



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

Evaluación del efecto antimicótico de
Ricinus communis L. (Higuerilla) sobre
tres cepas de hongos

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

ARIANNA LEZAMA UC

ASESORES:

**DR. TONATIUH ALEJANDRO CRUZ SÁNCHEZ
DRA. AMPARO LONDOÑO OROZCO
DR. JOSÉ GUILLERMO PENIERES CARRILLO**

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MEX.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Este trabajo fue apoyado por el Proyecto

UNAM –DGAPA- PAPIIT IN 211008

**Evaluación de la actividad antimicótica de compuestos sintéticos y naturales sobre
la estructura de las células micóticas**

PAPIIT IT223811-3

Perspectivas del uso del Propóleo en la salud animal

Cuyo responsable es el Dr. Tonatiuh Alejandro Cruz Sánchez

ÍNDICE

	Página
1. ÍNDICE DE FIGURAS	4
2. ÍNDICE DE TABLAS	5
3. ÍNDICE DE ABREVIATURAS	6
4. INTRODUCCIÓN	7
5. GENERALIDADES	8
5.1 Propiedades de <i>Ricinus communis L.</i> (Higuerilla)	8
5.2 Principales características de los hongos	9
5.3 Clasificación de las micosis	10
5.1.1. <i>Cándida albicans</i>	12
5.1.1.1. Características microscópicas	12
5.1.2. <i>Criptococcus neoformans</i>	15
5.1.2.1. Características microscópicas	16
5.1.3 <i>Fusarium moniliforme</i>	18
5.1.3.1. Características microscópicas	19
5.1.4. Clasificación de los antimicóticos	20
5.1.5. Microscopia electrónica	22
6. JUSTIFICACION	23
7. OBJETIVOS	24
1. Objetivo general	24
2. Objetivos Particulares	24
8. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	
1. Diseño Experimental	25
9. MATERIALES Y MÉTODO	26
9.1. Cepas	26
9.2. Preparación del extracto	26
9.3. Selección del disolvente óptimo	26
9.4. Evaluación de la actividad antifúngica	27
9.4.1 Pruebas de sensibilidad cualitativas	27
Hongos Levaduriformes: Método de Difusión en Agar	27

9.4.2 Pruebas de sensibilidad cuantitativas	27
9.4.2.1. Hongos Levaduriformes	27
Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)	
Método de dilución placa	28
Determinación de la concentración fungicida mínima(CFM)	
Macrodilución en caldo	28
9.4.2.2. Hongos Filamentosos	28
Determinación de la concentración inhibitoria mínima(CMI)	
Método de dilución en placa de 24 pozos	28
9.5. Observación de cambios estructurales	29
9.5.1. Microscopia de fluorescencia	29
9.5.2. Microscopía electrónica	
10. RESULTADOS	30
11. DISCUSION	42
12. CONCLUSIONES	44
13. ANEXOS	46
1. Preparación de la soluciones stock del EMFH	46
2. Reactivos	47
3. Protocolo de microscopia electrónica de transmisión para levaduras	49
4. Preparación de los medios de cultivo	50
14. REFERENCIAS	51

1. INDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Ricinus communis L. (Higuerilla)	8
Fig. 2 Alcaloide Ricina	8
Fig. 3 Sitios de acción de los antifúngicos.	21
Fig. 4 Prueba de Difusión en Agar para levaduras	30
Fig. 5 Determinación de la concentración mínima inhibitoria de <i>C. albicans</i> ATCC 10231 y <i>C. neoformans</i>	31
Fig.6 Determinación de la concentración fungicida mínima de <i>C. albicans</i> ATCC 10231 y <i>C. neoformans</i>	32
Fig. 7 Determinación de la concentración mínima inhibitoria para <i>Fusarium</i> <i>moniliforme</i>	33
Fig. 8,9 Inhibición de la formación de tubo germinativo en <i>C. albicans</i> ATCC 10231 por acción del EMFH	34
Fig. 10,11 Tinción de <i>C. albicans</i> ATCC 10231 con blanco de Calcoflúor	35
Fig.12-13 Tinción de <i>C. neoformans</i> con blanco de Calcoflúor	35
Fig.14, 15 Tinción de <i>F. moniliforme</i> con azul de algodón	36
Fig.16 Efecto del extracto metanólico de flores de Higuerilla sobre el diámetro de <i>C. albicans</i> ATCC 10231	37
Fig. 17 Efecto del extracto metanólico de flores de Higuerilla sobre la longitud del tubo germinativo de <i>C. albicans</i> ATCC 10231	37
Fig. 18 Efecto del extracto metanólico de flores de Higuerilla sobre el diámetro de <i>C. neoformans</i>	38
Fig. 19 Microfotografía de <i>C.albicans</i> ATCC 10231sin extracto metanólico de flores de Higuerilla	39
Fig.23-26 Microfotografías electrónicas de <i>C. albicans</i> ATCC 10231 incubadas 24 h con extracto metanólico de flores de Higuerilla	40-41

1. INDICE DE TABLAS

TABLA 1. Clasificación de las micosis según la OMS	11
TABLA 2. Clasificación taxonómica de <i>Candida albicans</i>	11
TABLA 3. Clasificación clínica de candidiasis	14
TABLA 4. Clasificación taxonómica de <i>Cryptococcus neoformans</i>	15
TABLA 5. Clasificación clínica de Criptococosis	17
TABLA 6. Clasificación de los antimicóticos	20
TABLA 7. Porcentaje de inhibición de <i>Fusarium moniliforme</i> con el extracto metanólico de flores de Higuera	33
TABLA 8. Stock del EMFH para determinar la concentración mínima inhibitoria para <i>C. albicans</i> y <i>C. neoformans</i>	46
TABLA 9 Stock de EMFH para determinar la concentración mínima inhibitoria de <i>Fusarium moniliforme</i>	46
TABLA 10 Stock para determinar concentración fungicida mínima para <i>C. albicans</i> y <i>C. neoformans</i>	47

2. INDICE DE ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection
°C	Grados Centígrados
BHI	Infusión Cerebro Corazón
CFM	Concentración Mínima Fungicida
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CLSI	Clinical and Laboratory Standard Institute
DAS	Diacetoxiescirpenol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DON	Deoxinivalenol
EMFH	Extracto Metanólico de Flores de Higuierilla
h	Horas
MET	Microscopia Electrónica de Transmisión
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standard
g	Gramos
µg	Microgramos
mg	Miligramos
ml	Mililitros
mm	Milímetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
UFC	Unidades Formadoras de Colonias

RESUMEN

Se sabe que desde la antigüedad nuestros antepasados utilizaron recursos a su alcance para curar los diversos males que los aquejaban, a lo largo de la historia dichos recursos han sido estudiados y aprovechados. En México este tipo recursos naturales sigue vigente su uso, debido en parte a sus bajos costos y fácil obtención, un ejemplo claro es el *Ricinus communis* L. (higuerilla) utilizado comúnmente como purgante. Debido al lento desarrollo de fármacos antifúngicos, se ha retomado el estudio de plantas utilizadas desde épocas prehispánicas.

El objetivo de este trabajo fue la evaluación del efecto antimicótico del extracto de *Ricinus communis* L. (Higuerilla), frente a dos cepas de hongos levaduriformes: *Candida albicans* (ATCC 10231); *Cryptococcus neoformans* y un filamentoso: *Fusarium moniliforme*.

La planta se recolectó en Cuautitlán, Estado de México y posteriormente fue identificada como *Ricinus communis* L. (Higuerilla) en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Las hojas se secaron a temperatura ambiente, después de 1 semana con el disolvente y posterior evaporación del mismo, se obtuvo el extracto. Se evaluó el efecto antimicótico mediante una prueba cualitativa empleando discos impregnados con el extracto frente a cepas de hongos levaduriformes *Candida albicans* ATCC 10231, *Cryptococcus neoformans* y uno filamentoso como *Fusarium moniliforme*. Así mismo por una prueba cuantitativa se evaluó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración fungicida mínima (CFM). Se encontró que el extracto de hoja de *Ricinus communis* L, tiene actividad fungicida contra *Candida albicans* con un CMI de 1mg/ml y CFM de 2.0mg/ml, *Cryptococcus neoformans* con un CMI de 1 mg/ml, la CFM es de 1.5 mg/ml y *Fusarium moniliforme* no se encontró la CMI ya que es mayor a la probada. Se observó el cambio morfológico de las levaduras (tamaño, forma), medidas mediante el uso del analizador de imágenes Software Q Capture Pro 6.0, y además para *C. albicans* ATCC 10231 la inhibición del tubo germinativo. El análisis estadístico se realizó con las pruebas de muestras no apareadas con la corrección de Welch's, usando el programa Graph Pad Prism Version 5. Se logró observar mediante técnicas de tinción los daños provocados por el EMFH. Para *Candida albicans* se observó que inhibe significativamente la formación de tubo germinativo ($p < 0.0001$) y en *Cryptococcus neoformans* la cápsula disminuye de tamaño ($p < 0.001$), lo cual es importante ya que ambas estructuras constituyen factores de virulencia importantes. También se logró observar mediante Microscopia Electrónica de Transmisión, el daño provocado a la pared celular de *Candida albicans* ATCC 10231. Esto es de suma importancia ya que los defectos en su formación tienen efectos profundos en el crecimiento y la morfología de la célula fúngica, pudiendo causar la muerte celular por lisis. En el caso de *Fusarium moniliforme*, mediante microscopia óptica se encontró que hay ruptura de las hifas.

No se reportan en otros estudios el uso de la hoja de *Ricinus communis* L. (Higuerilla), como antifúngico, Los estudios reportan el uso de la semilla, mas en especifico el aceite del mismo, pero como purgante. Los resultados obtenidos en este estudio, mostraron que el extracto de hoja presento actividad antimicótica contra *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* y *Fusarium moniliforme*.

3. INTRODUCCIÓN

Las infecciones micóticas han mostrado un incremento importante en todo el mundo debido al aumento en el número de pacientes inmunodeprimidos por diversas causas, como el SIDA, la quimioterapia en pacientes con cáncer, las neutropenias y los receptores de trasplantes sometidos a terapia inmunosupresora. Un aspecto que ha complicado la situación es el desarrollo de mecanismos de resistencia por algunas especies de hongos, explicando en gran parte por que la mayoría de los fármacos son fungistáticos y por la administración prolongada de los tratamientos en el tiempo, que permite la selección de los clones de resistencia. (Mesa 2004).

El papel cada vez más importante de los hongos dentro de las enfermedades infecciosas humanas ha ejercido una fuerte influencia sobre la investigación y el desarrollo de nuevos y variados fármacos con un mayor espectro de acción y menor toxicidad que los actuales. Por lo cual se buscan nuevas alternativas terapéuticas eficaces que puedan brindar más y mejores opciones, en el mundo se han venido explorando y valorando el uso de los productos naturales como fuente de nuevos y variados antimicóticos. (Mesa 2004)

Hoy en día se renueva la legendaria costumbre de utilizar un gran número de plantas, dicha costumbre se ha conservado hasta nuestros días, principalmente en poblaciones rurales, lo que ha permitido acumular un amplio conocimiento etno-farmacológico, punto importante de partida en las investigaciones dirigidas a la búsqueda de productos naturales con actividad biológica. Algunas plantas sintetizan metabolitos secundarios que utilizan para defenderse de la infección por agentes fitopatógenos entre ellos los hongos. Por esta razón, dichas moléculas pueden ser candidatas para estudios *in vitro* contra agentes micóticos implicados en infecciones humanas. (Mesa 2004, Fuentes 2007)

En la actualidad se busca en las plantas, nuevos fármacos que posean el efecto terapéutico deseado y que al mismo tiempo no provoquen efectos secundarios indeseados. (Fuentes 2007). No debemos olvidar que los remedios a base de plantas medicinales presentan una inmensa ventaja con respecto a los tratamientos químicos. En las plantas los principios activos están siempre biológicamente equilibrados por la presencia de sustancias complementarias, que van a potenciarse entre sí, de forma que en general no se acumulan en el organismo, y sus efectos indeseables están limitados. Sin embargo, a pesar de que han aumentado las investigaciones y estudios científicos de las plantas medicinales, todavía no se conocen muchos de los principios activos a los que deben las plantas sus extraordinarias cualidades. (Mesa 2004, Fuentes 2007)

El ser humano como raza y sociedad se está enfrentando una serie de problemas que ponen a prueba su capacidad para sobrevivir y más aún en aquellas civilizaciones donde su economía en crecimiento enfrenta importantes dificultades, de ahí la importancia de desarrollo de tecnología eficiente y al alcance de sus posibilidades y recursos. (Fuentes 2007)

5. GENERALIDADES

5.1. *Ricinus communis* L. (Higuerilla)

ESPECIE: *Ricinus communis*. Fam. Euforbiáceas

NOMBRE VULGAR: Ricino, higuerillo, higuera infernal, higuereta, tártaro, aceite de castor, catapusia.

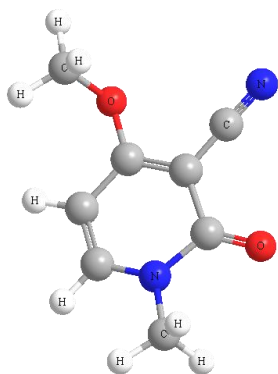
HABITAT: Originario de Etiopía y la India, estando actualmente distribuido en casi todas las zonas tropicales y subtropicales. Crece silvestre, sobre suelos arcillosos, drenados y orillas de ríos y arroyos.



FIG 1. *Ricinus communis* L. (higuerilla)

CARACTERÍSTICAS: Planta herbácea con hojas grandes, palmeadas y divididas en folículos de color rojizo. Las flores son unisexuales. El fruto, llamado capo, está rodeado de espinas blandas, tiene tres valvas y en el interior de cada valva hay una semilla. Al madurar la semilla, se separa mecánicamente del resto del fruto. Las semillas tienen forma ovoide con tegumento gris brillante y en la parte inferior poseen una protuberancia de la que sale una línea prominente en sentido vertical llamada rafe. (Kuklinski 2000, Alonso 2004)

OBTENCIÓN Y CARACTERÍSTICAS DEL ACEITE: Se recolectan las semillas y por expresión en frío se obtiene el aceite oficial. Por otros métodos se puede obtener aceite de ricino de menor calidad pero con mayor rendimiento. El aceite es de color amarillo claro, muy viscoso, ópticamente activo, soluble en frío en alcohol absoluto, pero insoluble en éter de petróleo. (Kuklinski 2000, Alonso 2004)



COMPOSICION QUÍMICA: Aceite: es una mezcla de triglicéridos de los cuales la triricinoleína es el componente mayoritario (85- 90%), en menor cantidad se encuentran los ácidos iso-ricinoléico, oleico, linoléico, estéarico y dehidroxiesteárico. (Alonso2004)

Hojas: se han aislado ácidos orgánicos (ácido gálico, elágico, ferúlico, shikímico y p-cumárico. También nitrato de potasio (alta cantidad), flavonoides, quercitrina e isorquertricina.

FIG 2. Alcaloides: Ricinina.

