negativo

Revelador: Hidróxido de potasio 0.5 N. Estándares: Cumarinas, color azul-verde bajo luz UV a 365 nm.

En la determinación de saponinas, se obtuvo una banda en la partición hexánica con un Rf de 0.92 y para la partición clorofórmica y extracto etanólico, tres bandas para cada una, con Rf de 0.69, 0.85 y 0.92 para el primero y 0.66, 0.86 y 0.92 para la segunda partición, como se muestra en la tabla 8.

Tabla 8. Tamizaje fitoquímico de Saponinas

Extracto/ Partición	Test de espuma	CCF*
Hexánica	Negativo	Incoloro Rf 0.92
Clorofórmica	Negativo	Café verde Rf 0.69 0.85 y 0.92
Etanólico	Negativo	Violeta, café Incoloro Rf 0.66, 0.86 y 0.92

Revelador: Vainillina- ácido sulfúrico Fase móvil: n-butanol, ácido acético, agua (25:5:20) Estándares: Solución de saponinas, color amarillo (Rf: 0.84); Colesterol: violeta (Rf: 0.85) Ginsenosido

*Cromatografía de capa fina.

En la tabla 9 se puede observar la determinación de principios amargos, con la aparición de dos bandas para las particiones hexánica y clorofórmica con Rf de 0.09, 0.91 y 0.79, 0.90 para cada uno y para el extracto etanólico tres bandas con Rf de 0.71, 0.79 y 0.90.

Tabla 9. Tamizaje fitoquímico de Principios amargos

Extracto/ Partición	CCF*
Hexánica	Café incoloro: Rf: 0.09 y 0.91
Clorofórmica	Café verde, incoloro: Rf: 0.79 y 0.90
Etanólico	Café verde, verde y incoloro: Rf: 0.71, 0.79 y 0.90

Revelador: Vainillina / ácido sulfúrico al 5 %. . Fase móvil: Acetato de etilo – metanol - agua (15.4:3:1.6). Estándares: Naringina, color naranja (Rf: 0.92).

*Cromatografía de capa fina.

En la tabla 10 se observa que la partición hexánica y el extracto etanólico tienen presencia de precipitados positivo para taninos. En la determinación de aceites volátiles se observaron cuatro bandas para la partición hexánica con Rf de 0.18, 0.32, 0.56 y 0.92, para partición clorofórmica dos bandas con Rf de 0.18 y 0.25 y cinco bandas para el extracto etanólico con Rf de 0.16, 0.25, 0.32, 0.49 y 0.92, como se detalla en la tabla 11.

Tabla 10. Tamizaje fitoquímico de Taninos

Extracto/ Partición	Gelatina al 1 % p/v	Gelatina-sal	Cloruro férrico al 1 %
Hexánica	Positivo	Positivo	Positivo
Clorofórmica	Negativo	Negativo	Negativo
Etanólico	Positivo	Positivo	Positivo

Gelatina al 1 %: precipitado blanco, positivo. Gelatina sal: formación de precipitado, positivo. Cloruro férrico al 1 %: color azul a negro, positivo.

Tabla 11. Tamizaje fitoquímico de Aceites volátiles

Extracto/ Partición	CCF*
Hexánica	Naranja rojo Rf: 0.18, 0.32, 0.56 y 0.92
Clorofórmica	Café azul Rf 0.18 y 0.25
Etanólica	Verde, café naranja Rf: 0.16, 0.25, 0.32, 0.49 y 0.92

Revelador: Vainillina / ácido sulfúrico Fase móvil: Tolueno-acetato de etilo (93:7). Estándares: Eugenol, color naranja; linalool, color azul; timol, rojo; carvacrol, color azul-violeta.

*Cromatografía de capa fina.

En la tabla 12 se puede observar que la flor *B. huanita* presenta los metabolitos secundarios siguientes: alcaloides, flavonoides, taninos y aceites volátiles en el extracto etanólico y sus particiones hexánica y clorofórmica, los cuales se determinaron por la observación y comparación se sus bandas y valores de Rf.

