

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**RASTREO DE LA ACTIVIDAD ANTIFUNGICA  
DE PLANTAS DEL NORESTE DE MEXICO, CONTRA  
LOS PRINCIPALES AGENTES CAUSALES  
DE MICOSIS PULMONAR EN LA REGION**

**Por**

**Q.C.B. BLANCA ALICIA ALANIS GARZA**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRIA EN CIENCIAS  
CON ORIENTACION TERMINAL EN  
QUIMICA BIOMEDICA**

**Mayo 2005**

TM

RC776

.F8

A5

2005

e.1

20

03

03

05

Q.C.B.

BLANCA

ALICIA

ALAIMIS

GARRZA



1080127185

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA

RASTREO DE LA ACTIVIDAD ANTIFUNGICA EN PLANTAS DEL NORESTE DE MEXICO, CONTRA LOS PRINCIPALES AGENTES CAUSALES DE MICOSIS PULMONAR EN LA REGION

Aprobación de la Tesis:



*[Signature]*  
DRA. VERONICA GALINDO

*[Signature]*

DRA. GLORIA MARIA GONZALEZ GONZALEZ

RASTREO DE LA ACTIVIDAD ANTIFUNGICA DE PLANTAS DEL NORESTE DE MEXICO, CONTRA LOS PRINCIPALES AGENTES CAUSALES DE MICOSIS PULMONAR EN LA REGION

DR. RICARDO SALAZAR ARANDA  
Co-Director de Tesis

Por

*[Signature]*

Q.C.B. BLANCA ALICIA ALANIS GARZA

Subdirector  
de Estudios de Posgrado

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRIA EN CIENCIAS  
CON ORIENTACION TERMINAL EN  
QUIMICA BIOMEDICA



Mayo 2005

TM  
RC776  
- F8  
AS  
2005



**RASTREO DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA EN PLANTAS DEL  
NORESTE DE MÉXICO, CONTRA LOS PRINCIPALES AGENTES  
CAUSALES DE MICOSIS PULMONAR EN LA REGIÓN**

**Aprobación de la Tesis:**



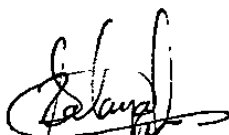
---

**DRA. VERÓNICA MAYELA RIVAS GALINDO**  
Director de Tesis



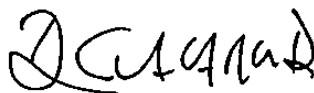
---

**DRA. GLORIA MARIA GONZALEZ GONZALEZ**  
Co-Director de Tesis



---

**DR. RICARDO SALAZAR ARANDA**  
Co-Director de Tesis



---

**DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO**  
Subdirector  
de Estudios de Posgrado

Rastreo de la actividad antifúngica de plantas del  
Noreste de México, contra los principales agentes  
causales de micosis pulmonar en la región

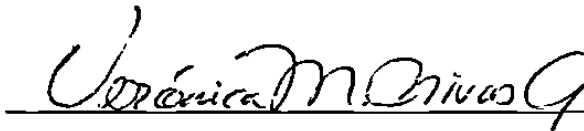
Presentado por:

**Q.C.B. Blanca Alicia Alanís Garza**

Este trabajo se realizó en los Departamentos de Química Analítica y Microbiología de la Facultad de Medicina, de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría de la Dra. Verónica Mayela Rivas Galindo y la co-asesoría de la Dra. Gloria María González González y el Dr. Ricardo Salazar Aranda.

Firmas

Director



Dra. Verónica Mayela Rivas Galindo

Co-Director  


Dra. Gloria María González González

Co-Director  


Dr. Ricardo Salazar Aranda

**La fuerza no proviene de la capacidad física,  
sino de la voluntad indomable**

**Mahatma gandhi**



Esta tesis esta dedicada muy especialmente a:

Mis padres:

Ing. Homero Alanís Hinojosa (†) y Blanca Esthela Garza González

Y

A toda aquella persona que creyó en mi  
y quienes me apoyaron.

## Agradecimientos

Por fin los agradecimientos! La primera página que verá el lector, pero la última que he escrito. El trabajo está hecho y sólo me queda dejar constancia de todo lo que debo a tanta gente. Casi todo lo que hacemos y entre ello lo relacionado con la investigación, es fundamentalmente una labor colectiva, aunque muchas veces los que han contribuido no sean en absoluto conscientes de ello.

Antes que todo, gracias a *Dios* por permitirme llegar hasta este momento con la libertad de poder hacer siempre lo que he querido, por tener la dicha de contar con salud y mis cinco sentidos. Por la voluntad para salir adelante y enfrentar las adversidades encontradas en el camino de nuestra vida diaria.

A ese hombre ejemplar de quien tenemos excelentes recuerdos, *mi padre*, aunque se que estuviste conmigo en todo momento, " Como me hiciste falta".

Por darme la oportunidad de llegar a este mundo muchas gracias a *mi madre*, por darme la libertad de estudiar y por estar siempre conmigo en todo momento.

Por su apoyo incondicional, a *la Comarre y el cuñado*, por entenderme y depositar en mí la confianza de ser la madrina de su primogénita, " Comarre: eres el mejor recuerdo que nos dejó Papá".

*A mi ahijada* quien siempre contará conmigo, no soy la mejor madrina, pero trato de ser lo mejor que puedo, "te quiero mucho".

Quiero agradecer a cada uno de los miembros de *mi comisión* por darme el privilegio de ser guiada de su mano estos 32 meses, por darme la libertad de desarrollar este trabajo brindándome la seguridad de que puedo hacer bien las cosas. Por formarme en el apasionante camino de la investigación y hacerme sentir entre amigos desde el primer momento. Mi profundo agradecimiento por la extraordinaria generosidad con la que me regalaron tiempo, paciencia y ayuda.

**A mi maestra (Vero),** me siento muy contenta de haber encontrado a un ser con alma transparente, lleno de amor y con ansias de compartir, de dar tanto de sí misma, en quien encontré un inestimable respaldo y amistad. Muchas gracias por animarme a embarcarme en esta aventura, por creer en mí más de lo que yo misma soy capaz de hacerlo, por poner a mi disposición tu amplia experiencia y conocimientos en el área de investigación en productos naturales. Por el apoyo brindado para sobreponerme a los distintos retos encontrados durante este largo trayecto. Por poner a mi disposición cuanto he necesitado para llevar a cabo la realización de este trabajo.

A la **Dra. Gloria** por la confianza que depositó en mí, a pesar de que no nos conocíamos, por abrirme las puertas del departamento de microbiología, por su paciencia y compartir conmigo sus conocimientos y experiencia, por compartir conmigo la pasión que siente por la micología y sembrar en mí el interés por esta área, fue una muy bonita experiencia trabajar juntas.

Bueno, **Ricardo** espero me hallas tomado un poco de cariño, gracias por darme la oportunidad de conocerte. Por tu apoyo, comprensión y obsesión. Quiero agradecerte tus buenos consejos, la paciencia demostrada, así como la convivencia y el intercambio de ideas lo cual siempre es reconfortante y por otro lado beneficioso para la realización de un trabajo con estas características.

Muchas gracias a la **Dra. Waksman** por adoptarme como un integrante más de la familia que ha formado con el personal del departamento de Química Analítica. Además por el apoyo incondicional para la realización de esta tesis.

Un agradecimiento muy especial a **Ivonne** por facilitarme el trabajo con su incansable apoyo, ayuda y convivencia diaria, por tu inmensa calidad humana, muchas gracias por tu amistad.

Gracias a **Lidia** y **Diana** por su apoyo en el desarrollo de mi trabajo en el departamento de micro.

A los biólogos **Humberto Sanches Vega, M. C. Mauricio González ferrara, M. C. María del Consuelo González de la Rosa y Marco Antonio Guzmán Lucio,** por su apoyo para la selección, ubicación e identificación de los especímenes empleados en este trabajo.

A mis compañeros de posgrado: **Jonathan, Ricardo y Anabel**, como agradecerles los momentos compartidos y por tolerarme, aunque....nunca me llevaron de paseo con ustedes, ahora pueden decir que tienen un límite de tolerancia muy alto.

Por aceptarme como soy, gracias a **Laura, Karina y Graciela**, por esas escapaditas que nos damos de vez en cuando, por los momentos compartidos. Por permitirme conservar en ustedes el tesoro de la amistad, que figura entre los bienes mayores y más dulces que pueda poseer el hombre en este mundo.

A **Gloria y Martha**, quienes me dieron el apoyo en cuestiones administrativas del departamento de Química Analítica, así como también me revisaron estas tres páginas momentos antes de llevar a encuadernar la tesis, gracias Glorix y Martiux.

Por buscar siempre la forma de facilitar y agilizar los trámites administrativos en posgrado, gracias a **Normita**.

Al proyecto **PAICYT-CN950-04** por el apoyo económico para la realización de esta tesis.

A **CONACYT** por la beca crédito para la realización de mis estudios de posgrado.

Por último quiero agradecer a todos aquellos que me apoyaron una vez estaba en esto, a todos los que me preguntaron una y mil veces cómo iba la cosa, a los que se interesaron por cuándo acababa o comenzaba. Todos ellos han hecho posible que me sienta razonablemente orgullosa de este trabajo.

Sinceramente.....Gracias!

## Resumen

Q.C.B. Blanca Alicia Alanís Garza

Fecha de Graduación : Mayo 2005

**Universidad Autónoma de Nuevo León  
Facultad de Medicina**

Título de Estudio:

**Rastreo de la actividad antifúngica de plantas del Noreste de México, contra los principales agentes causales de micosis pulmonar en la región.**

Numero de páginas: 58

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con Orientación terminal en Química Biomédica.

Área de estudio: Química Biomédica

### **Propósito y método del estudio**

La fitoterapia, como se denomina a los tratamientos naturales, se basa en el uso de los principios activos contenidos en las plantas o vegetales. Las plantas contienen miles de constituyentes y son una muy importante fuente de moléculas nuevas y biológicamente activas. Se plantea que las micosis pulmonares son infecciones de creciente incidencia en nuestros días, por el creciente número de individuos inmunodeprimidos, esto debido en parte a los avances de la medicina. Las limitaciones de los tratamientos actuales son el restringido acceso de la población a los medicamentos esenciales, la poca eficiencia del medicamento existente, su alta toxicidad, alto costo y reincidencia fúngica debido al efecto fungistático del medicamento. Dentro de los hongos oportunistas que provocan más comúnmente infección pulmonar se encuentran *Candida albicans* y *Aspergillus fumigatus* y dentro de los patógenos verdaderos se encuentran *Histoplasma capsulatum* y *Coccidioides immitis*. El propósito de este trabajo fue rastrear la actividad antifúngica en extractos obtenidos de plantas regionales, previamente seleccionadas, contra los principales agentes causales de micosis pulmonar, con el fin de colaborar en el principio de la búsqueda de nuevos compuestos activos que podrían ser utilizados en la generación de algún nuevo medicamento en el futuro. *Candida albicans*, se trabajó siguiendo el micro método descrito por el protocolo M27-A2 del NCCLS; *Aspergillus fumigatus* se trabajó siguiendo el micro método descrito por el protocolo M38P del NCCLS, *Histoplasma capsulatum* y *Coccidioides immitis*, se trabajaron siguiendo el macro método descrito por el protocolo M38P del NCCLS.

