



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

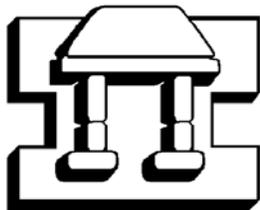
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

## ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LA PLANTA *Alternanthera caracasana*

T E S I S  
PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
B I Ó L O G O  
P R E S E N T A  
JULIETA OROZCO MARTÍNEZ

DIRECTOR Y ASESOR:  
DRA. Ma. MARGARITA CANALES MARTÍNEZ

LOS REYES IZTACALA, MÉXICO  
2007



IZTACALA



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

SINODALES:

DRA. CLAUDIA TZASNÁ HERNÁNDEZ DELGADO

DR. JOSÉ GUILLERMO ÁVILA ACEVEDO

DRA. MA. MARGARITA CANALES MARTÍNEZ

M. EN C. ANA MARÍA GARCÍA BORES

M. EN C. ÁNGEL DURÁN DÍAZ

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Fitoquímica  
(UBIPRO) DE LA Facultad de Estudios Superiores Iztacala  
UNAM.

“Nada en Biología tiene sentido si no  
es a la luz de la Evolución”

**Dobzhansky**

**A MIS PADRES,  
CON EL AGRADECIMIENTO  
Y CARIÑO  
QUE SE MERECE**

**A MI DIRECTORA DE TESIS,  
DRA. MA. MARGARITA CANALES MARTÍNEZ  
POR SU DEDICACIÓN  
Y CONSTANTE ESTÍMULO**

## AGRADECIMIENTOS

A la **UNAM** y a la **FESI** por haberme dado la oportunidad de alcanzar un anhelo y compartirme su saber y experiencia, cuyo espíritu siempre estará en mi alma y corazón.

A los profesores que realizaron la evaluación y revisión de este trabajo cuyos valiosos comentarios y consejos ayudaron a la conclusión del mismo:

A la **Dra. Margarita Canales**, por su impulso y valiosas palabras que siempre tendré presentes: "Rápido y Bien". Gracias por recibirme y apoyarme en todo momento.

A la **Dra. Tzasná Hernández**, por sus atinados consejos y por todo el apoyo que siempre me brindó. Gracias por su amistad y por los detalles que siempre tuvo conmigo, nunca se lo terminaré de agradecer.

Al Dr. **Guillermo Ávila**, por dejarme ser parte del laboratorio de Fitoquímica, por formar un maravillosos equipo de trabajo y por resolver mis dudas con gusto y paciencia.

A la **M. en C. Ana María García**, porque siempre estuvo dispuesta a aclarar mis dudas y por aquellos consejos que me dió.

Al **M. en C. Ángel Durán**, porque aparte de ser un gran maestro es un gran amigo, gracias por sus consejos y por aquellos desayunos que fueron momentos agradables.

## DEDICATORIAS

A mis padres, **Laura** y **Javier**, porque siempre me dieron lo mejor, espero que se sientan orgullosos de mi, sin ustedes no lo hubiera logrado, aunque todavía hay un largo camino que recorrer. Siempre contarán conmigo porque son mis padres y los amo.

A mi hermano **Xavier**, porque ser el hermano mayor ha sido difícil, pero aunque no lo creas, aprecio lo que has hecho por mi, fuiste mi ejemplo y mi inspiración para superarme.

A **Carlos**, por ser mi compañero durante esos días de experimentación y por tenerme paciencia en esos días de desesperación. Gracias apoyarme en todo momento. Sin ti todo hubiera sido más difícil, te quiero!!

A **Cintha, Elias, Nancy, Luis Carlos, Oscar, Andrea** y **Rebeca**, porque han sido muchos años de una maravillosa amistad en los cuales me han hecho reír en los momentos más duros. Gracias por su amistad, sé que siempre estarán conmigo.

A **Rosa, Angélica, Paloma, Auriz, Guadalupe, Valerio, Erick, Daniel, César** y **Carlos** porque fueron mi apoyo durante la carrera, con su presencia las clases fueron más amenas y aprendí cosas muy valiosas de cada uno de ustedes. Gracias por aquellos momentos inolvidables, por las lágrimas y las risas, sé que siempre contaré con ustedes.

A mi tía **Claudia**, porque siempre me cuidaste como tu hija. Gracias por tu apoyo constante y por enseñarme que la vida se disfruta mejor con un pay de limón.

A mi tío **Carlos**, porque eres un ejemplo a seguir y porque me diste la inspiración de esforzarme y llegar a ser parte de la UNAM.

A mis abuelitas **Delfinita, Carmen y Myriam** y a mis primos **Ale, Joel, Axel y Sebastián** porque son parte de este logro tan importante.

Y a todos aquellos que de alguna manera, compartieron conmigo y son parte ya, de una de las mejores etapas de mi vida.

A todos, mil gracias

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS.....	ii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
Antimicóticos.....	5
Familia Amaranthaceae.....	8
Género <i>Alternanthera</i> .....	9
<i>Alternanthera caracasana</i> HBK (Tianguis).....	10
OBJETIVOS.....	15
METODOLOGÍA.....	16
RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	22
Colecta de la planta.....	22
Obtención de los extractos.....	22
Evaluación cualitativa de la actividad antifúngica.....	24
Evaluación cuantitativa de la actividad antifúngica.....	25
Separación de los principios activos.....	31
Toxicidad general.....	36
DISCUSIÓN.....	37
CONCLUSIONES.....	42
PERSPECTIVAS.....	43
APÉNDICE 1 Clasificación de antifúngicos por su mecanismo de acción.....	44
APÉNDICE 2 Características de las cepas fúngicas.....	53
APÉNDICE 3 Método de inhibición del crecimiento radial.....	55
APÉNDICE 4 Método de difusión en agar o de Kirby-Baüer.....	57
APÉNDICE 5 Método de dilución en agar.....	60
APÉNDICE 6 Método de toxicidad general.....	61
APÉNDICE 7 Fenilpropanos.....	63
Cumarinas.....	63
LITERATURA CITADA.....	71

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Compuestos aislados de plantas de la familia Amaranthaceae.....	8
<b>Cuadro 2.</b> Compuestos aislados de plantas del género <i>Alternanthera</i> .....	9
<b>Cuadro 3.</b> Fraccionamiento del extracto clorofórmico mediante cromatografía en columna.....	20
<b>Cuadro 4.</b> Datos de herbario de <i>A. caracasana</i> .....	22
<b>Cuadro 5.</b> Actividad antifúngica de los extractos de la planta <i>A. caracasana</i> .....	24
<b>Cuadro 6.</b> Evaluación cuantitativa de los extractos crudos.....	25
<b>Cuadro 7.</b> Evaluación cuantitativa de M <sub>1</sub> .....	29
<b>Cuadro 8.</b> Actividad antifúngica de las fracciones obtenidas por cc del extracto clorofórmico sobre <i>R. solani</i> y <i>F. sporotrichum</i> .....	31
<b>Cuadro 9.</b> Evaluación cuantitativa de las fracciones activas sobre <i>F. sporotrichum</i> .....	32
<b>Cuadro 10.</b> Actividad antimicrobiana de algunas cumarinas.....	69

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> <i>Alternanthera caracasana</i> HBK.....	11
<b>Figura 2.</b> Estados donde se distribuye la especie.....	12
<b>Figura 3.</b> Zona de colecta de la planta <i>A. caracasana</i> .....	16
<b>Figura 4.</b> Rendimiento de los extractos obtenidos de <i>A. caracasana</i> .....	23
<b>Figura 5.</b> Rendimiento de la partición del extracto etanólico.....	23
<b>Figura 6.</b> Evaluación cuantitativa del extracto etanólico sobre <i>R. solani</i> y <i>A. niger</i> .....	26
<b>Figura 7.</b> Porcentajes de inhibición del extracto clorofórmico sobre <i>T. mentagrophytes</i> .....	26
<b>Figura 8.</b> Porcentajes de inhibición del extracto clorofórmico sobre <i>F. sporotrichum</i> .....	27
<b>Figura 9.</b> Porcentajes de inhibición del extracto clorofórmico sobre <i>A. niger</i> .....	27
<b>Figura 10.</b> Porcentajes de inhibición del extracto clorofórmico sobre <i>R. solani</i> .....	28
<b>Figura 11.</b> Porcentajes de inhibición del extracto etanólico sobre <i>A. niger</i> .....	28
<b>Figura 12.</b> Porcentajes de inhibición del extracto etanólico sobre <i>R. solani</i> .....	29
<b>Figura 13.</b> Porcentajes de inhibición de M <sub>1</sub> sobre <i>R. solani</i> .....	30
<b>Figura 14.</b> Porcentajes de inhibición de M <sub>1</sub> sobre <i>A. niger</i> .....	30
<b>Figura 15.</b> Porcentajes de inhibición de la fracción 10 sobre <i>F. sporotrichum</i> .....	33
<b>Figura 16.</b> Porcentajes de inhibición de la fracción 15 sobre <i>F. sporotrichum</i> .....	33
<b>Figura 17.</b> Porcentajes de inhibición de la fracción 21 sobre <i>F. sporotrichum</i> .....	34
<b>Figura 18.</b> Cromatograma de las fracciones comparadas con dos muestras puras de cumarinas.....	35

<b>Figura 19.</b> Estructura química de la 7-metoxi-cumarina y la 6,7-dimetoxi-cumarina.....	36
<b>Figura 20.</b> Actividad tóxica general del extracto clorofórmico.....	36
<b>Figura 21.</b> Sitio de acción de los antifúngicos.....	44
<b>Figura 22.</b> Estructura química de anfotericina B.....	45
<b>Figura 23.</b> Estructura química de la nistatina.....	46
<b>Figura 24.</b> Estructura química de ketoconazol.....	47
<b>Figura 25.</b> Estructura química del fluconazol.....	47
<b>Figura 26.</b> Estructura química de la nikomicina.....	48
<b>Figura 27.</b> Estructura química de la neumocandina C.....	49
<b>Figura 28.</b> Estructura química de la caspofungina.....	50
<b>Figura 29.</b> Estructura química de la flucitosina.....	51
<b>Figura 30.</b> Estructura química de la griseofulvina.....	52
<b>Figura 31.</b> Algunos ejemplos de cumarinas.....	64
<b>Figura 32.</b> Biosíntesis de los ácidos cinámicos, cumarinas y derivados del ácido salicílico.....	65

## RESUMEN

*Alternanthera caracasana* (Tianguis) ha sido utilizada desde tiempos muy antiguos como una planta medicinal, empleada para curar heridas, diarreas e inflamaciones. Los antecedentes de esta planta reportan que posee actividad antibacteriana, y el compuesto responsable de esta actividad es la 7-metoxi-cumarina. Las cumarinas poseen diversas actividades biológicas, como antioxidantes, antimicrobianos y antitumorales. Por lo que en el presente trabajo se evaluó la actividad antifúngica de *Alternanthera caracasana*.

Se obtuvieron tres extractos (hexánico, clorofórmico y etanólico) de 1, 590 gr de planta seca que fue colectada durante los meses de junio-agosto del 2005 en la FES Iztacala. Se utilizó el método de inhibición del crecimiento radial y de Kirby-Baüer para evaluar la actividad antifúngica de los extractos sobre seis cepas de hongos de importancia médica y agronómica. Se determinó que el extracto clorofórmico presentó actividad sobre *Aspergillus niger*, *Trichopyton mentagrophytes*, *Fusarium sporotrichum* y *Rhizoctonia solani*, mientras que el extracto etanólico fue activo sobre *Aspergillus niger* y *Rhizoctonia solani*.

Se obtuvo la  $CF_{50}$  y CFM de cada extracto activo mediante el método de dilución en agar. La cepa más sensible al extracto clorofórmico fue *Fusarium sporotrichum* ( $CF_{50}$ = 350  $\mu$ g/ml), en tanto que para el extracto etanólico fue *Rhizoctonia solani* ( $CF_{50}$ = 342.3  $\mu$ g/ml).

El extracto clorofórmico se fraccionó en una cromatografía en columna abierta de la cual se obtuvieron 12 fracciones activas sobre *Rhizoctonia solani* y 13 activas sobre *Fusarium sporotrichum*. A la fracción que mostró la mayor actividad se le determinó su composición mediante una cromatografía de HPLC y se comparó con 2 muestras de cumarinas puras (6,7-dimetoxi-cumarina y 7-metoxi-cumarina), encontrando que ambas cumarinas están presentes en la fracción.

Se evaluó la toxicidad del extracto clorofórmico mediante el método de toxicidad general sobre *Artemia salina*, obteniendo una CL<sub>50</sub> de 491.97 µg/ml, por lo que la toxicidad de este extracto se considera moderada.

Se concluye que probablemente las cumarinas, presentes en el extracto clorofórmico, sean las responsables de la actividad antifúngica del Tianguis.

## INTRODUCCIÓN

El hombre, a través del tiempo y de un largo proceso de aprendizaje, ha sabido apropiarse y sistematizar los recursos vegetales para su beneficio y atendiendo la utilidad que le proporcionan; así se encuentran plantas que se utilizan para diversos fines como alimenticio, forrajero, ornamental o medicinal. Las plantas medicinales forman parte importante de los recursos terapéuticos que emplea la medicina tradicional (Aguilar y Camacho, 1985).

Esta costumbre se ha conservado hasta nuestros días, principalmente en poblaciones rurales, lo que ha permitido acumular un amplio conocimiento etnofarmacológico, punto importante de partida en las investigaciones dirigidas a la búsqueda de productos naturales con actividad biológica (Mesa et al., 2004).

No fue sino hasta el siglo XX cuando los avances farmacológicos, químicos y tecnológicos hicieron posible la síntesis de muchos de los compuestos que actualmente se emplean en medicina. Aún así, un 25% de los medicamentos modernos se extraen de plantas. En muchos casos el empleo moderno de esos productos es similar al que les daba la antigua herbolaria (Argueta y Cano, 1994).

En México se conocen alrededor de 26,000 especies de plantas. Esta riqueza es un recurso que no se aprovecha totalmente, por lo que la investigación sobre nuevos compuestos con actividad farmacológica puede ser una alternativa para nuevas formas de manejo de los recursos vegetales (Mesa et al., 2004).

Las propiedades farmacológicas de las plantas es producida por una amplia variedad de sustancias químicas llamadas metabolitos secundarios, los cuales son compuestos orgánicos que antiguamente se consideraban que no tenían una función directa en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Sin embargo, se ha determinado que los metabolitos secundarios cumplen funciones fisiológicas y ecológicas en las plantas, ya que pueden actuar como agentes alelopáticos o

proporcionado protección contra la herbivoría. Estos metabolitos secundarios tienen una distribución restringida y por su abundancia o ausencia, proporcionan a la planta características químicas útiles para su clasificación botánica o su aprovechamiento por el hombre. Algunos ejemplos son los alcaloides, terpenoides, glicósidos, flavonoides y las cumarinas (Salisbury, 1992).

La fitoquímica se ha desarrollado como una disciplina que relaciona la química orgánica de los productos naturales y la bioquímica de la planta. La fitoquímica se interesa por la enorme variedad de sustancias orgánicas que son elaboradas y almacenadas por las plantas, la estructura química de esos compuestos, su biosíntesis, metabolismo, su distribución natural y su función biológica (Harborne, 1973).

La tendencia en los estudios fitoquímicos incluye la evaluación de la actividad biológica de los diferentes extractos, entre éstas actividades está la antifúngica (Harborne, 1973).

Por lo que en el presente trabajo se evaluó la actividad antifúngica de la planta *Alternanthera caracasana*.

## Antimicóticos

Los hongos constituyen un complejo grupo de organismos, tan grande que se calculan entre 100 a 300 mil especies. Los hongos tienen gran importancia en la conservación del equilibrio de la naturaleza, ya que degradan materia orgánica del ambiente a compuestos orgánicos simples y moléculas inorgánicas. De esta forma liberan y ponen a disposición de otros seres vivos: carbón, nitrógeno, fósforo, y otros componentes cruciales de los organismos muertos (Arenas, 2003; Prescott et al., 2004).

Pero por otro lado, los hongos son la principal causa de enfermedades de las plantas. Más de 5,000 especies atacan cosechas y plantas de jardín de interés comercial, así como muchas plantas silvestres. De forma parecida, los hongos son la causa de muchas enfermedades de los animales y de los seres humanos (Prescott et al., 2004).

En los últimos años las infecciones micóticas en el ser humano han mostrado un incremento importante en todo el mundo debido al aumento del número de pacientes inmunodeprimidos por diversas causas, como el síndrome de inmunodeficiencia adquirida, la quimioterapia en pacientes con cáncer y los receptores de trasplantes sometidos a la terapia inmunosupresora. Los hongos que se encuentran con mayor frecuencia implicados en las infecciones en este grupo de pacientes pertenecen a los géneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus*, *Histoplasma*, *Rhizopus*, *Acremonium*, *Fusarium* y al grupo de los dermatofitos (Mesa et al., 2004).

A pesar de la amplia variedad de infecciones que causan los hongos en el hombre y en las plantas, pocos agentes antifúngicos están disponibles para su tratamiento. Algunos de éstos se enlistan en el apéndice 1.

