

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

**ACTIVIDAD DE SEIS EXTRACTOS DE HIERBAS USADAS
MEDICINALMENTE CONTRA *Fonsecaea pedrosoi* y *Sporothrix schenckii***

Informe de Tesis

Presentado por

MARÍA JOSÉ RIVERA CASTELLANOS

Para optar al Título de

Química Bióloga

Guatemala, febrero de 2007.

INDICE

I.	RESUMEN	1
II.	INTRODUCCIÓN	3
III.	ANTECEDENTES	5
	A. Esporotricosis	5
	1. Definición	5
	2. Etiología	5
	3. Características	5
	4. Ecología	6
	5. Distribución	6
	6. Características clínicas	7
	7. Diagnóstico	7
	8. Pronóstico	10
	9. Tratamiento	10
	B. Cromoblastomycosis	13
	1. Definición	13
	2. Etiología	13
	3. Características	13
	4. Ecología	16
	5. Distribución	16
	6. Características clínicas	17
	7. Diagnóstico	17
	8. Pronóstico	18
	9. Tratamiento	18

C. Hierbas Nativas Guatemaltecas	19
1. Fitoterapia	19
2. Descripción de las hierbas nativas en estudio	21
a. <i>Baccharis trinervis</i>	21
b. <i>Dorstenia contrajerva</i>	21
c. <i>Hedyosmum mexicanum</i>	22
d. <i>Lippia chiapasensis</i>	23
e. <i>Petiveria alliacea</i>	23
f. <i>Ocimum micranthum</i>	23
IV. JUSTIFICACION	26
V. OBJETIVOS	28
VI. HIPÓTESIS	29
VII. MATERIAL Y METODOS	30
VIII. RESULTADOS	37
IX. DISCUSION DE RESULTADOS	40
X. CONCLUSIONES	43
XI. RECOMENDACIONES	44
XII. REFERENCIAS	45

I. RESUMEN

Las micosis subcutáneas son infecciones que se inician cuando ciertos hongos habitantes del suelo y materia vegetal se introducen bajo la piel mediante espinas, astillas o como contaminantes de las heridas.

La esporotricosis es una infección crónica que se puede diseminar, particularmente en pacientes inmunocomprometidos. El agente causal es *Sporothrix schenckii*, hongo dimórfico que vive como saprobio del suelo en materia orgánica, vegetales y otros sustratos. El tratamiento convencional contra esta afección consiste en la aplicación de una solución saturada de yoduro de potasio y en la esporotricosis pulmonar y diseminada, se utiliza la Anfotericina B.

La cromoblastomicosis es una micosis subcutánea, crónica, de evolución muy lenta y que suele afectar preferentemente a los miembros inferiores. Se caracteriza por producir nódulos, verrugosidades y atrofia de evolución crónica. *Fonsecaea pedrosoi*, es el agente causal de mayor importancia en zonas tropicales y húmedas de América. El tratamiento consiste en procedimientos quirúrgicos y en los casos más avanzados, el uso de Anfotericina B, por vía intravenosa o intra-arterial, dentro de la lesión o en forma tópica. En la actualidad el tratamiento de elección es la 5-Fluorocitocina, el cual ha fracasado en la enfermedad de larga duración. No existe tratamiento selectivo para la cromoblastomicosis.

En el presente estudio se evaluó la actividad antifúngica de extractos etanólicos seis de hierbas nativas guatemaltecas contra especímenes clínicos de *S. schenckii* y *F. pedrosoi*. Las hierbas fueron *Baccharis trinervis* (hoja), *Dorstenia contrajerva* (raíz), *Hedyosmum mexicanum* (hoja), *Lippia chiapasensis* (hoja), *Petiveria alliacea* (raíz) y *Ocimum micranthum* (hoja), para lo cual se utilizó el método para hongos filamentosos descrito por Brancato & Golging modificado por MacRae, contra la fase miceliar de *S. schenki* y *F. pedrosoi*, así como contra la fase levaduriforme de *S. schenckii*.

En el caso de *S. schenckii* en su fase miceliar, *Dorstenia contrajerva* y *Hedyosmum mexicanum* fueron los extractos que presentaron actividad positiva. *F. pedrosoi* fue susceptible únicamente al extracto de *Baccharis trinervis*. A estos extractos con actividad antifúngica se les determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM), encontrándose que *Dorstenia contrajerva* y *Hedyosmum mexicanum* tuvieron actividad antifúngica positiva contra la fase miceliar de *S. schenckii* a 0.1 mg/mL y 0.05 mg/mL respectivamente. De igual manera en el caso del extracto de

Baccharis trinervis, al determinar la CIM, éste no presentó actividad antifúngica positiva contra *F. pedrosoi* a concentraciones menores del punto de corte, el cual fue de 0.2 mg/mL. El extracto etanólico de *Dorstenia contrajerva* presentó la mejor actividad antifúngica contra la fase levaduriforme de *S. schenckii* (0.1 mg/mL). En tanto que, el extracto etanólico de *Hedyosmum mexicanum* no presentó actividad antifúngica positiva contra la levadura de *S. schenckii* a concentraciones menores de 0.2 mg/mL.

Con los resultados presentados se justifica la realización de estudios ulteriores para el fraccionamiento guiado e identificación de los principios activos de *Baccharis trinervis* (hoja), *Dorstenia contrajerva* (raíz) y *Hedyosmum mexicanum* (hoja) para determinar el o los compuesto(s) químico(s) responsables de su actividad antifúngica.

II. INTRODUCCIÓN

Las micosis subcutáneas son infecciones que se inician cuando ciertos hongos habitantes del suelo y materia vegetal, se introducen bajo la piel mediante inoculación traumática, o como contaminantes de las heridas. Entre estas infecciones se encuentran la esporotricosis y la cromoblastomicosis.

La esporotricosis es una infección micótica crónica de la piel causada por *Sporothrix schenckii* que se puede diseminar linfáticamente. Se localiza preferentemente en la cara y extremidades y se caracteriza por nódulos que dan lugar a lesiones fijas verrugosas o linfangíticas. La esporotricosis sistémica puede causar problemas respiratorios y pulmonares, así como, osteomielitis, artritis y meningitis. Generalmente se trata con yoduros administrados en forma oral, mientras que la infección sistémica o diseminada se trata con anfotericina B o algunas veces con itraconazol. El inconveniente de estos medicamentos, es que a pesar de ser efectivos, producen efectos secundarios considerables, afectando órganos importantes como los riñones y la médula ósea.

La cromoblastomicosis es una micosis verrugosa crónica que suele afectar preferentemente a los miembros inferiores, afectando el tejido celular. Se caracteriza por nódulos, verrugosidades y atrofia de evolución crónica. Uno de los agentes etiológicos de mayor importancia en zonas tropicales y húmedas de América es *Fonsecaea pedrosoi*. La evolución de la enfermedad es crónica, lenta, progresiva y asintomática. En la actualidad el tratamiento consiste en drogas fuertes como anfotericina B y 5-fluorocitocina, el cual ha fracasado en la enfermedad de larga duración. Esta terapia ha demostrado ser altamente tóxica causando severos efectos secundarios como vasoconstricción, daño renal y depresión de la médula ósea, entre otros.

Tomando en cuenta la gravedad de este tipo de micosis, el continuo aumento de estos padecimientos y la toxicidad de los tratamientos convencionales, se ha hecho necesaria la búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento que reduzcan o eliminen los nocivos efectos secundarios.

En Guatemala se ha realizado un considerable número de estudios sobre la acción antimicrobiana y/o antifúngica de diversas plantas nativas; sin embargo, a la fecha no se cuentan con estudios que hayan evaluado la actividad de las seis hierbas de esta investigación contra

agentes importantes de micosis subcutáneas como lo son *Sporothrix schenckii* y *Fonsecaea pedrosoi*.

El propósito de este estudio es la búsqueda y evaluación de la actividad antifúngica de extractos etanólicos seis de hierbas nativas guatemaltecas contra especímenes clínicos de *Sporothrix schenckii* y *Fonsecaea pedrosoi*, las cuales han sido seleccionadas en base a sus antecedentes etnomedicinales y en estudios previos en los que se han demostrado alguna actividad antifúngica y/o antimicrobiana.

III. ANTECEDENTES

A. ESPOROTRICOSIS

1. Definición

La esporotricosis es una infección micótica crónica de la piel (cutánea) que se puede propagar (diseminada, sistémica), particularmente en pacientes inmunocomprometidos. Se localiza preferentemente en cara y extremidades y se caracteriza por nódulos que dan lugar a lesiones fijas verrugosas o linfangíticas (1).

2. Etiología

El agente causal es *Sporothrix schenckii*, hongo dimórfico que vive como saprófito del suelo, materia orgánica, vegetales y otros sustratos (1).

Posee una pared celular compuesta por beta-glucanos y glucopéptidos. No se le conoce con certeza el estado teleomorfo. Se le ha relacionado filogenéticamente con *Ophiostoma (Ceratokystis) stenoceras*. Se adquiere principalmente por inoculación traumática y rara vez penetra por inhalación (1).

