



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

UNIDAD DE BIOTECNOLOGÍA Y
PROTOTIPOS

LABORATORIO DE FARMACOGNOSIA

DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE
LAS FLORES DE *Prosopis laevigata* SOBRE
UNO DE LOS FACTORES DE
VIRULENCIA DE *Candida albicans*

T E S I N A
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G O

PRESENTA:
TENANGO LEONARDO GABRIEL ARMANDO

DIRECTORA DE TESINA:
Dra. Ma. MARGARITA CANALES MARTÍNEZ



LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MÉXICO 2021



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.

RECONOCIMIENTO

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Farmacognosia de la Unidad de Biología y Prototipos (UBIPRO) en la Facultad de Estudios Superiores (FES) Campus Iztacala.

Fue dirigido por la Doctora María Margarita Canales Martínez.

Fue revisado por el siguiente jurado:

Dra. María Margarita Canales Martínez.

Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy

Dra. Judith Salas Oropeza.

Dra. Ana Bertha Hernández Hernández.

Mtro. Luis Barbo Hernández Portilla.

Para la realización de esta Tesina se contó con el apoyo de:

Financiamiento: UNAM-PAPIIT IN205020

No es la especie más fuerte la que sobrevive, ni la más inteligente, sino la que responde mejor al cambio

Charles Darwin

*¿No es triste irse a la tumba sin llegar a preguntarse por qué has nacido?
¿Quién, ante semejante pensamiento, no habría saltado de la cama, ansioso por comenzar de nuevo a descubrir el mundo y regocijarse por ser parte de él?*

Richard Dawkins

Las buenas noticias, en la mayoría de los casos, se dan en voz baja

Haruki Murakami

AGRADECIMIENTOS

A la Doctora Margarita Canales, mi directora de tesina, quien desde un principio confió en mí para llevar a cabo este trabajo de investigación y estuvo pendiente de mis dudas a pesar de la distancia que la pandemia del año 2020 nos hizo padecer. Muchas gracias por su cátedra, su comunicación compasiva y su horada sabiduría.

Sé que la experiencia hubiera sido más excepcional, practicando, retomando, y aprendiendo en el laboratorio de Farmacognosia, pero lo principal y más importante es que seguimos con vida, seguimos adelante.

A los Doctores Marco Aurelio Rodríguez Monroy y Ana Bertha Hernández Hernández, por sus minuciosas observaciones para que este trabajo tuviera la calidad escrita con la que se quiere presentar, así como sus sabios comentarios.

A los siguientes profesores, que nunca olvidare por sus invaluable consejos, atenciones y enseñanzas: Jorge Ciro, Leopoldo Vázquez, Ángel Lara, Gerardo Ortiz, Arnulfo Reyes, Margarita Canales, Salvador Rodríguez, Samuel Meraz, Ignacio Peñalosa, Ángel Durán, Teresa Gonzales, Magdalena Muñoz, Leonor Abundiz, Ana Ávila, Catriona Zúñiga, Erik Loeza, Roberto Velazco, Liliana Rubio, Karla Martínez, Nandini Sarma, Teresa Ramírez, Saúl Flores, Francisco Martínez, Irma Dueñas, Yolanda Pozos, Guadalupe Villanueva, Ruth Márquez, Ana Muñoz, Gloria Paniagua, Daniel Tejero y Ezequiel Vidal. Tuve una formación con mucha calidad.

Quiero agradecer a las personas con las que tuve el gran honor de trabajar en equipo, con los que discutí, platique, analice, expuse e investigue sobre los temas abordados en esta hermosa carrera y con quien alimento mi sabiduría. Siempre fuimos equipos competitivos y muy íntegros. Alejandra, Emiliano, Jessica, Christian, Karina, María Fernanda, Karla, Montserrat, Mónica, Juan, Reiki, Natali, Valeria, Abigail y Jair.

DEDICATORIAS

A mi mentora de vida, a mi madre Asunción Leonardo, quien, con su fuerza, su voluntad y su carácter, ha sido una pieza fundamental en mi camino. Desde niño siempre me ha enseñado que siempre busque ser de los mejores. Gracias a ella, siento tanto amor por tantas cosas, y nunca me detengo en aprender cosas nuevas, y, sobre todo, me enseñó que nunca es opción derrotarse a sí mismo. Este logro también es para ti. Te amo mamá.

A mi padre Armando Tenango, quien me ha enseñó lo valioso del trabajo, lo valioso de la tranquilidad. Te agradezco por confiar en que podía terminar este camino y por el valor que le has otorgado al mismo con tu trabajo.

A mi abuela María Juan José, quien desde niño me abrigo con su paz, su tranquilidad y su ternura como una segunda madre. Te llevo en mi memoria, y nunca habrá amor tan incondicional, como el que mostraste con tus nietos.

A mi abuelo Fabian Leonardo, un hombre valiente, temerario y humilde. Me enseñó el valor de la humildad, el valor no quedarse callado ante actos injustos y a no tener miedo a lo desconocido. También me enseñó a ser compartido con los demás, a ser un hombre valiente y a respetar. Te llevo en mis memorias también, ojalá me hubiera despedido de ti en vida.

A mis hermanos, Arnulfo y Melany, que han estado conmigo en este camino, y con quienes he aprendido a ser un adulto poco a poco con un carácter estricto. Les agradezco su fortaleza, pero les agradezco más que aprendan de sus errores. Los amo, y espero siempre estemos unidos.

A mis mejores amigos y Mariana Zarate y Edgar Rodríguez, con quienes he aprendido a tener disciplina, lógica, crítica, y conciencia. Desde que los conozco, no dejo de quererlos, admirarlos y agradecerles. Son como mis hermanos, gracias por acompañarme hasta estos días. Los amo demasiado.

A mi gran amigo Juan Nolasco, a quien conocí en esta gran carrera y pude crear una gran amistad con él y su familia. Te quiero amigo, tienes una creatividad grandiosa, una imaginación y un criterio muy valioso. Me siento contento de haberte conocido. Sé que seguiremos caminando juntos en estas nuevas etapas. Juntos por EROSOFÍA Fractal.

A mi querido Jesús Ferrer, gran amigo confidencial con quien he aprendido el valor de la salud, del dinero, de la familia, de los amigos y, sobre todo, el valor de la sinceridad. Te quiero amigo, eres una persona que sabe escuchar, y tu valor es inmensurable.

A ti, querido Hugo Alarcón, que, con tu inteligencia, sabiduría y sentido del humor, me enseñaste a ver algunas situaciones desde un sentido crítico. Con esa experiencia que te caracteriza, y tu gran complejo visual, conocí más el valor de apreciación.

A mi amigo Christian Ávila, gran consejero, gran mentor de salud, un gran oyente y comprensivo. Te quiero amigo, gracias por acompañarme en varios semestres de la carrera trabajando juntos, aprendí mucho de tu valor laboral y tus ganas de superarte. Juan, Jesús y Christian, Hugo, sé que seguiremos caminando juntos.

A mi querida amiga, Alejandra Hernández, con quien compartí muchas anécdotas con el pasar de los semestres, y siempre nos mantuvimos unidos cuando compartimos equipo. Eres una gran consejera, tienes un talento visual muy padre y tus consejos son invaluable. Te quiero mucho.

A mi Mónica Morales, una amiga muy comprensiva, tranquila, serena y cordial. Me gusta reírme contigo, porque tienes una mente muy abierta a muchas situaciones del entorno y tienes unas anécdotas muy singulares, con las que conozco mucho. Te estimo, admiro tu valentía y tus ganas de superación. Te quiero mucho.

A mi Jessica Gutiérrez, mi gran amiga y compañera de alma, de historias y grandes anécdotas. Te quiero mucho. Una chica muy intuitiva, inteligente, alegre y muy reservada. Gracias por tus grandes enseñanzas, eres además muy fuerte y de ti he sabido mucho. Contigo aprendí a formar poco a poco parte de mi carácter.

A mi gran amiga Brenda Medina, con quien también he descubierto el valor de la superación, el valor de la humildad y el valor de la alegría. Te estimo y quiero mucho. Gracias por confiar en mí, y por ser tan valiente.

Mi querida amiga Karina Servín. Eres una mujer que sabe escuchar, y tienes unos valores muy sanos completamente arraigados a ti, y de esa humilde persona, yo

aprendí mucho. Que alegría el haber podido conocer de tu inteligencia, tienes una alegría muy bonita. Te deseo mucho éxito.

A ustedes, y no menos importantes, amigas y compañeras que también me acompañaron en esta gran carrera: Edna, María Fernanda, Leslie, Montserrat Atenea, Reiki, Abigail, Angelica, Frida, Karen García, Nataly, Aranza y Andrea, cada una de ustedes es una mujer valiosa, con una magia propia de la cual tuve el privilegio de aprender y compartir inteligencia. Cada una tiene una historia, tiene un carácter, una sabiduría y una forma de ver la vida de la cual aprendo mucho. Cada una tiene mucho que aportar al mundo de la ciencia, no dejen de superarse a sí mismas. Aún sigo compartiendo experiencias y anécdotas con la mayoría y quiero seguir aprendiendo más de ustedes, porque para mí la mujer, es la mejor maestra de la vida.

A Jacqueline Guerrero, quien fungió como una mujer muy importante en la formación de mi personalidad, me hiciste ver las cosas distintas en las relaciones sociales, aprendí a conocer mis debilidades y mis fortalezas, me hiciste sentir un hombre dichoso, alegre y sabio. Tengo mucho que agradecerte, te quiero mucho, te admiro y te extraño, siempre te guardo de una manera muy bonita.

A Claudia Beltrán, mujer cuya inteligencia admiro, cuyo carácter me dio las bases para aprender más sobre el canto, la personalidad, la música y la ciencia. Hemos sido amigos por tantos años, y a pesar de la distancia, te guardo un gran respeto por tu valioso papel como una mujer que, a pesar de las caídas, no dejas que nada te detenga. Gracias por tu valiosa sabiduría y amor.

A mi querida amiga Melany Sosa, con tu carácter, tus experiencias, tus consejos, tu talento, tu valentía, me han conmovido mucho, y no dejo de pensar que eres una mujer extraordinaria por tu gran cariño, amistad y sabiduría.

A mi amigo Víctor Dulé, un hombre que me enseñó a ver la música desde un punto más profundo, conocí grandes artistas, aprendí de tu filosofía, tu paciencia, tu arte, tus pensamientos, tu sabiduría, y tu entrega como artista. Gracias por enseñarme a ver el arte de una forma excepcional.

A mis amigos, Nora Cruz, Natalia Jiménez, Iridian, Nancy Cedillo, Karen Martínez, Adalid, Sonia, Karla Alejo, Andrés, Eduardo Cerón, Néstor, Kevin, Ángeles, Miguel

Leonardo, Daniel Leonardo, Isaac Leonardo, Javier Leonardo, Alejandra Vega, Claudia Reyes, Alitzel, Adán, Cesar, Sergio Montiel, Jonathan Meza, Susana Castillo, Andrés Olvera, que, a pesar de la distancia y el tiempo, no los olvido por ser pilares en momentos donde compartimos experiencias muy excepcionales e importantes. Grandes personas que fueron un factor fundamental en mi formación personal y académica, siendo de los pilares estructurales de mi psicología y mi sabiduría. Gracias.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	v
ÍNDICE DE CUADROS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
Resumen	1
Introducción	2
Justificación	3
Problema	3
Hipótesis.....	3
Objetivos	4
General	4
Particulares	4
Capítulo I. <i>Candida albicans</i>	5
Información técnica de <i>Candida albicans</i>	5
Factores de virulencia	7
Polimorfismo, Adhesinas e Invasinas	8
Enzimas degradativas secretadas.....	11
Biopelículas	12
Tigmotropismo.....	13
Hidrolasas	14
Patología de <i>C. albicans</i>	14
La Candidiasis, síntomas y epidemiología	14
Capítulo II. Medicina antifúngica.....	18
Clasificación de medicamentos antifúngicos y su mecanismo de acción	18
Antifúngicos que actúan sobre la membrana plasmática	19
Antifúngicos que actúan sobre la pared de las células fúngicas	22
Antifúngicos que actúan sobre el núcleo de la célula.....	23
¿Por qué me puede dar alguna infección por <i>Candida albicans</i> ?	24
Precios de los principales antifúngicos a nivel nacional	24
Reacción adversa a medicamentos antifúngicos	26
Capítulo III. <i>Candida albicans</i> y su resistencia	29
El uso inadecuado de los antifúngicos	29
Carácter de resistencia de <i>Candida albicans</i>	29

Mecanismo de resistencia a los azólicos	30
Resistencia a las equinocandinas	31
Capítulo IV. Aspectos botánicos	32
Información técnica de la familia Fabaceae, del género <i>Prosopis</i> y distribución	32
El Mezquite <i>Prosopis laevigata</i>	33
Capítulo V. Farmacognosia	37
Lugar de Obtención.....	37
Zapotitlán Salinas, Puebla.....	37
Hidrografía	37
Clima	38
Edafología	38
Vegetación	38
Población	39
La magia de Zapotitlán.....	40
Medicina tradicional	42
Capítulo VI. Fitoquímica, aplicación y análisis de métodos	44
Técnicas fitoquímicas para el estudio de <i>Prosopis laevigata</i>	44
El método científico	44
Cuantificación de fenoles totales (Método modificado de Singleton et al., 1999).....	46
¿Cuáles son las razones de usar este método?	46
Método	46
Posibles resultados	47
Ventajas o desventajas de la técnica	48
Técnicas Alternativas	48
Determinación de Flavonoides totales por el Método Dowd (Ramamoorthy y Bono, 2007).....	49
¿Cuáles son las razones de usar este método?	49
Método	49
Posibles resultados	50
Ventajas o desventajas de la técnica	51
Técnicas alternativas	51
Cuantificación de Alcaloides (Shamsa et al., 2008).....	52
¿Cuáles son las razones de usar este método?	52
Técnica.....	52
Ventajas o desventajas de la técnica	55

Técnicas Alternativas	55
Determinación de capacidad Antioxidante, Método de reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) (Okusa et al., 2007)	55
¿Cuáles son las razones de usar este método?	55
Método	56
Posibles resultados	58
Ventajas o desventajas de la técnica	58
Técnicas Alternativas	59
Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)	60
¿Cuáles son las razones de usar este método?	60
Técnica.....	60
Posibles resultados	61
Ventajas o desventajas de la técnica	61
Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-DAD) (Gros et al., 1985; Mathews et al., 2002)	62
¿Cuáles son las razones de usar este método?	62
Posibles resultados	63
Ventajas o desventajas de la técnica	63
Técnicas alternativas	64
Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS) (Gros et al., 1985; Mathews et al., 2002)	65
¿Cuáles son las razones de usar este método?	65
Posibles resultados	66
Ventajas o desventajas de la técnica	67
Evaluación cualitativa de la actividad anti- <i>Candida</i> del extracto	67
Evaluación cuantitativa de la actividad anti- <i>Candida</i> del extracto. Microtécnica de dilución en caldo (Koneman, 1996)	67
Aportaciones	70
Discusión.....	71
Referencias	76

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Oligonucleótidos utilizados para la detección de la familia ALS de <i>C. albicans</i> . Fuente: Paniagua-Contreras et al., 2010.....	10
--	----

Cuadro 2. Primers utilizados en los ensayos de PCR y PCR en tiempo real para la detección de la secuencia del gen SAP2 de candidiasis vaginal (Fuente: Monroy-Pérez et al., 2013)	12
Cuadro 3. Clasificación de los antifúngicos por su estructura	18
Cuadro 4. Clasificación de los antifúngicos según su mecanismo de acción.	19
Cuadro 5. Precios obtenidos de Farmacias Especializadas (FESA) 2020 (Tienda en línea), de medicamentos disponibles para tratar infecciones fúngicas.	25
Cuadro 6. Lista de antifúngicos con sus respectivas reacciones adversas a medicamentos (RAM). Información obtenida de McKeny et al., 2020.....	27
Cuadro 7. Morfología y anatomía del género <i>Prosopis</i> con ilustraciones.	36
Cuadro 8. Tabla con las cantidades utilizadas para la curva patrón de Ácido gálico	47
Cuadro 9. Técnicas alternativas para determinación flavonoides, basándose en diferentes autores con el uso de diferentes técnicas.....	51
Cuadro 10. Tabla de cantidades utilizadas para el stock de atropina.....	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología microscópica de <i>C. albicans</i> . Fuente: DATABIO (CDC Public Health Library).	5
Figura 2. Ilustración de la pared celular de <i>C. albicans</i> , con los carbohidratos y proteínas que la componen. Tomado de Neil y Bernhard, 2012.....	6
Figura 3. <i>C. albicans</i> con tinción de papanicolaou modificado con microscopio Zeiss, seco fuerte 40X e iluminación Köhler. Fuente: Sánchez-Hernández et al., 2017	7
Figura 4. Mecanismos de acción de <i>Candida albicans</i> . Fuente: Mayer et al. 2013.....	8
Figura 5. Diagrama esquemático de la estructura genética de Als3. Fuente: Liu y Filler, 2011.....	10
Figura 6. Biopelícula de <i>Candida</i> en estado reproductivo. Fuente: Velazco et al. 2009.	13
Figura 7. Electromicrofotografía de las hifas penetrando la base. Fuente: Velazco et al. 2009.....	14
Figura 8. Manifestaciones clínicas de candidiasis superficial en pacientes de México durante el período 2005-2015. Fuente: Reyes-Montes et al., 2015.	16
Figura 9. Distribución de frecuencias de las especies de <i>Candida</i> que causan candidiasis superficial en México durante el periodo 2005-2015. (a) Candidiasis oral. (b) Candidiasis genital. (c) Onicomicosis. (d) Candidiasis cutánea0 Fuente: Reyes-Montes et al., 2015.....	17
Figura 10. Estructura general de los Polienos.....	20
Figura 11. Estructura química de los imidazoles. Fuente: Sádaba et al. 2004 ...	20
Figura 12. Estructura química de los triazoles. Fuente: Sádaba et al. 2004.....	21
Figura 13. Estructura química de las principales Alilaminas.....	21
Figura 14. Estructura química del Tolnaftato.....	22

Figura 15. Estructura química de caspofungina, micafungina y anidulafungina, medicamentos Lipopéptidos. Fuente: Diomedí 2004.....	22
Figura 16. Estructura química de la Fluocitosina.....	23
Figura 17. Estructura química del griseofulvin o griseofulvina.....	23
Figura 18. Ilustración que ejemplifica la expulsión de los azoles por medio de las bombas producidas por los genes MDR o CDR como carácter de resistencia. .	31
Figura 19. Distribución natural del género <i>Prosopis</i> y sus principales especies. Fuente: Barros 2010.....	33
Figura 20. Follaje de <i>Prosopis laevigata</i> . Foto original de Marco Aurelio Rodríguez Monroy	34
Figura 21. Hojas e inflorescencias de <i>Prosopis laevigata</i> . Foto original de Marco Aurelio Rodríguez Monroy.....	35
Figura 22. Municipio de Zapotitlán Salinas, Puebla. Fuente: Paredes-Flores et al., 2007.....	37
Figura 23. Vegetación y orografía de Zapotitlán Salinas. Fotografía Original de Marco Aurelio Rodríguez Monroy	39
Figura 24. Interior de la Parroquia San Martín Obispo de Zapotitlán Salinas. Fuente visitpuebla.mx.....	41
Figura 25. Fotografía del Parque ecoturístico Turritelas. Fuente: visitpuebla.mx	42
Figura 26. Ejemplo de un esquema metodológico para la elaboración de una investigación científica relacionada con las propiedades fitoquímicas de <i>Prosopis laevigata</i> y el estudio de su efecto antifúngico.	45

DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LAS FLORES DE *Prosopis laevigata* SOBRE UNO DE LOS FACTORES DE VIRULENCIA DE *Candida albicans*.

Resumen

La candidiasis es una enfermedad causada por una levadura del género *Candida*. Gran parte de las especies de *Candida* crean resistencias originadas por mutaciones a nivel molecular debido a que hay personas que se auto medican. Algunos medicamentos deben ser controlados por especialistas en la salud, porque básicamente tienen reacciones adversas. Los medicamentos utilizados para tratar infecciones por *Candida* tiene dos principales clasificaciones, una por su estructura química y por su mecanismo de acción. *Candida* resulta ser la principal causa de micosis en el mundo, la candidiasis genital, es la forma clínica más común, y *Candida albicans* es la especie causante más común.

Los extractos de las plantas medicinales son utilizados por practicantes de la medicina tradicional para curar diversas enfermedades. La aceptación de éstas se aplica como una alternativa de atención de la salud y la búsqueda de nuevos agentes antifúngicos a partir de plantas medicinales. *Prosopis* es un género primitivo dentro del clado Mimosoid, que posiblemente se originó en África tropical. A *Prosopis laevigata* se le conoce como mezquite, se localiza en zonas desérticas y semidesérticas. Se halla en los altiplanos centrales del norte de México, las tierras bajas de Tamaulipas meridional, y en partes de Oaxaca, Morelos, Puebla, Chiapas y Estado de México. Hay diversos métodos para estudiar la fitoquímica de *Prosopis laevigata*, dependiendo de lo que se quiere encontrar. Los más importantes son los utilizados para determinar fenoles, flavonoides, alcaloides, actividad antioxidante, aceites esenciales y compuestos de interés. Los métodos son diversos, porque se pueden usar diferentes reactivos, y su importancia radica en el costo, la efectividad, la reproductibilidad, y la eficacia de los resultados.

Palabras clave: Flores del Mezquite, *Prosopis laevigata*, *Candida albicans*, medicina tradicional, métodos fitoquímicos.

Introducción

La candidiasis es una enfermedad causada por una levadura del género *Candida*. Una de las cepas más comunes es *Candida albicans* (CDC, 2019). Según los datos proporcionados por los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) y la Red Nacional de Seguridad Sanitaria, las especies de *Candida* ocupan el quinto lugar entre los patógenos adquiridos en el hospital y el cuarto entre los patógenos BSI (aquellos que son capaces de infectar el torrente circulatorio "Bloodstream Infection") (Pfaller y Diekema, 2007). En México se estiman que las infecciones fúngicas graves, son la candidiasis vulvovaginal recurrente, seguido de aspergilosis broncopulmonar alérgica, aspergilosis pulmonar crónica, queratitis micótica, y candidiasis invasiva (Corzo-León et al., 2015). Existen una gama de medicamentos para combatir la candidiasis, tales como, acetato de caspofungina, amfotericina B y derivados, fluconazol, voriconazol y profilaxis antifúngica a pacientes en terapia intensiva (CENETEC, 2012).

Candida puede adquirir resistencia por dos mecanismos, el primero es por mutaciones moleculares de la enzima diana del antifúngico, como la alteración de las enzimas relacionadas con la síntesis del ergosterol, el segundo, se debe a la formación de barreras de permeabilidad o sistemas de bombeo del antifúngico fuera de la célula, como la alteración en las bombas de expulsión: *ATP-binding cassette (ABC)* y *facilitadores mayores (MF)* (Ortigoza y Arroyo 2014).

La resistencia que han desarrollado algunas cepas de *Candida*, dirige al estudio de nuevos agentes antifúngicos más potentes, pero sobre todo más seguros que los existentes actualmente, la dificultad yace en que las células fúngicas y humanas no difieren mucho en su composición, comparten vías intermediarias, enzimas y no es sencillo encontrar blancos que ofrezcan la selectividad para obtener un antifúngico seguro (Huamani y Ruiz, 2005). Con base a lo antes mencionado, en la actualidad existen diversos intentos de encontrar nuevos antifúngicos en la flora medicinal de diferentes regiones del mundo. De tal forma, que, en nuestro grupo de investigación, nos ha interesado estudiar una especie de la familia Fabaceae que tenga la propiedad de inhibir el crecimiento de *Candida albicans*.

La familia Fabaceae tiene cerca de 20000 especies y 750 géneros (Lewis et al., 2013), una de las principales características de esta familia radica en la posesión de un fruto conocido como legumbre, dehiscente, pluriseminado, que madura y se abre por dos líneas (Llamas y Acedo, 2016). El género *Prosopis* pertenece a la familia Fabaceae (Leguminosae) se caracteriza por habitar en ambientes xerófilos, con grandes adaptaciones y tipos biológicos que le confieren ventajas ecológicas, para tener una alta cobertura vegetal a pesar del déficit hídrico. (Passera, 2000). *Prosopis laevigata* (H. & B.) es un árbol, que puede crecer 12 m de altura, con un tronco de 1 metro de diámetro, tiene corteza gruesa, de color café-negruzco, poco fisurado; copa más ancha que alta; ramas glabras o pilosas, armadas de espinas estipulares de 1 a 4 cm de largo: hojas pecioladas con 1 a 3 pares de pinnas, cada una con 10 a 20 pares de foliolos sésiles; flores dispuestas en espigas densas de 5 a 10 cm de largo y de color blanco-amarillentas. El extracto metanólico de hojas de *P. laevigata* tiene actividad anti- *Candida*, efecto fungicida para *C. tropicalis*, y efecto fungicida para *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. albicans* de caso clínico (Moreno, 2019). Asimismo, las flores de *P. laevigata*, son bactericidas y tienen actividad promedio sobre hongos filamentosos (Nava, 2017).

Justificación

Se ha reportado que especies como *P. juliflora*, *P. ruscifolia* y *P. laevigata* tienen una actividad antifúngica sobre diferentes especies de hongos, por lo cual se buscará determinar el efecto del extracto metanólico de las flores de *P. laevigata* sobre uno de los factores de virulencia de *C. albicans*.