El concepto de antifúngico engloba cualquier sustancia capaz de producir una alteración en las estructuras de una célula fúngica de tal forma que se consiga

inhibir su desarrollo, alterando su viabilidad o capacidad de supervivencia, lo que facilita el funcionamiento de los sistemas de defensa del huésped (Gregorí, 2005).

El tratamiento de las infecciones por hongos ha tenido menos éxito que el de las infecciones bacterianas, en gran medida porque las células eucariotas de los hongos son mucho más parecidas a las humanas, por lo que muchos fármacos que inhiben o matan los hongos son bastante tóxicos para los seres humanos como la anfotericina B y la caspofungina, las cuales causan daño hepático y toxicidad renal (Prescott et al., 2004).

Las células fúngicas y las células de los mamíferos se diferencian en algunos aspectos, los cuales son fundamentales en el desarrollo de nuevos antimicóticos. Estas diferencias están representadas por la presencia de ergosterol, y no de colesterol como el esteroles más importante de la membrana celular; así como la producción de quitina y beta-glucanos como parte de la estructura de la pared celular. La pared celular en los hongos tiene una función similar a la de las bacterias, mientras que en las células animales está ausente, por lo que se considera ahora el sitio ideal para la inhibición de la biosíntesis de estos dos importantes componentes: glucanos y quitina (Arenas, 2003).

Algunas especies de hongos han desarrollado mecanismos de resistencia hacia algunos antifúngicos, explicada en parte porque la mayoría de estos fármacos son fungistáticos y por la administración prolongada de los tratamientos en el tiempo, que permite la selección de clones resistentes. Entre los mecanismos de resistencia utilizados por los hongos es importante hacer referencia a la sobreproducción de blancos enzimáticos, la implementación de vías metabólicas alternas y la producción de bombas de flujo externo que expulsan los medicamentos al espacio extracelular (Mesa et al., 2004).

El papel cada vez más importante de los hongos dentro de las enfermedades infecciosas en el ser humano y en las plantas ha ejercido una fuerte influencia sobre la investigación (Mesa et al., 2004).

En el mundo se ha venido explorando y valorado el uso de productos naturales como fuente de nuevos y variados agentes antimicóticos, entre ellos el uso de plantas medicinales. Por lo que es necesario incrementar las investigaciones desde el punto de vista químico farmacológico de las plantas medicinales, enfocándose al estudio de nuevos principios activos o moléculas prototipos para el desarrollo de compuestos farmacológicamente activos, menos tóxicos, más selectivos y por lo tanto más eficaces (Mesa et al., 2004).

Por lo antes mencionado, en este trabajo se evaluó la actividad antifúngica de la planta *Alternanthera caracasana* HBK, la cual pertenece a la familia Amaranthaceae.

## Familia Amaranthaceae

La familia Amaranthaceae comprende alrededor de 65 géneros y 900 especies. La mayoría de ellas son hierbas o subarbustos con unos cuantos árboles y trepadoras (Metcalf y Chalk, 1957). Es una familia ampliamente extendida cuyo hábitat se encuentra en regiones tropicales y subtropicales. Un gran número son plantas ornamentales de jardín, en especial las especies de los géneros *Alternanthera*, *Amaranthus*, *Celosia* e *Iresine* (Benson, 1979).

Los compuestos antimicrobianos de la familia Amaranthaceae, han sido poco estudiados, sin embargo se han aislado otro tipo de compuestos importantes para la industria farmacéutica y alimenticia (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Compuestos aislados de plantas de la familia Amaranthaceae.

Compuesto	Autores	Importancia
Esteroles (espinasterol, 7-estigmasterol, sitosterol y estigmasterol).	Patterson et al., 1991; Xu et al., 1986.	Farmacéutica
Betainas (trigonelina y glicinabetaina).	Blunden et al., 1999.	Farmacéutica
Betalainas.	Cai et al., 2005.	Alimenticia
Oxalato de calcio.	Siener et al., 2006.	Alimenticia

Dentro de la familia Amaranthaceae se encuentra el género *Alternanthera*, género al que pertenece la planta a estudiar en el presente trabajo.

## Género *Alternanthera*

*Alternanthera* es el nombre genérico que deriva del latín *alternans* (alternado) y *anthera* (antera), haciendo referencia a la estructura floral, en la que los estambres con antera alternan con estaminodios sin antera (Rzendowski y Rzendowski, 1979).

Las plantas del género *Alternanthera* son cosmopolitas, principalmente de América tropical y subtropical. Se encuentran aproximadamente 170 especies distribuidas en todo el mundo, algunas de estas son plantas acuáticas como *A. cardinalis* y *A. reineckii* (Rzendowski y Rzendowski, 1979).

Del género *Alternanthera*, se han realizado estudios en los cuales principalmente se han aislado flavonoides (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Compuestos aislados de plantas del género *Alternanthera*.

<b>Autores</b>	<b>País</b>	<b>Especie</b>	<b>Estudio</b>
Zhou et al., 1988.	U.S.A	<i>A. philoxeroides</i>	Aislaron la estructura de alternantina, un flavonoide C-glicosilado.
Brochado et al., 2003.	Brasil	<i>A. brasiliana</i>	Identificaron y aislaron los flavonoides robinobiosidos y ritinosidos.
Salvador y Dias., 2004.	Brasil	<i>A. maritima</i>	Aislaron flavonoides C-glicosilados y esteroides.
Guerra et al., 2003.	Brasil	<i>A. tenella</i>	Encontraron que el extracto acuoso tiene propiedad antitumoral e inmunoestimuladora

## ***Alternanthera caracasana* HBK (Tianguis)**

Como se mencionó anteriormente en el presente estudio se evaluó la actividad antifúngica de *A. caracasana*, por lo que a continuación se describen las características de esta especie.

### **A) CLASIFICACIÓN:**

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Caryophyllidae

Orden: Caryophyllales

Familia: Amaranthaceae

Género: *Alternanthera*

Especie: *Alternanthera caracasana* HBK

### **B) SINÓNIMO:**

*Alternanthera repens*.

### **C) NOMBRE COMÚN:**

Temix-tapextli, Tianguis (Estado de México), Tianguis pepetla (Hidalgo), Tianguistumina, Tlalpetate, Tumina (Michoacán), Verdolaga cimarrona, Verdolaga de puerco, Witichókare (tarahumara) (Argueta et al., 1994).

#### **D) DESCRIPCIÓN:**

*A. caracasana* es una hierba rastrera con los tallos ramificados que parecen alfombra. Con las hojas ovales u ovado-espatuladas, carnosas de 1 cm. de largo; los grupos de flores están en cabezuelas de color blanquecino, parecen estrellas que están colocadas entre las hojas (Argueta et al., 1994; Martínez, 1996) (Figura 1).

#### **E) DISTRIBUCIÓN:**

La planta *A. caracasana* se distribuye desde el sureste de Estados Unidos hasta Argentina. También en Asia y en el sur de Europa (Rezendowski y Rezendowski, 1979). En México se localiza en los estados de Baja California Sur, Coahuila, Chihuahua, Nuevo León, Durango, Nayarit, Jalisco, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo, Estado de México, Distrito Federal, Veracruz, Puebla y Chiapas (Argueta et al., 1994) (Figura 2).



**Figura 1.** *Alternanthera caracasana* HBK.



**Figura 2.** Estados donde se distribuye la especie.

#### **F) BOTÁNICA Y ECOLOGÍA:**

*A. caracasana* es probablemente originaria de América tropical y subtropical, presente en climas cálidos, semicálidos y templados, desde el nivel del mar hasta los 2,700 m. Está asociada a terrenos de cultivo, bosque tropical caducifolio y subcaducifolio, bosque espinoso, matorral xerófito, bosque mesófilo de montaña, bosque de encino, de pino y mixto de pino-encino (Argueta et al., 1994).

#### **G) ETNOBOTÁNICA:**

La planta completa se consume cruda o en té, se usa contra la fiebre, males estomacales, indigestión y dolores de cabeza. La raíz se utiliza contra la tifoidea y como purgante pero también se emplea contra padecimientos urinarios. Para bajar la calentura del sarampión, se toma el cocimiento de la raíz, una taza tres veces al día. En el tratamiento de sarampión, viruela y varicela, para hacerlas brotar pronto

y bajar la fiebre se baña a los niños enfermos con el cocimiento de la raíz (Argueta et al., 1994).

No se tiene definida la parte de la planta que se usa contra el dolor de estómago, estreñimiento, empacho, cólicos, diarrea, vesícula sucia y para combatir la fiebre intestinal. Se toma el cocimiento en caliente o se ponen lienzos en la parte afectada. Se usa para padecimientos del sistema digestivo, genitourinario, infecciones, sistema músculo-esquelético y del sistema nervioso (Argueta et al., 1994).

#### **H) HISTORIA:**

En el siglo XVI, Francisco Hernández dice que “la raíz purga todos los humores por el conducto inferior” (Argueta et al., 1994).

Francisco Flores, en el siglo XIX, menciona que los chichimecas la empleaban para combatir las heridas causadas por flechas envenenadas bebiendo los zumos de esta hierba, y agrega, que el zumo de las hojas era de utilidad para las almorranas así como en colutorios para las úlceras de la boca, en la gingivitis, cuando la inflamación no era intensa y como refrigerante para los accesos febriles (Argueta et al., 1994).

En el siglo XX, Maximino Martínez enumera lo siguiente: anticatarral, anticrotálico, antipirético, antiséptico intestinal, astringente, arroja los cálculos, desflema, diaforético, diurético, eupéptico, expulsa los gusanos de las úlceras, verrugas y vómitos de sangre. Luis Cabrera, la registra como aperitivo, diurético, para enfermedades exantémicas, fiebre, tifoidea, tifus exantemático y como un tónico (Argueta et al., 1994).

La planta *Alternanthera caracasana*, también conocida en México como tianguis, en la actualidad se recomienda con frecuencia para fiebres, y afecciones del aparato digestivo y de la piel (Argueta et al., 1994).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Con lo antes mencionado se asume que *A. caracasana* es poseedora de una gran variedad de metabolitos secundarios, los cuales le atribuyen a la planta diversas actividades biológicas. También es importante mencionar que la cumarina aislada por Canales et al., 2005 se ha reportado con propiedades antimicrobianas, por lo que se supuso que este metabolito puede tener actividad antifúngica. Por esto, los objetivos de este trabajo se encuentran a continuación.

## **Antecedentes de *A. caracasana***

Zavala et al., 1998, mostraron la actividad antidiarreica del extracto de metanol y acuoso de *A. repens*, sobre ratas con diarrea inducida con aceite de risino y sulfato de magnesio.

Sanoko et al., 1999, aislaron saponinas triterpénicas del extracto de metanol de las partes aéreas de *A. repens*.

Benavides, 2004, evaluó el efecto antiespasmolítico del extracto acuoso, obteniendo que los extractos polares y las fracciones de hojas de *A. repens* inhibieron la contracción intestinal inducida por serotonina, cloruro de potasio y cloruro de calcio.

Canales et al., 2005, demostraron la actividad antibacteriana del extracto de acetato de etilo sobre bacterias gram positivas y negativas. Además, se aisló la 7-metoxi-cumarina, metabolito responsable de esta actividad.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL:

- Evaluar la actividad antifúngica de los extractos de la planta *Alternanthera caracasana*.

### OBJETIVOS PARTICULARES:

- Obtener los extractos herbales de distinta polaridad (hexánico, clorofórmico y etanólico) de *Alternanthera caracasana*.
- Evaluar la actividad antifúngica de los extractos de manera cualitativa y cuantitativa sobre hongos patógenos de importancia médica y agronómica.
- Fraccionar el extracto activo.
- Evaluar la toxicidad general del extracto activo.

# METODOLOGÍA

## 1.-COLECTA DE LA PLANTA.

*A. caracasana* fue colectada en los jardines del área deportiva de la FES Iztacala, durante los meses de junio-agosto del 2005; se depositó un ejemplar en el herbario IZTA para su identificación y número de registro.



**Figura 3.** Zona de colecta de la planta *A. caracasana*.

## **2.-OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS.**

Los extractos de *A. caracasana* se obtuvieron por el método de maceración. Se colocaron 1,590 gr de la planta seca y molida en un recipiente de vidrio y se agregaron solventes en orden creciente de polaridad (hexanos, cloroformo y etanol), dejando cada solvente por 4 días aproximadamente. Una vez obtenidos los extractos se procedió a filtrarlos, posteriormente se destiló el exceso de solvente a presión reducida en un rotavapor. Los extractos se colocaron en recipientes de vidrio con la finalidad de completar la evaporación del solvente (Domínguez, 1979). Se realizó una partición con 5 gr del extracto etanólico con hexanos (H<sub>1</sub>) y metanol (M<sub>1</sub>) para determinar en que polaridad se presentaba la actividad antifúngica y para ver si esta incrementaba.

## **3.- EVALUACIÓN CUALITATIVA DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.**

Se utilizaron seis especies de hongos de importancia médica y agronómica: *Fusarium sporotrichum* (ATCC NRLL3299), *F. moniliforme*, *Aspergillus niger*, *Trichophyton mentagrophytes* (donadas por el laboratorio de Fisiología Vegetal de la UBIPRO, FES-I), *Rhizoctonia solani* (donada por el INIFAP, Celaya) y *Candida albicans* (donadas por la CUSI FES-I) (Apéndice 2).

La evaluación cualitativa para *A. niger*, *T. mentagrophytes*, *F. sporotrichum*, *F. moniliforme* y *R. solani* se realizó con el método de inhibición del crecimiento radial (Wang y Bun, 2002). Se emplearon sensidiscos que se impregnaron con 2000 µg de cada extracto; el control positivo se impregnó con 7 µg de ketoconazol y como control negativo se utilizaron sensidiscos con 10 µl de cada uno de los solventes. Todos los ensayos se realizaron por triplicado (Apéndice 3).

La evaluación cualitativa para *C. albicans* se realizó con el método de difusión en agar o de Kirby-Baüer (Koneman et al., 1985). Los sensidiscos se impregnaron con 2000 µg del extracto. Como control positivo se utilizaron sensidiscos con 25 µg de nistatina, y como control negativo sensidiscos con 10 µl de solvente. Todos los ensayos se realizaron por triplicado (Apéndice 4).

La actividad antifúngica de la partición ( $H_1$  y  $M_1$ ) solamente se evaluó sobre *A. niger* y *R. solani* con el método de inhibición del crecimiento radial (Wang y Bun, 2002). Usando sensidiscos con 2000 µg de cada partición; como control positivo se utilizaron sensidiscos con 7 µg de ketoconazol y como control negativo sensidiscos con 10 µl de cada uno de los solventes. Todos los ensayos se realizaron por triplicado (Apéndice 3).

#### **4.- EVALUACIÓN CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.**

Para la determinación de la concentración fungicida media ( $CF_{50}$ ) y la concentración fungicida mínima (CFM), se utilizó el método de dilución en agar (Wang y Bun, 2002) (Apéndice 5). Las concentraciones empleadas fueron: 2 000, 1 500, 1 000, 750, 500 y 250 µg/ml. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

#### **5.- FRACCIONAMIENTO DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS.**

##### **A) Cromatografía en columna:**

A partir del extracto clorofórmico se realizó una cromatografía en columna (cc). La fase estacionaria consistió en silica gel de malla 70-230 µm, para obtener una mejor separación. Previamente se realizó una prueba determinar la fase móvil adecuada para la columna experimental.

La cromatografía en columna se realizó con 19 gr del extracto clorofórmico, la fase móvil consistió en mezclas hexanos, diclorometano y metanol en orden

creciente de polaridad. Se obtuvieron 289 alícuotas de 50 ml que se agruparon en 28 fracciones (Cuadro 3) a las cuales se les evaluó la actividad antifúngica sobre *A. niger*, *F. sporotrichum* y *R. solani*.

Con la finalidad de agrupar las alícuotas similares se realizaron cromatografías en placa fina, se utilizaron cromatofolios de gel sílice con indicador U.V. Se revelaron con luz U.V (366-254 nm) y mediante la reacción con sulfato cérico.

De las fracciones obtenidas de cromatografía en columna se escogieron tres para calcular la  $CF_{50}$  y la CFM sobre *F. sporotrichum*, éstas fueron seleccionadas porque se observó que presentaban mayor actividad.

#### B) Cromatografía de líquida alta presión (HPLC):

Se realizó una cromatografía líquida de alta presión (HPLC) con las siguientes condiciones: columna Discovery C-18, con tamaño de partícula de 25-4.6-5.0  $\mu\text{m}$ , se corrió con una mezcla de metanol-acetonitrilo-agua (25-25-50). El cromatograma se realizó con la fracción 30 de la prueba cromatográfica y con la fracción 10 de la cromatografía en columna experimental. Ambas fracciones se compararon con dos muestras de cumarinas puras: 6,7-dimetoxi-cumarina y 7-metoxi-cumarina (aislada por Canales et al., 2005).