3. Agente Causal

a. *Sporothrix schenckii* (Hektoen y Perkins, 1900)

i) Taxonomía:

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Euascomycetes

Orden: Ophiostomatales

Familia: Ophiostomataceae

Género: *Sporothrix*

Especie: *schenckii* (2)

ii) Fase filamentosa

Morfología de la colonia: crece a temperaturas inferiores a 37°C. Presenta colonias de crecimiento lento (3-5 días) inicialmente claras, húmedas o levaduriformes, que posteriormente se convierten en colonias duras y arrugadas de color marrón o negro en su totalidad o por zonas, debido a la producción de conidias pigmentadas. La coloración puede ser inconstante y variar no sólo entre los aislamientos, sino que incluso puede perderse tras múltiples pases (3, 4, 5).

Morfología microscópica: en el examen microscópico, se observan hifas delgadas de 1-2 mm de diámetro, con conidióforos perpendiculares cuyo extremo distal se dilata formando una vesícula denticulada, de la que nacen simpoidalmente conidios hialinos de 2-3 mm x 3-6 mm que se agrupan en forma de ramillete o margarita. A medida que el cultivo envejece, la conidiación aumenta y aparecen conidios 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 llamados raduloconidios (3, 4, 5).

iii) Fase levaduriforme

Morfología de la colonia: la levadura crece a 37°C en medios enriquecidos y en los tejidos parasitados. La colonia tiene aspecto cremoso y brillante que se torna de color gris o crema (3, 4, 5).

Morfología microscópica: Se observan células levaduriformes redondeadas o con forma de cigarro, con múltiples gemaciones de 3-5 µm de diámetro. El cuerpo asteroide es muy sugestivo de esporotricosis, pero también puede observarse en otras infecciones fúngicas. Está constituido por una célula levaduriforme redonda u oval, rodeada de un material eosinofílico radiado constituido por un complejo antígeno-anticuerpo. Estos cuerpos se observan con mayor frecuencia en las lesiones secundarias, del cerebro y del ojo (3, 4, 5).

4. Ecología

El agente causal se encuentra en la vegetación y se inocula en la piel cuando ésta pierde continuidad, por ejemplo mientras se están manejando materiales de jardín como rosales, zarzas o tierra abonada. Puede ser una enfermedad ocupacional para granjeros y horticultores entre otros.

La esporotricosis generalizada (diseminada) se desarrolla en personas inmunocomprometidas cuando inhalan polvo cargado de esporas (1).

5. Distribución

Aunque esta enfermedad puede afectar a cualquier persona, quienes manipulan plantas espinosas, musgo o fardos de heno contaminados con este hongo en particular, corren mayor riesgo de contraer la enfermedad. Se han producido brotes de esporotricosis entre trabajadores de guarderías infantiles que manipulan musgo esfagno, jardineros que cuidan rosas, niños que juegan con fardos de paja y trabajadores de invernaderos que manipulan espinas de agracejos contaminados por el hongo (principalmente en el hemisferio norte) (1).

Tiene predominio en África del Sur, Japón y América en la zona intertropical. En Guatemala se han presentado casos en la Laguna de Ayarza (norte de Santa Rosa), faldas del volcán Tacaná (San Marcos) y Chimaltenango (6).

6. Características clínicas

Aunque *Sporothrix schenckii* puede causar múltiples síndromes, el más frecuente es la forma cutánea, que se caracteriza por la aparición de nódulos ulcerativos o verrucosos que afectan a piel, tejido subcutáneo y sistema linfático adyacente (5, 6).

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, aunque existe una tendencia a la cronicidad (5, 6).

La forma cutánea llamada fija o en placa no tiene tendencia a extenderse localmente y es característica de áreas endémicas con un elevado tanto por ciento 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 (5, 6).

b) Esporotricosis mucocutánea

La afección mucosa sin afección cutánea 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 (5, 6).

c) Esporotricosis extracutánea

La afección osteoarticular es la forma más frecuente de esporotricosis extracutánea. Se caracteriza por una artritis destructiva con lesiones osteolíticas, tenosinovitis y periostéfitis. 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 (5, 6).

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, 6).

La esporotricosis pulmonar es típica de varones entre 30-60 años. 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. Sin tratamiento, la enfermedad puede permanecer estacionaria pero la tendencia es hacia la progresión con aumento de las cavitaciones, necrosis, alteración de la función pulmonar y, en ocasiones, diseminación a otros órganos. El segundo tipo de infección pulmonar, se localiza en los ganglios linfáticos traqueobronquiales e hiliares. A pesar de que el crecimiento ganglionar puede causar obstrucción bronquial, esta forma puede permanecer estacionaria e incluso resolverse espontáneamente (5, 6).

La afectación 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 hipoglucorraquia. 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 (5, 6).

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 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 (5, 6).

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 (6).

7. Diagnóstico

Las esporotricosis puede confirmarse cuando se obtiene una muestra de un nódulo cutáneo recientemente abierto y se somete a un cultivo fúngico. El diagnóstico también puede

comprobarse a través de una muestra de sangre o biopsia mediante la realización de estudios inmunológicos e histológicos (1, 8).

a. Examen fresco de material

Observación microscópica de los cuerpos asteroides, que son estructuras formadas por levaduras que se presentan rodeadas de un material eosinofílico radiado PAS-positivo, constituido por un complejo antígeno-anticuerpo llamado fenómeno de Splendore - Hoespli (5, 9).

b. Cultivo

El material 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 *Sporothrix schenckii*, se reporta como negativo (4).

c. Estudios histopatológicos

Presencia de cuerpos asteroides, granulomas con infiltración de linfocitos, células gigantes, fibrosis y otros cambios celulares (3).

d. 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 (10).

8. Pronóstico

Con el tratamiento se espera una recuperación total. La esporotricosis diseminada es más difícil de tratar y requiere agentes quimioterapéuticos; además, esta última puede ser mortal para personas inmunocomprometidas (1).

9. Tratamiento

El tratamiento convencional para la esporotricosis cutánea consiste en una solución saturada de yoduro de potasio. En la esporotricosis pulmonar y diseminada se utiliza la Anfotericina B como tratamiento de elección, ya que por ser el más agresivo produce una mejor respuesta (11).

a. Anfotericina B

Este es un antimicótico de amplio espectro obtenido del hongo *Streptomyces nodosus*. Se utiliza como el tratamiento inicial para micosis diseminadas y extracutáneas, siendo posteriormente reemplazado por imidazoles (12).

i. Mecanismo de acción

La membrana de la célula fúngica se altera y se pierden las macromoléculas celulares y los iones, lo que origina un daño irreversible. La resistencia a este fármaco se puede deber a una disminución en la cantidad de ergosterol de la membrana o a una modificación en su estructura (13).

ii. Dosis

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

iii. Efectos secundarios

Van desde fiebre, escalofríos, anorexia, cefalea, náuseas y vómitos hasta insuficiencia renal; en casos de administración intratecal causa aracnoiditis, parestias, pérdida de la visión y alteraciones de los esfínteres. A menudo se presenta disminución de la presión arterial (4, 13).

b. Yoduro de potasio (KI)

Es el tratamiento de elección específico para la esporotricosis cutánea y linfocutánea (1).

i. Mecanismo de acción

El KI no tiene acción directa contra *Sporothrix schenckii*, ya que se ha demostrado que el hongo puede crecer en medios de cultivo con altas concentraciones de yoduro de potasio. Se asume, más bien, que su acción es indirecta, facilitando así los procesos de inmunidad celular o general (8, 14).

ii. Dosis

Administración de una solución saturada de yoduro de potasio (23 g / 100 ml de agua) tres veces por vía oral; se aumenta la dosis hasta 3 ó 4 ml tres veces al día durante tres a cuatro semanas, siendo la dosis óptima de 4 a 6 g por día en el adulto y de 1 a 3 g en los niños (12).

iii. Efectos secundarios

Produce exantema, salivación, lagrimeo, náuseas, vómitos, gastritis, rinitis, faringolaringitis y bronquitis (1,4).

c. 5-fluorocitocina

Es un antimicótico oral de amplio espectro, también se puede encontrar disponible en presentación para su administración intravenosa y tópica (15).

i. Mecanismo de acción

Penetra a la célula fúngica por medio de la permeasa de citosina e inhibe la síntesis del ácido ribonucleico (ARN) por acción de una desaminasa de citosina. Intracelularmente es convertida a 5-fluorouracilo y en trifosfato de fluororidina. La sustitución del uracilo por 5-fluoruracilo y el fosfato de fluororidina, inhibe la síntesis de ácido desoxiribonucleico (ADN) y del ARN respectivamente, alterando la síntesis protéica, llevando a la célula fúngica a la muerte (8, 13)

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 (13, 15).

iii. Efectos secundarios

Produce náuseas, vómitos, enterocolitis y depresión de la médula ósea (15).

d. Otros

Otros antimicóticos de utilidad en el tratamiento de la esporotricosis son los triazoles, principalmente el itraconazol, activo en todas las formas de esporotricosis pero por su alto costo sólo se emplea en formas diseminadas. La dosis promedio empleada es de 200 mg diarios que pueden administrarse por varios meses. No se recomienda el uso

del ketoconazol por su pobre respuesta y su potencial hepatotóxico. El fluconazol es también efectivo en las formas graves de esporotricosis, utilizándose dosis de 200 a 400 mg diarios, hasta por seis meses (1).