(Alonso 2004)

Otros: proteínas (20-26%), lípidos (50-60%), glúcidos, enzimas (lipasa, invertasa, endotripsina, amilasa, oxidasa, ribonucleasa y maltasa), ácido úrico, ácido fórmico, tocofenoles, ácido orgánicos (ascórbico, fumárico, glicólico, málico, oxálico, succínico y tartárico) y escualeno. (Alonso 2004)

PROPIEDADES FARMACOLOGICAS: El aceite de ricino es un purgante tradicional. Administrado por vía oral llega al intestino delgado donde se hidroliza por acción de las lipasas y libera el ácido ricinoléico, que es irritante de las paredes intestinales y aumenta el peristaltismo. El efecto aparece a las 2-3 horas de haber sido administrado y puede ser usado incluso en niños para resolver un problema de estreñimiento. En casos de estreñimiento crónico conviene utilizar otros laxantes menos enérgicos. Su uso es limitado; solo se emplea en farmacia hospitalaria cuando se desea un efecto purgante rápido, por ejemplo en casos de envenenamiento o intoxicación alimentaria. Aplicado externamente tiene propiedades emolientes y cicatrizantes. (Kuklinski 2000, Alonso 2004)

5.2. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE LOS HONGOS

Los hongos están formados por células eucariotas. El DNA está organizado en cromosomas que se hayan envueltos por la membrana nuclear. El citoplasma con orgánulos membranosos y abundantes ribosomas, está limitado por una membrana citoplasmática rica en ergosterol. Recubriendo la membrana se encuentra una pared celular rígida de estructura polisacárida compleja, compuesta mayoritariamente por quitina, manosa y glucanos, que protege la lisis osmótica y regula el paso de moléculas. Tienen un metabolismo de tipo quimioheterótrofo absorbtivo, es decir, obtienen la energía y el carbono absorbiendo los nutrientes de la materia orgánica, que descomponen mediante la producción de exoenzimas. (Pratz 2005)

Los hongos pueden ser unicelulares los cuales son denominados **levaduras**, tienen forma redonda u oval, con un diámetro de entre 3 y 30 μm , se reproducen asexualmente mediante gemación que es un proceso de división binaria mitótica convencional, en el que a partir de una célula madre se forman protuberancias protoplasmáticas o yemas (también llamadas blastoconidios) que irán creciendo hasta separarse y formar una nueva célula. En ocasiones, las células hijas no se separan y forman cadenas de células, que se denominan pseudohifas (seudomicelios). (Pratz 2005)

Los **hongos filamentosos** son pluricelulares; las células son alargadas, con una anchura de 3 a 15 μm de diámetro y de longitud variable. Crecen por extensión apical, tabicándose para formar nuevas células que no se desprenden. Los filamentos celulares así constituidos se denominan hifas y van ramificándose con frecuencia hasta formar un conjunto entrelazado de hifas que se denomina micelio. (Pratz 2005)

Los hongos filamentosos pueden clasificarse en superiores e inferiores. En los superiores, las hifas son delgadas (2-5 μm) y las células fúngicas que las forman están separadas entre sí por tabiques provistos de un poro que permite el intercambio de material citoplasmático entre células contiguas. Forman esporas (conidias) directamente en las hifas o en las estructuras llamadas conidióforos, constituyendo esporas externas. En los hongos inferiores las hifas son más anchas (10-15 μm) y no están tabicadas, por lo que las células forman un conjunto coenocítico con múltiples núcleos y un citoplasma único, las esporas denominadas esporangiosporas, se forman en el interior de estructuras saculares, llamadas esporangios (esporas internas). (Pratz 2005)

5.3. CLASIFICACIÓN DE LAS MICOSIS

Las infecciones causadas por hongos microscópicos se llaman micosis y toma su nombre de la parte del organismo que invade, o del hongo que las causa, se dividen en endógeno y exógeno.

Los hongos endógenos se encuentran en mucosas o tegumentos de individuos sanos y solo en condiciones especiales del huésped (inmunosupresión) se convierten en patógenos. Los hongos exógenos viven fuera del ser humano o animales; algunos son parásitos obligatorios y otros saprobios y excepcionalmente se convierten en patógenos. Las micosis se dividen de la siguiente manera según la OMS: Ver tabla 1 (Arenas 2003)

	SITIO DE ATAQUE	AGENTE ETIOLÓGICO	OBSERVACIONES	DISTRIBUCION
Cutáneas (Superficiales)	Afectan a capas más profundas de la epidermis, el cabello y las uñas.	<i>Malassezia furfur</i> <i>Trichophyton spp.</i> <i>Microsporum spp.</i> <i>Epidermophyton spp.</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Infección superficial; relativamente inofensivo; el patógeno es dependiente en una fuente exterior de ácidos grasos. • Todos los dermatofitos son hongos filamentosos. Antropofílicos, zoofílicos, geofílicos. Transmitido siempre por el contacto directo o indirecto. 	Cosmopolita
Subcutáneas	Afecta principalmente miembros inferiores, pies y piernas.	<i>Sporothrix schenckii</i> <i>Phylaphora verrucosa</i> <i>Fonsecea pedrosi</i> <i>Cladosporium carrionii.</i> <i>Madurella micetomatis</i> <i>Scedosporium opiospermum.</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Es un Hongo dimorfo que causa lesiones ulcerosas en las extremidades. • Célula gruesa de color marrón, la lesión es granulomatosa y supurativa. • Supurativa con abundantes abscesos fibrosis y fístulas 	Zona tropical y subtropical (África, Asia y Latinoamérica)
Sistémicas (profundas)	Su primer contacto es el pulmón (Hongos inhalados), después se distribuye al resto de los tejidos.	<i>Coccidioides immitis</i> <i>Histoplasma capsulatum</i> <i>Blastomyces dermatitidis</i> <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Inhalación de esporas, micosis pulmonar • Mayor frecuencia de afectación cutánea y ósea, baja tasa de enfermedad pulmonar. • Enfermedad extrapulmonar, piel, hueso, genitourinaria, sistema nervioso central. • Enfermedad pulmonar de resolución espontánea, se disemina en piel, mucosas, ganglios linfáticos, viseras y meninges 	Latinoamérica y Asia

Oportunistas	Puede afectar piel, mucosas, estructuras profundas y órganos internos.	<i>Candida spp.</i> <i>Aspergillus spp.</i> <i>Cryptococcus spp.</i> <i>Mucor spp.;</i> <i>Rhizopus spp.;</i> <i>Conidiobolus spp</i> <i>Basidiobolus spp;</i> <i>entre otras.</i>	<ul style="list-style-type: none"> ● Infección primaria de la mucosa y piel con diseminación secundaria ● Pueden aparecer asma, infiltrados pulmonares, eosinofilia periférica, elevación de las concentraciones séricas de inmunoglobulina E ● Diseminación desde los pulmones, habitualmente al sistema nervioso central. ● Afección rinocerebral, pulmonar, gastrointestinal, mucormicosis cutánea 	Cosmopolita
---------------------	--	---	---	--------------------

TABLA. 1 Clasificación de las micosis según la OMS, Kayser (2005), Arenas (2003), Murray 2006

5.1.1. *Candida albicans*

Esta levadura ha recibido distintos nombres a lo largo de los años. Robín la denominó en 1853 *Oidium albicans*, esta especie estuvo incluida en 100 sinónimos y pasada a través de 18 géneros, entre ellos el género *Monilia*, en el cual estaba incluida la especie *Monilia candida*, luego *Monilia albicans*, hasta el trabajo de C.M. Berkhout, quien en 1923 propone el género *Candida* y la especie *albicans*, que fue aceptado por el Congreso Internacional de Microbiología en Nueva York en 1939.

Candida albicans, se encuentra actualmente clasificada taxonómicamente de la siguiente forma:

TABLA. 2 Clasificación taxonómica de *Candida albicans* (Pardi, Cardozo 2002)

CATEGORIA	NOMBRE
Reino	Fungi
Phylum	<i>Ascomicota</i>
Orden	<i>Saccharomycetales</i>
Familia	<i>Saccharomycetaceae</i>
Género	<i>Candida</i>
Especies	<i>albicans</i>

5.1.1.1. Características micro y macroscópicas

Candida albicans suele presentarse como una célula oval levaduriforme de 2 a 4 μm , con paredes finas; con extremos redondos de 3 a 5 μm de diámetro y pseudohifas, que son cadenas de levaduras alargadas que se forman cuando tras la gemación no se produce una separación de las células. (A. Ruiz, S. Moreno 2006).

Esta levadura tiene una tendencia a formar esporas grandes de pared gruesa, denominada clamidoconidios, éstas son terminales y tienen un diámetro de 7 a 8 μm y casi siempre se originan en el extremo del pseudomicelio (Alcama 2003, Carlile 2001). Una característica importante morfológica en la identificación, es la producción de tubo germinativo (filamento en suero), cuando las colonias son inoculadas en 0.5 ml de suero fetal bovino a una temperatura de 37° C observándose los resultados después de 2 ó 3 horas. (Arenas 2003)

Esta levadura se observa mejor al utilizar blanco de calcoflúor, el cultivo se logra de 24 a 48 horas en los medios habituales como Saboraud simple o con ciclohexamina y cloranfenicol donde se obtienen colonias lisas, blandas y brillantes de color blanco o ligeramente beige.

La composición química está representada por 20-40% de proteínas y 30-50% de polisacáridos, la proporción de lípidos es variable. La fracción lipídica va a depender de la cepa, edad del cultivo, condiciones ambientales y del origen de la fuente de carbono.

La pared celular de esta levadura, está compuesta principalmente por los polisacáridos Manán, glucán y quitina. La síntesis de los componentes de la pared celular está influenciada por las condiciones de crecimiento y por los estadios metabólicos. El polisacárido manán representa aproximadamente entre 15,2% y 22,9% del peso seco y poco más de 40% de los polisacáridos de la pared celular. El D-Glucán β -1-3 y el D-Glucán β -1-6 constituyen entre 47% y 60% del peso seco de la pared celular. Otros componentes son las proteínas en cantidades que oscilan entre 6% y 25%, lípidos entre 1% y 7% y quitina entre 0,6% y 9% del peso de la pared celular.

La membrana citoplasmática es una estructura que contiene las enzimas responsables de la síntesis de la pared celular. Ésta presenta una doble capa compuesta por lípidos. Además de los lípidos, la membrana citoplasmática está compuesta por grandes cantidades de proteínas y carbohidratos en menor proporción. (Cardi, Cardozo 2002)

En el citoplasma, *C. albicans* presenta: ribosomas, mitocondrias con doble capa, gránulos de glucógeno y vacuolas que, contienen en algunas ocasiones cuerpos lipídicos y gránulos de polifosfato. El núcleo es típico de una célula eucariótica, con membrana nuclear limitante, uno o varios nucleolos, ADN y ARN y varios cromosomas. (Cardi, Cardozo 2002)

5.1.1.2. Enfermedades causadas por *Candida albicans*

Candida albicans presenta una serie de factores de virulencia que facilitan la colonización y la infección del hospedador. Entre ellos destaca el dimorfismo o capacidad del hongo para desarrollar un crecimiento levaduriforme y filamentoso, ya que favorece la evasión de los mecanismos defensivos del hospedador. Otros factores de virulencia son las adhesinas que permiten la unión de la célula fúngica a receptores del hospedador o a materiales plásticos utilizados en medicina, como las prótesis y los catéteres; algunas enzimas como las proteinasas y fosfolipasas, que favorecen la diseminación por los tejidos del hospedador (A. Ruiz, S. Moreno 2006).

ENFERMEDADES CAUSADAS POR *Candida albicans*.

(Edwin, Murray 2006, Arenas 2004, Bonifaz 2000)

TABLA 3. Clasificación clínica de candidiasis

FORMA CLÍNICA	CUADRO CLÍNICO	DESCRIPCIÓN
Genital	Leucorrea blanco, espumoso, grumoso, de aspecto viscoso muy pruriginoso, que recubre la pared de la vagina y el endocervix	Es la infección más frecuente y molesta en el aparato genital de la mujer. Halladas también en niñas recién nacidas (alto nivel de hormonas heredadas por la madre) y en mujeres diabéticas por el incremento de glucosa en los tejidos, así como el paciente con tratamientos prolongados de antibióticos. En caso de los hombres, se presenta como balanopostitis; es una lesión en el pene y en el surco balanoprepusial con eritema y placas blanquecinas.
Oral	También conocida como algodoncillo, cepillo o moguet. Es una placa pseudomembranosa blanquecina cremosas, que pueden cubrir la lengua, mucosa oral y la comisura labial	Se ve en recién nacidos de madres con infecciones vaginales, pacientes con enfermedades terminales como el carcinoma.
Onicomycosis	La uña incrementa de grosor, opacándose, se oscurece y en ocasiones aparecen estrías. En el borde la uña hay inflamación, edema, dolor y puede producir expulsión de pus	La lesión es en la uña y en el borde de la misma (paroniquia), debido a la excesiva humedad.

Granulomas	Lesiones verrugosas vegetantes.	Se observa en niños inmunosuprimidos, o en pacientes con diabetes mellitus y VIH.
Mucocutánea crónica	Las lesiones abarcan todo el cuerpo, las mucosas y la piel son granulomatosas, produciendo invasión en todos los órganos.	Es casi exclusivo en niños con defectos genéticos o en la función del timo, que los llevan a alteraciones en la inmunidad celular.
Urinaria	Afecta al riñón produciendo pielonefritis, en la vejiga y uretra como polaquiuria, manifestaciones uretritis y dolor vesicular.	Se observa en pacientes diabéticos con catéteres y trastornos en las corticoides.
Sistémica profunda	Están asociadas por candidiasis broncopulmonar, endocarditis, meningoencefalitis.	Ocurre en pacientes con inmunosupresión humoral y celular como aquellos con VIH, debido a la invasión sanguínea que éstos presentan.

5.1.2. *Cryptococcus neoformans*.

Los primeros informes de infección en humanos causada por *Cryptococcus neoformans* datan de 1894, Buschke y Busee notificaron por separado el aislamiento del hongo en la tibia (osteomielitis) de una paciente de 31 años. La designación *neoformans* se refiere a que puede ser causante de cáncer o de tumor. Simultáneamente Sanfelice aisló una levadura encapsulada del jugo de un durazno, con la que provocó lesiones en animales. Vuillemin en 1901, lo denominó como *Cryptococcus hominis* y señaló que no formaba ascosporas. En 1970 Lodder y Kreger-Van Rji fueron quienes primero usaron el nombre *Cryptococcus neoformans*. Benham describió cuatro serotipos de *Cryptococcus neoformans*: A, B, C y D. Emmons en 1955, aisló el hongo en las heces de palomas y gallinas, que son la fuente principal de infección. (Ripon 1990)

En la actualidad la clasificación taxonómica de *Cryptococcus neoformans* tanto en su fase sexual como asexual es la siguiente:

TABLA 4. Clasificación taxonómica de *Cryptococcus neoformans* (Bonifaz 2000)

	FASE ASEXUAL	FASE SEXUAL
Clase	Deuteromycetes	Basidiomycetes
Subclase	Hyphomycetidae	Teliomycetidae
Orden	Cryptococcales	Ustilaginales
Familia	<i>Cryptococaceae</i>	Ustilaginaceae
Genero	<i>Cryptococcus</i>	<i>Fillobasidium</i>
Especie	<i>neoforman</i>	<i>neoformans</i>
Variedad	<i>neoformans o gatti</i>	<i>neoformans o gatti</i>

5.1.2.1. Características micro y macroscópicas

Los *Cryptococcus* son levaduras esféricas, redondas u ovals, de 3 a 8 μm de diámetro; con la cápsula, llegan a medir de 2 a 20 μm . Se reproducen por gemación única; se caracterizan por tener un cuello estrecho entre la célula madre y la hija. Excepcionalmente se observa gemación múltiple, con formas alargadas y pseudohifas. (Murray 2006) El tamaño de la levadura varía dependiendo de la cepa y del medio de cultivo que se utilice para su aislamiento. El medio de cultivo habitual es el agar Sabouraud, también puede utilizarse el de extracto de levadura y el medio de infusión cerebro-corazón (BHI). En estos medios, las

colonias se desarrollan en 48 a 72 horas; tienen aspecto mucoso brillante, convexo, color blanco amarillento que recuerda la «leche condensada». (Bonifaz 2000)

El hongo posee un metabolismo aerobio, por lo que no son organismos fermentadores; producen ureasa y utilizan varios hidratos de carbono. Las especies de criptococos se diferencian por varias características: crecimiento a 37°C, asimilación de la sacarosa, lactosa, galactosa, melobiosa, celobiosa, rafinosa, trealosa, dulcitol, utilización de KNO₃ y producción de ureasa y feniloxidasas. (J.L. Rodríguez, M. Cuenca 2009)

Cryptococcus neoformans es una levadura capsulada que habitualmente se le encuentra en la materia fecal de palomas y pichones que le proporciona un medio alcalino, rico en nitrógeno condiciones óptimas para su supervivencia.