**Cuadro 3.** Fraccionamiento del extracto clorofórmico mediante cromatografía en columna.

<b>Eluyente</b>	<b>Proporción (100%)</b>	<b>Alícuota</b>	<b>Fracción</b>
Hexanos	100	1-2	1
		3-4	2
		5-7	3
		8-12	4
		13-18	5
Hexanos- Diclorometano	90:10	19-25	6
		26-27	7
	80:20	28	8
		29-34	9
	70:30	35-38	10
		39-40	11
		41-43	12
		44-52	13
	60:40	53-54	14
		55-70	15
	50:50	71-79	16
		80-84	17
	40:60	85-93	18
		30:70	94-96
	20:80		97-108
		109-123	21
124-135		22	
136-162		23	
10:90	163-184	24	
	185-196	25	
Diclorometano	100	197-247	26
Diclorometano-Metanol	90:10	248-280	27
	50:50	281-289	28

## **6.- TOXICIDAD GENERAL.**

La toxicidad general se evaluó con el extracto clorofórmico debido a que fue el que presentó mayor actividad. Los ensayos se realizaron con larvas nauplio II de *Artemia salina*, siguiendo el método de McLaughlin (1991), a concentraciones de 1 000, 100 y 10 µg/ml. Todos los ensayos se realizaron por triplicado (Apéndice 6).

## **7.- ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.**

Las pruebas estadísticas que se realizaron para la evaluación del método cuantitativo de la actividad antifúngica y para el método de toxicidad general. Para ambos métodos se realizaron análisis de regresión (lineal o logarítmica), según el modelo que tuviera el mejor coeficiente de determinación ( $R^2$ ).

## RESULTADOS Y ANÁLISIS

### 1.- COLECTA DE LA PLANTA.

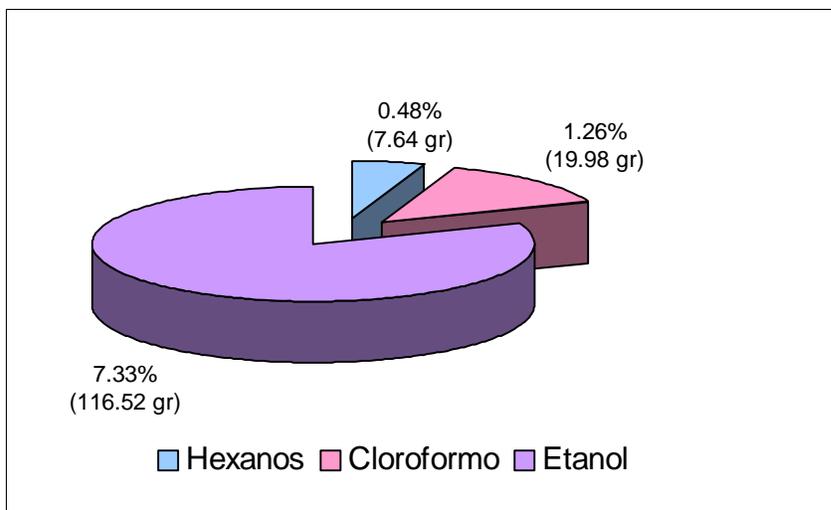
Se colectaron 1,590 gr de la planta *A. caracasana* en la FES Iztacala durante los meses de junio-agosto (2005). Los datos de herbario se muestran en el cuadro 4.

**Cuadro 4.** Datos de herbario de *A. caracasana* .

<b>Familia</b>	Amaranthaceae
<b>Nombre científico</b>	<i>Alternanthera caracasana</i> HBK
<b>Nombre común</b>	Tianguis
<b>No. de registro</b>	12136

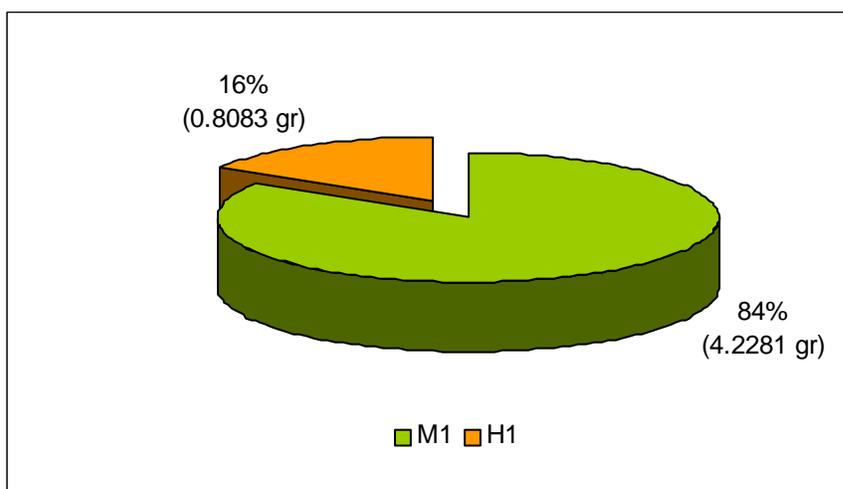
### 2.-OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS.

El rendimiento obtenido de cada uno de los extractos de *A. caracasana* se muestra en la figura 4. Se observa que el extracto de más alto rendimiento correspondió al extracto etanólico con 116.52 gr (7.33%) y el rendimiento más bajo se obtuvo en el extracto hexánico con 7.64 gr (0.48%).



**Figura 4.** Rendimiento de los extractos obtenidos de *A. caracasana* (El porcentaje con respecto a 1,590 gr de planta seca).

De la partición de 5 gr del extracto etanólico se obtuvo mayor rendimiento en M<sub>1</sub> (4.2281 gr) que en H<sub>1</sub> (0.8083 gr) (Figura 5).



**Figura 5.** Rendimiento de la partición de 5 gr del extracto etanólico.

### 3.- EVALUACIÓN CUALITATIVA DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.

En el cuadro 5 se muestran los resultados de la actividad antifúngica de los extractos obtenidos de *A. caracasana*. Se observa que el extracto clorofórmico presentó actividad en cuatro cepas (*A. niger*, *F. sporotrichum*, *T. mentagrophytes* y *R. solani*), y el extracto etanólico fue activo sobre dos cepas (*A. niger* y *R. solani*). El extracto hexánico no presentó actividad.

De la partición del extracto etanólico, la parte polar (M<sub>1</sub>) tuvo actividad sobre *R. solani* y *A. niger*, y la parte no polar (H<sub>1</sub>) solamente presentó actividad sobre *R. solani* (Cuadro 5).

**Cuadro 5.** Actividad antifúngica de los extractos crudos de *A. caracasana*.

Hongo	Extractos		Partición del extracto etanólico	
	Cloroformo	Etanol	H <sub>1</sub>	M <sub>1</sub>
<i>Aspergillus niger</i>	A	A	–	A
<i>Fusarium moniliforme</i>	–	–	–	–
<i>Fusarium sporotrichum</i>	A	–	–	–
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	A	–	–	–
<i>Rhizoctonia solani</i>	A	A	A	A
<i>Candida albicans</i>	–	–	–	–

(A) activo, (-) no activo

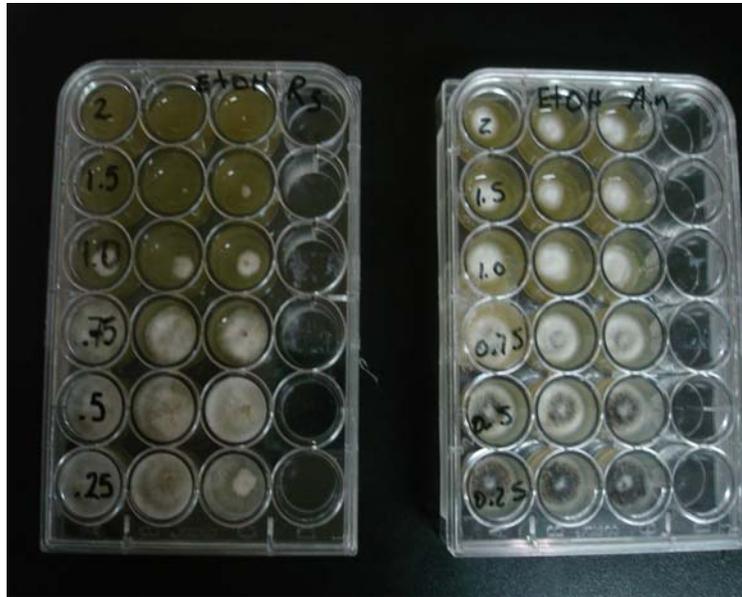
#### 4.- EVALUACIÓN CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.

En el cuadro 6 se muestra la CF<sub>50</sub> y la CFM de los extractos activos comparados con el control positivo (ketoconazol). Se observa que la cepa más sensible al extracto clorofórmico fue *F. sporotrichum* (CF<sub>50</sub>= 350 µg/ml), en tanto que para el extracto etanólico fue *R. solani* (CF<sub>50</sub>= 342.3 µg/ml) (Figura 6). En las figuras 7 a 12 se muestran los porcentajes de inhibición de cada una de las cepas sensibles.

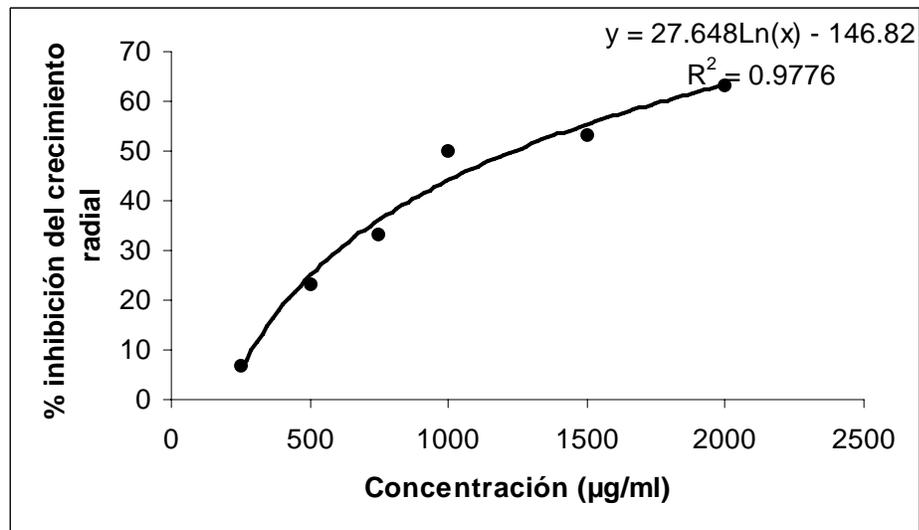
**Cuadro 6.** Evaluación cuantitativa de los extractos.

Hongos	Cloroformo (µg/ml)		Etanol (µg/ml)		Ketoconazol (µg/ml)	
	CF <sub>50</sub>	CFM	CF <sub>50</sub>	CFM	CF <sub>50</sub>	CFM
<i>T.m</i>	1,235.1	7,532.63	nd.	nd.	0.109	0.88
<i>F.s</i>	350.0	2,400.73	nd.	nd.	0.094	3.50
<i>A.n</i>	977.1	2,960.39	1,534.0	7,714.34	415.1	2,688.0
<i>R.s</i>	840.2	2,000.00	342.3	1,500.0	0.225	7.00

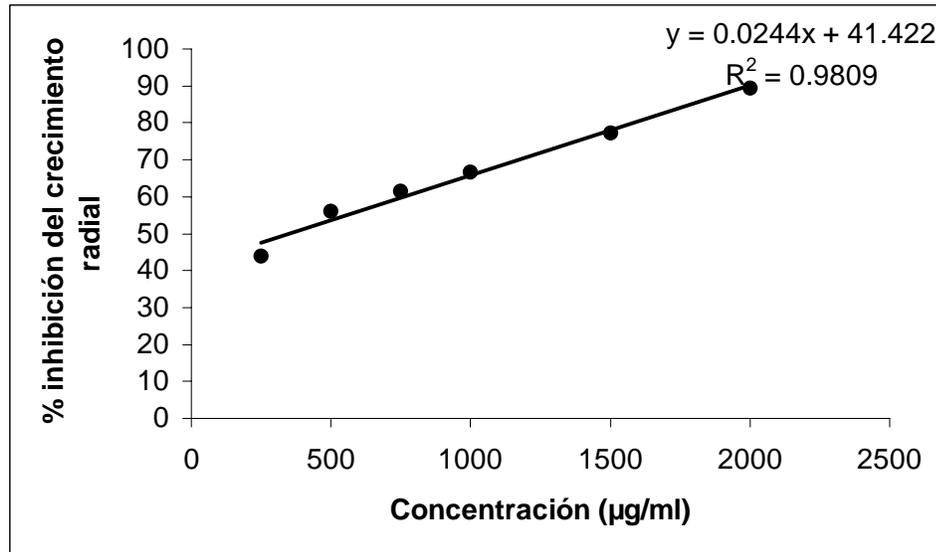
CF<sub>50</sub>, concentración fungicida media; CFM, concentración fungicida mínima; *T.m*, *Trichophyton mentagrophytes*; *F.s*, *Fusarium sporotrichum*; *A.n*, *Aspergillus niger*; *R.s*, *Rhizoctonia solani*; nd, no determinado.



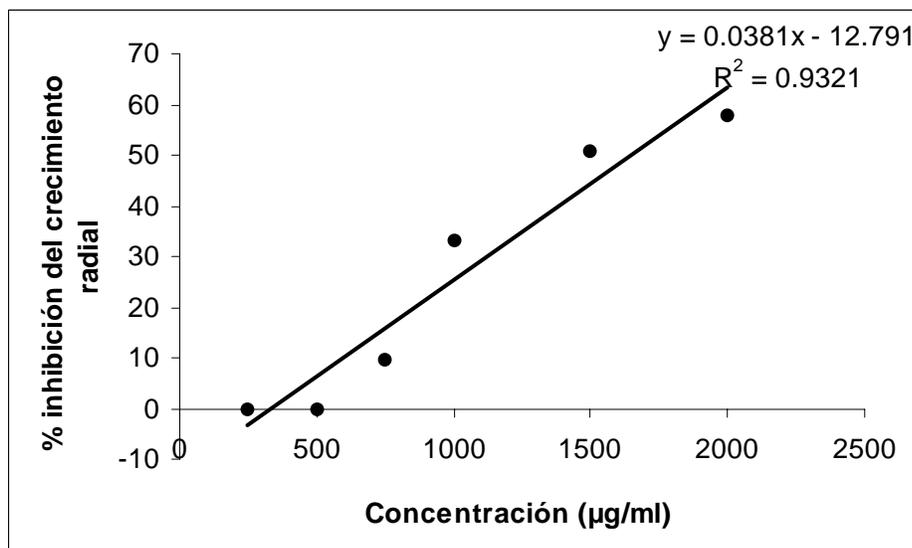
**Figura 6.** Evaluación cuantitativa del extracto etanólico sobre *R. solani* (izquierda) y *A. niger* (derecha).



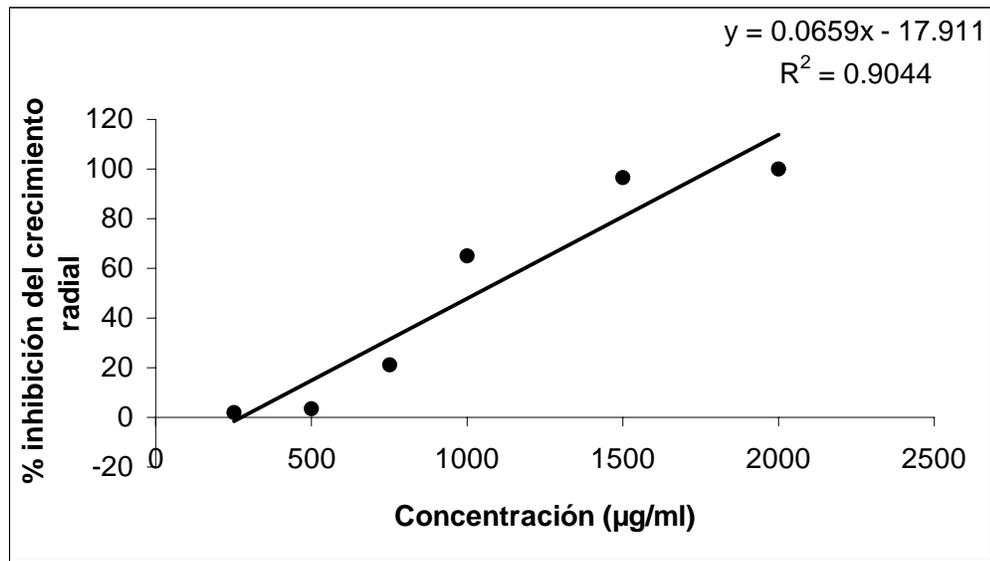
**Figura 7.** Porcentajes de inhibición del extracto clorofórmico sobre *T. mentagrophytes*.