B. CROMOBLASTOMICOSIS

1. Definición

La cromoblastomicosis es una micosis subcutánea crónica de evolución muy lenta y que suele afectar preferentemente a los miembros inferiores. Afecta piel y tejido celular. Se caracteriza por nódulos, verrugosidades y atrofia de evolución crónica (16).

El tipo de enfermedad provocada depende del huésped, sus defensas y la virulencia relativa del agente infectante (19).

2. Etiología

Los agentes causales son hongos que viven como saprófitos de suelo y vegetales (14). Los principales agentes etiológicos de la cromoblastomicosis son: *Fonsecaea pedrosoi*, el agente causal de mayor importancia en zonas tropicales y húmedas de América; *Fonsecaea compacta*, se ha aislado en menos de 12 casos a nivel mundial; *Cladophialophora carrioni* que se encuentra en zonas áridas y semiáridas; *Phialophora verrucosa*, se encuentra en tierras bajas en las mismas condiciones que *F. pedrosoi* (8, 20).

3. Características

a. Agentes etiológicos

i) *Fonsecaea pedrosoi* (Link y Gray, 1821)

Taxonomía:

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Euascomycetes

Orden: Chaetothyriales

Familia: Herpotrichiellaceae

Género: *Fonsecaea*

Especie: *F. pedrosoi* (2)

Morfología de la colonia: En cultivo crece muy lentamente, produce una colonia de color pardo negruzco, negro grisáceo, verde oliva grisáceo o negro, de textura aterciopelada a vellosa con una superficie que varía de plana a apilada y plegada. En algunas cepas se presenta radiaciones o disposiciones en zonas (3, 8, 18).

Morfología microscópica: Se observa tres tipos de esporulación: cladosporium corto y algunas veces rinocladiela (acroteca) y fialofora (3, 8, 18).

ii) *Fonsecaea compacta* (Carrion, 1940)

Taxonomía:

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Euascomycetes

Orden: Chaetothyriales

Familia: Herpotrichiellaceae

Género: *Fonsecaea*

Especie: *F. compacta* (2)

Morfología de la colonia: En 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 distingue de *Fonseca pedrosoi* (3, 8, 17, 19).

Morfología microscópica: Se observa predominantemente la esporulación cladosporium corto y algunas veces tipo acroteca y fialófora (3,8).

iii) *Cladophialophora carrionii* (Gray 1821, Hoog 1995)

Taxonomía:

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Ascomycetes

Orden: Chaetothyriales

Familia: Herpotrichiellaceae

Género: *Cladophialophora*

Especie: *C. carrionii* (2)

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 (3, 8, 18, 19).

Morfología microscópica: Se encuentra casi exclusivamente el tipo de esporulación cladosporium largo (3, 8, 19).

iv) *Phialophora verrucosa* (Medlar 1915)

Taxonomía:

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Euascomycetes

Orden: Chaetothyriales

Familia: Herpotrichiellaceae

Género: *Phialophora*

Especie: *P. verrucosa* (2)

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. Un micelio aéreo, gris, termina por cubrir la colonia la cual es compacta, resistente y coriácea (3, 8, 19).

Morfología microscópica: Se producen fiálides con morfología 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. Se observa únicamente la esporulación tipo fialófora (3, 8).

b. Tipos de esporulación

Los agentes etiológicos en su fase saprofítica o miceliar, tienen micelio septado y se diferencian entre sí por el tipo de esporulación que presentan: cladosporium corto, cladosporium largo, fialófora y rinocladiella (8).

i) Tipo Fialófora

En este tipo de esporulación existe una célula conidiógena distinta 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 (3, 8, 19).

ii) Tipo Rinocladiela (acroteca)

Los conidióforos son simples y no difieren mucho de la hifa vegetativa. Se producen conidios ovales en los extremos y a los lados de los conidióforos. Generalmente son únicos y no germinan (3, 8, 19).

iii) Tipo Cladosporio (corto y largo)

De la hifa conidiógena nace un conidióforo ligeramente alargado en el que se forman dos o más conidios. En la variedad larga, la conidiación continua formando largas cadenas y en la variedad corta, se forman bifurcaciones en arborescencia de donde se desprenden los conidios sin formar cadenas (3, 8, 15, 18).

4. Ecología

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 (16). La infección predomina en el medio rural y entre campesinos (80%). La infección natural se encuentra en gatos, perros, caballos, ranas, sapos y lobos marinos (19).

5. Distribución

Es una micosis que no tiene una zona endémica establecida, pero predomina en clima tropical y subtropical. La cromoblastomicosis afecta preferentemente a adultos de 30 a 60 años de edad (67%) con un predominio en varones (70 – 91%), siendo rara en mujeres (9%), como consecuencia principalmente a que los varones tienen más contacto con el suelo y se predisponen a sufrir de heridas durante el trabajo (19, 20).

6. Características clínicas

La lesión se presenta en el sitio en donde se sufrió el traumatismo. La lesión inicial es una pápula o nódulo eritematoso no pruriginoso que se extiende lentamente a los tejidos vecinos. La evolución es crónica, lenta, progresiva y asintomática. 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 (16, 21).

La enfermedad se mantiene localizada en el sitio del traumatismo. Sin embargo en algunas ocasiones puede haber una infección secundaria provocada por bacterias, lo que provoca una estasis linfática que puede ocasionar una elefantiasis en el paciente. No existe invasión en huesos o músculos y no hay formación de fístulas (16, 21).

7. 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* las cuales se encuentran en la fase parasítica del hongo y son estructuras redondeadas de 4 a 15 μm , de pared gruesa y color marrón, con o sin divisiones y que pueden estar en grupos o aisladas, 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 por ciento en busca de hifas pigmentadas de color pardo, ramificadas (de 2 a 6 μm de ancho) y cuerpos escleróticos (de 4 a 12 μm) los cuales son visibles como células esféricas en los tejidos cutáneos y subcutáneos de las personas afectadas y son considerados patognomónicos la cromoblastomycosis (8, 11, 17, 19).

b. Cultivo

Se pueden utilizar medios selectivos que contengan cicloeximida y cloranfenicol (Sabouraud más antibióticos). Los cultivos deben incubarse a una temperatura de 25°C, descartando como negativo si no hay crecimiento en 3 semanas (8, 11, 19).

c. Identificación

La identificación específica es la taxonómica, se identifican a nivel de género y especie por la morfología del micelio, pero sobre todo por las características microscópicas de sus esporas

asexuadas y los elementos que las originan por lo que se determinan los tipos de esporulación, los conidios presentes y los detalles precisos de la producción de conidios (8, 11, 19).

8. Pronóstico

Las micosis subcutáneas son graves en cuanto a pronóstico y tiene limitaciones en cuanto al tratamiento y posibilidades de curación (16).

La cromoblastomicosis es una enfermedad crónica y benigna. En algunos pacientes puede causar invalidez y en otros puede requerirse amputación (16).

9. Tratamiento

En las primeras etapas de la enfermedad el tratamiento más confiable es la extirpación, electrodesecación, criocirugía, láser o radioterapia (16).

En los casos más avanzados, el uso de Anfotericina B, por vía intravenosa, intra-arterial, dentro de la lesión o en forma tópica ha ido en aumento, aunque en las dos últimas presenta poca absorción. En la actualidad el tratamiento de elección es la 5-Fluorocitocina, el cual ha fracasado en la enfermedad de larga duración (20, 22).

No existe tratamiento selectivo para la cromoblastomicosis.

a. Anfotericina B

Es un antibiótico polieno aislado de la cepa de *Streptomyces nodosus* (12).

i) Dosis

En el caso de adultos es necesario disolver la droga en 500 ml de dextrosa líquida al 5 por ciento y debe aplicarse en intervalos de 4 a 6 horas. La 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 (12, 13, 15).

ii) Mecanismo de acción

Los antibióticos polienos se fijan firmemente al ergosterol de la membrana celular del hongo. Se altera la permeabilidad de la membrana, con esto la célula pierde las macromoléculas y los iones causando la muerte (12, 13, 16).

iii) Efectos secundarios

Este antibiótico no es completamente efectivo y puede causar tromboflebitis, fiebre, escalofríos, anorexia, cefalea, náuseas y vómitos. El daño más importante es la vasoconstricción y lesión de las membranas lisosómicas de las células de los túbulos renales (12, 20, 21).

b. 5-fluorocitocina

Conocida también como flucitosina, que es una pirimida fluorada, antimetabolito de la citocina y con estructura similar al 5-fluoruracilo (12).

i) 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 LCR (15).

ii) Mecanismo de acción

Penetra a la célula fúngica por medio de la permeasa de citosina e inhibe la síntesis de ARN por la acción de una deaminasa de citosina; se convierte en 5-fluoruracilo, lo que provoca que el código genético sea leído en forma equivocada y detiene el crecimiento de la célula; un segundo mecanismo de acción ocurre a través de otro metabolito que es el monofosfato de 5-fluorodeoxiuridina, que inhibe la timidato sintetasa y bloquea la síntesis de DNA (13, 15).

iii) Efectos secundarios

Son pocos, pero puede causar náuseas, vómitos, enterocolitis y depresión de la médula ósea, leucopenia y trombocitopenia (13, 15).