La cápsula es una característica distintiva de *C. neoformans*, ya que ésta es responsable de la virulencia, se le han comprobado diversos efectos sobre la respuesta inmune sobresaliendo la inhibición de la fagocitosis y el estímulo en la producción de los linfocitos T supresores, estos fenómenos se explican en base a la composición química de la capsula la cual está formada en una menor proporción de glucopéptidos, pero la fracción responsable de las características inmunogénicas es un polisacárido, los cuales forman un compuesto α -glucorido-xilo manana, unido a moléculas de manosa este polímero puede diferir ligeramente en su composición y por lo tanto genera cuatro serotipos conocidos como A,B,C,D. Siendo estas: *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* (serotipos A y D), *Cryptococcus neoformans* var *gatti* (serotipos B y C). (Bonifaz 2000; Vázquez Y Martínez 2006)

5.1.2.2. Enfermedades causadas por *Cryptococcus neoformans*

La criptococosis es una enfermedad infecciosa generalmente sistémica que afecta a los animales y al hombre, se manifiesta sobre todo en personas inmunodeprimidas. La criptococosis como micosis oportunista, también se presenta en pacientes con neoplasias hematológicas, linfoma de Hodgkin, sarcidosis o hepatopatías crónicas graves y en enfermos transplantados renales o tratados con altas dosis de glucocorticoides. (Rodríguez y Cuenca 2009)

La puerta de entrada de los propágulos del hongo (levaduras desecadas de < 3 μ m) es respiratoria, por lo que el pulmón es el primer órgano en infectarse. La enfermedad puede quedar localizada o diseminada por vía sanguínea, afectando principalmente el sistema nervioso central. Las manifestaciones de la criptococosis varían según el estado

inmunitario del paciente, siendo mucho más graves en los pacientes inmunodeprimidos y especialmente con SIDA. (Ruiz Y Moreno 2006)

ENFERMEDADES CAUSADAS POR *Cryptococcus neoformans*

(Ruiz y Moreno 2006, Murray 2006, Bonifaz 2000, Arenas 2004)

TABLA 5. Clasificación clínica de criptococosis

FORMA CLINICA	CUADRO CLINICO	DESCRIPCIÓN
Sistema Nervioso Central (meningoencefalítica)	Cefalea, fiebre, náuseas, vómito, pérdida de memoria, rigidez de la nuca, visión borrosa y/o coma.	Pueden aparecer los síntomas después de 2 a 4 semanas. Más del 90% de los pacientes presentan alteraciones en el líquido cefalorraquídeo, como son presión alta, elevación de proteínas, linfocitosis y baja concentración de glucosa.
Pulmonar	Grados variables de temperatura, Tos, dolor torácico, esputo, pérdida de peso, hemoptisis, disnea y pérdida del sueño.	En pacientes inmunocomprometidos, el curso de la infección es más rápido y tiende a diseminarse. Presentan cambios radiológicos muy variables como lesiones de aspecto tumoral con infiltrados peri bronquiales, cavitación, efusión pleural, fibrosis y calcificaciones.
Cutánea	Las lesiones se presentan	Las lesiones pueden presentarse en todo el cuerpo, pero con mayor frecuencia afecta principalmente cara, cuello y miembros.
Ocular	Ceguera, parálisis ocular, coriorretinitis, disminución de la visión, fotofobia, papiloedema y lesiones en retina con hemorragia.	Suelen llevar a la pérdida irreversible de la visión.
Urogenital	Sitio común que es infectado es la próstata (prostatitis)	Han sido reportados casos en pacientes con SIDA tanto hombres como mujeres que tienen lesiones genitales causadas por este hongo.
Gastrointestinal	Diarrea, dolor abdominal, fiebre, náuseas y/o fluido grisáceo, en el caso del hígado presenta hepatitis y cirrosis.	Infecciones desde el esófago hasta el recto, en hígado, páncreas y a lo largo de todo el intestino.

5.1.3. *Fusarium moniliforme*

El género *Fusarium* pertenece al phylum *Ascomycota*, orden *Hypocreales*. Algunas de las especies del género *Fusarium* sólo presentan una fase asexual (anamorfo o forma imperfecta), mientras que otras especies pueden presentar además un estado teleomórfico (forma sexual o perfecta). Los estados teleomórficos de *Fusarium*, pueden estar encuadrados en cuatro géneros, siendo *Gibberella* el género que agrupa a *Fusarium moniliforme* (Seifert y Lévesque 2004)

Las especies del género *Fusarium* constituyen un grupo cosmopolita de hongos filamentosos que están ampliamente distribuidas en el suelo y que colonizan las partes aéreas y subterráneas de las plantas, así como residuos vegetales y otros substratos orgánicos. Se considera un género de hongos fitopatógenos, ya que son capaces de infectar especies vegetales y producir enfermedades, aunque también pueden vivir de manera saprófita sobre residuos de éstas o en productos derivados de ellas. Son responsables de marchitamientos, podredumbres de la raíz y chancros en una amplia variedad de plantas de cultivo. Algunas de las especies de este género son capaces de producir metabolitos secundarios conocidos con el nombre de micotoxinas, que causan enfermedades severas agudas y crónicas en animales y humanos al ingerir productos contaminados por ellas. (Seifert y Lévesque 2004)

Fusarium en el maíz

La enfermedad que *Fusarium* produce en el maíz se denomina “fusariosis de la mazorca” (“*Maize Ear Rot*”). En función de las especies de *Fusarium* que colonicen el cereal, puede denominarse como “fusariosis roja o rosa”. Cuando a la enfermedad se la denomina “fusariosis rosa”, es por la presencia de *F. moniliforme*. La especie *F. moniliforme*, también puede producir la “fusariosis del tallo” (“*Stalk rot of maize*”), por tanto las micotoxinas asociadas a esta enfermedad serán ZEA, DON y fumonisinas. (Seifert y Lévesque 2004)

TOXINAS PRODUCIDAS POR *Fusarium*

El género presenta especies fitopatógenas, que causan graves enfermedades principalmente en los cereales, aunque puede afectar otros vegetales y frutas. Su importancia no se debe tan solo a la pérdida de cosechas, sino también a la elaboración de micotoxinas. Estas micotoxinas son productos naturales de bajo peso molecular con elevada diversidad estructural, pueden estar presentes en los cereales y sus productos, producen síndromes de intoxicación en animales y llegando a la cadena alimenticia de los humanos. Las toxinas más comunes elaboradas por especies de este género son los

tricotecenos, la zearalenona, la moniliformia y las fumosinas. Estos metabolitos tienen algunas características en común. Se pueden elaborar tanto durante el crecimiento de la planta como al principio del almacenamiento. Pueden estar presentes en granos de cereales asintomáticos. Una característica importante del género es que una misma micotoxina puede ser producida por diferentes especies del mismo, y que una misma especie puede producir diferentes micotoxinas a la vez, por lo que en un mismo sustrato podemos encontrar más de un metabolito tóxico. (Jay 2002)

5.1.3.1. Características microscópicas

La principal característica del género es la presencia de conidios hialinos, curvados fusiformes y septados denominados macroconidios. Éstos se forman a partir de unas estructuras denominadas esporodoquios o bien pionotes. Algunas especies también pueden producir conidios más pequeños uni o bicelulares denominados microconidios. Para realizar la identificación es importante tomar en cuenta la forma de esporodoquios, color y forma de los macroconidios, sus dimensiones, el número de septos y la forma de la célula basal y apical. (Soriano 2007)

Los *Tricotecenos* son un grupo de metabolito secundario, éstos se clasifican en dos tipos según su estructura química; de tal forma que hay tricotecenos tipo A y los diacetoxiescirpenol (DAS) y los de tipo B como el deoxinivalenol (DON). (Soriano 2007)

La *micotoxina* T-2 es un tricoteceno de tipo A que se metaboliza rápidamente a HT-2, es una especie saprofita, que forma colonias con micelio blanco algodonoso y con reverso color rojo carmín. Forma abundantes microconidios, los macroconidios presentan de tres a cinco septos, no son muy curvados y la célula apical y basal están poco diferenciadas. (Soriano 2007)

La *zearalenona* compuesto anabólico y uterotrópico con actividad estrogénica, presenta un micelio blanco flocoso que con el tiempo se vuelve marrón y con un reverso rojo a púrpura o marrón, presenta monofálides y no forma microconidios. Los macroconidios están curvados dorsalmente y presentan cinco septos. (Soriano 2007)

La *moniliformina* se forma por un gran número de géneros de *Fusarium*. Se aisló por primera vez del genero *F. moniliforme* actualmente esta especie se considera un complejo de especies y lo que se le denomina *F. moniliforme*. (Soriano 2007)

Las colonias presentan un micelio flocoso de coloraciones que varían desde el blanco al violeta y con un reverso de color claro a púrpura. Forma macroconidios, aunque no son

CLASE	MECANISMO DE	FARMACO	ESPECTRO
-------	--------------	---------	----------

muy abundantes ni característicos. No forman clamidiosporas y solo se pueden diferenciar por el tipo de conidióforo que presentan y la manera de formar los microconidios. (Soriano 2007)

5.1.4. Clasificación de los antimicóticos

Se han descubierto muy pocos antimicóticos en comparación con los antibióticos antibacterianos, pueden ser fungistáticos o fungicidas, según inhiban el crecimiento o produzcan lisis en los hongos. (ARENAS 2003)

El concepto de antifúngico o antimicótico engloba cualquier sustancia capaz de producir una alteración tal de las estructuras de una célula fúngica que consiga inhibir su desarrollo, alterando su viabilidad o capacidad de supervivencia bien directa o indirectamente lo que facilita el funcionamiento de los sistemas de defensa del hospedero. (Arenas 2004, Elias J. 2003)

Los antimicóticos pueden dividirse de acuerdo con la siguiente clasificación:

TABLA 6. Clasificación de los antimicóticos

	ACCION		
Polienos	Desestabiliza la membrana celular del hongo. Se unen al ergosterol, alterando la membrana plasmática causando salida del contenido citoplasmático.	Anfoterisina B Nistatina	Útil para infecciones sistémicas y localizadas
Pirimidina	Transportado intracelularmente vía citosina permeasa. Convertido a 5-fluorouracilo vía citosina desaminasa y subsecuentemente convertida a 5-fluorouridina trifosfato, la cual es incorporada al RNA del hongo e interfiere con la síntesis de proteínas. El intermediario de 5FC también inhibe timidilato sintasa e interfiere con la síntesis de DNA.	5-fluorocitosina	Usada para infecciones sistémicas por hongos
Azoles	Interfiere con la síntesis de esterol vía inhibición de Citocromo P-450 dependiente de C-14 α dimetilasa. El Citocromo P-450 es una enzima importante para convertir lanosterol a ergosterol.	Ketoconazol Fluconazol Itraconazol Voriconazol Posaconazol	Se administra tópicamente para tratar infecciones por dermatofitos
Equinocandinas	Interfiere en la síntesis de β -1,3 glucano. la pared celular del hongo es mayormente polisacáridos, y los glucanos son los polímeros más abundantes de la membrana celular del hongo. Glucano sintasa cataliza la polimerización de estos polisacáridos, la inhibición de esta enzima provoca permeabilidad creciente de la pared celular y lisis de la célula.	Caspofungina Micafungin Anidulafungin	Usado para tratar infecciones por Candida y aspergilosis invasiva

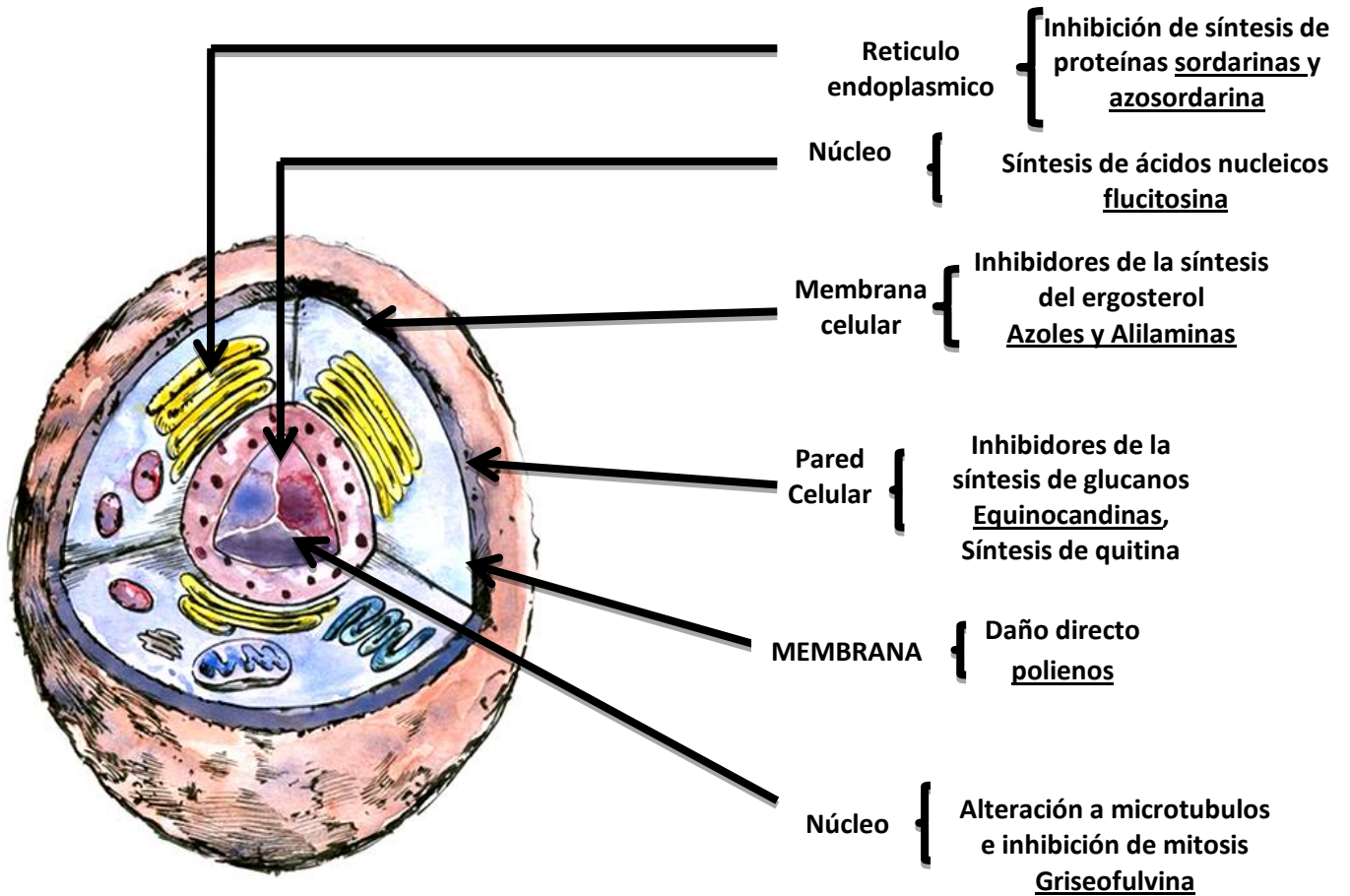


FIG 3. Sitio de acción de los antifúngicos (Elias 2003, Tapia 2004)

