



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN

Evaluación del efecto antimicótico de  
*Brickellia veronicaefolia* HBK (Gray)  
“PEXTO”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA  
P R E S E N T A:  
MITZELI RODRÍGUEZ RAMÍREZ

ASESOR DE TESIS:  
DR. JOSÉ GUILLERMO PENIERES CARRILLO

COASESORES DE TESIS:  
MICROB. AMPARO LONDOÑO OROZCO  
DR. TONATIUH ALEJANDRO CRUZ SANCHEZ



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.

Agradezco a las personas e instituciones que a continuación mencionaré, ya que sin ellas, no hubiera sido posible la realización del presente trabajo.

Para mi casa, la Universidad Nacional Autónoma de México

Para mi segundo hogar, la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

A la DGAPA-UNAM a través del proyecto PAPIIT IN211008.

A la Secretaría de Educación Pública, por su apoyo con el FORTALECIMIENTO DEL PROGRAMA DE BECAS.

Al Señor Draucin Jiménez Celi, del Taller de vidrio de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán-UNAM, Campo 1, por el apoyo brindado en la construcción y reparación de material de vidrio utilizado en el presente trabajo.

Al cDr. Hulme Ríos Guerra, por el apoyo en el manejo del equipo de Resonancia Magnética Nuclear de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán-UNAM.

A los sinodales, por cada uno de sus consejos y observaciones que realizaron a este trabajo, y así, enriquecerlo más.

Dr. José Guillermo Penieres Carrillo  
Q.F.B. Lis Antonio Martínez Arellano  
D. Benjamín Velasco Bejarano

Da. Alma Lucila Núñez del Arco  
M. en C. Ma. Guadalupe Avilés Robles

A mis tutores, por todo su interés, paciencia, motivación, confianza, amistad y apoyo  
brindado a lo largo de este proceso, Gracias.

Microb. Amparo Londoño Orozco  
Dr. José Guillermo Penieres Carrillo  
Dr. Tonatiuh Alejandro Cruz Sánchez

A todos los que trabajan en el en el laboratorio L-121, de la Sección de Química Orgánica,  
en especial a Lalo, Angélica y Abraham, por su compañerismo, amistad y sus enseñanzas.

A todos los que trabajan en el laboratorio 6 de Microbiología de la Unidad de Investigación  
Multidisciplinaria de Campo 4, en especial a Eli, Ary, Israel y Lupita.

Dedico el presente trabajo a todas las personas que han estado en mi vida y me brindaron su amor y comprensión, en especial:

A mis papas Lupita y Rubén por darme la vida, por su paciencia, amor, apoyo, comprensión, consejos; por estar a mi lado y motivarme a levantarme cada vez que me sentía vencida y gracias a mi infancia sé que a pesar de lo difícil que sea la vida, no significa que sea imposible seguir disfrutando de ella y siempre con actitud de ser humilde, responsable, honesta, respetuosa, constante y persistente para dar lo mejor y todo de mí.  
Son los papas más buenos del mundo. Los quiero mucho.

A mis hermanos Rubí Yamilet, Lupita y Rubén por su paciencia y llenar mi vida de alegrías, sonrisas, de momentos divertidos y por enseñarme a aceptar mis errores, bueno... aún sigo trabajando en eso ¡¡¡. Los quiero mucho.

A mis abuelitos Rebeca y Jaime por su infinito amor, por apoyarme y escucharme a lo largo de toda mi vida, por confiar y creer en mí. Por guiarme a salir adelante, los admiro y los quiero mucho.

Para el amor de mi vida, por estar siempre a mi lado y permitirme ser parte de tu vida, por todas las alegrías, tristezas y quererme como soy con todos mis defectos y virtudes, porque siempre procuras que nada me falte, me has visto crecer, me has escuchado decir muchas veces ya no más pero con tu inmenso amor y motivación me das fuerzas para levantarme en los momentos amargos y hacerme recordar que hay fe y esperanza de que todo va a salir bien. Por lo maravilloso que eres. Te amo Saúl.

Para la Sra. Araceli, Gaby, Lalo y Don Roge por dejarme entrar en sus corazones, por su apoyo y sus sabios consejos. Para ustedes con mucho cariño.

A mis amigas, Nora, Cinthia, Belem y Rocío, por permitirme formar parte de sus familias, por alegrar y endulzar mi vida, estar en los momentos más difíciles, por escucharme y porque han sido sinceras conmigo, por todos sus consejos y por enseñarme que lo mejor es trabajar en equipo, saber escuchar y respetar las decisión de los demás.

A mis amigos, Ernesto, Joel, Iván y Chente, por toda su dedicación, cariño, comprensión, atención, su sinceridad, por escucharme y haber hecho esta etapa de mi vida instantes de reflexión.

Este trabajo se realizó en las instalaciones de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán-UNAM Campo 1, en el Sección Química Orgánica en el Laboratorio

L-121, cuyo responsable es el Dr. José Guillermo Penieres Carrillo. Y en el Laboratorio 6 de Microbiología de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán-UNAM Campo 4.

Fue apoyado por el proyecto PAPIIT: IN211008, cuyo responsable es el Dr. Tonatiuh Alejandro Cruz Sánchez.

Y apoyo otorgado por la SEP con el FORTALECIMIENTO DEL PROGRAMA DE BECAS, ciclo escolar 2008-2009. Modalidad: Beca de Titulación, Folio No. 20080014528. Y por BECAS PAPIIT: IN211008, ciclo escolar 2008-2009.

Los resultados parciales de este trabajo fue presentado en el

43° Congreso Mexicano de Química, Tijuana B.C., realizado el 27 de Septiembre al 1° de  
Octubre del 2008.

V Congreso Nacional de micología Médica, Guanajuato Gto. México, realizado el 30 de al  
Julio al 1 de Agosto del 2008.

## ÍNDICE GENERAL

## PÁGINA

Índice de figuras	i
Índice de tablas	iv
Lista de abreviaturas	v
1. Resumen	1
2. Introducción	3
3. Generalidades	4
3.1. Productos Naturales	4
3.1.1. Métodos de extracción.	5
3.1.2. Métodos de purificación e identificación	6
3.1.2.1. Principio básico de la cromatografía	7
3.2. Principales características de los hongos	9
3.2.1. Clasificación de las micosis	10
3.2.1.1. Características de <i>Candida albicans</i>	11
3.2.1.1.1. Enfermedades causadas por <i>Candida albicans</i> .	13
3.2.1.2. Características de <i>Criptococcus neoformans</i>	14
3.2.1.2.1. Enfermedades causadas por <i>Criptococcus neoformans</i>	16
4. <i>Brickellia veronicaefolia</i> (HBK) Gray “PEXTO”	17
4.1. Antecedentes	17
5. Justificación	20
6. Objetivo general.	21
6.1. Objetivos particulares	22
7. Metodología experimental	23
7.1. Materiales y métodos	23
7.1.1. Material biológico	23
7.1.2. Obtención del extracto de hoja y del metabolito mayoritario puro.	23

	<b>PÁGINA</b>
7.1.3. Evaluación de la actividad antifúngica	24
7.1.3.1. Método de difusión en disco (Prueba de sensibilidad por difusión con disco)	24
7.1.3.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) (Prueba de sensibilidad por dilución en agar)	25
7.1.3.3. Determinación de la concentración mínima fungicida (CMF) (Prueba de sensibilidad por macrodilución en caldo).	26
7.1.3.4. Inhibición del tubo germinativo	26
7.1.3.5. Evaluación del cambio morfológico	27
7.2. Estrategia experimental para <i>Candida albicans</i> (ATCC 10231).	28
7.3. Estrategia experimental para <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	29
8. Resultados	30
9. Discusión	59
10. Conclusiones	68
11. Referencias	69
12. Anexos	75

## ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1. <i>Candida albicans</i>	12
Figura 2. <i>Cryptococcus neoformans</i>	15
Figura 3. Imagen de <i>Brickellia veronicaefolia</i> (HBK) Gray “PEXTO”.	17
Figura 4. Estructuras químicas de <i>Brickellia veronicaefolia</i> (HBK) Gray “PEXTO”.	18
Figura 5. Estructuras químicas de <i>Brickellia veronicaefolia</i> (HBK) Gray “PEXTO”.	19
Figura 6. Espectro de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> /TMS), determinado a 200 MHz para el Metabolito Puro.	31
Figura 7. Espectro de RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> /TMS) determinado a 50.2 MHz para el Metabolito Puro.	32
Figura 8. Espectro de masas obtenido por medio de Impacto Electrónico, como técnica de ionización para el Metabolito Puro.	33
Figura 9. Método de difusión en agar. Determinación de halos de inhi- bición de <i>Candida albicans</i> (ATCC 10231).	34
Figura 10. Método de difusión en agar. Determinación de halos de inhi- bición de <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> .	35

	<b>PÁGINA</b>
Figura 11. Determinación de CMI del EH contra <i>Candida albicans</i> (ATCC 10231), por medio de la técnica de dilución en agar.	37
Figura 12. Determinación de CMI del MP contra <i>Candida albicans</i> (ATCC 10231), por medio de la técnica de dilución en agar	38
Figura 13. Determinación de CMI del EH contra <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> , por medio de la técnica de dilución en agar.	40
Figura 14. Determinación de CMI del MP contra <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> , por medio de la técnica de dilución en agar.	41
Figura 15. Determinación de CFM de EH y MP frente a <i>Candida albicans</i> (ATCC 10231).	42
Figura 16. Determinación de CFM de EH y MP contra <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	43
Figura 17. Tubo germinativo de <i>C. albicans</i> , a través del microscopio óptico a 100x.	44
Figura 18. Efecto del EH sobre la morfología y número de células por campo (marcadas con flechas) de <i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	49

## PÁGINA

Figura 19.	Efecto del MP sobre la morfología y número de células por campo (marcadas con flechas) de <i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	50
Figura 20.	Efecto del EH sobre la morfología y número de células por campo (marcadas con flechas) de <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> .	53
Figura 21	Efecto del MP sobre la morfología y número de células por campo (marcadas con flechas) de <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> .	54

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>PÁGINA</b>
Tabla No. 1 Cromatografía en capa fina.	8
Tabla No. 2 Cromatografía en columna.	9
Tabla No. 3 Clasificación clínica de candidiasis	13
Tabla No. 4 Clasificación clínica de criptococosis	16
Tabla No. 5 Porcentaje de inhibición de <i>C.albicans</i> y <i>C. neoformans</i> frente a EH.	36
Tabla No. 6 Porcentaje de inhibición de <i>C.albicans</i> y <i>C. neoformans</i> frente a MP.	36
Tabla No. 7 Diluciones para el extracto de hoja (EH).	57
Tabla No. 8 Diluciones para el metabolito puro (MP).	58
Tabla No. 9 Diluciones para el extracto de hoja y metabolito puro.	58

## LISTA DE ABREVIATURAS

ASD	Agar Dextrosa Sabouroud
ATCC	American Type Culture Collection
CFM	Concentración Mínima Fungicida
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Acido desoxirribonucléico
EH	Extracto de Hoja
EM	Espectroscopía de masas
h	hora
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
MP	Metabolito Puro
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
OMS	Organización Mundial de la Salud
RMNC	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono
RMNH	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
RNA	Acido ribonucléico
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
UFC	Unidad Formadora de Colonia

## 1. RESUMEN

La actividad biológica de las plantas, forman parte importante en la medicina tradicional contra diversos microorganismos, los cuales causan enfermedades en humanos, por lo que ha sido ampliamente estudiado, una de ellas es el espécimen llamado *Brickellia veronicaefolia* (HBK) Gray, conocida en el Estado de México como “PEXTO”.

Hasta el momento solo existen antecedentes de que es utilizado para el tratamiento de gastroenteritis, afecciones del estómago, dispepsia, cólicos biliares, artritis y problemas de diarrea<sup>1</sup>, agente antiinflamatoria, relajante muscular<sup>2</sup>, presenta efecto hipoglucemiante en el tratamiento de la diabetes mellitus y se le atribuyen propiedades vermífugas; <sup>3, 4</sup> por lo anterior se pretendió evaluar una nueva alternativa que ayude a prevenir y/o curar enfermedades causadas por *Candida albicans* (ATCC 10231) y *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*, con el uso del extracto de esta planta.