C. HIERBAS NATIVAS GUATEMALTECAS

1. Fitoterapia

a. Definición

La fitoterapia es el estudio del interés terapéutico de las plantas, estas plantas contienen componentes activos utilizados para el tratamiento de diversas enfermedades. Estos principios activos han sido estudiados y extraídos por diferentes métodos. Para que una planta conserve sus

propiedades medicinales se deben respetar, en los procesos para estandarizar la calidad y contenido de los principios activos, ciertas reglas de recogida, desecación, almacenamiento y finalmente la presentación final en infusiones, extractos, cápsulas, etc. (22).

Desde las primeras épocas el hombre ha usado los métodos naturales para curar sus molestias, métodos que cuando eran efectivos se transmitían de generación en generación y así han llegado a nuestros días (23).

La implementación de la fitoterapia, como se denomina a los tratamientos naturales que se basan en el uso de los principios activos contenidos en las plantas, debe realizarse teniendo en cuenta determinadas pautas para llegar a producir los efectos deseados: la mejoría del síntoma sin efectos secundarios (23).

La medicina vegetal o terapia con hierbas medicinales, comprende el uso de plantas o partes de plantas en su estado natural (sin procesamiento químico). Los remedios vegetales pueden incluir el uso de las hojas, raíces, cortezas, frutos, etcétera o también se puede utilizar la planta entera. Algunos medicamentos consisten en la mezcla o combinación de diferentes plantas (23).

Su administración más corriente, es bajo la forma de polvos, granulados, tabletas, cápsulas o ingeridos a manera de té o tisanas; algunos se aplican sobre la piel formando parte de geles, pomadas, ungüentos resinosos o adicionados en solución a baños de inmersión. Otra forma habitual de prescripción, consiste en fórmulas preparadas únicamente con los principios activos (ingredientes purificados) de las plantas, que han sido estudiados y probados en laboratorios bajo normas más estrictas de elaboración, prestando mayor atención a la seguridad y efectividad de sus componentes. Las plantas (o sus partes aisladas), a pesar de ser consideradas productos naturales, no significa que sean inocuas. Los medicamentos de origen vegetal suelen contener compuestos nocivos para la salud, por lo cual es imprescindible ser cautos en su utilización. Tengamos siempre presente que la finalidad de toda medicina natural, está dirigida ante todo a restablecer el equilibrio y la armonía perdidos, y para lograrlo es imprescindible no provocar daños innecesarios al organismo (24).

2. Descripción de las hierbas nativas en estudio

a. *Baccharis trinervis* (Lam.) Pers.

i) Familia

Asteraceae (Compositae)

ii) Nombre común

Lengua de vaca, Santo Domingo, cardenillo, crucita.

iii) Descripción taxonómica

Arbusto de 2 a 3 m, cuyas ramas crecen sobre otras plantas, Las hojas son elípticas, de 5 a 12 cm con tres vainas conspicuas. Flores blancas en cabezuelas y en panículas terminales. Flores femeninas y masculinas en plantas diferentes (25).

iv) Hábitat

Se encuentra en bosques de pino y roble, a orilla de caminos y cercos, en lugares abandonados y en matorrales. Es más común en las montañas del centro y occidente del país. Nativo de Centro y Sur América (25).

v) Usos medicinales

Los usos medicinales reportados en Honduras son principalmente afecciones en los riñones (dolor y mal de orín), dolores, inflamaciones, calentura, diarrea, reumatismo, dolor de cuerpo, dolor de muelas, disipela, hígado, flujo (25).

b. *Dorstenia cotrajerva* L.

i) Familia

Moraceae

ii) Nombre común

Refriyau, raíz de resfriado, raíz de contrayerba, hierba de cáncer, cresta de gallo (26).

iii) Descripción taxonómica

Herbácea que mide alrededor de 30 cm de altura con la raíz en forma de camote. La planta tiene un látex lechoso y sus hojas parecen estar rotas. Sus flores son aplanadas y originan frutos pequeños (26).

iv) Hábitat

Es originaria de México y habita en algunas regiones de Guatemala y otros países de Centro América, zonas de clima cálido y semicálido. Crece asociada a la vegetación de manglar, sabana y selva tropical caducifolia, subcaducifolia, subperennifolia y perennifolia (26).

v) Usos medicinales

Se usa la raíz como antídoto para las mordeduras de víbora, la rabia y la intoxicación por alimentos. Otros usos comunes son: para malestares relacionados con el aparato digestivo tales como secreciones excesivas de bilis, disentería, vómito, dolor de estómago y mala digestión; así como para tratar las caries. La raíz en cocimiento es utilizada en padecimientos ginecológicos o venéreos. El látex se aplica de manera externa para la cicatrización de las heridas, además de emplearse contra la **disipela**, **erisipela** y paperas; mientras que, por vía oral se utiliza en casos de tos crónica, diabetes, inapetencia y paludismo (26, 27). **A esta hierba se le han realizado estudios que demuestren su actividad antimicrobiana más no antifúngica (27).**

c. *Hedyosmum mexicanum* Cordem

i) Familia

Chloranthaceae

ii) Nombre común

Platanillo, palo de agua, taba de jolote.

iii) Descripción taxonómica

Se caracteriza principalmente por ser un árbol cuyo tallo tiene nodos engrosados, y hojas simples, opuestas y aromáticas (28). Las hojas miden aproximadamente de 5-15 cm de largo y de 3-6 cm de ancho; elípticas, con ápice acuminado, bordes serrados y base cuneada (29).

iv) Hábitat

Es muy común en las montañas neotropicales, que se distribuyen desde México, Centro América, hasta la parte sur de Bolivia y la Guyana, y habita principalmente en bosques de encino y pino-encino (30).

v) Usos medicinales

Sus usos medicinales reportados corresponden principalmente a malestares estomacales y a trastornos digestivos, así como el uso de las cabezuelas molidas y aspiradas para aliviar el estornudo (30).

d. *Lippia chiapasensis* Loes.

i) Familia

Verbeneaceae

ii) Nombre común

Salbiyá

iii) Descripción taxonómica

Arbusto delgado de 4 m de altura, hojas con peciolo de 4-14 mm de longitud de forma ovalada u ovalada elíptica. Arbusto vasto, usualmente muy desarrollado, a veces obtuso y usualmente cuneado en la base. Las hojas presentan una venación prominente con márgenes que van de crenados a serrados; pedúnculos de 2-4 cm y muy densos. La flor mide de 8-9 mm con una corola de color amarillo de casi el doble de largo que el cáliz (31).

iv) Hábitat

Generalmente se encuentra en lugares boscosos de 1,500 a 3,000 m de altitud, de los departamentos de Baja Verapaz, Huehuetenango, San Marcos, Sololá, Totonicapán y también en México (31).

v) Usos medicinales

Se le han reportado pocas propiedades medicinales. Se utiliza para el alivio de padecimientos como fiebre y artritis (26).

e. *Petiveria alliacea* L.

i) Familia

Phytolaccaceae

ii) Nombre común

Apacín, anamú, hierba de las gallinitas, payche, zorrillo.

iii) Descripción taxonómica

Hierba perenne, erecta, 1 m de alto, a menudo leñosa; ramas jóvenes puberulentas o glabras. Hojas en pecíolos de 1-5 cm de largo; limbo oblongo u ovalado, de 5-15 cm de largo, verde brillantes. Inflorescencias en racimos delgados, 10-35 mm de largo, poco floreadas; flores subsésiles o en cortos pedicelos, sépalos blanco-verduzcos, oblongo-lineares, 3-4 mm de largo. Frutos comprimidos en el raquis del racimo, angostamente cuneados y 8 mm de largo (32).

iv) Hábitat

Nativa de México, Caribe, Centro y Sur América. Se encuentra en campos secos y húmedos, cerca de casas y terrenos sin cultivar. En Guatemala se ha descrito en Alta y Baja Verapaz, Chiquimula, Escuintla, Guatemala, Petén, Retalhuleu, Santa Rosa, Sacatepéquez, San Marcos, Suchitepéquez y Zacapa (32).