5.1.5. Microscopia electrónica de transmisión (MET)

El microscopio electrónico de transmisión (MET), permite la observación de muestra en cortes ultrafinos. Un MET dirige el haz de electrones hacia el objeto que se desea aumentar. Una parte de los electrones rebotan o son absorbidos por el objeto y otros lo atraviesan formando una imagen aumentada del espécimen. Para utilizar un MET debe cortarse la muestra en capas finas, no mayores de un par de miles de angstroms. Se coloca una placa fotográfica o una pantalla fluorescente detrás del objeto para registrar la imagen aumentada. Los microscopios electrónicos de transmisión pueden aumentar un objeto hasta un millón de veces (Vázquez, Echeverría 2000)

Todos los microscopios electrónicos cuentan con varios elementos básicos. Disponen de un cañón de electrones que emite los electrones que chocan contra el espécimen, creando una imagen aumentada. Se utilizan lentes magnéticas para crear campos que dirigen y enfocan el haz de electrones, ya que las lentes convencionales utilizadas en los microscopios ópticos no funcionan con los electrones. El sistema de vacío es una parte relevante del microscopio electrónico. Los electrones pueden ser desviados por las moléculas del aire, de forma que tiene que hacerse un vacío casi total en el interior de un microscopio de estas características. Por último, todos los microscopios electrónicos cuentan con un sistema que registra o muestra la imagen que producen los electrones (Kessel y Shin 1976)

La potencia amplificadora de un microscopio óptico está limitada por la longitud de onda de la luz visible. El microscopio electrónico utiliza electrones para iluminar un objeto. Dado que los electrones tienen una longitud de onda mucho menor que la de la luz pueden mostrar estructuras mucho más pequeñas. La longitud de onda más corta de la luz visible es de alrededor de 4.000 angstroms (1 Angstrom es 0,000000001 metros). La longitud de onda de los electrones que se utilizan en los microscopios electrónicos es de alrededor de 0,5 angstroms (Vázquez 2000, Kessel 1976)

6.0. JUSTIFICACION

Uno de los mejores indicadores de la importancia que están adquiriendo las micosis, principalmente las infecciones invasoras, es la continua e imparable notificación de su incremento clínico (Quindós 2002), el aumento de las infecciones por hongos, unido a la resistencia que han empezado a tener estos agentes a los antimicóticos, han llevado a una constante búsqueda de alternativas terapéuticas eficaces que puedan brindar más y mejores opciones. Un ejemplo de lo descrito es la fitoterapia la cual en nuestro país es

basta gracias al conocimiento ancestral. La ciencia actual ha recurrido a estos conocimientos debido a que muchas de las plantas a las que se les ha encontrado una actividad antimicrobiana no tienen el efecto deseado cuando se habla de hongos, de ahí la necesidad de buscar nuevas plantas con actividad antimicótica y una baja toxicidad.






7.0. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antimicótico de *Ricinus communis* L. (Higuerilla) y cambio morfológico producido, al utilizar el extracto metanólico de hoja frente a dos cepas de hongos levaduriformes: *Candida albicans* y *Criptococcus neoformans* y un hongo filamentoso: *Fusarium moniliforme*

OBJETIVOS PARTICULARES

- 🍄 Obtener extractos de *Ricinus communis* L. (Higuerilla), empleando diferentes disolventes orgánicos (hexano, acetato de etilo y metanol), para determinar el óptimo para extraer mayor cantidad de metabolitos en hoja.

- 
 Evaluar la sensibilidad de *Candida albicans* ATCC 10231 y *Criptococcus neoformans*, empleando discos impregnados con extracto metanólico de flores de higuierilla (EMFH), mediante la técnica de difusión en agar, determinando si presentan halos de inhibición.
- 
 Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), del extracto metanólico de flores de higuierilla (EMFH), mediante la prueba de dilución en placa para *Candida albicans* ATCC 10231, *Criptococcus neoformans* y dilución de 24 pozos para *Fusarium moniliforme*.
- 
 Determinar la Concentración Mínima Fungicida (CFM) del extracto metanólico de flores de higuierilla (EMFH), mediante la prueba de macrodilución en caldo, contra la cepa *Candida albicans* y *Criptococcus neoformans*.
- 
 Evaluar el cambio morfológico (tamaño y forma) de *Candida albicans* ATCC 10231 y *Criptococcus neoformans* utilizando el analizador de imágenes Q Capture Pro 6.0 (Cibernetics Media).
- 
 Determinar cambios estructurales en *Candida albicans* ATCC 10231 y *Criptococcus neoformans* mediante microscopía óptica y electrónica, para observar el daño causado por el extracto metanólico de flores de higuierilla.

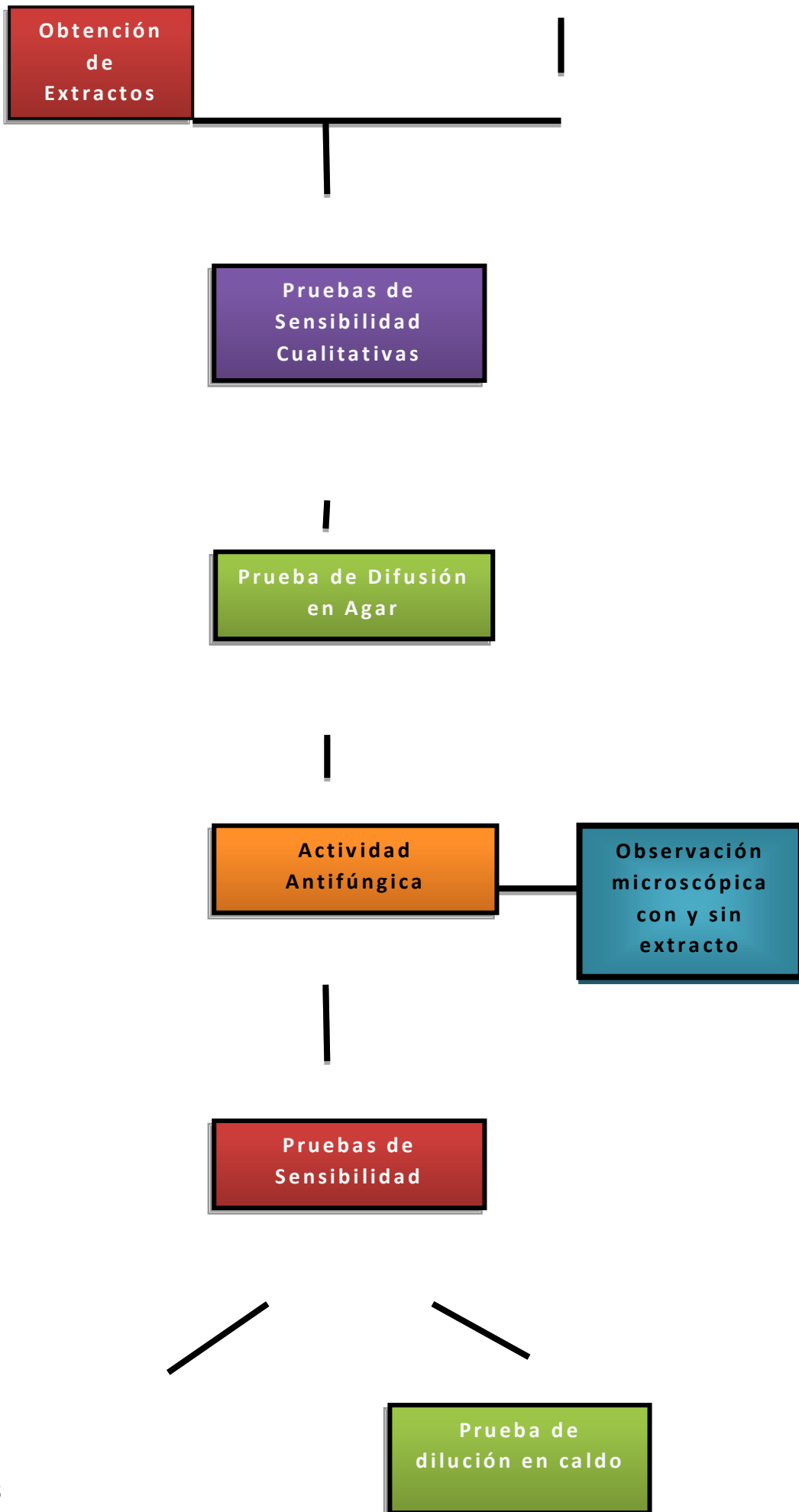
8.0. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

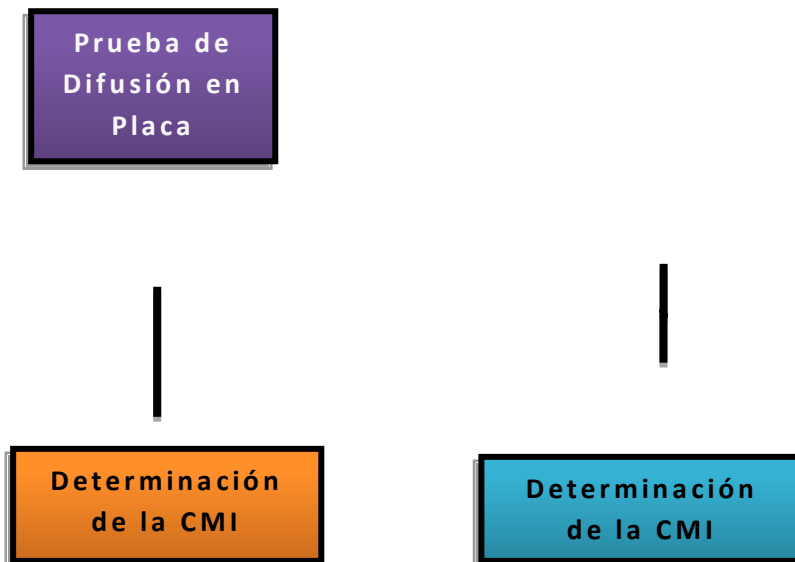
Diseño experimental

**Flores de *Ricinus communis* L.
(Higuierilla)**

**Cepas de Hongos
Levaduras
(*C. albicans* ATCC10231
y *C. neoformans*)
Filamentosos**

|







9.0. MATERIALES Y MÉTODOS

9.1. Cepas de hongos:

Se usaron las siguientes cepas de hongos obtenidas del cepario del laboratorio 6 de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación y del laboratorio de Fitoquímica de la FES-Iztacala.

 *Candida albicans* ATCC 10231¹

 *Cryptococcus neoformans*¹

 *Fusarium moniliforme*²

Las cepas se obtuvieron del; ¹Cepario de Laboratorio de microbiología de la FES-Cuautitlán,

² Laboratorio de farmacognosia de la FES- Iztacala

9.2. Preparación del Extracto de *Ricinus communis* L (Higuerilla)

Se recolectaron flores en las instalaciones de la FES-Cuautitlán, Estado de México y posteriormente se enviaron al herbario de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, donde se depositó un ejemplar de la misma, el ejemplar fue identificado como *Ricinus communis* L. familia Euphorbiaceae número de registro IZTA 42416. Las flores se secaron a temperatura ambiente, posteriormente se pesaron (obteniéndose 119.30 gr), se molieron empleando un molino manual.

9.3. Selección del disolvente óptimo

Maceración: en tres frascos de cierre hermético se colocó en una muestra de las flores molidas y se agregó hexano, acetato de etilo y metanol respectivamente; se dejó reposar por 1 semana con agitación frecuente, después se filtró y se dejó evaporar el disolvente a temperatura ambiente.

Identificación: Se realizó cromatografía en capa fina de sílice y como fase móvil acetato de etilo/ hexano en diferentes proporciones, empleando como revelador luz ultravioleta. De esta manera se logró determinar el disolvente óptimo para la extracción.

Preparación del extracto en el disolvente óptimo

Maceración: en un frasco con tapa se colocó el total de flores molidas (119.30 gr) y se agregó metanol. Se dejó reposar en un lugar oscuro durante 15 días, después se filtró y posteriormente se concentró la muestra por destilación a presión reducida, dejando evaporar el disolvente remanente del extracto a temperatura ambiente. Obteniéndose como peso final de extracto de flores 4.8 gr.

9.4. Evaluación de la actividad antifúngica

9.4.1. Pruebas de sensibilidad cualitativas

Hongos Levaduriformes

Método de difusión en agar

Se prepararon cajas de Agar Mueller-Hinton suplementado con 2 % de glucosa y 0.5 µg/ml de azul de metileno. Se sembró de forma masiva con el inóculo estandarizado igualando al Nefelómetro de Mac Farland (1×10^6 UFC/ml) de cada una de las cepas de hongos y se colocan los discos impregnados con 10 µl del EMFH, a una concentración de 1mg/ml y 2mg/ml usando como disolvente dimetilsulfóxido. Las cajas se incubaron a 35°C y se toman las lecturas a las 24 y 48 horas respectivamente; midiendo los halos de inhibición.

Hongos filamentosos

Método de inhibición del crecimiento radial. (Método modificado de Wang y Bun, 2002.)

Se prepararon cajas de Agar Dextrosa Papa y se colocó en el centro de cada placa un inóculo de 5 mm de diámetro del hongo a probar. Se colocaron alrededor del inóculo, a una distancia de 30 mm, los discos impregnados con 10 µl del EMFH a una concentración de 2mg/disco. Se incubaron las placas a 28 °C durante 72 horas o hasta que la superficie del agar esté cubierta por el micelio. Observar la formación de zonas de inhibición con formas de medias lunas. (Wang 2002)

9.4.2. Pruebas de sensibilidad cualitativas

Hongos Levaduriformes (*C. albicans* ATCC 10231 y *C. neoformans*)

Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)

Método de dilución en placa (Modificado de Koneman et al. 2003)

Se prepararon cajas con 6 ml de Agar Dextrosa Sabouraud adicionadas con diferentes concentraciones de EMFH 3.0, 2.5, 2.0, 1.5, 1.0, 0.5 mg/ml partiendo de una solución stock (ver anexo 1, tabla 8). Se inoculó por triplicado una placa de cada concentración con cada levadura se incubaron a 35 °C durante 24-48 horas. Empleando como control de crecimiento una placa de medio sin compuestos. Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).