### **Conclusiones y contribuciones:**

De los extractos secundarios, 18 presentaron la mayor actividad antifúngica en un rango de 63 a 16 mg/mL contra los diferentes hongos. De los extractos secundarios solo dos extractos resultaron tóxicos en el ensayo de letalidad de *Artemia salina*. Los resultados obtenidos con este trabajo son de suma importancia debido a que podría derivarse el desarrollo de nuevos medicamentos antifúngicos que tendrían gran repercusión en la salud humana, especialmente debido a que estas micosis son altamente refractarias al tratamiento actual convencional.

## Índice

Capítulo	Página
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1 La medicina tradicional .....	1
1.2 La medicina tradicional en México.....	5
1.3 La importancia de las plantas como fuente de nuevos medicamentos .....	6
<b>2. Antecedentes</b>	<b>8</b>
2.1 Detección de compuestos .....	9
2.2 Las Micosis en Nuestros Días .....	10
2.3 Clasificación General de los Hongos .....	12
2.4 Mecanismo de acción de los medicamentos actuales .....	14
2.5 Justificación .....	16
2.6 Objetivos .....	17
2.6.1 Objetivo general .....	17
2.6.2 Objetivos específicos .....	17
<b>3. Material y Métodos</b>	<b>18</b>
3.1 Material, reactivos y equipo .....	18
3.1.1 Material Biológico .....	18
3.1.2 Material.....	19
3.1.3 Reactivos y solventes.....	21
3.1.4 Equipos .....	22
3.2 Métodos .....	23
3.2.1 Selección y preparación de material biológico .....	23
3.2.2 Obtención de los extractos hidroalcohólicos.....	23
3.2.3 Extracción diferencial de los extractos hidroalcohólicos activos.....	24
3.2.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana. ....	25
3.2.4.1 Preparación del medio .....	25

3.2.4.2 Preparación de inóculos.....	25
3.2.4.2.1 <i>Candida albicans</i> .....	25
3.2.4.2.2 <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	26
3.2.4.2.3 <i>Histoplasma capsulatum</i> .....	26
3.2.4.2.4 <i>Coccidioides immitis</i> .....	26
3.2.5 Bioensayos.....	27
3.2.5.1 Micro dilución .....	27
3.2.5.2 Macro dilución.....	28
3.2.6 Ensayos de toxicidad.....	28
<b>4. Resultados</b>	<b>30</b>
4.1 Selección de las plantas .....	30
4.2. Porcentajes de recuperación de los extractos hidroalcohólicos.....	31
4.3 Evaluación de actividad antifúngica de los extractos hidroalcohólicos.....	32
4.4 Extracción diferencial.....	33
4.5 Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos secundarios. ....	34
4.5.1 Bioensayos con <i>Candida albicans</i> .....	35
4.5.2 Bioensayos con <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	36
4.5.3 Bioensayos con <i>Coccidioides immitis</i> . ....	36
4.5.4 Bioensayos con <i>Histoplasma capsulatum</i> .....	37
4.6 Evaluación de toxicidad. ....	38
<b>5. Discusión</b>	<b>41</b>
<b>6. Conclusiones</b>	<b>48</b>
<b>7. Perspectivas</b>	<b>49</b>
<b>8. Referencias</b>	<b>50</b>

## Lista de figuras

Figura	Descripción	Página
1.	Imagen representativa de la zona de acción de los medicamentos con los que actualmente se cuenta para el tratamiento de las micosis sistémicas.....	15



## Lista de tablas

Tabla	Contenido	Página
1.	Nombre científico y nombre común de las plantas seleccionadas con el número de folio cotejado por especie.....	31
2.	Porcentajes de recuperación obtenidos para los extractos hidroalcohólicos.....	32
3.	Concentración mínima inhibitoria de los extractos hidroalcohólicos frente a <i>C. albicans</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>C. immitis</i> y <i>H. Capsulatum</i> .....	33
4.	Porcentaje de recuperación obtenido para cada uno de los extractos secundarios. ....	34
5.	CMI de los extractos secundarios frente a <i>C. albicans</i> .....	35
6.	CMI de los extractos secundarios frente a <i>A. fumigatus</i> .....	36
7.	CMI de los extractos secundarios frente a <i>C. immitis</i> .....	37
8.	CMI de los extractos secundarios frente a <i>H. capsulatum</i> .....	38
9.	Toxicidad de los extractos secundarios de mayor actividad.....	39

## Abreviaturas y símbolos

<b>g</b>	<b>Gramo</b>
<b>mg</b>	<b>Miligramo</b>
<b>µg</b>	<b>Microgramo</b>
<b>mm</b>	<b>Milímetro</b>
<b>nm</b>	<b>Nanómetro</b>
<b>µm</b>	<b>Micrómetro</b>
<b>L</b>	<b>Litro</b>
<b>mL</b>	<b>Mililitro</b>
<b>µL</b>	<b>Microlitro</b>
<b>µg/mL</b>	<b>Microgramo por mililitro</b>
<b>ppm</b>	<b>Partes por millón</b>
<b>µM</b>	<b>Micromolar</b>
<b>UFC</b>	<b>Unidades formadoras de colonia</b>
<b>UFC/mL</b>	<b>Unidad formadora de colonia por mililitro</b>
<b>Spp.</b>	<b>Especie</b>
<b>min</b>	<b>Minuto</b>
<b>rpm</b>	<b>Revoluciones por minuto</b>
<b>NCCLS</b>	<b>National Committee for Clinical Laboratory Standards</b>
<b>U.A.N.L.</b>	<b>Universidad Autónoma de Nuevo León</b>
<b>UNL</b>	<b>Universidad de Nuevo León</b>
<b>N. L.</b>	<b>Nuevo León</b>
<b>CMI</b>	<b>Concentración mínima inhibitoria</b>
<b>DMSO</b>	<b>Dimetil sulfóxido</b>
<b>OMS</b>	<b>Organización mundial de la salud</b>
<b>°C</b>	<b>Grados Celsius</b>
<b>%</b>	<b>Por ciento</b>
<b>SIDA</b>	<b>Síndrome de Inmuno Deficiencia Adquirida</b>
<b>EUA</b>	<b>Estados Unidos de América</b>

# Capítulo I

## Introducción

A través de los años, los seres humanos han encontrado en la naturaleza la satisfacción de sus necesidades básicas, comida, calzado, vestido, medio de transporte, sabores y olores; no menos importante, es el uso que desde tiempos remotos el hombre hizo de las fuentes naturales para curar sus afecciones. Las plantas han formado la base de los sistemas tradicionales de medicinas, los cuales han existido por cientos de años (1).

### ***1.1 La medicina tradicional***

Las plantas son una parte pequeña pero importante de la herencia biológica de la tierra (2), contienen miles de constituyentes y son una fuente muy importante de moléculas nuevas y biológicamente activas.

A pesar de la disponibilidad de diferentes propuestas para el descubrimiento de terapéuticos, los productos naturales permanecen como uno de los mejores reservorios de nuevos tipos de estructuras químicas. Solo un pequeño porcentaje de entre las

250,000 y 500,000 especies del reino vegetal en el planeta han sido investigadas fitoquímicamente, incluso menos especies han sido estudiadas en sus propiedades biológicas y farmacológicas (3). Un pequeño porcentaje (1-10%) de éstas son utilizadas como alimento por humanos y otras especies de animales (4).

Los productos de origen natural constituyen una fuente para el hallazgo de novedosas estructuras químicas, que pueden modificarse para encontrar rápida y eficientemente análogos con igual o mayor actividad biológica que los originales (5).

Un alto contenido de los principios activos, depende de factores internos de la planta como son aquellos relacionados con el crecimiento adecuado de la especie en cuestión, los referidos a la recolección y conjuntamente también las condiciones climáticas, pues como seres vivos que son, las plantas están en constante interacción con el medio que las rodea; esencialmente el clima influye en un momento determinado en su crecimiento y desarrollo y en especial en la producción de sus metabolitos (6).

El empleo terapéutico de las plantas por los pueblos constituye una parte importante de la cultura universal que ha acumulado la humanidad (7).

El uso de las plantas medicinales es tan antiguo como la historia del hombre mismo, quien logra clasificar aquellas especies útiles en medicina y luego transmitir su conocimiento de una generación a otra; así es que estos conocimientos han llegado a nuestros días. A partir de las últimas dos décadas aparece un resurgimiento en el interés acerca del uso y estudio de la plantas medicinales avalado por un gran número de publicaciones científicas que corroboran las propiedades atribuidas por la población (8).

La medicina tradicional desarrolla actualmente un papel esencial en la salud; la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que aproximadamente el 80% de

los más de 4000 millones de habitantes en el mundo confían en las medicinas tradicionales para sus principales necesidades; cerca del 85% de la medicina tradicional involucra el uso de extractos de plantas (1).

La implantación de la fitoterapia, como se denomina a los tratamientos naturales que se basan en el uso de los principios activos contenidos en las plantas o vegetales, debe realizarse teniendo en cuenta determinadas pautas para llegar a producir los efectos deseados (9).

La forma biológica más utilizada es la hierba con un 65.83%, seguida por el árbol con un 18.33%, además la vía de administración más usada es la oral 53.01%. En lo referente a aparatos y sistemas, los padecimientos mencionados más frecuentemente en el empleo de la medicina tradicional son los relacionados a infecciones del aparato respiratorio (10).

El agua es el solvente utilizado universalmente para extraer los compuestos activos. En los hogares, las plantas secas pueden ser ingeridas como té, algunas veces como tinturas o inhaladas por medio de vaporizaciones. Otra forma de uso es el tópico, en la cual partes secas de la planta y molidas pueden ser agregadas a aceites o jaleas de petróleo (4).

En la actualidad la aplicación de la medicina natural con nivel científico puede representar no solo el rescate de un rico acervo cultural sino también la solución a problemas de salud. La medicina natural constituye actualmente una opción válida vinculada a la necesidad de perfeccionar la salud pública (11).

La utilización de la llamada medicina tradicional en países de América Latina ha llegado a una nueva etapa. Con el impresionante incremento de la demanda de

alternativas terapéuticas ajenas en conceptos y prácticas al modelo científico biomédico, la medicina tradicional se encuentra enmarcada hoy en día en un contexto que hace algunos años no existía. Prueba de ello es el notable crecimiento de algunos de sus recursos en países industrializados, mismo que ha venido acompañado por cambios en la composición de la oferta de servicios terapéuticos, formas distintas de entender la salud y la enfermedad, así como la utilización combinada de muchas de estas formas terapéuticas. El sector tradicional tiene una presencia importante en la mayoría de los países latinoamericanos, con diferentes formas de expresión según región y localidad, siendo uno de sus nichos "naturales" la zona rural, habitada primordialmente por poblaciones indígenas (12).

En algunas ciudades la medicina tradicional es llamada complementaria o alternativa. En África más del 80% de la población usa la medicina tradicional como atención primaria a la salud; en China la preparación de hierbas tradicionales es del 30-50% de la medicina consumida; en Europa, Norteamérica y otras regiones industrializadas, más del 50% de la población ha utilizado medicina contemporánea o alternativa al menos una vez; en San Francisco y Londres el 75% de la gente que vive con SIDA utiliza este tipo de tratamientos; el 70% de la población en Canadá ha usado este tipo de tratamiento por lo menos una vez; en Alemania, el 90% de la población ha recurrido a remedios naturales en algún momento de su vida (13).