v) Usos medicinales

El conocimiento de las hojas se usa en el tratamiento de afecciones digestivas (diarrea, disentería, flatulencia), respiratorias (amigdalitis, asma, catarros, bronquitis, tos ferina), nerviosas (calambres, epilepsia, histeria, rabia), dolor de cabeza y de muelas, caries, reumatismo, tumores, diabetes e **infecciones dermatomucosas (forúnculos y tiñas)**, la hoja fresca se inhala para el tratamiento de cefalea y sinusitis; la maceración en alcohol es usada para fricciones como linimento para dolores reumáticos (33, 34, 35). Se les atribuye propiedad afrodisíaca, antidiarréica, antiinflamatoria, carminativa, diurética, emenagoga, espasmolítica y febrífuga (35, 36, 37). **Estudios de la actividad antimicótico de a maceración hidroalcohólica de las hojas no demostraron actividad anticándida, pero si se demostró que el cocimiento de las hojas presenta una ligera actividad contra *Epidermophyton floccosum*, no así contra otros cinco dermatofitos estudiados. En otros estudios ha demostrado actividad antibacteriana *in vitro* contra microorganismos como *P. alliaceae*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y levaduras de *Candida albicans* (37, 40).**

f. *Ocimum micranthum* Willd.

i) Familia

Lamiaceae (Labiatae)

ii) Nombre común

Albahaca de gallina, albahaca de monte, albahaca.

iii) Descripción taxonómica

Hierba anual, pequeña de hasta 50 cm de alto, de olor agradable, tallos erectos, ramosos y cuadrados. Hojas enteras, dentadas, opuestas, ovadas y frecuentemente en tonalidades moradas. Flores bilabiadas, color variable desde amarillo a blanco-moradas (25).

iv) Hábitat

Se dice que es originaria de Asia tropical, pero algunos autores afirman que es originaria de Centroamérica. Crece silvestre en climas cálidos y terrenos fértiles, muy raras veces en lugares frescos (25).

v) Usos medicinales

Se le han reportado usos para el dolor de oídos, dolor de cabeza, dolor de vientre, dolor de estómago, aire, calentura, dolor de muelas, después del parto, dolor de cuerpo, corazón, vista, nervios, tos, llagas y granos, regulador menstrual, mal de orín, diabetes, dolor de pecho, flujo, vómitos, cólicos, lombrices (41). El extracto etanólico de las hojas ha demostrado tener efectos cronotrópicos negativos y un efecto hipotensor (42).

IV. JUSTIFICACIÓN

Las micosis subcutáneas son infecciones que se inician cuando ciertos hongos habitantes del suelo se introducen bajo la piel mediante espinas o astillas, o como contaminantes de las heridas, de entre las cuales se encuentran la esporotricosis y la cromoblastomicosis.

La esporotricosis se caracteriza por linfadenitis ascendente y lesiones ulcerosas en la piel causadas por el hongo *Sporothrix schenckii*. Estas lesiones no sanan, a menos que se sometan a tratamiento, y pueden permanecer ulceradas por años. La esporotricosis sistémica puede causar problemas respiratorios y pulmonares, osteomielitis, artritis y meningitis. Generalmente, se trata con yoduros y la infección sistémica o diseminada se trata con anfotericina B o algunas veces con itraconazol. Sin embargo, existen muchas reacciones adversas al tratamiento como fiebre, náusea, vómitos, así como otros efectos más severos como tromboflebitis y daño renal a causa de su uso prolongado.

Por otro lado, la cromoblastomicosis es una micosis verrugosa crónica. Uno de los principales agentes etiológicos es *Fonsecaea pedrosoi*, el agente causal de mayor importancia en zonas tropicales y húmedas de América. La evolución es crónica, lenta, progresiva y asintomática. En la actualidad el tratamiento de elección es la 5-fluorocitocina y Anfotericina B, el cual ha fracasado en la enfermedad de larga duración incluyendo reacciones secundarias como fiebre, escalofríos, anorexia, cefalea, náuseas, vómitos y tromboflebitis, hasta daños más severos como vasoconstricción y lesiones renales.

En la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, de la Universidad de San Carlos de Guatemala, se han llevado a cabo varios estudios sobre la actividad antibacteriana y/o antifúngica de algunas plantas nativas guatemaltecas, sin embargo, no se ha realizado ningún estudio que demuestre la actividad antifúngica de las seis hierbas nativas de esta investigación, contra *Sporothrix schenckii* y *Fonsecaea pedrosoi*.

Las hierbas en estudio se escogieron por sus antecedentes etnomedicinales reportados o bien por mostrar en investigaciones anteriores alguna actividad contra bacterias, dermatofitos, infecciones dermatomucosas y/o en otros agentes micóticos patógenos (25-27, 33-35, 40, 41)

Actualmente el estudio de estas seis hierbas nativas es parte de un proyecto llevado a cabo por el Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala en colaboración con la Organización de Estados

Americanos (OEA), para el tamizaje de la actividad de plantas regionales contra hongos patógenos de relevante importancia a nivel americano como lo son *Sporothrix schenckii* y *Fonsecaea pedrosoi*.

Guatemala es un país tropical con una gran diversidad de bosques en los que crecen innumerables plantas, muchas de ellas con características medicinales, lo que genera un recurso importante en la búsqueda de nuevas alternativas para el tratamiento de diversas patologías. Esto aunado al hecho, que una alternativa natural de tratamiento reduzca o elimine los efectos secundarios y la alta toxicidad de los tratamientos convencionales.

V. OBJETIVOS

A. OBJETIVO GENERAL

Demostrar la actividad antifúngica de extractos de seis hierbas nativas guatemaltecas contra *Sporothrix schenckii* y *Fonsecaea pedrosoi*.

B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la actividad antifúngica *in vitro*, de los extractos etanólicos de seis hierbas nativas guatemaltecas contra *Sporothrix schenckii*.
2. Evaluar la actividad antifúngica *in vitro*, de los extractos etanólicos de seis hierbas nativas guatemaltecas contra *Fonsecaea pedrosoi*.
3. Determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los extractos etanólicos de las hierbas que presenten actividad contra *Sporothrix schenckii*.
4. Determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los extractos etanólicos de las hierbas que presenten actividad contra *Fonsecaea pedrosoi*.

VI. HIPÓTESIS

Al menos uno de los extractos etanólicos de las seis hierbas nativas guatemaltecas utilizadas en este estudio, presenta actividad antifúngica *in vitro* contra *Sporothrix schenckii* en cualquiera de sus fases y contra *Fonsecaea pedrosoi*.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

A. UNIVERSO DE TRABAJO

1. Universo

- a. Aislamientos de *Sporothrix schenckii* y *Fonsecaea pedrosoi*.
- b. Hierbas nativas guatemaltecas.

2. Muestra

- a. Cepas de *Sporothrix schenckii* y *Fonsecaea pedrosoi* aisladas de muestras clínicas de pacientes y proporcionadas por el Servicio de Micología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
- b. Extractos etanólicos de seis hierbas nativas guatemaltecas de uso medicinal.

3. Materiales

a. Equipo

- Autoclave
- Balanza analítica
- Campana de flujo laminar
- Estufa
- Incubadora a 25 °C y 36 °C
- Mechero Bunsen
- Microscopio
- Pipetas automáticas
- Refrigeradora
- Vortex

b. Reactivos

- Agar Sabouraud
- Agar Müller-Hinton enriquecido con sangre de carnero al 10%.
- Agua desmineralizada

- Agua destilada
- Anfotericina B
- Caldo BHI
- Etanol al 50%
- Etanol al 70%
- Fenol al 5%
- Medio de Takashio (Agar-agar, Dextrosa, Fosfato diácido de potasio KH_2PO_4 , Sulfato de sodio Na_2SO_4 , Peptona)
- Solución salina estéril.

c. Cristalería

- Beacker de 250 ml.
- Beacker de 500ml.
- Campanillas de Dirham
- Cámara de Neubauer
- Erlenmeyer de 250 ml
- Erlenmeyer de 500ml
- Pipetas automáticas de 10 – 1000 μl
- Probeta de 100 ml
- Tubos pirex con tapón de rosca de 15 ml.

d. Otros

- Algodón
- Asa de nicromo en argolla y en L
- Cajas de Petri
- Tips amarillos estándar 200 μl
- Tips azules estándar 1000ul
- Fósforos

B. PROCEDIMIENTO

1. Obtención de extractos etanólicos

Los extractos etanólicos de las hierbas a utilizar en este estudio serán proporcionados por el Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala. El extracto se obtiene moliendo la parte a utilizar de la planta, la cual se pesa y se coloca en el percolador con alcohol al 90%; la solución que se obtiene del percolador pasa el rotavapor y se destila, para luego desecarlo y obtener el rendimiento del extracto.