Tabla 12. Tamizaje fitoquímico de la flor *B. huanita*

Extracto/ Partición	Metabolito secundario	Rf / precipitación
Hexánica	Alcaloides, aceites volátiles	0.88, 0.22, 0.95 presencia de precipitados
Clorofórmica	Alcaloides, taninos, flavonoides	0.85, 0.90, 0.78 precipitados
Etanólico	Alcaloides, flavonoides, taninos	0.91, 0.85, 0.96 precipitados

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente estudio se realizó la partición de los extractos etanólicos de la hoja de *L. graveolens* y la flor de *B. huanita*, obteniéndose sus particiones por orden creciente de polaridad utilizando la metodología de partición líquido-líquido. Se utilizaron las particiones hexánica, clorofórmica, acetato de etilo y acuosa. El rendimiento fue mayor para las particiones clorofórmica (67.55 y 15% respectivamente), mientras que las particiones obtenidas con acetato de etilo fueron las de menor rendimiento (4.3 y 6 %).

Es importante considerar el porcentaje de rendimiento de un extracto o fracción ya que cuando se evalúan las diversas actividades biocidas, un buen rendimiento garantiza una mayor cantidad de metabolitos responsables de la actividad (62). El rendimiento permite además determinar la dosis que se administrará con fines terapéuticos o el desarrollo una droga nueva (65).

El ensayo antifúngico se realizó utilizando la metodología descrita por Brancato & Golding modificado por MacRae *et al.* (61) para hongos filamentosos. Se determinó la actividad contra los hongos *S. schenckii* tanto en su fase micelial (saprobia) como en su fase levaduriforme (parasítica) y *F. pedrosoi* solamente en su fase micelial. Dicha actividad se realizó para las cinco particiones obtenidas de cada extracto crudo.

Los resultados del tamizaje de la actividad antifúngica de los extractos y sus particiones, evidenciaron que la fase micelial de los hongos fue susceptible al extracto etanólico y a dos particiones de la hoja de *L. graveolens* (hexánica, clorofórmica) y la fase levaduriforme solo la partición hexánica de *L. graveolens*.

A las particiones que evidenciaron actividad antifúngica en la fase de tamizaje se les determinó la CIM, utilizando diluciones seriadas de las muestras y evaluándolas contra los hongos a los que presentaron actividad. Para *F. pedrosoi* se obtuvo una CIM de 0.5 mg/mL con el extracto etanólico y su partición clorofórmica y 0.25 mg/mL en la partición hexánica. La fase micelial de *S. schenckii* fue susceptible a las particiones de hexanica y cloroformica a una CIM de 1 mg/mL y para el extracto etanólico a 0.5 mg/mL. El ensayo de la actividad contra la fase levaduriforme de *S. schenckii* presentó actividad únicamente con la partición de hexanica a una CIM de 0.5 mg/mL.

La concentración a la cual actúa un antifúngico a determinada CIM se debe a la cantidad de compuestos activos presentes en el extracto. Por lo que se puede deducir que la partición hexánica de *L. graveolens* actúa por diferentes mecanismos de acción frente a la célula fúngica, ya que morfológicamente y estructuralmente la composición de la membrana de la levadura y el micelio del hongo son distintos y por tanto se van a ver afectados de diferente forma por los antifúngicos. Es posible que los compuestos activos presentes en los extractos de las plantas inhiban la biosíntesis de ergosterol o de otros esteroides, lesionando la pared celular fúngica y alterando su permeabilidad; como consecuencia se produce la pérdida de elementos intracelulares. Otro posible mecanismo antifúngico es la inhibición de la biosíntesis de triglicéridos y fosfolípidos o la inhibición de la actividad enzimática oxidativa y peroxidativa, lo que conlleva a la acumulación de concentraciones tóxicas de peróxido de hidrógeno, que contribuyen al deterioro de los órganos subcelulares y necrosis celular (22).

Los resultados anteriores reafirman el hecho que *L. graveolens* sea utilizada popularmente para afecciones dérmicas (cicatrización de heridas, afecciones en la piel y llagas) (15, 16).

Para esta especie se han identificado componentes químicos como el carvacrol, timol y eucaliptol, los cuales podrían ser los responsables de la actividad antifúngica contra *F. pedrosoi* y *S. schenckii*, ya que estos han demostrado tener actividad fungicida contra otro tipo de hongos levaduriformes como *Candida albicans* (15).