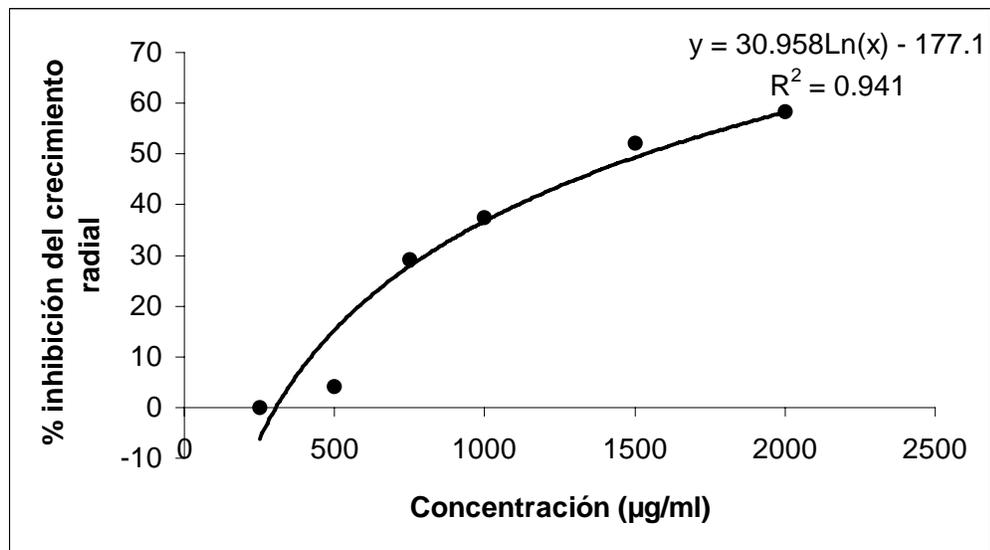
**Figura 8.** Porcentajes de inhibición del extracto clorofórmico sobre *F. sporotrichum*.



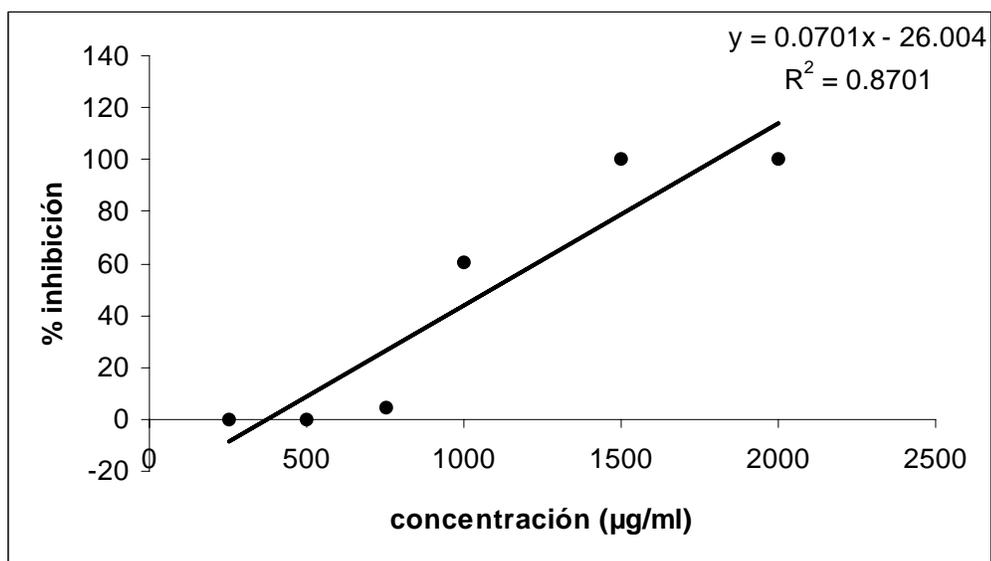
**Figura 9.** Porcentajes de inhibición del extracto clorofórmico sobre *A. niger*.



**Figura 10.** Porcentajes de inhibición del extracto clorofórmico sobre *R. solani*.



**Figura 11.** Porcentajes de inhibición del extracto etanólico sobre *A. niger*.



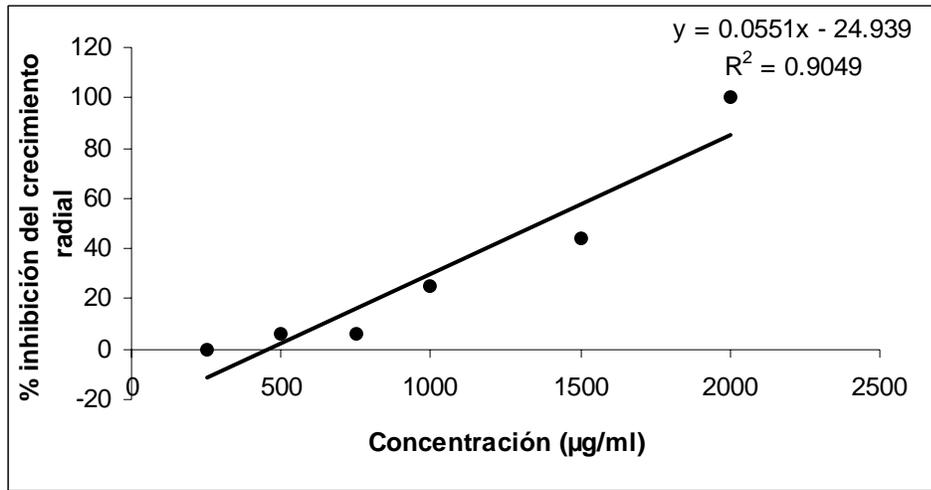
**Figura 12.** Porcentajes de inhibición del extracto etanólico sobre *R. solani*.

En cuanto a la parte polar de la partición del extracto etanólico ( $M_1$ ) (Cuadro 7), se muestra que la cepa más sensible fue *R. solani* ( $CF_{50}=1,360.05 \mu\text{g/ml}$ ). En el caso de *A. niger* se necesita una concentración mayor ( $CF_{50}= 4,387.11 \mu\text{g/ml}$ ). En las figura 13 y 14 se muestran los porcentajes de inhibición para estas especies fúngicas.

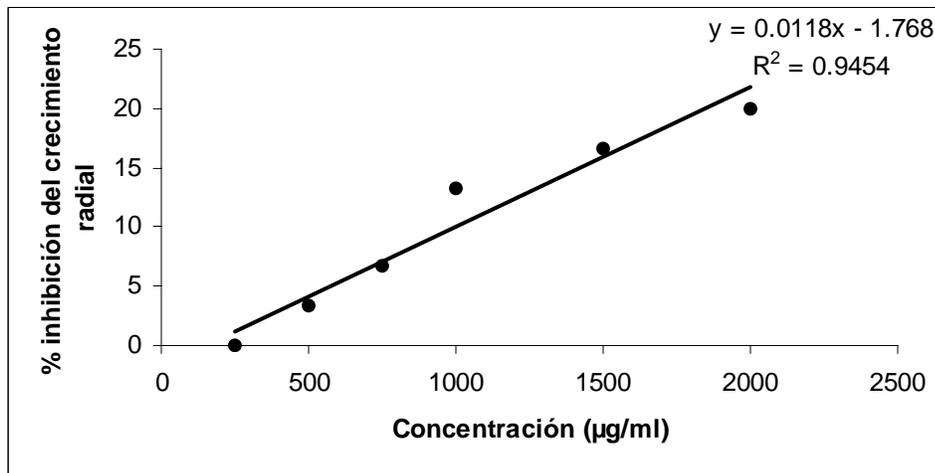
**Cuadro 7.** Evaluación cuantitativa de  $M_1$ .

Hongo	$M_1$ ( $\mu\text{g/ml}$ )		Ketoconazol ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	$CF_{50}$	CFM	$CF_{50}$	CFM
<i>R.s</i>	1,360.05	2,000.00	0.225	7.00
<i>A.n</i>	4,387.11	8,624.40	415.1	2,688.0

$CF_{50}$ , concentración fungicida media; CFM, concentración fungicida mínima; *R.s-* *Rhizoctonia solani*; *A.n-* *Aspergillus niger*;



**Figura 13.** Porcentajes de inhibición de M<sub>1</sub> sobre *R. solani*.



**Figura 14.** Porcentajes de inhibición M<sub>1</sub> sobre *A. niger*.

## 5- FRACCIONAMIENTO DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS.

### A) Cromatografía en columna:

De las 28 fracciones obtenidas en la cromatografía en columna del extracto clorofórmico, sólo 12 mostraron actividad sobre *R. solani* y 13 sobre *F. sporotrichum*. Ninguna fue activa para *A. niger*. En el cuadro 8 se muestra la actividad de cada fracción.

**Cuadro 8.-** Actividad antifúngica de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna de extracto clorofórmico sobre *R. solani* y *F. sporotrichum*.

Fracción	<i>R. solani</i>	<i>F. sporotrichum</i>	Fracción	<i>R. solani</i>	<i>F. sporotrichum</i>
1	+	-	<b>15</b>	<b>+++</b>	<b>++</b>
2	++	++	16	+	++
3	++	++	17	-	-
4	+	+	18	-	-
5	-	-	19	-	-
6	-	-	20	-	-
7	-	-	<b>21</b>	<b>+++</b>	<b>++</b>
8	-	-	22	++	+
9	-	+	23	+	-
<b>10</b>	-	<b>+++</b>	24	+	-
11	-	++	25	-	-
12	-	-	26	-	-
13	++	++	27	-	-
14	++	++	28	-	+

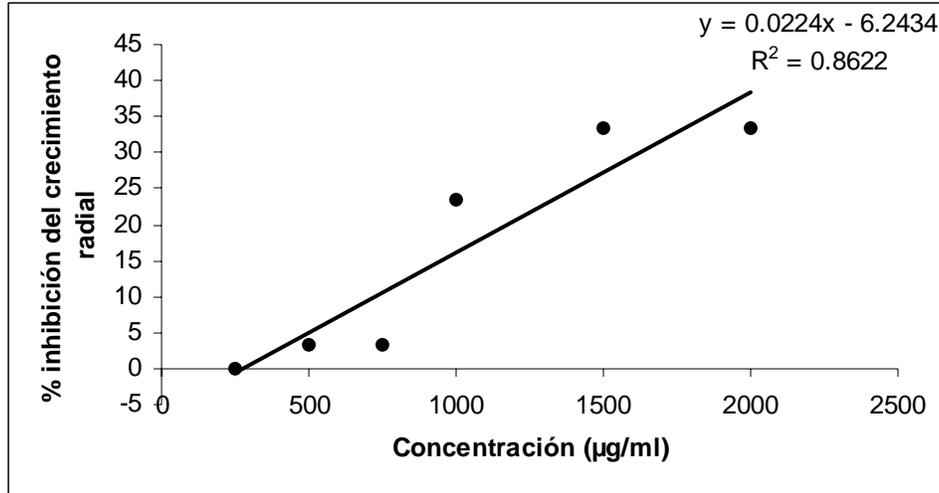
(+) actividad baja, (++) actividad media, (+++) actividad alta, (-) no activo

Las fracciones utilizadas para calcular la  $CF_{50}$  y la CFM sobre *F. sporotrichum* fueron la 10, 15 y 21. La fracción 10 se escogió debido a que se observó que presentó mayor actividad sobre *F. sporotrichum* y las fracciones 15 y 21 se eligieron porque presentaron mayor actividad sobre *R. solani* (Cuadro 8). En todos los casos se observa que se requieren más de 2,000  $\mu\text{g/ml}$  para alcanzar la  $CF_{50}$  (Cuadro 9). En las figuras 15, 16 y 17 se muestran los porcentajes de inhibición de cada una de las fracciones.

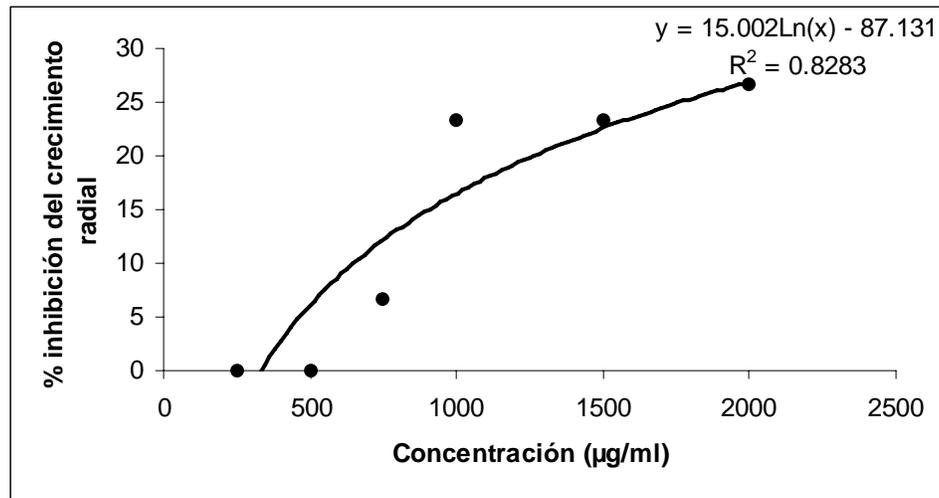
**Cuadro 9.** Evaluación cuantitativa de las fracciones activas sobre *F. sporotrichum*.

	<b>Fracciones</b>			
	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>21</b>	<b>Ketoconazol</b>
<b><math>CF_{50}</math> (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	2,516.2	9,326.8	2,938.5	0.094

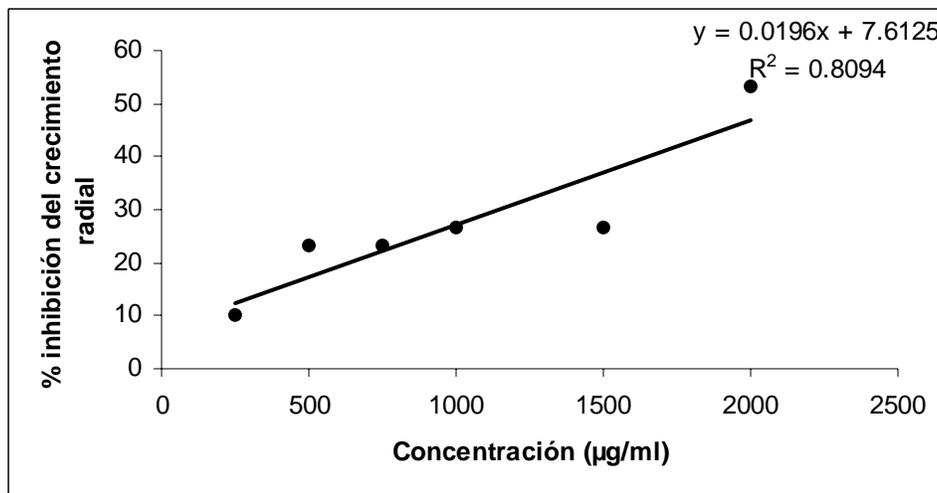
$CF_{50}$ , concentración funguicida media.



**Figura 15.** Porcentajes de inhibición de la fracción 10 sobre *F. sporotrichum*.



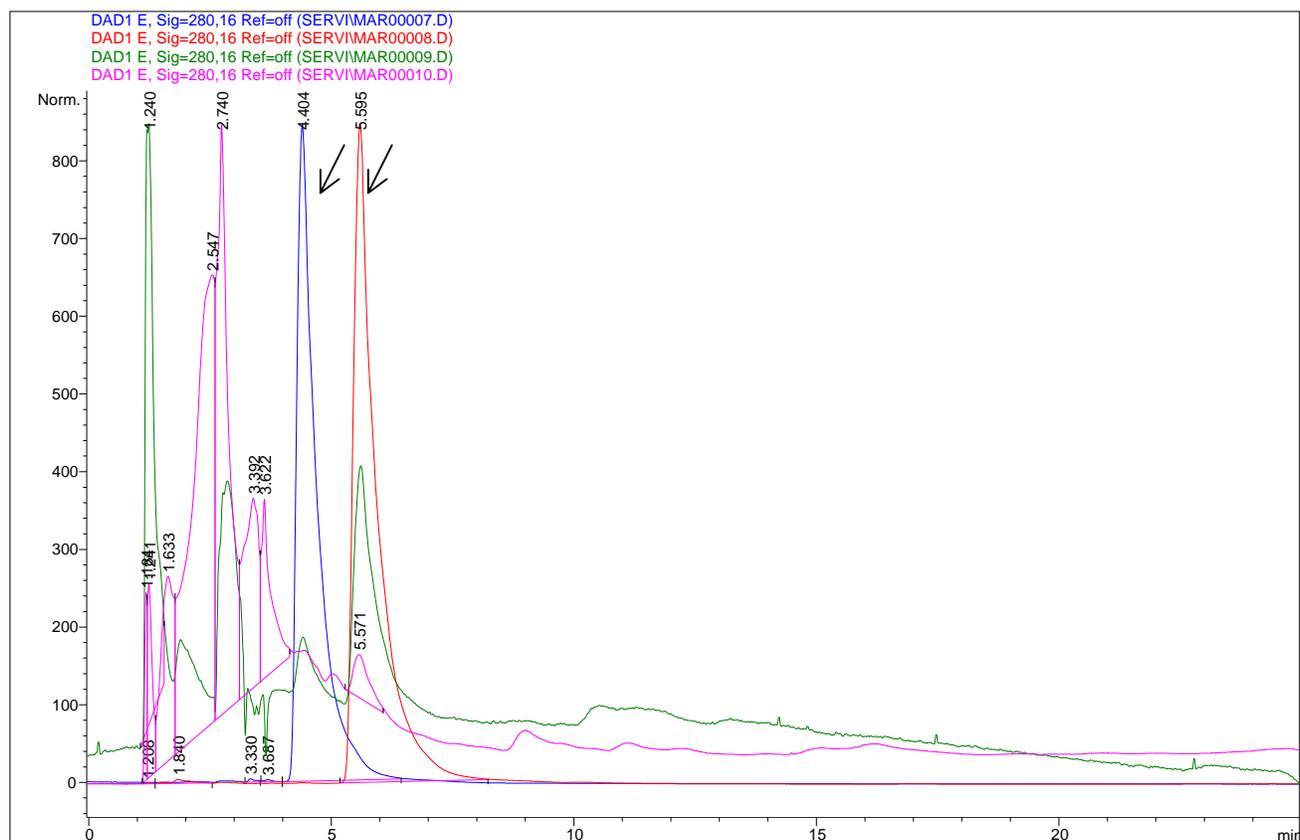
**Figura 16.** Porcentajes de inhibición de la fracción 15 sobre *F. sporotrichum*.