Problema

¿El extracto de flores de *Prosopis laevigata* inhibirá el desarrollo del tubo germinativo en *Candida albicans*?

Hipótesis

Si especies de *Prosopis* sp. han sido comprobadas como antifúngico sobre diferentes especies de *Candida*, con base al estudio de sus hojas y flores, entonces el extracto de flores podría inhibir el desarrollo del tubo germinativo de *C. albicans*.

Objetivos

General

Determinar la actividad inhibitoria del desarrollo del tubo germinativo del extracto metanólico de flores de *Prosopis laevigata*

Particulares

1. Cuantificar la concentración de fenoles, flavonoides y alcaloides
2. Determinar la capacidad antioxidante
3. Determinar la composición química con una GC-MS, HPLC-DAD, HPLC-MS
4. Corroborar la actividad anti-*Candida*
5. Determinar la actividad inhibitoria del desarrollo del tubo germinativo

Capítulo I. *Candida albicans*

Información técnica de *Candida albicans*

Candida albicans es un hongo dimórfico, es decir, se desarrolla de forma distinta en función de la temperatura de crecimiento, como levadura, normalmente a 37°C en el huésped, y como hongo de aspecto filamentoso (Figura 1), a 25°C en la naturaleza (DATABIO, 2012).

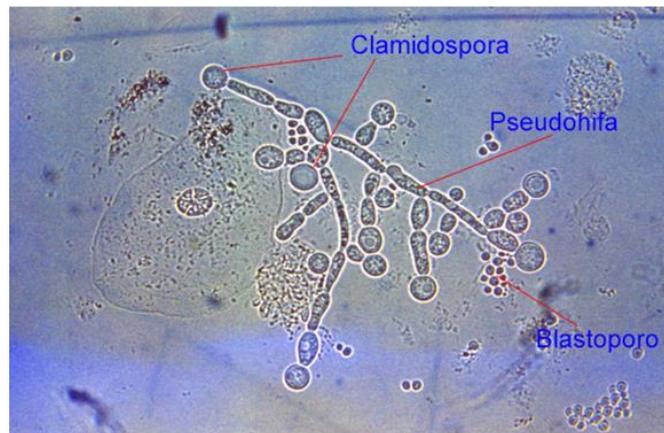


Figura 1. Morfología microscópica de *C. albicans*.

Fuente: DATABIO (CDC Public Health Library).

La pared celular de *C. albicans*, tiene una composición de 90% de carbohidratos y 10% de proteínas. Los carbohidratos son reconocidos por el sistema inmune del huésped, por su parte las proteínas tienen un papel clave en las interacciones adhesivas con superficies del huésped. Las proteínas de la pared celular son relevantes como antígenos y por lo tanto son dianas de las vacunas (Spellberg et al., 2006), por otra parte, las proteínas que son secretadas a la pared celular como las proteasas aspárticas son reconocidas por las células inmunitarias (Pietrella et al., 2010). La pared tiene polisacáridos que están en 3 formas principales, mananos, que son modificaciones postraduccionales de las proteínas de la pared celular; β -glucanos (β -1,3, glucano y β -1,3, glucano) y quitina y/o quitosano en su forma desacetilada (Figura 2) (Neil y Bernhard, 2012).

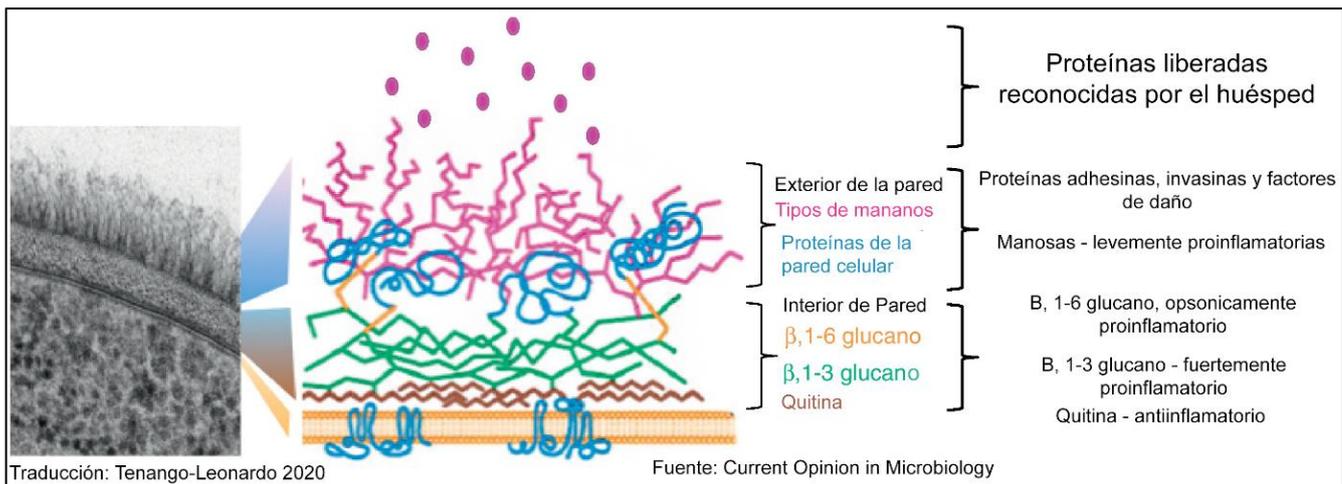


Figura 2. Ilustración de la pared celular de *C. albicans*, con los carbohidratos y proteínas que la componen. Tomado de Neil y Bernhard, 2012.

C. albicans pertenece al filo Ascomycota y se reproduce de forma asexual por gemación. En forma de levadura presenta un aspecto de células redondas u ovaladas, de 3 a 8 x 2 a 7 micrómetros de tamaño, agrupadas en pequeños grupos, mientras que, en forma de hongo filamentoso, las células se alargan y se diversifican tomando la apariencia de filamentos, pseudo-hifas o pseudo-micelio (Figura 3). En forma de levadura se comporta como saprofita, conviviendo en simbiosis con el huésped, mientras que, en forma de hongo filamentoso, se comporta como un parásito patógeno produciendo síntomas en el huésped. Macroscópicamente, en agar Sabouraud crece formando colonias blancas, blandas, cremosas y lisas (DATABIO, 2012). Entre sus factores de virulencia se asocia la producción de tubo germinativo y de enzimas como la fosfolipasa, aunque se agregan proteasas, esterases, proteasas aspárticas secretoras, y capacidad de adherencia a las superficies de las células del hospedero (Salas et al., 2000).

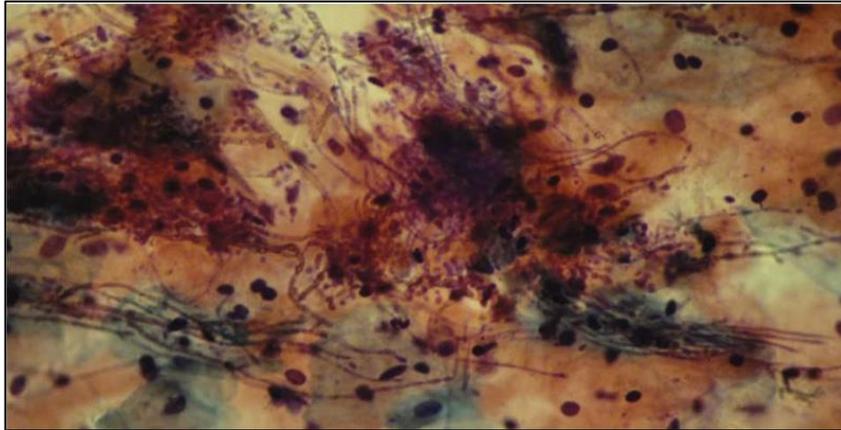


Figura 3. *C. albicans* con tinción de Papanicolaou modificado con microscopio Zeiss, seco fuerte 40X e iluminación Köhler. Fuente: Sánchez-Hernández et al., 2017

Factores de virulencia

Los factores de virulencia de *Candida albicans*, tienen la característica de tener una habilidad para sobrevivir como comensal, tiene adherencia a células del hospedero, secreta enzimas degradativas y tienen cambios de morfología (Figura 4) (Lim et al., 2012). Estos factores de virulencia actúan en diferentes papeles de la infección del patógeno, que puede dividirse en 4 etapas:

1. Colonización: se da cuando ocurre una adhesión epitelial y adquiere los nutrientes por medio de adhesinas, enzimas hidrolíticas, además de que cambia de hifas y de fenotipo.
2. Infección superficial: aquí es donde pasa a una penetración epitelial por medio de la degradación de proteínas del hospedero por enzimas hidrolíticas y comienza a formar hifas.
3. Infección profunda: participa la penetración tisular, invasión vascular y evasión inmune por medio de enzimas hidrolíticas y también la formación de hifas.
4. Infección diseminada: *C. albicans* realiza esta infección a través de la adherencia al endotelio, activa el sistema de coagulación por intervención de adhesinas, enzimas hidrolíticas, formación de hifas y cambio de fenotipo (Rodríguez et al., 2012).

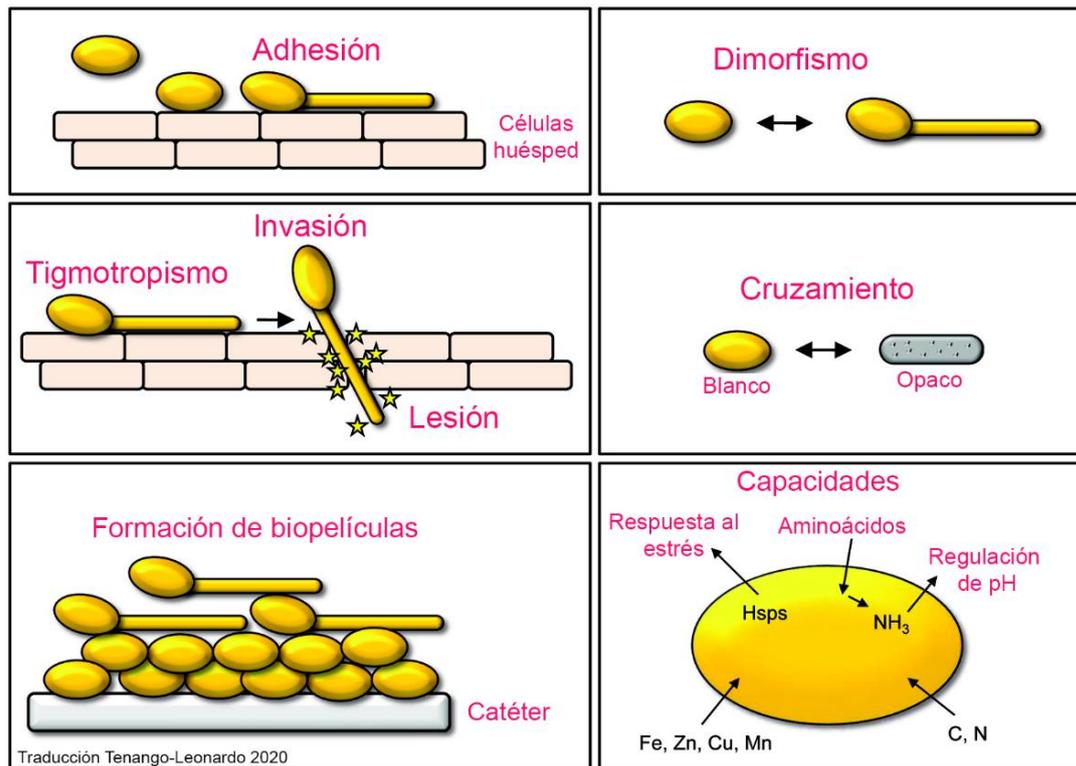


Figura 4. Mecanismos de invasión de *Candida albicans*. Fuente: Mayer et al., 2013.

Polimorfismo, Adhesinas e Invasinas

Las células de la levadura se adhieren a las superficies de la célula huésped mediante la expresión de adhesinas, dicho contacto, desencadena la transición de levadura a hifa y un crecimiento dirigido a través del tigmotropismo. La expresión de invasinas, media la captación del hongo por la célula huésped a través de endocitosis inducida. Surge una invasión, la penetración activa impulsada por hongos en las células del huésped rompiendo barreras, y básicamente esta invasión da lugar a biopelículas de *C. albicans* por una propuesta de plasticidad fenotípica. Esta biopelícula, adquiere también respuestas al estrés mediada por proteínas de choque térmico (Hsps), autoinducción de la formación de hifas a través de la absorción de aminoácidos, la excreción de amoníaco y la alcalinización extracelular concomitante, flexibilidad metabólica y absorción de diferentes compuestos como fuentes de carbono, nitrógeno, y absorción de trazas de metales esenciales, por ejemplo, hierro, zinc, cobre y manganeso. Las hifas contienen una serie de proteínas en su pared, la primera

es la Hwp1, la proteína de secuencia similar a aglutinina Als3, las proteasas aspárticas secretadas (Sap4, Sap5 y Sap6) y proteínas asociadas a hifas Ece1 y Hyr1. *Candida albicans* consta de un conjunto de adhesinas, estas ayudan a la adherencia de otras células de *C. albicans* a superficies abióticas y células hospederas. Entre las adhesinas más comunes está una proteína similar a aglutinina (ALS), consta de ocho miembros que están en la superficie celular unidas a glucosilfosfatidilinositol, y la adhesina Als3 es importante para la adhesión además contribuyen a la formación de biopelículas actuando como adhesinas complementarias. *C. albicans* es un patógeno notable, ya que puede utilizar dos mecanismos diferentes para invadir las células huésped: endocitosis inducida y penetración activa (Mayer et al., 2013).

Als3 es una proteína muy importante para *C. albicans*, porque resulta ser la proteína específica de la hifa para poder adherirse. Su función como adhesina, hace que medie la unión a células epiteliales, células endoteliales y proteínas de la matriz extracelular. Esta se une a los receptores de la célula huésped como la E-cadherina y la N-cadherina, lo que induce a las células huésped a endocitar al hongo. Als3 está codificado por el gen ALS3, que es un miembro de la familia de genes de secuencia similar a aglutinina (ALS) (Hoyer y Hecht, 2001). Las proteínas Als están compuestas por un número de repeticiones en tándem de 36 aminoácidos (Figura 5). Estas repeticiones son ricas en serina y treonina, están expuestas en la superficie celular y se utilizan para la adherencia. (Liu y Filler, 2011). Las repeticiones en tándem pueden mediar directamente la adherencia a algunos sustratos (Frank et al., 2010). Para Als3, tener un mayor número de repeticiones en tándem se asocia con una mayor adherencia cuando se expresan alelos de diferente tamaño en *C. albicans* (Oh et al., 2005).

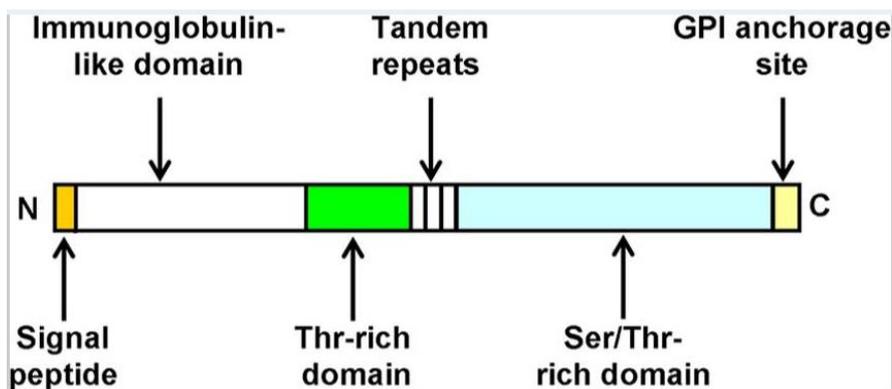


Figura 5. Diagrama esquemático de la estructura genética de Als3.

Fuente: Liu y Filler, 2011.

Se ha buscado inducir anticuerpos contra Als3 mediante una vacuna con β -1,3-glucano. Se ha encontrado que una vacuna con laminarina (β -1,3-glucano purificada) conjugada con toxina diftérica inactivada genéticamente protege a ratones de infecciones causadas por *C. albicans* (Torosantucci et al., 2005). Este mecanismo es gracias a la inducción de anticuerpos anti- β -1,3-glucano, dichos efectos contra las infecciones de *C. albicans*, pueden ser imitados por un anticuerpo monoclonal dirigido contra el β -1,3-glucano (Torosantucci et al., 2009). Este anticuerpo monoclonal tiene varias dianas, y entre esas está Als3, que es una proteína anclada a glucosilfosfatidilinositol unida a glucano (Liu y Filler, 2011). Un estudio en 2010 detectó la familia de genes ALS de *C. albicans* mediante PCR con la ayuda de oligonucleótidos (Paniagua-Contreras et al., 2010) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Oligonucleótidos utilizados para la detección de la familia ALS de *C. albicans*. Fuente: Paniagua-Contreras et al., 2010

GEN	Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Tamaños de las ampliaciones (pb)
ALS3	ALS3F ALS3R	CCA CTT CAC AAT CCC CAT C CAG CAG TAG TAG TAA CAG TAG TAG TTT CAT C	342

Las invasinas son expresadas para la endocitosis inducida, estos median la unión a ligandos del hospedador como E-cadherina en células epiteliales y N-cadherina

en células endoteliales, que provocan la absorción de la célula fúngica en la célula huésped (Phan et al., 2007; Phan et al., 2005). Se han identificado dos invasinas, Als3 (igual funciona como adhesina) y Ssa1 (Mayer et al., 2013). Als3 y Ssa1 se unen al huésped E-cadherina e inducen a endocitosis por un mecanismo dependiente de clatrina (Phan et al., 2007).

Enzimas degradativas secretadas

Las enzimas degradativas secretadas están en dos grandes familias, corresponden a la aspartil proteasas (SAP) y las fosfolipasas (PL). Las SAP, sirven para que *C. albicans* hidrolice proteínas del hospedero como colágeno, laminina, fibronectina, mucina, lactoferrina e inmunoglobulinas. Saps 1, 2 y 3 la secretan levaduras y hacen daño tisular e invaden el epitelio oral y la epidermis. Saps 4, 5 y 6 producido por las hifas, son importantes para la infección sistémica. Saps 9 y 10 están conectadas con la pared celular fúngica a un sitio de unión GPI. Las proteínas PLB1 son necesarias para la virulencia e invasión porque hidroliza las uniones de éster de glicerofosfolípidos de la membrana celular del hospedero (Rodríguez et al., 2012).

Los estudios de las propiedades bioquímicas de las isoenzimas de Sap se han realizado utilizando sobrenadantes de cultivo purificado o mediante la expresión recombinante en *Pichia pastoris* o *Escherichia coli*. La mayoría de los estudios bioquímicos utilizaron condiciones de cultivo que favorecían la expresión de SAP2 y, en consecuencia, se caracterizó principalmente a Sap2. Esta isoenzima actúa principalmente en valores de pH ácidos y parece tener una amplia especificidad de sustrato. Las proteínas de la matriz extracelular y de la superficie del huésped, como estrato corneo humano, el colágeno, la laminina, la fibronectina y la mucina son degradadas eficazmente por Sap2. Sap2 ha sido de las proteínas más eficaces ante la respuesta defensiva del huésped, siendo un hidrolizador eficiente ante proteínas tales como la lactoferrina salival, enzimas de los macrófagos y casi todas las inmunoglobulinas, incluida la IgA secretoria, resistente a la mayoría de las proteasas bacterianas (Schaller et al., 2005). En un estudio, se observó un aumento de la expresión de SAP2 y de la actividad del producto génico secretado (Sap2) en siete de los ocho aislados de *C. albicans* tras el tratamiento con agentes antifúngicos. Los resultados de estos estudios confirman la expresión diferencial

que se sospechaba de la familia de genes SAP *in vitro* (Copping et al., 2005) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Primers utilizados en los ensayos de PCR y PCR en tiempo real para la detección de la secuencia del gen SAP2 de candidiasis vaginal (Fuente: Monroy-Pérez et al., 2013)

Gen	Primer	Secuencia (5´-3´)	Tamaño del producto amplificado (pb)
SAP2	SAP2F SAP2R	AACAACAACCCACTAGACATCACC TGACCATTAGTAACTGGGAATGCTTTAGGA	178

En células de *Candida* en fase logarítmica, cultivadas en medios artificiales que contienen albumina de suero bovino (BSA), el ARNm de SAP2 es el principal transcrito de SAP y, por tanto, Sap2 es la principal proteasa aspártica secretada. Varios peptidomiméticos, conocidos por inhibir la proteasa aspártica del VIH-1, se ensayaron con la Sap2 purificada y los resultados arrojaron una deficiente inhibición de Sap2 que la proteasa aspártica del VIH-1. No obstante, diez de los diecinueve tenían IC_{50S} (Concentración inhibidora semi-máxima) inferiores a 15 µM, valor comparado con las propiedades anti-Sap de los inhibidores de la proteasa aspártica del VIH-1 que se utilizan como fármacos contra el SIDA y que posiblemente también inhiben Sap de *Candida in vivo*. De los inhibidores probados, TS-70, parecer ser eficiente con un IC₅₀ de 0.2 µM. Se ha descubierto que varios petidomiméticos de estado de transición, que son potentes inhibidores de la VIH-1, también inhiben Sap2 (Damiano y Domenico, 2002).

Biopelículas

Las biopelículas de *C. albicans* son una estructura de levaduras e hifas embebidas en una matriz extracelular producida por sí misma (Figura 6). Cuando están maduras, presenta mucha resistencia a la respuesta inmune, a los medicamentos antifúngicos (Karkowska-Kuleta et al., 2009). A esto se le agrega, que la dispersión de las células de levadura de la biopelícula madura contribuye a la virulencia (Uppuluri et al., 2010). La dispersión de estas biopelículas se ve regulada por la proteína de choque térmico Hsp9, que además les otorga la resistencia a los fármacos antimicóticos (Robbins et al., 2011). Las biopelículas

están reguladas por el factor de transcripción Bcr1p, y la adhesina Hwp1, adhesina específica de la hifa, y los factores Tec1 y Efg1 (Naglik et al., 2003; Fanning y Mitchell, 2012). Recientemente se han descubierto nuevos reguladores de la producción de biopelículas, incluyen Ndt80, Rob1, Brg1 (Nobile et al. 2012).

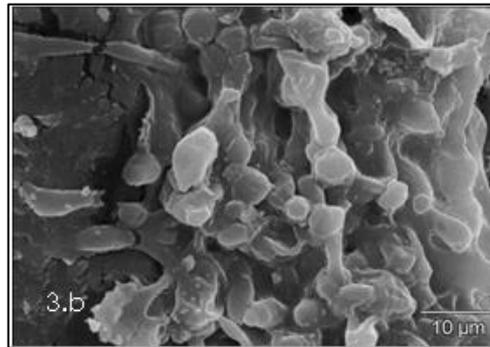


Figura 6. Biopelícula de *Candida* en estado reproductivo.

Fuente: Velazco et al., 2009.

La matriz extracelular está controlada por factores adicionales, como los factores de transcripción sensible al zinc Zap1, que regula negativamente el β -1,3 glucano, componente principal de la matriz de la biopelícula. Asimismo, las glucoamilasas (Gca1 y Gca2), el glucano transferasa (Bgl2 y Phr1) y la exoglucanasa (Xog1), son reguladores positivos de β -1,3 glucano (Nobile et al., 2009; Taff et al., 2012). Se ha estudiado que las biopelículas de *C. albicans* son resistentes a la muerte por neutrófilos y no desencadenan la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), según la evidencia, los β -glucanos en la matriz extracelular, protegen a *C. albicans* de estos ataques (Xie et al., 2012).

Tigmotropismo

Las hifas y biopelículas se forman debido a una señal ambiental, cuando entra en contacto con una superficie y este comienza a tener un crecimiento hifal (Figura 7). Este mismo crecimiento se da en sustratos, como el agar y superficies mucosas, asimismo, sustancias sólidas (Kumamoto, 2008). El tigmotropismo de las hifas de *C. albicans* está regulado por la captación extracelular de calcio a través de los canales de calcio Cch1, Mid1 y Fig1. El tigmotropismo es necesario para el daño total de las células epiteliales y la virulencia normal (Brand et al., 2007).

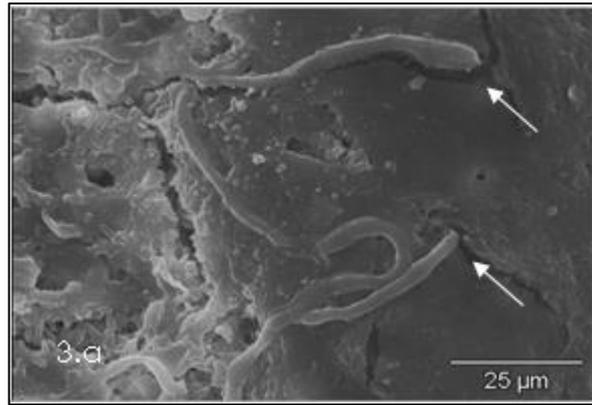


Figura 7. Electromicrofotografía de las hifas penetrando la base.