Determinación de la concentración fungicida mínima (CFM)

Prueba de sensibilidad por macrodilución en caldo

Se prepararon tubos con 2 mL de caldo Dextrosa Sabouraud; una vez estériles, se le adicionó concentraciones de 3.0, 2.5, 2.0, 1.5, 1.0, 0.5 mg/ml de extracto de hoja de Higuerilla contra *Candida albicans* (ATCC 10231) y *Criptococcus neoformans*, provenientes de una solución Stock (ver anexo 1, tabla 10). A partir de un cultivo de *Candida albicans* (ATCC 10231) de 24 h y de un cultivo de *Criptococcus neoformans* de 48 h, se prepararon inóculos; ambos igualados al tubo 0.5 del Nefelómetro de Mac Farland (1×10^6 UFC/mL) en solución salina fisiológica estéril, a los tubos se le agregó 100 μ L de inóculo, respectivamente. Fueron homogeneizadas e incubadas a 35 °C durante 24 h con respecto a *Candida albicans* (ATCC 10231) y 48 h para *Criptococcus neoformans*. Transcurrido el tiempo de incubación se tomaron 10 μ l de cada tubo y fueron sembrados en cajas de Agar Dextrosa Sabouraud. Se determinó la Concentración Fungicida Mínima (CFM). Método modificado de NCCLS M27-A2

Hongos filamentosos (*Fusarium moniliforme*)

Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)

Método de dilución de 24 pozos (Modificado de Ye *et al*, 1999)

Empleado una placa de 24 pozos, se adicionó en cada pozo 1 ml del medio Agar Dextrosa Papa, con cada una de las diferentes concentraciones del extracto de higuerilla 5.5, 5.0, 4.5, 4.0, 3.5, 3.0, 2.0mg/ml partiendo de una solución Stock(ver anexo 1, tabla 9) . Se consideró tres pozos por cada dilución. En el centro de cada pozo se colocó un inóculo de 1mm de diámetro con el hongo filamentosos. Se Incuban las placas a 28°C hasta el desarrollo completo en el pozo control, al cual no se le adicionó ningún compuesto. Medir el área de crecimiento micelial para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).

9.5. Observación de cambios estructurales

Se observó el cambio morfológico de las levaduras (tamaño y forma), medidas mediante el uso del analizador de imágenes Software Q Capture Pro 6.0 (Cibernetics Media),

considerando 10 observaciones por cada tipo celular y además para *C. albicans* ATCC 10231, inhibición del tubo germinativo.

9.5.1. Microscopía de fluorescencia

Se realizaron observaciones de *Candida albicans* (ATCC 10231) y de *Cryptococcus neoformans* tratadas con EMFH y sin extracto, para el montaje de la prueba se colocó en un portaobjetos una gota del inóculo y una gota de una solución de blanco de Calcoflúor al 1%, se cubrió con un portaobjetos y se observó, empleando un microscopio de luz con epifluorescencia (Carl Zeiss, Axioscop 40), empleando el objetivo de 40X, teniendo acoplada una Cámara Evolution VF Cooled Color Media Cybernetics. Las imágenes fueron analizadas usando un Software Q Capture Pro 6.0 (Cybernetics Media), considerando 10 observaciones por cada tipo celular.

9.5.2. Microscopía electrónica

También se obtuvieron micrografías electrónicas de transmisión de secciones ultrafinas de ambas levaduras en un microscopio electrónico de transmisión (Carl Zeiss, modelo 900). Se realizó en el laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNAM.

Las células de levadura fueron prefijadas en una mezcla de paraformaldehído, glutaraldehído, MgCl₂, CaCl₂, dimetilsulfóxido (DMSO) y Azul de Alcian por 3 h a temperatura ambiente, de acuerdo a las recomendaciones de Shepherd, 1987 y Jabra-Rizk, 1999 (Ver anexo 3).

10. RESULTADOS

Se obtuvo el extracto con 119.30 g de flores molidas sometidas a maceración con metanol obteniendo un peso final de 4.8 gr de extracto de Higuera.

Pruebas cualitativas

Difusión en Agar

Esta prueba se basa en la inhibición del crecimiento fúngico, mediante la difusión de sustancias activas en un medio sólido la que se evidencia con la formación de halos de inhibición. Tal como se muestra en la fig. 7, se utilizaron concentraciones de 1mg/ml y 2mg/ml para ambas levaduras *C. neoformans* y para *C. albicans* ATCC 10231.

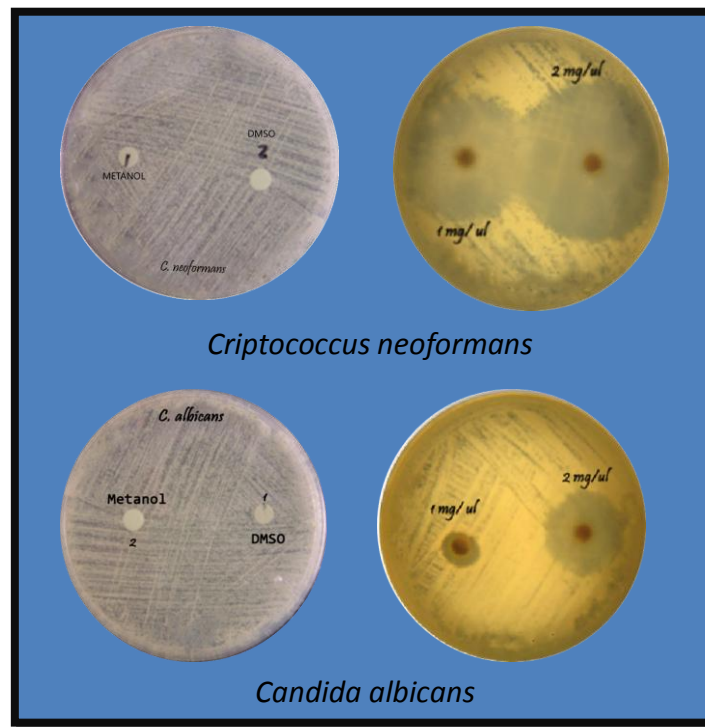
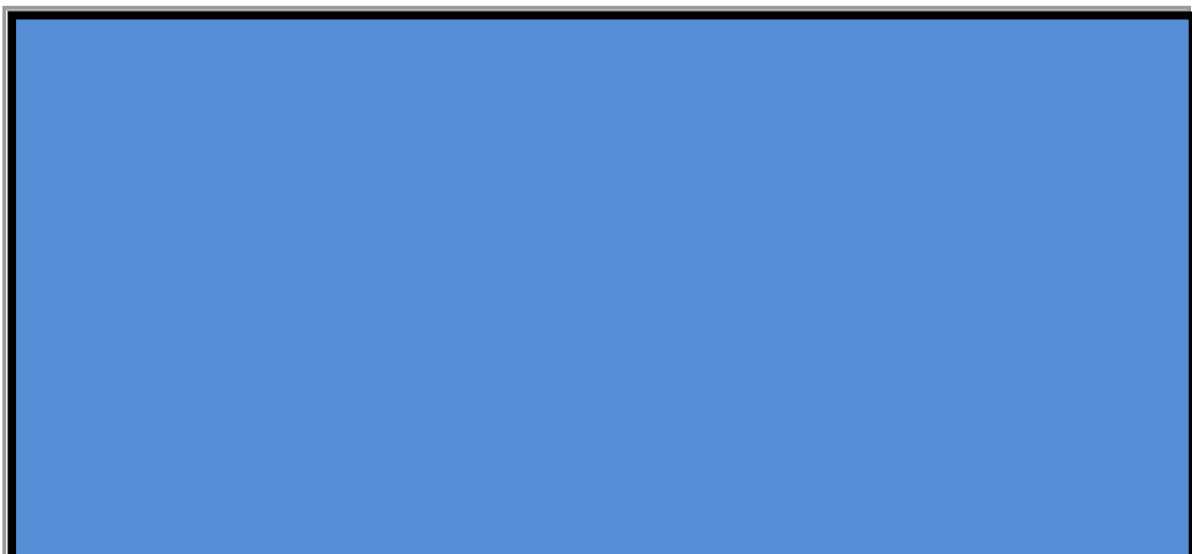


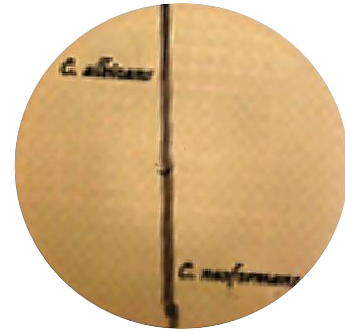
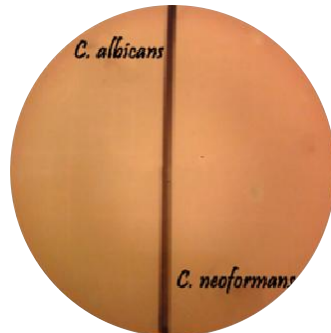
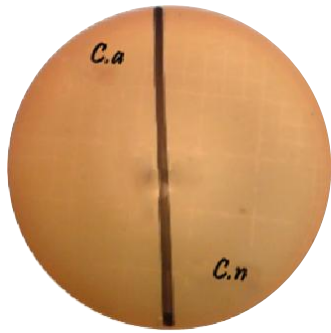
FIG. 4 Con el extracto metanolico de *Ricinus communis* L. (Higuerilla); se observa un diámetro de 21mm para *Candida albicans* a una concentración de 2mg/ml y de 12mm a una concentración de 1mg/ml ; para *Cryptococcus neoformans* a una concentración de 1 mg/ml se observa un diámetro de 22.3mm y a una concentración de 2 mg/ml un diámetro de 27.6 mm. Tambien se muestran los controles con los disolventes en el cual no se observa inhibición.

Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CMI)

Dilución en Agar

Se determinó la CMI del extracto metanólico de Higuerilla sobre el crecimiento de la cepa *C. albicans* ATCC 10231 y *C. neoformans*. En la figura 8 se observa un crecimiento a la concentración de 0.5 mg/ml, lo cual nos indica que para ambos casos (*C. albicans* y *C. neoformans*) la CMI es de 1 mg/ml.

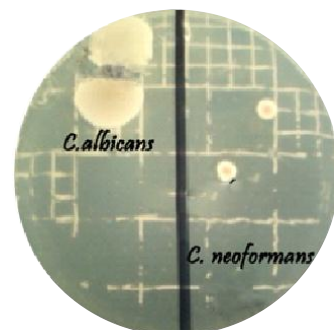
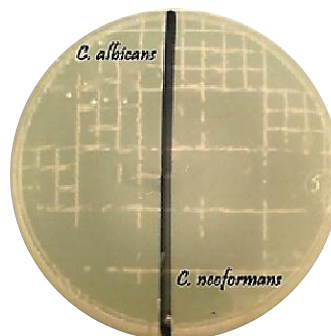
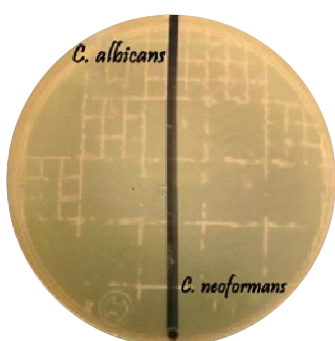




3mg/ml

2.5mg/ml

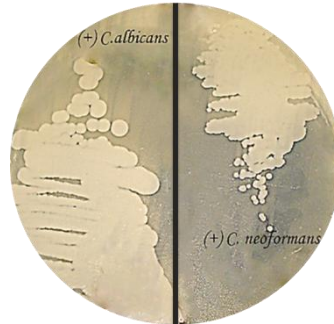
2.0 mg/ml



1.5mg/ml

1.0mg/ml

0.5 mg/ml



CONTROL (+)

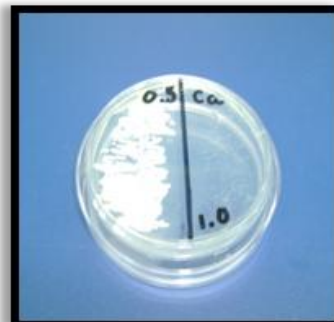
FIGURA. 5 Determinación de la CMI de la cepa de referencia *C. albicans* ATCC 10231 y *C. neoformans* por medio de la técnica dilución en agar. La CMI se determinó como la concentración más baja capaz de inhibir el crecimiento visible, que para este caso de *C. albicans* y para *C. neoformans* fue de 1.0 mg/ml.

***Candida albicans* determinación de la concentración fungicida mínima (CFM)**

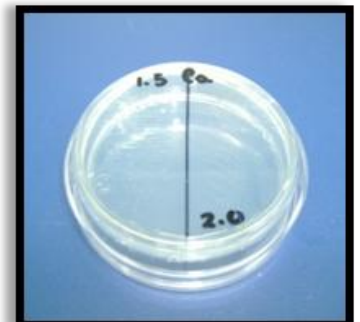
Se determinó la CFM con el Extracto Metanólico de Flores de Higuierilla sobre las cepas *C.*



Control (+)



Candida albicans



*Cryptococcus
neoformans*

albicans ATCC 10231 Y *C. neoformans*.

FIG.6 Determinación de la CFM de la cepa de referencia *C. albicans* ATCC 10231 y *C. neoformans* por medio de la técnica macrodilución en caldo. La CFM se determinó como la menor concentración del antifúngico que no muestra crecimiento o bien, este es inferior a tres colonias la cual corresponde a 99.5% de la actividad fungicida, que para este caso de *C.albicans* la CFM es de 1 mg/ml y para *C. neoformans* es de 1.5 mg/ml.

Hongos Filamentosos

Con la prueba de inhibición del crecimiento radial para hongos filamentosos se encontró que fue inhibido el desarrollo de *F. moniliforme* por el EMFH. En la fig. 10 y tabla 7 se presentan los resultados obtenidos para CMI con el EMFH, en placa de 24 pozos para *F. moniliforme*, considerando que es mayor a 5.5 mg/ml, ya que se observa reducción, pero no inhibición total del crecimiento.



FIG. 7 Determinación de la CMI de la cepa *Fusarium moniliforme*, en la prueba de dilución en placa, se emplean tres repeticiones por cada dilución, se observa reducción de crecimiento aunque la CMI es superior a la mayor concentración probada.

Resultados de crecimiento micelial para *Fusarium moniliforme*

TABLA. 7 Porcentaje de reducción del crecimiento a diferentes concentraciones.