La planta se recolectó en Ocopulco, Chiautla, Estado de México y posteriormente fue identificada como *Brickellia veronicaefolia* (HBK) Gray, en el Instituto Botánico de la Universidad Autónoma Chapingo. El material se secó bajo condiciones ambientales y posteriormente se separaron las hojas para ser trituradas y molidas (1.19 2 kg), después de 15 días de maceración con hexano, fue llevado a evaporación del mismo a presión reducida, teniendo un rendimiento de 99.0 g del extracto de las hojas y mediante cromatografía en columna se obtuvieron 7 g de metabolito puro y una retención relativa de  $R_f = 0.87$  por medio de la cromatografía en capa fina (fase estacionaria: gel de sílice; fase móvil: hexano-acetato de etilo 70:30). El metabolito puro podría corresponder al hexatriacontano ( $C_{36}H_{74}$ ), caracterizado con técnicas espectroscópicas tales como Resonancia Magnética Nuclear de  $^1H$  (RMN $^1H$ ), Resonancia Magnética Nuclear de  $^{13}C$  (RMN $^{13}C$ ), Espectrometría de masas (EM) y un punto de fusión de 68 – 70.

El extracto de hoja (EH) y el metabolito puro (MP) fueron sometidos a evaluación antimicótica enfrentándolos contra *Candida albicans* (ATCC 10231) y *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*. Las concentraciones de 2 a 5 mg de EH/mL frente a *Candida*

*albicans* (ATCC 10231) y *Cryptococcus neoformans* var *neoformans*, tienen actividad antifúngica *in vitro* de manera significativa en el método de difusión en disco (prueba de sensibilidad por difusión con disco), ya que presentan porcentajes mayores al 20% de inhibición. Para el metabolito puro, a concentraciones de 2 a 5 mg de MP/mL contra *Candida albicans* (ATCC 10231) y *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*, de igual manera todas presentan actividad antifúngica, excepto a la concentración de 4 mg de MP/mL contra *Cryptococcus neoformans* var *neoformans*, tiene poca actividad antifúngica.

Se determinó que para el extracto de hoja y metabolito puro frente a *Candida albicans* (ATCC 10231) su CMI fue de 4 mg de EH/mL y 0.25 mg de MP/mL; con respecto a *Cryptococcus neoformans* var *neoformans*, su CMI fue de 0.5 mg de EH/mL y 0.1 mg de MP/mL. La CMF obtenida para el extracto de hoja y metabolito puro frente a *Candida albicans* (ATCC 10231) fue de 4 mg de EH/mL y 1.0 mg de MP/mL; para *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* la CMF fue de 0.25 mg de EH/mL y 0.75 mg de MP/mL.

Para los compuestos estudiados en este trabajo (extracto de hoja y el metabolito puro), se evaluó el cambio morfológico (tamaño, forma y número de células por campo) de *Candida albicans* (ATCC 10231) y *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*, utilizando el análisis de imágenes, medidas con el programa Image Pro-Express Versión 4.

Se evaluó la alteración en la formación del tubo germinativo de *Candida albicans* (ATCC 10231). A una concentración de 1.0 mg de MP/mL presentó disminución significativa ( $p < 0.0001$ ) en la longitud del tubo germinativo, disminución en el diámetro de los conidios ( $p < 0.001$ ) y el 0.5% de las células observadas al microscopio óptico presentaron tubo germinativo. A una concentración de 4 mg de EH/mL presentó disminución significativa en la longitud del tubo germinativo, el 61% de las células presentaron tubo germinativo. El análisis estadístico se realizó con la prueba de comparación múltiple Tuckey's con ANOVA, usando el programa GraphPad Prism versión 5.01.

## 2. INTRODUCCIÓN

México es rico en un gran número de especies vegetales que forman parte fundamental de su medicina tradicional, debido a que muchos metabolitos secundarios puros, extractos de plantas y/o aceites aislados de ellas, han mostrado actividad biológica diversa. Por esta razón, es importante conocer las diferentes posibilidades de actividad biológica que puedan presentar los sistemas antes mencionados.

Por tal motivo, es de sumo interés el estudio de las plantas medicinales para encontrar nuevas alternativas que ayuden a mejorar y preservar la salud de los humanos, animales y vegetales.<sup>5</sup>

Por otro lado, en los últimos años el índice de infecciones causadas por hongos ha ido en aumento a nivel mundial. Tres de las principales causas de lo anterior son: resistencia de los hongos a los agentes antimicóticos existentes y limitado número de nuevos antifúngicos. Además, suelen presentar problemas de seguridad, alta toxicidad de los fármacos antimicóticos, reacciones adversas y el uso de tratamientos prolongados que incrementan la Concentración Mínima Inhibitoria.<sup>5,6</sup>

También, este aumento de infecciones es causado por un gran número de factores ligados principalmente a procedimientos terapéuticos, como el uso indiscriminado de antibióticos y esteroides, citotóxicos, trasplantes de médula ósea y órganos sólidos, instalación de catéteres venosos, nutrición parenteral así como drogadicción, neoplasias, diabetes mellitus, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), siendo éste el de mayor importancia.<sup>6</sup>

Por todo ello, en este trabajo se buscan alternativas para el tratamiento de las micosis con la evaluación antimicótica del extracto hexánico de hoja y metabolito secundario (mayoritario) puro del mismo extracto de *Brickellia veronicaefolia* (HBK) Gray “PEXTO”, frente a *Candida albicans* (ATCC 10231) y *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*.

### **3. GENERALIDADES**

#### **3.1 PRODUCTOS NATURALES**

Desde los tiempos antiguos nuestros ancestros combatían las enfermedades, con ayuda de los frutos, aceites de vegetales, plantas, raíces, inclusive derivados de los animales, entre otros. Sin embargo, por muchos años se han realizado infinidad de investigaciones, para el descubrimiento de la actividad biológica de las plantas y así convertirse en una fuente invaluable de nuevas moléculas biológicamente activas. Las moléculas o metabolitos secundarios producidas por las plantas, se originan a través de diferentes vías metabólicas, generando una infinidad de compuestos y cada uno volviéndose particular para un grupo de plantas y en concentraciones variables. El número de compuestos, proporción y composición es determinada o dependiente de factores externos, como son: la región, condiciones ambientales, nutrición de la tierra, época del año, período de recolecta, entre otros y factores propios de la planta (claramente ligados con los anteriores), como por ejemplo el tipo de tejido (hoja, raíz, flor, fruto, semillas, corteza, tallo), edad de la planta, etc.<sup>7,8</sup>

Los metabolitos secundarios, son sustancias de variado peso molecular, no son comunes en todas las plantas y por el contrario, pueden ser una expresión de la individualidad química de la misma. Son productos del proceso fundamental de la fotosíntesis que proporcionan intermediarios biosintéticos necesarios para dar lugar a su formación, haciéndose evidente la interconexión entre productos del metabolismo primario con el secundario.

Se ha demostrado en varias investigaciones, que estos metabolitos secundarios son utilizados por las plantas para preservar la integridad de la misma, contra el ataque de enemigos, como nemátodos, bacterias, hongos, insectos y herbívoros, o bien, en la atracción de polinizadores y dispersores de semillas, inclusive en algunas plantas liberan estos metabolitos para atraer insectos y ser digeridos por las plantas.<sup>8</sup>

Entre los compuestos más conocidos son los flavonoides, fenoles simples (hidroxibenzóicos o hidroxicinámicos), con propiedades fungicidas, glicósidos de fenoles, saponinas, alcaloides y terpenos que participan en la respuesta hipersensible, cumarinas

clasificados como antifúngicos y antibacterianos; los conjugados de fenilpropanoides con aminas que se adicionan a la pared celular vegetal para aumentar su rigidez e impedir la entrada del patógeno, etc. Todos ellos presentan en su mayoría alguna actividad biológica; por lo tanto, dichas propiedades y principios activos se han aplicado a la medicina moderna, cosmetología, farmacéutica, biotecnología, agricultura ecológica, entre otros.<sup>8,9,10,11</sup>

Lo anterior, es debido a que la mayoría de los compuestos estudiados han sido obtenidos bajo conceptos químicos. Principalmente, la química orgánica estudia la estructura, transformación, métodos de extracción, purificación, identificación, caracterización, así mismo la síntesis de estos metabolitos secundarios. Y posteriormente, por efectos biológicos, donde los metabolitos secundarios son enfrentados a diversos organismos.<sup>8,11</sup>

### **3.1.1. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN**

Las plantas poseen una variedad de mezclas de compuestos bioactivos o metabolitos secundarios, como ya se mencionó anteriormente y además de otras componentes como lípidos, grasas, fragancias, pigmentos y saborizantes.<sup>9,10</sup>

Para separar estos compuestos (soluto o alguno en particular) de la fase sólida, se utilizan varios métodos, como por ejemplo, la mezcla de compuestos se ponen en una fase líquida, ambas fases entran en contacto íntimo y el (los) soluto (s) se difunde (n) desde el sólido a la fase líquida, lo que permite una separación de los componentes de su fuente natural u original; este proceso se conoce como lixiviación.<sup>8,9,10</sup>

Otros procesos muy utilizados consisten en la extracción de aceites vegetales, en los cuales se emplean disolventes orgánicos como hexano, acetona y éter, por mencionar algunos. Los métodos tradicionales de extracción requieren tiempo de residencia y grandes cantidades de solventes. Estos métodos se basan en la selección del solvente, asociado con el uso de calor y/o agitación e incluyen el soxhlet, la hidrodestilación, maceración mezclada con agua, alcohol o grasa caliente, percolación, etc. Ésta es una técnica muy utilizada en química orgánica, que suele implicar procesos físicos y/o químicos, la cual involucra una fase

líquida (extractante), que aísla la sustancia de interés de una segunda fase (líquida, sólida o gaseosa); el disolvente extractante debe ser inmisible con el resto de la mezcla. Para ello, es importante considerar la selección del disolvente, ya que produce extractos y composiciones específicos, debe ofrecer las siguientes características: selectividad respecto al soluto por extraer, capacidad para producir el material extraído con una calidad no alterada por el disolvente, estabilidad química en las condiciones del proceso, baja viscosidad, alta presión de vapor, baja toxicidad e inflamabilidad, baja densidad, baja tensión superficial, facilidad y economía de recuperación de la corriente del extracto y bajo costo.<sup>8,9,10</sup>

### 3.1.2. MÉTODOS DE PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN.

Sin embargo, cuando se requiere la purificación e identificación de uno o varios compuestos se recurre a la cromatografía, que fue inventada y denominada así, a principios del siglo XX por el botánico ruso Mikhail Tswett (1872-1919). Él empleó la técnica para separar varios pigmentos vegetales, tales como la clorofila y xantofila, haciendo pasar disoluciones de estos compuestos a través de una columna de vidrio, rellena con carbonato de calcio finamente dividido. Las especies separadas aparecían como bandas coloreadas en la columna, dando así, el nombre de cromatografía del griego *chroma* que significa color y *graphein* que significa escribir.<sup>12,13</sup>

En la actualidad, la cromatografía se define como la técnica que permite fraccionar (separar), identificar y/o purificar componentes de una mezcla.<sup>12,13,14</sup>

De acuerdo a la IUPAC se establece que:

*La cromatografía, es un método usado principalmente para la separación de los componentes de una muestra, en el cual los componentes son distribuidos entre dos fases, una de las cuales es estacionaria, mientras que la otra es móvil. La fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido soportado en un sólido o en un gel (matriz). La fase estacionaria*

*puede ser empaquetada en una columna, extendida en una capa o distribuida como una película.*<sup>13</sup>

### **3.1.2.1. PRINCIPIO BÁSICO DE LA CROMATOGRAFÍA**

La separación de las sustancias que componen una mezcla, se fundamenta en una serie de sucesivos equilibrios entre la fase estacionaria y la fase móvil. La muestra se desplaza con una fase móvil (gas o líquido), se hace pasar a través de una fase estacionaria inmisible e inerte (columna o superficie plana). La muestra se distribuye de manera distinta en ambas fases. Aquellos componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria, se mueven lentamente en el flujo de la fase móvil, y los que se unen débilmente a la fase estacionaria, se mueven con rapidez. Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas o zonas discretas, que pueden analizarse cualitativamente y/o cuantitativamente.<sup>12, 13</sup>

En las tablas 1 y 2 se explican las características, fundamento, adsorbentes y los disolventes más utilizados de la cromatografía en capa fina y por columna, siendo éstos empleados en el presente trabajo.