Fuente: Velazco et al., 2009

Hidrolasas

Las hidrolasas facilitan la penetración activa en las células hospederas y el crecimiento de las hifas. *C. albicans* expresa tres clases diferentes de hidrolasas secretadas: proteasas, fosfolipasas y lipasas (Wächtler et al., 2012). Las proteasas aspárticas comprenden diez miembros (Sap1-10). Las Sap1-8, se secretan a un medio circundante, mientras que Sap9 y Sap10 permanecen unidas a la superficie celular (Mayer et al., 2012). Las fosfolipasas constan de cuatro clases diferentes (A, B, C y D) y solo los miembros de la clase B (PLB1-5) son extracelulares y pueden contribuir a la patogenicidad, rompiendo las membranas del huésped (Niewerth y Korting, 2002; Mavor et al., 2005). Las lipasas, por su parte, constan de 10 miembros (LIP1-10) (Fu et al., 1997).

Patología de *C. albicans*

La Candidiasis, síntomas y epidemiología

El término Candidiasis comprende un espectro clínico extremadamente variado desde una infección superficial hasta una diseminada, y puede afectar cualquier órgano o sistema (Bedout y Gómez, 2010). Las claves clínicas en examen físico de que ocurre una invasión hematógena por *Candida* incluyen: lesiones características en los ojos, lesiones en la piel como un grupo de pústulas dolorosas con base eritematosa y con menor frecuencia abscesos musculares (CENETEC, 2012). Los síntomas de esta afección dependen de la zona de infección, además de las lesiones cutáneas, se pueden presentar fiebres,

salpullido cutáneo, debilidad generalizada, presión arterial baja, dolores musculares, dolores de cabeza y dolores abdominales.

A nivel mundial, los principales estudios epidemiológicos de vigilancia nacional y los estudios multicéntricos se originan principalmente en América del Norte. Aunque existen algunos estudios multicéntricos en la literatura que se originan en países europeos y algunas otras partes del mundo, la mayoría de estos artículos generalmente incluyen datos de centros individuales, este hecho da como resultado datos epidemiológicos excesivamente diversos (Yapar, 2013).

Candida resulta ser la principal causa de micosis en el mundo, especialmente en pacientes neutropénicos, pacientes con tumores malignos tratados con inmunosupresores, pacientes sometidos a cirugía o trasplante de órganos, lactantes prematuros y pacientes con VIH / SIDA. En datos obtenidos de 18 artículos relacionados con la candidiasis entre los años, 2005 y 2015, (Figura 8) muestran que la forma clínica más común, es la genital (47.81%), seguida de la candidiasis oral (36.26%), onicomicosis (14.65%) y finalmente, infecciones cutáneas (1.29%). *Candida albicans* (Figura 9) fue la causa más común (71.36%), además de que, en 20 casos de balanitis y balanopostitis, el agente etiológico más común fue *C. albicans*. La especie *C. albicans* es la que predomina en la candidiasis oral (77.24%), onicomicosis (45.27%), candidiasis cutánea (88.89%) de las diferentes especies que son causantes de la enfermedad (Reyes-Montes et al., 2017).

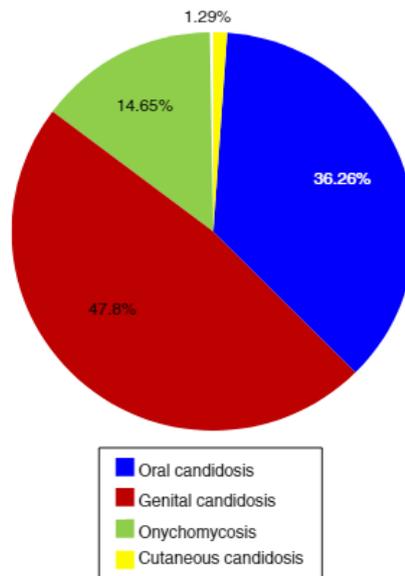


Figura 8. Manifestaciones clínicas de candidiasis superficial en pacientes de México durante el período 2005-2015.
Fuente: Reyes-Montes et al., 2017.

De los 15 estudios encontrados en la literatura sobre candidiasis invasiva, seis incluyeron informes sobre pruebas de susceptibilidad antifúngica que mostraron resistencia a itraconazol en *C. tropicalis* y amfotericina B, fluconazol e itraconazol en *C. glabrata* (Reyes-Montes et al., 2017). En estados Unidos de América, existe cierta preocupación por la resistencia a las equinocandinas, así como la resistencia a múltiples fármacos, en *C. glabrata*. Aunque algunos aspectos de la candidemia y la candidiasis se han mantenido constantes, las tasas, las especies y la susceptibilidad están en un estado de cambio constante (Shawn y Lockhart, 2014).

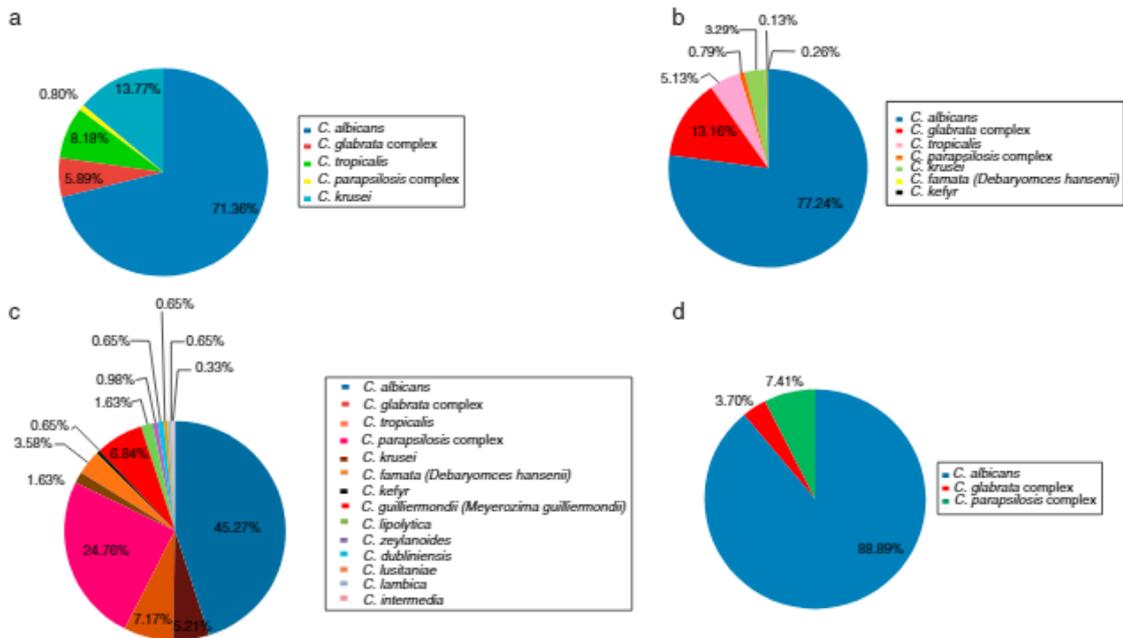


Figura 9. Distribución de frecuencias de las especies de *Candida* que causan candidiasis superficial en México durante el periodo 2005-2015. (a) Candidiasis oral. (b) Candidiasis genital. (c) Onicomicosis. (d) Candidiasis cutánea. Fuente: Reyes-Montes et al., 2017.

Capítulo II. Medicina antifúngica

Clasificación de medicamentos antifúngicos y su mecanismo de acción

Los medicamentos que son utilizados para tratar infecciones relacionadas con hongos patógenos se clasifican según los criterios convencionales que están relacionadas con su estructura (Cuadro 3), con su origen en sustancias producidas por organismos vivos o derivados de síntesis química, de acuerdo con el espectro de acción (amplio o restringido) y con el sitio de acción (Cuadro 4). A esto también puede agregarse la forma en la que el medicamento se aplica, en los que destacan medicamentos en forma de crema, gel, pomada, polvo, solución, loción, aerosol, tabletas vaginales y hasta champú. Las aplicaciones van a depender del tipo de infección y la lesión que el hongo deje (Allevato 2007).

Cuadro 3. Clasificación de los antifúngicos por su estructura y sus respectivos medicamentos

CLASIFICACION DE LOS ANTIFUNGICOS POR SU ESTRUCTURA	
POLIENOS	Nistatina, natamicina, amfotericina B
AZOLES	Imidazol: miconazol, clotrimazol, ketoconazol. Triazoles: fluconazol, itraconazol, (ketoconazol). Triazoles de segunda generación: voriconazol, ravuconazol, posaconazol
ALILAMINAS	Terbinafina, naftifina
LIPOPEPTIDOS	Papulacandinas. Triterpenos glicosilados. Equinocandinas: caspofungina, anidulafungina, micafungina.
PIRIMIDINAS	Flucitosina.
OTROS	Ioduro de potasio, ciclopirox, tolnaftato, griseofulvin.

Fuente: Avellato 2007.

Cuadro 4. Clasificación de los antifúngicos según su mecanismo de acción.

ANTIFÚNGICOS, CLASIFICACIÓN SEGÚN SU MECANISMO DE ACCIÓN
ANTIFÚNGICOS QUE ACTÚAN SOBRE LA MEMBRANA PLASMÁTICA
<ul style="list-style-type: none"> • Polienos • Azoles • Alilaminas • Tiocarbamatos
ANTIFÚNGICOS QUE ACTÚAN SOBRE LA PARED
<ul style="list-style-type: none"> • Lipopéptidos
ANTIFÚNGICOS QUE ACTÚAN SOBRE EL NÚCLEO
<ul style="list-style-type: none"> • Pirimidinas fluoradas • Misceláneos

Fuente: Avellato 2007.

Antifúngicos que actúan sobre la membrana plasmática

La membrana plasmática, juega un papel esencial en la relación, huésped-patógeno, porque las proteínas que la componen median diferentes funciones, como la detección y la señalización al entorno externo, donde las proteínas de membrana ancladas con glucosilfosfatidilinositol (GPI) desempeñan un papel importante. Se han identificado cerca de 214 proteínas de membrana, de las cuales 41 están descritas como parte de la membrana plasmática (Cabezón et al., 2009). En las células fúngicas existe un esteroide llamado ergosterol, y éste no es sintetizado por células de mamíferos, asimismo, los polienos, azoles y alilaminas, inhiben la síntesis de éste o se fijan al mismo modificando la permeabilidad de la membrana plasmática (Avellato et al., 2007). A continuación, se presentan una serie de antifúngicos que actúan sobre la membrana plasmática y los efectos que éste provoca.

1. Polienos: estos medicamentos se unen al ergosterol presente en la membrana celular, estos compuestos, forman poros que alteran la permeabilidad de la membrana, lo que permite una pérdida de proteínas, glúcidos y cationes monovalentes y divalentes, causando una muerte celular repentina (Figura 10).

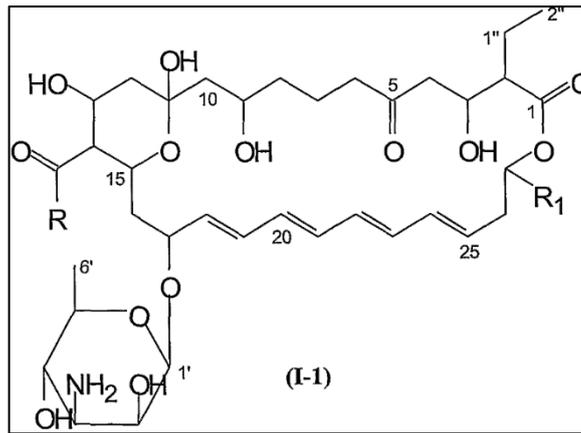


Figura 10. Estructura general de los Polienos.

2. Azoles: estos compuestos inhiben al citocromo P-450-3-A de la célula fúngica, a través de la inactivación de la enzima 14- α -dimetilasa, bajo esta acción, se inactiva la síntesis de ergosterol en la membrana celular. Cuando la célula no tiene el ergosterol, se acumulan estroles tóxicos intermedios, aumenta la permeabilidad de la membrana y se interrumpe el crecimiento del hongo (Hiemenz y Walsh, 1996) (Figuras 11 y 12).

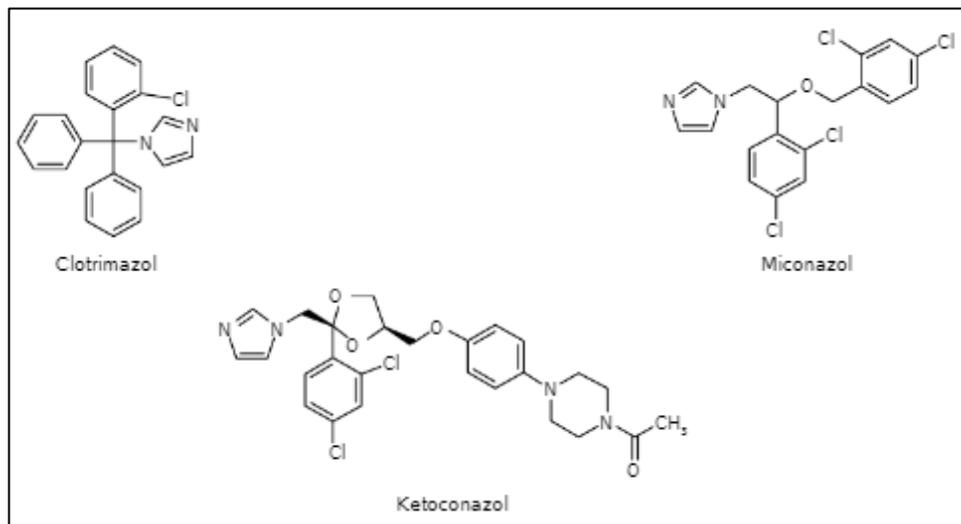


Figura 11. Estructura química de los imidazoles. Fuente: Sádaba et al., 2004.

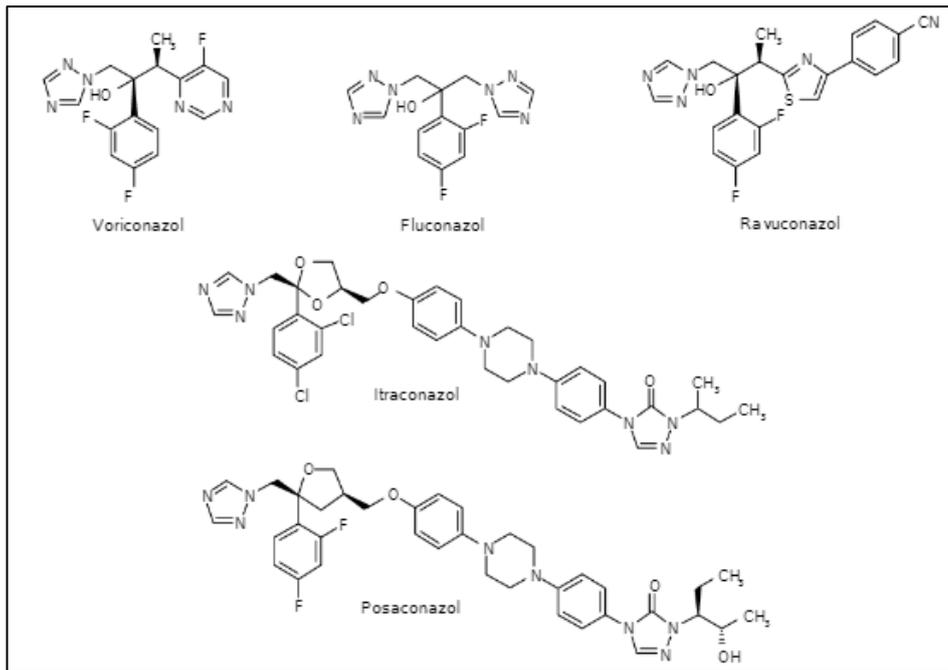


Figura 12. Estructura química de los triazoles. Fuente: Sádaba et al. 2004.

3. Alilaminas: actúan similar a los azoles, conceptualmente inhiben la síntesis de ergosterol. Las alilaminas inhiben a la enzima escualeno epoxidasa, que hace que el ergosterol disminuya su concentración, aumenta los niveles de escualeno, aumenta la permeabilidad de la membrana celular, interrumpe la organización celular y por ende disminuye su crecimiento (Gregorí, 2005) (Figura 13).

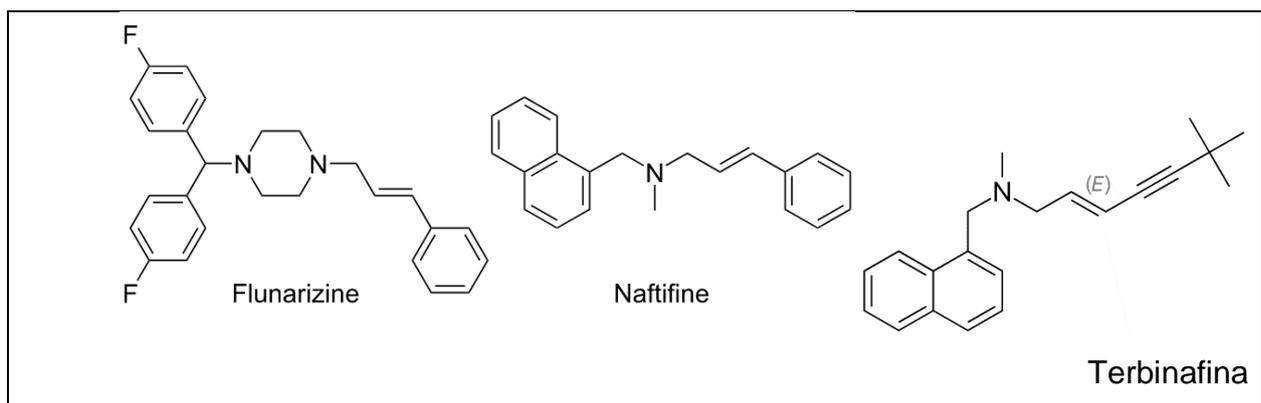


Figura 13. Estructura química de las principales Alilaminas.

4. Tiocarbamatos: los tiocarbamatos tienen un compuesto conocido como tolnaftato que bloquea la síntesis de ergosterol al inhibir la epoxidación del

escualeno, unida a la membrana, enzima implicada en la biosíntesis del ergosterol (Allevato et al., 2007) (Figura 14).

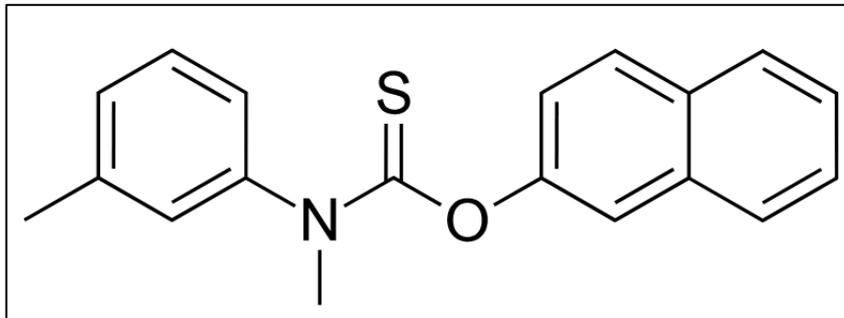


Figura 14. Estructura química del Tolnaftato.

Antifúngicos que actúan sobre la pared de las células fúngicas

La pared celular tiene una gran plasticidad que protege a la célula de diferentes tipos de estrés ambiental, como lo son los cambios osmóticos. Ésta también permite la interacción con el medio externo, ya que cuenta con adhesinas y receptores. La pared celular tiene en su estructura glucanos, quitina y glicoproteínas (Ponton, 2009).

1. Lipopéptidos: Los antifúngicos que actúan sobre ella, lo hacen inhibiendo la síntesis de los glucanos por medio de la inactivación de la enzima 1,3-betaglucano sintetasa, a falta de glucano en la pared celular, esta se vuelve incapaz de soportar el estrés osmótico (Gregorí, 2005). Entre los lipopéptidos más utilizados como antifúngicos están las equinocandinas (Figura 15).

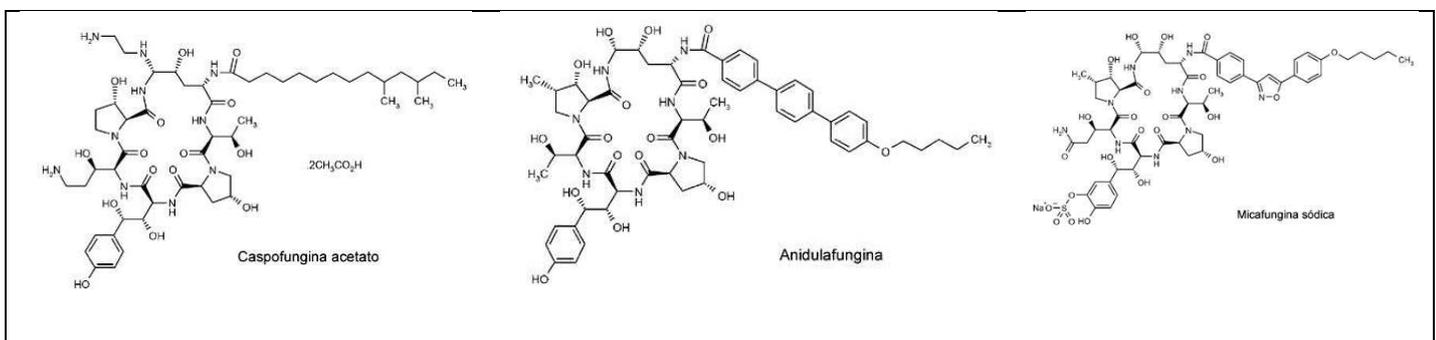


Figura 15. Estructura química de caspofungina, micafungina y anidulafungina, medicamentos Lipopéptidos. Fuente: Diomedi 2004.

Antifúngicos que actúan sobre el núcleo de la célula

El núcleo es el organelo que contiene el material genético del organismo, este tiene la finalidad de contener ADN para la reproducción, la mitosis y las diferentes etapas del dogma central de la biología (replicación, transcripción, traducción). Los compartimentos hifales de *C. albicans* son uninucleados, y solo el compartimiento hifal apical es la parte que permanece mitóticamente activo (Thomson et al., 2016).

1. Pirimidinas fluoradas: actúan como anti-metabolitos. La fluocitosina o 5-fluorocitosina, inhibe el crecimiento y reproducción de los hongos (Figura 16). Su mejor acción es convertirse en 5-fluoracilo (5-FU), el cual es fosforilado e incorporado al ARN, sintetizándose en dexosinucleótido que posteriormente inhibe a la timidilato sintetasa e impide la síntesis de proteínas de la célula (Allevato et al., 2007).

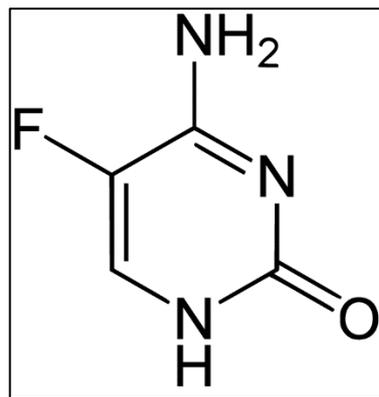


Figura 16. Estructura química de la Fluocitosina.

2. Agentes misceláneos: el más común es el griseofulvin, éste inhibe la mitosis al destruir el huso mitótico (Gregorí, 2005) (Figura 17).

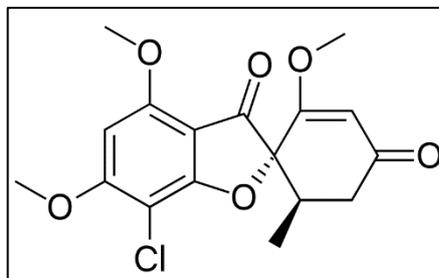


Figura 17. Estructura química del griseofulvin o griseofulvina.

¿Por qué me puede dar alguna infección por *Candida albicans*?

Candida albicans resulta ser el hongo más oportunista, usualmente reside en el tracto gastrointestinal y genitourinario. La inmunodepresión de un paciente es una de las causas que pueden ocasionar que *C. albicans* no tenga un control dentro del organismo y se disemine por el cuerpo en diferentes órganos internos. La infección por *C. albicans*, se le conoce como candidiasis, cuyos factores de riesgo, yacen en una gama de causas que incluyen cirugías (principalmente abdominales), quemaduras, prolongación de cuidados intensivos y administración previa de antibióticos de amplio espectro y agentes inmunosupresores. Cabe agregar que ciertos manejos médicos como la quimioterapia antineoplásica, trasplante de órganos, la hemodiálisis, la nutrición parenteral y los catéteres venosos centrales, también contribuyen a una invasión generalizada de hongos (Spampinato y Leonardi, 2013). Después de lo anterior expuesto, resulta oportuno mencionar que no sólo *Candida albicans* puede aprovecharse de las causas centrales para su diseminación e infección, si no también especies como *C. glabrata*, *C. tropicales*, *C. parapsilosis* y *C. krusei*, son especies que han sido encontradas en pacientes sanos y pacientes enfermos (MacCallum, 2012). A los efectos de estas causas, se determina entonces que la candidiasis puede diseminarse por procesos exógenos y endógenos, significa entonces que el individuo que posee el hongo, lo puede pasar a una persona que no está infectada, como el caso de las enfermedades de transmisión sexual, que se transmiten dependiendo de cómo se efectuó el acto sexual. Es importante estar atentos a molestias o síntomas relacionadas con la candidiasis y evitar una infección más grave por este patógeno o en su caso, infectar a otras personas.

Precios de los principales antifúngicos a nivel nacional

Los medicamentos que existen para el tratamiento antimicótico sistémico abarcan un espectro de donde derivan una serie de formulaciones comunes. En general, estas incluyen la Amfotericina B, derivados de azoles, equinocandinas y la flucitosina (Revankar, 2019). Pascual (2017) menciona que los precios van a variar dependiendo de los costos de producción, valor terapéutico, el costo de los competidores y los precios internacionales (Cuadro 5).