Las plantas medicinales, son fruto de la diversidad biológica y porque no, una de las mayores riquezas que poseemos y que en realidad está siendo estudiada y aprovechada por los países desarrollados (1).

La industria farmacéutica atiende la salud del 36% de la población mundial con fármacos sintéticos ó aislados de productos naturales, mayoritariamente plantas. El resto de los habitantes del planeta no tienen acceso a tales medicinas y utilizan regularmente,

para tratar sus enfermedades, plantas con supuestas propiedades medicinales. Es así como existe un muy importante acervo tradicional de sabiduría popular, aprovechado por los sectores académicos e industrial para descubrir y establecer el potencial terapéutico de productos naturales (14).

En los Estados Unidos de América, 158 millones de población adulta utiliza la medicina complementaria y de acuerdo a la Comisión para medicinas Alternativas y Complementarias, 17 billones de dólares fueron vendidos en remedios tradicionales en el año 2000. En el Reino Unido, el gasto anual en medicina alternativa es de 230 millones de dólares. El mercado global de plantas medicinales actualmente se pone de manifiesto con mas de 60 billones de dólares anuales creciendo y ganando terreno (13).

### ***1.2 La medicina tradicional en México***

Fue hasta la década de los años 70 cuando comenzaron a resurgir investigadores interesados en ese campo y se creó el Instituto Mexicano para el estudio de las plantas medicinales, el cual retomó esos estudios con un enfoque etnobotánico.

En Junio del año 2002 personal de el Centro de Análisis Social y Económico en Salud, La Fundación Mexicana para la Salud, El Centro de Investigación en Sistemas de Salud y El Instituto Nacional de Salud Pública realizaron juntos un trabajo en el cual se obtuvo como resultado que un 52% de la población en México maneja la posibilidad de utilizar la medicina complementaria para atender algún problema de salud que se le pudiera presentar en el futuro, lo que revela el gran interés por ella. El 40.4% de la población que no utiliza este tipo de medicina es porque no sabe de la existencia de ese servicio. El 82.9% de la población que participó opinó que se debería incluir este servicio

de medicina complementaria en las instituciones públicas de salud y el 77.8% estaría dispuesto a pagar parte del costo, si ésta se llegara a incluir (15).

Existen evidencias que indican que la información etnomédica puede incrementar en aproximadamente unas 10 veces la probabilidad del éxito en la búsqueda de nuevos medicamentos. Por eso es importante resaltar que es necesario intensificar la investigación en etnomedicina para evitar de ese modo que la devastación de muchos hábitats y la pérdida de conocimiento de las propiedades de las plantas medicinales en culturas tradicionales, heredado a lo largo de generaciones, resulte en la desaparición definitiva de información valiosa (5).

El estudio de las plantas medicinales en México es de suma importancia para la ciencia médica contemporánea, sobre todo por la frágil economía del país, donde los medicamentos son caros para la mayoría de los mexicanos (17).

### ***1.3 Importancia de las plantas como fuente de nuevos medicamentos***

Cerca del 25% de las medicinas modernas son obtenidas de extractos de plantas usadas tradicionalmente o principios activos derivados de ellas, mientras que otro 25% son de modificación estructural del producto natural. Cuando se considera que una sola planta puede contener miles de constituyentes, la posibilidad de hacer nuevos descubrimientos se hace evidente (3).

Las plantas superiores han sido descritas como fábricas, las cuales son capaces de sintetizar un número ilimitado de sustancias químicas altamente complejas e inusuales cuyas estructuras escapan de la imaginación de los quienes sintetizan compuestos.



Considerando que muchos de estos orígenes pueden perderse para siempre debido a la extinción, y debido a que las plantas tienen un gran potencial para producir nuevos medicamentos de gran beneficio para los hombres, debe tomarse alguna acción para dar marcha atrás a la actual apatía en los Estados Unidos con respecto a este potencial (16).

La industria farmacéutica de los Estados Unidos gastó \$4.1 billones de dólares en investigación y desarrollo en el año de 1985. Los consumidores americanos gastaron un exceso de \$8 billones de dólares al surtir prescripciones farmacéuticas cuyos constituyentes activos han sido extraídos de plantas superiores (16).

## Capítulo II

### Antecedentes

La era actual trae nuevamente el legado de nuestros antepasados, quienes se valían de las plantas para curar sus enfermedades. El descubrimiento de la penicilina a partir del hongo filamentoso, *Penicillium notatum* y su uso terapéutico, en los años 40, devino en una nueva era de la medicina, la “ Edad de Oro” de los antibióticos; se promovió así la intensa investigación de la naturaleza como una fuente de nuevos agentes bioactivos (1).

En 1984, al menos el 25% de los medicamentos prescritos en Estados Unidos y Canadá contenían principios activos, los cuales eran extraídos o copiados de plantas superiores y este porcentaje no ha variado mas del 1.0% durante el periodo de 25 años previos. En 1985, Fransworth reportó que 119 metabolitos de plantas, utilizados globalmente como medicamentos, aún son obtenidos de plantas superiores. Ese número de fármacos todavía se extrae de alrededor de 90 especies de plantas; el sentido común indica que numerosas sustancias utilizables como medicamentos esperan ser descubiertas (14). El 74% de los componentes derivados de plantas farmacológicamente activas fueron descubiertos posterior al seguimiento del uso etnobotánico de la planta (18).

## 2.1 Detección de compuestos

El rastreo de compuestos con la actividad deseada en los complejos extractos crudos de plantas depende de la fiabilidad y sensibilidad del sistema de detección utilizado. Los bioensayos, son esenciales para el monitoreo de los efectos deseados siguiendo la vía de actividad de las fracciones. Todas las fracciones son evaluadas y aquellas que continúen presentando actividad son seguidas en futuros aislamientos y purificaciones hasta que se obtiene la sustancia activa (3).

La estrategia del rastreo comprende por lo general dos etapas: la primaria y la secundaria o de orden superior. Cada una de estas etapas implica la realización de uno o más ensayos de actividad biológica (bioensayos). Ambas etapas tienen por objeto reducir a un número manejable el conjunto de los extractos vegetales, para efectuar sobre éstos el fraccionamiento dirigido por los bioensayos y así encontrar el compuesto de interés.

El bioensayo utilizado para el rastreo primario debe reunir las siguientes características: ser de amplio espectro, esto es, debe detectar una amplia gama de actividades biológicas; tener alta capacidad para permitir el procesamiento simultáneo de muestras; ser rápido; utilizar poca cantidad de muestra; ser sencillo, económico y capaz de predecir la actividad biológica buscada.

A los extractos que demuestren actividad en esta etapa se les efectúa el fraccionamiento dirigido por el bioensayo, a fin de detectar el ó los compuestos responsables de dicha actividad. Una vez que el compuesto con actividad biológica es aislado, se determina su estructura y se somete a estudios detallados y específicos que se efectúan *in vivo*.

La búsqueda de medicamentos en la naturaleza es una tendencia que se complementa perfectamente con las nuevas disciplinas y procedimientos de laboratorio para el desarrollo de nuevos medicamentos (5). Una prueba de toxicidad simple y rápida para los compuestos bioactivos obtenidos de los extractos de plantas es el ensayo con larvas de *Artemia salina*, propuesto por J. L. McLaughlin. Este ensayo no es selectivo para algún tipo químico y no ha sido relacionado con otras actividades biológicas. Sin embargo, por la simplicidad de dicho procedimiento, se debe asegurar un lugar en los laboratorios de productos naturales como un bioensayo preliminar para el rastreo de toxicidad en los extractos de plantas y fraccionamiento biodirigido (19).

Debemos considerar que algunos de los compuestos que exhiben actividad en los bioensayos podrían ser nuevos medicamentos, ser igual o menos potentes que los ya existentes; otros pudieran ser muy tóxicos para el uso comercial. Sin embargo, la actividad demostrada en los bioensayos es el primer paso necesario en el proceso de desarrollo de un medicamento (20).

## ***2.2 Las Micosis en Nuestros Días***

En la década de los 70's se revolucionaron el diagnóstico y tratamiento para las infecciones bacterianas; en los 80's fue notable el impulso y desarrollo en la lucha contra los virus, sin embargo en el último decenio del siglo los esfuerzos se concentraron en el enfrentamiento de las infecciones causadas por hongos. (21)

Debido al continuo desarrollo de resistencia microbiana en la medicina, el descubrimiento de nuevas sustancias antimicrobianas es importante, si no es que

urgente. Particularmente es deseable el descubrimiento de nuevos prototipos de agentes antimicrobianos, que tengan diferente modo de acción que los ya existentes.

Los microbiólogos clínicos tienen dos razones para estar interesados en tópicos de extractos de plantas con actividad antimicrobiana. La primera es que existe una alta probabilidad de que los compuestos extraídos de plantas encuentren un lugar en el arsenal de medicamentos antimicrobianos prescritos por médicos. La segunda razón es que debido a la auto-medicación y el mal empleo de antibióticos tradicionales, que ha llegado a generar microorganismos resistentes a estos medicamentos, el descubrimiento de nuevos compuestos químicos con esta actividad biológica es de gran interés. Además, la gente esta interesada en tener más autonomía sobre su cuidado médico (4).

Se plantea que las micosis pulmonares son infecciones de creciente incidencia en nuestros días, por el creciente número de individuos inmunodeprimidos, esto se debe en parte a los avances de la medicina y significa un enorme reto para aquellos profesionales que se dedican a combatir las, tratarlas y erradicarlas (21).

Las enfermedades fúngicas son bien reconocidas como causa importante de muerte en pacientes inmunocomprometidos seriamente. La incidencia de candidemia y mortalidad por infecciones con *Candida spp.* comenzaron a incrementarse a finales de los 90's, junto a la incidencia por otras micosis, particularmente aquellas causadas por hongos filamentosos, como *Aspergillus fumigatus*, posterior a trasplantes de medula ósea (22).

Habitualmente hemos considerado que estas micosis pulmonares o sistémicas son enfermedades de curso más bien crónico e insidioso, pueden autolimitarse en individuos inmunocompetentes (histoplasmosis) o estar limitadas geográficamente (blastomicosis, coccidioidomicosis). Hace 50 años, hongos de los géneros *Candida spp.* y

*Aspergillus spp.* eran considerados con más frecuencia contaminantes; hoy en día se reportan cada vez más estos microorganismos como causantes de sepsis grave y muerte en pacientes inmunodeprimidos (21). Esto se debe en parte a los avances de la medicina como son la terapia con antimicrobianos de amplio espectro, la quimioterapia del cáncer, el trasplante de órganos, la cirugía mayor, así como también al esparcimiento del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), hemopatías malignas, tratamiento oncológico intenso, el uso de esteroides y la expansión de drogadicción endovenosa (23).

### **2.3 Clasificación General de los Hongos**

Clásicamente se han determinado dos categorías en la génesis de las infecciones por hongos, una relacionada con el estado constitucional del hospedero que son los llamados hongos oportunistas y otra relacionada con la virulencia inherente del germen, por lo que se denominan patógenos verdaderos.