**Figura 17.** Porcentajes de inhibición de la fracción 21 sobre *F. sporotrichum*.

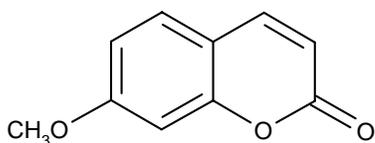
#### B) Cromatografía líquida de alta presión (HPLC)

La cromatografía líquida de alta presión (HPLC) se realizó con la fracción 30 de la prueba cromatográfica (elegida por que presentaba una fluorescencia azul-verdosa a 366 nm) y con la fracción 10 de la cromatografía experimental (elegida porque presentó mayor actividad sobre *F. sporotrichum*). Se observa que en ambas fracciones están presentes las dos cumarinas (6,7-dimetoxi-cumarina TR= 4.404 min; 7-metoxi-cumarina TR= 5.595 min). En ambas casos la 7-metoxi-cumarina se encuentra en mayor concentración que la 6,7-dimetoxi-cumarina, aunque no es el componente principal (Figura 18). En la figura 19 se muestran las estructuras de la 7-metoxi-cumarina y la 6,7 dimetoxi-cumarina.

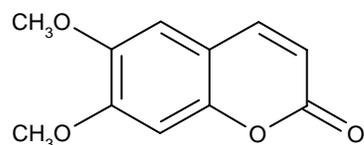


**Figura 18.** Cromatograma de las fracciones comparadas con dos muestras puras de cumarinas.

- Muestra fracción 30 (cromatografía de prueba).
- Muestra fracción 10 (cromatografía experimental).
- Muestra 6, 7-dimetoxi-cumarina.
- Muestra 7-metoxi-cumarina.



7-metoxi-cumarina

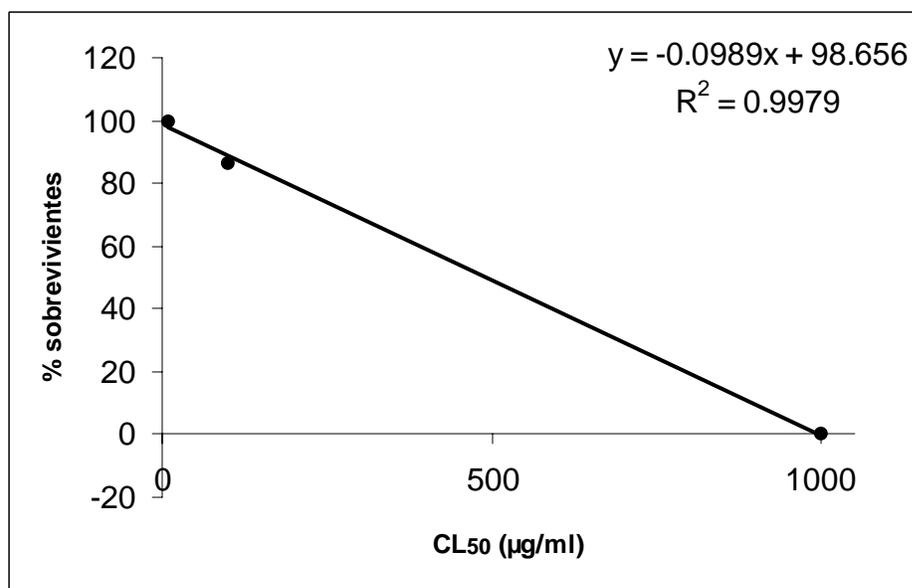


6,7-dimetoxi-cumarina

**Figura 19.** Estructura química de la 7-metoxi-cumarina y la 6,7-dimetoxi-cumarina

## 6.- TOXICIDAD GENERAL.

El extracto clorofórmico obtuvo una  $CL_{50}$  igual a 491.97  $\mu\text{g/ml}$  (Figura 18), por lo que la actividad tóxica se considera moderada según el criterio establecido por McLaughlin, 1991 (Apéndice 6).



**Figura 20.** Actividad tóxica general del extracto clorofórmico.

## DISCUSIÓN

En la bibliografía se cuenta con información (florística, etnobotánica y fitoquímica) de la planta *Alternanthera caracasana*, dicha información sentó las bases del presente trabajo.

### 1.- COLECTA DE LA PLANTA.

La planta fue colectada durante los meses en donde la lluvia es abundante (junio-agosto), lo cual permite el desarrollo óptimo de *A. caracasana*, ya que en las áreas adoquinadas de los jardines de la zona deportiva de la FES Iztacala se pudieron observar grandes extensiones cubiertas por esta planta. Es importante mencionar que alrededor de *A. caracasana* no se observó el desarrollo de ninguna otra especie vegetal, esto probablemente se deba a la adaptabilidad del tianguis a este ambiente que está caracterizado por el paso diario de la gente, ya que probablemente la planta sintetiza algunos metabolitos secundarios que le dan ventaja ecológica (Harbone, 1982; Salisbury, 1992).

### 2.-OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS.

El rendimiento (contenido de sólidos) de los extractos obtenidos de la planta *A. caracasana*, indica que el extracto etanólico presentó la mayor proporción (7.33%) (Figura 4), por lo tanto, la mayor parte de los componentes de la planta son de naturaleza polar como pueden ser los flavonoides y alcaloides. Esto también se puede observar en la partición de este extracto en donde M<sub>1</sub> obtuvo la mayor proporción (Figura 5). Lo anterior coincide con Canales et al., 2005 quienes igualmente tuvieron mayor rendimiento en el extracto de mayor polaridad.

### 3.- EVALUACIÓN CUALITATIVA DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.

Los extractos clorofórmico y etanólico de la planta *A. caracasana* poseen actividad antifúngica (Cuadro 4). Se observa que los extractos presentan actividad sobre hongos de importancia tanto médica como agronómica (*A.niger*, *F. sporotrichum*, *T. mentagrophytes* y *R.solani*).

El extracto donde se tuvo mayor actividad antifúngica fue en el clorofórmico, lo cual coincide con el trabajo de Canales et al, 2005 quienes encontraron actividad antibacteriana en un extracto de polaridad semejante (acetato de etilo), esto indica que el compuesto activo probablemente sea de una polaridad intermedia, y por lo tanto sea el mismo metabolito reportado por Canales et al., 2005, el responsable de la actividad antifúngica.

En cuanto a la actividad antifúngica de la partición del extracto etanólico (Cuadro 4), se observa que H<sub>1</sub> solamente presentó actividad sobre *R. solani*, esto en contraste con M<sub>1</sub> que obtuvo actividad tanto en *R. solani* y *A. niger*, esto puede indicar que probablemente los compuestos responsables de la actividad antifúngica se encuentren en mayor cantidad en la parte polar de dicho extracto.

#### **4.- EVALUACIÓN CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.**

La evaluación cuantitativa de la actividad antifúngica (CF<sub>50</sub> y CFM) indica que *F. sporotrichum* y *R. solani* fueron las cepas más sensibles a los extractos clorofórmico y etanólico respectivamente (Cuadro 6), esto es importante desde un punto de vista agronómico ya que según Agrios, 1996 éstas especies son responsables de grandes pérdidas de cultivos de interés comercial, tanto de ornato como comestibles como la papa, frijol, crisantemo y el clavel.

En cuanto a la partición del extracto etanólico se observa que la  $CF_{50}$  de  $M_1$  sobre *A. niger* ( $CF_{50}= 4,387.11 \mu\text{g/ml}$ ) y *R. solani* ( $CF_{50}=1,360.05 \mu\text{g/ml}$ ) aumentó comparándolo con el extracto etanólico crudo ( $1,534 \mu\text{g/ml}$  y  $342.3 \mu\text{g/ml}$  respectivamente). Esto puede deberse a que existe una sinergia entre  $H_1$  y  $M_1$ , por lo que el extracto crudo es más efectivo para inhibir el crecimiento fúngico.

## **5- FRACCIONAMIENTO DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS.**

Las fracciones en donde se encontró actividad, presentaron un color azul intenso al observarlo en placa fina bajo luz UV con una longitud de onda de 366 nm. Según Harborne y Dey, 1989 las cumarinas presentan estas características, por esta razón y por los antecedentes de *A. caracasana*, nos guiaron a suponer que probablemente eran las cumarinas responsables de la actividad antimicótica del Tianguis.

Por esta razón se realizó una cromatografía de alta presión (HPLC) comparando una fracción de cada cromatografía en columna (prueba y experimental) con dos muestras de cumarinas puras (7-metoxi-cumarina y 6,7-dimetoxi-cumarina) (Figura 18), dando como resultado que efectivamente las cumarinas se encontraban en las fracciones activas, aunque en baja concentración.

Las cumarinas se encuentran dentro del grupo de los fenilpropanos (Apéndice 7) y se han reportado como poseedoras de propiedades antimicrobianas. Autores como Sardari et al., 1999, Al-Barwani y Eltayeb, 2004 y Stein et al., 2006 reportan que las cumarinas poseen efecto antifúngico principalmente contra *Trichophyton* spp, *Alternaria* spp, *Fusarium* spp. y *Aspergillus niger* (Cuadro 9). Esto es importante ya que probablemente sean las cumarinas las responsables de la actividad antifúngica de *A. caracasana*.

Sin embargo, también se han reportado otras actividades para las cumarinas: Jamal y Smith, 1989 reportan que las cumarinas han sido

administradas clínicamente para el tratamiento de linfedemas, Marshall et al., 1989 las reporta como antitumorales y Egan et al., 1990 mencionan que las cumarinas también han sido aplicadas para infecciones crónicas. Estudios recientes han reportado a las cumarinas con efecto antioxidante (Torres et al., 2006), vasodilatador (Dongmo et al., 2006), antitrombótico y antimutagénico (Creaven et al., 2006).

Cowan, 1999 reporta a la cumarina warfarina como antiviral la cual interacciona con el ADN eucariótico. Las cumarinas umbeliferona, esculetina y herniarina se agregaron a los preparados de protección solar principalmente por su capacidad de absorción en la región UV (280 a 315 nm), cuya radiación causa la formación de eritemas en la piel (Gros et al., 1985).

Bruneton, 1991 comenta que las cumarinas se encuentran en mayor concentración en raíces, frutos y semillas, además de que la síntesis de fenilpropanoides es afectada por el ambiente, condiciones nutricionales y hormonales, así como varios factores de estrés (Domínguez, 1979). Esto es importante dado a que como se mencionó anteriormente la planta *A. caracasana* fue colectada en época de lluvia, por lo que las cumarinas probablemente se sintetizan durante esa época, debido a que probablemente su metabolismo es más activo.

## **6.- TOXICIDAD GENERAL.**

El ensayo de toxicidad sobre *Artemia salina* se considera una herramienta muy útil para evaluar la toxicidad. Este ensayo se ha aplicado para determinar la toxicidad de extractos de plantas medicinales (McLaughlin, 1991; Campos, 2006; Canales et al., 2007), además también se ha utilizado para monitorear micotoxinas, contaminantes marinos, productos petroleros y metales pesados (Sam, 1993).

El extracto clorofórmico presentó una toxicidad moderada sobre *Artemia salina*, esto probablemente pudo ser a causa de las cumarinas, ya que, como se había mencionado se ha reportado que las cumarinas son poseedoras de diferentes efectos biológicos como antibióticos, actividad fitotóxica, inhibidores del crecimiento de plantas y de microorganismos que causan dermatitis, daño hepático, carcinogénesis, entre otros (Gros et al., 1985).

Lewis et al., 2006 reportan que las cumarinas producen tumores en roedores. Sin embargo, Báez et al., 2005 especifican que las cumarinas tienen poca toxicidad en el hombre.

Lo antes mencionado valida el empleo del Tianguis en la medicina tradicional, además de presentar compuestos con actividad antifúngica lo que la hace una planta adecuada para combatir diferentes procesos infecciosos.

## CONCLUSIONES

- Los extractos clorofórmico y etanólico de *Alternanthera caracasana* presentan actividad antifúngica.
- El extracto clorofórmico fue el que presentó mayor actividad antifúngica, inhibiendo el crecimiento de cuatro cepas de hongos.
- *Rhizoctonia solani* y *Fusarium sporotrichum* son las cepas más sensibles al extracto clorofórmico y etanólico respectivamente.
- Probablemente los compuestos responsables de la actividad antifúngica son la 7-metoxi-cumarina y 6,7-dimetoxi-cumarina, los cuales están presentes en el extracto clorofórmico
- El extracto clorofórmico de *Alternanthera caracasana* presenta una toxicidad moderada.

## PERSPECTIVAS

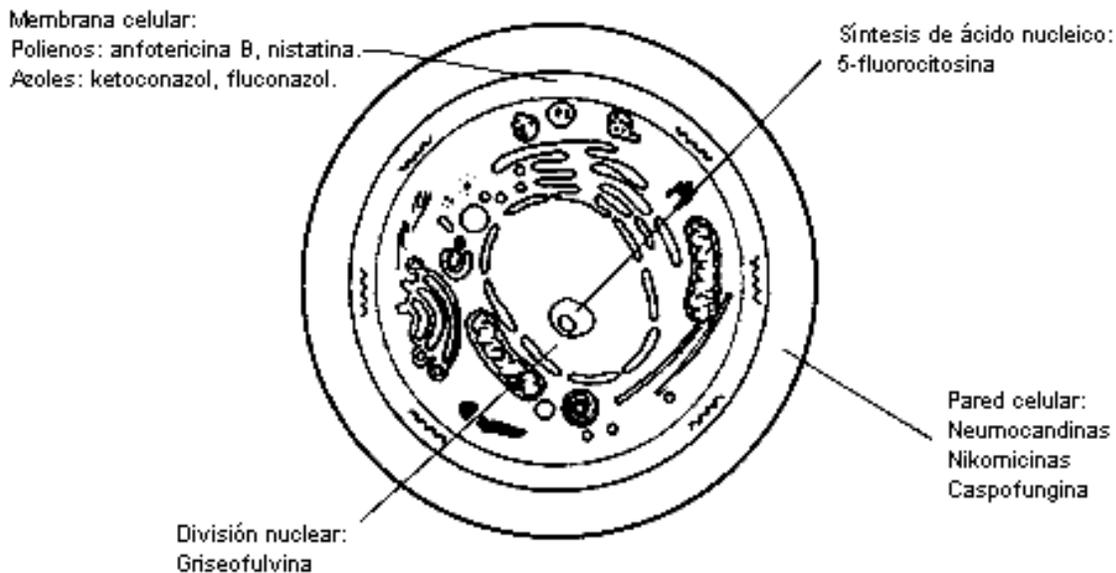
Es importante continuar el estudio de *A. caracasana* debido a que su uso como planta medicinal no solamente se limita para el tratamiento de fiebres y enfermedades gastrointestinales sino que se podría utilizar para otro tipo de enfermedades. Por lo que se propone realizar los siguientes estudios:

- 1.- Seguir realizando estudios para la evaluación de otras actividades biológicas como antioxidante, antitumoral, antiprotozoaria, entre otras.
- 2.- Aislar los compuestos puros de la 7-metoxi-cumarina y 6,7-dimetoxi-cumarina para comprobar que realmente éstos fueron los compuestos responsables de la actividad antifúngica.
- 3.- Determinar el modo de acción de las cumarinas en caso de que estas sean las responsables de la actividad antifúngica.
- 4.- Aislar y determinar las estructuras químicas y las actividades moleculares de los compuestos de polaridad similar a la de las cumarinas.
- 5.- Ampliar el estudio toxicológico utilizando especies de mayor complejidad como moscas (*Drosophila melanogaster*) y ratas.