Tabla No. 1 Cromatografía en capa fina <sup>12, 13</sup>	
Características	<p>Es utilizada como guía, para el desarrollo de óptimas condiciones en la separación de la cromatografía en columna.</p> <p>Factor de retardo (<math>R_f</math>) definida como, la distancia del compuesto desde el origen, entre la distancia recorrida desde el origen, hasta el frente del eluyente. Parámetro indicativo de la eficiencia de la elución. (Ideal 0.65 y 0.7).</p>
Fundamento	<p>La fase móvil se desplaza a través de la fase estacionaria por capilaridad y adsorción.</p> <p>La separación ocurre cuando el adsorbente y las moléculas adsorbidas están en equilibrio entre la fase estacionaria y las que están libres en el disolvente, moviéndose las moléculas individuales entre las dos fases.</p> <p>Si las moléculas de un componente particular tienen una elevada afinidad por el adsorbente, pasarán muy lentamente, mientras que otro componente con menos afinidad lo hará más rápido.</p>
Adsorbentes más utilizados	Gel de sílice activada y alúmina activada
Disolventes por orden de menor a mayor poder eluyente	Hexano, éteres de petróleo, Heptano, ciclohexano, Tetracloruro de carbono, Benceno, Tolueno, Cloroformo, Éter dietílico, Acetato de etilo, Piridina Acetona, Propanol, Etanol, Metanol, Agua, Mezcla de ácidos, bases con agua, alcoholes.
Revelado de la placa	<p>Método químico: 2,4 - dinitrofenilhidrazina (para aldehídos y cetonas), Verde de bromocresol (para ácidos carboxílicos) y el más usado: yodo.</p> <p><math>\rho</math>-Dimetilaminobenzaldehído (para aminas), Ninhidrina (para aminoácidos) y Sulfato cérico/<math>H_2SO_4</math>.</p> <p>Métodos físicos. Lámpara ultravioleta</p>

Tabla No. 2 Cromatografía en columna<sup>12, 13</sup>

Características	<p>Las separaciones pueden realizarse por reparto, adsorción o intercambio iónico. La elución implica el transporte de una especie a través de una columna por la adición continuada de nueva fase móvil.</p> <p>El movimiento de los solutos, sólo puede ocurrir en la fase móvil, la velocidad media a la que una zona de soluto migra en la columna, depende de la fracción de tiempo que reside en estas fases; las diferencias de velocidad que resultan, hacen que se separen los componentes de la mezcla en bandas o zonas, localizadas a lo largo de la columna y la salida de ellas se lleva a cabo haciendo pasar suficiente cantidad de fase móvil, hasta que las bandas individuales salen de ella</p>
Fundamento	<p>Las moléculas son retenidas por la fase estacionaria, mediante fuerzas de retención y al mismo tiempo son arrastradas por la fase móvil, mediante fuerzas de arrastre. La intensidad de estas fuerzas (de naturaleza eléctrica), es propia de cada sustancia. Si una sustancia es pobremente retenida, pero fuertemente arrastrada, tendrá bajo <i>tiempo de elución</i>; en cambio, otra que es fuertemente retenida y pobremente arrastrada demorará mucho en cruzar la fase estacionaria y tendrá un <i>tiempo de elución</i> elevada.</p>
Adsorbentes más utilizados	<p>gel de sílice, celita, alúmina, óxido de magnesio, óxido cálcico, carbón activado, entre otros</p>

### 3.2. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE LOS HONGOS

La Micología es la ciencia que se encarga del estudio de los hongos. Los hongos microscópicos son células eucariotas, es decir; presentan un núcleo diferenciado con membrana bien organizada; son aerobios, heterótrofos y no móviles.<sup>33</sup> Se reproducen por esporas sexuales (teleomorfismo) y asexuales (anamorfismo). Tienen dos tipos de células fúngicas, las somáticas, que contienen núcleos muy pequeños y su proceso de división es por mitosis ordinaria. En las hifas septadas se observan generalmente un núcleo por cada célula y en las no septadas o cenocíticas, los núcleos se encuentran en el citoplasma

distribuidos más o menos uniformemente. El segundo tipo de células son las reproductoras, que contienen núcleos mucha más grande y su división celular es generalmente por meiosis. Pueden ser unicelulares (levaduras: unidad anatómica fundamental “hifa”) o multicelulares (hongos filamentosos). La membrana celular basal está organizada y contiene gran cantidad de esteroides, principalmente el ergosterol. La pared celular está formada por polisacáridos, polipéptidos, quitina (N-acetilglucosamina); celulosa, glucanas, mananos y algunos glucopéptidos; estos componentes dan a la pared rigidez y son de importancia taxonómica y propiedades antigénicas. Los hongos no poseen cloroplastos, por lo tanto no son fotosintéticos; su nutrición siempre es por absorción, que obtienen al desintegrar polímeros o de material orgánico, mediante enzimas extracelulares llamadas despolimerasas, su fuente primordial es a base de CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, sales de nitrógeno y de carbohidratos (glucosa, sacarosa, maltosa), necesitan de los iones inorgánicos más comunes.<sup>15, 16, 17, 18, 33</sup>

Existen condiciones óptimas de crecimiento para cada especie, la mayoría de los hongos crece entre 0 y 55° C, teniendo un rango de temperatura entre 20 y 30° C, los hongos oportunistas y patógenos pueden crecer entre 35 y 40° C. A diferencia de las bacterias, los hongos son acidófilos, crecen mejor entre pH de 5.6 a 7.0, la luz no es vital pero para muchas especies juega un papel muy importante para la esporulación.<sup>18, 19</sup>

Existen alrededor de 200 especies patógenas, de las cuales 60 especies se asocian de forma consistente a infecciones humanas y un elevado número de hongos es causante de graves pérdidas ganaderas, agrícolas, debido a las enfermedades causadas en plantas, animales e inclusive en los humanos.<sup>20</sup>

### **3.2.1 CLASIFICACIÓN DE LAS MICOSIS**

Las micosis son infecciones provocadas por los hongos microscópicos, de acuerdo a la OMS, se clasifican en superficiales, cutáneas, subcutáneas, sistémicas y oportunistas). Las micosis toman su nombre de la parte del organismo que invaden (onicomicosis) o del hongo que las causa (coccidioidomicosis), también se pueden clasificar por su reproducción asexual o sexual y éstas pueden ser de origen endógeno o exógeno.<sup>15, 16, 18, 19, 21, 22</sup>

### 3.2.1 .1.CARACTERÍSTICAS DE *Candida albicans*

Forma parte de la flora normal de la piel, de las mucosas, tracto digestivo, y genitourinario del ser humano, encontrándose asimismo en animales, plantas, objetos inanimados y en el medio ambiente.<sup>23</sup> Forma el grupo más importante de hongos patógenos oportunistas, siendo el causante común de infecciones septicémicas. El género *Candida* con mayor frecuencia cuenta con un elevado número de formas clínicas, dividiéndose en sistémicas y superficiales. Ambas son de importancia clínica, porque involucran diversos daños a órganos de diferentes sistemas, provocando riesgo para la salud del paciente y el incremento de consultas que éstas generan.<sup>24</sup> En la tabla 3 se muestran algunos ejemplos de candidiasis.

Robin denominó a *C. albicans* en 1953 como *Oidium albican*; anteriormente, por mucho tiempo, estuvo incluida en 100 sinónimos, pasada a través de 18 géneros, entre ellos el género *Monilia*, que incluía a la especie *Monilia candida*, luego *Monilia albicans*. Tiempo después, el trabajo de C.M. Berkhot propone en 1923 el género *Candida* y la especie *albicans*, siendo éste aceptado por el 3<sup>er</sup> Congreso Intencional de Microbiología en Nueva York en 1939.<sup>25, 26</sup>

El género *Candida* comprende más de 150 especies, de las cuales las de mayor importancia médica son: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. guilliermondi*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* y *C. dubliniensis*.<sup>25, 26, 27</sup> *Candida albicans*, se clasifica taxonómicamente de la siguiente forma

Categoría	Nombre
Reino:	<i>Fungi</i>
Phylum:	Ascomisota
Orden:	Saccharomycetales
Familia:	Saccharomycetaceae
Género:	<i>Candida</i>

Las levaduras o blastoconidias son microorganismos eucariotas, las cuales se reproducen asexualmente por un proceso específico de división celular conocido como gemación. Cuando el brote o yema ha crecido y se encuentra en su tamaño óptimo, se suscita la división celular y se forma un tabique o septo entre las dos células.<sup>28</sup>

Morfológicamente presenta dimorfismo, es decir, se desarrolla como célula levaduriforme ovalada o redondas de 3-5  $\mu\text{m}$  (hidrofílicas), que genera tubos germinales (hidrofóbicas) y forman esporas denominadas clamidoconidias terminales, de pared gruesa de 7-8  $\mu\text{m}$ .<sup>29, 30</sup>

La forma filamentosa de *Candida albicans* es la hifa que muestra tigmotropismo (sentido del tacto); esta propiedad le permite crecer a lo largo de surcos, a través de poros y podría facilitar la infiltración a las superficies epiteliales. La hifa es una estructura tubular que contiene unidades celulares divididas por septos y puede surgir a partir de blastononidios o de hifas existentes. Su crecimiento es por extensión apical. figura 1.

También existen formas intermedias que en su conjunto se denominan pseudohifas, éstas son células alargadas de levadura que permanecen unidas entre sí, cuando las yemas siguen creciendo, pero sin desprenderse y generan cadenas alargadas, unidas en los tabiques entre las células.<sup>29, 31</sup>

Un tubo germinativo se define como una extensión filamentosa de una célula levaduriforme que mide alrededor de la mitad del ancho y tres a cuatro veces el largo de la célula y se ha descrito como un tubo de constricción en el punto de origen.<sup>32</sup>

En medio Agar Dextrosa Sabouraud incubadas a 37° C durante 24 h o a temperatura ambiente, dan lugar a colonias lisas en forma de domo de color blanco a crema con olor característico, es una levadura gram positiva y aerobia.<sup>5, 15, 18, 26, 27,</sup>



Figura 1. *Candida albicans*

3.2.1 .1.1. ENFERMEDADES CAUSADAS POR *Candida albicans*.

**Tabla No. 3 Clasificación clínica de candidiasis**<sup>33, 34, 35, 36, 37, 38, 39</sup>

Forma clínica	Cuadro clínico	Descripción
Genital	Leucorrea blanco, espumoso, grumoso, de aspecto viscoso muy pruriginoso, que recubre la pared de la vagina y el endocervix	Es la infección más frecuente y molesta en el aparato genital de la mujer. Halladas también en niñas recién nacidas (alto nivel de hormonas heredadas por la madre) y en mujeres diabéticas por el incremento de glucosa en los tejidos, así como el paciente con tratamientos prolongados de antibióticos. En caso de los hombres, se presenta como balanopostitis; es una lesión en el pene y en el surco balanoprepusial con eritema y placas blanquecinas.
Oral	También conocida como algodoncillo, cepillo o moquet. Es una placa pseudomembranosa blanquecina cremosas, que pueden cubrir la lengua, mucosa oral y la comisura labial	Se ve en recién nacidos de madres con infecciones vaginales, pacientes con enfermedades terminales como el carcinoma.
Onicomycosis	La uña incrementa de grosor, opacándose, se oscurece y en ocasiones aparecen estrías. En el borde la uña hay inflamación, edema, dolor y puede producir expulsión de pus	La lesión es en la uña y en el borde de la misma (paroniquia), debido a la excesiva humedad.
Granulomas	Lesiones verrugosas vegetantes.	Se observa en niños inmunosuprimidos, o en pacientes con diabetes mellitus y VIH.
Mucocutánea crónica	Las lesiones abarcan todo el cuerpo, las mucosas y la piel son granulomatosas, produciendo invasión en todos los órganos.	Es casi exclusivo en niños con defectos genéticos o en la función del timo, que los llevan a alteraciones en la inmunidad celular.
Urinaria	Afecta al riñón produciendo pielonefritis, en la vejiga y uretra como poloquiuria, manifestaciones uretritis y dolor vesicular.	Se observa en pacientes diabéticos con catéteres y trastornos en las corticoides.
Sistémica profunda	Están asociadas por candidiasis broncopulmonar, endocarditis, meningoencefalitis.	Ocurre en pacientes con inmunosupresión humoral y celular como aquellos con VIH, debido a la invasión sanguínea que éstos presentan.