Concentración (mg/ml)	5.5	5.0	4.5	4.0	3.5	3.0	2.5	CONTROL (+)
Crecimiento (cm)	0.2	0.4	0.4	0.5	0.6	0.7	0.7	0.9
	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.7	0.9
	0.2	0.3	0.4	0.5	0.5	0.6	0.6	0.9
Promedio de Crecimiento (cm)	0.2	0.3	0.4	0.5	0.5	0.6	0.6	0.9
Inhibición (cm)	0.7	0.6	0.5	0.4	0.4	0.3	0.3	0.0

Inhibición (%)	77.7	66.6	55.5	44.4	44.4	33.3	33.3	0.0
----------------	------	------	------	------	------	------	------	-----

Candida albicans ATCC10231

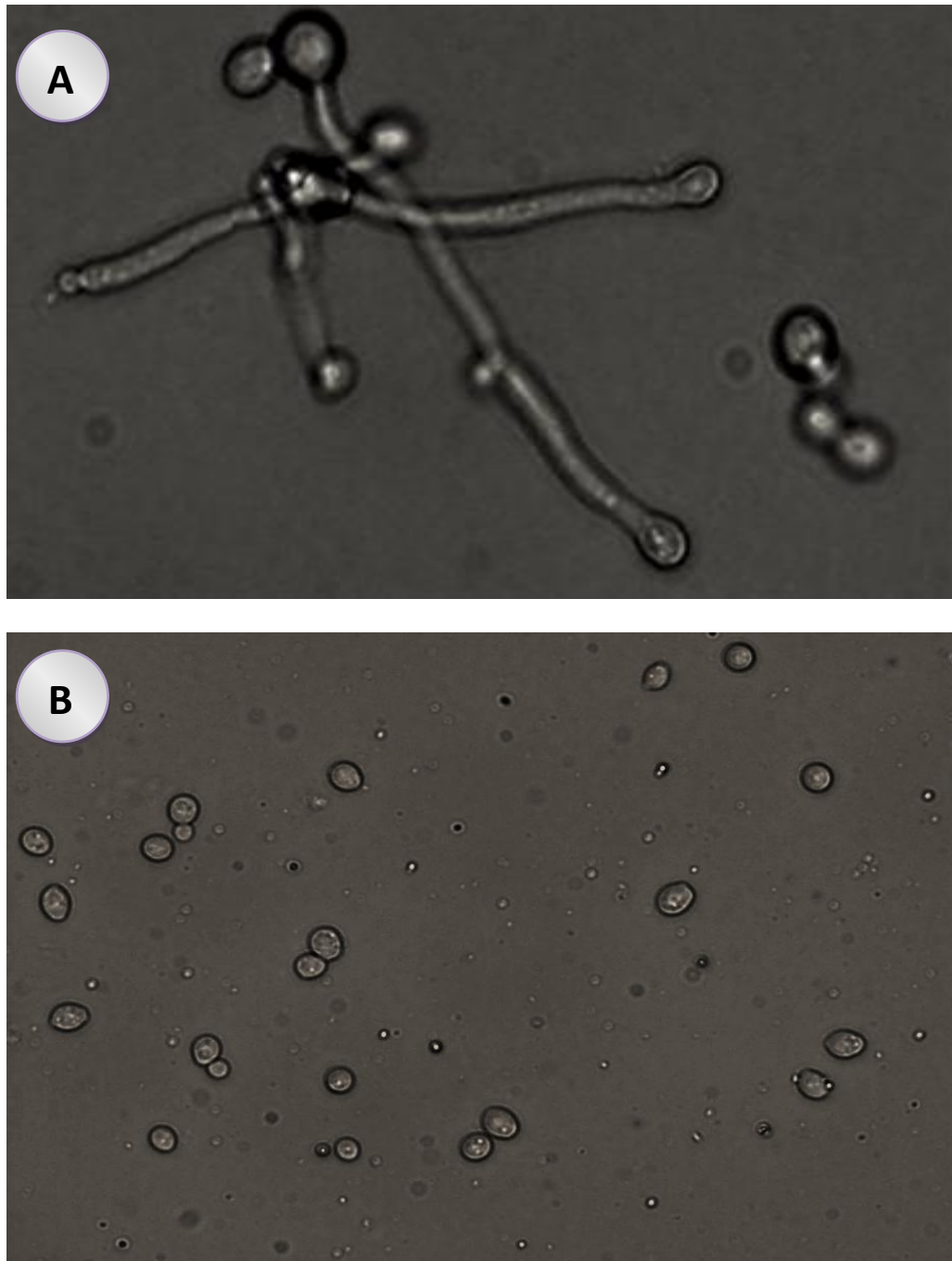


FIG. 8,9 Inhibición en la formación de Tubo Germinativo en *C. albicans* ATCC 10231 por acción del EMFH (Campo claro 40 X). En A se muestra el control después de tres horas de incubar en Suero Fetal bovino a 35°C, en la cual hay formación de Tubo Germinativo y en la imagen B se muestra la Inhibición del tubo germinativo a una concentración de 1.5 mg/ml de EMF, bajo las mismas condiciones de crecimiento.

Candida albicans ATCC10231

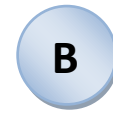
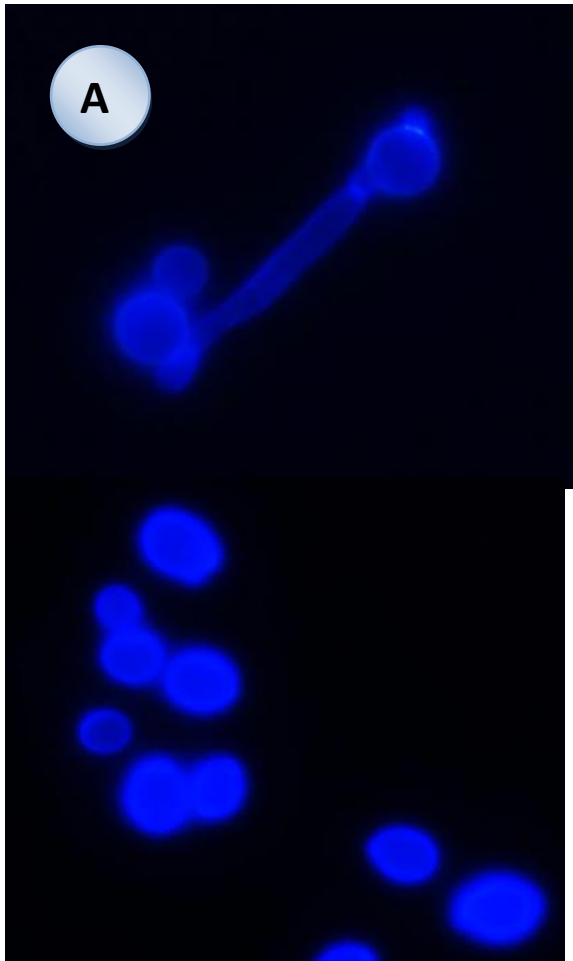


FIG. 10, 11 Tinción de *C. albicans* ATCC 10231 con Blanco de Calcoflúor (Tinción Fluorescente a 40X) En la imagen **A** se muestra el control después de tres horas de incubar en Suero Fetal bovino a 35°C, en la cual hay formación de tubo germinativo y en la imagen **B** se muestra la Inhibición del tubo germinativo a una concentración de 1.5 mg/ml de EMF, bajo las mismas condiciones de crecimiento.

Cryptococcus neoformans

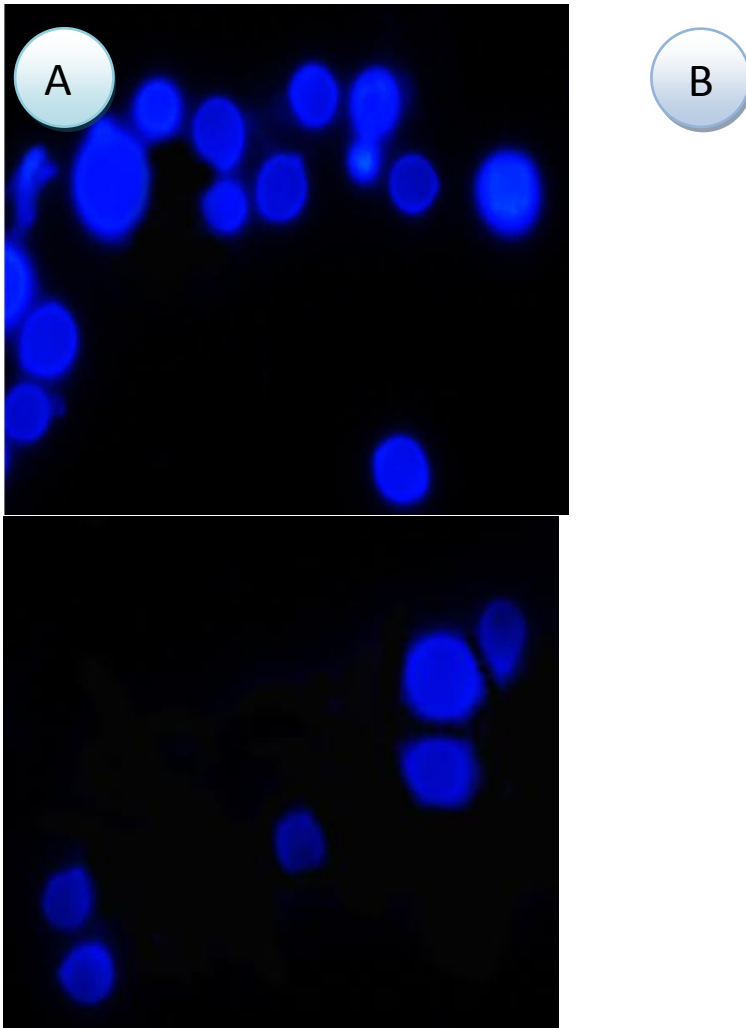


FIG. 12, 13 Tinción de *C. neoformans* con Blanco de Calcoflúor (Tinción Fluorescente a 40X). En la imagen A se muestra el control células esféricas u ovoides. En B se le adicionó EMFH a una concentración de 2mg/ml, solo podemos observar reducción en el tamaño sin alteración morfológica aparente.

Fusarium moniliforme

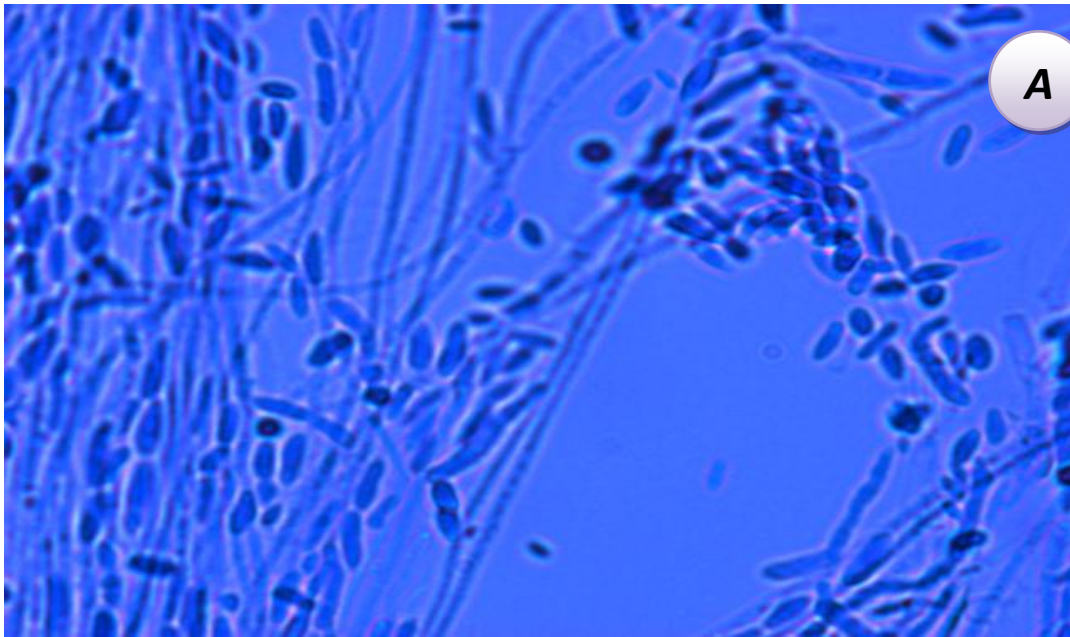


FIG. 14, 15 Tinción de *F. moniliforme* con Azul de Algodón (Campo Claro 40 X). En **A** se muestra el control donde se aprecia tamaño forma, así como hifas sin daño alguno, mientras que en **B** al adicionar EMFH a una concentración de 3.5mg/ml y dejarlo en contacto por 24 horas se observa deformación en las hifas lo cual, representa daño en la estructura fúngica.

GRÁFICAS

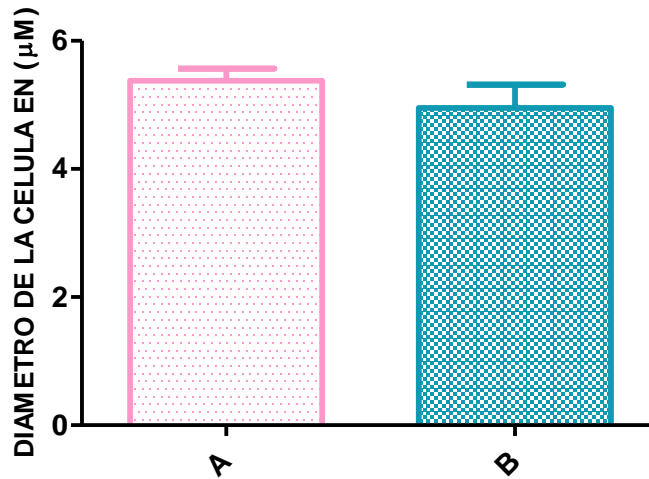


FIG. 16 Efecto del extracto metanólico de flores de Higuierilla sobre el diámetro de *C. albicans* ATCC 10231. No hubo variación significativa en el diámetro de la levadura por la exposición al EMFH ($P= 0.2067$). **A:** Diámetro de las levaduras sin EMFH. **B:** Efecto del EMFH sobre la levadura. (n=10 células por campo).

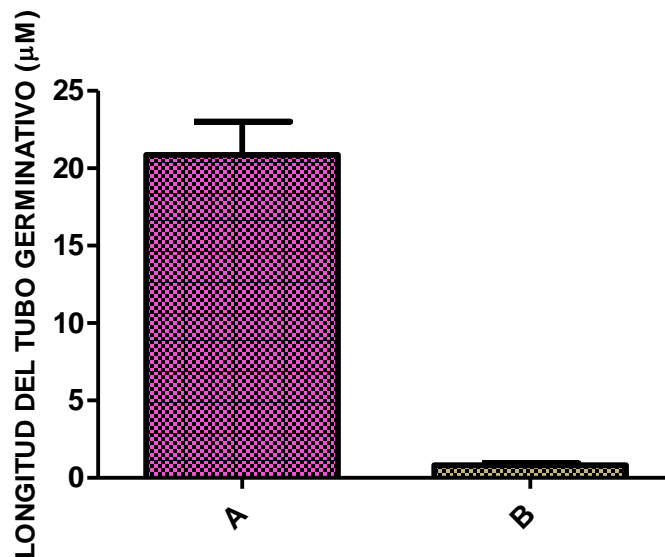


FIG. 17 Efecto del extracto metanólico de flores de Higuierilla sobre la longitud del tubo germinativo de *C. albicans* ATCC 10231. Hubo ausencia de formación de tubo germinativo en presencia del extracto. Efecto significativo ($P < 0.0001$). **A:** Longitud del tubo germinativo formado por las levaduras sin extracto. **B:** Inhibición de la formación de tubo germinativo en presencia de EMFH. (n=10 células por campo)

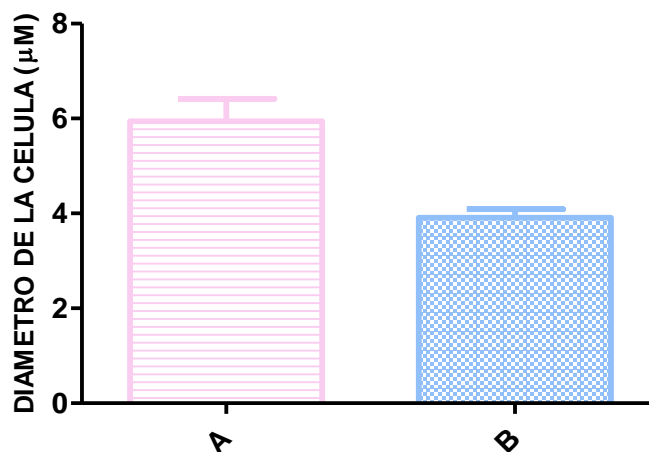


FIG. 18 Efecto del extracto Metanólico de Flores de Higuierilla sobre sobre el diámetro de

C. neoformans. Muestra variación significativa en el diámetro de la levadura tras la exposición del EMFH ($P < 0.001$). **A** es *C. neoformans* sin EMFH, y **B** es el efecto del EMFH sobre la levadura. (n=10 células por campo)

NOTA: El análisis estadístico se realizó con las pruebas de muestras no apareadas con la corrección de Welch's, usando el programa Graph Pad Prism Version 5.

Microscopia Electrónica de Transmisión (MET)

Se analizó por MET micrografías de *C. albicans* ATCC 10231, la primer micrografía analizada es el control (Fig 22), en el cual podemos observar, una pared celular integra,

mitocondrias, cuerpos lipídicos, vesículas, vacuolas así como también material granular heterogéneo.