2. Obtención de cepas

Se utilizarán aislamientos de especímenes clínicos de *Sporothrix schenckii* y *Fonsecaea pedrosoi*, proporcionados por el Servicio de Micología, del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

3. Evaluación de la actividad antifúngica

Se utilizará como método de referencia de la actividad antifúngica el de Brancato & Holding (43,44), el cual ha sido utilizado previamente para demostrar actividad contra estos hongos (45, 46).

a. Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos etanólicos de las hierbas contra la fase miceliar de *Sporothrix schenckii* y *Fonsecaea pedrosoi*.

i) Preparación del medio de cultivo para hongos filamentosos

- Preparar tubos con 13.5 ml de agar Sabouraud
- Esterilizar, dejar enfriar a 50°C y agregar 1.5 ml de extracto de la planta a probar. Agitar. La concentración final es de 1 mg/ml.
- Verter en cajas de Petri estériles, dejar solidificar e incubar a 36°C durante 24 horas para chequear esterilidad.
- Guardar en refrigeración hasta el momento de su uso.

ii) Preparación de inoculo de hongos filamentosos

- Preparar medio Takashio (Sabouraud modificado para producción de esporas) con los siguientes reactivos: Dextrosa 0.6 g; Na₂SO₄ 0.3g; KH₂PO₄ 0.3 g; Peptona 0.3 g; Agar-agar 6.0 g. Agregarlo a 300 ml de agua, disolver, verter 6 ml en tubos con tapón de rosca, esterilizar en autoclave y dejar solidificar con el mayor declive posible. Incubar 48 horas a 25°C para descartar contaminación.
- Sembrar en este medio los hongos a ensayar e incubar a 25°C durante 21 días hasta obtener un crecimiento homogéneo (aproximadamente 15 días)
- Agregar a cada tubo 2 ml de agua destilada estéril y desprender el hongo con ayuda de una varilla.
- Trasvasar el material obtenido a viales con tapa de rosca. Agitar 1 minuto en vórtex y hacer un conteo de esporas en cámara de Neubauer.
- Llevar la suspensión a 100 esporas/μl, que es igual a 1×10^5 esporas/ml (aproximadamente 10 esporas/cuadrante) y almacenar en viales estériles en refrigeración.

iii) Inoculación de hongos filamentosos en placa

- Abrir cuatro agujeros en forma equidistante en las cajas con agar planta, con campanillas de Durham de 5 mm de diámetro.
- Tomar 30μl de la suspensión de esporas y depositar en los agujeros. Incubar a 25 °C por 14 días.
- Hacer 4 repeticiones en la misma forma, usar una caja con agar Sabouraud y etanol al 50% como control negativo; y como control positivo una caja con agar Sabouraud y anfotericina B (1 mg/ml)

iv) Lectura e interpretación de los resultados

- Medir el diámetro de la colonia del hongo en mm.
- Calcular el porcentaje de inhibición, comparando el diámetro contra el de las colonias en las cajas control.

- Tomar como positivos los extractos que reducen el diámetro de la colonia en un 75%.
- b. Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos etanólicos de las hierbas contra la fase levaduriforme de *Sporothrix schenckii*.
- i) Preparación del medio de cultivo para hongos levaduriformes
- Preparar tubos con 9.0 ml de agar Müller-Hinton enriquecido con sangre de carnero al 10 por ciento (43).
 - Esterilizar, dejar enfriar a 50°C y agregar 1.0 ml de extracto de la planta a probar. Agitar.
 - Verter en cajas de Petri estériles, dejar solidificar e incubar a 37°C durante 24 horas para chequear esterilidad.
 - Guardar en refrigeración hasta el momento de su uso.
- ii) Preparación del inóculo para hongos levaduriformes
- Sembrar el micelio del hongo en cajas de Petri con agar Müller-Hinton enriquecido con sangre de carnero al 10 por ciento, incubar a 37°C en jarra con candela (ambiente de 5% de CO₂) durante 3 a 5 días. Observar crecimiento de levaduras al microscopio.
- iii) Inoculación de levaduras en placa
- En las cajas con agar-planta inocular con un asa de nicromo las levaduras, haciendo 4 inoculaciones.
 - Incubar a 37°C durante 3 a 5 días.
 - Para el control negativo, sembrar por estrías la levadura en una caja con agar Müller-Hinton enriquecido con sangre de carnero al 10 por ciento sin extracto.
- iv) Lectura e interpretación de resultados
- Observar el crecimiento de la levadura en el medio:
Crecimiento positivo: NO ACTIVIDAD
Crecimiento negativo: ACTIVIDAD ANTILEVADURA

C. DISEÑO ESTADÍSTICO

1. Tipo de estudio

Experimental. La determinación y detección de la concentración de los extractos de las plantas que muestren actividad antifúngica se basará en una concentración de 0.2 mg/ml; haciendo diluciones de 0.1, 0.05 y 0.025 mg/ml en los casos que sean positivos, para determinar la concentración inhibitoria mínima.

2. Variables de interés

Variable independiente: Hierbas nativas guatemaltecas.

Variable dependiente: Actividad contra *Sporothrix schenckii* y *Fonsecaea pedrosoi* de los extractos etanólicos de las seis hierbas seleccionadas.

3. Validación del método

Actividad antifúngica en fase miceliar: se utilizará como control positivo agar Sabouraud con anfotericina B, que presenta un 100 por ciento de actividad antifúngica y como control negativo agar Sabouraud con etanol al 50 por ciento el cual debe presentar un crecimiento óptimo de la levadura. En cada ensayo se realizarán cuatro repeticiones.

Actividad antifúngica de la fase levaduriforme: se utilizará como control positivo agar Müller-Hinton enriquecido con sangre de carnero al 10 por ciento con anfotericina B de tal forma que se demuestre un 100 por ciento de actividad antifúngica y como control negativo agar Müller-Hinton enriquecido con sangre de carnero al 10 por ciento con etanol al 50 por ciento, en el cual deberá haber un crecimiento óptimo de la levadura. En cada ensayo se realizarán cuatro repeticiones.

4. Análisis de datos

Actividad antifúngica en fase miceliar: se utilizará como control positivo agar Sabouraud con anfotericina B, que presenta un 100 por ciento de actividad antifúngica y como control negativo agar Sabouraud con etanol al 50 por ciento, el cual debe presentar un crecimiento óptimo de la levadura. En cada ensayo se realizarán cuatro repeticiones.

Actividad antifúngica de la fase levaduriforme: se utilizará como control positivo agar Müller-Hinton enriquecido con sangre de carnero al 10 por ciento con anfotericina B, de tal forma que se demuestre un 100 por ciento de actividad antifúngica y como control negativo agar Müller-Hinton enriquecido con sangre de carnero al 10 por ciento con etanol al 50 por ciento, en el cual deberá haber un crecimiento óptimo de la levadura. En cada ensayo se realizarán cuatro repeticiones.

Las conclusiones serán validas únicamente para las plantas estudiadas.

VIII. RESULTADOS

A. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

El tamizaje antifúngico realizado demostró actividad positiva de los extractos de *Dorstenia contrajerba* y *Hedyosmum mexicanum*, contra la fase miceliar y levaduriforme de *S. schenckii* a una concentración de 0.2 mg/mL, (Tabla 1). Los extractos de *Baccharis trinervis*, *Lippia chiapasensis*, *Petiveria alliacea* y *Ocimum micranthum*, no presentaron actividad contra ambas fases del hongo (miceliar y levaduriforme).

Tabla 1. Tamizaje de la actividad antifúngica de los 6 extractos de hierbas seleccionados, contra la fase miceliar y levaduriforme de *Sporothrix schenckii*

Planta	Parte Utilizada	Actividad antifúngica (fase miceliar)	Actividad antifúngica (fase levaduriforme)
<i>Baccharis trinervis</i>	hoja	-	-
<i>Dorstenia contrajerba</i>	raíz	+	+
<i>Hedyosmum mexicanum</i>	hoja	+	+
<i>Lippia chiapasensis</i>	hoja	-	-
<i>Petivera alliacea</i>	raíz	-	-
<i>Ocimum micranthum</i>	hoja	-	-

(+) Actividad positiva a una concentración de 0.2 mg/mL

(-) Actividad negativa a una concentración de 0.2 mg/mL

Se observó también, actividad positiva del extracto de *Baccharis trinervis* contra *Fonsecaea pedrosoi* a una concentración de 0.2 mg/mL (Tabla 2). Los extractos de *Dorstenia contrajerba*, *Hedyosmum mexicanum*, *Lippia chiapasensis*, *Petiveria alliacea* y *Ocimum micranthum*, no mostraron actividad contra *F. pedrosoi* a esta concentración.