### 3.2.1.2. CARACTERÍSTICAS DE *Cryptococcus neoformans*

En 1894, Sanfelice aisló del jugo de durazno a una levadura con cápsula que denominó *Saccharomyces neoformans*. En el mismo año Busse y Buscke aislaron de un paciente a partir de diferentes tejidos, levaduras capsuladas que nombraron *Saccharomyces hominis*, Vuillemin en 1901 analizó a *Saccharomyces neoformans*, *S. hominis* y *S. subcutaneous tumefaciens*, concluyendo que era el mismo microorganismo. En sus estudios observó que las levaduras no formaron ascosporas, estructuras de reproducción características del género *Saccharomyces*, por lo que reubicó al hongo dentro del género *Cryptococcus*. En 1970 Lodder y Kreger-Van Rij, renombra a la levadura como *Cryptococcus neoformans*. Actualmente se conocen 20 especies pertenecientes al género *Cryptococcus*.<sup>40, 41</sup>

La cápsula es una característica distintiva de la levadura, constituye el principal factor de virulencia y le confiere al organismo diferencias antigénicas que permiten clasificar a los aislamientos en dos variedades (*gattii* y *neoformans*) y cinco serotipos: *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (A, D, y AD) y *Cryptococcus neoformans* var. *Gattii* (serotipos B y C). En 1999, Franzot basado en estudios moleculares propuso otra variedad serotipos A y *Cryptococcus neoformans* var. *Grubii*. Las variedades presentan diferencias en la distribución geográfica y en el hábitat.<sup>42, 43</sup>

De acuerdo a su genoma, la clasificación de este hongo levaduriforme ha quedado conformado como se muestra a continuación:<sup>44</sup>

<b>Categoría</b>	<b>Nombre</b>
Reino:	<i>Fungi</i>
Phylum:	Basidiomycota
Orden:	Filobasidiales
Familia:	Filobasidiales
Género:	Filobasidiales ( <i>Cryptococcus</i> )
Especie:	<i>neoformans</i>
Variedades:	<i>neoformans</i> ( <i>C. neoformans</i> var <i>neoformans/grubii</i> ) <i>neoformans</i> ( <i>C. neoformans</i> var <i>gattii</i> )

El hábitat natural de donde se han aislado con mayor frecuencia en los excrementos de las palomas (*Columba livia*), excremento de murciélago, materiales biológicos obtenidos de perros, equidrias, zarigüyas, aire circunvecino del hábitat de los koalas, misceláneas de desechos vegetales, pelo de dromedario, plumas de avestruz, etc.<sup>42, 45, 46</sup>

Macroscópicamente el estado anamorfo depende del tipo de medio en el que se haya sembrado, número de días, condiciones de temperatura y humedad en la que crece. Para el aislamiento se puede utilizar medios de cultivo en caldo o agar como dextrosa sabouraud, infusión cerebro corazón, agar sangre o agar chocolate. Los cultivos deben incubarse a 26° C ó 37° C para obtener desarrollo fúngico entre 48 a 72 horas. En la mayoría de los medios de cultivo mencionados, las colonias son de aspecto mucoso brillante, poco elevadas de bordes lisos y de color variable como blanco amarillento o rosadas muy pálidas. Cuando la cepa sembrada tiene poco material capsular o nulo, las colonias son secas. Tienen metabolismo aerobio, por lo que no son fermentadoras, producen ureasa y feniloxidasa. Las distintas especies de criptococos se diferencian entre sí por una serie de características: crecimiento a 37° C, asimilación de la sacarosa, lactosa, galactosa, melobiosa, celobiosa, rafinosa, trealosa, dulcitol y utilizan KNO<sub>3</sub>.<sup>40</sup>

Son levaduras encapsuladas no miceliales, redondas u ovals (3,5-8 µm) que se reproducen por gemación única, con un cuello estrecho entre la célula madre y la hija. Presenta cápsula polisacárida con la que inclusive llega a medir alrededor de 50 µm de diámetro, casi siete veces su tamaño, ésta se considera responsable de su virulencia y se le atribuyen diversos efectos sobre la resistencia inmune, principalmente inhibición de la fagocitosis y el estímulo en la producción de linfocitos T supresores.<sup>42, 43</sup> figura 2.

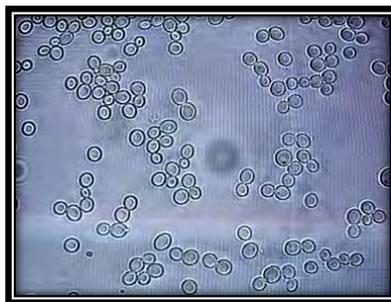


Figura 2. *Cryptococcus neoformans*

### 3.2.1.2.1. ENFERMEDADES CAUSADAS POR *Cryptococcus neoformans*

Se denomina criptococosis a la infección exógena, cosmopolita, de evolución crónica o subaguda producida por levaduras encapsuladas del género *Cryptococcus*, siendo *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* el agente más comúnmente aislado para ello se resumen en la Tabla 4.

Tabla No. 4 Clasificación clínica de criptococosis <sup>47, 48, 49</sup>		
Forma clínica	Cuadro clínico	Descripción
Sistema Nervioso Central (meningoencefalítica)	Cefalea, fiebre, náuseas, vómito, pérdida de memoria, rigidez de la nuca, visión borrosa y/o coma.	Pueden aparecer los síntomas después de 2 a 4 semanas. Más del 90% de los pacientes presentan alteraciones en el líquido cefalorraquídeo, como son presión alta, elevación de proteínas, linfocitosis y baja concentración de glucosa.
Pulmonar	Tos, dolor torácico, esputo, fiebre, pérdida de peso, hemoptisis, disnea y pérdida del sueño.	En pacientes inmunocomprometidos, el curso de la infección es más rápido y tiende a diseminarse. Presentan cambios radiológicos muy variables como lesiones de aspecto tumoral con infiltrados peribronquiales, cavitación, efusión pleural, fibrosis y calcificaciones.
Cutánea	Lesiones nodulares solitarias o múltiples con úlceras o con abscesos.	Las lesiones pueden presentarse en todo el cuerpo, pero con mayor frecuencia en la cabeza.
Ocular	Ceguera, parálisis ocular, coriorretinitis, disminución de la visión, fotofobia, papiloedema y lesiones en retina con hemorragia.	Afecta a todas las edades.
Urogenital	Sitio común que es infectado es la próstata (prostatitis)	Han sido reportados casos en pacientes con SIDA tanto hombres como mujeres que tienen lesiones genitales causadas por este hongo.
Gastrointestinal	Diarrea, dolor abdominal, fiebre, náuseas y/o fluido grisáceo, en el caso del hígado presenta hepatitis y cirrosis.	Infecciones desde el esófago hasta el recto, en hígado, páncreas y a lo largo de todo el intestino

#### 4. *Brickellia veronicaefolia* (HBK) Gray. “PEXTO”

##### 4.1. ANTECEDENTES

El espécimen *Brickellia veronicaefolia* (HBK) Gray, (Familia: Asteraceae, Subfamilia: Lactuceae, Orden: Asterales, Subclase: Asteridae)<sup>53</sup>, es conocida comúnmente como "hierba dorada", “oreganillo de campo”, “pexto”, “pexton”, entre otros sinónimos. Es una planta que en la medicina tradicional mexicana se emplea en el tratamiento de gastroenteritis, afecciones del estómago, dispepsia, cólicos biliares, artritis, y problemas de diarrea<sup>1</sup>, como agente antiinflamatorio, relajante muscular<sup>2</sup>; presenta efecto hipoglucemiante en el tratamiento de la diabetes mellitus y, además, se le atribuyen también propiedades vermífugas.<sup>3,4</sup>

Pertenece a la familia de las compuestas, es arbustiva de unos 30 cm de altura, de hojas opuestas de 4-5 mm ovaladas de borde crenado, con pecíolo de 3-6 mm; flores azulosas o algo rosadas en cabezuelas de 12-17 mm (figura 3); se localiza en Coahuila, Oaxaca, Estado de México y Puebla, es propia de los climas semicálidos y templados entre los 1 800 y 2 800 m de altura.<sup>50,51</sup>



Figura 3. Imagen de *Brickellia veronicaefolia* (HBK) Gray “PEXTO”

La composición química del extracto de hoja de *Brickellia veronicaefolia* (HBK) Gray “PEXTO”, contiene dos resinas ácidas y una resina neutra, contiene materia colorante amarilla, eupatopextina, materia tánica<sup>50</sup>, 86% de aceites esenciales, compuestos orgánicos, ver figura 4 y el  $\beta$ -cariofileno, identificados por espectroscopía de  $^1\text{HRMN}$ , así como otros compuestos derivados del ácido benzóico, como 1,2-bis-o-(2-metoxibenzoil)- $\beta$ -D-glucopiranosido, 2,6-dimetoxibenzoato de 3-( $\beta$ -glucopiranosiloxi)bencilo, acetato de taraxasterilo, 4-alil-2-metiloxifenil- $\beta$ -glucopiranososa, ácido 2-hidroxi-6-metoxibenzóico, ácido 2-metoxibenzóico, ver figura 5, utilizando mezcla de  $\text{CH}_2\text{-Cl}_2\text{-MeOH}$  (1:1) por medio de maceración.<sup>1,2</sup>

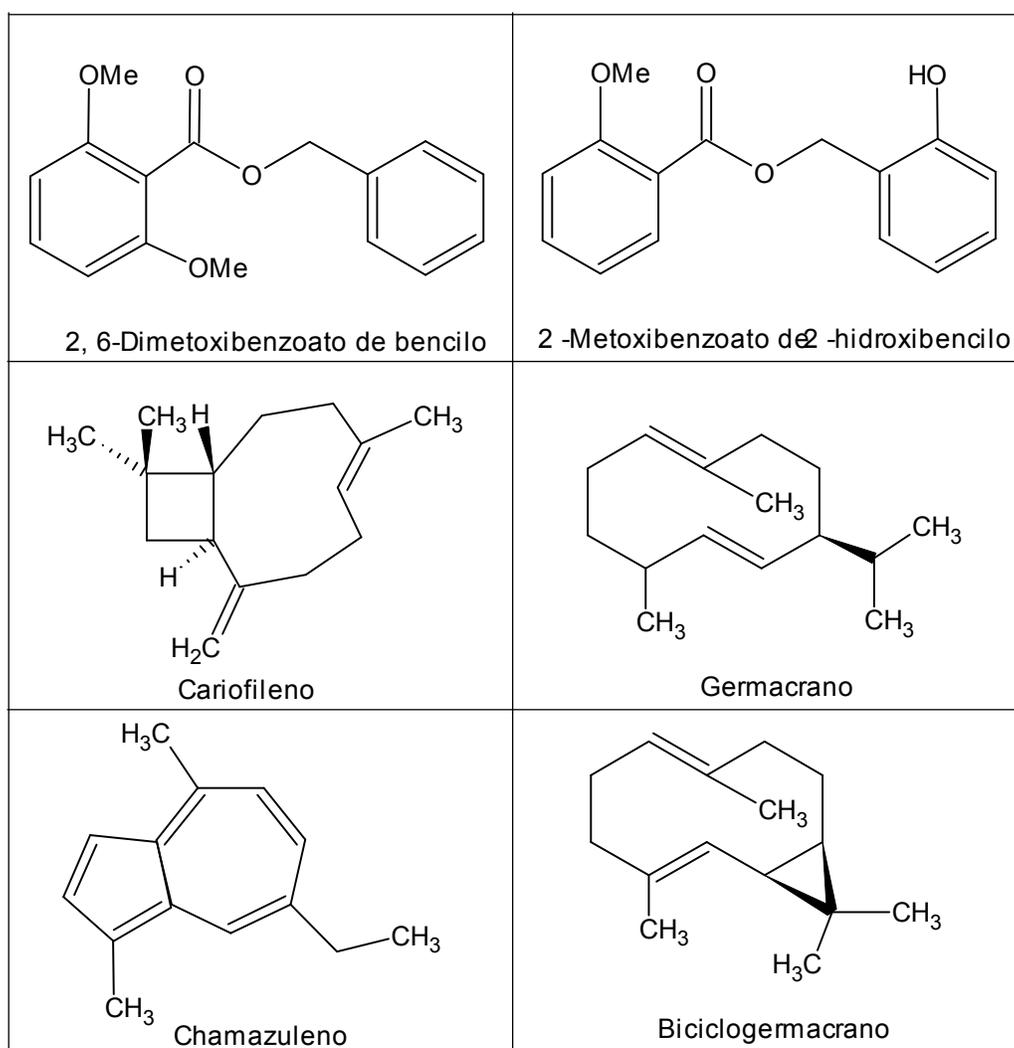


Figura 4. Estructuras químicas de *Brickellia veronicaefolia* (HBK) Gray “PEXTO”