## APÉNDICE 1

### CLASIFICACIÓN DE ANTIFÚNGICOS POR SU MECANISMO DE ACCIÓN.

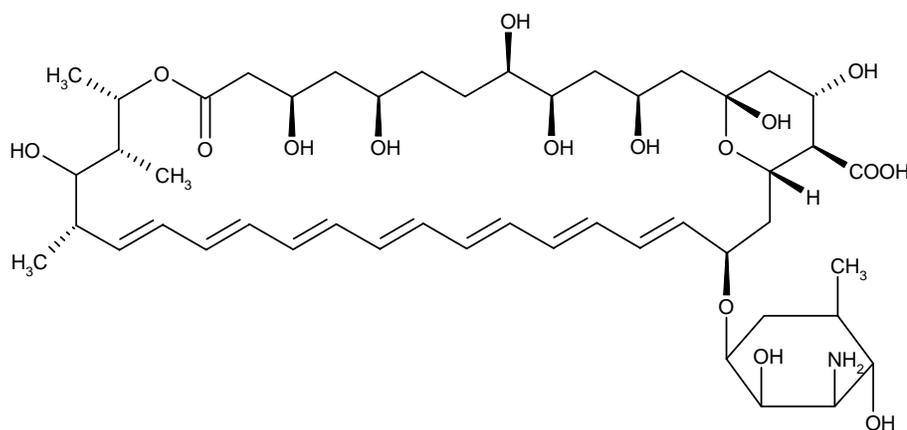
Los antifúngicos generalmente actúan en cuatro principales sitios de la célula fúngica que son: la pared celular, la membrana celular, la síntesis del ácido nucleico y la división nuclear (Figura 19).



**Figura 21.** Sitio de acción de algunos antifúngicos.

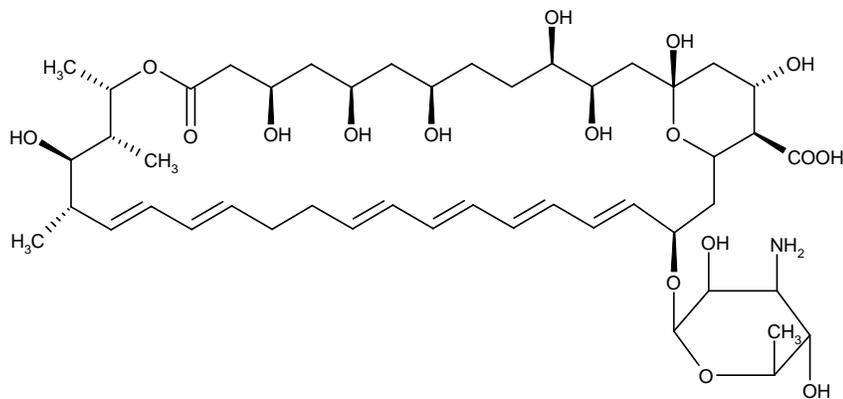
## A. INHIBICIÓN DE LA FUNCIÓN DE LA MEMBRANA CELULAR

**-Anfotericina B.** La anfotericina B es un polieno aislado a partir del hongo *Streptomyces nodosus*. Ha sido el fármaco más utilizado en el tratamiento de las infecciones fúngicas profundas. La anfotericina B se une al ergosterol de la membrana citoplásmica de los hongos, por lo que se alteran las propiedades de permeabilidad de la misma, produciendo poros y cráteres que permiten la salida de iones intracelulares y ocasionan muerte por lisis celular. Es un antifúngico de amplio espectro ya que actúa sobre levaduras, hongos dimórficos y dermatofitos (Calderón, 1997; Mims et al., 1999; Arenas, 2003; Lumbreras et al., 2003; Murray et al., 2003). Las reacciones adversas son muy variadas; dependen de la hipersensibilidad y del efecto tóxico directo, las más importantes son la tromboflebitis y la toxicidad renal, pero también puede causar sudoración, vértigo, dolores generalizados, convulsiones, choque, fibrilaciones e incluso paro cardíaco (Arenas, 2003; Lumbreras et al., 2003) (Figura 22).



**Figura 22.** Estructura química de anfotericina B.

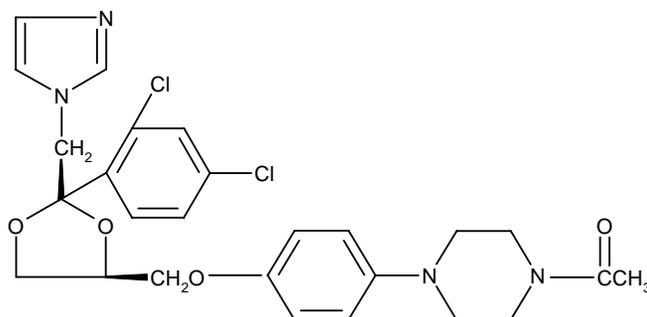
**-Nistatina.** Es un análogo estructural de la anfotericina B y fue aislada a partir de los hongos *Streptomyces noursi* y *S. albulus*. La nistatina se parece a la anfotericina B en cuanto a sus propiedades permeabilizantes y letales sobre las células eucariotas (Murray et al., 2003). La nistatina puede ser fungistático o fungicida; inhibe la respiración celular y altera el metabolismo del fósforo inorgánico. Es de espectro reducido y específico para infecciones por *Candida*. Las reacciones adversas son dermatitis, náuseas, vómito y diarrea (Arenas, 2003) (Figura 23).



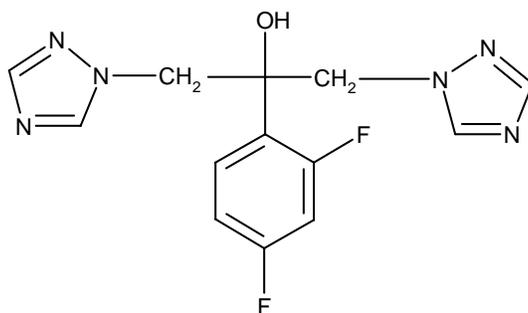
**Figura 23.** Estructura química de la nistatina.

**-Azoles.** Los azoles se caracterizan por poseer un anillo imidazólico o triazólico, los cuales contienen de 2 a 3 átomos de nitrógeno. Son compuestos sintéticos y constituyen el mayor grupo de agentes antifúngicos. Se clasifican en imidazoles (ketoconazol, miconazol, clotrimazol) y triazoles (fluconazol, itraconazol) (Sanglard, 2002). Los azoles actúan inhibiendo la enzima 14- $\alpha$ -demetilasa. Esta inhibición se produce al formarse un complejo del azol con una parte del citocromo P-450 del hongo. El bloqueo de esta enzima impide la conversión de lanosterol en ergosterol, que es un componente fundamental de la membrana citoplasmática del hongo, y produce una alteración de la permeabilidad de la membrana y la acumulación de peróxidos que la dañan (Lumbreras et al., 2003). Poseen un amplio espectro de actividad ya que actúan contra mohos y levaduras; tienen

actividad antibacteriana y contra protozoarios, así como acción inmunoestimulante (Calderón, 1997; Mims et al., 1999; Arenas, 2003; Murray et al., 2003). Las acciones adversas más comunes son las gastrointestinales y dermatológicas (Arenas, 2003) (Figura 24 y 25).



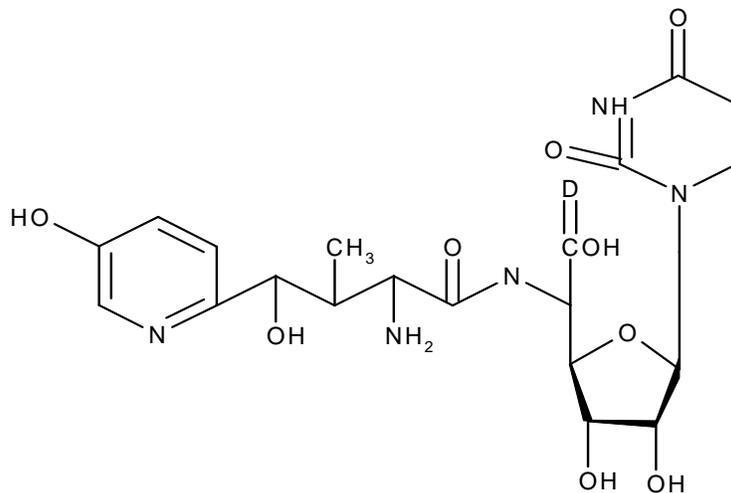
**Figura 24.** Estructura química del ketoconazol.



**Figura 25.** Estructura química del fluconazol.

## B. INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE PARED CELULAR

**-Nikomicinas.** Su estructura química se conforma por un nucleósido de pirimidina unido a una unidad peptídica. Las nikomicinas son productos naturales generados por la fermentación del hongo *Streptomyces tendae*. Son funguicidas y son inhibidores competitivos de la quitina sintetasa de la pared celular, esto conduce a la inhibición de la septación, con la consiguiente rotura osmótica de la célula fúngica. Su espectro antifúngico es errático, se necesitan grandes cantidades del compuesto para tener concentraciones clínicas relevantes y actúan mejor en mohos que en levaduras. No se reportan acciones adversas en el paciente (Peláez, 1998; Arenas, 2003) (Figura 26).



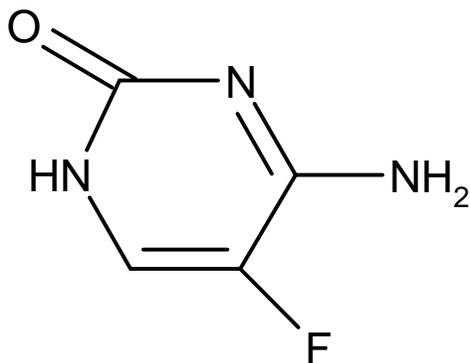
**Figura 26.** Estructura química de la nikomicina.





### C. INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

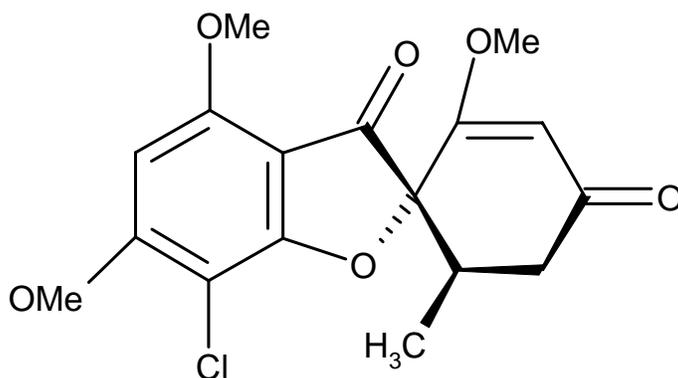
**-Flucitosina (5-fluorocitosina).** La flucitosina es un análogo de las pirimidinas. Es un compuesto sintético el cual penetra a las células por medio de la citosina permeasa e inhibe la síntesis de ARN por la acción de una desaminasa de citosina; se convierte en 5-fluoruracilo y éste se metaboliza a su vez hacia 5-fluoruridina. La sustitución del uracilo de los hongos por 5-fluoruracilo alteran la síntesis de proteínas y ocasiona la muerte de los microorganismos; también interrumpe la síntesis de ADN por inhibición de la actividad de la timidilata sintetasa (Mims et al., 1999; Arenas, 2003). Es fungicida para las levaduras y los hongos sensible, por lo que se considera un antifúngico de corto espectro (Sanglard, 2002; Lumbreras et al., 2003). Las reacciones adversas observadas con mayor frecuencia son del tubo digestivo (nauseas, vómitos, enterocolitis y, rara vez, perforación intestinal), lo más grave es la depresión de la médula ósea, que se manifiesta por leucopenia y trombocitopenia. También puede causar daño hepático (Arenas, 2003) (Figura 29).



**Figura 29.** Estructura química de la flucitosina.

#### D. INHIBICIÓN DE LA DIVISIÓN NUCLEAR

**-Griseofulvina.** Es un derivado del benzofurano y fue aislado del hongo *Penicillium griseofulvum*. Es fungistático; no destruye los hongos, sino que los elimina porque altera el crecimiento de las hifas al producir enroscamiento de las mismas, de modo que impide la parasitación de la queratina; el mecanismo de acción incluye interferencia con la división nuclear al evitar la replicación del ADN e inhibir mitosis en metafase y los microtúbulos celulares. Tiene espectro reducido ya que actúa solamente sobre dermatofitos. Entre las reacciones adversas más comunes se encuentra depresión de médula ósea, trastornos hematológicos, cutáneos y renales(Arenas, 2003) (Figura 30).



**Figura 30.** Estructura química de la griseofulvina.

## APÉNDICE 2

### CARACTERÍSTICAS DE LAS CEPAS FÚNGICAS.

#### ✧ *Aspergillus niger*

*A. niger* es un hongo filamentoso que causa infecciones tanto en el hombre como en las plantas. Se ubica principalmente en la materia orgánica (estiércol). Las conidias de *A. niger* son fácilmente transportadas por el aire, por lo que se encuentran ampliamente diseminados en el medio ambiente (Vargas, 2004).

*A. niger* causa infecciones oportunistas en pacientes inmunodeprimidos por medio de la vía respiratoria, aunque también puede penetrar directamente a través de traumas cutáneos o mucosos. Puede causar trombosis e infarto cuando invaden los vasos sanguíneos, neumonía aguda, bloqueo parcial de la vía aérea por masas micóticas y reacciones broncopulmonares alérgicas (Mims et. al,1999).

En las plantas causa pudrición principalmente en maíz pero también causa pudrición en fibras de algodón y en cebolla (Finch y Finch, 1974; Agrios, 1996).

#### ✧ *Candida albicans*

*C. albicans* es un hongo dimórfico componente de la flora normal del tracto gastrointestinal, apareciendo como levadura en las superficies mucosa, pero forma hifas cuando invade. Produce infecciones oportunistas en pacientes estresados, inmunodeprimidos o tratados con antibióticos, lo cual modifica la flora intestinal y aumenta el potencial de inóculo de *C. albicans*, causando lesiones mucocutáneas localizadas e invasión de todos los órganos importantes en la enfermedad diseminada (Mims et al., 1999; Vargas, 2004).

### ✧ ***Fusarium moniliforme* y *F. sporotrichum***

Son hongos filamentosos, los cuales infectan principalmente a las plantas pero también enferman al hombre. *F. moniliforme* y *F. sporotrichum* son microorganismos que se encuentran comúnmente en el suelo (Vargas, 2004).

Pueden causar afecciones cutáneas, respiratorias y diseminadas en pacientes inmunocomprometidos. La forma de infección habitualmente es posterior a la exposición traumática con vegetales en descomposición (Vargas, 2004).

En las plantas provocan pudrición de: maíz, caña de azúcar, frijol, cacahuate, clavel, crisantemo. Necrosis foliar en el maíz y tizón de las plantas de algodón (Finch y Finch, 1974).

### ✧ ***Trichophyton mentagrophytes***

*T. mentagrophytes* es un hongo dermatofito, el cual infecta a pacientes inmunodeprimidos. Causa micosis cutánea (tiñas), principalmente la tiña del cuerpo, crural y del pie (pie de atleta) (Myrvik y Weisner, 1988; Prescott et al., 2004).

### ✧ ***Rhizoctonia solani***

*R. solani* es un hongo filamentosos que infecta a las plantas, por lo que es un microorganismo del suelo. Afecta principalmente a los cultivos de papa, pero también produce pudrición de la raíz en orquídeas, canchrosis del tallo en melón, crisantemo, frijol, maní, aguacate, ajonjolí, apio, camote, cebolla, rábano, tabaco, tomate y cítricos (Finch y Finch, 1974).

## **APÉNDICE 3**

### **MÉTODO DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO RADIAL**

**(Wang y Bun, 2002)**

El ensayo contra hongos filamentosos se lleva a cabo en cajas petri (100 x 15 mm) que contienen 30 ml de agar papa-dextrosa en el cual se inocula el micelio del hongo. Después que el micelio se haya desarrollado, se colocan sensidiscos previamente impregnados con el extracto (2 mg/disco). Los discos se colocan a una distancia de 5 mm del límite micelial.

#### **☞ APLICACIÓN DE SUSTANCIAS.**

Se utilizan sensidiscos de 5 mm de diámetro hechos de papel Whatman No. 5. En todos los casos se realizan diluciones para que los sensidiscos lleven la cantidad deseada de producto. Se utilizan 2000 µg de los extractos disueltos en 10 µl del disolvente correspondiente a cada extracto. Los sensidiscos se preparan 12 horas antes del bioensayo. Al llevar a cabo la prueba de susceptibilidad, los discos impregnados con las sustancias a evaluar se colocan en la superficie del agar manualmente, utilizando una pinza estéril. Los sensidiscos se presionan suavemente con la punta de la pinza, cuidando de no moverlos una vez colocados en su lugar.

#### **☞ CONTROLES NEGATIVOS.**

Sensidiscos a los que se les agrega 10 µl del solvente empleado para disolver el problema, dejándolos evaporar durante 12 horas (al igual que los experimentales).

### **☞CONTROL POSITIVO.**

Se evalúa la sensibilidad de las cepas experimentales con sensidiscos con 7 µg de ketoconazol.

### **☞INCUBACIÓN.**

Las placas se incuban a 28°C durante 72 hrs o hasta que el crecimiento micelial se haya desarrollado.

### **☞INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.**

En el caso de existir zonas de inhibición con respecto al control negativo y positivo se reporta el extracto como activo.

## APENDICE 4

### MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR O DE KIRBY-BAUER

(Koneman et al., 1985)

Este método se utilizó para evaluar la actividad antifúngica sobre *Candida albicans*.