Cuadro 5. Precios obtenidos de Farmacias Especializadas (FESA) 2020 (Tienda en línea), de medicamentos disponibles para tratar infecciones fúngicas.

Nombre	Laboratorio	Principio activo	Presentación y cantidad	Gramaje	Precio (MXN)
AMFOTERICINA					
Candipres	KENER	Amfotericina B	Frasco ampula	50 mg	\$ 1,271.25
AZOLES					
Afumix	ALTIA	Fluconazol Tinidazol	Caja con 4 tabletas	37.5/500 mg	\$ 601.54
Afungil	ALTIA	Fluconazol	Caja con 10 cápsulas	100 mg	\$ 2,020.00
Candiflux	LIOMONT	Fluconazol	Caja con 1 cápsula	150 mg	\$ 111.93
Diflucan	PFIZER	Fluconazol	Caja con 1 cápsula	150 mg	\$ 563.20
Fluoxan	PISA	Fluconazol	Caja con 10 cápsulas	100 mg	\$ 1,189.21
Cresemba	BIOTOSCANA	Isavuconazol	Caja con 14 cápsulas	100 mg	\$ 15,000.00
Cresemba	BIOTOSCANA	Isavuconazol	Frasco ampula	200 mg	\$ 6,100.00
Conazol	LIOMONT	Ketoconazol	Caja con tubo	40 g	\$ 90.00
Isox	ITRA	Itraconazol	Caja con 15 cápsulas	100 mg	\$ 417.60
Sporanox15D	JANSSEN	Itraconazol	Caja con 15 cápsulas	100 mg	\$ 1,024.95
Steitraz	LandsteinerS.	Itraconazol	Caja con 15 cápsulas	100 mg	\$ 61.10
Itraisdin	ISDIN	Itraconazol	Caja con 7 cápsulas	50 mg	\$ 439.76
Spriafil	SCHERING PLOUGH	Posaconazol	Caja con frasco c/ 105 ml y 1 cucharita dosificadora graduada	40mg/ml	\$ 19,906.11
Vfend	PFIZER	Voriconazol	Frasco ampula	200 mg	\$ 2,489.92
Vfend	PFIZER	Voriconazol	Caja con 14 tabletas	200 mg	\$ 9,669.37
Daktrain Gel Oral	JANSSEN	Miconazol	2g Caja con tubo	78 g	\$ 466.02
EQUINOCANDINAS					
Cancidas	MSD	Caspofungina	Frasco ampula	50 mg	\$ 3,690.00
Equaltha	PFIZER	Anidulafungina	Frasco ampula	100 mg	\$ 3,720.02
OTROS					
Canesten V	BAYER	Clotrimazol	Caja con 1 óvulo	500 mg	\$ 167.00
Lamisil	NOVARTIS	Terbinafina	Caja con 20 tabletas	250 mg	\$ 1,407.02
Ciclopirox	SANOFI	Ciclopirox	Caja con frasco	3 ml	\$ 1,109.68

La venta de un medicamento no resulta fácil, puesto que se tienen que realizar diferentes investigaciones sobre el modo de acción de las moléculas sintetizadas en un laboratorio, y ver cual resultara viable para comercializar, depende mucho de qué tan resistente es el microorganismo a ciertos principios activos y cuán difícil

es sintetizarlo. El cuadro 5 nos muestra que el medicamento más caro es el Spriafil (Posaconazol), cercano a los \$ 20,000.00 MXN, y haciendo una investigación concisa sobre por qué es tan elevado su precio, se encontró que Kely et al. 2011, hizo una comparación de efectividad del posaconazol contra fluconazol/itraconazol, encontrando que el primero, proporciona beneficios incrementales en comparación con la terapia con azoles. Con referencia a lo anterior, parece ser un indicio que el precio tiene un punto clave en la efectividad, lo que parece indicar que el paciente necesita tener la posibilidad de suministrarse medicamentos más caros para tener resultados oportunos ante alguna afección por *Candida*. No se encontró un precio específico para la flucitosina, lo que parece indicar que es un medicamento muy controlado o definitivamente está fuera de los estándares para el tratamiento de candidiasis, no obstante, se ha visto que flucitosina tiene una actividad antifúngica aditiva o sinérgica cuando se administra con amfotericina B. Parece tener un control en hospitales que la suministran para un tratamiento (Lumbreras et al., 2003).

Reacción adversa a medicamentos antifúngicos

Las RAM, se entienden como el efecto indeseado que ocurre tras la administración de un fármaco mediante dosis terapéuticas, diagnosticas o profilácticas. Estas reacciones adversas se clasifican en predecibles e impredecibles. Las predecibles son dosis dependientes, es decir, están relacionadas con acciones farmacológicas del medicamento como sobredosis, efectos colaterales, efectos secundarios e interacción con otros fármacos. Comparativamente con las impredecibles, se refiere a dosis independientes, cuyas consecuencias tendrán un desglose que va a depender de la sensibilidad inmunológica del paciente o diferencias genéticas, lo anterior dicho se ejemplifica con intolerancias, idiosincrasia (anomalías en el metabolismo) reacciones de hipersensibilidad y en general reacciones alérgicas (Goienetxe et al., 2008).

Sobre la base de las consideraciones anteriores, se resumen en el cuadro 6, las reacciones adversas generales de una gama de medicamentos antifúngicos.

Cuadro 6. Lista de antifúngicos con sus respectivas reacciones adversas a medicamentos (RAM). Información obtenida de McKeny et al., 2020.

Antifúngico	RAM
Amfotericina B	
AMB-d	➤ Hipotensión, escalofríos, dolor de cabeza, hipopotasemia, hipomagnesemia, anemia, insuficiencia renal, náuseas, vómitos, escalofríos y fiebre.
L-AMB	➤ Riesgo de nefrotoxicidad, hipertensión, hipotensión, taquicardia, flebitis localizada, escalofríos, dolor de cabeza, erupción cutánea, anomalías electrolíticas, hiperglucemia.
ABCD	➤ Riesgo de nefrotoxicidad, fiebre, escalofrío.
AZOLES	
Ketoconazol	➤ Hipotensión ortostática, trombocitopenia, prurito, exantema, mialgias y una supresión rara de la producción de glucocorticoides en las glándulas suprarrenales. Mayor malestar gastrointestinal.
Itraconazol	➤ Insuficiencia cardíaca, hipertensión, edema periférico e hipopotasemia.
Voriconazol	➤ Cambios de visión, alucinaciones auditivas y/o visuales, neurotoxicidad, erupción por fotosensibilidad, fotofobia, periostitis, cardiotoxicidad y alopecia.
Posaconazol	➤ Tromboflebitis secundaria a catéteres intravenosos periféricos, hipertensión, hipotensión, cefalea, exantema, hipopotasemia y trombocitopenia.
Isavuconazol	➤ Efectos gastrointestinales, dolor de cabeza, hipopotasemia, disnea, tos y edema periférico.
Miconazol	➤ Comúnmente causa dermatitis de contacto, ardor / escozor y prurito en sitio de aplicación
Clotrimazol	➤ Irritación, ardor / escozor, prurito, urticaria y posibles ampollas en el lugar de aplicación
ALILAMINA	
Terbinafina	➤ Dolor de cabeza, erupciones cutáneas, diarrea, dispepsia e inflamación o infección de las vías respiratorias
EQUINOCANDINAS	
Anidulafungina	➤ Hipotensión, edema periférico, insomnio, hipopotasemia, hipomagnesemia, mayor riesgo de infecciones del tracto urinario, disnea y fiebre.
Caspofungina	➤ Vínculos con hipotensión, edema periférico, taquicardia, escalofríos, color de cabeza, erupción cutánea, anemia, flebitis localizada, insuficiencia respiratoria y reacciones relacionadas con la infusión.
Micafungina	➤ Se relaciona con flebitis, anemia, transaminitis, hiperbilirrubinemia, insuficiencia renal y fiebre.
Otros	
Griseofulvina	➤ Erupción cutánea y urticaria. En casos graves, fotosensibilidad cutánea, leucopenia, granulocitopenia y hepatotoxicidad.
Flucitosina	➤ Afecciones cardiovasculares, en el sistema nervioso central y periférico, dermatológico, hematológico, hepático y renal.
Ciclopirox	➤ Irritación, ardor de piel, dermatitis de contacto y prurito.

Quinolinas	➤ Piel seca, dermatitis de contacto, reacción alérgica, crecimiento rápido del cabello en las áreas donde se aplica el agente y foliculitis.
Yoduro de Potasio	➤ Arritmias, hemorragia gastrointestinal, angioedema, parotiditis, adenoma de tiroides y bocio
Piritiona de Zinc	➤ Irritaciones leves de la piel.

Capítulo III. *Candida albicans* y su resistencia

El uso inadecuado de los antifúngicos

El mal uso de cualquier medicamento expone a la persona a adquirir efectos adversos dentro de su organismo, y con ello, aumenta las posibilidades de que muchos patógenos adquieran resistencia mediante un proceso de selección, que los vuelve resistentes a moléculas de los principios activos de los medicamentos. La limitación actual sobre la venta de los medicamentos no detiene en lo más mínimo que éstos sean aplicados de forma errónea, porque los problemas van desde indicaciones erróneas dichas para una terapia antifúngica, errores en la elección de antifúngicos, errores en la dosificación, duración del tratamiento, y la no aplicación de una terapia secuencia adecuada. Estas acciones tendrán factores causales, como limitaciones en técnicas diagnósticas, médicos no especialistas que pueden tratar de manera equivocada la infección, retrasos en el tratamiento (causante muchas veces de mortalidad) y el desconocimiento parcial de los efectos adversos de un medicamento, que pueden incluso agravar la situación del paciente (Manzano, 2019).

Las consecuencias ante la prescripción inapropiada de un agente antifúngico exponen al paciente a efectos adversos, un mal tratamiento inicial puede aumentar los costos en la atención de la infección, contribuye al incremento en la resistencia a antifúngicos, incluso permite la aparición de una enfermedad fúngica invasora (Osorio-Lombana et al., 2019). En México se ha observado un incremento importante en el número de pacientes con micosis que no responden a los tratamientos, pero no se han cuantificado los casos (López-Ávila et al., 2016).

Carácter de resistencia de *Candida albicans*

Para entender que es precisamente la resistencia, tenemos que ver cómo se define, en este caso hay dos formas de definirlo: resistencia microbiológica, resistencia clínica y la definición compuesta (microbiológica y clínica) (Turnidge y Paterson, 2007). La resistencia microbiológica ocurre cuando el crecimiento del patógeno infectante es inhibido por una concentración de antimicrobiano superior al rango observado para las cepas de tipo silvestre. En cuanto a la resistencia clínica, el patógeno es inhibido por una concentración antimicrobiana que es más alta que la que podría lograrse con seguridad con una dosis normal. La definición compuesta está presente cuando los aislamientos no son inhibidos por las

concentraciones generalmente alcanzables del agente con esquemas de dosificación normales y/o cuando demuestran que la concentración mínima inhibitoria cae en el rango donde es probable que haya mecanismos específicos de resistencia (Pfaller, 2012).

Las características genómicas de *C. albicans* que se relacionan con la resistencia, son descritas por mutaciones en los genes que codifican para la síntesis de ergosterol de la membrana plasmática, o bien con la sobreexpresión de genes que codifican para bombas de expulsión de fármacos fuera del microorganismo (López-Ávila et al., 2016).

Mecanismo de resistencia a los azólicos

El primer mecanismo ante antifúngicos azólicos, es debido a la inducción de bombas de salida que conducen a una disminución de la concentración del fármaco en la enzima diana dentro de la célula fúngica. La regulación al alza de las bombas de salida codificadas por genes MDR o CDR se ha asociado con la resistencia a los azólicos en *C. albicans* (*MDR 1*, *CDR1*, *CDR2*). Estas bombas de eflujo codificadas por genes CDR afectan a todos los fármacos azoles y a menudo, son suficientes para la resistencia, por el contrario, las bombas de eflujo codificadas por genes MDR suelen ser selectivas para el fluconazol (Figura 18). Dentro de la gama de especies de *Candida* es por medio de la adquisición de mutaciones puntuales en el gen que codifica la enzima diana (*ERG11*), lo que da como resultado una diana alterada con afinidad reducida o incapacidad para unirse a los azoles. La manera de ampliar la gravedad de esta resistencia puede ser si hay una sobreexpresión o regulación positiva de la enzima diana alterada, es decir, entre más enzimas mutantes existan, puede que las bombas se multipliquen. Un último mecanismo de resistencia a los azoles en las especies de *Candida*, implica que se desarrollen vías de derivación que anulen los efectos de alteración de la membrana de los fármacos azoles asociados con la inhibición del crecimiento de hongo. Esta mutación se cree existe, debido a la mutación del gen *ERG3* en ciertas cepas resistentes de *Candida* (MacCallum et al., 2010).

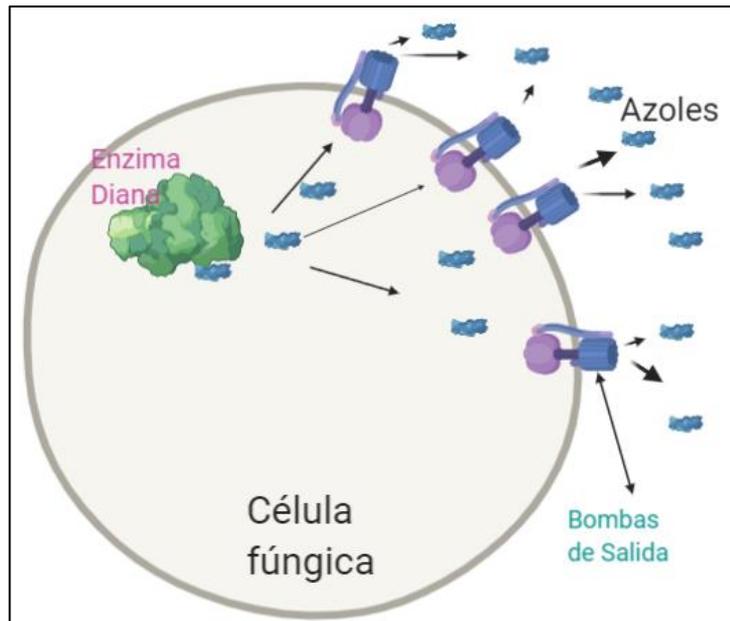


Figura 18. Ilustración que ejemplifica la expulsión de los azoles por medio de las bombas producidas por los genes MDR o CDR como carácter de resistencia.

Resistencia a las equinocandinas

El componente esencial de la pared celular de los hongos es el 1,3-β-D-glucano, sintetizado por la 1,3-β-D-glucano sintasa. La afectación de 1,3-β-D-glucano sintasa puede provocar inestabilidad celular y lisis en las levaduras. La resistencia que existe es en pro de codificar elementos para la sintasa. Puntualmente las mutaciones están en dos regiones de “puntos calientes” (HS1 y HS2) de FKS1, cuyo gen codifica la subunidad catalítica principal y presunta de 1,3-β-D-glucano sintasa (Perlin, 2007).

Las consecuencias que existen en estas dos principales resistencias tienen consecuencias en términos de concentración mínima inhibitoria elevadas que se asocian con infecciones más disruptivas durante el tratamiento antimicótico y la profilaxis. Como se mencionó en el apartado “El uso inadecuado de los antifúngicos”, estas resistencias pueden provocar infecciones micóticas invasivas en pacientes de alto riesgo que reciben profilaxis antifúngica (Pfaller, 2012).

Capítulo IV. Aspectos botánicos

Información técnica de la familia Fabaceae, del género *Prosopis* y distribución

La familia Fabaceae es la tercera familia más grande de las Angiospermas y representan la segunda familia más importante de las plantas cultivada. Se considera un superalimento con numerosas ventajas nutricionales por sus semillas altamente nutritivas que además permiten un desarrollo sostenible, puesto que proporcionan también, medicinas, maderas, forraje y contribuyen al enriquecimiento del suelo (Llamas y Acedo, 2016). Poseen, además, las capacidades de germinar en condiciones de elevado estrés hídrico y salino e incluso de alta concentración sódica (Passera, 2000).

Prosopis es un género primitivo dentro del clado Mimosoide, que posiblemente se originó en África tropical, donde actualmente persiste *P. africana*, la especie menos especializada y más mesófila. *Prosopis* obtuvo su nombre por Linneo en 1767 para describir la única especie en el momento, conocida como *Prosopis spicigera* Linnaeus, hoy conocido con el sinónimo *P. cineraria* (L.) Druce, la especie tipo del género (Fontana et al., 2018) (Figura 19).



Figura 19. Distribución natural del género *Prosopis* y sus principales especies.
Fuente: Barros 2010.

Las especies de *Prosopis* se distinguen de otros géneros del clado Mimosoide por sus vainas carnosas indehiscentes y la liberación de polen en granos individuales (Folliot y Thames 1983). El género se distingue por ser de árboles y arbustos que se caracterizan por el follaje plumoso (Figura 20) resultante de sus hojas bipinnadas con numerosos folíolos pequeños y pequeñas flores actinomorfas y pentámeras amarillas (o blancas) reunidas en espigas o cabezuelas elipsoides a globosas de ubicación axilar (Figura 21). En su mayoría son espinosos, y tienen vainas sub cilíndricas, gruesas o comprimidas, rectas, arqueadas o en espiral, indehiscentes y mesocarpio carnoso que van desde el color amarillo hasta el negro y las valvas nunca se separan de forma natural, ya sea del árbol o una vez caído (Fontana et al., 2018) (Cuadro 7).

El Mezquite *Prosopis laevigata*

A *Prosopis laevigata* se le conoce como mezquite, se localiza en zonas desérticas y semidesérticas, en México, se distribuye en la vertiente del Pacífico, desde Michoacán hasta Oaxaca, y en la del Golfo en Nuevo León, Tamaulipas y el norte

de Veracruz, en la depresión central de Chiapas y en las regiones altas centrales del país (Rodríguez-Sauceda et al., 2014).



Figura 20. Follaje de *Prosopis laevigata*.
Foto original de Marco Aurelio Rodríguez Monroy

La especie *Prosopis laevigata* (Humbolt et Barpland ex Willd) se halla en los altiplanos centrales del norte de México, las tierras bajas de Tamaulipas meridional, y en partes de Oaxaca, Morelos, Puebla, Chiapas y Estado de México. Su crecimiento es sobre laderas de colina, en depresiones y a lo largo de llanos inundados. Esta especie se halla también en el centro y sur de Perú.



Figura 21. Hojas e inflorescencias de *Prosopis laevigata*.
Foto original de Marco Aurelio Rodríguez Monroy.

Existe una variedad llamada *Prosopis laevigata* var. *andicola* Burkart, que es un tipo montano y crece en alturas medias de 1900 a 2900 msnm. Se distribuye en el sur de Perú a través de los Andes bolivianos hasta la extrema esquina del noroeste argentino. Se usa comúnmente para leña y forraje (Folliot y Thames, 1983).

Cuadro 7. Morfología y anatomía del género *Prosopis* con ilustraciones.
Fuente: Folliot y Thames 1983.

Morfología y anatomía	Descripción	Imagen
Tallos y raíces	La planta es generalmente un arbusto de 2 o 3 m, pero puede crecer hasta una altura de 6 a 7 m. Las ramitas son glabras y las espinas son axilares.	
Hojas	Pueden presentarse uno o dos pares de pinnas, por hoja, de 2.5 a 12 cm de largo, con 20 a 30 pares de foliolos cada una. Los foliolos son glabros, lineares, oblongos de 5 a 10 mm de largo, y de 2 a 7 veces más largos que anchos. Sus intervalos sobre el raquis son inferiores a sus anchos; su color es verde pálido a grisáceo, y en la parte inferior tiene una fuerte nervadura pinada.	
Inflorescencia	Los racimos son de 4 a 10 cm de largo y llevan flores blanco-verdosas con pétalos de 3 a 4 mm de largo. El cáliz es de alrededor de 1 mm de largo	
Legumbres y semillas	Las vainas son de 9 a 17 cm de largo y 0.7 a 1.4 cm de ancho. Son lineares, glabras, derechas o levemente curvadas y de un color amarillo puro. Los segmentos son redondeados o rectangulares en su corte transversal y son más cortos que anchos. Las semillas son longitudinales dentro de la vaina.	

Capítulo V. Farmacognosia

Lugar de Obtención

Zapotitlán Salinas, Puebla

Zapotitlán Salinas, está localizado en un valle de la porción occidental del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, al sureste del estado de Puebla, y al norte del estado de Oaxaca, y ocupa una superficie de 485 km². Está ubicada entre los paralelos 18° 07' 18" t 18° 26' 00" de latitud Norte y los meridianos 97° 19' 24" y 97° 19' 06" Oeste (Figura 22). Colinda al norte con Tehuacán, al sur con Caltepec, al Oriente con San Gabriel Chilac, San José Hiahuatlán y Altepexi, al poniente con Atexcal y el estado de Oaxaca.

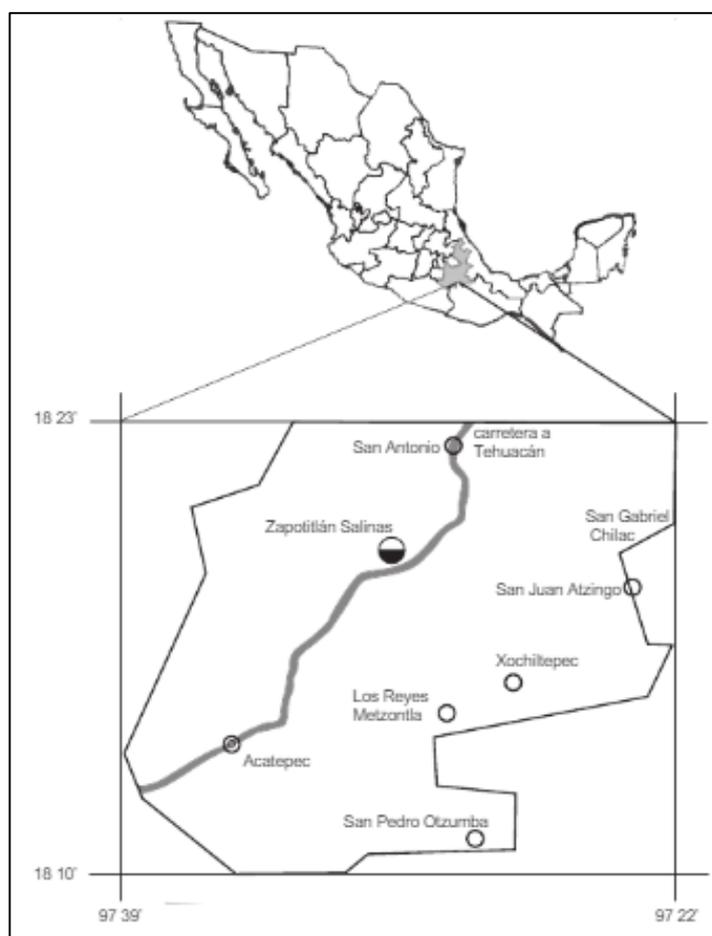


Figura 22. Municipio de Zapotitlán Salinas, Puebla.
Fuente: Paredes-Flores et al., 2007.

Hidrografía

El municipio pertenece a la cuenca del Paloapan en gran parte, solo el extremo Suroeste pertenece a la cuenca del Balsas, es recorrido por numerosos arroyos

intermitentes en diferentes direcciones concentrándose en un arroyo principal al centro-este llamado Agua el Gavilán principal afluente de Zapotitlán. Se encuentra el río Zapotitlán, se une al Tehuacán en el valle del mismo nombre y forman el Río Salado uno de los principales afluentes del Papaloapan, el extremo Suroeste presenta varios arroyos de los cuales destacan el Acatepec y Las Manzanas, afluentes de Acatlán perteneciente a la cuenca del Balsas (Fernández et al., 2020).

Clima

Predominan los climas secos, semicálidos subhúmedos con lluvias en verano. El clima templado subhúmedo con lluvias en verano se presenta en el centro norte donde se ubica el cerro el pajarito, así como en el suroeste. El clima semiseco cálido con lluvias en verano y escasas predomina en todo el año al igual que el clima semicálido con lluvias en verano. Tiene una temperatura media anual entre 18 y 22 grados centígrados y la del mes más frío es inferior a 18°C. Tiene el clima semiseco templado con lluvias en verano y escasas en el año, el verano es cálido (Fernández et al., 2020).

Edafología

La edafología de Zapotitlán Salinas es en mayor parte, suelos someros, pedregosos y muestran diferentes niveles de alcalinidad y salinidad, debido a la influencia de los diferentes substratos geológicos presentes en el sitio. Según se ha citado, las principales unidades de suelos litosoles, cambisoles, cálcicos y xerosoles cálcicos derivados de evaporitas del Cretácico inferior y Medio, siendo complementado con regosoles y fluvisoles calcáricos formados por materiales transportados, derivados de sedimentos aluviales (Paredes-Flores et al., 2007).