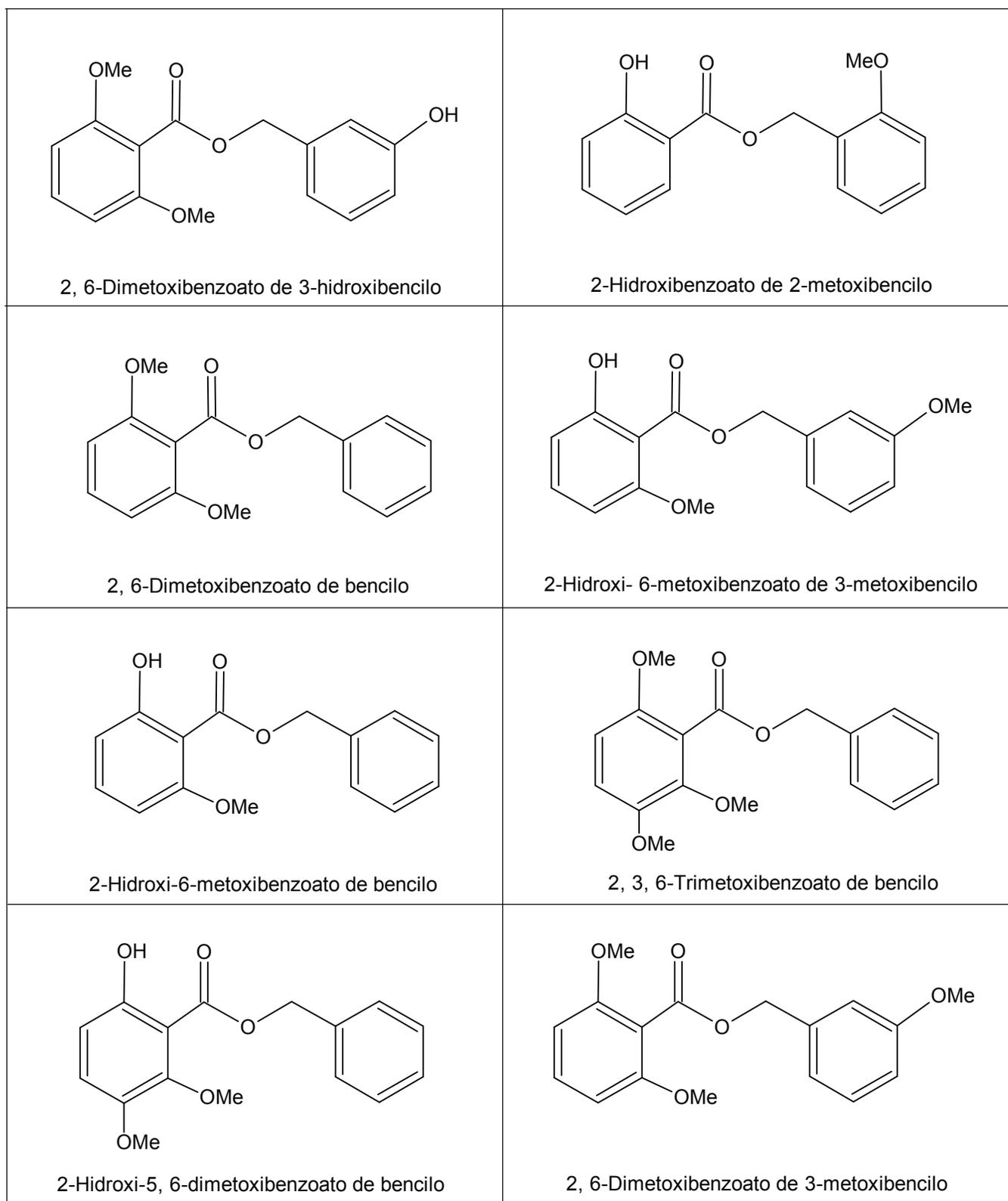


Figura 5. Estructuras químicas de *Brickellia veronicaefolia* (HBK) Gray “PEXTO”

## **5. JUSTIFICACIÓN**

Debido al incremento en la incidencia de infecciones micóticas en el humano, en pacientes inmunodeprimidos donde sus mecanismos normales de defensa están afectados, la presencia del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), la quimioterapia postrasplante, el uso indebido de antibióticos, nutrición parenteral, drogadicción, neoplasias, diabetes mellitus, y sustancias inmunosupresoras, han ocasionado una disminución de la resistencia del huésped. Además de problemas de seguridad y toxicidad de los fármacos antifúngicos; así como, de la resistencia de los mismos contra los diversos hongos, han hecho imprescindible el desarrollo de nuevos antifúngicos, que aporten ventajas con respecto a los ya existentes.

Por todo ello, el presente trabajo tiene como propósito probar si el EH y MP del espécimen *Brickellia veronicaefolia* (HBK) Gray también conocido como “PEXTO”, pueden ser utilizados como antifúngicos especialmente contra *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*, ya que hasta el momento no existen antecedentes del EH y MP, hayan sido empleados para el tratamiento de las micosis, producidas por los hongos estudiadas en este trabajo, por tal motivo se podría considerar como una probable alternativa.

## **6. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto antimicótico *in vitro* de *Brickellia veronicaefolia* (HBK) Gray “PEXTO” y cambio morfológico producido, al utilizar el extracto de hoja y de metabolito secundario puro, frente a cepa de referencia *Candida albicans* (ATCC 10231) y contra *Cryptococcus neofomans* var. *neofomans*.

## 6.1. OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el disolvente orgánico óptimo para extraer mayor cantidad de metabolitos en hoja, identificándolos por medio de cromatografía en capa fina, así como establecer el sistema de elusión adecuado para una separación eficiente.
- Purificar el (los) metabolito(s) mayoritario(s) de hoja molida, por medio de procesos cromatográficos (cromatografía en columna, cromatografía preparativa).
- Caracterizar el(los) metabolito(s) obtenido(s), mediante técnicas espectroscópicas tales como Resonancia Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  (RMN $^1\text{H}$ ), Resonancia Magnética Nuclear de  $^{13}\text{C}$  (RMN $^{13}\text{C}$ ) y Espectroscopía de masas (EM) y determinar su punto de fusión.
- Determinar la sensibilidad *in vitro* de *Candida albicans* (ATCC 10231) y *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*, empleando discos impregnados con extractos de hoja (EH) y metabolito puro (MP), mediante la técnica de difusión en agar, determinando si presentan halos de inhibición.
- Determinar Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Fungicida (CMF) del extractos de hoja (EH) y metabolito puro (MP), contra la cepa de referencia *Candida albicans* (ATCC 10231) y *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*.
- Evaluar el cambio morfológico (tamaño, forma y número de células por campo) de *Candida albicans* (ATCC 10231) y *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*, utilizando el análisis de imágenes, medidas con el programa Image Pro-Express Versión 4.
- Evaluar la alteración en la formación del tubo germinativo de *Candida albicans* (ATCC 10231).

## **7. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL**

### **7.1. MATERIAL Y MÉTODOS**

**7.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO.** El espécimen *Brickellia veronicaefolia* (HBK) Gray “PEXTO”, se recolectó en Agosto del 2005, en la localidad de Ocopulco, Chiautla, Estado de México. Posteriormente, se secó a la sombra y a temperatura ambiente, se separaron las hojas de las ramas (obteniéndose 1.192 kg), se molieron empleando un molino manual.

**7.1.2. OBTENCION DEL EXTRACTO DE HOJA (EH) Y DEL METABOLITO MAYORITARIO PURO (MP).**<sup>7, 8, 9, 10</sup>

#### **PREPARACIÓN DEL EXTRACTO DE HOJA (PRUEBA PRELIMINAR)**

**MACERACIÓN.** En tres frascos de cierre hermético se colocaron en cada uno 10 g de las hojas molidas y se agregó 50 mL de hexano, 50 mL etanol y 50 mL de acetato de etilo respectivamente. Se dejó reposar en un lugar oscuro durante 15 días con agitación frecuente, después se filtró el extracto y se dejó evaporar el disolvente a temperatura ambiente.

**IDENTIFICACIÓN.** Para el extracto de hoja (EH) se realizó cromatografía en capa fina de sílice y como fase móvil acetato de etilo/hexano en diferentes proporciones, empleando como revelador luz ultravioleta. Así, se logró determinar el disolvente orgánico óptimo para la extracción.

#### **PREPARACIÓN DEL EXTRACTO CON EL DISOLVENTE ÓPTIMO**

**MACERACIÓN.** En un frasco con tapa se colocó el total de las hojas molidas (1.192 Kg) y se agregó hexano. Se dejó reposar en un lugar oscuro durante 15 días, después se filtró y posteriormente se concentró la muestra por destilación a presión reducida, dejando evaporar

el disolvente remanente del extracto a temperatura ambiente. Obteniendo como peso final del EH 99.0 g.

### **PURIFICACIÓN DEL METABOLITO MAYORITARIO PURO (MP)**

Del EH se tomaron 44.5 g, y se sometieron a un proceso de purificación mediante cromatografía en columna con sílica gel o alúmina como fase estacionaria y con mezclas de acetato de etilo: hexano en diferentes proporciones como fase móvil, empleando luz ultravioleta como revelador. Se recolectaron las fracciones del MP y se concentraron por destilación a presión reducida, protegiéndolas de la luz y fueron finalmente refrigeradas, obteniendo 7 g de MP. Tanto para el EH y MP se determinaron las condiciones ambientales de manera general, para determinar la estabilidad así como, su solubilidad.

Finalmente, el MP obtenido se caracterizó mediante técnicas espectroscópicas tales como RMN de  $^1\text{H}$ , RMN de  $^{13}\text{C}$  y EM. Por último se determinó su punto de fusión.

#### **7.1.3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA**

Microorganismos utilizados: *Candida albicans* (ATCC 10231) y *Cryptococcus neoformans* var *neoformans*, se obtuvieron en el cepario del Laboratorio 6 de Microbiología, en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo cuatro.

##### **7.1.3.1. MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO (PRUEBA DE SENSIBILIDAD POR DIFUSIÓN CON DISCO)** <sup>8, 52, 54</sup>

Se prepararon cajas de Agar Mueller-Hinton suplementado con 2 % de glucosa y 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de azul de metileno y se sembraron con el inóculo estandarizado igualado al 0.5 del Nefelómetro de Mac Farland ( $1 \times 10^6$  UFC/mL) de cada una de las cepas de hongos, colocando también discos impregnados con 10  $\mu\text{L}$  de EH, así como de MP con concentraciones de 2 a 5 mg/mL DMS, respectivamente. Cada caja preparada de esta forma se incubó a 35° C, se tomaron lecturas a las 24 y 48 h, midiendo posteriormente los halos

de inhibición, determinándose el porcentaje de crecimiento y el porcentaje de inhibición del crecimiento de los hongos (Control positivo: Ketoconazol 7µg/mL).

$$\% \text{ Crecimiento} = \frac{\text{Diámetro de crecimiento del hongo en el extracto} \times 100}{\text{Diámetro del control negativo}}$$

$$\% \text{ Inhibición} = 100\% - \% \text{ Crecimiento}$$

### **7.1.3.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (PRUEBA DE SENSIBILIDAD POR DILUCIÓN EN AGAR)**<sup>52, 54</sup>

Para la determinación de CMI para *Candida albicans* (ATCC 10231), de igual forma, se prepararon tubos con 6 mL de ASD; cuando alcanzó una temperatura de 40° C, se les agregaron concentraciones de 2.5-5 mg de EH/mL y 0.25-2.5 mg de MP/ mL (Anexo 2), a partir de una solución Stock (Anexo1). Fueron homogeneizados y vertidos en cajas petry estériles. A partir de un cultivo de *Candida albicans* (ATCC 10231) de 24 h, se preparó un inóculo igualado al tubo 0.5 del Nefelómetro de Mac Farland (1x10<sup>6</sup> UFC/mL) en solución salina fisiológica estéril. Las placas fueron inoculadas con 10µl, de la solución anterior y sembradas. Todas las placas fueron incubadas a 35° C durante 24 h. Obteniéndose la CMI de forma visible. Se empleó como control negativo, crecimiento de *Candida albicans* (ATCC 10231) de 24 h en una placa de medio sin compuestos a evaluar.