Dentro de los hongos oportunistas se encuentra *Candida albicans* siendo esta la especie responsable de la mayoría de los casos de candidosis, la cual es una micosis cosmopolita y afecta por igual ambos sexos en todas las edades. A diferencia de otros hongos el reservorio de *Candida albicans* es por lo general la propia flora endógena del paciente. Esta es una levadura que se encuentra como parte de la flora normal del tracto gastrointestinal, vagina y sobre la piel; el número puede incrementar con alteraciones en la flora normal en presencia de alguno de los factores predisponentes. Los factores antes mencionados son muy importantes para el establecimiento de una micosis de este tipo.

Otro hongo oportunista es *Aspergillus fumigatus*, quien normalmente se encuentra en el medio ambiente y crece en las hojas muertas, granos almacenados y en vegetación en descomposición. Este es el agente causal de la aspergillosis, siendo esta una micosis cosmopolita que no tiene preferencia por edad ni sexo y es una de las principales causas de infección sistémica fúngica en los Estados Unidos. Puede afectar el corazón, los pulmones, el cerebro y los riñones, presentando un 70–100% mortalidad (24).

Dentro de los patógenos verdaderos se encuentra *Histoplasma capsulatum*, el agente causal de la histoplasmosis, siendo ésta la micosis sistémica de más alta prevalencia tanto en su forma endémica como epidémica en nuestro país la forma epidémica de histoplasmosis ha sido registrada en todas las entidades federativas y representa un problema de salud ambiental y ocupacional. Es la micosis pulmonar más frecuente en pacientes con SIDA de nuestro medio y es causada por la inhalación de polvo proveniente de excretas de murciélagos y aves infectadas con conidias. Los grupos de riesgo son mineros, espeleólogos, guaneros, arqueólogos, etc.

Otro patógeno verdadero es *Coccidioides immitis*, agente causal de la coccidioidomicosis, conocida como la fiebre del valle. El hábitat de *Coccidioides immitis* es el suelo en regiones áridas y semi-áridas. La infección es endémica en el sur de EUA y el Norte de México. Áreas endémicas menos importantes se encuentran en América Central y América del Sur. Los grupos de riesgo son las personas que viven en áreas endémicas, quienes tienen ocupaciones con exposición al polvo (construcción, arqueólogos, agricultores) y personas inmunocomprometidas (25).

Los dos agentes etiológicos antes mencionados, considerados patógenos verdaderos, poseen ciertas características en común como lo es el hecho de ser dimórficos, ambos tienen como hábitat el suelo y su principal vía de entrada es la inhalación con la infección primaria en pulmón. Aproximadamente entre un 60-75% de los

casos cursan con infección asintomática, entre un 25%-40% presentan sintomatología leve y el 1-5% de los casos cursan con sintomatología severa.

#### ***2.4 Mecanismo de acción de los medicamentos actuales.***

Los medicamentos con los que actualmente se cuenta para el tratamiento de las micosis sistémicas tienen diferentes blancos en la célula fúngica (ver figura 1):

- a) **Pared celular fúngica:** inhibición de la síntesis de  $\beta$ -glucana, este mecanismo de acción lo presentan las equinocandinas como la caspofungina.
- b) **Membrana celular fúngica:** inhibición de la síntesis del ergosterol, este es el mecanismo de acción de los triazoles como, fluconazol, itraconazol y voriconazol.
- c) **Membrana celular fúngica:** daño no enzimático en el ergosterol presente en esta estructura, este efecto lo tienen los polienos como la anfotericina B.

Dentro de las limitaciones de los tratamientos actuales se puede mencionar que más de un tercio de la población de ciudades en desarrollo carece de acceso a los medicamentos esenciales (13), la eficiencia de los medicamentos existentes es limitada, así como también son bien conocidos sus efectos adversos (toxicidad renal, anemia, lesiones cardiacas, convulsiones, neuropatía, pérdida del oído, alergias, gastritis), su elevado costo y reincidencia fúngica debido al efecto fungistático del medicamento.



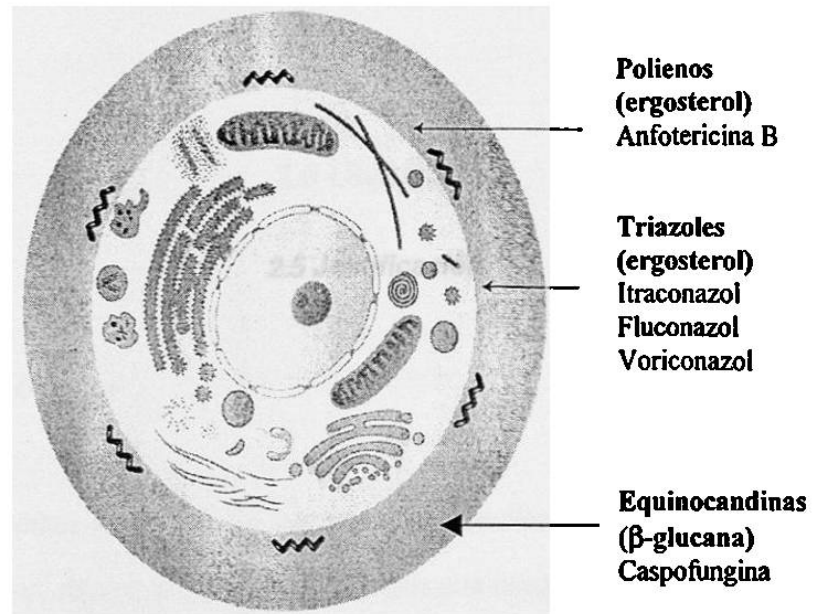


Figura 1.- Imagen representativa de la zona de acción de los medicamentos con los que actualmente se cuenta para el tratamiento de las micosis sistémicas.

## **2.5 Justificación**

Debido a las serias limitaciones de los medicamentos actuales, y al hecho de que las plantas contienen miles de constituyentes que son una muy importante fuente de moléculas nuevas y biológicamente activas, se considera importante la búsqueda de actividad antifúngica en extractos de plantas empleadas en la medicina tradicional.

## **2.6 Objetivos**

### **2.6.1 Objetivo General**

Evaluar la actividad antifúngica de los extractos obtenidos de plantas regionales contra *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Histoplasma capsulatum* y *Coccidioides immitis*.

### **2.6.2 Objetivos Específicos**

1. Seleccionar 15 plantas de la región Noreste de México para evaluar actividad antifúngica mediante pruebas de susceptibilidad *in vitro*.
2. Obtener los extractos hidroalcohólicos de las plantas seleccionadas.
3. Evaluar la actividad antifúngica mediante pruebas de susceptibilidad *in vitro*.
4. Realizar extracción diferencial a los extractos hidroalcohólicos activos.
5. Evaluar actividad antifúngica mediante pruebas de susceptibilidad *in vitro* a los extractos obtenidos mediante extracción diferencial.
6. Evaluar toxicidad de los extractos que resulten activos.

## Capítulo III

### Material y Métodos

#### 3.1 Material, reactivos y equipos

##### 3.1.1 Material Biológico

Lista de plantas colectadas en el ejido “El Potrero” perteneciente al municipio de Villaldama, N. L. el día 13 de Noviembre de 2003.

Parte aérea de *Colubrina greggii* (Colubrina)

Parte aérea de *Rivina humilis* (Rivina)

Parte aérea de *Solanum rostratum* (Mala Mujer)

Parte aérea de *Salvia texana* (Salvia)

Parte aérea de *Acacia farnesiana* (L) Willd (Huizache)

Parte aérea de *Euphorbia prostrata* (Golondrina)

Parte aérea de *Clematis drummondii* (Barba de chivo hembra)

Parte aérea de *Clematis drummondii* (Barba de chivo macho)

Parte aérea de *Bougainvillea glabra* (Bugambilia)

Parte aérea de *Hedeoma drummondii* (Poleo)

Parte aérea de *Heliotropium angiospermum* (Cola de escorpión)

Raíz de *Jatropha dioica* (Sangre de Drago)

Lista de plantas colectadas en la carretera Monterrey-Saltillo el día 7 de Octubre de 2003:

Parte aérea de *Leucophyllum frutescens* (Cenizo)

Parte aérea de *Cordia boissieri* (Anacahuita)

Parte aérea de *Schinus molle* (Pirúl)

Lista de cepas fúngicas que fueron proporcionadas por el Laboratorio del departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L.

Cepa 501 *Candida albicans*

Cepa 498, *Candida albicans*

Cepa 434, *Aspergillus fumigatus*

Cepa 514, *Aspergillus fumigatus*

Cepa 1526, *Histoplasma capsulatum*

Cepa 99-1591, *Histoplasma capsulatum*

Cepa 168, *Coccidioides immitis*

Cepa 167, *Coccidioides immitis*

Huevecillos de *Artemia salina* Great Lake

### **3.1.2 Material**

Tubos de ensaye Pyrex® de 16 mm X 150 mm con tapón de rosca

Tubos Pyrex® 13 mm X 100 mm con tapa de rosca.

Tubos de vidrio de 30 mL con tapa de rosca

Tubos de fondo redondo de poliestireno 12 x 75 mm (5 mL) FALCON® 352054

Frascos Pyrex® de 100 mL con tapa de rosca.

Frascos Pyrex® de 30 mL con tapa de rosca.

Matraz bola con boca esmerilada Pyrex® 24/40 con capacidad de 250 mL

Matraz quitazato 1 L

Matraz de aforación 1 L

Vasos de precipitado 10 mL

Microtubos Eppendorf® de 1.5 mL

Pipeta lineal de 10 mL

Pipeta volumétrica de 5 mL

Pipeta volumétrica de 2 mL

Pipetas pasteur

Pipeta automática Wilson® de 100 a 1000 µL

Pipeta automática Wilson® de 20 a 200 µL

Puntillas de 200 µL para pipeta automática

Puntillas de 1000 µL para pipeta automática

Puntillas con filtro de 200 µL BIOzym budget line

Puntillas con filtro de 1000 µL BIOzym budget line

Bulbo para pipeta Pasteur

Bulbo para pipeta lineal

Embudo de filtración rápida

Embudo Hirsch

Cronómetro

Probeta 100 mL

Parafilm®

Microplacas de 96 pozos Corning Incorporated Costar® 3799

Filtro ACRODISC 13 No. 4454 (0.2 µm) Gelman Sciences

Filtro CA (acetato de celulosa), para 500 mL (0.22  $\mu\text{m}$ ) CORNING 430769

Papel filtro

Papel aluminio

Membrana de nylon 0.45 $\mu\text{m}$ , 47 mm, Pall Life science

Mechero

Agitador

Espátula acanalada

Aplicadores de madera

Almohadillas de algodón

Jeringas estériles desechables con aguja ultra-fina 3 mL (21G X 32 mm) PLASTIPAK®

Marcador indeleble de secado rápido

Gradillas

Cámara de incubación, con división y comunicado por la parte inferior

Lámpara de luz blanca

Guantes 100% latex natural PROTEC

Cubre bocas

Cubre bocas respirador N95, modelo 1930 SURVIVAIR

Bata quirúrgica

Lentes de seguridad

### **3.1.3 Reactivos y solventes**

Etanol grado analítico CTR®

Metanol grado analítico CTR®

Butanol grado analítico CTR®

Acetato de etilo grado analítico CTR®

Hexano grado analítico CTR®

DMSO grado analítico Merck-Schuchardt®

Glutaraldehído al 2% DERMO DEX<sup>MR</sup> DEGASA, SA DE CV.