Tabla 2. Tamizaje de la actividad antifúngica de los 6 extractos de hierbas seleccionados, contra la fase miceliar de *Fonsecaea pedrosoi*

Planta	Parte Utilizada	Actividad antifúngica
<i>Baccharis trinervis</i>	hoja	+
<i>Dorstenia contrajerva</i>	raíz	-
<i>Hedyosmum mexicanum</i>	hoja	-
<i>Lippia chiapasensis</i>	hoja	-
<i>Petivera alliacea</i>	raíz	-
<i>Ocimum micranthum</i>	hoja	-

(+) Actividad positiva a una concentración de 0.2 mg/mL

(-) Actividad negativa a una concentración de 0.2 mg/mL

A los extractos de *Dorstenia contrajerva* y *Hedyosmum mexicanum* que demostraron actividad antifúngica contra la fase miceliar y levaduriforme de *S. Schenckii* se les determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM), obteniéndose resultados de 0.1 mg/mL y 0.05 mg/mL respectivamente para la fase miceliar y de 0.1 mg/mL en el caso de *Dorstenia contrajerva* para la fase levaduriforme e inactividad a las concentraciones ensayadas (0.1, 0.05, 0.025 mg/mL) para *Hedyosmum mexicanum* (Tabla 3).

Tabla 3. Concentración Mínima Inhibitoria de los extractos que mostraron actividad positiva contra la fase miceliar y levaduriforme de *Sporothrix schenckii*.

Planta	Parte Utilizada	CIM (fase miceliar)			CIM (fase levaduriforme)		
		0.1 mg/mL	0.05 mg/mL	0.025 mg/mL	0.1 mg/mL	0.05 mg/mL	0.025 mg/mL
		<i>Baccharis trinervis</i>	hoja	-	-	-	-
<i>Dorstenia contrajerva</i>	raíz	+	-	-	+	-	-
<i>Hedyosmum mexicanum</i>	hoja	+	+	-	-	-	-
<i>Lippia chiapasensis</i>	hoja	-	-	-	-	-	-
<i>Petiveria alliacea</i>	raíz	-	-	-	-	-	-
<i>Ocimum micranthum</i>	hoja	-	-	-	-	-	-

(+) Actividad positiva

(-) Actividad negativa

Al extracto de *Baccharis trinervis* que mostró actividad contra *Fonsecaea pedrosoi*, se le aplicó la técnica de determinación de la CIM con los mismos parámetros de concentración (0.1, 0.05 y 0.025 mg/mL) los cuales resultaron negativos en dichas concentraciones.

IX. DISCUSION DE RESULTADOS

En el presente estudio se seleccionaron seis hierbas nativas guatemaltecas, a las que se les determinó su actividad antifúngica contra la fase miceliar de *Sporothrix schenckii* y *Fonsecaea pedrosoi*, así como contra la fase levaduriforme de *S. schenckii*.

En la Tabla 1 se presentan los resultados obtenidos del tamizaje de la actividad antifúngica de los seis extractos contra *S. schenckii*, tomando como punto de corte una concentración de 0.2 mg/mL. De igual forma en la Tabla 3, se presentan los resultados obtenidos a diferentes concentraciones (0.1, 0.05, 0.025 mg/mL), observándose que tanto *Dorstenia contrajerva* y *Hedyosmum mexicanum* mostraron tener actividad en la fase miceliar como en la levaduriforme de *S. schenckii*, aunque al realizar la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) no se evidenció la misma susceptibilidad de *S. schenckii* en estas dos fases, notándose en este caso una mayor susceptibilidad del hongo al extracto en la fase miceliar, siendo *Hedyosmum mexicanum* el extracto con mejor actividad antifúngica (0.05 mg/mL) en dicha fase y *Dorstenia contrajerva* en la fase levaduriforme ya que tuvo la mejor actividad a una concentración de 0.1 mg/mL. Esta diferencia puede deberse a que el ergosterol presente en la pared celular del hongo se encuentra en diferentes proporciones en el micelio que en la levadura pudiendo en cierto modo favorecer, o bien evitar la acción de los compuestos químicos activos presentes en la planta (47, 48).

F. pedrosoi fue susceptible únicamente al extracto de *Baccharis trinervis* a una concentración de 0.2 mg/mL (Tabla 2). En esta especie, se han identificado algunos componentes químicos como poliacetilenos, flavones y un largo número de diterpenos, los cuales podrían ser los responsables de la actividad antifúngica contra *F. pedrosoi*, aunque es probable que estos compuestos se encuentren en una mayor concentración en otras partes de la hierba como en la raíz o las flores, dado que en este estudio la hoja no mostró tener actividad a concentraciones menores a 0.2 mg/mL (49).

Las variaciones de actividad de los extractos tanto en *S. schenckii* como en *F. pedrosoi*, así como la actividad a diferentes concentraciones y fases fúngicas se le puede atribuir al

mecanismo de acción de los compuestos activos presentes en estos extractos y que actúan de diferente forma química en cada fase fúngica. Estos compuestos probablemente actúen inhibiendo la biosíntesis de ergosterol o de otros esteroides presentes en la pared celular del hongo, lesionándola de esta forma y alterando su permeabilidad; como consecuencia se produce la pérdida de elementos intracelulares esenciales. Otro posible mecanismo por el cual pudieran actuar los compuestos activos de estos extractos con actividad positiva, es la inhibición de la biosíntesis de triglicéridos y fosfolípidos o bien 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; sin embargo, es difícil definir un mecanismo específico de acción ya que aún no se cuentan con estudios que lo demuestren (47, 48).

A estos extractos con actividad antifúngica se les determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM), realizando diluciones seriadas del mismo, encontrándose que (Tabla 3) *Dorstenia contrajerva* y *Hedyosmum mexicanum* tuvieron actividad antifúngica positiva contra la fase micelial de *Sporothrix schenckii* a 0.1 mg/mL y 0.05 mg/mL respectivamente. De igual manera en el caso del extracto de *Baccharis trinervis*, al determinar la CIM, este no presentó actividad antifúngica positiva contra *Fonsecaea pedrosoi* a concentraciones menores del punto de corte, el cual fue de 0.2 mg/mL.

Los resultados de la CIM de los extractos de *Baccharis trinervis*, *Dorstenia contrajerva* y *Hedyosmum mexicanum*, muestran una actividad interesante, ya que a ninguno de los tres extractos mencionados anteriormente se les ha demostrado alguna actividad antifúngica. Cabe resaltar también, que los extractos de hierbas que mostraron actividad en este estudio, en su uso etnomédico son utilizados como antiséptico, o bien, para el tratamiento de afecciones de la piel, heridas y/o inflamaciones, justificándose aun más su eficacia en el tratamiento de afecciones dérmicas (25, 26, 27, 30). Los extractos de *Lippia chiapasensis*, *Petiveria alliacea* y *Ocimum micranthum*, que no mostraron tener actividad contra ambos hongos indican la probabilidad de su eficacia en el uso etnomedicinal al hecho de poder encontrarse sus compuestos químicos activos en otros segmentos de la planta a una mayor concentración.

Con estos hallazgos se evidencia un punto de partida para que, tanto *Baccharis trinervis*, *Dorstenia contrajerva* y *Hedyosmum mexicanum* sean estudiados en mayor profundidad y pueda determinarse su utilidad y viabilidad como tratamientos alternativos para la esporotricosis y cromoblastomycosis. Por tanto, este hallazgo justifica estudios ulteriores de estos tres extractos, tales como el fraccionamiento guiado e identificación de los principios activos, así como la conveniencia de analizar la capacidad antibiótica de fuentes vegetales nativas, desconocidas por la industria farmacéutica y etnomedicinal.

X. CONCLUSIONES

1. En el tamizaje realizado a los seis extractos de hierba contra *Sporothrix schenckii*, *Dorstenia contrajerva* (raíz) y *Hedyosmum mexicanum* (hoja) fueron los únicos que presentaron actividad antifúngica positiva contra la fase miceliar y levaduriforme de *Sporothrix schenckii*.
2. El extracto etanólico de hoja de *Hedyosmum mexicanum* presentó la mejor actividad antifúngica contra la fase miceliar de *S. schenckii* (0.05 mg/ml).
3. El extracto etanólico de *Dorstenia contrajerva* (raíz) presentó la mejor actividad antifúngica contra la fase levaduriforme de *Sporothrix schenckii* (0.1 mg/mL).
4. El extracto etanólico de *Baccharis trinervis* (hoja) fue el único que presentó actividad antifúngica positiva contra *Fonsecaea pedrosoi* a una concentración de 0.2 mg/mL.
5. Basándose en los resultados obtenidos en la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) la fase miceliar de *S. schenckii*, es mas susceptible a los componentes químicos activos, presentes en los extractos con actividad positiva para este hongo.
6. Los extractos de *Lippia chiapasensis*, *Petiveria alliacea* y *Ocimum micranthum*, los cuales no demostraron tener actividad positiva en el tamizaje realizado contra *F. pedrosoi* y *S. schenckii*, y que muestran actividad etnomedicinal en el tratamientos de afecciones de la piel puede deberse a que los compuestos químicos activos se encuentren en otros segmentos de la planta y no en la parte específica utilizada en este ensayo.