Para determinar la CMI, se prepararon tubos con 6ml de ASD, cuando alcanzó una temperatura de 40° C, se les adicionó concentraciones de 0.1-1.5 mg de EH/ mL y 0.1-1.5 mg de MP/mL (Anexo 3), provenientes de una solución Stock (Anexo 1). Fueron homogeneizados y vertidos en cajas petry estériles. A partir de un cultivo de *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* de 48 h, se preparó un inóculo igualado al tubo 0.5 del Nefelómetro de Mac Farland (1x10<sup>6</sup> UFC/mL) en solución salina fisiológica estéril. Las placas fueron inoculadas con 10 µL, de la solución anterior y sembradas. Todas las placas fueron incubadas a 35° C durante 48 h. La CMI se determinó visiblemente como la concentración más baja capaz de inhibir el crecimiento visible. Se empleó como control

negativo, crecimiento de *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* de 48 h en una placa de medio sin compuestos a evaluar.

### 7.1.3.3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA FUNGICIDA (PRUEBA DE SENSIBILIDAD POR MACRODILUCIÓN EN CALDO).<sup>52, 54</sup>

Para determinar CMF, se realizó la técnica de dilución. Se prepararon tubos con 5 mL de caldo dextrosa sabouroud; una vez estériles, se le adicionó concentraciones de 0.1-1.5 mg de EH/ mL y 0.1-1.5 mg de MP/ ml contra *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* y 2.5-5 mg de EH/mL y 0.25-2.5 mg de MP/ mL contra *Candida albicans* (ATCC 10231) (Anexo 2 y 3), provenientes de una solución Stock (Anexo 1). A partir de un cultivo de *Candida albicans* (ATCC 10231) de 24 h y de un cultivo de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* de 48 h, se prepararon inóculos; ambos igualados al tubo 0.5 del Nefelómetro de Mac Farland ( $1 \times 10^6$  UFC/mL) en solución salina fisiológica estéril, a los tubos se le agregó 100  $\mu$ L de inóculo, respectivamente. Fueron homogeneizadas e incubadas a 35° C durante 24 h con respecto a *Candida albicans* (ATCC 10231) y 48 h para *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*.

Se tomó 10  $\mu$ L de los tubos inoculados con *Candida albicans* (ATCC 10231) y se sembró en cajas de 6mL de caldo dextrosa sabouroud. Todas las placas fueron incubadas a 37 °C durante 24 h. A las 48 h se tomó 10  $\mu$ L de los tubos inoculados con *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* y se sembró en cajas de 6mL de ASD. Todas las placas fueron incubadas a 35° C durante 48 h. Se emplearon como controles negativos, crecimiento de *Candida albicans* (ATCC 10231) de 24 h y *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* de 48 h en placas con medio ASD, sin compuestos a evaluar.

### 7.1.3.4. INHIBICIÓN DEL TUBO GERMINATIVO<sup>34</sup>

Se evaluó mediante la prueba de formación de tubo germinativo en suero fetal bovino, para ello se partió de un cultivo de cepa de referencia de *Candida albicans* (ATCC 10231) de 24 h de crecimiento, del cual se tomaron 100  $\mu$ L para la inoculación de tubos con 500  $\mu$ L de suero a fin de alcanzar un volumen de 600  $\mu$ L, éstos fueron adicionados con EH (4 mg/mL)

y con MP (0.5 mg/mL) y control sin EH y MP. Se incubaron a 35° C. y después de tres horas se observó al microscopio óptico para determinar positivo con crecimiento del tubo germinativo y negativo con inhibición del tubo germinativo y se midió su longitud y diámetro de los conidios, mediante el análisis de imagen, con el programa Image Pro-Express Versión 4.

El análisis cuantitativo de la inhibición del tubo germinativo se realizó con un conteo de 10 células para determinación del crecimiento del tubo germinativo El análisis estadístico se realizó con la prueba de comparación múltiple Tuckey's con ANOVA, usando el programa GraphPad Prism versión 5.01.

#### **7.1.3.5. EVALUACIÓN DEL CAMBIO MORFOLÓGICO**

Se determinó a partir de la preparación de tubos con 1000 µL de caldo dextrosa sabouroud estéril, agregando concentraciones de 4 mg de EH/mL y 0.5 mg de MP/mL, contra 1000 µL a partir de un cultivo de *Candida albicans* (ATCC 10231) de 24 h. Se incubó a 35° C durante 24 h y control sin EH ó MP. Se realizó una preparación en fresco con 30 µL de dicha suspensión, para después ser observado por microscopio para medir tamaño de la célula, forma y el conteo de número de células por campo, mediante el análisis de imagen, con el programa Image Pro-Express Versión 4.

A partir de cultivo de *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* de 48 h, se incubaron con 1000 µL a tubos con 1000 µL de caldo dextrosa sabouroud estéril, agregando concentraciones de 0.25 mg de EH/mL y 0.75 mg de MP/mL. Se homogeneizó e incubó a 35° C; después de 48 h, se tomó 30 µL en donde se realizaron preparaciones en fresco. El análisis del cambio morfológico se efectuó con un conteo de 10 células por triplicado, por medio de análisis de imágenes, para determinar los cambios morfológicos observados (tamaño y forma), así como, el conteo de número de células por campo (15 campos). El análisis estadístico se realizó con la prueba de comparación múltiple Tuckey's con ANOVA, usando el programa GraphPad Prism versión 5.01.

**7.2. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL PARA EVALUAR EL EFECTO ANTIMICÓTICO DE *Brickellia veronicaefolia* (HBK) Gray SOBRE *Candida albicans* (ATCC 10231).**

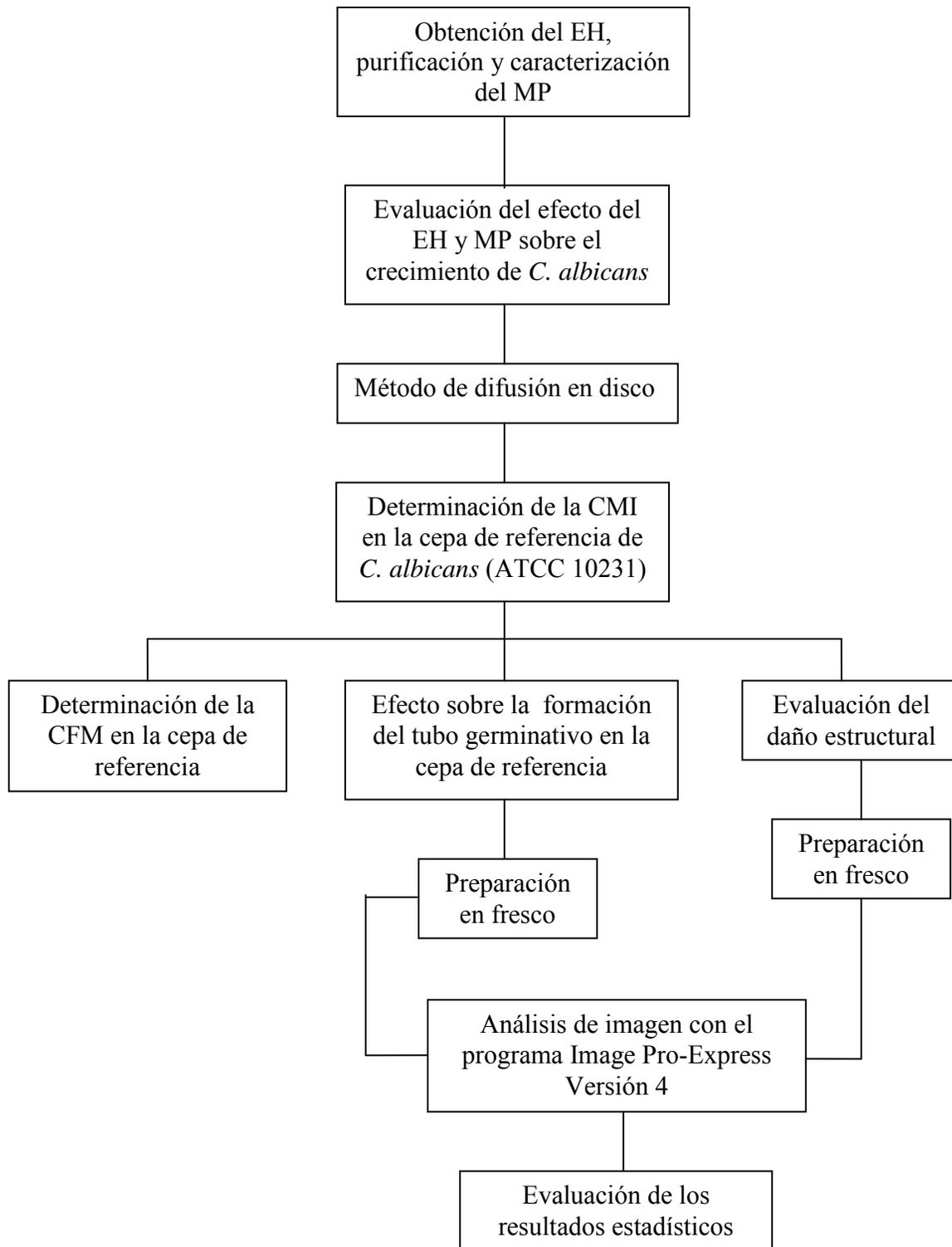


Diagrama 1. Estrategia experimental para realizar el estudio del efecto de EH y MP sobre *Candida albicans* (ATCC 10231).

**7.3. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL PARA EVALUAR EL EFECTO ANTIMICÓTICO DE *Brickellia veronicaefolia* (HBK) Gray SOBRE *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans***