Al analizar las micrografías de *C. albicans* ATCC 10231 tratadas con EMFH (Fig 23-26), muestra alteraciones, tales como múltiples depósitos de grasa, vacuolización, en todas las micrografías hay ruptura de la pared celular. Dado la importancia de la pared celular, puede considerarse el “talon de Aquiles” de los hongos y por tanto una diana muy importante para la acción de los fármacos antifúngicos.

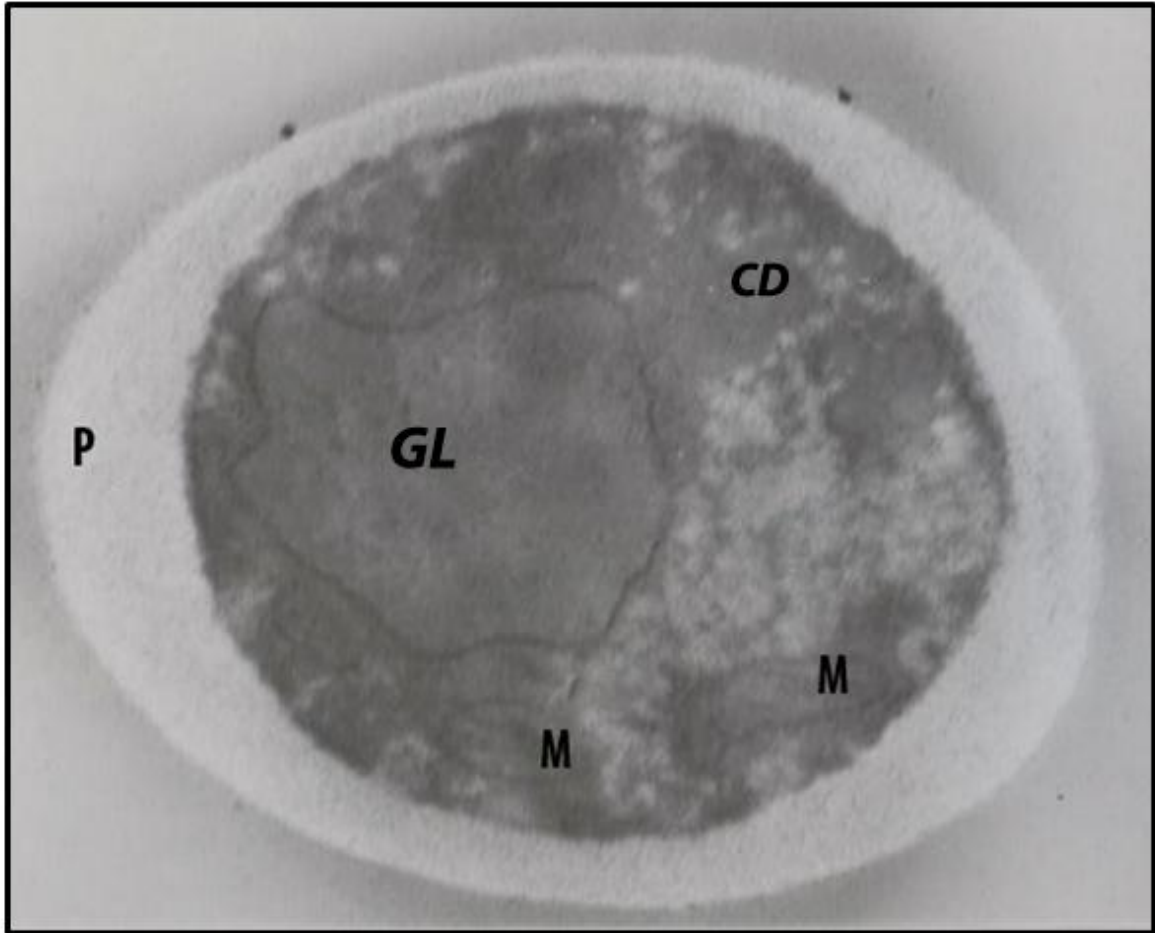


FIG. 19 Control de *C. albicans* ATCC 10231, Se aprecia material granular heterogéneo (MGH), en cuyo interior se observan mitocondrias (M), y una gran gota de lípido (GL), cuerpos densos (CD), rodeados por la pared celular (P) (12000x).

Micrografías electrónicas de *Candida albicans* ATCC 10231 incubadas 24 horas con EMFH

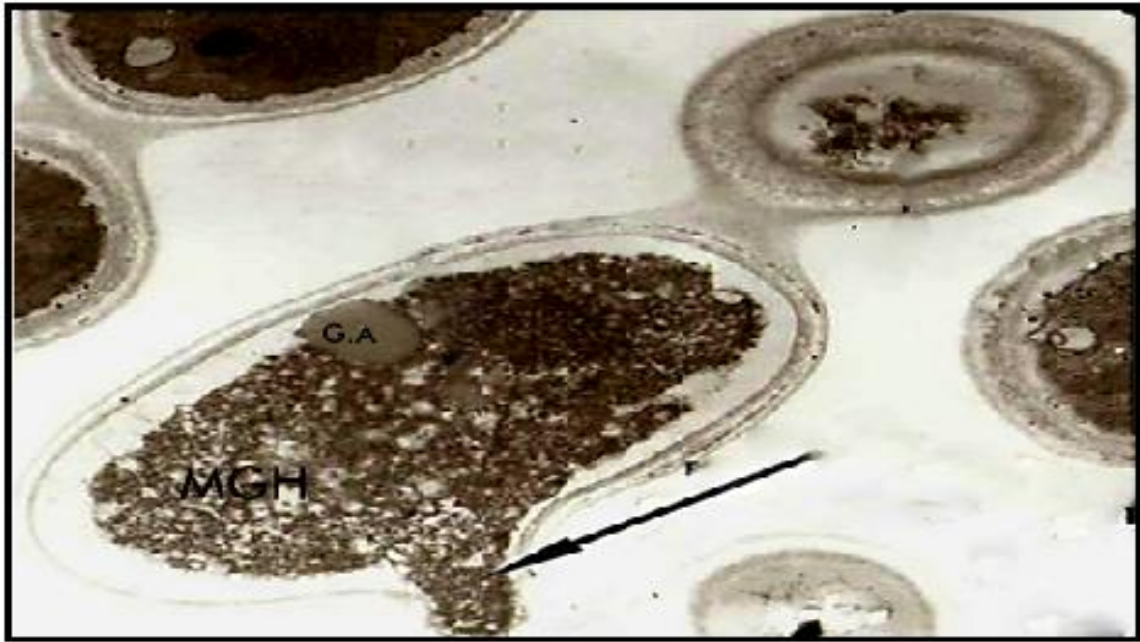


FIG. 20 En la micrografía se muestra gran cantidad de material granular heterogéneo (MGH), un gránulo de almacenamiento (GA), la flecha muestra la ruptura de la pared celular y salida de material celular (7000X).



FIG. 21 Se observa material heterogéneo (MGH), granulo de almacenamiento (GA), la flecha muestra la ruptura de la pared celular (3000X)

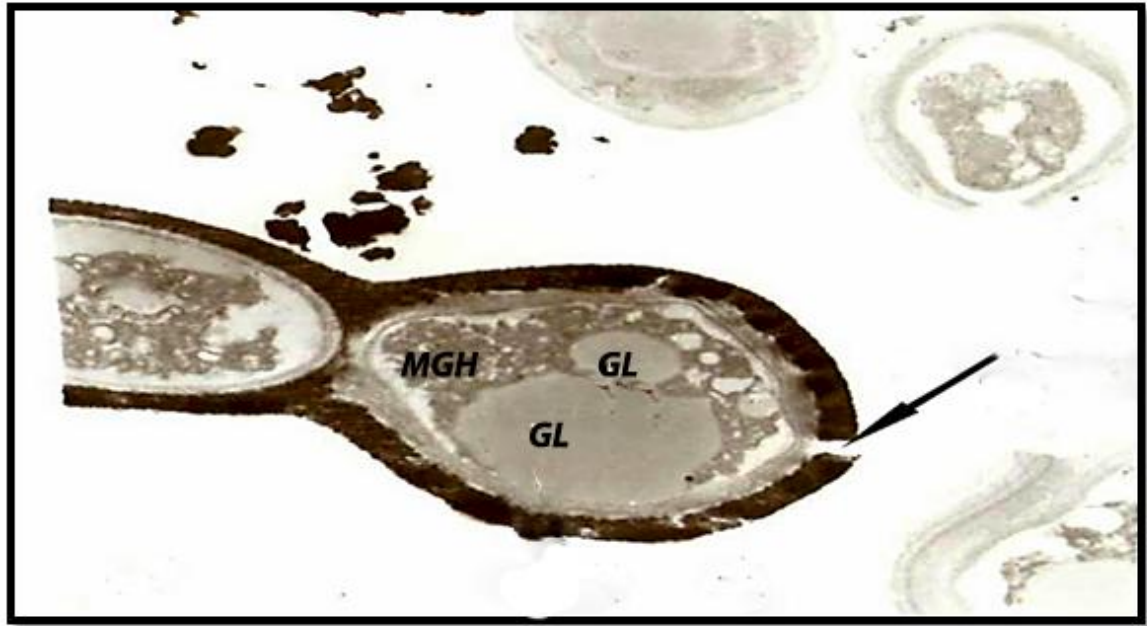


FIG. 22 Se muestra dos gotas de lípido (L), material granular heterogéneo, la flecha muestra la ruptura de la pared celular (7000X)

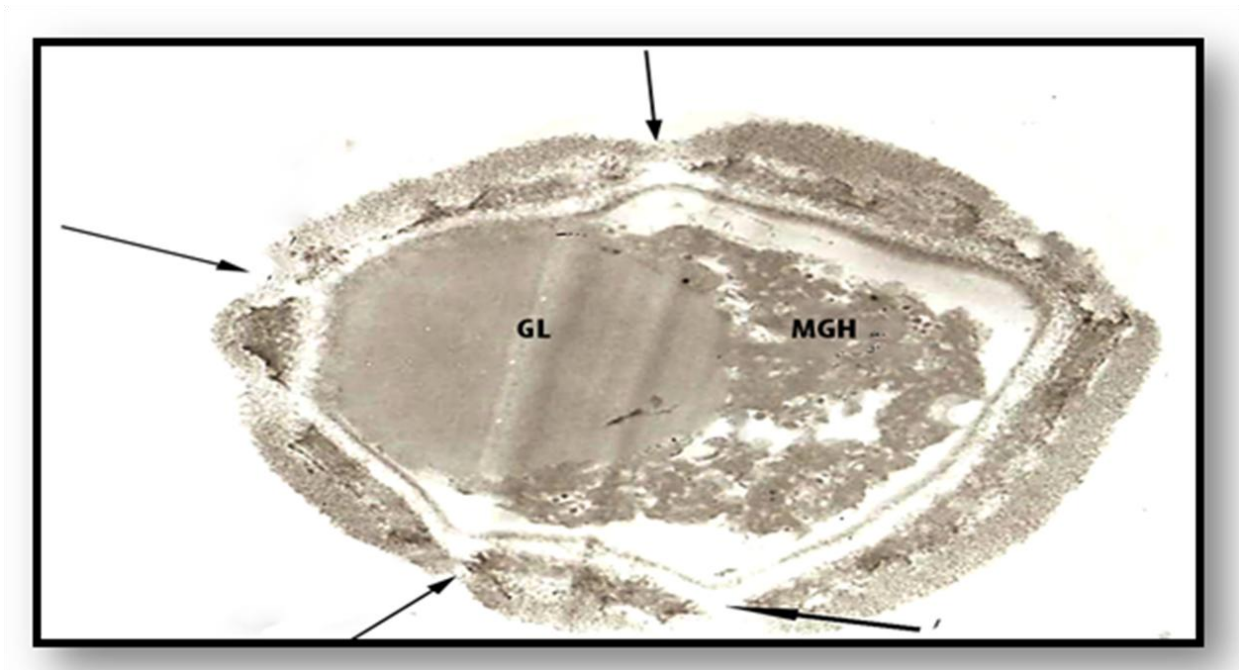


FIG. 23 En la micrografía se muestra una gran gota de lípido (L), material granular heterogéneo (MGH), visible adelgazamiento de la pared celular indicado con las flechas (12000X).

11. DISCUSIÓN

En los últimos años ha habido un incremento en el uso de los productos de origen natural como parte de la medicina, debido a que estos compuestos presentan características como baja toxicidad, amplio espectro de acción, no se ven afectados por el almacenamiento y no generan resistencia (Reagor 2002).

Además, debido a su origen es factible abatir costos, como en el caso de *Ricinus communis* L (Higuerilla), una planta de uso frecuente y antiguo en nuestro país, por lo que resulta de vital importancia conocer más acerca de su mecanismo de acción, actividad biológica, composición y otras características de este compuesto.

En estudios previos con el extracto de semillas de *R. communis* en acetona, etanol y agua, se encontró que presentan actividad antibiótica contra: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Serratia marcescens*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, y *Neisseria gonorrhoeae*. Es importante mencionar, que no hay artículos en la búsqueda realizada, relacionados con la actividad antifúngica de la hoja de *Ricinus communis*, por lo cual no se puede hacer una comparación de los resultados obtenidos en este proyecto (Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana 2009).

En el presente estudio se evaluó la actividad antifúngica del Extracto Metanólico de Flor de Higuerilla (EMFH), sobre la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231 y *Cryptococcus neoformans*.

Los resultados de la prueba de Difusión en Agar (FIG 7), empleando concentraciones de 1mg/ml y 2mg/ml., muestran que el EMFH presenta inhibición contra *C. albicans* ATCC 10231 y *C. neoformans*.

Mientras que mediante la prueba de Dilución en Agar (FIG 8) se determinó que la CMI para ambas levaduras es de 1mg/ml.

Para *Fusarium moniliforme* solo se observa reducción de crecimiento, el cual fue de 77% aproximadamente (Ver tabla 7) por lo que se considera que la CMI es mayor a las concentraciones propuestas en este experimento.

También se determinó la Concentración Fungicida Mínima (FIG 9), la cual fue para *C. albicans* ATCC 10231 de 2.0 mg/ml y para *C. neoformans* de 1.5 mg/ml.

Una característica importante de *Candida albicans* es su capacidad de formar tubo germinativo en presencia de suero (Pontón 2002, G. Black 2002, Arenas 2003). *In vivo* esta capacidad de filamentación está relacionada con su virulencia al permitir el proceso de penetración de las células y tejidos al hospedero y de adherencia a la superficie celular (Stephen 1999). Debido a que se ha demostrado que las cepas incapaces de formar hifas son avirulentas en un modelo murino (Iranzo M. 2003), se ha sugerido la necesidad de desarrollar compuestos antifúngicos que puedan prevenir la formación de hifas y de destruir ambas formas de la levadura.

En este estudio se demostró que el EMFH inhibe la formación de Tubo Germinativo en *C. albicans* ATCC 10231 a una concentración de 1.5 mg/ml; algunos presentaron filamentaciones delgadas en comparación con el control positivo. (FIG 11 Y 12).

Con los resultados anteriores se obtuvieron las condiciones de crecimiento adecuadas para poder apreciar diferentes daños provocados por EMFH, por lo cual se realizaron tinciones: la primera fue con blanco de Calcoflúor en donde se observa que para *C. albicans* ATCC 10231 hay una inhibición en la formación del tubo germinativo a diferencia del control positivo. Para *C. neoformans* también se realizó la tinción de blanco de Calcoflúor, en esta tinción se observa reducción en el grosor de la cápsula y esto resulta importante ya que la cápsula es necesaria para la virulencia y es blanco de las respuestas de anticuerpos protectores (FRASES, 2009). Lo anterior puede corroborarse en el análisis estadístico (FIG 19, 20, 21).