XI. RECOMENDACIONES

1. Realizar otros estudios de tamizaje con otras plantas nativas guatemaltecas para determinar la actividad antifúngica de *Sporothrix schenckii* en su fase miceliar y levaduriforme, y así proporcionar más y mejores alternativas de tratamiento contra la esporotricosis.
2. Realizar otros estudios de tamizaje con otras plantas nativas guatemaltecas para determinar la actividad antifúngica de *Fonsecaea pedrosoi* en su fase miceliar y parasítica (células fumagoides o esclerotes de Mediar), de modo que se puedan ofrecer alternativas de tratamiento contra la cromoblastomycosis.
3. Realizar el fraccionamiento guiado e identificación de los principios activos de *Baccharis trinervis* (hoja), *Dorstenia contrajerva* (raíz) y *Hedyosmum mexicanum* (hoja) para definir el o los compuesto(s) químico(s) responsables de su actividad antifúngica.

XII. REFERENCIAS

1. Medline Plus. "Esporotricosis". Disponible en <<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/001338.htm>>
2. ISF. Index Fungorum. Disponible en <<http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>>
3. Rippon JW. Micología Médica; Hongos y Actinomicetos Patógenos. 3. ed. México: Interamericana, McGraw Hill, S.A. de C.V., 1990. 854p.
4. 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.
5. Ayats Ardite J. "Sporothrix schenckii". Disponible en <http://www.seimc.org/control/revi_Mico/espore.htm>
6. DoctorFungus. "Sporothrix spp." Disponible en <<http://www.doctorfungus.org/thefungi/sporothrix.htm>>
7. Mesa AC. *et al.* 2002. 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.
8. Logemann H. Manual Práctico de Micología Médica. Guatemala: Bayer, 1995. 227p.
9. Rodino S, Dorfman D. 2002. Splendore-Hoeppli Phenomenon. Archives of Pathology and Laboratory Medicine. Vol 125. No. 11. pp 1515-1516.
10. Stites D. *Et al.* Inmunología Básica y Clínica. 10ªed. México: Manual Moderno, S.A. de C.V., 2002. 917p´.
11. Anaissi EJ, McGinnis MR, Pfaller MA. Clinical Mycology. USA: Churchill Livingstone, 2003. 608p.
12. Teixidor JR. *et al.* Medicina Interna. Barcelona: Masson, S.A., 1998. 1938p.
13. Datzung BG. Farmacología básica y clínica. 8ed. México: El Manual Moderno, 2002. 1346p

14. Torres, BM. *et al.* Efecto del yoduro de potasio sobre la respuesta inmune en la esporotricosis. *Iberoamericana Micol.* 1997. 14:98-100
15. Smith CM y Reyard AM. *Farmacología.* Argentina: Médico Panamericano. 1995. 1135p.
16. JANSEEN-CILAG. “Cromoblastomicosis”. Disponible en <http://www.janssen-cilag.es/disease/detail.jhtml?itemname=fungal#micosis_sistemicas>
17. Doctor fungus. “Fonsecaea spp.” Disponible en <<http://www.doctorfungus.org/thefungi/Fonsecaea.htm>>
18. Academia Biomédica Digital VITAE. “La endemia de cromomicosis en Venezuela: una estrategia para su control”. Disponible en <<http://caibco.ucv.ve/caibco/CAIBCO/Vitae/VitaeVeinticuatro/Articulos/Micologia/ArchivosHTML/Exposicion.htm>>
19. Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolf K, Freedberg IM, Austen KF. Enfermedades micóticas con compromiso cutáneo. En: *Dermatología en Medicina General.* Shadomy HJ y Utz JP 4ta edición. Buenos Aires: Panamerican. 1997: 2587-90.
20. Agarwalla A, Canal B, Gavs UK, Aguawal S, Jabob M y Rani S. 2002. Chromoblastomicosis: report of two cases from Nepal. *J Dematol.* 44. 315-319.
21. Minotto R, Bernardi CD, Mallmann LF, Edelwis MI, Scroferneken. 2001. Chromoblastomicosis: A review of 100 cases in the state of Rio Grande, Brasil. *J Am Acad Derm.* 44. 585-592.
22. Naturamedic. “Fitoterapia”. Disponible en <www.naturamedic.com/fitoterapia.htm>
23. Medicina Naturista en Argentina. “Hierbas, Yuyos y Yuyitos”. Disponible en <www.medicinanaturista.com.ar/articulos/fito/>
24. Steinberg, Luis. Enplenitud.com. “Consideraciones útiles sobre Fitomedicina y Fitoterapia”. Disponible en <www.enplenitud.com/nota.asp?articuloID=172_>
25. Torres. 1995. *Plantas Medicinales Comunes de Honduras.* P.R. House *et al.* 1ª.edición. Honduras. Litografía López S. de R.L. 555p
26. Ayensa, E. S. *Medicinal Plants of the West Indies* Algonac. Reference Pulications. 1981.
27. Cáceres A. *et al.* *Furanocoumarins from the aerial parts of Dorstenia Contrajerva.* Elsevier Science 2001

28. Todzia, C.A. Chloranthaceae en Harling G & L. Anderson (eds). Flora of Ecuador No. 40. Sweden. 1990.
29. CTFS. "Árboles del Área del Canal de Panamá". Disponible en <<http://ctfs.si.edu/webatlas/spanish/hedybo.html>>
30. Zamora, Nelson. INBio. "*Hedyosmum mexicanum*". Disponible en <www.inbio.ac.cr>
31. Standley PC, Williams LO. Flora of Guatemala. Chicago: Fieldiana Bonany, vol 24, Vol. 9, 3-4m 1973, 417 p.
32. Standley PC, Steyermark JA |Flora of Guatemala. Fieldiana: Botany. 1946. 24 (9): 196
33. Cáceres A., Samayoa B., Tamizaje de la actividad antibacteriana de plantas usadas en Guatemala para el tratamiento de afecciones gastrointestinales. Cuadernos de Investigación No. 6-89. Guatemala, DIGI/USAC. 1989. Pp.81-82
34. House P, Lagos-Witte S Manual de 50 Plantas Medicinales de Honduras. Tegucigalpa, CONS-H/CIIR/UNAH. 1981. pp. 80-81
35. Morton JF. 1977. Some medicine plants of Central American markets. Quart. J. Crude Drug Res. 15. 165-192.
36. Orellana SL. 1987. Indian Medicine in Highland Guatemala. Albuquerque, University of New México Press. pp 226.
37. Robineau L Hacia una Farmacopea Caribeña. Santo Domingo, Enda-Caribe y Universidad Nacional Autónoma de Honduras, 1989 pp. 278-282
38. Cáceres A. 1991. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatomucosal infections. 1: Screening of 38 plant extracts for anticandidal activity. J. Ethnopharmacol. 33:277-283.
39. Cáceres A. 1991. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. 1. Screening for antimycotic activity of 44 plant extracts. J. Ethnopharmacol. 31:293-276.
40. Berdy, J. 1982. CRC Handbook of antimicrobial activity of plants popularly used in Guatemala for the treatment of dermatomucosal diseases. J. Ethnopharmacol. 20:223-237.
41. Cáceres A. *et al.* Doscientas Setenta Plantas Medicinales Iberoamericanas. Mahabir P. Gupta Editor. Bogotá Colombia. 1995. 1ª ed. Talleres de Editorial Presencia. 617p.

42. Ribeiro R., Fiuza de Melo, N.M. de Barros F. y Gómez C. Acute antihypertensive effect in conscious rats produced by some medicinal plants used in the state of Sao Paulo. *J. Ethnopharmacol.* 15(3):261-269.
43. Bancrato FP, Golding NS. The Diameter of the Mold Colony a Reliable Measure of Growth. *J of Mycol* 1953 45:848-863.
44. Cáceres A, *et al.* Manual de Procedimientos del proyecto Biodiversidad tropical Centroamericana (Organización de Estados Americanos –OEA-). Guatemala: Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos, 1999. 17p.
45. Gaitán IC. Actividad de doce plantas nativas guatemaltecas contra *Sporothrix scheenkii*. Guatemala: Universidad de San Carlos (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2005. 59p.
46. Del Cid NE. Actividad de diecisiete extractos de doce plantas nativas guatemaltecas contra *Fonsecaea pedrosoi*. Guatemala: Universidad de San Carlos (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2005. 52 p.
47. “Antifungicos y su mecanismo de acción”. Disponible en www.hsmq.cl/farmacia/farm022.htm
48. “Antifungicos”. Disponible en www.facmed.unam.mx
49. Jane MR, *et al.* Composition and antimicrobial activity of the essential oil from aerial parts of *Baccharis trinervis*. *Arkivoc.* 2004. Part VI. pp 59-65.

María José Rivera Castellanos
Tesisista

Lic. Armando Cáceres
Asesor

Lic. Osberth Morales
Revisor

Dr. Roberto Flores
Revisor

M.Sc. Vivian Matta de Ríos
Directora

Oscar Cobar Pinto Ph.D.
Decano