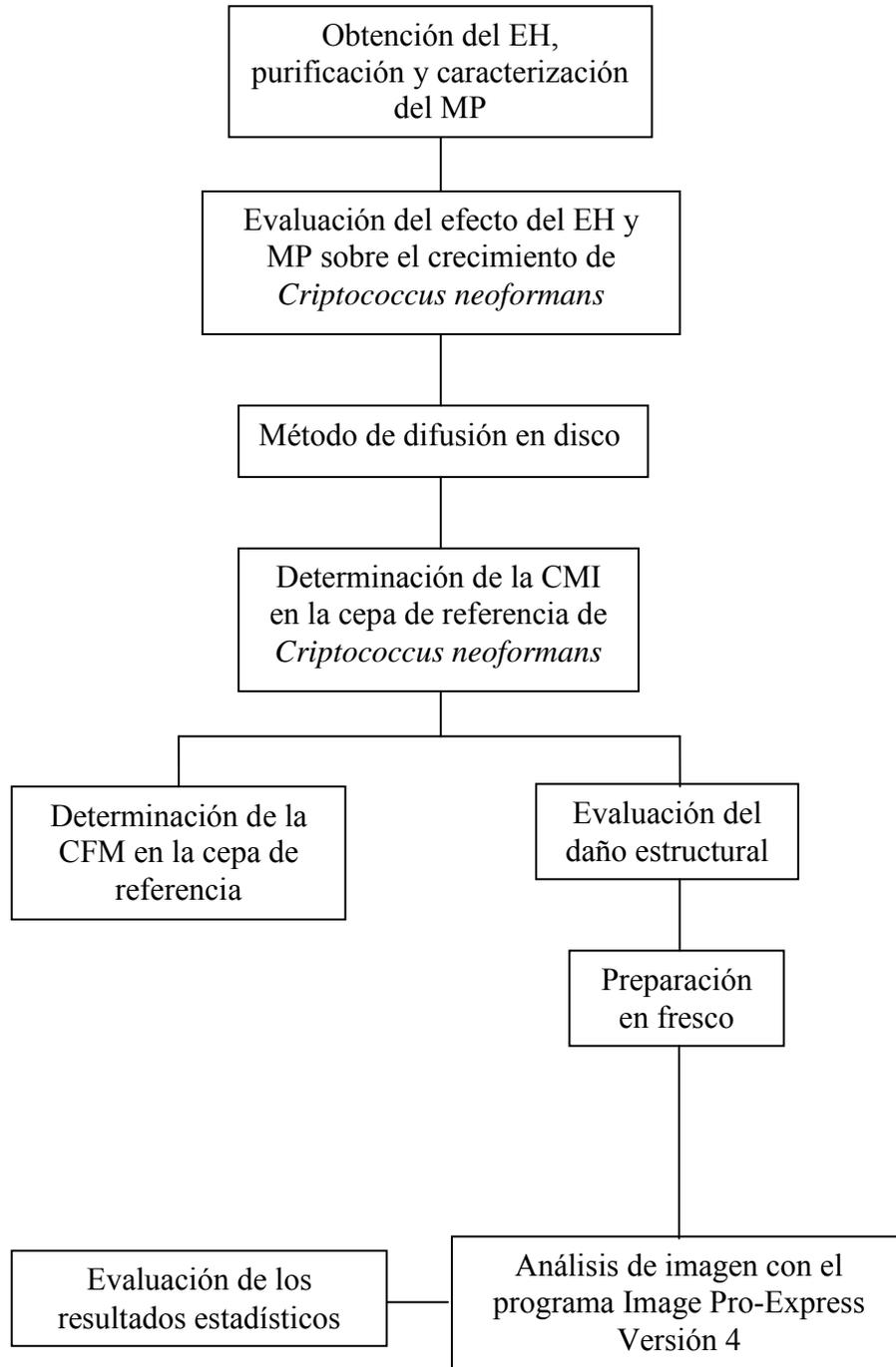


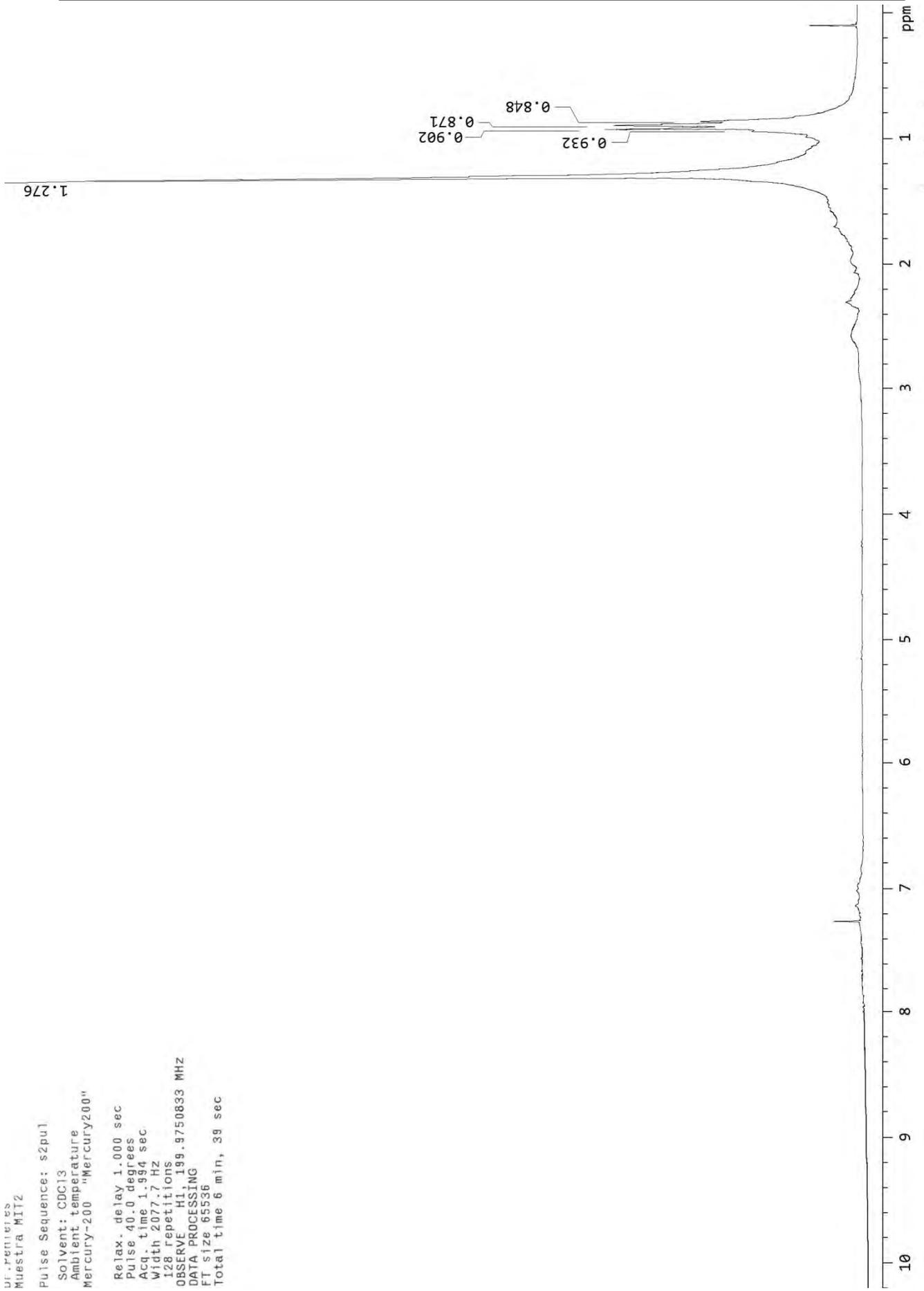
Diagrama 2. Estrategia experimental para realizar el estudio del efecto de EH y MP sobre *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*

## 8. RESULTADOS

Se obtuvo el extracto con 1.192 Kg de hoja molida sometidos a maceración con hexano, obteniendo como peso final 99.0 g de EH, se realizaron pruebas de evaluación de la actividad antimicótica, encontrando resultados positivos, que se mencionan posteriormente. Estos resultados nos llevaron a considerar la purificación del metabolito secundario mayoritario del extracto trabajado, utilizando 44.5 g de EH, obteniendo 7 g de MP, el cual fue obtenido en forma pura mediante cromatografía en columna (90:10 Hexano: Acetato de etilo) y una retención relativa de  $R_f = 0.87$  por medio de la cromatografía en capa fina (fase estacionaria: gel de sílice; fase móvil: hexano-acetato de etilo 70:30).

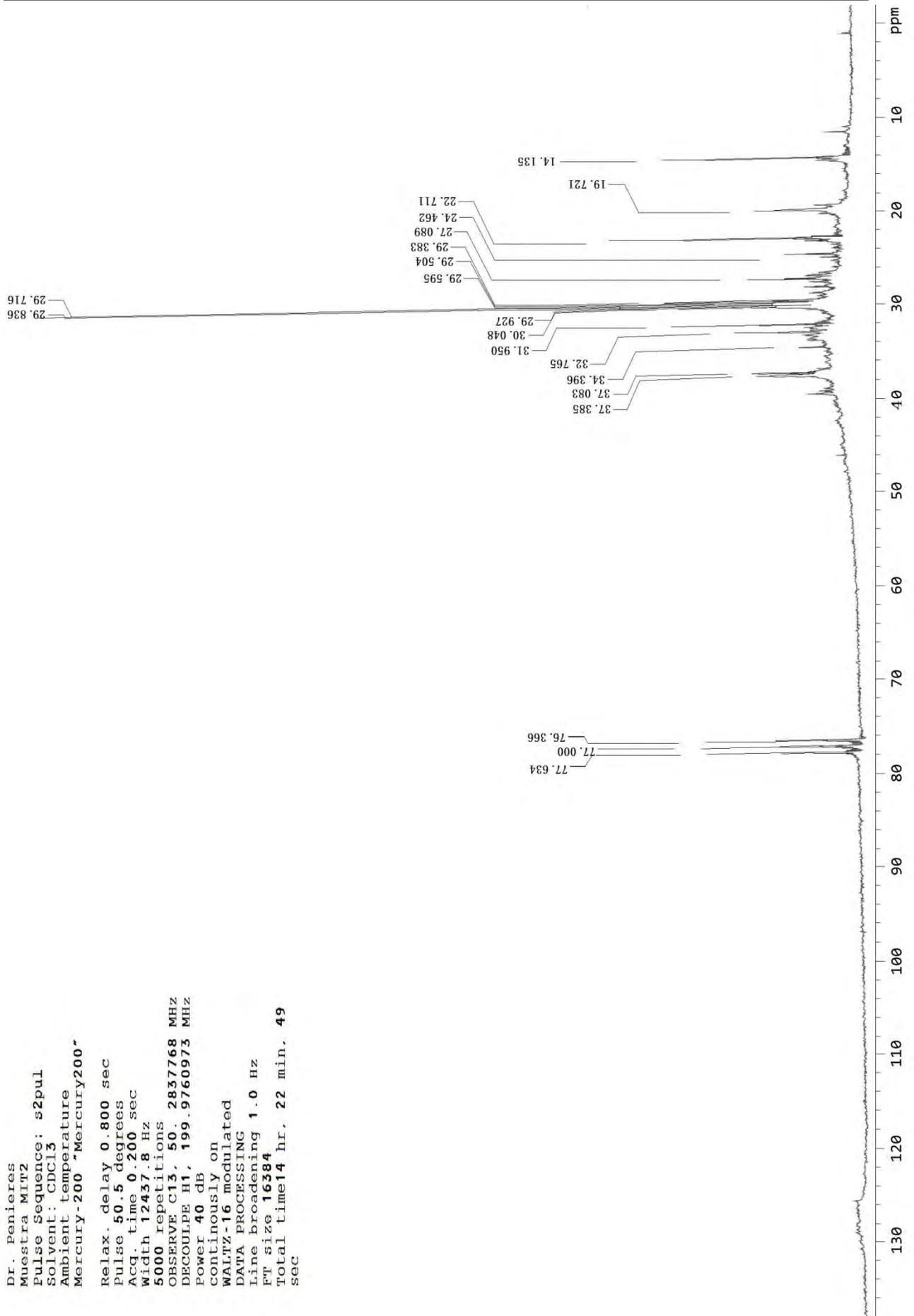
El metabolito secundario mayoritario (**MP**), fue identificado mediante técnicas espectroscópicas convencionales, tales como Resonancia Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  (RMN $^1\text{H}$ ) ver figura 6, Resonancia Magnética Nuclear de  $^{13}\text{C}$  (RMN $^{13}\text{C}$ ) ver figura 7 y Espectrometría de masas (EM) ver figura 8, la cual corresponde al alcano hexatriacontano ( $\text{C}_{36}\text{H}_{74}$ ). El análisis de estos resultados de identificación se presenta posteriormente.

El metabolito puro es polvo blanco, con olor característico y altamente soluble a disolventes no polares y poco polares (hexano, acetato de etilo, DMSO, Acetona, etanol y Cloroformo), su punto de fusión es de 68 – 70 °C.



DE: penitentes  
 Muestra MITZ  
 Pulse Sequence: s2pul1  
 Solvent: CDCl3  
 Ambient temperature  
 Mercury-200 "Mercury200"  
 Relax. delay 1.000 sec  
 Pulse 40.0 degrees  
 Acq. time 1.994 sec  
 Width 2077.7 Hz  
 128 repetitions  
 OBSERVE HI, 199.9750833 MHz  
 DATA PROCESSING  
 FT size 65536  
 Total time 6 min, 39 sec

Figura 6. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>/TMS), determinado a 200 MHz para el Metabolito Puro.



Dr. Penieres  
 Muestra MIT2  
 Pulse Sequence: s2pul  
 Solvent: CDCl3  
 Ambient temperature  
 Mercury-200 "Mercury200"  
 Relax. delay 0.800 sec  
 Pulse 50.5 degrees  
 Acq. time 0.200 sec  
 Width 12437.8 Hz  
 5000 repetitions  
 OBSERVE C13, 50. 2837768 MHz  
 DECOUPLE H1, 199.9760973 MHz  
 Power 40 dB  
 continuously on  
 WALTZ-16 modulated  
 DATA PROCESSING  
 Line broadening 1.0 Hz  
 FT size 16384  
 Total time 14 hr, 22 min, 49 sec

Figura 7. Espectro de RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>/TMS), determinado a 50.2 MHz para el Metabolito Puro.