#### ☞ MEDIO.

Se utilizó como medio de cultivo estándar el agar Müller-Hinton. Es importante que el medio alcance en la placa un espesor uniforme de 4 mm. Si es más fino, los antibióticos tienden a difundir más en dirección lateral aumentando el tamaño de las zonas de inhibición; un agar de más de 4 mm de espesor produce una mayor disolución del antibiótico hacia abajo, con tendencia a estrechar artificialmente las zonas de inhibición.

#### ☞ INÓCULO.

Con un asa de siembra se tocan las superficies convexas de 4 o 5 colonias de apariencia semejante al del microorganismo a ensayar (*Candida albicans*). Se sumerge el asa en 10 ml de caldo Müller-Hinton, se enjuaga bien en el líquido para descargar todo material y luego se retira el asa, incubar el tubo de cultivo a 37°C durante aproximadamente 18 a 24 horas, o hasta que la turbidez del medio sea equivalente al estándar N° 0.5 de MacFarland. Esto equivale a una concentración de aproximadamente  $1.5 \times 10^8$  UFC/ml.

Una vez logrado esto, se sumerge un hisopo de poliéster, estéril y seco en la suspensión de levadura, antes de retirarlos se elimina el exceso de líquido haciendo rotar el hisopo contra la pared interna del tubo. Con este hisopo se inocula la superficie de una placa de agar de Müller-Hinton. Previamente, se deja

que la placa alcance temperatura ambiente; es aconsejable mantener la tapa entreabierta para permitir la evaporación de cualquier exceso de humedad de la superficie de agar. Finalmente, se siembra mediante estría en por lo menos tres direcciones, dando vueltas a la placa en ángulos de aproximadamente 60° luego de cada estría.

#### ☞ **APLICACIÓN DE SUSTANCIAS.**

Para este caso, se utilizaron sensidiscos de 5 mm de diámetro hechos de papel Whatman del N° 5. En todos los casos se hicieron diluciones para que los sensidiscos lleven la cantidad deseada de producto. Se utilizan 2 mg de los extractos disueltos en 10  $\mu$ l del disolvente correspondiente a cada extracto.

Para llevar a cabo la prueba de susceptibilidad, los discos impregnados con las sustancias a evaluar se colocaron en la superficie del agar manualmente, utilizando una pinza estéril.

#### ☞ **CONTROL NEGATIVO.**

Sensidiscos a los que se les agrega 10  $\mu$ l del solvente empleado para disolver el problema, dejándolos evaporar durante 12 horas (al igual que los experimentales).

#### ☞ **CONTROL POSITIVO.**

Se evalúa la sensibilidad de las cepas experimentales con sensidiscos con 25  $\mu$ g de nistatina.

### **☞ INCUBACIÓN.**

Una vez preparadas convenientemente las placas para la prueba de susceptibilidad, se colocan en una incubadora a 36 °C, sin mayor tensión de CO<sub>2</sub>

### **☞ INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.**

En el caso de existir zonas de inhibición se reporta el extracto como activo.

## APÉNDICE 5

### MÉTODO DE DILUCIÓN EN AGAR

(Wang y Bun, 2002)

El ensayo contra hongos filamentosos se lleva a cabo en cajas de 24 pozos, cada pozo contiene 1.5 ml de agar papa dextrosa, con las siguientes concentraciones del extracto y fracciones a probar 2 000, 1 500, 1 000, 750, 500 y 250  $\mu\text{g/ml}$ . Posteriormente se coloca un inóculo de 1 mm de diámetro de micelio en el centro de la caja.

#### ☞CONTROL NEGATIVO.

Al agar se le agrega el volumen de solvente donde se disolvió la mayor concentración del problema (2 000  $\mu\text{g/ml}$ ).

#### ☞INCUBACIÓN.

Las placas son incubadas a 28°C durante 72 horas hasta que el crecimiento micelial se haya desarrollado.

#### ☞INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.

Los resultados se reportan en porcentaje de inhibición, teniendo en cuenta que la concentración que representa el 100% de inhibición es aquella en la que ya no se observa crecimiento, la cual corresponde a la Concentración Fungicida Mínima (CFM); mientras que la concentración que representa al 50% de inhibición corresponde a la Concentración Fungicida Media ( $CF_{50}$ ) y estas se determinan con respecto al grupo testigo, el cual representa el 0% de inhibición.

## APÉNDICE 6

### MÉTODO DE TOXICIDAD GENERAL

(McLaughlin, 1991)

El ensayo se realiza con larvas nauplio II de *Artemia salina* (Leach). En frascos de vidrio transparentes se colocan 10 ml al 0.5% de NaCl; posteriormente se colocan 10 larvas por frasco. La concentración del problema a ensayar son 1000, 100 y 10 µg/ml.

#### ☞CONTROL NEGATIVO.

Como control negativo se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO), el cual fue el solvente empleado para disolver el problema, se empleó el mismo volumen en que se disolvió la concentración más alta del extracto o compuesto a evaluar (375 µl).

#### ☞INCUBACIÓN.

Los cultivos se mantienen iluminados (luz blanca) a una temperatura de 23-25°C durante 24 horas.

#### ☞INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.

Se cuentan el número de larvas sobrevivientes, las cuales deberán desplazarse de la misma manera que las del grupo testigo.

La concentración letal media (CL<sub>50</sub>) se determinará para cada extracto interpolándolo en gráficas de porcentaje de mortalidad contra la concentración en mg/ml y a través del análisis de regresión lineal.

La actividad tóxica general se considera débil cuando la  $CL_{50}$  se encuentra entre 500 y 1000  $\mu\text{g/ml}$ , moderada cuando se encuentra entre 100 y 500  $\mu\text{g/ml}$ , y fuerte entre 0 y 100  $\mu\text{g/ml}$  (McLaughlin, 1991).

## APÉNDICE 7

### FENILPROPANOS

Los fenilpropanos son sustancias aromáticas que tienen funciones oxigenadas (hidroxilos, metoxilos, metilendioxis) en posiciones *orto* y/o *para*; están muy difundidas en el reino vegetal y provienen del metabolismo de los hidratos de carbono (Gros et al., 1985).

Desde el punto de vista biogénico, los fenilpropanos son derivados del ácido shiquímico. Este ácido se encuentra distribuido principalmente en las Gimnospermas, parece ser el eslabón que vincula a los azúcares alifáticos con los derivados bencénicos de las plantas (Gros et al., 1985).

Dentro de los fenilpropanos se encuentran incluidos diversos compuestos aromáticos como cumarinas, ácidos cinámicos, lignanos, xantonas, naftoquinonas, entre otros (Gros et al., 1985).

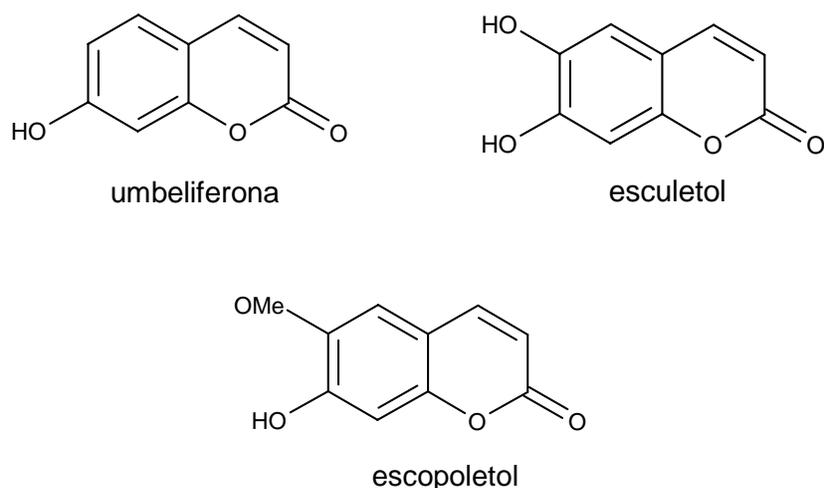
#### CUMARINAS

El nombre “cumarina” proviene de un árbol nativo Guayana, “coumarouna” (*Dipterix odorata* Willd). De las semillas de esta planta se aisló y cristalizó la primera benzo- $\alpha$ -pirona no sustituida. Sus estructuras son muy variables: se conocen más de 800 en los vegetales superiores (Bruneton, 1991).

Las cumarinas son benzo- $\alpha$ -pironas o  $\alpha$ -cromonas y, por lo tanto, poseen el mismo esqueleto carbonado que los ácidos cinámicos. En realidad son lactonas de los ácidos o-hidroxicinámicos (Gros et al., 1985).

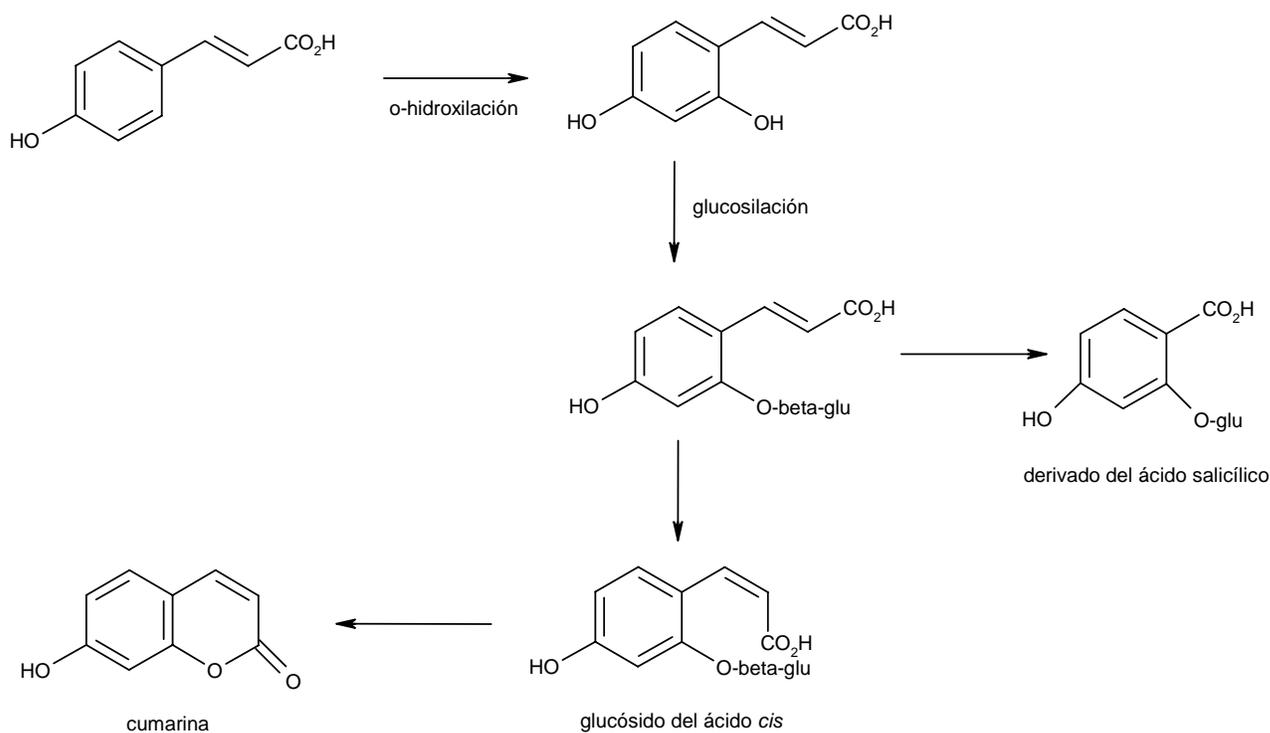
No está claro en qué consiste el mecanismo de conversión de ácidos cinámicos en cumarinas. Ante todo, debe tenerse en cuenta que los ácidos cinámicos naturales son *trans*, por lo que para convertirlos en cumarinas deben isomerizarse a *cis* y, además, experimentar una *o*-hidroxilación. Como es muy raro encontrar *o*-hidroxifenilpropanos naturales, se propone que ha ocurrido una isomerización *trans-cis* acompañada de una *o*-hidroxilación (Gros et al., 1985).

Las cumarinas simples corresponden a compuestos hidroxilados y a ésteres. Las tres cumarinas más repartidas en las plantas son la umbeliferona, el esculetol y el escopoletol (Bruneton, 1991) (Figura 31).



**Figura 31.** Algunos ejemplos de cumarinas.

Con frecuencia, la cumarina no sustituida está presente en la planta fresca como *o*-glucósido del ácido *o*-hidroxi-*trans* o *cis*-cinámico (melilotósido) y es inodora. A partir de éste, al marchitarse o secarse el material vegetal, se forma la cumarina. Tal proceso ocurre cuando se seca el pasto recién cortado, liberándose un típico “olor a heno”. Por ello se propone que las cumarinas son productos, que por acción enzimática, dan lugar a glucósidos intermediarios. Los derivados del ácido salicílico se formarían por  $\beta$ -oxidación de cumarinas o precursores de éstas (Figura 32) (Gros et al., 1985).



**Figura 32.** Biosíntesis de los ácidos cinámicos, cumarinas y derivados del ácido salicílico.

La mayoría de las cumarinas simples poseen un hidroxilo en C-7, otro hidroxilo o metoxilo puede encontrarse en C-6 y con menor frecuencia, en C-4, C-5 o C-8. Los glucósidos más comunes son los 7-*o*-monoglucósidos. Las cumarinas presentan, en general, una intensa fluorescencia azul o azul-verdosa a 366 nm, por lo que es muy fácil detectarlas cromatográficamente (Gros et al., 1985).

Las cumarinas se encuentran muy difundidas en determinadas familias de plantas: Leguminosas, Compuestas, y sobre todo en Umbelíferas y Rutáceas, en las cuales se encuentran las estructuras más complejas. En particular, la concentración es mayor en raíces, frutos y semillas (Bruneton, 1991).

## CUMARINAS CONDENSADAS

**Cumarinas diméricas.** De las hojas descompuestas de *Melilotus albus* se aisló dicumarol (3, 3'-metilen-bis-4-hidroxycumarina) que se origina por la acción bacteriana sobre la cumarina presente en el material vegetal húmedo (Gros et al., 1985).

El dicumarol inhibe la formación de la protombina, la proconvertina y del factor Stuart-Power en el hígado, interrumpiendo así la capacidad de coagulación de la sangre. Su acción consiste en desalojar a la vitamina K (importante para la coagulación de la sangre) de su complejo con la apoenzima, que es el activo. Se usa por la vía oral como anticoagulante en casos de posibles trombosis; existen, además, anticoagulantes sintéticos de estructura similar (Gros et al., 1985).

**Furanocumarinas.** Se conocen furanocumarinas con el anillo furano unido a C-6, C-7 (tipo psoraleno) y las que poseen el anillo furano unido a C-7, C-8 (tipo angelicina). Los carbonos de anillo furano de estos compuestos provienen del isopreno. Se encuentran en las familias de Fabaceae, Rutaceae, Apiaceae y Moraceae (Gros et al., 1985).

Las furanocumarinas, en especial el psoraleno, el bergapteno y la santonina, exhiben notablemente propiedades “fotosensibilizantes” al ser colocadas sobre la piel, luego expuestas a la luz solar (Gros et al., 1985).

**Piranocumarinas.** El anillo de pirano puede estar unido a distintas posiciones de las cumarinas, tipo xantiletina, tipo alloxantiletina, y tipo seselina. Ejemplos de este último tipo son los derivados de dihidroseselina presentes en *Ammi majus* (Apiaceae), visnadina, samidina, dihidrosamidina. La visnadina posee acción dilatadora de coronarias. Algunas cumarinas son preniladas y complejas (Gros et al., 1985).

## **ACCIÓN Y USO DE LAS CUMARINAS**

Se ha demostrado que las cumarinas inhiben la germinación de semillas y, en pequeña concentración, favorecen el crecimiento de las raíces, es muy probable que tengan función fisiológica (Gros et al., 1985).

La síntesis de los fenilpropanoides es afectada por el ambiente, las condiciones nutricionales y hormonales, así como varios factores de estrés. Algunos ácidos hidroxicinámicos y cumarinas simples han sido reportados como poseedores de diferentes actividades biológicas como antibióticos, actividad fitotóxica, inhibidores de la germinación de semillas e inhibidores del crecimiento de plantas y de microorganismos que causan dermatitis (Harborne, 1982), daño hepático y carcinogénesis (Murray et al., 1982; Brown, 1985): como por ejemplo el dicumarol (3, 3'-metileno-bis-[4-hidroxycumarina]) es conocido por su potencia anticoagulante causando hemorragia.

Se han comprobado propiedades antitumorales en algunas cumarinas y psoralenos, actividad antimicrobiana y propiedades biológicas en cumarinas, naturales y sintéticas, sustituidas con heterociclos en C-3 (Gros et al., 1985).

La acumulación de grandes cantidades de fenilpropanoides constitutivos, o la elaboración de compuestos nuevos, ha sido reconocida como parte del mecanismo de defensa usado por las plantas en respuesta al ataque de patógenos (Harborne y Dey, 1989).