La caracterización fitoquímica se realizó a través de ensayos macro y semimicro, cromatografía en capa fina (CCF) utilizándose estándares conocidos para comparar los posibles metabolitos presentes en las particiones, a las cuales se les atribuye su actividad farmacológica.

En el tamizaje fitoquímico se determinó que las particiones de la hoja de *L. graveolens* que demostraron actividad positiva presentaron metabolitos secundarios tales como: aceites volátiles, taninos, alcaloides y flavonoides. Estos metabolitos secundarios caracterizados por medio de CCF pueden ser los responsables de la actividad biológica de las particiones y las propiedades farmacológicas atribuidas, como en el caso de los flavonoides que a menudo son antiinflamatorios, antiespasmódicos, citostáticos y antibacterianos (62, 64, 66).

Se realizó la prueba de aceites volátiles para confirmar la presencia de los mismos en las particiones y se pudo observar la presencia de eugenol y linalool en las tres particiones.

Al realizar la prueba de taninos en las tres particiones, se observó la formación de precipitado y cambio de coloración, al agregar cloruro férrico las soluciones se tornaron de color negro-azulado por lo que se puede decir hay presencia de taninos tipo pirogalol.

Se realizó la prueba de alcaloides para confirmar la presencia de éstos se observó un resultado positivo, porque se formaron precipitados en las muestras.

Se realizó la prueba de flavonoides en donde se determinó la presencia de ácido clorogénico y quercetina, observando bandas del mismo color y con el mismo Rf tanto para los estándares aplicados como para las particiones.

En el tamizaje fitoquímico se determinó que las particiones de la flor de *B. huanita* que aunque no hayan presentado actividad se les determinó la presencia de los metabolitos secundarios tales como: aceites volátiles, taninos, alcaloides y flavonoides. Estos metabolitos secundarios caracterizados por medio de CCF.

X. CONCLUSIONES

1. De los 2 extractos y 8 particiones evaluadas en el estudio, únicamente el extracto etanólico y las particiones hexánica y clorofórmica de la hoja de *L. graveolens*, poseen actividad antifúngica contra la fase miceliar *S. schenckii* y *F. pedrosoi*.
2. El extracto etanólico de la hoja de *L. graveolens* presentó la mejor actividad antifúngica contra *S. schenckii* en su fase miceliar (0.25 mg/mL).
3. La partición hexánica de la hoja de *L. graveolens* fue la única que presentó actividad antilevadura a una concentración inhibitoria mínima de 0.5 mg/mL, contra *S. schenckii*.
4. Los metabolitos secundarios identificados en el extracto etanólico y en sus particiones hexánica y clorofórmica de la hoja de *L. graveolens* fueron: Aceites volátiles, taninos, flavonoides, alcaloides y saponinas.
5. Los metabolitos secundarios identificados en el extracto etanólico y en sus particiones hexánica y clorofórmica de la flor de *B. huanita* fueron: alcaloides, flavonoides, taninos y aceites volátiles.

XI. RECOMENDACIONES

1. Evaluar la actividad antifúngica contra *F. pedrosoi* y *S. schenckii* con otras plantas utilizadas popularmente para las afecciones subcutáneas, para proporcionar nuevas alternativas de tratamiento para la cromoblastomicosis y esporotricosis.
2. Realizar estudios en donde se utilice la fase parasítica del hongo *F. pedrosoi* para conocer si los extractos o particiones que ya han presentado actividad actúan de igual manera en la fase miceliar que en la fase saprobia.
3. Evaluar la actividad farmacológica de las particiones de *L. graveolens* con el objetivo de validar las propiedades medicinales (cicatrización de heridas, antipirética, analgésica, antiinflamatoria, afecciones respiratorias) que se le atribuyen popularmente.
4. Determinar la actividad de otros órganos de *B. huanita* contra otros microorganismos, con el propósito de contar con mayor información y poder validar sus propiedades medicinales popularmente atribuidos.