Vegetación

El municipio cuenta con comunidades vegetales como lo son el mezquital o selva baja perennifolia con espinas laterales (prevalencia de *Prosopis laevigata*); matorral espinoso (con *Mimosa luisana*, *Acacia farnesiana*, *Cordia curassavica* y *Fourquieria formosa*); la tetechera (con abundancia de *Neobuxbaumia tetetzo*), el cardonal (destaca *Cephalocereus columna-trajani*); el izotal (matorral con *Yucca periculosa*); chaparral (*Brahea nítida* y *Dasyllirion serratifolium*); la tetechera-candelillar (*Neobuxbaumia tetetzo* y *Euphorbia antisyphilitica*), la selva baja caducifolia (*Myrtillocactus geometrizans*, *Bursera schlechtendalii* y *Bursera*

aptera) (Paredes-Flores et al., 2007) (Figura 23). Al suroeste se presenta una franja de bosque de encino con vegetación secundaria arbustiva, además se presentan dos zonas de agricultura de riego, la ribera del Arroyo de Manzanas al suroeste y al extremo noreste dentro del Valle de Tehuacán (Fernández et al., 2020).



Figura 23. Vegetación y orografía de Zapotitlán Salinas.
Fotografía Original de Marco Aurelio Rodríguez Monroy.

Población

Según el último censo poblacional proporcionado por el INEGI en 2010, Zapotitlán Salinas tiene una población de 2,700 habitantes, siendo la cabecera municipal del Municipio (SCIM, 2013). Los habitantes de Zapotitlán realizan actividades como la agricultura, la recolección de leña y de plantas medicinales. Algunos pobladores se dedican a realizar artesanías de ónix, la extracción de sal, a la albañilería y a la industria textil (Paredes-Flores et al., 2007).

La magia de Zapotitlán

Zapotitlán tiene en sus entrañas lugares como las canteras de alabastro y sus salinas de los cuales se ha obtenido sal desde tiempos anteriores a la conquista. Según Sánchez (2010), las salinas llaman la atención por la ordenada disposición de las terrazas (nombrados parajes por los salineros), pero sobre todo por la suavidad de las tonalidades, que se tornan blanco lila, verde, amarillo y rosa, según el tiempo de exposición al sol. Los salineros levantan cada tres meses, tres cosechas distintas de sal; la sal de arrobas, la sal tierna y la sal de grano. Hace 60 millones de años el terreno accidentado y desértico de la zona, fue brazo de mar, lo que permite la extracción de sal. Esta es aprovechada durante la temporada de lluvias, el agua fluye por las montañas y llena los antiguos pozos y en los meses de marzo, abril y mayo, comienza el verdadero trabajo (Upchurch, 2019).

Zapotitlán Salinas tiene el Jardín Botánico “Helia Bravo-Hollins” (primera bióloga graduada en México), y cuenta con un vivero de cactáceas, que incluyen cerca de 53 especies de cactáceas endémicas y en peligro de extinción. Lo bonito de este jardín es que es considerado de tipo *in situ*, es decir, que no es un jardín que imite los ecosistemas de otros lugares para que las plantas puedan sobrevivir, puesto que muchas plantas se encuentran en su hábitat natural y actúa con la conservación del ecosistema y sus especies. Según el portal Aventura Vertical (2019), se puede pasear por el bosque de cactáceas y conocer diferentes especies, conocer el mirador, visitar el sotolín gigante y conocer el ambiente árido.

La parroquia de San Martín Obispo es de los templos más antiguos de la diócesis de Tehuacán (Figura 24). Tiene un estilo barroco y fue consagrada en 1578 siendo una de las parroquias más antiguas de la Diócesis de Tehuacán.



Figura 24. Interior de la Parroquia San Martín Obispo de Zapotitlán Salinas.
Fuente paseopormexico.com

Otros de sus atractivos es la cascada Tilapa, que cuenta con una altura de entre 2 y 5 metros y un ancho de 5 metros aproximadamente, incluso se encuentran formaciones rocosas con fósiles incrustados. Hablando de fósiles, en la zona está el Paleoparque Las Ventas A.C., que exhibe material paleontológico e incluye recorridos en las Canteras de ónix y la Capilla enterrada En Las Ventas. Museo Paleontológico, Santuario de Cactáceas Gigantes y Parque Ecoturístico Turritelas, cuentan con recorridos, por estos parques destacan huellas de dinosaurio que fueron localizadas por los habitantes (Figura 25). El Santuario de Cactáceas que cuenta con ejemplares de biznagas y otras cactáceas columnares (Secretaría de Puebla 2020).



Figura 25. Fotografía del Parque ecoturístico Turritelas. Fuente tudu.com.mx

Medicina tradicional

Los extractos de las plantas medicinales son utilizados por practicantes de la medicina tradicional para curar diversas enfermedades. La aceptación de estas se aplica como una alternativa de atención de la salud y la búsqueda de nuevos agentes antifúngicos a partir de plantas medicinales, ha tenido una importancia destacada (Wen et al., 2011). Estos medicamentos siguen representando una parte importante, que más de 100 países tienen regulaciones para las medicinas a base de hierbas, varían mucho dichas prácticas por factores como la cultura, historia, actitudes personales y la filosofía. Detrás de estas prácticas es necesario que exista una regulación basándonos en estudios profesionales de investigación sobre el manejo de estos productos (Pierre-Louis, 2014).

Los grupos humanos han creado una cultura en la que desarrollaron un sustento tanto alimenticio como medicinal, con relación al medio que los rodea. En muchas o en casi todas las culturas se ha transmitido estos saberes tradicionales, siendo éstos una riqueza única para muchas generaciones, y gracias a la vegetación que nos rodea, hemos podido erradicar un sinnúmero de malestares. Dolores de cabeza, dolores de cuerpo, dolores de estómago, malestares que si bien ya hay

medicamentos que sencillamente evitan tales molestias, nunca dejan de aparecer otras plantas que pueden proveer de los mismos beneficios sin ser tan corrosivas para la salud. Hoy en día cuantas personas no siguen atendiendo su salud por medio de hierbas, plantas o semillas, porque suele ser efectivo, confiable y barato. Bajo estos argumentos, no se propone perjudicar la facultad de un medicamento, si no argumentar que su distribución parece obsoleta en regiones con poco acceso a un sistema de salud integro que cubra todas sus necesidades medicinales, y muy pocas personas pueden pagar medicina. El capítulo de Pierre-Louis (2014) menciona que para los países es preocupante el consumo de medicina tradicional, y que la OMS busca regular estas adquisiciones. Si bien es necesario para evitar intoxicaciones por alguna mala dosis o mal manejo de la planta, también se debería considerar que es muy difícil reducir la práctica, porque ya es algo tan apegado a una cultura. Por otra parte, el aumento de las investigaciones tiene que representar un valor y una importancia relevante para recopilar los usos que se le puede dar a los principios activos que posee la planta. Descubrir nuevos compuestos activos tiene que ser un beneficio compartido, y se tiene que reconocer a la región que lo usa, las personas que lo usaron anticipadamente y el reconocimiento cultural que tienen en una o en varias regiones.

Estos principios activos nos pueden proporcionar información, como la de inhibir cepas de microorganismos que se han adaptado a viejos medicamentos, porque han adquirido una resistencia muy particular. No dejemos de lado que pueden tener un uso en tratamientos como la diabetes, que pueden tener principios que ayudan a combatir enfermedades de carácter pandémico, y sustancias cuyos componentes sean benéficos para la salud fisiológica y psicológica.

Capítulo VI. Fitoquímica, aplicación y análisis de métodos

Técnicas fitoquímicas para el estudio de *Prosopis laevigata*

El método científico

Resulta muy curioso pensar que el método científico muchas veces lo aplicamos sin ser conscientes en nuestra vida cotidiana. Un bebé, por ejemplo, siempre suele ser muy curioso con su entorno, observa un objeto, la visualiza en todos sus puntos, es posible que se haga preguntas, y si su hipótesis es que el objeto, tiene un sabor, lo llevara a su boca para en seguida comprobar su hipótesis, si este objeto definitivamente no tiene buen sabor, su conclusión será que no lo volverá a probar, de lo contrario, ha determinado un uso nuevo como saborearlo constantemente. El método científico particularmente en las ciencias naturales se basa principalmente en la observación empírica del mundo, lo más objetiva e imparcial posible, y en el uso adecuado de procesos como la deducción, la inducción y retención con el fin de generar y contrastar hipótesis y posteriormente modelos que nos permiten describir, explicar y modificar el mundo real

Los métodos deben ser la parte más importante de un escrito científico, porque proporciona la información esencial que permite al lector juzgar la validez de los resultados y conclusiones del estudio informado. En ellas se declara con precisión como se realiza el estudio y la justificación de las opciones metodológicas y las características del diseño de estudio (Figura 26). Esta información nos va a permitir dos cosas: el estudio va a poder ser replicado por otros investigadores, con el fin de evaluar la reproductibilidad de los resultados; los lectores pueden juzgar la validez de los resultados y conclusiones presentados (Azevedo et al., 2011).

La importancia del método científico en la investigación y como el progreso de la tecnología y su aplicación, afecta directamente al progreso en investigación científica. Empero es la mente del investigador, en último término, la que lleva a éste a la elección de unos u otros y al desarrollo de otros nuevos, que permitan que la ciencia vaya progresando. Otro factor importantísimo, y actualmente subestimado, es la necesidad de combinar métodos científicos de diferentes disciplinas, para generar interpretaciones más contenciosas y útiles de los resultados obtenidos (Ruiz-Villalba, 2005).

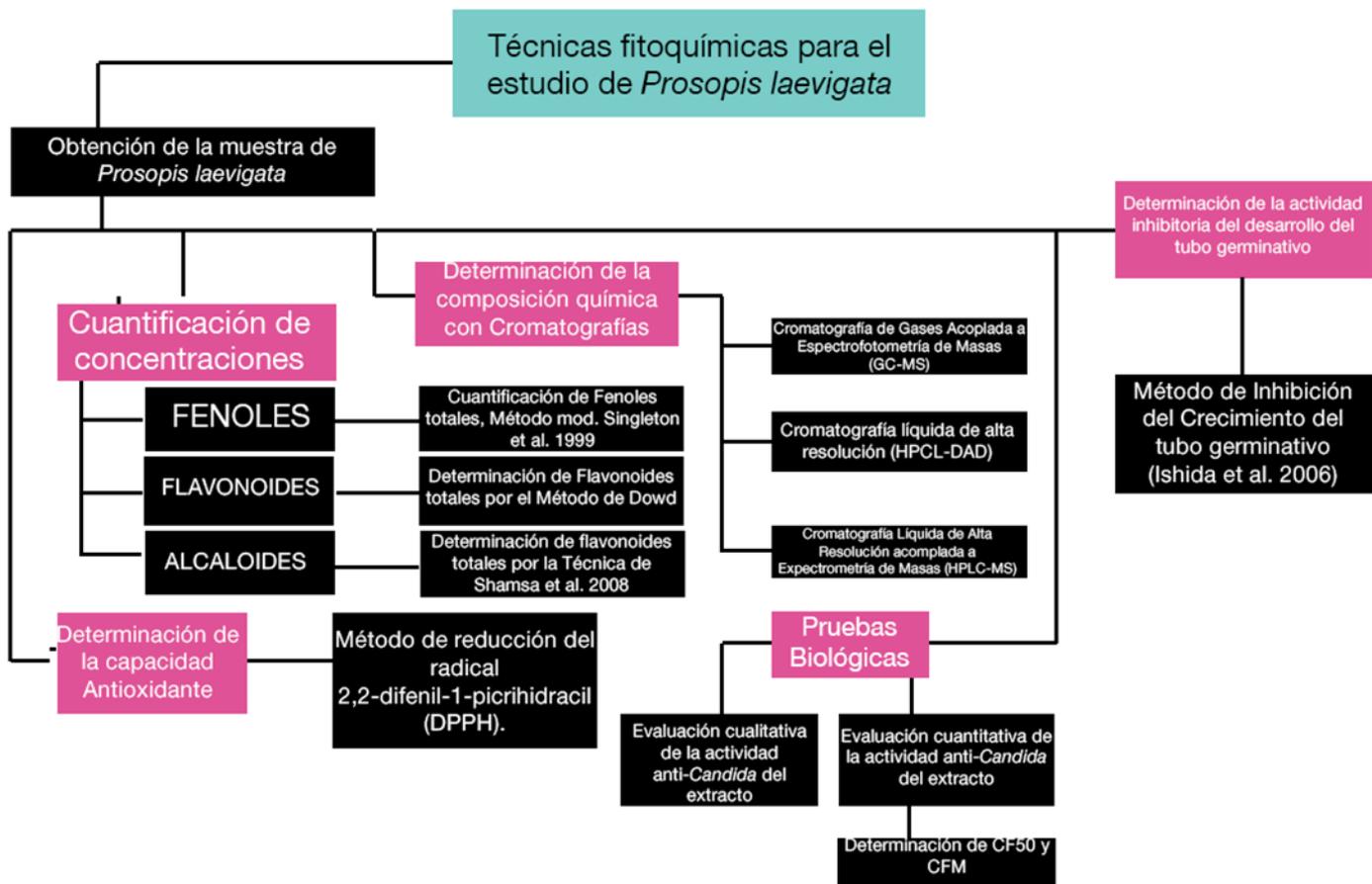


Figura 26. Ejemplo de un esquema metodológico para la elaboración de una investigación científica relacionada con las propiedades fitoquímicas de *Prosopis laevigata* y el estudio de su efecto antifúngico.

Cuantificación de fenoles totales (Método modificado de Singleton et al., 1999)

¿Cuáles son las razones de usar este método?

El reactivo de Folin-Ciocalteu (F-C) contiene sales de molibdeno y tungsteno que reaccionan con cualquier tipo de fenol formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico. La transferencia de electrones a pH básico transforma (reduce) los complejos fosfomolibdico-fosfotúngsticos en óxidos cromógenos de color azul intenso de tungsteno y molibdeno siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula. La coloración azul se puede determinar espectrofotométricamente a 760nm (Cortez et al., 2018).

Método

Los fenoles totales se miden por la reacción de óxido-reducción con el reactivo Folin Ciocalteu. Este reactivo tiene una coloración amarilla y pH ácido, contiene molibdato y tungstato sódico que puede reaccionar con cualquier tipo de fenol formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngsticos. La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngsticos. en óxidos de color azul intenso de tungsteno, siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de las moléculas.

Preparación del Extracto

Se pesan 5 mg de extracto metanólico y se diluyen en 1 mL de agua destilada, y de esta dilución se toman 500 μ L para agregar al tubo problema. Una vez agregadas las cantidades de ácido gálico a cada tubo, se añade agua destilada hasta llegar a un volumen de 8 mL y 500 μ L de reactivo Folin Ciocalteu a cada tubo. Después de cinco minutos se añaden 1.5 mL de una solución de Na_2CO_3 al 20% se deja reposar durante dos horas, tiempo en el cual todos los componentes reaccionan a temperatura ambiente y se lee la absorbancia a 760 nm (Cuadro 8).

Cuadro 8. Tabla con las cantidades utilizadas para la curva patrón de Ácido gálico

Tubo	Ácido gálico (mg/mL)	Patrón de ácido gálico (µL)	Agua destilada (µL)	Agua destilada (mL)	Folin Ciocalteau (µL)	Na ₂ CO ₃ (1 mL)
Blanco	-----	-----	-----	8	500	1.5
1	0.00625	31.5	968.75	7	500	1.5
2	0.0125	62.5	937.5	7	500	1.5
3	0.0250	125	875	7	500	1.5
4	0.05	250	750	7	500	1.5
5	0.1	500	500	7	500	1.5
6	0.2	1000	1000	7	500	1.5
Problema	-----	-----	500	7	500	1.5

Problema: Se pesan 5 mg de extracto y se disuelven en 1 mL de agua; de esta dilución se toman 500 µL.

Los resultados se interpretan con una gráfica de concentración contra la absorbancia para obtener una curva patrón de ácido gálico. Para conocer la concentración de fenoles del extracto problema, se utiliza un análisis de regresión lineal, interpolando la absorbancia de las muestras evaluadas. Los resultados se reportan como equivalentes de ácido gálico o en porcentaje.

Posibles resultados

- Nava (2017), encontró en el extracto metanólico de las flores de *P. laevigata* dos resultados para fenoles de dos diferentes colectas; febrero y marzo, determinando 61.00 mg eAG/g, y 488.00 mg eAG/g (equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto), respectivamente.
- Según Schmeda-Hirschmann et al. 2015, reportaron que las muestras de harina de *Prosopis chilensis* tiene un contenido de fenoles totales que va

desde 0.82 a 2.57 g equivalentes de ácido gálico/100 g de peso fresco harina.

- Cárdenas-Camacho (2017), obtuvo en su extracto etanólico, un total de 8.39 mg eAG/g extracto seco de fenoles totales de la planta *Prosopis pailida* y 3.69 mg eAG/g extracto seco de la vaina (pulpa).
- Gallegos-Peralta (2019), encontró 3 resultados de extracto acuoso de *Prosopis juliflora* en goma de algarrobo (de diferentes zonas), de 40.08 mg eAG/100 g (zona 1), 37.12 mg eAG/100 g (zona 2) y 18.49 mg eAG/100 g (zona 3).
- Botero et al. 2017, indica 36.53 g eAG/100 g de fenoles totales en goma de algarrobo (exudado gomoso), *Prosopis juliflora*.
- Moreno (2019), encontró en hojas *P. laevigata*, un total de 67 mg eAG/g de fenoles totales, de un extracto metanólico.

Ventajas o desventajas de la técnica

Una ventaja del ensayo de Folin es que este se asocia con la aparición de la absorbancia en lugar de con la disminución de absorbancia, aunque Folin-Ciocalteu no es específico de los polifenoles. De las ventajas principales del método es que su procedimiento está completamente estandarizado y su absorción a una longitud de onda larga minimiza las interferencias producidas por matrices alimentarias. Su principal desventaja es que no es aplicable en entornos lipófilos (López, 2016).

Técnicas Alternativas

Método de Price y Butler

Se fundamenta también en reacciones de oxidación-reducción. En el método de Price y Butler, también el ión fenolato es oxidado mientras que el ion férrico (Fe^{3+}) es reducido a ión ferroso (Fe^{2+}) que se detecta mediante la formación de un complejo azul con el reactivo ferricianuro de potasio. El complejo formado de fórmula $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ se conoce con el nombre de azul de Prusia (Ricco et al., 2015).

Se toman 250 μl del extracto y se le adicionan 25 ml de agua desionizada, seguido de 3 ml de cloruro férrico 0.1 M. Luego de 3 min se agregan 3 ml de ferricianuro de potasio 8 mM y se mezcla. Después de 15 min se lee la absorbancia a 720 nm.

El contenido de fenoles totales se expresa como equivalentes de ácido tánico (eAT mg ácido tánico / g material seco) o equivalentes de ácido gálico (eAG, mg ácido gálico /g material seco).El ensayo se estandariza con una solución madre de 0.01 M de ácido gálico (188µg/ml) (Price y Butler, 1977).

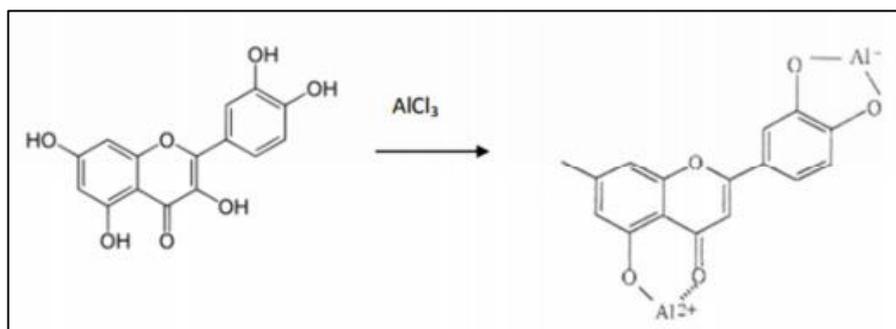
Determinación de Flavonoides totales por el Método Dowd (Ramamoorthy y Bono, 2007)

¿Cuáles son las razones de usar este método?

El método es reproducible, proporcionado desviaciones pequeñas o con ninguna diferencia entre una prueba y otra sobre la misma muestra. Es un método que utiliza pocos reactivos (Amaya y Portillo 2013).

Método

Se utiliza cloruro de aluminio para la determinación espectrofotométrica de la presencia de grupos químicos de flavonoides. El catión de aluminio forma complejos estables con flavonoides en metanol, que se producen en el análisis espectrofotométrico un desplazamiento hacia longitudes de onda mayores y una intensificación de la absorción. Así, es posible determinar la cantidad de flavonoides, evitando la interferencia de otras sustancias fenólicas que invariablemente acompañan a los flavonoides en los tejidos vegetales.



Al unirse el aluminio con el compuesto fenólico, el complejo es llamado quelato, que son compuestos orgánicos de origen natural o sintético, cuyas propiedades les permiten combinarse con un catión metálico al cual acomplejan, formando finalmente una estructura heterocíclica. Estos cationes son ligados en el centro de su molécula, esto hace que pierdan sus características iónicas. El quelato en su

papel protege al catión de posibles reacciones químicas como oxidación reducción, inmovilización, precipitación, entre otras.

1. Stock de quercetina

Se pesan 1 mg de quercetina, los cuales se disuelven en 1 mL de MeOH grado Absoluto.

2. Curva Patrón

Se toman alícuotas necesarias del Stock de quercetina para la preparación de la curva patrón, con las concentraciones de 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 ppm y se les agrega el MeOH para obtener un volumen de 1 mL, 1 mL de AlCl_3 al 2%.

3. Stock del Extracto

Se pesan 1 mg del extracto metanólico y se disuelven en 3 mL de MeOH grado absoluto.

4. Blanco

Se toma 1 mL de stock del extracto y 1 mL de MeOH grado absoluto

5. Problema

Se toma 1 mL del stock del extracto y se le agrega 1 mL de AlCl_3 al 2%. Se vierten 200 μL de las soluciones preparadas para la curva patrón, el problema, el blanco y el control negativo en una placa de ELISA, por triplicado. Después de 10 minutos de reacción a temperatura ambiente se determina la absorbancia a 415 nm.

6. Interpretación de resultados

Se grafica la concentración contra la absorbancia para obtener la curva patrón de quercetina. Para el problema, se realiza un análisis de regresión lineal y se interpola el promedio de la absorbancia de la muestra a evaluar. Los resultados se expresan como equivalente de quercetina/g de extracto.

Posibles resultados

- Nava (2017), encontró en el extracto metanólico de las flores de *P. laevigata* dos resultados para flavonoides de dos diferentes colectas;

febrero y marzo, determinando 0.364 y 23.2 mg eQ/g (equivalentes de Quercetina por gramo de extracto).

- Moreno (2019), encontró en hojas *P. laevigata*, un total de 2.6 mg eQ/g de flavonoides totales, del extracto metanólico.

Ventajas o desventajas de la técnica

El método colorimétrico de cloruro de aluminio es un método sencillo, económico y confiable (Bautista, 2011).

Técnicas alternativas

Los métodos (Cuadro 9), se basan en la formación de complejos coloreados entre los hidroxilos fenólicos y el grupo ceto de los flavonoides con el tricloruro de aluminio o el 2-aminoetil difenilborato (Ho et al., 2012). Curva de calibración: La curva de calibración se realiza con soluciones metanólica de rutina de 1000 mg/ml, 0.500 mg/ml, 0.250 mg/ml, 0.125 mg/ml, 0.0625 mg/ml. Con base a la técnica empleada, se utilizan las concentraciones que permitan una relación lineal entre la absorbancia y la concentración (Ricco et al., 2015).

Cuadro 9. Técnicas alternativas para determinación flavonoides, basándose en diferentes autores con el uso de diferentes técnicas.
Información de Ricco et al., 2015.

Método y autor	Técnica
Modificación de la técnica de Maksimovic et al., 2005	A 0.1 ml del extracto se le adicionan 1.4 ml de agua desionizada y 0.50 ml del reactivo de flavonoides (133 mg tricloruro de aluminio, 400 mg acetato de sodio en 100 ml de solvente constituido por 140 ml metanol, 50 ml agua, 10ml ácido acético). Luego de 5 min a temperatura ambiente, se mide la absorbancia a 430 nm. Se realiza una curva de calibración con rutina. El contenido de flavonoides se expresa como equivalentes de rutina (eR, mg rutina / g material seco)
Adaptación de las técnicas de Woisky y Salatino y Chang et al. (Woisky y Salatino, 1998; Chang et al., 2002)	0.5 ml del extracto se mezcla con 1.5 ml de etanol 95 %. Se agrega posteriormente 0.1 ml de una solución acuosa de tricloruro de aluminio al 10 % (p/v) y 0.1 ml de una solución acuosa 1 M de acetato de sodio. Se lleva a un volumen final de 5 ml con agua destilada y la mezcla se deja reposar por 30 min. Posteriormente se determina la absorbancia a 415 nm. Se realiza una curva de calibración con rutina. El contenido de flavonoides se expresa como equivalentes de rutina (eR, mg rutina / g material seco).