Al observar las estructuras de *F. moniliforme* con blanco de Calcoflúor podemos observar que hay daño en la estructura fúngica, ya que se aprecia alteración en las hifas.

Para complementar este trabajo se realizó un análisis por microscopia electrónica de transmisión para *Candida albicans* ATCC 10231, en el cual nos muestra el daño causado por EMFH, (FIG 23-26) especialmente a nivel de pared celular, lo cual produce la salida de material celular.

La pared celular es una estructura esencial para los hongos y su eliminación o los defectos en su formación tienen efectos profundos en el crecimiento y la morfología de la célula fúngica, pudiendo causar la muerte celular por lisis. Dado el papel vital que la pared celular juega en la fisiología de la célula fúngica, puede considerarse un punto débil, de los

hongos y por tanto, una diana muy importante para la acción de los fármacos antifúngicos (Pontón 2008).

Sin embargo no existen trabajos previos, en el que nos revele alteraciones morfológicas provocadas por el EMFH, respecto a lo que sucede en *Candida albicans*, los estudios realizados a esta levadura solo se limitan a la evaluación de la actividad biológica, por lo cual no se puede hacer una comparación de lo obtenido en este trabajo.

12. CONCLUSIONES

- Se obtuvo un extracto metanólico de hojas de *Ricinus communis* L. (Higuerilla), que presentó actividad antifúngica contra *Candida albicans* ATCC 10231 y *Criptococcus neoformans*.
- Se evaluó el efecto antimicótico mediante la prueba de difusión en agar empleando concentraciones de 1mg/ml y 2 mg/ml, encontrando que para *Candida albicans* ATCC 10231 y *Criptococcus neoformans* hay inhibición en el crecimiento.
- Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI), para *Candida albicans* ATCC 10231 y *Criptococcus neoformans*, la cual es de 1 mg/ml para ambas levaduras. Para *Fusarium moniliforme* no se logró establecer la CMI, sin embargo, se observó una reducción de crecimiento del 77 % a 5.5 mg/ml que fue la mayor concentración probada.
- La Concentración Fungicida Mínima (CFM) para *Candida albicans* fue de 2.0 mg/ml y para *Criptococcus neoformans* 1.5 mg/ml.
- Se logró observar mediante técnicas de tinción los daños provocados por el EMFH. Para *Candida albicans* se observó que inhibe la formación de tubo germinativo y en *Criptococcus neoformans* la cápsula disminuye de tamaño,

lo cual es importante ya que ambas estructuras constituyen factores de virulencia importantes.

- También se logró observar mediante Microscopia Electrónica de Transmisión, el daño provocado a la pared celular de *Candida albicans* ATCC 10231. Esto es de suma importancia ya que los defectos en su formación tienen efectos profundos en el crecimiento y la morfología de la célula fúngica, pudiendo causar la muerte celular por lisis.
- En el caso de *Fusarium moniliforme*, se encontró que hay alteración en la estructura fúngica, ya que hay alteración en las hifas.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda llevar el extracto de *Ricinus communis* (Higuerilla), a un análisis químico para complementar este estudio y así mismo conocer el mecanismo de acción y los componentes responsables de la actividad antifúngica.
- En el caso de *Fusarium moniliforme* se recomienda seguir esta línea de investigación, ya que es de suma importancia encontrar nuevas fuentes de control de los hongos que atacan a los granos, los cuales sean inofensivos tanto para el hombre, como para el ambiente.

13. ANEXO

Anexo 1

PREPARACION DE LA SOLUCION STOCK DEL EEFH PARA DETERMINAR LA CMI

Tubo	[mg/ml]	mg de extracto	Stock (μ l)
1	0.5	3	15
2	1.0	6	30
3	1.5	9	45
4	2.0	12	60
5	2.5	15	75
6	3.0	18	90
Control (+)	-	-	-

TAB. 8 Preparación de solución stock


 Se pesó 100 mg de EEHH/ 500 μ l de DMSO

STOCK PARA DETERMINAR LA CMI EN HONGOS FILAMENTOSOS

Tubo	[mg/ml]	mg de extracto	Stock (μ l)
1	2.5	2.5	25

2	3.0	3.0	30
3	3.5	3.5	35
4	4.0	4.0	40
5	4.5	4.5	45
6	5.0	5.0	50
7	5.5	6.0	55
Control (+)	-	-	-


TAB. 9 Solución stock para determinar la CMI de filamentosos

 Se pesó 100 mg de EEHH/1000 µl de DMSO

STOCK PARA DETERMINAR LA CFM

Tubo	[mg/ml]	mg de extracto	Stock (µl)
1	0.5	1	10
2	1.0	2	20
3	1.5	3	30
4	2.0	4	40
5	2.5	5	50
6	3.0	6	60
Control (+)	-	-	-





TAB. 10 Stock para determinar Concentración Fungicida Mínima para *C. albicans* y *C. neoformans*

 Se pesó 50mg/500 µl de DMSO

Anexo 2. REACTIVOS




TINCIÓN DE GRAM

Cristal Violeta (30s)

-  2 gr de Cristal violeta
-  20 ml de etanol al 95°
-  0.8 gr de Oxalato de Amonio
-  80 ml de Agua destilada



PREPARACIÓN: disolver el cristal violeta en el etanol y el oxalato e amonio en el agua destilada, mezclar las dos soluciones.

Lugol (30s)



-  2.0 gr de Yoduro de Potasio
-  1gr de Yodo metálico
-  100 ml de agua destilada

PREPARACIÓN: disolver el yoduro en 20 ml de agua destilada y agregar el resto.

Safranina (30s)

-  0.5 gr de Safranina
-  100 ml de agua destilada

Alcohol-ácido

-  30 ml de ácido clorhidrico concentrado
-  970 ml de Etanol al 95°

SOLUCIÓN SALINA FISIOLÓGICA

-  8.5 gr de Cloruro de Sodio
-  1000 ml de agua destilada

AZUL DE ALGODÓN

Se realizan las preparaciones a partir de cultivos. El fenol destruye la flora acompañante y organismos; el ácido láctico conserva las estructuras fúngicas y el azul algodón tiñe la quitina de las paredes fúngicas.

Añadimos una gota de la muestra o una porción del hongo en un portaobjetos. Sobre ella colocamos una gota de azul algodón y ponemos el cubreobjetos. Observamos al microscopio.

BLANCO DE CALCOFLÚOR

Colocamos en un portaobjetos la muestra +1 gota de Calcoflúor. Ponemos el cubreobjetos. Se observa en un microscopio de fluorescencia (verde brillante o blanco azulado).

Anexo 3

PROTOCOLO DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN PARA LEVADURAS

(Shepherd, 1987; Jabra-Rizk, 1999.)

FIJACIÓN: Las células son prefijadas en una mezcla de paraformaldehído al 3%, glutaraldehído al 1%, MgCl₂ 1M, CaCl₂ 1mM, dimetilsulfóxido (DMSO) al 0.1%, 0.1% de Azul de Alcian en buffer de fosfatos (PBS) 0.1M, pH 7.2, por 3 hrs a temperatura ambiente.

Se lavan las células 3 veces en el mismo buffer por 10 min.

POST-FIJACIÓN: Las muestras se incuban por 3 hrs a temperatura ambiente en una solución de OsO₄ al 1%, K₂Cr₂O₇ al 1%, NaCl al 0.85% (solución salina fisiológica, SSF) y DMSO al 0.1% en el mismo buffer.

Posteriormente se realizan 3 lavados por 10 min en SSF.

DESHIDRATACIÓN: Las células se deshidratan en una serie de etanol con acetato de uranilo. Etanol: 10, 25, 50, 70 % 30 min c/u, 90 % 1 hr, 100 % 1 hr (3 veces).

INFLITRACIÓN:

A) Óxido de propileno: Etanol

3:1 24 hrs

2:1 12 hrs

1:1 12 hrs

B) Óxido de propileno: resina epóxica

3:1 1 día

1:1 1 día

1:3 1 día

Epón 12 hrs

INCLUSIÓN en resina epóxica 100 %

POLIMERIZACIÓN: 12 hrs 60 °C






Posteriormente las muestras son cortadas con un micrótopo y posteñidas con acetato de uranilo al 2% en solución acuosa.

Realizar la observación en un microscopio electrónico de transmisión.

Anexo 4





PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Agar Dextrosa Sabouraud

-  40.0gr Dextrosa
-  5.0 gr Peptona de Caseína
-  5.0 gr Digerido Pancreático de Tejido Animal
-  15.0 gr Agar Bacteriológico
-  pH 5.6 ± 0.2








MÉTODO: Suspender 65 g del medio en un litro de agua destilada. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución (clarificar). Evitar el sobrecalentamiento. Esterilizar en autoclave a 121°C (15libras de presión) durante 15 minutos. Dejar enfriar a una temperatura entre 45-50°C y vaciar en cajas Petri estériles.

Agar Dextrosa Papa

-  200 gr Infusión de Papa
-  20 gr Dextrosa
-  15 gr Agar Bacteriológico
-  pH 5.6 ± 0.2

MÉTODO: Suspender 39 g del medio en un litro de agua destilada . Calentar con agitación suave hasta su completa disolución (clarificar). Esterilizar en autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos. Enfriar a una temperatura entre 45-50 °C y vaciar en cajas Petri estériles.

Agar Muelle Hinton (Modificado)

-  300gr Infusión de Carne
-  1.5 gr Almidón
-  17.5gr Peptona de Caseína H
-  17.0 Agar Bacteriológico
-  pH 7.4 ± 0.2
-  0.5 gr de azul de Metileno **
-  2% de Glucosa**

MÉTODO: Suspender 38 g del medio en un litro de agua purificada, agregar la glucosa y el Azul de metileno. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución (clarificar). Esterilizar en autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 10minutos. Dejar enfriar a una temperatura entre 45-50 °C y vaciar en cajas Petri estériles.

**Estos son suplementos agregados al medio

14. REFERENCIAS

- Ausina R. V., Moreno S; (2006) "**Tratado SEIMC de Enfermedades infecciosas y microbiología Clínica**"; editorial Médica Panamericana; Madrid; Págs. 618-624
- Arenas Roberto (2004); "**Micología médica Ilustrada**" 2ª Ed; Editorial Mac Graw Hill; México D.F. Págs. 307-329
- Alcama E. (2003) "**Microbes and society and Introduction to microbiology**" Jones and Bartlett Publisher
- Alonso Jorge (2004) "**Tratado de Fitofármacos y Nutraceuticos**" 1ª Ed. Editorial Corpus; Argentina, Rosario
- Bonifaz Alejandro (2000) "**Micología Médica Ilustrada Básica**" Editorial Méndez Editores; México D.F.
- Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional**
- www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx
- Carlile J. Watkinson S., and Godoy G., (2001) "**The Fungi**" 2ª Ed. Academic Press California; Págs. 87-92, 95-114, 153-180, 432-44
- Edwin H. Lennette; Earle H. Spaulding; Joseph P. Truant; (1981) "**Manual de Microbiología Clínica**" Madrid; Ed. Salvat Editores; Págs. 517
- Frases Susana, Pontes Bruno, Nimrichter Leonardo, Marcio L. Rodríguez, Nathan B. Viana, and Casadevall Arturo (2009) "**The Elastic Properties of the Cryptococcus neoformans Capsule**" Biophysical Journal Volume 97 August 2009 937-945
- Fuentes V., Granados M., (2007) "**Conozca las Plantas Medicinales**" 2ª ed; editorial Científico Técnica; Ciudad de la Habana Cuba
- G. Black Jacquelyn (2002) "**Microbiology principles and explorations**" 5th ed. John Wiley Sons, Inc.U.S.A.
- Iranzo M. (2003) "**Isolation and characterization of and avirulent Candida albicans yeast monomorphic mutant**" Medical Mycology; 41 (1) pp. 43-5 (10)
- Keith A. Seifert and C. André Lévesque (2004) "**Phylogeny and molecular diagnosis of mycotoxigenic fungi**" European Journal of Plant Pathology 110: 449471 Klower Academic Publishers

Koneman, EW, Allen, SD, Dowell, VR, Sommers, HM. 2003. **“Diagnóstico microbiológico”**.

Ed. Médica Panamericana, 5ª Ed., México. Pp. 386-393.

Kuklinski Claudia (2000); **“Farmacognosia estudio de las drogas y sustancias**

medicamentosas de origen natural” Omega; Barcelona; Pág. 291-29

Mesa Arango A.C, Bueno Sánchez J.G. y Betancur Galvis L.A.”**Productos Naturales con**

Actividad Antimicótica” Rev. Esp. Quimioterapia, Diciembre 2004; Vol. 17(No 4)325-

331 <http://www.seq.es/seq/0214-3429/17/4/325.pdf>

NCCLS/CLSI. (2002). **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts.** M-27A2. NCCLS. Villanova, Pennsylvania.

Pardi G. Cardozo E.I. (2002) **“Algunas Consideraciones sobre Candida albicans, como**

Agente Etiológico de Candidosis bucal”; Home ediciones 40(1).

Prats, Guillerme (2005) **“Microbiología Clínica”** Buenos Aires; Madrid; Ed. Médica

Panamericana, Pág. 83-84

Patrick R. Murray; Ken S. Rosenthal; Michael A. Pfaller (2006) **“Microbiología Médica”**

5ª edición; Madrid, España; Ed. Elsevier; Págs. 787-788.

Pontón J. (2002) **“Diagnóstico Microbiológico de la micosis”** “Revista Iberoamericana de

Micología 19:25-29

Quindos Guillermo (2002) **“Las micosis en el amanecer del siglo XXI”** Rev. Iberoamericana de micología 19:1-4

Reagor L. (2002) **“The effectiveness of processed grapefruit-seed extract as an**

Antibacterial Agent: I.A. in vitro agar assay”. *J Altern Complement Med.* 8 (3): 325-332

Rippon, John Willard (1990) **“Micología medica: Hongos y actinomicetos patógenos”**

3ª Edición Interamericana Mac Graw Hill; México.

Shepherd MG. (1987). **“Cell envelope of Candida albicans.”** CRC Clin Rev Microbiol; 15: 7-25.

Vázquez Tsuji Oscar, Martínez Barbabosa Ignacio, Campos Rivera Teresita (2005)

“Criptococosis Historia natural y estado actual del tratamiento” Acta Pediátrica de

México Volumen 26, Núm. 1, enero-febrero

- J. L. Rodríguez Tudela y M. Cuenca-Estrella (2009) "**Importancia médica de la Identificación de los hongos patógenos humanos al nivel de especie**" Centro Nacional de Microbiología Instituto de Salud Carlos III.
- Jabra-Rizk MA, Falkler WA, Merz WG, Kelley JI, Baqui A, Meiller TF. (1999). "**Candida dubliniensis and Candida albicans display surface variations consistent with observed intergeneric coaggregation**". Rev Iberoam Micol.; 16: 187-193.
- Vázquez Gerardo, Echeverría Olga (2000) "**Introducción a la microscopía electrónica aplicada a las ciencias biológicas**" Fondo de Cultura Económica; México D.F.
- R.G.Kessel C.Y. Shih (1976) "**La microscopía Electrónica de Barrido en Biología**" Editorial Dossat, Madrid España
- Wang H., Bun T. N. (2002). "**Isolation of an antifungal thaumatin-like protein from kiwi Fruits**". Phytochemistry. 61: 1-6.
- Ye, X.Y., Wang, H.X., Ng, T.B., (1999). "**First chromatographic isolation of an antifungal thaumatin-like protein from French bean legumes and demonstration of its antifungal activity**". Biochem Biophys Res Commun. 263: 130-134.