Solución salina 5%

Sal de mar (Instant ocean)

Agua bidestilada

Agua destilada

Nitrógeno gas de alta pureza, AGA®

Medio RPMI 1640 con L-glutamina, con solución amortiguadora de morfolino 165 nM, sin bicarbonato, No. R63165, ANGUS Buffers&Biochemicals

Placas de Agar Sabouraud Merck®

Fluconazol Pfizer®

### **3.1.4 Equipos**

Licuada Man modelo LMU-9090

Balanza analítica Ohaus® Analytical Plus

Balanza Granataria OHAUS® SC6010

Vortex Mixer Cat S8223, American Scientific products

Pulse vortex Glass-Col®

Agitador Hidolth instrument Unimax 1010

Rotavapor BÜCHI modelo 461 con baño de agua BÜCHI RE 121

Rotavapor-R BÜCHI® con baño de agua HB4 Basic Kika Labortechnik®

Incubadora Sabil-Therm® Blue M Electric company

Incubadora modelo IS81 American Scientific Products, American Gold Series®



Espectrofotómetro Beckman modelo 340

Campana de bioseguridad tipo II Labconco

Campana de bioseguridad tipo II Labconco en cuarto de contención

Bomba de vacío Welch 1400 Duo Seal®

## **3.2 Métodos**

### **3.2.1 Selección y Preparación de material biológico**

La recolección de las plantas se realizó con el apoyo del Biólogo Humberto Sánchez, quién contribuyó a la localización e identificación de las mismas. El material fue cuidadosamente seleccionado bajo la aplicación del criterio etnofarmacológico y quimiotaxonómico; una vez colectado se dejó secar por un período de dos semanas en una habitación a temperatura ambiente, posteriormente se procedió a fraccionar manualmente el material; los especímenes se molieron hasta apariencia polvosa.

### **3.2.2 Obtención de los extractos hidroalcohólicos.**

Se procedió a realizar la extracción con solución hidroalcohólica de etanol:agua (90:10), de 50 g de material pulverizado de cada una de los especímenes. La solución fue preparada justo antes de utilizarla (27).

La extracción se realizó a temperatura ambiente, con un volumen total de solvente de 600 mL, velocidad de extracción de 160 rpm, 3 extracciones de una hora cada una. Posteriormente el solvente fue decantado sobre un papel filtro en un embudo de filtración rápida, el filtrado se llevó a sequedad en un rotavapor. Éste fue el extracto primario. Los extractos ya secos fueron recuperados con una pequeña cantidad de metanol y depositados en frascos color ámbar con tapa de rosca previamente tarados. El metanol se dejó evaporar en la estufa a 25°C y por último se guardó en atmósfera de Nitrógeno.

### ***3.2.3 Extracción diferencial de los extractos hidro-alcohólicos activos.***

Para obtener los extractos secundarios se utilizaron solventes de tres distintas polaridades, hexano (solvente no polar), acetato de etilo (medianamente polar) y butanol (solvente polar).

Se pesaron 4 g de cada uno de los extractos activos y se resuspendieron en solución hidroalcohólica, etanol:agua (90:10), para posteriormente hacer cuatro extracciones con 50 mL de cada uno de los solventes, en un embudo de separación líquido-líquido; primero se realizó la extracción con hexano, después con acetato de etilo y por último con butanol. El volumen total de cada uno de los solventes utilizado fue de 200 mL.

Los extractos obtenidos, fueron llevados a sequedad mediante el empleo de un rotavapor a una temperatura de 28°C y recuperados con metanol en pequeños frascos que fueron previamente tarados. El metanol se dejó evaporar en una estufa a una temperatura de 25°C y se guardó en atmósfera de Nitrógeno.

### **3.2.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana.**

Se trabajó siguiendo el método descrito por el protocolo M27-A2 del NCCLS para las levaduras y el protocolo M38P del NCCLS para los hongos filamentosos.

#### **3.2.4.1 Preparación del medio**

Se utilizó medio RPMI 1640 con L-glutamina, con solución amortiguadora de morfolino 165 nM, sin bicarbonato. Filtro CA (acetato de celulosa), para 500 mL (0.22 µm) CORNING

#### **3.2.4.2 Preparación de inóculos**

##### **3.2.4.2.1 *Candida albicans***

Se sembró en agar Sabraud y se incubó por un período de 24 horas, a una temperatura de 35°C, para obtener un cultivo joven.

Se hizo una suspensión de levaduras en la solución salina, esta suspensión se ajustó a una transmitancia de 85% a 530 nm. Se realizó una dilución 1:100 en solución salina y luego una dilución 1:20 en medio RPMI 1640, esta última fué la suspensión de trabajo, la cual tenía una concentración de  $10^3$  UFC/mL

#### **3.2.4.2.2 *Aspergillus fumigatus***

Se sembró en agar Sabouraud y se incubó por un período de 7 días, a una temperatura de 35°C para obtener un cultivo joven.

Se hizo una suspensión concentrada en la solución salina y se ajustó a una transmitancia de 81% a 530 nm. Se realizó una dilución 1:50 en medio RPMI 1640 y esta última fué la suspensión de trabajo, con una concentración de  $10^4$  UFC/mL.

#### **3.2.4.2.3 *Histoplasma capsulatum***

Se sembró en agar Sabouraud y se incubó por un período de 15 a 21 días, a una temperatura de 30°C.

Se hizo una suspensión concentrada en solución salina, para posteriormente preparar una suspensión ajustada a una transmitancia de 95% a 530 nm. Se realizó una dilución 1:10 en medio RPMI 1640 y esta última fué la suspensión de trabajo, con una concentración de  $10^4$  UFC/mL.

#### **3.2.4.2.4 *Coccidioides immitis***

Se sembró en agar Sabouraud y se incubó por un período de 10 días, a una temperatura de 37°C.

Se obtuvo una suspensión concentrada en solución salina, y se ajustó a una transmitancia de 95% a 530 nm. Se realizó una dilución 1:10 en medio RPMI 1640 y esta última fué la suspensión de trabajo, con una concentración de  $10^4$  UFC/mL.

### **3.2.5 Bioensayos**

#### **3.2.5.1 Micro dilución**

Para los ensayos en micro dilución se pesaron 5.6 mg de cada extracto y se resuspendieron en 700  $\mu$ L, se realizaron diluciones seriadas, para obtener un rango de concentraciones de 31.25  $\mu$ g/mL a 1000  $\mu$ g/mL.

Para los extractos secundarios se pesaron 1.4 mg de cada extracto para su posterior resuspensión en 700  $\mu$ L. De esta solución se hicieron cinco diluciones seriadas obteniendo así un rango de concentraciones de 15.62  $\mu$ g/mL a 250  $\mu$ g/mL.

En cada pocillo de la placa se depositaron 100  $\mu$ L de medio RPMI1640. En el pocillo de concentración mayor se adicionaron 100  $\mu$ L de la solución de extracto, para de ahí pasar 100  $\mu$ L al siguiente pocillo, de ahí se pasaron 100  $\mu$ L al siguiente y así sucesivamente para obtener diluciones seriadas con cinco distintas concentraciones, las cuales para los extractos hidroalcohólicos quedaron en un rango de 1000 a 63  $\mu$ g/mL mientras que para los extractos diferenciales fué de 250 a 16  $\mu$ g/mL. A cada pocillo se agregaron 100  $\mu$ L de suspensión de trabajo y se incubó. Se trabajaron dos cepas diferentes para cada hongo y cada una de ellas por duplicado.

### **3.2.5.2 Macro dilución.**

Para los ensayos en macro dilución se pesaron 14 mg de cada extracto para resuspender en 700  $\mu\text{l}$ , se realizaron diluciones seriadas para obtener un rango de concentraciones de 31.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Para los extractos secundarios se pesaron 1.4 mg de cada extracto para su posterior resuspensión 700  $\mu\text{l}$ . De esta solución se obtuvieron cinco diluciones seriadas con rango de concentración de 15.62  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

En cada tubo se depositaron 100  $\mu\text{L}$  de medio RPM11640. En el tubo de concentración mayor se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de la solución de extracto, para de ahí pasar 100  $\mu\text{L}$  al tubo siguiente y así obtener diluciones seriadas en los siguientes tubos. A cada tubo se agregaron 900  $\mu\text{L}$  de suspensión de trabajo y se incubó. Se trabajaron dos cepas distintas para cada hongo y cada una de ellas por duplicado.

### **3.2.6 Ensayos de toxicidad.**

Se preparó agua de mar, para lo cual se pesaron 38 g de sal de mar que fueron disueltos en agua destilada, aforados a un litro y filtrado con vacío.

La cámara de incubación se llenó con agua de mar y en el lado oscuro de la cámara fueron depositados los huevecillos de *Artemia salina*, la cámara fue colocada bajo la luz blanca de una lámpara. Se incubó a temperatura ambiente por un período de

48 horas en el cual las larvas ya maduras pasan por debajo de la división de la cámara hacia el lado de la luz.

Se pesaron 20 mg de cada extracto y se disolvieron en 2 mL de etanol para de esta solución pasar las cantidades adecuadas para obtener concentraciones de 10, 100 y 1000 ppm en vasitos de precipitado de 10 mL.

En cada vaso de precipitado con el extracto, se colocaron 10 larvas y se completó un volumen de 5 mL.

## **Capítulo IV**

### **Resultados**

#### **4.1 Selección de las plantas**

La selección de las plantas se realizó en base a criterios quimiotaxonómicos en algunos casos y etnofarmacológicos en otros. El nombre científico de las especies fue corroborado por la M. C. María del Consuelo González de la Rosa, encargada del laboratorio de fanerógamas, y el Biólogo Marco Antonio Guzmán Lucio, los especímenes fueron comparados con los del Herbario Institucional de la Facultad de Ciencias Biológicas (UNL) de la Universidad Autónoma de Nuevo León, por lo cual se anexan los números de folio de los especímenes cotejados por especie (ver tabla I).



**Tabla I . Nombre científico y nombre común de las plantas seleccionadas con el número de folio cotejado por especie.**

Nombre científico	Nombre común	Folio
1) <i>Acacia farnesiana</i>	Huizache	19593
2) <i>Heliotropium angiospermum</i>	Cola de espcorpión	23124
3) <i>Rivina humilis</i>	Rivna	23371
4) <i>Euphorbia prostrata</i>	Golondrina	13950
5) <i>Hedeoma drummondii</i>	Poleo	23782
6) <i>Bougainvillea glabra</i>	Bugambilia	23636
7) <i>Solanum rostratum</i>	Mala mujer	7146
8) <i>Salvia texana</i>	Salvia	22298
9) <i>Leucophyllum frutescens</i>	Cenizo	18419
10) <i>Cordia boissieri</i>	Anacahuita	24167
11) <i>Schinus molle</i>	Pirúl	24166
12) <i>Colubrina greggii</i>	Colubrina	12284
13) <i>Clematis drummondii</i> "Hembra"	Barba de chivo	19390
14) <i>Clematis drummondii</i> "Macho"	Barba de chivo	19390
15) <i>Jatropha dioica</i>	Sangre de drago	24077

#### **4.2. Porcentajes de recuperación de los extractos hidro-alcohólicos**

En la tabla II se presentan los porcentajes de recuperación obtenidos de los extractos hidro-alcohólicos en g/100g.