<p>Técnica de Shohael et al., 2006</p>	<p>A una alícuota del extracto se le adiciona 1.25ml de agua desionizada y 75 µl de una solución acuosa de NaNO₂ (5 % p/v). La mezclase agita con un mezclador de vórtice y se incuba a temperatura ambiente durante 6min. Luego se añade 150 µl de una solución acuosa de AlCl₃ (10 % p/v) y, después de 5min, se agrega 0,5 ml de una solución acuosa 1 M de NaOH y 2,5 ml de agua desionizada. Finalmente, la mezcla se incuba durante 30 min a temperatura ambiente y se mide la absorbancia a 510 nm utilizando metanol como blanco. Los valores se expresan como equivalentes de quercetina (eQ, mg de quercetina / g material seco) o como equivalentes de rutina (eR, mg rutina / lg material seco)</p>
<p>Adaptación de las técnicas de Jia et al., 1999 y Yoo et al., 2008.</p>	<p>Se agrega a 1 ml del extracto a analizar 4 ml de agua destilada y 0.3 ml de una solución acuosa de nitrito de sodio al 5 % (p/v). Luego de 5 min de reacción, se agregan 0.6 ml de una solución acuosa de tricloruro de aluminio al 10 % (p/v). Luego de 6 min, se agregan 2 ml de una solución acuosa 1 M de hidróxido de sodio y agua destilada hasta llegar a un volumen de 10ml. La mezcla es centrifugada a 3000 rpm durante 3 min, y la absorbancia del sobrenadante se mide a 510 nm. Se realiza una curva de calibración con quercetina. Los valores se expresan como equivalentes de quercetina (eQ, mg de quercetina / g material seco). Todas las mediciones se efectúan por triplicado.</p>
<p>Técnica adaptada de Hariri et al., 1991.</p>	<p>A 2 ml del extracto se mezcla con 100 µl de una solución metanólica al 1 % (p/v) del reactivo 2-aminoetil difenilborato. Luego de 20 min a temperatura ambiente, se determina la absorbancia a 404 nm. Los valores se expresan como equivalentes de rutina (eR, mg rutina / g material seco).</p>

Cuantificación de Alcaloides (Shamsa et al., 2008)

¿Cuáles son las razones de usar este método?

Este método es 16 sencillo, rápido, sensible, requiere de un espectrofotómetro de UV-Vis, el complejo obtenido es muy estable y es nula o escasa la interferencia por otros compuestos (Oropeza, 2012).

Técnica

Se basa, por un lado, en la reacción del verde de bromocresol, el colorante utilizado dentro de la técnica, para estabilizarse al momento de encontrarse en un medio ácido (entre 4 y 5 en la escala de pH). Cuando se encuentra en un medio de esa naturaleza, se torna azul al desprotonarse, se vuelve amarillo en el momento en que cae en un medio ácido. Por otro lado, la precipitación de los alcaloides en medios ácidos es muy importante, debido a que en el momento en que se encuentran en un medio ácido, tienden a precipitarse (este es el mismo

fundamento que las técnicas de detección cualitativa). Dentro de esta técnica, ambos principios se unen, ya que, a la hora de hacer lavados con cloroformo, este solvente es capaz de arrastrar los alcaloides acidificados, coloreados con el verde de bromocresol que, al caer en un medio ácido (es decir, el cloroformo con los alcaloides) se torna amarillento, siendo esto lo que se mide por espectrometría.

Preparación de reactivos

1. Verde de bromocresol

Se pesan 69.8 mg de verde de bromocresol, los cuales se disuelven en 3 mL de una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 2 N. Una vez disuelto el colorante, se añaden otros 5 mL de agua destilada.

Es necesario calentar un poco la mezcla con la finalidad de disolver bien el azul de bromocresol. Una vez disuelto perfectamente, se afora a un litro añadiendo agua destilada.

2. Buffer de fosfato (pH 4.7)

Para el buffer se requiere una solución 2 M de fosfato de sodio, la cual se prepara pesando 21.6 gramos de Na_2HPO_4 y se disuelven en un litro de agua destilada.

Para ajustar el pH a 4.7 se utiliza una solución de ácido cítrico en las proporciones de 42.02 g para un litro de solución. Con ayuda de un potenciómetro, se ajusta el pH de la solución hasta llegar a 4.7

Nota: En caso de observarse poca variación al añadir gotas de ácido cítrico, preparar una nueva solución más concentrada.

3. Estándar de atropina

Para realizar la curva patrón, se hace un stock de atropina en una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de agua destilada.

4. Stock del problema

En el caso del problema, se prepara un stock con la concentración de 2 mg/mL de agua destilada.

5. Preparación de la curva

Una vez que se han preparado los stocks de atropina y del problema, se procede a colocar en tubos de ensayo las siguientes cantidades:

Cuadro 10. Tabla de cantidades utilizadas para el stock de atropina

mL de stock de atropina	Atropina (mg)	Buffer fosfato (4.7 pH) mL	Verde de bromocresol (ml)
0.2	0.02	2.5	2.5
0.3	0.03	2.5	2.5
0.4	0.04	2.5	2.5
0.5	0.05	2.5	2.5
0.6	0.06	2.5	2.5
0.8	0.08	2.5	2.5
1.0	0.1	2.5	2.5

En el caso del problema, se toma una alícuota de 1.25 mL, que llevará una concentración de 2.5 mg del extracto.

***Lavados de cloroformo**

Para obtener los alcaloides a medir, es necesario realizar lavados con cloroformo. Para este efecto, se añaden secuencialmente 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mL. Con ayuda de un agitador automático, se mezcla perfectamente bien en cada lavado; el uso del agitador es necesario para asegurarse de que el cloroformo arrastre la mayor cantidad posible de alcaloides de la muestra. Una vez agitado, en el fondo del tubo se formará un precipitado amarillento, el cual debe recogerse con una pipeta Pasteur y trasladarse a otro tubo.

Nota: De preferencia, comenzar a recoger el precipitado después del segundo lavado.

6. Obtención e interpretación de resultados

Una vez obtenidos los lavados de cloroformo de las concentraciones de la curva patrón y del problema, se leen en un espectrofotómetro a 470 nm.

Para interpolar la muestra problema, se realiza un análisis de regresión lineal y se reporta como miligramos equivalentes de atropina por gramo de extracto.

Posibles resultados

- Nava (2017), encontró en el extracto metanólico de las flores de *P. laevigata* dos resultados para alcaloides de dos diferentes colectas; febrero y marzo, determinando 66.96666 y 67.39166667 mg e A/g (equivalentes de atropina por gramo de extracto), respectivamente.
- Moreno (2019), encontró en hojas de *P. laevigata*, un total de 11.87 mg e A/g de alcaloides totales, de un extracto metanólico.

Ventajas o desventajas de la técnica

Los métodos espectrofotométricos para la detección de alcaloides se basan en su mayoría en la formación de complejos coloridos a pH ácidos, sin embargo, la mayoría de los métodos reportados, presentan una gran cantidad de desventajas como; un rango de determinación estrecho, extracción y/o calentamiento previo, tiempos de reacción largos e inestabilidad del complejo formado. Sin embargo, suelen ser métodos sencillos, económicos y accesibles (Pérez y Campos, 2018).

Técnicas Alternativas

Los métodos que se emplean para determinar los alcaloides totales pueden ser, la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), la fluorimetría, la cromatografía iónica, la cromatografía de gases y la electrocromatografía. La mayoría de los métodos tienen la desventaja de emplear elevadas temperaturas para extraerlos, por lo que es necesario ampliar los tiempos para completar la reacción, o que el producto colorido es inestable (Shamsa et al., 2008).

Determinación de capacidad Antioxidante, Método de reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) (Okusa et al., 2007)

¿Cuáles son las razones de usar este método?

La estabilidad relativa de este radical se atribuye a la deslocalización del electrón desapareado, esta deslocalización también le otorga una coloración violeta

caracterizada por una banda de absorción, en disolución etanólica a 520 nm. Cuando una disolución de DPPH está en contacto con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno o con otra especie radical ($R\cdot$) se produce la forma reducida DPPH-H o DPPH-R con la consecuente pérdida del color y por lo tanto la disminución o pérdida de la absorbencia. El parámetro CA_{50} , que es la concentración necesaria para obtener un 50% de efecto, es generalmente usado para la interpretación de este método (Gutiérrez-Avella et al., 2008).

Método

El 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) es un radical libre, con un electrón desapareado que le da una coloración violeta y que no se dimeriza. Cuando el DPPH está en contacto con una sustancia que le puede donar un átomo de Hidrógeno, este se reduce, produciendo un cambio de color de violeta a amarillo coloración dado por el grupo picril (Molyneux, 2004). La actividad antioxidante se evalúa midiendo el grado de decoloración (desvanecimiento del color violeta intenso a amarillo claro), de una solución metanólica de 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) por la adición del compuesto activo a diferentes concentraciones (2-100 ppm). Stock del extracto. Se prepara una solución con 5 mg del extracto o fracción a evaluar y se disuelven en 5 mL de MeOH grado Absoluto. Las concentraciones para evaluar son 10, 20, 30, 50, 100, 200,300 y 500 ppm. Del Stock de extracto, se añaden 50 μ L a la placa de Elisa y 150 μ L de DPPH. En la misma placa, se utiliza el blanco de MeOH grado Absoluto y el DPPH disuelto en metanol, y de ambos se agregan 200 μ L.

1. Stock de Quercetina

Se agrega 1mg de Quercetina a 1mL de MeOH grado absoluto. En la placa de Elisa de Quercetina se utiliza como control positivo, en concentraciones de 1 ppm (1 μ g/mL) a 50 ppm (50 μ g/mL). Como blanco se usan 3 pozos con 200 μ L de MeOH grado Absoluto. Para las concentraciones de 1, 2, 3, 4 y 5 ppm hacer:

Del Stock (5 mg en 5 mL de MeOH) se toma 10 μ L y se adicionan 90 μ L de MeOH grado Absoluto. De este nuevo stock se tomarán las siguientes cantidades:

ppm	Quercetina Stock (μM)	MeOH
1	10	990
2	20	980
3	30	970
4	40	960
5	50	950

Del stock (5 mg en 5 mL de MeOH) tomar:

ppm	Quercetina Stock (μM)	MeOH
6	6	994
7	7	993
8	8	992
9	9	991
10	10	990
20	20	980
30	30	970
40	40	960
50	50	950

2. Aplicación de sustancias

En una placa de ELISA se adicionan 50 μL de la solución problema a diferentes concentraciones por triplicado, para agregar posteriormente 150 μL de la solución metanólica de DPPH. Inmediatamente se protege de la luz envolviendo con papel aluminio y se incuba durante 30 minutos a 37°C. Luego de incubar, se determina la absorbancia a 540 nm en un lector de ELISA.

3. Blanco

Se llena los pozos con 200 μ L de metanol

4. Interpretación de Resultados

Se reportan obteniendo el porcentaje de reducción, que se calcula con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Reducción de DPPH} = (C-E/C) * 100$$

Donde C= Absorbancia del DPPH disuelto en MeOH

E= Absorbancia experimental (Mezcla de DPPH (150 μ L) + solución problema (50 μ L)).

Posibles resultados

- Lakshmibai et al. 2015, menciona que el extracto etanólico de *Prosopis juliflora* presentó un 98% de inhibición de radicales libres por el método DPPH a una concentración de 50mg/mL.
- Cárdenas-Camacho (2017), presentó los resultados del ensayo de la actividad antioxidante por DPPH para el extracto etanólico de las hojas de *Prosopis pallida*, mostrando un CA₅₀ de 456.75 μ g/mL.
- Moreno (2019), mostró que el resultado de la prueba de capacidad antioxidante del extracto metanólico de hojas *P. laevigata* fue una CA₅₀= 334.87 μ g/mL.
- Nava (2017), determinó la capacidad antioxidante del extracto metanólico de las flores de *P. laevigata* de dos colectas de los meses de febrero y marzo obteniendo para el mes de marzo CA₅₀= 907.67 μ g/mL. El dato de febrero se obtuvo de la referencia de Castro, 2016, encontrando CA₅₀=591.38 μ g/mL.

Ventajas o desventajas de la técnica

El tiempo de medida necesario para realizar las medidas de DPPH dura de 30 a 60 minutos, en comparación con el método ABTS (1 minuto), supone una desventaja en su aplicación, en adición también al elevado coste de la DPPH. Debe señalarse que, a pesar de las diferencias metodológicas, los resultados

obtenidos con los métodos ABTS y DPPH permiten alcanzar conclusiones prácticamente similares (Kuskoski et al., 2005).

Técnicas Alternativas

Método ABTS

El radical ABTS se obtiene tras la reacción de ABTS (7 mM) con persulfato potásico (2.45 mM, concentración final) incubados a temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) y en la oscuridad durante 16 horas. Una vez formado el radical ABTS se diluye con etanol hasta obtener un valor de absorbancia comprendido entre 0,70 ($\pm 0,1$) a 754 nm (longitud de onda de máxima absorción). Las muestras filtradas (antocianos) se diluyen con etanol hasta que se produce una inhibición del 20 al 80%, en comparación con la absorbancia del blanco, tras añadir 20 μL de la muestra. A 980 μL de dilución del radical ABTS así generado se le determina la A_{754} a 30°C , se añade 20 μL de la muestra (dilución de antocianos) y se mide de nuevo la A_{754} pasado 1 minuto. La absorbancia se mide de forma continua transcurridos 7 minutos. El antioxidante sintético de referencia, Trolox, se ensaya a una concentración de 0-15 μM (concentración final) en etanol, en las mismas condiciones, lo que se hace también con ácido ascórbico (0-20 mg/100 mL). Los resultados se expresan en TEAC (actividad antioxidante equivalente a Trolox) y en VCEAC (actividad antioxidante equivalente a vitamina C), en este último caso por tratarse de alimentos (Re et al., 1999; Kuskoski et al., 2005).

Método DMPD

Este se basa en añadir 1 mL de la disolución de DMPD 100 mM a 100 mL de disolución tamponada con ácido acético/ acetato de sodio 0,1 M (pH 5,25). Tras la adición de 0,2 mL de una disolución de cloruro férrico 0,05 M (concentración final de 0,1 mM) se forman radicales cationes coloreados (DMPD). Un mililitro de esta disolución se traslada a una cubeta midiéndose su absorbancia, comprendida entre 0,90 ($\pm 0,1$), a 506 nm. Se añade 50 μL de una disolución patrón de antioxidante o de muestras diluidas y transcurridos diez minutos (a 25°C) se hace otra medida de absorbancia a 506 nm. La disolución tamponada de acetato se utiliza como blanco de referencia. Los resultados se expresan en TEAC, o sea, actividad equivalente a Trolox (en mM o μM) o bien en VCEAC, actividad

equivalente a vitamina C (mg/L o mg/100 g) (Fogliano et al., 1999; Kuskoski et al., 2005).

Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

¿Cuáles son las razones de usar este método?

Este método tiene capacidad para separar mezclas complejas, cuantificar e identificar analitos y determinar niveles de trazas de contaminación orgánica. GC/MS se puede usar tanto escaneo completo de MS como en modo de monitoreo de iones para cubrir una amplia gama de relaciones m/z o para recopilar datos para masas de interés específicas, respectivamente (ISASA, 2020).

Técnica

En cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por flujo de una fase móvil de un gas inerte y a diferencia de la mayoría de los tipos de cromatografía, la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito; su única función es transportar el analito a través de la columna.

El equipo utilizado es:

- a) Cromatógrafo de Gases modelo 6850 y un Espectrómetro de Masas Modelo 5975 C, marca Agilent Technologies.
- b) Columna RTX 30 m de largo por 0.25 mm de diámetro interno y 25 micras de película

Condiciones de corrida para las fracciones (método hexánico)

- Temperatura del inyector: 250°C
- Modo de inyección: Split
- Radio: 33.5:1
- Purga de flujo de Split: 29.9 mL/mn
- Flujo de corrida: 35cm/seg

Horno

- Temperatura inicial: 70°C
- Rampa de calentamiento: 15°C por minutos hasta 290°C, se mantiene 6 minutos
- Tiempo de corrida total: 26.67 minutos
- Línea de transferencia: 290°C

Detector del Espectrómetro de Masas:

- Método de adquisición de datos: Full Scan
- Rango de masas: 35-600 m/z
- Temperatura de la fuente del cuádruplo: 150°C
- Temperatura de la fuente de ionización: 230°C
- Impacto electrónico: energía de 70 eV

Posibles resultados

- Moreno (2019), encontró mediante GC-MS, un total de 7 compuestos en el extracto metanólico de las hojas de *P. laevigata*.
- Nava (2017), registro mediante GC-MS, del extracto metanólico de flores de *P. laevigata* un total de 5 compuestos para el mes de febrero, siendo estos alcoholes coniferílico, ácido palmítico, ácido linoleico, ácido linolénico, y palmitato de isopropilo. Para la colecta del mes de marzo, encontró 3 compuestos: ácido palmítico, ácido linoleico y 1,2-Benzisothiazol-3-amine tbdms.
- Zamora-Zamora et al. 2019, en la caracterización del aceite de semilla de *P. juliflora*, mediante GC-MS, encontró un total de 17 fitoesteroles.
- Khokar y Menghani (2016), encontraron mediante GC-MS un total de 15 compuestos, del extracto metanólico de la raíz de *Prosopis cineraria*.

Ventajas o desventajas de la técnica

Se trata de dos técnicas que trabajan en fase gaseosa y necesitan una muy pequeña cantidad de muestra para su análisis, por lo que son muy compatibles. El único obstáculo serio a la hora de realizar su acoplamiento es que el efluente

que emerge de la columna cromatográfica sale a presión atmosférica y debe introducirse en el interior del espectrómetro de masas que trabaja a alto vacío. Actualmente, el acoplamiento directo resulta fácil cuando se utiliza la cromatografía de gases capilar, que es el caso más habitual. En el caso de mezclas complejas, el cromatograma obtenido puede presentar muchos picos, algunos de ellos muy próximos, resultando difícil la identificación rápida y fiable de algún compuesto de interés. Cuando se desea explícitamente localizar la presencia de uno o varios compuestos determinados, de espectro conocido, con la mayor rapidez o con la máxima sensibilidad posible se recurre a la técnica de detección SIR ("selected ion recording") (Gutiérrez y Droguet, 2002).

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-DAD) (Gros et al., 1985; Mathews et al., 2002)

¿Cuáles son las razones de usar este método?

Este método es ampliamente utilizado para la separación, identificación, purificación y cuantificación de componentes de productos naturales (Gurib-Fakim, 2006). Es un tipo de cromatografía en columna, se utiliza para separar componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica.

Los elementos que participan en la interacción de un HPLC-DAD son la fase móvil, la fase estacionaria y la muestra.

En el HPLC-DAD el compuesto (muestra) pasa por la columna cromatográfica a través de la fase estacionaria, la cual presenta pequeñas partículas con ciertas características químicas en su superficie. La muestra pasa mediante el bombeo de líquido (fase móvil) a alta presión a través de la columna. La muestra analizada es introducida y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que se adelantan por la columna. El grado de retención de los componentes depende de la naturaleza del compuesto de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil. El tiempo que tarda un compuesto en ser eluído se denomina tiempo de retención y se considera una característica que identifica a un compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria. La utilización de presión en este tipo de cromatografía incrementa la velocidad lineal de los compuestos dentro de la

columna y reduce así su difusión dentro de la misma, mejorando la resolución de la cromatografía.

Los extractos que se analizan en el HPLC-DAD modelo Hewlett-Packard HP serie 1100 (Hewlett-Packard, Wilmington DE, USA) operado con ChemStation A0903 bajo los siguientes parámetros:

- Columna Discovery C-18 de 250 x 4.6 mm con un tamaño de película de 5 μm .
- Extracto metanólico: Se corre de forma isocrática con una mezcla de metanol-acetonitrilo-agua (25.25:50)
- Flujo: 1 mL/min
- Detector de arreglo de diodos (DAD)
- Longitud de onda de 260 nm, realizando un barrido completo de 200-400 nm.

Posibles resultados

- Moreno (2019), determino mediante HPLC-DAD, un total de 6 compuestos fenólicos, y catecol en el extracto metanólico de las hojas de *P. laevigata*
- Nava (2017), registro mediante HPLC, del extracto metanólico de flores de *P. laevigata* un total de 10 tipos de compuestos, de los cuales, 3 son fenil propanoide, 2 son isoflavonas, 1 favona, 1 flavonol, 1 ácido fénilico, 1 Dihidrochalcona y 1 flavanonol, para el mes de febrero. Para el mes de marzo, encontró un total de 9 tipos de compuestos: isoflavona, flavona, flavanona, 3-Antraquinona, antraquinona, fenantreno, hidroxycoumarina, rotenoide y flavonol.

Ventajas o desventajas de la técnica

La HPLC es capaz de separar macromoléculas y especies iónicas, productos naturales lábiles, materiales poliméricos y una gran variedad de otros grupos polifuncionales de alto peso molecular. Con una fase móvil líquida interactiva, otro

parámetro se encuentra disponible para la selectividad, en adición a una fase estacionaria activa. La HPLC ofrece una mayor variedad de fases estacionarias, lo que permite una mayor gama de estas interacciones selectivas y más posibilidades para la separación (Laboratorio de Técnicas Instrumentales, 2020). En HPLC, se emplean hasta 60 volúmenes de solventes, siendo una gran desventaja desde el punto de vista económico y ambiental, dados los altos costos de los solventes grado HPLC y los problemas inherentes al manejo de residuos químicos (Cala y Vásquez, 2008).

Técnicas alternativas

Electroforesis capilar

Es un método micro analítico, aplicable para el análisis de una amplia gama de compuestos, incluyendo productos naturales y metabolitos de la planta. CE proporciona ventajas en términos de velocidad, bajo costo y simplicidad. Se puede emplear como una excelente alternativa para análisis de sustancias fitoquímicas (Hiermann y Radl, 1998).

En la separación de los analitos se basa en las diferencias de las movilidades electroforéticas de los solutos iónicos que determinara la migración de los analitos a través del capilar bajo la acción del campo eléctrico aplicado, que ocasiona que lleguen al detector en tiempos diferentes. La movilidad electroforética de un soluto es función de su carga, de radio (suponiendo una geometría esférica) y de viscosidad del medio (Baker, 1995). Por tanto, a mayor carga y menor radio, mayor será su movilidad electroforética, siendo estos analitos los primeros en ser detectados. El medio en donde se realiza la separación es una solución buffer, característica para cada clase de analitos. En el caso de las catequinas, cuando el detector empleado es de absorción UV o UV-Vis, se busca un buffer de baja absorptividad molar para que la detección se realice de manera directa, es decir, por aumento de la señal cuando cada catequina pase por el detector, aprovechando que éstas tienen una absorptividad molar alta (Kuhn y Hoffstetter-Khun, 1993).

Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS) (Gros et al., 1985; Mathews et al., 2002)

¿Cuáles son las razones de usar este método?

Es un método analítico moderno utilizado para detectar y cuantificar sustancias en niveles de traza. Además de la detección de medicamentos o pesticidas, también se utiliza para la detección de micotoxinas. LC-MS/MS ofrece muchas ventajas: es muy sensible, eficiente y adecuado para varias aplicaciones. Además, se dispone de métodos multi-analitos, lo cual es de gran importancia especialmente para el análisis de micotoxinas (SCANCO, 2020).

Técnica

La cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS) facilita el análisis de muestras que tradicionalmente han sido difíciles de analizar por GC-MS, es decir, analitos poco volátiles. Como resultado, la técnica es ampliamente utilizada en el análisis de fármacos, proteínas, etcétera.

Los sistemas de ionización que han hecho posible este desarrollo son los sistemas API-EI y APCI. De esta forma se pueden analizar compuestos de peso molecular de hasta 100kDa, con un rango de polaridades que van desde analitos no polares hasta los muy polares.

La LC-MS (por sus siglas en inglés) combina el poder de separación de los materiales de gran peso molecular de la HPLC y la capacidad de detección selectiva y confirmación de la identidad molecular de la espectrometría de masas.

Aunque la LC-MS utiliza un sistema de HPLC, en el punto en que las fases móviles de líquidos abandonan la columna, la muestra líquida es rociada para producir microgotas, las cuales, al ser evaporadas rápidamente, liberan moléculas de analitos ionizadas que, a continuación, pueden separarse en el espectrómetro de masas.

Los espectros de masas obtenidos por HPLC-MS suelen ser más sencillos que los obtenidos en GC-MS debido a que el nivel de fragmentación de las moléculas es menor. El inconveniente de los espectros es que dependen parcialmente de los parámetros de ionización, que no pueden ser considerados como *huella dactilar* del compuesto, por lo que la comparación de espectros estándares no es posible.

Por esta razón, la comparación del espectro de masas de analitos con patrones debe realizarse en las mismas condiciones.

En el HPLC el compuesto (muestra) pasa por la columna cromatográfica a través de la fase estacionaria, la cual presentará pequeñas partículas con ciertas características químicas en su superficie. La muestra pasará mediante el bombeo del líquido (fase móvil) a alta presión a través de la columna. La muestra para analizar es introducida y sus componentes son retrasados dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que se adelantan por la columna. El grado de retención de los componentes de la muestra dependerá de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase móvil y de la fase estacionaria. El tiempo que tarda un compuesto en ser eluído de la columna se denomina *tiempo de retención* y se considera una propiedad característica que identifica a un compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria. La utilización de presión en este tipo de cromatografía incrementa la velocidad lineal de los compuestos dentro de la columna y reduce su difusión dentro de la misma, mejorando la resolución de la cromatografía.

El análisis de las muestras se puede realizar mediante perfiles cromatográficos en HPLC acoplado a un espectrómetro de masas, empleando un equipo Infinity Series 1200 (Agilent Technologist, Alemania) y de los cuales, la columna e inyector son modelo 1269 y la columna 1290; el espectrómetro de masas Agilent Technologies 6230 TOF. Para este fin, se utiliza una columna Kinetex 2.6u, C1800A (150 x 2.1 mm) (Phenomenex, USA) y una fase móvil en gradiente de dos líneas (A y B), donde A= Agua grado HPLC-Acetonitrilo (90:10) y B= Metanol grado HPLC-Atonitrilo (90:10). A ambas se les agregó 0.1% de ácido fórmico. El cromatograma se compara con los estándares.