IX. REFERENCIAS

1. Pomilio AB, Mongelli E. Etapas de Screening. *Ciencia Hoy*. 2002. 12:68.
2. Gaitán I, *et al.* Establecimiento de un método para evaluar actividad vegetal contra hongos subcutáneos (*Sporothrix schenckii* y *Fonsecaea pedrosoi*). Disponible en www.bvs.sld.cu/revistas/pla/vol10_esp_05/pla03405.htm54. Fecha de consulta Diciembre 2005.
3. Logemann H. Manual Práctico de Micología Médica. Guatemala: Bayer, 1995. 227p.
4. Rippon JW. Micología Médica: Hongos y Actinomicetos patógenos. 3 Ed. México: Interamericana, McGraw Hill. S.A. de C.V. 1990. 854p.
5. Anaissi EJ, McGinnis MR, Pfaller MA. *Clinical Mycology*. USA: Churchill Livingstone. 2003. 608p.
6. Larone DH. *Medically important Fungi a guide to identification*. 4 Ed. USA. 2002. 194p.
7. Jawetz E, Melnick J, Adelberg E. *Review of Medical Microbiology*. USA: Lange medical Publications, 1982. 553p.
8. Sandberg F. The Integrated Natural Products Research in the Development of Plant-derived Pharmaceuticals. *Fitoterapia*. 1987. 57: 313p.
9. Mizzau D. El arte de curar con plantas en el hombre. Disponible en www.fundacer.com.arg. Fecha de consulta noviembre de 2005.
10. Plantas medicinales en farmacia. Disponible en www.cof.es. Fecha de consulta noviembre de 2005.
11. Arteche A. Historia de la medicina naturista española. Disponible en www.fitoterapia.net. Fecha de consulta noviembre de 2005.
12. Hernández M, Nieto A. Fichas técnicas. Plantas medicinales. Universidad Navarra. 1992.
13. Flores R. Atlas de las plantas medicinales y curativas. España: Cultural, S.A. 1997. 110p.
14. Villatoro E. Etnomedicina en Guatemala. Centro de Estudios Folklóricos. Colección Monografías Vol. 1. Universidad de San Carlos de Guatemala 316. 1984. 456p.

15. Cáceres A. Plantas de uso medicinal en Guatemala. Guatemala: Editorial Universitaria, 1996. 402p.
16. Cáceres A, *et al.* Actividad antifúngica de plantas de uso medicinal en Guatemala. Guatemala: Editorial Universitaria (Cuaderno de investigación 7-92, Dirección General de Investigación DIGI, USAC) 1993. 89p.
17. Cáceres A, Girón L. Sistema para la Revalidación, Investigación y Comercializaciones de las plantas medicinales en Guatemala. En Etnomedicina en Guatemala. Compiladora Elba Villatoro. Centro de Estudios Folklóricos. Colección Monografías. Vol. 1. Universidad de San Carlos de Guatemala. 1984. 284-287p.
18. Standley PC, Williams LO. Flora of Guatemala. Fieldiana Botany, 9 1-2, 24. 1970. 236p.
19. Robson N, Robson E. Maravillas Botánicas. Madrid. LIBSA. 1991. 83p.
20. Martínez JV, *et al.* Fundamentos de agrotecnología, de cultivo de plantas medicinales Iberoamericanas. Colombia: CYTED 2000. 524p.
21. Morales J, Saravia A. Estudio Farmacológico de los extractos etanólico, hexánico, clorofórmico, acetato de etilo y acuoso de las hojas de *Lippia graveolens* como diurético (fase II): Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2005. 25p.
22. He X, *et al.* An Antifungal compound. J. Ethopharma. 1994, 43. 173-177p.
23. Cáceres A, *et al.* (1994) 10 años del CYTED, pp. 212.
24. Rojas U. Elementos de Botánica General. Tomo III. Guatemala. 1929. 1660p.
25. Standley P, Steyermark J. Flora of Guatemala. Fieldiana: Botany. IX, Vols. XIII. 1974.
26. Simpson M. Anthropological Papers. Bulletin 136 No. 27-32. Smithsonian Institution: USA. 1943. 375p.
27. Aguilar J. Catálogo de los Árboles de Guatemala. USAC: Guatemala. 1982. 248p.
28. Standley PC, Steyermark JA. Flora of Guatemala. Fieldiana Botany, 24, 1976. 114p.
29. Torres M. Esquisúchil, el árbol del Hermano Pedro. Disponible en www.prensalibre.com/especiales/ME/hermano/arbol. Fecha de consulta Noviembre 2005.