**Tabla II. Porcentajes de recuperación obtenidos para los extractos hidroalcohólicos.**

Porcentaje de Recuperación	
g/100g	
1) <i>Acacia farnesiana</i>	7.8
2) <i>Heliotropium angiospermum</i>	6.8
3) <i>Rivina humilis</i>	8.0
4) <i>Euphorbia prostrata</i>	9.4
5) <i>Hedeoma drummondii</i>	4.0
6) <i>Bougainvillea glabra</i>	6.3
7) <i>Solanum rostratum</i>	9.6
8) <i>Salvia texana</i>	9.5
9) <i>Leucophyllum frutescens</i>	10.8
10) <i>Cordia boissieri</i>	9.4
11) <i>Schinus molle</i>	24.2
12) <i>Colubrina greggii</i>	13.2
13) <i>Clematis drummondii</i> "Hembra"	8.4
14) <i>Clematis drummondii</i> "Macho"	12.6
15) <i>Jatropha dioica</i>	1.5

#### **4.3. Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos hidroalcohólicos.**

En la tabla III se muestran los resultados de la evaluación de la actividad antifúngica de los extractos hidroalcohólicos obtenidos frente a *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Coccidioides immitis* e *Histoplasma capsulatum*.

#### 4.4 Extracción diferencial

En la tabla IV se presentan los porcentajes de recuperación en g/100g para cada una de los extractos diferenciales obtenidos con hexano, acetato de etilo y butanol.

**Tabla III. Concentración mínima inhibitoria de los extractos hidroalcohólicos frente a *C. albicans*, *A. fumigatus*, *C. immitis* e *H. Capsulatum*.**

Extracto hidroalcohólico				
CMI en µg/mL				
Planta	<i>C. albicans</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>C. immitis</i>	<i>H. capsulatum</i>
1) <i>Acacia farnesiana</i>	>1000	>1000	>1000	500
2) <i>Heliotropium angiospermum</i>	>1000	>1000	>1000	500
3) <i>Rivina humilis</i>	>1000	>1000	>1000	1000
4) <i>Euphorbia prostrata</i>	63	>1000	500	500
5) <i>Hedeoma drummondii</i>	>1000	>1000	>1000	500
6) <i>Bougainvillea glabra</i>	>1000	>1000	500	>1000
7) <i>Solanum rostratum</i>	>1000	>1000	>1000	1000
8) <i>Salvia texana</i>	125	500	63	63
9) <i>Leucophyllum frutescens</i>	>1000	>1000	>1000	250
10) <i>Cordia boissieri</i>	>1000	>1000	>1000	125
11) <i>Schinus molle</i>	>1000	>1000	500	250
12) <i>Colubrina greggii</i>	125	>1000	>1000	125
13) <i>Clematis drummondii</i> "Hembra"	250	500	1000	250
14) <i>Clematis drummondii</i> "Macho"	500	>1000	125	500
15) <i>Jatropha dioica</i>	500	>1000	>1000	1000
Fluconazol	4	16	8	4

**Tabla IV. Porcentaje de recuperación obtenido para cada uno de los extractos secundarios.**

Extracción Secundarios			
Porcentaje de Recuperación (g/100g)			
Planta	H	AE	B
4) <i>Euphorbia prostrata</i>	26.64	30.65	19.74
6) <i>Bougainvillea glabra</i>	8.09	17.73	10.83
8) <i>Salvia texana</i>	14.85	25.78	18.80
9) <i>Leucophyllum frutescens</i>	13.59	45.81	15.65
10) <i>Cordia boissieri</i>	16.67	15.23	35.48
11) <i>Schinus molle</i>	18.00	15.02	28.08
12) <i>Colubrina greggii</i>	9.60	9.05	7.33
13) <i>Clematis drummondii</i> "Hembra"	21.06	10.22	25.37
14) <i>Clematis drummondii</i> "Macho"	4.37	11.57	42.35
15) <i>Jatropha dioica</i>	17.24	29.65	16.74

H = Hexano  
 AE = Acetato de Etilo  
 B = Butanol

#### 4.5 Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos secundarios.

Para llevar a cabo la selección de extractos hido-alcohólicos que fueron sometidos a la extracción diferencial, en lo referente al ensayo de *Candida albicans* se planteo un punto de corte de 500 µg/ml ya que este es el que se maneja en la mayoría de los artículos que trabajan *C. albicans* frente a extractos crudos de plantas, mientras que para *Aspergillus fumigatus*, *Histoplasma capsulatum* y *Coccidioides immitis* no se ha encontrado en la bibliografía revisada hasta el momento trabajos de este tipo en los que se incluyan estos hongos, por lo cual, para *A. fumigatus* y *C. immitis* se planteo un punto de corte de 500µg/ml, mientras que pasa *H. capsulatum* al ser 14 los extractos que

presentaron actividad y varios de ellos en concentración menor de 500 µg/ml se planteo un punto de corte de 250 µg/ml.

#### 4.5.1 Bioensayos con *Candida albicans*

En la tabla V aparecen los resultados de la evaluación de la actividad antifúngica de los extractos secundarios obtenidos de los extractos primarios seleccionados de acuerdo con el punto de corte establecido.

**Tabla V. CMI de los extractos secundarios frente a *C. albicans*.**

Extractos Secundarios				
CMI en µg/mL				
<i>Candida albicans</i>				
Planta	Primario	H	AE	B
4) <i>Euphorbia prostrata</i>	63	>250	16	31
8) <i>Salvia texana</i>	125	63	63	125
12) <i>Colubrina greggii</i>	125	250	63	63
13) <i>Clematis drummondii</i> "Hembra"	250	250	125	>250
14) <i>Clematis drummondii</i> "Macho"	500	250	250	>250
15) <i>Jatropha dioica</i>	500	>250	250	>250

Primario = Extracto Hidroalcohólico  
H = Hexano  
AE = Acetato de Etilo  
B = Butanol

#### 4.5.2 Bioensayos con *Aspergillus fumigatus*

En la tabla VI aparecen los resultados obtenidos mediante la evaluación de la actividad antifúngica, contra *A. fumigatus*, de los extractos secundarios obtenidos de los extractos primarios seleccionados de acuerdo con el punto de corte establecido.

**Tabla VI. CMI de los extractos secundarios frente a *A. fumigatus*.**

Extractos Secundarios				
CMI en µg/mL				
<i>Aspergillus fumigatus</i>				
	Primario	H	AE	B
8) <i>Salvia texana</i>	500	63	125	250
13) <i>Clematis drummondii</i> "Hembra"	500	>250	250	>250

Primario = Extracto Hidroalcohólico

H = Hexano

AE = Acetato de Etilo

B = Butanol

#### 4.5.3 Bioensayos con *Coccidioides immitis*

En la tabla VII aparecen los resultados obtenidos, para los extractos secundarios obtenidos de los extractos primarios seleccionados de acuerdo con el punto de corte establecido, en la evaluación de la actividad frente a *C. immitis*.

**Tabla VII. CMI de los extractos secundarios frente a *C. immitis*.**

Extractos Secundarios				
CMI en µg/mL				
<i>Coccidioides immitis</i>				
Planta	Primario	H	AE	B
4) <i>Euphorbia prostrata</i>	500	250	250	>250
6) <i>Bougainvillea glabra</i>	500	>250	>250	>250
8) <i>Salvia texana</i>	63	32	16	63
11) <i>Schinus molle</i>	500	>250	>250	>250
13) <i>Clematis drummondii</i> "Hembra"	1000	>250	>250	>250
14) <i>Clematis drummondii</i> "Macho"	125	>250	>250	>250

Primario = Extracto Hidroalcohólico

H = Hexano

AE = Acetato de Etilo

B = Butanol

#### 4.5.4 Bioensayos con *Histoplasma capsulatum*

En la tabla VIII aparecen los resultados obtenidos, para los extractos secundarios obtenidos de los extractos primarios seleccionados de acuerdo con el punto de corte establecido, en la evaluación de la actividad frente a *H. capsulatum*.

**Tabla VIII. CMI de los extractos secundarios frente a *H. capsulatum*.**

Extractos Secundarios				
CMI en µg/mL				
<i>Histoplasma capsulatum</i>				
Planta	Primario	H	AE	B
8) <i>Salvia texana</i>	63	31	16	31
9) <i>Leucophyllum frutescens</i>	250	125	16	250
10) <i>Cordia boissieri</i>	125	31	63	>250
11) <i>Schinus molle</i>	250	125	125	63
12) <i>Colubrina greggii</i>	125	250	>250	>250
13) <i>Clematis drummondii</i> "Hembra"	250	125	16	>250

Primario = Extracto Hidroalcohólico

H = Hexano

AE = Acetato de Etilo

B = Butanol

#### 4.6 Evaluación de toxicidad.

En la tabla IX aparecen los resultados de los ensayos de letalidad con *Artemia salina*. para cada uno de los extractos secundarios que presentaron mayor actividad contra por lo menos uno de los hongos con su respectiva concentración letal media y su intervalo de confianza con un 95%.



Tabla IX. Toxicidad de los extractos secundarios de mayor actividad

<i>Euphorbia prostrata</i>		
Solvente	CL <sub>50</sub> (µg/mL)	IC (95)
Hexano	ND	NC
Acetato de etilo	2225,1	432.4 - 23124346
Butanol	239603808	NC

<i>Salvia texana</i>		
Solvente	CL <sub>50</sub> (µg/mL)	IC (95)
Hexano	ND	NC
Acetato de etilo	ND	NC
Butanol	ND	NC

<i>Leucophyllum frutescens</i>		
Solvente	CL <sub>50</sub> (µg/mL)	IC (95)
Hexano	66,6	41,7-106,2
Acetato de etilo	92,8	NE
Butanol	4531,3	1231,6-1101880

<i>Cordia boisieri</i>		
Solvente	CL <sub>50</sub> (µg/mL)	IC (95)
Hexano	ND	NC
Acetato de etilo	681,6	401,3-1462,6

<i>Schinus molle</i>		
Solvente	CL <sub>50</sub> (µg/mL)	IC (95)
Hexano	393	227,5-773,7
Acetato de etilo	ND	NC
Butanol	ND	NC

<i>Colubrina greggii</i>		
Solvente	CL <sub>50</sub> (µg/mL)	IC (95)
Hexano	229,7	131.7 - 428.1
Acetato de etilo	2442,3	10.68.9 - 68607.5
Butanol	4096,9	967.6 - 1265870.6

<i>Clematis drummondii "hembra"</i>		
Solvente	CL <sub>50</sub> (µg/mL)	IC (95)
Hexano	566,1	NC
Acetato de etilo	ND	NC
Butanol	ND	NC

Tabla IX. Continuación

<i>Clematis drummondii</i> "macho"		
Solvente	CL <sub>50</sub> (µg/mL)	IC (95)
<i>Hexano</i>	ND	NC
<i>Acetato de etilo</i>	ND	NC
<i>Butanol</i>	ND	NC

<i>Jatropha dioica</i>		
Solvente	CL <sub>50</sub> (µg/mL)	IC (95)
<i>Hexano</i>	ND	NC
<i>Acetato de etilo</i>	ND	NC

CL<sub>50</sub> = concentración letal media  
 IC (95) = intervalo de confianza 95%  
 NC = No calculado  
 ND = No detectado

## Capítulo V

### Discusión

La selección de las plantas se realizó bajo criterios etnofarmacológicos y quimiotaxonómicos. Para el primer criterio, se efectuó una búsqueda bibliográfica de las plantas empleadas para afecciones de las vías respiratorias en la medicina tradicional y que pudieran ser encontradas en el Noreste de México. Con este propósito se consultaron algunas páginas de internet (32, 33, 34, 35), así como también se hizo una revisión de artículos de distintas revistas científicas (29, 36, 37) y de un catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas Mexicanas. De esta forma, en base al criterio etnofarmacológico se seleccionaron *Rivina humilis*, *Solanum rostratum*, *Schinus molle*, *Clematis drummondii* "macho", *Clematis drummondii* "hembra", *Cordia boissieri*, *Leucophyllum frutescens*, *Hedeoma drummondii* y *Bougainvilleae glabra*.