Posibles resultados

- Moreno (2019), no identifico compuestos mediante HPLC-MS para el extracto metanólico de las hojas de *P. laevigata*.
- Nava (2017), registro mediante HPLC-MS, del extracto metanólico de flores de *P. laevigata*, compuestos como Vainillina, Ácido cafeico, Crisina y Acacetina en la colecta de febrero. Para la muestra de marzo, registró los compuestos de Pinocebrina, Apigenia, Naringenina y Quercetina.

Ventajas o desventajas de la técnica

Esta técnica proporciona unos resultados con una gran sensibilidad, especificidad, precisión y exactitud, difíciles de lograr con otras técnicas, todas ellas son las que habitualmente se exigen en las distintas técnicas analíticas con aplicaciones clínicas y forenses. Si bien la LC-MS no se puede considerar una técnica imprescindible en la determinación de los niveles de un fármaco o droga ya identificado, sí lo es cuando se requiere determinar pequeñas concentraciones de sustancias obviando los complicados y laboriosos procesos de derivatización (Quintela et al., 2004).

Evaluación cualitativa de la actividad anti-*Candida* del extracto

Para las levaduras se utilizan como control positivo sensidiscos impregnados con nistatina (25 µg por disco). Para el extracto los sensidiscos son impregnados con 4 mg. Como medio de cultivo se utiliza Agar Papa Dextrosa (PDA) y caldo Sabouraud. Las cajas se incuban a 36° C de 16-24 horas y se mide el diámetro del halo de inhibición (Cole,1994; Vanden Berghe y Vlietinck,1991; Beer y Sherwood,1945 y CLSI, 2012). Se registra el tamaño de halos de inhibición que se obtienen al interaccionar el extracto sobre varias cepas del género *Candida* con una concentración de 4mg/ sensidisco, usando como control positivo Nistatina a una concentración de 25 µg.

Para ver si hay diferencias entre el extracto y control positivo sobre cada cepa se realizan pruebas de t, donde se determinan las diferencias significativas ($P < 0.05$).

Evaluación cuantitativa de la actividad anti-*Candida* del extracto. Microtécnica de dilución en caldo (Koneman, 1996)

Preparación de reactivos y diluciones: se prepara una suspensión de microorganismos con un asa de siembra estéril tocando las superficies convexas de 4 o 5 colonias de los microorganismos a ensayar. Se sumerge el asa en 10 mL de caldo dextrosa Sabouraud (levaduras), se enjuaga bien el líquido para descargar todo el material y luego se retira el asa de siembra. Las disoluciones antimicrobianas de trabajo se preparan diluyendo el extracto de la planta en frascos con 10 mL de caldo dextrosa Sabouraud (según las concentraciones deseadas). Previamente el caldo se esteriliza en frascos con tapa de rosca, además de todo el material a emplear. Se coloca la cantidad necesaria del stock

del extracto para obtener la concentración requerida y de realizar las diluciones requeridas.

Inoculación e incubación de los frascos y tubos: se prepara un inóculo que contiene aproximadamente 1.5×10^8 UFC/mL (unidades formadoras de colonia/mL) ajustando la turbidez de un caldo de cultivo (estándar de turbidez: estándar 0,5 de MacFarland). De este inóculo, se hace una dilución en caldo Sabouraud, para obtener una concentración de 1 a 1.5×10^5 UFC/mL. Incubar los frascos a 37°C por 48 hrs. No se recomienda la incubación en atmósfera de CO₂ a menos que sea esencial para el desarrollo del microorganismo; pasado este tiempo se le añaden 50 µL de una solución de cloruro de tetrazolio al 0.08% a cada tubo, se incuba por 2 a 12 hrs a 37 °C, en los tubos donde se desarrolla el organismo, produciéndose un botón violeta en el fondo del tubo. Donde no hay desarrollo de levaduras la solución permanece clara.

Interpretación de resultados: la menor concentración de antimicrobiano que produce un descenso drástico del desarrollo visible representa la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). Una presencia colonial muy ligera o un pequeño botón de desarrollo se considera evidencia de que la sustancia ha sido capaz de inhibir por completo el desarrollo a esa concentración.

En aquellas cajas en donde se observa una nula progresión de la población de microorganismos (99.9 % de inhibición), se denomina en el caso de levaduras, Concentración Fúngica Mínima (CFM).

Actividad del extracto metanólico sobre el desarrollo del tubo germinativo de *Candida albicans* (Ishida et al., 2006)

Inóculo: Con un asa de siembra estéril se tocan las superficies convexas de 4 ó 5 colonias de *Candida albicans*.

Se sumerge el asa en 10 mL de caldo Sabouraud, se enjuaga bien el líquido para descargar todo el material y luego se retira el asa de siembra. Se incuba el tubo a 37° C durante aproximadamente 24 horas. Trascorrido este tiempo se hace un conteo con cámara de Neubauer, contando cada cuadrante para posteriormente hacer un promedio de los cuatro datos, este se multiplicará por el factor de la cámara el cual es de 10 000, el número resultante es la cantidad de células que

se encuentran en un mL y se ajusta para tener un número total de 50 000 células en 500 μ L, el cual es el volumen final.

El medio utilizado para que las levaduras puedan germinar es el Suero Fetal Bovino el cual es preparado y descomplementado. En tubos estériles de microcentrífuga de 1.5 mL se agregan 500 μ L del suero, así como las concentraciones determinadas para CFM, así como un testigo (tubo de microcentrífuga con suero fetal bovino y levadura) y un control negativo (tubo de microcentrífuga con suero fetal bovino, levadura y la máxima cantidad del solvente utilizado para disolver la muestra), es importante no usar DMSO como disolvente en esta prueba ya que ensayos realizados muestran que inhibe el desarrollo del tubo germinativo.

Se incuban de dos a tres horas a 37°C, transcurrido este tiempo se toma una muestra del tubo testigo de 10 μ L y se coloca en la cámara de Neubauer donde se buscará la presencia de crecimiento del tubo germinativo. Una vez crecido el tubo en el testigo se procede al conteo de las levaduras que no tuvieron crecimiento de este en los tubos con las diferentes concentraciones. Se reporta el porcentaje de inhibición por concentración.

Aportaciones

En este trabajo de investigación se incluyen las siguientes aportaciones para futuros trabajos relacionados con *Candida albicans* y *Prosopis laevigata*.

- Información genética de la proteína Als3 que funciona como molécula específica de la hifa para poder adherirse al huésped. Se incluye la secuencia del gen.
- Enunciados que describen el factor molecular β -1,3-glucano purificado (laminarina) como medio de inducción mediante una vacuna para inhibir la adhesina Als3.
- Detalles de los factores de enzimas degradativas, así como la isoenzima SAP2 y su principal caracterización genética como una de las proteínas más peligrosas de *C. albicans*. Se incluye la secuencia genética.
- Información específica relacionada con las proteínas implicadas en la formación de biopelículas, inductoras del tigmotropismo y las hidrolasas.
- Se incluyen datos recientes que detallan mediante gráficos de pastel, las enfermedades más comunes en México que implican a la cepa *C. albicans*, así como las frecuencias de diferentes especies del género *Candida* que provocan candidiasis.
- Se describe por completo la clasificación de los antifúngicos por su estructura química, y su mecanismo de acción. En el rubro de medicina antifúngica, se detallan los compuestos químicos que inhiben los factores específicos para la prevalencia de *C. albicans*, y la reacción que tienen con base al medio en el que actúan.
- Se expone una tabla con 22 medicamentos utilizados para infecciones por hongos, donde se menciona el laboratorio, el principio activo, la presentación, el gramaje y el precio expresado en pesos mexicanos para posteriores comparaciones. Todos clasificados por su estructura química.
- Se presenta una tabla con las reacciones adversas que puede sufrir un individuo que consuma medicamentos antifúngicos. En esta, se mencionan los síntomas, mediante una clasificación por su estructura química.

- Se incluye información relacionada con los diferentes mecanismos de resistencia de *C. albicans*, ante los medicamentos, clasificándola por su estructura química. Se incluyen argumentos genéticos que participan en estas resistencias, así como los efectos que derivan de las alteraciones químicas que inducen los medicamentos.
- El presente trabajo presenta información de la familia Fabaceae, el género *Prosopis* y la distribución a nivel mundial. Se muestra a detalle las características botánicas (tallos, hojas, inflorescencias y legumbres) de *Prosopis laevigata* y su distribución nacional e internacional.
- Se detallan los aspectos físicos y biológicos de Zapotitlán Salinas Puebla. El porte de fotografías que muestran la orografía y vegetación. Hay información de aspectos culturales importantes de Zapotitlán Salinas.
- Métodos que recientemente se han utilizado para el estudio fitoquímico, comprendiendo, además, técnicas alternativas que puede utilizarse para el mismo fin.
- Posibles resultados de las técnicas cuyo método está determinado por sustancias químicas, y aplicaciones de aparatos cromatográficos.

Discusión

C. albicans es de las cepas del género *Candida* más estudiado por las grandes capacidades que tienen para desarrollar una infección. Según Salas et al. 2000, *C. albicans* es la responsable del 60% de las candidiasis lo que puede ser factible, ya que, debido a esta investigación, se encontró que las infecciones más comunes son debido a la presencia de este hongo. Los factores de virulencia presentados en este trabajo fueron las adhesinas, invasinas, enzimas degradativas, formación de biopelículas, tigmotropismo, y las hidrolasas. El factor de virulencia más eficiente en la penetración de tejidos es la producción de hifas (Bykov, 1991). Debido a esto, el hongo tiene la capacidad de desarrollar tubo germinativo y micelio, por ende, es considerado de los factores de virulencia más importantes en este hongo (Richardson y Smith 1981). No obstante, a pesar de clasificarlo como lo más eficiente, estas hifas necesitan obligatoriamente de enzimas que favorecen la lisis de membranas que normalmente actúan como barreras

mecánicas (Bykov, 1991). Las hidrolasas secretadas por *C. albicans* más estudiadas son las aspartil proteasas, las fosfolipasas y las esterases, mientras que, según Valle et al. 2019, las lipasas son las menos estudiadas. Estas enzimas son importantes porque tendrían la función de facilitar la penetración activa en las células, participar en la digestión y síntesis de ésteres de lípidos y contribuir a la invasión del tejido al hidrolizar los componentes lipídicos de las membranas celulares del hospedador.

Los medicamentos utilizados contra antifúngicos, en gran medida son de tipo azoles (cuadro 3). Itraconazol y voriconazol tienen una actividad contra hongos filamentosos a diferencia de fluconazol, pero su espectro está fuera de los agentes de mucormicosis. Itraconazol y voriconazol son más activos sobre aislados de *Candida* no *albicans* con resistencia natural o adquirida a fluconazol. Si bien estos medicamentos son utilizados en infecciones por *C. albicans*, fluconazol ha sido validado en este escenario. En pacientes con aspergilosis invasora sólo voriconazol ha sido formalmente comparado contra amfotericina B y se dispone de una evidencia menos sustantiva (no comparativa) sobre itraconazol endovenoso en esta condición. En contraste, en pacientes oncológicos con episodios de neutropenia y fiebre, con sospecha de infección fúngica, sólo itraconazol endovenoso ha demostrado un rendimiento semejante a amfotericina B, lo que no pudo ser demostrado para voriconazol. Empero, el medicamento además de tener las cualidades para efectuar su mecanismo químico de acción también necesita involucrar aspectos relacionados con la frecuencia de administración, la dosis, efectos del pH gástrico, concentraciones estacionarias y los costos de adquisición, lo que significa que los efectos de los medicamentos dependen de quien los consume y sus posibilidades económicas. No se puede dejar de lado el hecho de que muchos pacientes, han generado resistencias, y no les funcionan algunos medicamentos. Los preparados parenterales de itraconazol y voriconazol no pueden ser administrados en pacientes con falla renal, por poner un ejemplo (Fica, 2004). Afortunadamente la investigación nos ha permitido encontrar otras alternativas, Schneider et al. 2018, informe por primera vez sobre las propiedades inhibitorias del crecimiento del medio condicionado de células madre de estroma cervical humano (hUCESC-CM) contra diferentes especies de *Candida*.

La resistencia microbiológica en términos generales se define como el crecimiento del microorganismo a dosis normales del antifúngico, pero puede ser inhibido a una concentración más alta (López-Ávila, 2016). El conocimiento de la sensibilidad a cada grupo de fármacos antifúngicos de la cepa de *Candida* spp., puede repercutir en la toma de decisiones con respecto al tratamiento y pronóstico. El estudio de vigilancia antifúngica Artemis DISK (1997 a 2003) menciona que en 10 especies, la resistencia al fluconazol se incrementó de manera notable: *C. albicans* de 0.8 a 1.5%, *C. tropicalis* de 3 a 6.6%, *C. parapsilosis* de 2 a 4.2%, *C. lusitaniae* de 1.6 a 6.6% y *C. kefyr* de 0 a 5.7%; en otras especies se ha mantenido durante 6.5 años (Torre-Saldaña et al., 2014). Según Manzano et al. 2008, en México, se ha observado un incremento importante en el número de pacientes con micosis que no responden a los tratamientos, lo que significa que puede deberse a resistencias esparcidas a nivel nacional.

La especie *Prosopis juliflora*, tiene propiedades bactericidas y fungicidas, además de ser usado en patologías como infecciones oculares, desórdenes estomacales, enfermedades de piel y heridas superficiales. La actividad antimicrobiana de la julifloricina, un alcaloide aislado de *P. juliflora*, ha sido demostrada en al menos 40 tipos de microorganismos que incluyen bacterias, hongos, virus y algunas especies del género *Candida* (Taisma, 2017). Asimismo, el extracto metanólico de *P. ruscifolia*, presenta actividad antifúngica sobre *Aspergillus* (Gómez et al., 2018). *Prosopis chilensis* por su parte, tiene un estudio que destaca su eficiencia sobre cepas de *Streptococcus*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumonia* y *Candida albicans* (Singh et al., 2011). *Prosopis cineraria* destaca sus usos en problemas del sistema circulatorio, anemia y problemas cardiacos (Hameed et al., 2011). El extracto metanólico de hojas de *P. laevigata* tiene actividad anti-*Candida*, efecto fungicida para *Candida tropicalis*, y efecto fungistático para *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. albicans* de caso clínico (Moreno, 2019). Asimismo, las flores de *P. laevigata*, son bactericidas y tienen actividad promedio sobre hongos filamentosos (Nava, 2017).

Los métodos propuestos en este trabajo se exponen en el capítulo V (Fitoquímica, aplicación y análisis de métodos), donde se derivan como antecedentes los posibles resultados de la aplicación en un estudio fitoquímico de algún miembro

del género *Prosopis*. Primero se analizó el método para la cuantificación de fenoles (Método modificado de Singleton et al., 1999), que implica el uso del reactivo Folin Ciocalteu. De los posibles resultados, todos utilizaron la técnica de Singleton, por lo que se concluye que hoy en día es una de las técnicas más factibles para su aplicación. El método Dowd (Ramamoorthy y Bono, 2007), resultó tener cinco métodos alternativos, pero no se encontraron antecedentes de su uso, aunque si hay antecedentes para el método Dowd. Por otra parte, el método para cuantificar alcaloides de Shamsa et al. 2008, no tuvo alternativas que hicieran uso de reactivos, si no de técnicas cromatográficas, cuya desventaja se basa en aplicar elevadas temperaturas para extraer alcaloides.

El método de reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH), tiene 2 métodos alternativos, método ABTS, y método DMPD. Según Kuskoski (2005), recomienda utilizar el radical ABTS, ya que es un método de elevada sensibilidad, práctico, rápido y sumamente estable. Esto quiere decir, que los métodos pueden ser reproducibles y coherentes.

No se encontraron técnicas alternativas para GC-MS, pero se encontraron mediante los antecedentes resultados favorables al utilizar este método en elementos botánicos del género *Prosopis*. Esta técnica no es recomendada para mezclas complejas donde predominen los compuestos que no sean volátiles (Gutierrez y Droquet, 2002). HPLC-DAD, cuenta con una técnica alternativa, que es electroforesis capilar. Se compara en el ámbito del costo, siendo HPLC más costoso (Cala y Vásquez, 2008), y electroforesis capilar barato, añadiendo términos de velocidad, bajo costo y simplicidad (Hierman y Radl, 1998). No se encontraron técnicas alternativas para HPLC-MS, con 2 antecedentes recientes. Tienen ventajas de aplicarse en técnicas analíticas clínicas y forenses.

Finalmente se explicaron en extensos antecedentes relacionados a la actividad antifúngica que presentaron especies del género *Prosopis*. La especie *Prosopis juliflora*, tiene propiedades bactericidas y fungicidas, además de ser usado en el tratamiento de enfermedades de piel y heridas superficiales. La actividad antimicrobiana ha sido demostrada en al menos 40 tipos de microorganismos que incluyen bacterias, hongos, virus y algunas especies del género *Candida*, (Taisma, 2017). El extracto metanólico de *P. ruscifolia*, presenta actividad antifúngica sobre *Aspergillus* (Gómez et al., 2018). *Prosopis chilensis* por su

parte, tiene un estudio que destaca su eficiencia sobre cepas de *Streptococcus*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumonia* y *Candida albicans* (Singh et al., 2010). El extracto metanólico de hojas de *P. laevigata* tiene actividad anti-*Candida*, efecto fungicida para *Candida tropicalis*, y efecto fungistático para *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. albicans* de caso clínico (Moreno, 2019). Asimismo, las flores de *P. laevigata*, son bactericidas y tienen actividad promedio sobre hongos filamentosos (Nava, 2017).

Conclusión

Todos los datos que se incluyen en esta tesina hacen evidente que el género *Prosopis* tiene especies que son usadas en la medicina tradicional, que de algunas de ellas se han realizado estudios científicos que aportan evidencia que estas especies sintetizan compuestos, que son los responsables de las propiedades etnomedicinales que se les asocian.

Es muy probable que el extracto metanólico de la especie *P. laevigata* tenga la propiedad de inhibir alguno de los factores de virulencia de *C. albicans*, como lo es el desarrollo del tubo germinativo.

Referencias

1. Allevalo, M. A., 2007. Sistemas terapéuticos transdérmicos. *Acta Terapéutica Dermatológica* 30, 154-166.
2. Amaya, L., Portillo, C., 2013. Determinación de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante en melaza, azúcar blanco y moreno en el ingenio Chaparrastique por el método de espectrofotometría ultravioleta-visible. Tesis de licenciatura. Universidad de El Salvador.
3. Azevedo, L. F., Canário-Almeida, F., Fonseca, J., Costa-Pereira, A., 2011. How to write a scientific paper-Writing the methods section. *Pulmonology* 17 (5), 232-238.
4. Baker, D. 1995. *Capillary electrophoresis*. New York. Ed. John Willey & Sons, INC.
5. Barros, S., 2010. El género *Prosopis*, valioso recurso forestal de las zonas áridas y semiáridas de América, Asia y África. *Ciencia e Investigación Forestal* 16 (1), 91-127.
6. Bautista, M. E. 2011. Análisis de flavonoides en plantas medicinales por electroforesis capilar y determinación de su actividad biológica. Tesis de Ingeniería. Instituto Politécnico Nacional.
7. Bedout, C., Gómez, B. L., 2010. *Candida* y candidiasis invasora: un reto continuo para su diagnóstico temprano. *Revista Infectio*. 14(S2), S159-S171.
8. Beer, E. y Sherwood, M., 1945. The paper-disc agar-plate method for assay of antibiotic substances. *Journal of Bacteriology*. 50 (4), 459-467.
9. Botero, C., Beltran, O., Rincon, F. y Reyes, L., 2017. Caracterización Físicoquímica de la goma de *Prosopis juliflora* (Cují). *Revista REDIELUZ*. 7(1), 100-105.
10. Brand, A., Shanks, S., Duncan, V. M., Yang, M., Machenzie, K., Gow, N. A., 2007. Hyphal orientation of *Candida albicans* is regulated by a calcium-dependent mechanism. *Current Biology* 17 (4), 347-352.
11. Bykov, V. L., 1991. Velocity of *Candida albicans* invasion into host tissues. *Mycosses* 34(7-8), 293-296.
12. Cabezón, V., Llama-Palacios, A., Nombela, C., Monteoliva, L. y Concha G., 2009. Analysis of *Candida albicans* plasma membrane proteome. *PROTEOMICS* 9 (20), 4770-4786.

13. Cala, M. P. y Vásquez, M. A. 2008. Estudio comparativo por electroforesis capilar y cromatografía líquida de alta eficiencia de catequinas extraídas de plantas de la familia Labiaceae, y determinación de su actividad antioxidante. Tesis de Licenciatura. Universidad Industrial de Santander, Facultad de ciencias.
14. Cárdenas-Camacho, C. 2017. Actividad antimicrobiana y antioxidante del extracto etanólico de *Prosopis pallida* "algarrobo". Tesis de Licenciatura. Universidad Mayor de San Marcos.
15. CENETEC. 2012. Diagnóstico y tratamiento de Candidiasis Invasiva en el Adulto. Secretaria de Salud. En <https://bit.ly/3hH66C8>, revisada el 29 de agosto de 2020
16. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2019. Candidiasis. Fungal Diseases. En <https://www.cdc.gov/fungal/diseases/candidiasis/index.html>, revisada el 29 de agosto del 2020.
17. Chang C. C., Yang M. H., Wen H. M., Chern J. C., 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis* 10 (3), 178-182.
18. CLSI., 2012. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for microbial susceptibility testing; twentieth informational supplement. Tech. Rep. M100-S22, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Pennsylvania, USA, 184 p.
19. Cole, M., 1994. Key antifungal, antibacterial and anti-insect assays-a critical review. *Biochemical Systematic and Ecology* 22(8), 837-856.
20. Copping V. M., Barelle C. J., Hube, B., Gow, N. R., Brown, A. J., Odds, F. C., 2005. Exposure of *Candida albicans* to antifungal agents affects expression of SAP2 and SAP9 secreted proteinase genes. *Journal Antimicrobial Chemother.* 55 (5), 645–54.
21. Cortez, J., Faicán, M., Pirovani, M., Piagentini, A. 2018. Determinación de polifenoles en frutas con vitamina C incorporada: Metodología para mejorar la especificidad del ensayo Folin-Ciocalteu. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha.* 19 (2), 148-158.

22. Corzo-León, D. E., Amstrong-James, D., Denning D. W., 2015. Burden of serious fungal infections in Mexico. Blackwell Verlag GmbH, Mycoses 58 (S5), 34–44.
23. Damiano, S., y Domenico, R., 2002. Inhibition of *Candida albicans* secreted aspartic protease by a novel series of peptidomimetics, also active on the HIV-1 protease. Biochemical and Biophysical Research Communications 279 (5), 1350-1353.
24. DATABIO. 2012. *Candida albicans*. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. En <https://www.insst.es/documents/94886/353749/Candida+albicans.pdf/807f3982-1e35-4c03-b626-a73873867028>, revisada el 29 de agosto del 2020
25. Diomedi, P. A., 2004. Nuevos antifúngicos: Las equinocandinas. Revista Chilena de Infectología 21 (2), 89-101
26. Fanning, S., Mitchel, A. P., 2012. Fungal Biofilms. PLoS Pathogens. 8 (4), e1002585. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002585>
27. Farmacias Especializadas (FESA), 2020. Medicamentos. En <https://www.farmaciasespecializadas.com/home> revisada el 10 de noviembre del 2020.
28. Fernández, M. J. R., Hernández, T. P., Enríquez, D. J., Contreras, V. G., Rojas, J. J. E., Sánchez, R. S. 2020. Enciclopedia de los Municipios y Delegaciones, Zapotitlán. En <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM21puebla/municipios/21209a.html> revisada el 25 de noviembre del 2020.
29. Fica, A., 2004. Tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas Primera parte: fluconazol, itraconazol y voriconazol. Revista Chilena de infectología, 21(1), 26-38.
30. Fogliano, V., Verde, V., Randazzo, G., Ritieni, A., 1999. Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. Journal of Agricultural and Food Chemistry 47 (3), 1035-1040.
31. Folliot, F. & Thames, J., 1983. Manual sobre la taxonomía de *Prosopis*, en México, Perú y Chile. Estados Unidos, Editorial FAO.

32. Fontana, M. L., Pérez, V. R., Luna, C. V., 2018. Características evolutivas en *Prosopis spp.*: citogenética, genética e hibridaciones. *Rodriguésia* 69(2), 409-421.
33. Frank A. T., Ramsook, C., Otoo, H., Tan, C., Soybelman, G., Rauceo, J., Gaur, N., Klotz, S., y Lipke, P., 2010. Structure and function of glycosylated tandem repeats from *Candida albicans* ALS adhesins. *Eukariot Cell* 9 (3), 405-414.
34. Fu, J., Ren, M., y Kreibich, G., 1997. Interactions among subunits of the oligosaccharyltransferase complex. *The Journal of biological chemistry* 272(47), 87-92.
35. Gallegos-Peralta, F. 2019. Análisis fisicoquímico y determinación del contenido fenólico total del exudado del árbol de algarrobo *Prosopis juliflora* (Fabaceae). Tesis de Licenciatura. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
36. Goienetxe, E., Garrido, S., Lizaso, T., 2008. Cap. 20 Dermatología y Alegría. En Libro electrónico de temas de urgencia. Navarra, España. ISBN: 978-84-690-6958-5
37. Gómez, A. A., Sampietro, D. A., Mandova, T., Grougnet, R., Kristsanida, M., y Vattuone, M., 2018. Compuestos antifúngicos en *Prosopis rusCIFolia*: identificación y análisis de su utilidad en el control de especies toxigenicas de *Aspergillus*. *Dominguezia*, 34 (2), 37-45.
38. Gregorí, B. S., 2005. Estructura y actividad de los antifúngicos. *Revista Cubana Farmacéutica* 39 (2), ISSN 1561-2988.
39. Gros, E. G., Pomilio A. B., Seldes, A. M., Burton, G. 1985. Introducción al estudio de los productos naturales. Estados Unidos, Washington D.C.
40. Gurib-Fakim, A. 2006, Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine* 27(1), 1-96.
41. Gutiérrez, M. C., y Droguet, M., 2002. La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor. En <https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099/2733/5CROMGASES.pdf> el 8 de diciembre del 2020.
42. Gutiérrez-Avella, D. M., Ortiz-García, C. A., Mendoza-Cisneros, A., 2008. Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para

alimentación animal. En
https://www.cenam.mx/simposio2008/sm_2008/memorias/M2/SM2008-M220-1108.pdf el 24 de enero del 2020.