30. Zamarripa A. *Sporothrix schenckii*: Aspectos bioquímicos y morfológicos. IV Congreso de Micología: Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de México (UNAM), Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Guanajuato. México D.F.
31. Phalow M. Farmacéutica El gran libro de las plantas medicinales. Editorial Everest, S.A. 1982. 288p.
32. Ayats J. Esporotricosis. Disponible en:
www.seime.org/control/revi_Micol/espore.htm Fecha de consulta: noviembre de 2005.
33. Mesa AC, *et al.* Tipificación de aislados clínicos de *Sporothrix schenckii* de diferentes orígenes geográficos. IV Congreso Nacional de Micología: Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de México (UNAM). México D.F.
34. Ortiz JL. Prevalencia de Micetomas, esporotricosis y cromomicosis en el Hospital Nacional Pedro Betancourt de la Antigua Guatemala. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Médicas) 1992. 25p.
35. Donabedian H. *et al.* Disseminated cutaneous and meningeal Sporothricosis in an AIDS patient. Diagnostic of Microbiology Infections Diseases. 1994. 18:111-115.
36. Stites D, *et al.* Inmunología Básica y Clínica. 9ed. México: Manual Moderno, S.A. de C. V. 1998. 1080p.
37. Smith CM, Reyard AM. Farmacología. Argentina: Médico Panamericano, 1995. 1135p.
38. Torres BM, *et al.* Efecto del yoduro de potasio sobre la respuesta inmune en la esporotricosis. Iberoamericana Micology 1997. 14:98-100.
39. Teixidor JR, *et al.* Medicina Interna. España: Masson, S.A. 1998. 1938p.
40. Ayats Ardite J. *Sporothrix schenckii*. Disponible en
www.seime.org/cpmtrp:/redy/Myco/espore.htm. Fecha de consulta: Noviembre de 2005.
41. Datzung BG. Farmacología básica y clínica. 8ed. México: El Manual Moderno, 2002. 1346p.

42. Lavalle P, Padilla M. Tratamiento de Esporotricosis. Disponible en www.galderma.com.mx. Fecha de consulta noviembre de 2005.
43. Leal R. Micosis. Disponible en: www.geocities.com/rav7/micosis.htm. Fecha de consulta octubre de 20005.
44. Record Details. Nombres y clasificación de los hongos. Disponible en: www.indexfungorum.org/Names/NamesRecord.asp?. Fecha de consulta marzo de 2006.
45. Dubos R. Bacterial and Mycotic of microorganisms. 3 ed. USA: Lippincott Company. 1958. 820p.
46. Howard DH. Fungi Pathogenic of Humans and Animals. USA: Marcel Dekker Inc. 1983. 652p.
47. McGinnis M, D'Amato R, Geoffrey A. Pictorial handbook of Medically Important Fungi and Aerobic Actinomycetes. USA: Land Praeger Publishers. 1982. 160p.
48. Manigot G. Enfermedades micóticas de la piel. Disponible en: www.eprodig.com/dermlink/Paginas/consejos_enfermedades_micoticas_hm. Fecha de consulta diciembre de 2005.
49. Gupta AK, Taborda PR and Sanzovo AD. Alternate web and combination itraconazole and terbinafine therapy for chromoblastomycosis caused by *Fonsecae pedrosoi* in Brasil. Medical Mycology. 2002. 40(5): 529-534.
50. Bonifaz A, Carrasco-Gerard E, Saul A. Chromoblastomycosis: clinical and mycologic experience of 51 cases. Mycoses. 2001. 44(1-2): 1-7.
51. Physicians GenRx. The Complete drug reference. USA: Mosby, 1996. 2130p.
52. Karzung BG. Farmacología Básica y clínica. 6 Ed. México: Manual Moderno. 2002. 1346P.
53. Wiley J. Antifungal Chemotherapy Department of Bacteriology. USA: D.C.E. Speller, 1980.446p.
54. Anfotericina B, Disponible en: www.viatusalu.cm/documento.asp?ID=6412&alias=ANFOTERICINA%20B·indice. Fecha de consulta diciembre de 2005.
55. Cáceres A. Plantas de Uso Medicinal en Guatemala. Guatemala. Editorial Universitaria. 1996. pp.