Para el segundo criterio, se contó con la valiosa orientación de los biólogos Humberto Sánchez Vega y M. C. Mauricio González Ferrara, quienes opinaron cuáles plantas empleadas en la medicina tradicional pudieran presentar actividad antifúngica, qué parte de la planta se utiliza, cuáles de ellas se pueden localizar en la zona de interés, los lugares exactos donde se pueden localizar y las fechas óptimas para su recolección. De esta forma, bajo este criterio se seleccionaron *Acacia farnesiana*, *Heliotropium angiospermum*, *Salvia texana*, *Euphorbia prostrata*, *Colubrina greggii* y *Jatropha dioica*.

En la extracción primaria se utilizó una mezcla etanol:agua, en base a estudios previos realizados por Orozco Hayek y cols. (27); quien reportó un mayor porcentaje de recuperación, además de que con esta mezcla de solventes se obtienen compuestos de un amplio rango de polaridades.

Si se analizan los porcentajes de recuperación obtenidos para los extractos hidro-alcohólicos (tabla II), se puede apreciar que el menor porcentaje de recuperación se obtuvo con *Jatropha dioica* (1.57%), mientras que el mayor porcentaje de recuperación se obtuvo con *Schinus molle* (24.2%). Cabe aclarar que a las primeras catorce plantas se les realizó la extracción de la parte aérea mientras que para la planta quince (*Jatropha dioica*) se utilizó la raíz, debido a que ésta es la parte que la gente utiliza como remedio tradicional.

Los extractos hidro-alcohólicos se sometieron a bioensayos de actividad antifúngica, en la tabla III aparece la concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada uno de los extractos reportadas en  $\mu\text{g/mL}$  para cada uno de los hongos que se trabajaron. La CMI fue valorada a un 80% de inhibición de crecimiento respecto del control de cada una de las cepas. R. Fenner y cols. (30) reportaron la actividad de extractos obtenidos de especies de *Hypericum* contra levaduras y hongos filamentosos considerados patógenos oportunistas como *Candida albicans* y *Aspergillus fumigatus*; estos autores trabajaron con el método de dilución en agar en un rango de concentración de 0.25 a 1000  $\mu\text{g/mL}$ ; por esta razón el rango de concentraciones que se analizaron en el presente trabajo fue de 63 a 1000  $\mu\text{g/mL}$ .

Por otra parte, *Candida albicans* fue sensible a seis extractos hidro-alcohólicos que mostraron actividad en un rango de concentraciones entre 63 a 500  $\mu\text{g/mL}$ . En este trabajo se estableció un punto de corte de 500  $\mu\text{g/mL}$  para *C. Albicans*, en base al trabajo reportado por Kanyanga Cimanga y cols. (28). En dicho trabajo se analizaron extractos

hidro-alcohólicos (etanol:agua) de *Cryptolepis sanguinolenta* contra bacterias entre las cuales se incluía a *Candida albicans*; ellos consideraron una CMI de 500µg/mL como poca actividad del extracto frente a esta levadura. Los extractos hidro-alcohólicos de *Euphorbia prostrata*, *Salvia texana*, *Colubrina greggii*, *Clematis drummondii* "hembra", *Clematis drummondii* "macho" y *Jatropha dioica* fueron considerados como activos frente a *C. albicans*, y se seleccionaron para realizar una extracción diferencial.

Por otro lado, Victor Navarro y cols. (29) evaluaron extractos hexánicos, clorofórmicos y metanólicos de *Bougainvillea glabra* contra *C. albicans* y agregaron el extracto de la planta al agar Sabourad 4% agar dextrosa fundido en placas Petri, para obtener concentraciones de 0.625 a 5.0 mg/mL. Posteriormente, prepararon una suspensión de 10<sup>6</sup> UFC, el inóculo se aplicó con un asa calibrada (0.002 mL), las placas se incubaron 24 horas a 37°C. Estos autores reportaron una CMI mayor a 5 mg/mL para los tres extractos; estos resultados concuerdan con los obtenidos en el presente trabajo (una CMI superior a 1000 µg/mL), a pesar de haber realizado el ensayo bajo condiciones diferentes.

En la tabla V, se muestran los resultados obtenidos con los extractos secundarios contra *C. albicans*. El rango de concentraciones evaluados fue de 250 a 16 µg/mL, valoradas a un 80 % de inhibición respecto del control a las 24 horas de incubación. Si comparamos estas CMI con las obtenidas en los extractos primarios, *Euphorbia prostrata* aumentó su actividad en el extracto butanólico y ésta aumentó aun más en el extracto de acetato de etilo con una CMI de 16 µg/mL; con los extractos secundarios de *Salvia texana*, se obtuvo una menor CMI en el extracto no polar y medianamente polar, siendo ésta de 63 µg/mL. En lo referente a *Colubrina greggii*, la mayor actividad se concentró en los extractos obtenidos con acetato de etilo y butanol llegando a ser de 63 µg/mL. Cabe mencionar que para los extractos de *Clematis drummondii* "hembra" la fracción más activa fue la medianamente polar ya que en esta la actividad aumentó a 125 µg/mL,

mientras que en resultados obtenidos con los extractos de *Clematis drummondii* "macho", la CMI disminuyó en las fracciones obtenidas con hexano y acetato de etilo a 250 µg/mL. En lo referente a *Jatropha dioica* los compuestos activos quedaron concentrados en la fracción medianamente polar con una actividad de 250 µg/mL.

Solo dos extractos hidro-alcohólicos presentaron actividad contra *Aspergillus fumigatus*, ambos con una actividad de 500 µg/mL. R. Fenner y cols. (30) reportaron la extracción con metanol de especies de *Hypericum*, y extracción diferencial de este extracto (éter de petróleo, cloroformo y metanol); evaluaron la actividad contra levaduras y hongos filamentosos oportunistas entre los cuales se incluyó a *Aspergillus fumigatus*. El ensayo se realizó con el método de dilución en agar y determinaron una CMI de 500 y 250 µg/mL. En base a estos resultados se estableció el punto de corte para *A. fumigatus* en 500 µg/mL. De acuerdo a esto, los extractos hidroalcohólicos de *Salvia texana* y *Clematis drummondii* "hembra" fueron considerados como activos, y se seleccionaron para realizar una extracción diferencial.

Los resultados obtenidos de la actividad de los extractos secundarios para *Aspergillus fumigatus* se presentan en la tabla VI con las CMI en µg/mL, valoradas a un 80 % de inhibición respecto del control a las 48 horas de incubación; el rango de concentraciones que se analizó fue de 250 a 16 µg/mL. *Salvia texana* presentó una marcada disminución en la CMI de la fracción no polar (hasta 63 µg/mL), en comparación con la CMI obtenida para el extracto primario; mientras que en los extractos butanólico y de acetato de etilo, la CMI fue de 250 y 125 µg/mL respectivamente. Por otro lado, se puede decir que los compuestos activos del extracto de *Clematis drummondii* "hembra" mostraron un carácter medianamente polar al disminuir su CMI en esta fracción a 250 µg/mL.

Contra *Coccidioides immitis*, fueron seis los extractos hidro-alcohólicos que presentaron actividad en un rango de concentraciones de 125 a 1000 µg/mL. No se encontró ningún reporte en el que se evalúe la actividad de extractos crudos de plantas contra este hongo, por lo cual se decidió establecer el punto de corte igual que para los hongos anteriores en 500 µg/mL. De esta forma los extractos de *Euphorbia prostrata*, *Bougainvillea glabra*, *Salvia texana*, *Schinus molle*, *Clematis drummondii* "hembra" y *Clematis drummondii* "macho", fueron considerados activos y seleccionados para una extracción diferencial (tabla VII). El extracto hidroalcohólico de *Clematis drummondii* "hembra" que presentó una actividad de 1000 µg/mL, se incluyó en la extracción diferencial debido a que presentó actividad contra el resto de los hongos incluidos en el trabajo.

Las CMI de los extractos secundarios expresadas en µg/mL, a un 80% de inhibición respecto del control a las 72 horas de incubación de *Coccidioides immitis* se muestran en la tabla VII; el rango de concentraciones probado fue de 250 a 16 µg/mL. En esta tabla, podemos ver que el extracto de *Euphorbia prostrata* aumentó su actividad a 250 µg/mL en los extractos hexánico y de acetato de etilo. En los extractos diferenciales de *Bougainvillea glabra* no se observó aumento en la actividad. Para *Salvia texana* la actividad aumentó en dos extractos diferenciales presentando su mayor actividad en el extracto obtenidos con acetato de etilo. Los extractos de *Schinus molle*, *Clematis drummondii* "hembra" y *Clematis drummondii* "macho" adoptaron la misma conducta que los obtenidos con *Bougainvillea glabra*; ya que la actividad de los tres quedó por arriba de los 250 µg/mL. Esto pudiera deberse a que el o los compuestos activos se volatilizaron y se perdieron, o se degradaron, o bien la actividad en el extracto primario se debía a un efecto de sinergismo.

En lo referente a *Histoplasma capsulatum*, fueron catorce los extractos hidro-alcohólicos que presentaron actividad frente a este hongo en un rango de

concentraciones que va de 125 a 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (ver tabla III). No se encontró en la bibliografía revisada algún artículo en el que se evaluara la actividad de extractos crudos de plantas frente a este patógeno; por esta razón y en consideración a que se encontró un número importante de extractos activos, se estableció el punto de corte en 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Así los extractos de *Salvia texana*, *Leucophyllum frutescens*, *Cordia boissieri*, *Schinus molle*, *Colubrina greggii* y *Clematis drummondii* "hembra" fueron considerados como activos.