43. Hameed, M., Ashraf, M., Al-Quriany, F., Nawaz, T., Ahmad, M. S. A., Younis, A., y Naz, N., 2011., Medical flora of cholistan desert: A review. *Pakistan Journal of Botany* 43, 39-50.
44. Hariri, B., Salle, G., Andary, C. 1991. Involvement of flavonoids in the resistance of two popular cultivars to mistletoe [*Viscum album* L.]. *Protoplasma*. 162, 20-26.
45. Hiemenz, J. W., y Walsh, J., 1996. Lipid formulations of amphotericin B: Recent progress and future directions. *Clinical Infection Diseases* 22 (2), 133-44.
46. Hiermann, A., y Radl, B., 1998. Analysis of aromatic plant acids by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography* 803 (1-2), 311-314.
47. Ho Y. C., Yu H. T., Su N. W., 2012. Re-examination of Chromogenic Quantitative Assay for Determining Flavonoid Content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (10), 2674-81.
48. Hoyer, L. L., Hecht, J. E., 2001. The ALS5 gene of *Candida albicans* and analysis of the Als5p N-terminal domain. *Journal Yeast* 18(1), 49-60.
49. Humani, A., y Ruiz, J. R. 2005. Determinación de la actividad antifúngica contra *Candida albicans* y *Aspergillus niger* de 10 plantas medicinales de 3 departamentos del Perú. Tesis Licenciatura Químico Farmacéutico. UNMSM, Facultad de Farmacia y Bioquímica. Perú.
50. ISASA. 2020. Cromatografía de gases GC-MS- ISASA Latam. n <http://www.isasalatam.com/cromatografia/gc-ms/> revisada el 15 de marzo del 2020
51. Ishida, K., Palazzo, J. C., García, D. A., Dias, B. P., Ueda, T. y Vataru, C., 2006. Influence of tannins from *Stryphnodendron adstringen* son growth and virulence factors of *Candida albicans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 58 (5), 942-949.
52. Jia Z. S., Tang M. C., Wu J. M., 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry* 64, 555-559.

53. Karkowska-Kuleta, J., Rapala-Kozik, M., y Kozik, A., 2009. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochimica Polonica* 56(2), 211-24.
54. Kely, R. M. D., Pierre, K. A., Salinas, E. G., 2011. Costo efectividad de Posaconazol versus Fluconazol/Itraconazol en el Tratamiento Profiláctico de las infecciones fúngicas invasivas en México. *Value in Health*. 14, 39-42.
55. Khokar, A., & Menghani, E., 2016. TLC and GC-MS analysis of Methanol extract of root of *Prosopis cineraria* from Jaipur, Rajasthan, India. *International Journal of Scientific & Engineering Research* 7 (6), 537-543.
56. Khun, R. & Hoffstetter-Khun, S. 1993. *Capillary electrophoresis: principles and practice*. Alemania. Editorial Springer.
57. Koneman, E. W., 1996. *Diagnóstico microbiológico*. México: Editorial Panamericana.
58. Kumamoto, C. A. 2008. Molecular mechanisms of mechanosensing and their roles in fungal contact sensing. *Nature Reviews Microbiology*. 6 (9), 667–673.
59. Kuskoski, E. M., Asuero, A., Troncoso, A., Mancini-Filho, J., Fett, R., 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 25 (4), 726-732.
60. Laboratorio de Técnicas Instrumentales Uva. 2020. Cromatografía de líquidos HPLC. En <https://laboratoriotecnicasinstrumentales.es/analisis-quimicos/cromatografa-de-liquidos-hplc> revisado el 15 de marzo del 2020.
61. Lakshibai, R., Amirtham, D., Radhika, S., 2015. Preliminary Phytochemical Analysis and Antioxidant Activities of *Prosopis juliflora* and *Mimosa pudica* Leaves. *International Journal of Scientific Engineering and Technology Research* 4(30), 5766-5770.
62. Lewis, G., Schrire, B. D., Mackinder, B. A., Rico, L., y Clarck, R., 2013. A 2013 linear sequence of legume genera set in a phylogenetic context – A tool for collections management and taxon sampling. *South African Journal of Botany* 89, 76-84.

63. Lim, CS-Y., Rosli, R., Seow, H. F., Chong, P. P., 2012. *Candida* and invasive candidiasis: back to basics. *Journal Clinical Microbiology Infection* 31(1), 21-31.
64. Liu, Y., & Filler, S. G., 2011. *Candida albicans* Als3, a multifuncional adhesin and invasión. *Eukaryotic cell* 10(2), 168-173.
65. Llamas, F. y Acedo, C., 2016. Las leguminosas (Leguminosae o Fabaceae): una síntesis de las clasificaciones, taxonomía y filogenia de la familia a lo largo del tiempo. *Ambiociencias* 14, 5-18.
66. López, F. R. 2016. Compuestos bioactivos en bebidas con capacidad antioxidante. Tesis de Doctorado. Universidad Complutense de Madrid.
67. López-Ávila, K., Dzul-Rosado, K. R., Lugo-Caballero, C., Arias-León, J. J., Zavala-Castro, J. E. 2016. Mecanismos de resistencia antifúngica de los azoles en *Candida albicans*. *Revista Biomédica* 27 (3), 127-136.
68. Lumbreras, C., Lizasoain, M., Aguado, J. M. 2003. Antifúngicos de uso sistémico. *Enfermedades infecciosas y Microbiología clínica* 21 (7), 366-382.
69. MacCallum D. M., Coste, A., Ischer, F. Jacobsen, M., Odds, F., Sanglard, D., 2010. Genetic dissection of azole resistance mechanisms in *Candida albicans* and their validation in a mouse model of disseminated infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54(4), 1476-1483.
70. MacCallum, D. M. 2012. Hosting infection: experimental models to assay *Candida* virulence. *International Journal of Microbiology* 2012. ID 363764.
71. Maksimovic, Z., Malencic, D., Kovacevic, N., 2005. Polyphenol contents and antioxidant activity of *Stigma maydis* extracts. *Bioreserch Technology*. 96 (8), 873-877.
72. Manzano, L. R. 2019. Estudio de utilización de antifúngicos restringidos den el Hospital Clínico de San Carlos. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Medicina.
73. Manzano, P., Méndez, L., Hernández, F., López, M., 2008. La resistencia a los antifúngicos: un problema emergente en México. *Gaceta Médica de México*. 144 (1), 23-26.
74. Mathews, C. K., Holde, K. E., Ahern, K. G., 2002. *Bioquímica*. 3a ed. España, Addison Wesley.

75. Mavor, A. L., Thewes, S., y Hube, B., 2005. Systemic fungal infections caused by *Candida* species: epidemiology, infection process and virulence attributes. *Current Drug Targets* 6(8), 863-874.
76. Mayer, L., Wilson, D., & Hube, B., 2013. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence* 4(2), 119-128.
77. McKeny, P. T., Nessel, A. T., y Zito, M. P., 2020. Antifungal Antibiotics. StatPearls Publishing LLC. Bookshelf ID: NBK538168PMID: 30844195
78. Molyneaux, P., 2004. The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science ad Technology* 26(2), 211-219.
79. Monroy-Pérez, E., Paniagua-Contreras, G., Vaca-Paniagua, F., Negrete-Abascal, E., y Vaca, S., 2013. SAP Expression in *Candida albicans* Strains Isolated from Mexican Patients with vaginal candidiasis. *International Journal of Clinical Medicine* 4 (1), 25-31.
80. Moreno, B. P. 2019. Evaluación de la actividad anti-*Candida* del extracto metánolico de las hojas de *Prosopis laevigata*. Tesis Licenciatura Biólogo. UNAM. FES Iztacala. México.
81. Naglik, J. R., Challacombe, S. J., Hube, B., 2003. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiology Molecular Biology* 67(3), 400-428.
82. Nava, S. U. 2017. Estudio comparativo de la actividad antimicrobiana de las flores de *Prosopis laevigata* (Humb. & Bonpl. Ex. Willd) M. C. Jhonst. Tesis Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Tlalnepantla. México.
83. Neil, A. R. G., Bernhard, H., 2012. Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. *Current Opinion in Microbiology* 15 (4), 406-412.
84. Niewerth, M., & Korting, H. C., 2002. Phospholipases of *Candida albicans*. *Mycoses* 44 (4-10), 361-367.
85. Nobile C. J., Nett, J. E., Hernday, A. D., Homann, O. R., Deneault, J. S., Nantel, A. 2009. Biofilm matrix regulation by *Candida albicans* Zap1. *PLoS Biology* 7 (6), <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000133>.

86. Nobile, C. J., Fox, E. P., Nett, J. E., Sorrells, T. R., Mitrovich, Q. M., Hernday, A. D., 2012. A recently evolved transcriptional network control biofilm development in *Candida albicans*. *Cell* 148 (1-2), 126-38.
87. Oh, S. H., Cheng, G., Nuessen, J. A., Jajko, R., Zhao, X., Pujol, C., Soll, D. R., Hoyer, L. L., 2005. Functional specificity of *Candida albicans* Als3p proteins and clade specificity of ALS3 alleles discriminated by the number of copies of the tandem repeat sequence in the central domain. *Microbiology* 151 (3), 673-681.
88. Okusa, P., Penge, O., Devleeschouwer, M., Duez, P., 2007. Direct and indirect antimicrobial effects and antioxidant activity of *Cordia gillettii* De Wild (Boraginaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 112 (3), 476-481.
89. Oropeza, M. 2012. Alcaloides totales y actividad antioxidante de extractos metanólico de hojas de *Ipomea murucoides* (casahuate). Tesis de Ingeniería. Universidad Tecnológica de la Mixteca.
90. Ortigoza-Medrano, E., y Arroyo-Espinosa, D., 2014. Susceptibilidad in vitro de las especies de *Candida* a los antifúngicos en el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional de Occidente. *Medicina Interna de México* 30 (4), 373-380.
91. Osorio-Lombana, J. P., Cuervo-Maldonado, S. I., López-Mora, M. J., y Gómez-Rincón, J. C., 2019. Prescripción inapropiada de antifúngicos y la necesidad de programas para su uso racional. *Revista Chilena de Infectología* 36 (4), ISSN 0716-1018.
92. Paniagua-Contreras, G. L., Monroy-Pérez, E., Pineda-Olvera, J., Negrete-Abascal, E., Vaca-Pacheco, S., 2010. Caracterizaciones genotípicas de cepas de *Candida albicans* aisladas de la mucosa oral y vaginal de pacientes no inmunocomprometidos. *Revista Medica del Hospital General* 73 (2), 94-101.
93. Paredes-Flores, M., Lira, S. R., Dávila, A. P. D., 2007. Estudio botánico de Zapotitlán Salinas, Puebla. *Acta botánica mexicana* 79, 13-61.
94. Pascual, N. 2017. ¿Qué determina el precio de los medicamentos? *La Vanguardia*. En <https://www.lavanguardia.com/economia/management/20170612/423350500536/que-determina-precio-medicamentos.html> revisada el 10 de noviembre del 2020.

95. Passera, C. B., 2000. Fisiología de *Prosopis spp.* Multequina 9(2), 53-80.
96. Pérez, J., y Campos, E., 2018. Alcaloides: ¿Qué son? Y ¿Cómo se determinan? Revista Mexicana de Industria y Salud. 1 (7), 23-30.
97. Perlin, D. S., 2007. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. Drug Resistance Updates 10 (3), 121-130.
98. Pfaller, M. A., 2012. Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for treatment. The American Journal of Medicine 125 (1), 3-13.
99. Pfaller, M. A., y Diekema, D. J., 2007. Epidemiology of Invasive Candidiasis: A Persistent Public Health Problem. Clinical Microbiology Reviews 20 (1), 133–163.
100. Phan, Q. T., Fratti, R. A., Prasadarao, N. V., Edwards, J. E., Filler, S. G., 2005. N-cadherin Mediates Endocytosis of *Candida albicans* by Endothelial Cells. Journal of Biological Chemistry 280 (11), 10455-10461.
101. Phan, Q. T., Myres, C. L., Fu, Y., Sheppard, D. C., Yeaman, M. R., Welch, W. H., 2007. Als3 is a *Candida albicans* invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells. PLoS Biology 5 (3), doi: 10.1371/journal.pbio.0050064
102. Pierre-Louis, L. MS, PhD. 2014. Part I – State of play and Review of Major Cooperation Initiatives. First edition. International Cooperation, Convergence and Harmonization of Pharmaceutical Regulations. Pages, 7-170. Estados Unidos. Academic Press.
103. Pietrella, D., Rachini, A., Pandey, N., Schild, L., Netea, M. Bistoni, F. Hube, B. y Vecchiarelli, A., 2010. The inflammatory response induced by aspartic proteases of *Candida albicans* is independent of proteolytic activity. Infection and Immunity 78 (11), 4754-4762.
104. Ponton, J., 2009. La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. Revista Iberoamericana de Micología 25 (2), 78-82.
105. Price M. L., Butler L. G., 1977. Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. Journal of Agricultural and Food Chemistry 25 (6), 1268-1273.
106. Quintela, O., Cruz, A., Concheiro, M., De Castro, A., y López-Rivadulla, M., 2004. Metodología LC-MS. Aspectos generales de la técnica y sus aplicaciones en el campo de la toxicología. Revista de Toxicología 22, 7-14.

107. Ramamoorthy, P., Bono, A., 2007. Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of *Morinda citrifolia* fruit extracts from various extraction processes. *Journal of Engineering Science and Technology* 2(1), 70-80.
108. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine* 26 (9/10), 1231-1237.
109. Revankar, S. G. 2019. Fármacos antimicóticos. Manual MSD. En <https://www.msdmanuals.com/es-mx/professional/enfermedades-infecciosas/hongos/f%C3%A1rmacos-antimic%C3%B3ticos> revisada el 11 de noviembre del 2020.
110. Reyes-Montes, M. R., Duarte-Escalante, E., Martínez-Herrera, E., Acosta-Altamirano, G., y Fías-De León, M. G., 2017. Currents status of the etiology of candidiasis in México. *Revista Iberoamericana de Micología* 34 (4), 203-210.
111. Ricco, R., Ignacio, J., Agudelo, I., Wagner, M., 2015. Métodos empleados en el análisis de los polifenoles en un laboratorio de baja complejidad. *Lilloa* 52 (2), 161-174.
112. Richardson, M. D., Smith, H., 1981. Production of germ tubes by virulent and attenuated strains of *Candida albicans*. *Journal Infection Diseases*. 144 (6), 565- 569.
113. Robbins, N., Uppuluri, P., Nett, J., Rajendran, R., Ramage, G., López-Ribot, J. L. 2011. Hsp90 Governs Dispersion and Drug Resistance of Fungal Biofilms. *PLoS Pathog* 7 (9), <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002257>.
114. Rodríguez, N., Vélez, C., Castro, N., 2012. Factores de virulencia para la infección de tejidos queratinizados por *Candida albicans* y hongos dermatofitos 26 (1), 0120-8705.
115. Rodríguez-Sauceda, E. N., Rojo, E. G., Ramírez-Valverde, B., Martínez, R., Cong, M., Medina, S. M., Piña, H. H., 2014. Análisis técnico del árbol del Mezquite (*Prosopis laevigata* Humb. & Bonpl. ex Willd.) en México. *Ra Ximhai* 10 (3), 1665-0441.
116. Ruiz-Villalba, A. 2005. La importancia del método científico. En https://www.researchgate.net/publication/28096775_La_importancia_del_m_etodo_cientifico revisado el 3 de marzo del 2021.

117. Sádaba, B., García-Quetglas, E. y Aranza, J. R., 2004. Relación entre estructura y función en los azoles. *Revista española de Quimioterapia* 17 (1), 71-78.
118. Salas, I., García, J., Miranda, K., 2000. Factores de virulencia en cepas *Candida albicans*. *Revista Costarricense de Ciencias Médicas* 21 (1-2), 0253-2948.
119. Sánchez, L. E., 2020. Zapotitlán Salinas. Wiki Puebla. En <http://www.wikipuebla.poblanerias.com/zapotitlan-salinas/> revisado el 15 de diciembre del 2020.
120. Sánchez-Hernández, J. A., González-Belén, L., Rojas-Valderrama, K., Muñoz-Zurita, G., 2017. Prevalencia de *Candida albicans* y su relación con cambios en el pH vaginal. *Atención Familiar* 24 (1), 18-22.
121. SCANCO. 2019. LC-MS/MS: Método de elección para un eficiente análisis de múltiples micotoxinas. En <https://scancotec.com/blog/lc-ms-ms-analisis-de-micotoxinas/> revisado el 15 de marzo del 2020
122. Schaller, M., Borelli, C., Korting, H., & Hube, B., 2005. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses* 48 (6), 365-377.
123. Schmeda, H., Quispe, C., Soriano, M. P., Theoduloz, C., Jimenez-Aspée, F., Pérez, M., Cuello, A. S., Isla, M. I., 2015. Chilean *Prosopis* mesocarp flour: phenolic profiling and antioxidant activity. *Molecules* 20 (4), 7017-7033.
124. Schneider, J., Mateo, E., Marcos-Arias, C., Eiro, N., Vizoso, F., Pérez-Fernández, R., Eraso, E., Quindos, G., 2018. Antifungal Activity of the Human Uterine Cervical Stem Cells Conditioned Medium (hUCESC-CM) Against *Candida albicans* and Other Medically Relevant Species of *Candida*. *Frontiers in Microbiology* 9 (281), 1-8.
125. SCIM. 2013. Unidad de Microregiones, Zapotitlán. En <http://www.microrregiones.gob.mx/zap/datGenerales.aspx?entra=nacion&ent=21&mun=209> consultado el 25 de noviembre del 2020.
126. Secretaría de Puebla. 2020. Puebla el Patrimonio de México; Actividades de Zapotitlán Salinas. En <http://visitpuebla.mx/actividades/?place=zapotitlan-salinas> consultado el 25 de noviembre de 2020.
127. Shamsa, F., Monsef, H., Ghamooshi, R. y Verdian-rizi, M., 2008. Spectrophotometric determination of total alkaloids in some Iranian medicinal plants. *Thai Journal Pharmacology Science* 32, 17-20.

128. Shawn, R., Lockhart, P., 2014. Current Epidemiology of *Candida* Infection. *Clinical Microbiology Newsletter* 36 (17), 131-136.
129. Shohael A. M., Ali M. B., Yu K. W., Hahn E. J., PaekK. Y., 2006. Effect of temperature on secondary metabolites production and antioxidant enzyme activities in *Eleutherococcus senticosus* somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 85(2), 219-228.
130. Singh S. y S.K.V. Swapnil., 2011. Antibacterial properties of alkaloid rich fractions obtained from various parts of *Prosopis juliflora*. *International Journal Of Pharmaceutical Sciences and Research* 2 (3), 114-120.
131. Singleton, V., Orthofer, R. and Lamuela-Reventós, R., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology* 299, 152-178.
132. Spampinato, C. y Leonardi, D., 2013. *Candida* infections, Causes, Targets, and resistance mechanisms: Traditional and alternative antifungal agents. *BioMed Research International* 2013, <https://doi.org/10.1155/2013/204237>.
133. Spellberg, B. J., Ibrahim, A. S., Avanesian, V., Fu, Y., Myers. C., Phan, Q., Filler, S. Yeaman, M. Edwards, J., 2006. Efficacy of the Anti-*Candida* rAls3p-N or rAls1p-N Vaccines against Disseminated and Mucosal Candidiasis. *The Journal of Infectious Diseases* 194 (2), 256-260.
134. Taff, H. T., Nett, J. E., Zarnowski, R. Ross, K. M., Sanchez, H., Cain, M. T., 2012. A *Candida* biofilm-induced pathway for matrix glucan delivery: implications for drug resistance. *PLoS Pathog* 8(8), <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002848>.
135. Taisma, M. A., 2017. Usos medicinales de *Prosopis juliflora* (Sw.) DC. en comunidades rurales de la península de Paraguaná, Venezuela. *Revista Peruana de Biología* 24 (1), ISSN 1727-9933
136. Thomson, D. D., Berman, J., y Brand, A., 2016. High frame-rate resolution of cell division during *Candida albicans* filamentation. *Fungal Genetic Biology* 88, 54-58.
137. Torosantucci A., Chiani, P., Bromuro, C., Bernardis, F., Palma, A., Liu, Y., Mignogna, G., Maras, B., Colone, M., Stringaro, A., Zamboni, S., Feizi, T., Cassone, A., 2009. Protection by anti-beta-glucan antibodies is associated with restricted beta-1,3 glucan binding specificity and inhibition of fungal growth and adherence. *PLoS One*. 4(4), doi: 10.1371/journal.pone.0005392.

138. Torosantucci, A., Bromuro, C., Chiani, P., Bernardis, F., Berti, F., Galli, C., Norelli, F., Bellucci, C., Polonelli, L., Costantino, P., Rappuoli, R., Cassone, A., 2005. A novel glyco-conjugate vaccine against fungal pathogens. *The Journal of Experimental medicine* 202 (5), 597–606.
139. Torre-Saldaña, V., Martínez-Velásquez, M., Reséndiz-Sánchez, J., 2014. Risk factors and Epidemiology of candidemia at Hospital Juárez de México. *Medicina Interna de México* 30, 121-132.
140. Turnidge, J., Paterson, D. L., 2007. Setting and revisiting antibacterial susceptibility breackpoints. *Clinical Microbiology Reviews* 30 (3), 391-408.
141. Upchurch, E. 2019. Zapotitlán Salinas, donde nace el “oro blanco”. En <https://travesiasdigital.com/mexico/zapotitlan-salinas-en-puebla> consultado el 25 de noviembre de 2020.
142. Uppuluri, P. Chaturvedi, A. K., Srinivansan, A., Banerjee, M., Ramasubramaniam, A. K., Köhler, J. R., 2010. Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle. *PLoS Pathogens* 6 (3), <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000828>.
143. Valle, G., Azcurra, A., Sotomayor, C., 2019. Lipasas de especies *Candida*: una revisión sobre aspectos bioquímicos moleculares y patógenos. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas de Córdoba* 76(2), 107-112.
144. Vanden Berghe, D. A. and Vlietinck, A. J. 1991. Screening methods for antibacterial agents from higher plants. En: *Methods in plant biochemistry*. Vol. 6 "Assays for Bioactivity". Hostettmann, K. Series editor Dey, P. M. Academic Press. New York, USA. p 47-71.
145. Velazco, G., Ortiz, R., Arellano, L., Bustillos, L., y Gónzales, A., 2009. Evidencia microscópica de la presencia de *Candida albicans* en bases protésicas retiradas de la cavidad bucal. *Revista Cubana de Estomatología* 46 (2), ISSN 1561-297.
146. Wächtler, B., Citiulo, F., Jablonowsky, N., Förster, S., Dalle, F., Schaller, M. 2012. *Candida albicans*-epithelial interactions: dissecting the roles of active penetration, induced endocytosis and host factors on the infection process. *PLoS One* 7 (5), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036952>.
147. Wen, L., Haddad, M., Fernández, I., Ezpinoza G., Ruiz, C., Neyra, E., Bustamante, B., y Rojas, R., 2011. Actividad antifúngica de cuatro plantas en la medicina tradicional peruana. Aislamiento de 3´Formil-2´,4´6´-

- Trihidroxidihidrochalcona principio activo de *Psidium acutangulum*. Revistas Sociedad Química Perú 77(3), ISSN 1810-634.
148. Woisky, R. G., Salatino, A., 1998. Analysis of propolis: some parameters and procedures chemical quality control. Journal of Apicultural Research. 37 (2), 99-105.
 149. Xie, Z., Thomson, A., Sobue, T., Kashleva, H., Xu, H., Vasilakos, J., 2012. *Candida albicans* biofilms do not trigger reactive oxygen species and evade neutrophil killing. The Journal of Infectious Diseases 206 (12), 1936-1945.
 150. Yapar, N., 2013. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. Therapeutics and Clinical Risk Management 2014 (10) 95–105.
 151. Yoo K. M., Lee C. H., Lee H. G., Moon B. K., Lee C. Y., 2008. Relative antioxidant and cytoprotective activities of common herbs. Food Chemistry 106 (3), 929-936.
 152. Zamora-Zamora, T., Bello-Alarcón, A., Villavicencio-Velásquez, M., 2019. Caracterización del aceite de semilla de la especie *Prosopis juliflora* ecuatoriana. Revista Ciencia Unemi 12 (13), 30-39.