56. Alio AB, *et al.* Cromomicosis: Uso del tratamiento combinado de Itraconazol y 5-fluorouracilo en *Fonsecae pedrosoi* e itraconazol y Criospray en *Exophiala jeanselmei* var *Lecanii-Corni*. *Derm. Venezuela*. 2001. 39:11-15.
57. Sevigny GM, Ramos-Caro FA. Treatment of chromoblastomycosis due to *Fonsecae pedrosoi* with low-dose terbinafine. *Cutis*. 2000;66(1): 45-46.
58. Esterre P, Jahevitra M, Andriantsimahavandy A. Humoral immune response in chromoblastomycosis during and after therapy. *Laboratory Immunology*. 2000;7(3):497-500.
59. Perez A. Terbinafine: broad new spectrum of indications in several subcutaneous and systemic and parasitic diseases. *Mycoses*. 1999; 42:111-114.
60. Tahuma H, *et al.* Case report. A case of chromoblastomycosis effectively treated with terbinafine. Characteristics of chromoblastomycosis in the Kitasato region, Japan. *Mycoses*. 2000; 43(1-2):79-83.
61. Cáceres A. Manual de Procedimientos del Proyecto Biodiversidad Tropical de Centro América. Organización de Estados Americanos. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala. 1999. 17p.
62. Solís PN, *et al.* Manual de Caracterización y Análisis de Drogas Vegetales y Productos Fitoterapéuticos. Proyecto Desarrollo de Tecnología de Cultivo de Plantas Medicinales y Producción de Fitoterápicos (OEA/AICD/AE 089/03). 2005. pp. 43-65.
63. Anderson JE, *et al.* A blind comparison of simple benchtop bioassay and human tumor cell cytotoxicities as antitumor prescreens. *Phytochemical Analysis*. 1991. 2: 107-111.
64. Chariandy MC, *et al.* Screening of medicinal plants from Trinidad and Tobago for antimicrobial and insecticidal properties. *J. Ethnopharmacol*. 1999. 64: 265-270.
65. Cox PA, Balick, MJ. The ethnobotanical approach to drug discovery. *Scientific American*, June. 1994. pp. 82-87.
66. Cutler S. Biologically Active Natural Products: Pharmaceuticals. Boca Ratón, Florida, USA. CRC Press LLC. 2000. pp. 17-23.
67. Meyer BN, *et al.* Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plants constituents. *Planta Médica*. 1982. 45: 31-34.

68. Hernández L, *et al.* Actividad antimicrobiana de plantas que crecen en Cuba. *Revista Cubana Plantas Medicinales*. 2001. (2):44-47.
69. Mitscher LA, *et al.* A modern look at folkloric use anti-infective agents. *J. Nat. Prod.* 5: 1987. 1025-1041.
70. Mitscher LA, *et al.* Antimicrobial agents from higher plants. 1. Introduction, rationale and methodology. *Lloydia*. 1972. 35: 157-166.
71. Pellecuer S, *et al.* Huiles Essentielles Bactericidas et Fongicides. *Revue de l'Institute Pasteur de Lyon*. 1976. 9:135-159.
72. Ríos JL, *et al.* Screening methods for natural products with antimicrobial activity. *J. Ethnopharmacology*. 1988. 28: 127-149.
73. Gentry AH. *A field Guide to the Families and Genera of Woody Plants of Northwest South America*. USA. The University of Chicago Press. 1996. pp. 835.
74. Medinilla BE. *Manual de Laboratorio de Fitoquímica*. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala, Guatemala. 2002. pp. 27.
75. Sharapin N, *et al.* *Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos*. Colombia. CAB y CYTED. 2000. pp. 247.
76. Trease W. Evans. *Farmacognosia*. 13 Ed. México. Interamericana McGraw Hill. 1991. 261-280p.
77. Wagner H, *et al.* *Plant Drug Analysis*. 2 Ed. Berlin, Germany. Springer-Verlag Heidelberg. 2001. 384p.
78. Sandberg F. *Pharmacological Screening of Medicinal Plants*. Government, Colombo, Shrilanka. 1967. 1-15p.
79. Janssen AM, Scheffer JJC, Svendsen A. Screening for Antifungal Activity of Nineteen Latin American Plants. *Phytotherapy research*. 1998; 12:427-430.
80. Martínez JV, *et al.* *Fundamentos de agrotecnología, de cultivo de plantas medicinales Iberoamericanas*. Colombia: CYTED 2000. 524p.