Las CMI de los extractos secundarios expresadas en  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , con un 80% de inhibición respecto del control a las 120 horas de incubación de *Histoplasma capsulatum*, aparecen en la tabla VIII. El rango de concentraciones de los extractos fue de 250 a 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . En esta tabla podemos apreciar cómo el extracto de *Salvia texana* aumentó su actividad en los extractos de hexano y butanol, mientras que aumentó aún más su actividad en el extracto de acetato de etilo, siendo esta de 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Podemos decir que en los extractos de *Leucophyllum frutescens*, la mayoría de los compuestos responsables de la actividad antifúngica se concentraron en la fracción obtenida con acetato de etilo con una CMI de 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Para *Cordia boissieri*, su CMI disminuyó en la fracción de acetato de etilo mientras que la fracción más activa fue la de hexano con una actividad de 31  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . En lo referente a *Schinus molle* se observó un aumento de la actividad en las fracciones obtenidas con hexano y acetato de etilo, y por otro lado se observó una marcada disminución en la CMI en la fracción de butanol (63  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Si analizamos la conducta de los extractos secundarios de *Colubrina greggii* donde el extracto hexánico aumentó a 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  su CMI, esto probablemente se pudiera deber a que el o los compuestos activos son volátiles y se perdió parte de ellos, se degradaron en algún momento o bien se dio algún tipo de sinergismo entre compuestos de distinta polaridad, los cuales fueron separados mediante la extracción diferencial. Con los resultados de *Clematis drummondii* "hembra", donde el extracto hexánico aumentó su actividad y aumentó aun más para el extracto obtenido con acetato de etilo con una actividad de 16



$\mu\text{g/mL}$ , se puede decir que la mayoría de los compuestos responsables de la actividad antifúngica en este extracto, tienen una mediana polaridad.

Si observamos los resultados obtenidos en este trabajo (Tabla III), encontramos dos conductas diferentes de acuerdo a los puntos de corte establecidos. Algunos extractos mostraron actividad contra los cuatro hongos incluidos, tal es el caso de *Salvia texana* y *Clematis drummondii* "hembra". Mientras que otros extractos fueron activos únicamente contra uno de los hongos; tal es el caso de *Bougainvillea glabra*, que fue activa solo contra *Coccidioides immitis*, *Leucophyllum frutescens* y *Cordia boissieri* que resultaron activas solo contra *Histoplasma capsulatum*, y por último *Jatropha dioica* que resultó activa solo contra *Candida albicans*.

Para tener una idea de la toxicidad que pudieran tener los extractos secundarios, se evaluó la toxicidad de estos mediante el ensayo de *Artemia salina*. Esta descrito en la literatura el amplio uso de este ensayo debido a su sencillez, rapidez y bajo costo (38). En la tabla IX, se muestran los resultados obtenidos de la evaluación de la toxicidad de los extractos secundarios con actividad antifúngica. Es importante hacer notar que solo dos extractos resultaron tóxicos: el extracto hexánico de *Colubrina greggii* con una dosis letal media de 229.7  $\mu\text{g/mL}$  y el extracto hexánico de *Clematis drummondii* "hembra" con una concentración letal media de 566.1  $\mu\text{g/mL}$ . El resto de los extractos fueron considerados no tóxicos debido a que en dos de las concentraciones probadas no hubo larvas muertas y en la concentración de 1000 ppm fueron muy pocas las larvas muertas.

Se sugiere hacer diluciones intermedias (100–1000 ppm) para poder establecer una dosis letal media.

En resumen, con los resultados obtenidos mediante el desarrollo de este trabajo, se puede demostrar la importancia de la aplicación del criterio etnobotánico en la

búsqueda y selección de plantas que pueden derivar en nuevas oportunidades para el tratamiento de infecciones refractarias como las causadas por *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Histoplasma capsulatum* y *Coccidioides immitis* quedando abierta la posibilidad del descubrimiento de alguna nueva opción para la lucha contra estos hongos.

Además, el hecho de que solo dos extractos resultaran tóxicos en el ensayo de *Artemia salina*, es promisorio. Si bien es necesario hacer otro tipo de ensayos para evaluar de manera más contundente la toxicidad, éstos resultados nos dan una idea general de la misma.

## Capítulo VI

### Conclusiones

Solamente diez de las plantas seleccionadas presentaron actividad al menos contra uno de los hongos incluidos en este trabajo.

De los extractos secundarios, 18 presentaron la mayor actividad antifúngica en un rango de 63 a 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  contra los diferentes hongos.

De los extractos secundarios, solo los extractos de hexano y acetato de etilo de *Salvia texana* resultaron tóxicos en el ensayo de letalidad de *Artemia salina*.

## **Capítulo VII**

### **Perspectivas**

**Aislar el o los compuestos responsables de la actividad antifúngica y elucidar su estructura.**

**Determinar si la actividad es fungicida o fungistática.**

**Hacer estudios para la determinación del mecanismo de acción de los compuestos que se obtengan.**

## Bibliografía

- 1) Laza Loaces, **Descubrimiento y desarrollo de agentes cancerígenos derivados de plantas medicinales.** *Rev Cubana Plant Med*, Sept.-Dec. 2003, vol.8, no.3. Disponible en <http://imbiomed.com>
  
- 2) Vizoso parra, **Extracto hidroalcohólico de cera de caña no induce daño genético.** *Rev Cubana Plant Med*, Jan.-Apr. 2002, vol.7, no.1, p.18-22.
  
- 3) Kurt Hostettman. **Strategy of the biological and chemical evaluation of plant extracts.** IUPAC (1999). Disponible en <http://www.iupac.org>
  
- 4) Marjorie Murphy Cowan, **Plant Products as Antimicrobial Agents.** *Clinical Microbiology Reviews*, Oct. 1999, Vol. 12 N° 4,p.564-582.
  
- 5) Elena R. Mongelli. **Nuevos medicamentos y etnomedicina.** *Ciencia Hoy*, Abril/Mayo 2002, Vol. 12, No. 68, p 52-66.
  
- 6) Acosta de la Luz. **Principios agroclimáticos básicos para la producción de plantas medicinales.** *Rev Cubana Plant Med*, Jan.-Apr. 2003, vol.8, no.1  
Disponible en <http://imbiomed.com>

- 7) Lic. Miguel Riveiro López, **Actividad antifúngica in vitro del Pinus caribaea (Pino Macho)** *Rev Cubana de Plant Med* ene.-abr. 1997, vol. 2, no.1, p 25-29
- 8) Castro Mendez. **Boerhaavia SPP.** *Rev Cubana Plant Med*, Mayo-ago. 2001, vol. 6, no.2, p. 67-72.
- 9) <http://www.medicinanaturista.com>
- 10) Álvarez Calderón, **Estudio etnobotánico de las plantas medicinales en la localidad de San Isidro el Mirador municipio de San Francisco Ixtacamaxtitlan. Puebla. Resumen del XV Congreso SBM.** Disponible en <http://www.socbot.org.mx>
- 11) Batista Carmona, **Validación de la técnica analítica para la determinación de aceite volátil en la tintura de jengibre al 50%.** *Rev Cubana Plant Med*, Jan.-Apr. 2003, vol.8, no.1. Disponible en <http://imbiomed.com>
- 12) Nigenda, **La práctica de la medicina tradicional en América Latina y el Caribe: el dilema entre regulación y tolerancia.** *Salud Pública de México*, Enero-febrero de 2001, vol. 43, no.1, p. 41-51.
- 13) WHO, **Fact Sheet N°134, Revised May 2003.** Disponible en <http://www.who.int>
- 14) Paladini, **¿Cómo se descubre o inventa un medicamento?,** *Ciencia Hoy*, **Máy/Jun 1996, Vol. 6, No. 34.** Disponible en <http://www.ciencia-hoy.com>

- 15) Gustavo Nigenda, **Modelos alternativos de atención a la salud: utilización y disponibilidad en la ciudad de México**. Junio 2002. Disponible en <http://www.funsalud.org.mx>
- 16) Fransworth, **Screening plants for new medicines**, Chapter 9 in *Biodiversity*, Ed. E.O. Wilson., Washington, D.C.: National Academy Press. Disponible en <http://www.ciesin.org>
- 17) Abigail Aguilar, **Historia de la Flora Medicinal en México**, *GACETA CCH*, Mayo 1997, 19, 20, pp.16. Disponible en [http://www.dgcch.unam.mx/gaceante/1997/mayo\\_19/gace20.html](http://www.dgcch.unam.mx/gaceante/1997/mayo_19/gace20.html).
- 18) J.N. Eloff, **Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants?**, *Journal of Ethnopharmacology*, 60 (1998) 1-8.
- 19) Teng Wah Sam, **Toxicity Testing Using The Brine Shrimp: *Artemia salina***, *Bioactive Natural Products*, Ed. CRC Press, Inc., Chapter 18, p.441-455.
- 20) Paul Alan Cox, **The ethnobotanical approach to drug discovery**, *Scientific American*, June (1994), 82-87.
- 21) Dr. Carlos Gassiot Nuño, **A propósito de micosis pulmonares**, *Acta Médica*, 9 (1-2), (2000), 59-66.

- 22) Frank C. Odds, PhD, FRC Path, **Treatment of invasive fungal disease: will combination antifungal therapy reduce mortality?** Disponible en: [www.medscape.com/viewprogram/2439\\_pnt](http://www.medscape.com/viewprogram/2439_pnt).
- 23) Luis Thompson M., David Oddo B., **Micosis Oportunista.** Disponible en: [http://www.med.uchile.cl/otros/dra\\_ancic/capitulo22.html](http://www.med.uchile.cl/otros/dra_ancic/capitulo22.html)
- 24) [http://eduserv.hscer.washington.edu/pharmacy/medchem401/PDF%20files/401\\_03\\_67\\_78.pdf](http://eduserv.hscer.washington.edu/pharmacy/medchem401/PDF%20files/401_03_67_78.pdf)
- 25) <http://www.cdc.gov>
- 26) Maximino Martínez, **Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas Mexicanas**, Ed. Fondos de Cultura Económicos, 1994.
- 27) Orozco Hayek M.. **Elección de las condiciones mas adecuadas para la obtención de extractos de plantas superiores con actividad sobre una cepa de *Staphylococcus aureus* resistente.** Tesis de Maestría, Facultad de Medicina, U. A. N. L., 2004.
- 28) Kanyanga Cimanga, Tess de Bruyne, **In vitro Biological activities of alkaloids from *Cryptolepis sanguinolenta***, *Planta Med.*, 62, (1996), 22-27.
- 29) Victor Navarro, Gabriela Rojas, Juan Lévaro, **Antimicrobial evaluation of certain plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of respiratory diseases**, *Journal of Ethnopharmacology*, 74, (2001), 97-101.



- 30) R. Frenner, M. Sortino, **Antifungal activity of some Brazilian *Hypericum* species**, *Phytomedicine*, 12, (2005), 236-240.
- 31) Berrin Ozcelik, **Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of the lipophylic extracts of *Pistacia cera***. *Microbiological Research*, 160, (2005), 159-164.
- 32) <http://www.rain-tree.com>
- 33) <http://www.fitoterapia.net>
- 34) <http://www.medserv.com>
- 35) <http://www.semamat.gob.mx>
- 36) Joing Yang, **Concise total synthesis of the bioactive Mesotricyclic Diterpenoids Jatrophatine Citlatrione**, *J. Am. Chem. Soc.*, 125, (2003), 1567-1574.
- 37) Sergio R. Peraza-Sanchez, **Screening of Yucatecan Plant Extracts to Control *Colletotrichum gloeosporioides* and Isolation of a new pimarene from *Acacia pennatula***, *J. Agric. Food Chem.*, 53, (2005), 2429-2432.
- 38) Meyer, B.N., **Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents**, *Medicinal Plant Research*, Vol. 45, (1982), 31 – 34.