Las cumarinas se utilizaron durante mucho tiempo como corrector de olor y sabor en productos farmacéuticos y en la industria alimenticia, pero debido a que en experimentos con animales se observaron lesiones hepáticas y propiedades cancerígenas, está prohibido su uso. Presenta además, acción espasmolítica, dilatadora de vasos, sedante central y bactericida (Gros et al., 1985).

Algunas cumarinas elaboradas por hongos inferiores, son muy importantes debido a su toxicidad: es el caso de las aflatoxinas cancerígenas. Estas toxinas policíclicas se elaboran por diversas cepas de *Aspergillus* que se desarrollan sobre los cacahuates durante su almacenamiento (Bruneton, 1991).

Se han aislado una gran variedad de cumarinas que presentan actividad tanto antibacteriana como antifúngica (Cuadro 9).

**Cuadro 10.** Actividad antimicrobiana de algunas cumarinas.

Autores	País	Planta	Cumarina aislada	Actividad
Stein et al., 2006	Brasil	<i>Pterocaulon polystachyum</i>	Preniletina Preniletina-metil-eter	Antifúngica ( <i>Cryptococcus neoformas</i> , <i>Microsporum gypseum</i> , <i>Trichophyton rubrum</i> y <i>T. mentagrophytes</i> ).
Yasunaka et al, 2005	México	<i>Mammea americana</i> <i>Calophyllum brasiliense</i>	Mammea	Antibacteriana ( <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> ).
Al-Barwani y Eltayeb, 2004	Omán	<i>Conium maculatum</i>	Xantotoxina Bergapteno Angelicina Umbeliferona Scopoletina	Antifúngica ( <i>Alternaria brassicicola</i> , <i>Bipolaris sorokiniana</i> , <i>Fusarium</i> spp. y <i>Alternaria</i> spp.).
Ojala et al., 2000	Finlandia	Apiaceae Rutaceae	Bergapteno Herniarina Umbeliferona Xantotoxina Scopoletina	Antimicrobiana ( <i>Fusarium culmorum</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Bacillus subtilis</i> ).

**Cuadro 10.** Continuación....

Sardari et al., 1999	Canadá	<i>Diplotoenia damavandica</i>	Angelicina	Antifúngica ( <i>Candida albicans</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Aspergillus niger</i> ).
Rastogi et al., 1998	Francia	<i>Amyris elemifera</i> <i>Triphasia trifolia</i>	Heraclenol Isomeranzina	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>M. avium</i> y <i>M. kansasii</i> .
Ng et al., 1996	China	<i>Cnidium monnieri</i>	Edultina	Antibacteriana ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> ).
Kostova et al., 1993	Bulgaria	<i>Franiux ornus</i>	Esculetina Fraxetina	Antimicrobiana ( <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Candida sp.</i> ).
Chiang et al., 1982	Gran Bretaña	<i>Haplopappus multifolius</i>	Haplopinol Esculetina	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Sarcinia lutea</i> y <i>Escherichia coli</i>

## LITERATURA CITADA

Aguilar, A., Camacho, J. R. 1985. **Uso popular de las plantas medicinales y su distribución por aparatos y sistemas**. Archivos de Investigación Médica. México. Suplemento vol. 6. pp. 13-14.

Agrios, G. N. 1996. **Fitopatología**. 2ª ed. Ed. Limusa. México. pp. 281, 464.

Al-Barwani, F. M., Eltayeb, E. A. 2004. **Antifungal compounds from induced *Conium maculatum* L. plants**. Biochemical Systematics and Ecology 32, 1097-1108.

Arenas, R. 2003. **Micología Medica Ilustrada**. 2ª ed. Ed. McGraw-Hill. México. pp. 307.

Argueta, V. A., Cano, A. J. 1994. **Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana I**. Instituto Nacional Indigenista. México. pp. 64-84.

Argueta, V. A., Cano, A. J., Rodsarte, M. E. 1994. **Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana III**. Instituto Nacional Indigenista. Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana. México. pp. 1334.

Báez, C. M. E., León, F., Santos, E. 2005. **Effects of coumarins and 7OH-coumarin on bcl-2 and Bax expression in two human lung cell lines in vitro**. Cell Biology International 29, 703-708.

Benavides, C. D. 2004. **Actividad espasmolítica del extracto acuoso y fracciones obtenidas por cromatografía en columna de *Alternanthera repens* (L.) Kutze**. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. pp. 2.

Benson, L. 1979. **In: Plant Classification**. 2ª ed. Health, D.C. USA. pp. 227-229.

Blunden, G., Yang, M., Janicsák, G., Máthé, I., Carabot, C. A. 1999. **Betaine distribution in the Amaranthaceae**. *Biochemical Systematics and Ecology*. 27(1): 87-97.

Borrell, N. S. 2002. **Nuevos antifúngicos: equinocandina**. *Servivio de Microbiología*. 8-14 pp.

Brochado, C., Almeida, A. P., Barreto, B. P., Costa, L. P., Ribeiro, L. S., Pereira, R. L., Koatz, V. L. G., Costa, S. S. 2003. **Flavonol Robinobiosides and Rutinosides from *Alternanthera brasiliana* (Amaranthaceae) and their effects on lymphocyte proliferation *in vitro***. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 14: 449-451.

Brown, S. A. 1985. **In: Proceedings of the Phytochemical Society of Europe**. Vol. 5 (Van Sumere, C. F., Lea, P.J. eds). Clarendon Press. Inglaterra. pp. 257-287.

Bruneton, J. 1991. **Elementos de Fitoquímica y de farmacognosia**. Ed. Acribia. España. pp. 142-145.

Cai, Y., Sun, M., Corke, H. 2005. **Characterization and application of betain pigments from plants of the Amaranthaceae**. *Trends in Food Science and Technology* 16, 370-376.

Calderón, J. E. 1997. **Aplicación clínica de antibióticos y quimioterápicos**. 7<sup>a</sup> ed. Méndez Editores. México. pp. 34-35.

Campos, M. D., Cruz, I. R., Alba, M. A., Corral, G. C., López, G. E. A. 2006. **Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine**. *Journal of Ethnopharmacology*. doi:10.1016/j.jep.2006.10.001.

Canales, M. M., Hernández, T., Flores, O. C., Durán, D. A., García, B. A. M., Ávila, A. G. 2005. **Antimicrobial Activity of *Alternanthera caracasana***. *Pharmaceutical Biology*. 43: 305-307.

Canales, M., Hernández, T., Serrano, R., Hernández, L. B., Duran, A., Ríos, V., Sigrist, S., Hernández, H. L. H., García, A. M., López, O. A., Fernández, M. A., Ávila, G. 2007. **Antimicrobial and general toxicity activities of *Gymnosperma glutinosum*: A comparative study**. *Journal of Ethnopharmacology* 110, 343-347.

Chiang, M. T., Bittner, M., Silva, M., Mondaca, A., Zemelman, R., Sammes, P. G. 1982. **A prenylated coumarin with antimicrobial activity from *Haplopappus multifolius***. *Phytochemistry* 21, 2753-2755.

Cowan, M. M. 1999. **Plant Products as Antimicrobial Agents**. *Clinical Microbiology Reviews*. 12: 564-582.

Creaven, B. S., Egan, D. A., Kavanagh, K., McCann, M., Noble, A., Thati, B. 2006. **Synthesis, characterization and antimicrobial activity of a series of substituted coumarin-3-carboxylatosilver(I) complexes**. *Inorganica Chimica Acta* 359, 3976-3984.

Domínguez, X. A. 1979. **Métodos de la Investigación Fitoquímica**. Ed. Limusa. México. pp. 45-47.

Dongmo, A. B., Azebaze, A. G. B., Nguélefack, T. B. 2006. **Vasodilator effect of the extracts and some coumarins from the stem bark of *Mammea africana* (Guttiferae)**. *Journal of Ethnopharmacology*. doi:10.1016/j.jep.2006.11.026.

Egan, D., Kennedy, R. O., Moran, E., Cox, D., Prosser, E., Thornes, R. 1990. **The pharmacology, metabolism, analysis, and applications of coumarins and coumarin-related compounds**. Drug Metabolism 22, 503-529.

Finch, H. C., Finch, A. N. 1974. **Los hongos comunes que atacan cultivos en América Latina**. Ed. Trillas. México. pp. 17, 58, 119.

Greenwood, D., Ogilvie, M. M. 2002. **Antimicrobial agents**. In: Greenwood D., Slack C. B. R., Peutherer F. J. A guide to microbial infections: Medical microbiology pathogenesis, immunity, laboratory diagnosis and control. 16<sup>a</sup> ed. Ed. Churchill Livingstone. pp. 46-55.

Gregorí, B. S. 2005. **Estructura y actividad de los antifúngicos**. Revista Cubana de Farmacología. 39(2):35-50.

Gros, E. G., Pomilio, A. B., Seldes A. M., Burton, G. 1985. **Introducción al estudio de los productos naturales**. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. USA. pp. 47-51.

Guerra, R. N. M., Pereira, H. A. W., Silveira, L. M. S., Olea, R. S. G. 2003. **Immunomodulatory properties of *Alternanthera tenella* Colla aqueous extracts in mice**. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 36, 1215-1219.

Harborne, J. B. 1973. **Phytochemical Methods**. Ed. Chapman and Hall. USA. pp. 56.

Harborne, J. B. 1982. **An Introduction to Ecological Biochemistry**. 2<sup>a</sup> ed. Academic Press. USA.

Harborne, J. B., Dey, P. M. 1989. **Methods in Plant Biochemistry**. Vol. I. Plant Phenolics. Ed. Academia Press. USA. pp. 75-106

Jamal, S., Smith, J. R. C. 1989. **The effects of 5,6-benzo(a)pyrone (coumarin) and DEC on filarite lymphoedema and elephantitis in India**. Tropical Medicine Parasitol 83, 287-290.

Koneman, E. W., Allen, S. D., Dowell, V. R., Summers, H. M. 1985. **Diagnóstico microbiológico**. Ed. Médica Panamericana. México. 909 pp.

Kostova, I. N., Nikolov, N. M., Chipilska. L. N. 1993. **Antimicrobial properties of some hydroxycoumarins and *Fraxinus ornus* bark extracts**. Journal of Ethnopharmacology 39, 205-208.

Lewin, D. F. V., Ito, Y., Lake, B. G. 2006. **Metabolism of coumarin by human P450s: A molecular modelling study**. Toxicology in Vitro 20, 256-264.

Lumbreras, C., Lizasoain, M., Aguado, J. M. 2003. **Antifúngicos de uso sistémico**. Enfermedades infecciosas microbiológicas. 21(7):366-379.

Martínez, M. 1996. **Las plantas medicinales de México**. 6<sup>a</sup> ed. Ed. Botas. México. pp. 316-317.

Marshall, M. E., Butler, K., Cantrel, J., Wiseman, C., Mendelson, L. 1989. **Treatment of advanced malignant meloma with coumarin and cimetidine: A pilot study**. Pharmacology 24, 65-66.

McLaughlin, J. L. 1991. **Crown Gall Tumours on Potato Disc and Brine Shrimp Lethality: Two Simple Bioassays for Higher Plant Screening and**

**Fractionation.** In: Dey, P. M., Harbone, J. B., Hostettman, K. (Ed.), *Methods in plant Biochemistry Assays for Bioactivity*. Vol. 6. Academic Press, USA. pp. 1-32.

Mesa, A. C., Bueno, J. G., Betancur, L. A., 2004. **Productos naturales con actividad antimicótica.** *Revista Española de Quimioterapia*. 17:325-331.

Metcalf, C. R., Chalk, L. 1957. **In: Anatomy of the Dicotyledons 2.** Clarendon Press. Oxford. pp. 1067-1087.

Mims, C., Playfair, J., Roitt, I., Walkelin, D., Williams, R. 1999. **Microbiología médica.** 2ª ed. Ed. Harcourt Brace. España. pp. 430-432, 535-536.

Murray, P. R., Rosenthal, K. S., Kobayashi, G. S., Pfaller, M. A. 2003. **Microbiología médica.** 4ª ed. Ed. Mosby. España. pp. 622-623.

Murray, R. D. H., Mendez, J., Brown, S. A. 1982. **The Natural Coumarins: Ocurrence, Chemistry and Biochemistry.** John Wiley. Inglaterra.

Myrvik, Q. N., Weisner, R. S. 1988. **Bacteriología y Micología médicas.** 2ª ed. Ed. Interamericana McGrawHill. México. pp. 646-650.

Ng, T. B., Ling, J. M. L., Wang, Z., Cai, J. N., Xu, G. J. 1996. **Examination of Coumarins, Flavonoids and Polysaccharopeptide for Antibacterial Activity.** *Genetical Pharmaceutical*. 27(7): 1237-1240.

Ojala, T., Remes, S., Haansuu, P., Vuorela, H., Hiltunen, R., Haahtela, K., Vuorela, P. 2000. **Antimicrobial activity of some coumarin containing herbal plants growing in Finland.** *Journal of Ethnopharmacology* 37, 299-305.

Patterson, G. W., Xu, S., Salt, T. A. 1991. **Sterols of Caryophyllales with emphasis on Amaranthaceae.** *Phytochemistry*. 30(2): 523-526.

Peláez, F., Cabello, A., Basilio, A., Vicente, M. F. 2003. **Microbial natural products as a source of antifungals**. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 9(1):15-32.

Prescott, L. M., Harley J. P., Klein, D. A. 2004. **Microbiología**. 5<sup>a</sup> ed. Ed. McGraw-Hill. España. pp. 597, 886.

Rastogi, N., Abaul, J., Goh, K. S., Devallois, A., Philogène, E., Bourgeois, P. 1998. **Antimycobacterial activity of chemically defined natural substances from the Caribbean flora in Guadeloupe**. Immunology and Medical Microbiology 20, 267-273.

Romero, M., Cantón, E., Pemán, J., Gobernado, M. 2005. **Antifúngicos inhibidores de la síntesis de glucano**. Revista Española de Quimioterapia. 18(4): 281-299.

Rzedowski J., Rzedowski G. 1979. **Flora de Fanerogamas del Valle de México**. Vol I. Ed. Contiental. México. pp. 144-146.

Salisbury, R. 1992. **Plant physiology**. 4<sup>a</sup> ed. USA. pp 119-121.

Salvador, M. J., Dias, D. A. 2004. **Flavone C-glycosides from *Alternanthera maritima* (Mart.) St. Hil. (Amaranthaceae)**. Biochemical Systematics and Ecology 32, 107-110.

Sam, T. W. 1993. **Toxicity testing using the brine shrimp: *Artemia salina***. Bioactive Natural Products, 441-457.

Sanglard, D. 2002. **Importancia clínica de los mecanismos de resistencia a los antifúngicos en las levaduras.** Enfermedades Infecciosas Microbiológicas. 20(5):42-49.

Sanoko, R., Speranza, G., Pizza, C., Tommasi, N. 1999. **Triterpene saponins from *Alternanthera repens*.** Phytochemistry 51, 1043-1047.

Sardari, S., Mori, Y., Horita, K., Micetich, R. G., Nishibe, S., Daneshtalab, M. 1999. **Synthesis and Antifungal Activity of Coumarins and Angular Furanocoumarins.** Bioorganic & Medical Chemistry 7, 1933-1940.

Siener, R., Hönow, R., Seidler, A., Voss, S., Hesse, A. 2006. **Oxalate contents of species of the Polygonaceae, Amaranthaceae and Chenopodiaceae families.** Food Chemistry 98, 220-224.

Stein, A. C., Álvarez, S., Avancini, C., Zacchino, S., Poser, G. 2006. **Antifungal activity of some coumarins obtained from species of *Pterocaulon* (Asteraceae).** Journal of Ethnopharmacology 107, 95-98.

Torres, R., Faini, F., Modak, B., Urbina, F., Labbé, C., Guerrero, J. 2006. **Antioxidant activity of coumarins and flavonols from the resinous exudate of *Haplopappus multifolius*.** Phytochemistry 67, 984-987.

Vargas, H. 2004. **Patógenos emergentes en micosis cutáneas y sistémicas.** Dermatología Venezolana. 42(2):4-18.

Wang, H., Bun, T. N. 2002. **Isolation of an antifungal thaumatin-like protein from kiwi fruits.** Phytochemistry 61, 1-6.

Xu, S., Patterson, G. W., Schmid, K. 1986. **Sterols of Amaranthaceae.** Phytochemistry. 25(8): 1883-1886.

Yasunaka, K., Abe, F., Nagayama, A., Okabe, H., Lozada, L., López, E. V., Estrada, E. M., Aguilar, A., Reyes, R. C. 2005. **Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthones.** Journal of Ethnopharmacology. 97(2): 293-299.

Zavala, M. A., Pérez, S., Pérez, C., Vargas, R., Pérez, R. M. 1998. **Antidiarrhoeal activity of *Waltheria americana*, *Commelina coelestis* and *Alternanthera repens*.** Journal of Ethnopharmacology 61, 41-47.

Zhou, B., Blaskó, G., Cordell, G. A. 1988. **Alternanthin, a C-glycosylated flavonoid from *Alternanthera philoxeroides*.** Phytochemistry. 27(11): 3633-3636.