[ Mass Spectrum ]  
 Date : Dr-Lopez-Jose-057 Date : 24-Feb-120 14:45  
 Sample: 497 M246 MITZE RX505HH  
 Note : Javier-Perez  
 Inlet : Direct Ion Mode : EI+  
 Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]  
 RT : 0.56 min Scan# : (13,18) Temp : 22.4 deg.C  
 BP : m/z-57.0000 Int. : 1500.75  
 Output m/z range : 10.0000 to 538.7923 Cut Level : 0.00 % 15872972

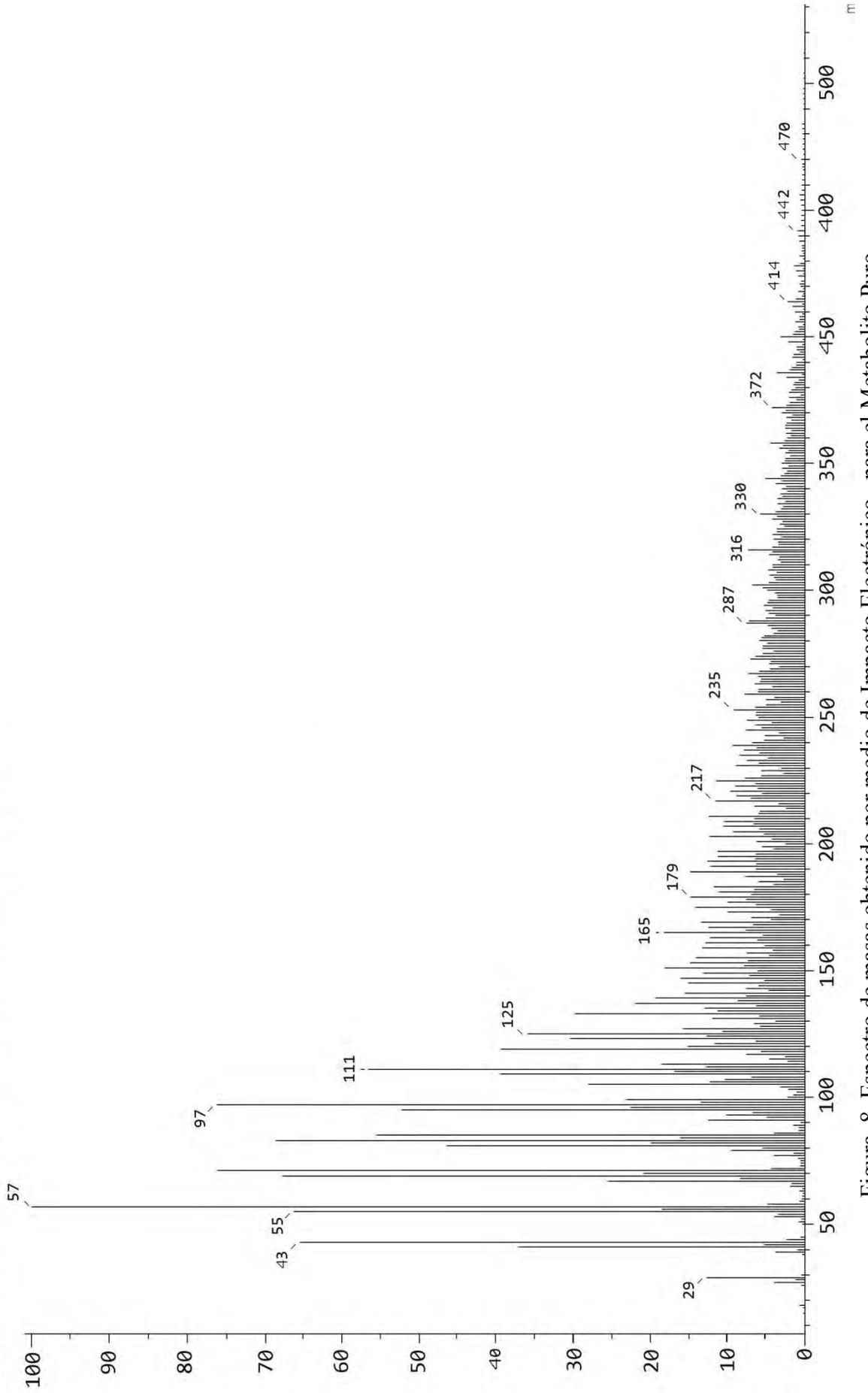


Figura 8. Espectro de masas obtenido por medio de Impacto Electrónico, para el Metabolito Puro.

## MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO

En la figura 9 se ilustran los halos de inhibición producidos por los discos impregnados con 2 y 3 mg de MP/mL (A), 4 y 5 mg de MP/mL (B), 2 y 3 mg de EH/mL (C) y 4 y 5 mg de EH/mL (D) contra *Candida albicans* (ATCC 10231), con un porcentaje de inhibición al 20% como lo muestran en las tablas 5 y 6. Se empleó como control positivo Ketoconazol 7 $\mu$ g/mL (E).

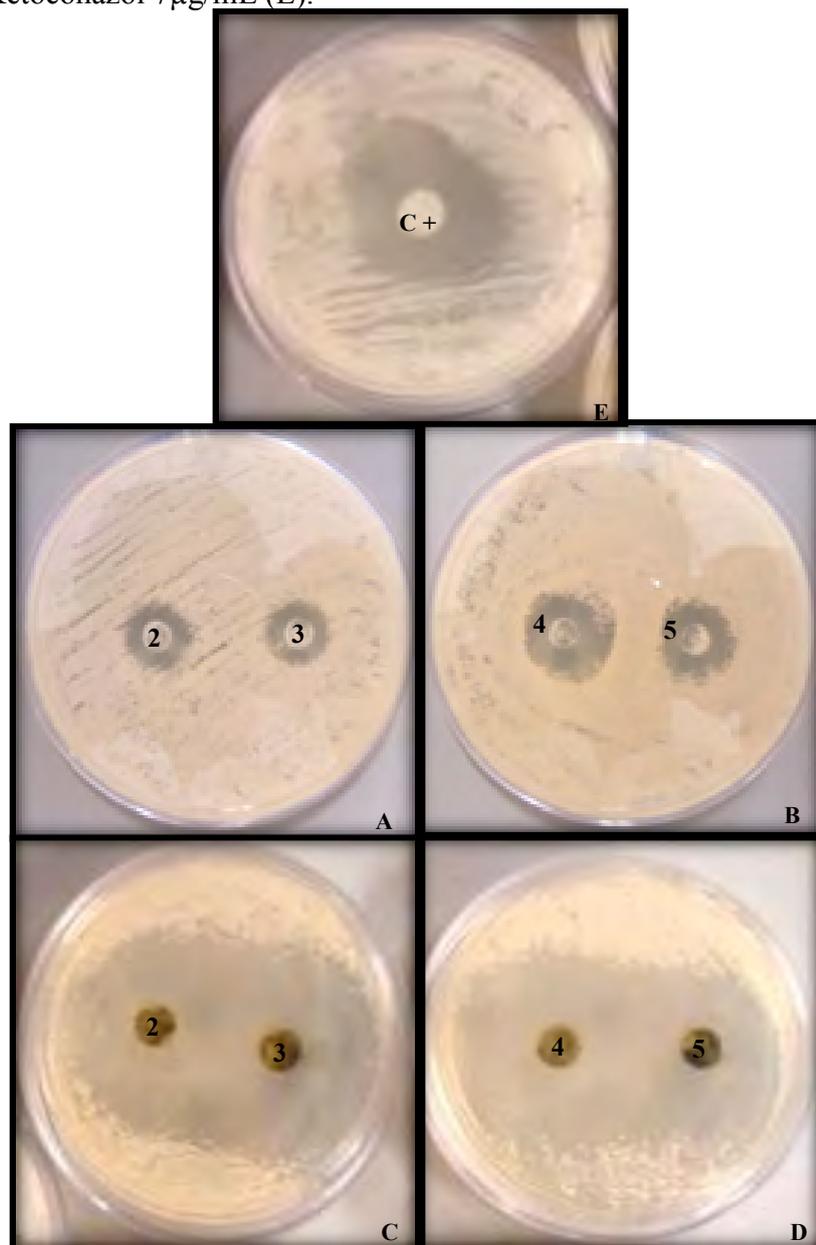


Figura 9. Método de difusión en agar. Determinación de halos de inhibición de *Candida albicans* (ATCC 10231), con discos impregnados de EH, MP y como Control positivo (C+) Ketoconazol 7 $\mu$ g/mL. El ensayo se llevó a cabo por duplicado en experimentos independientes a 35° C.

Para *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*, en la figura 10 se muestran los halos de inhibición con concentraciones de 2 mg de EH/mL y 2 mg de MP/mL (A), 3 y 4 mg de EH/mL, 3 y 4 mg de MP/mL (B), 5 mg de EH/mL y 5 mg de MP/mL (C). Utilizando como control positivo (C+) Ketoconazol 7 $\mu$ g/mL (A y C). Con porcentajes de inhibición mayor al 20 % tanto para EH y MP, ver tablas 5 y 6.

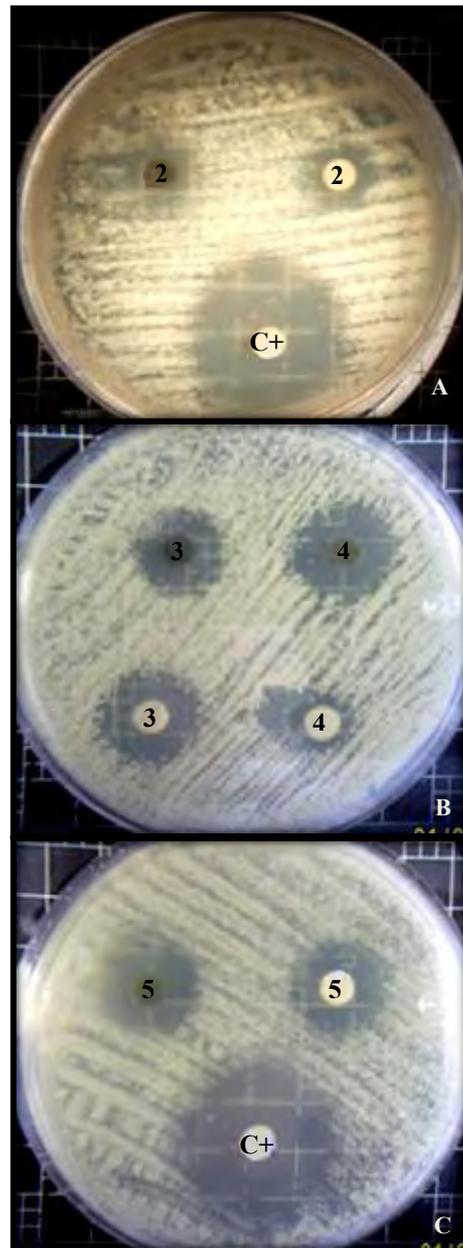


Figura 10. Método de difusión en agar. Determinación de halos de inhibición de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*. Control positivo (C+) Ketoconazol 7 $\mu$ g/mL. El ensayo se llevó a cabo por duplicado en experimentos independientes a 35° C.

<b>Tabla No. 5 Porcentaje de inhibición de <i>C.albicans</i> y <i>C. neoformans</i> frente a EH</b>					
<b>CONCENTRACIÓN (mg/mL)</b>	2	3	4	5	C+
<b>Promedio halos de inhibición (mm)</b>	30	31.66	34	35	43.33
<b>% inhibición <i>C. albicans</i></b>	30.76	26.93	21.53	19.22	
<b>Promedio halos de inhibición (mm)</b>	13.33	19.16	27.33	34.33	44.5
<b>% inhibición <i>C. neoformans</i></b>	70.04	56.94	38.58	22.85	

<b>Tabla No. 6 Porcentaje de inhibición de <i>C.albicans</i> y <i>C. neoformans</i> frente a MP</b>					
<b>CONCENTRACIÓN (mg/mL)</b>	2	3	4	5	C+
<b>Promedio halos de inhibición (mm)</b>	12	13	17.16	22.33	43.33
<b>% inhibición <i>C. albicans</i></b>	72.31	70.00	60.40	48.47	
<b>Promedio halos de inhibición (mm)</b>	14.66	18.33	26.66	28.66	44.5
<b>% inhibición <i>C. neoformans</i></b>	67.06	58.81	40.09	35.60	

### CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)

Se partió de concentraciones de 2.5 mg de EH/mL (A), 3.0 mg de EH/mL (B), 3.5 mg de EH/mL (C), 4.0 mg de EH/mL (D), 4.5 mg de EH/mL (E) y 5mg/mL de EH (F) sobre el crecimiento de *Candida albicans* (ATCC 10231) como se observa en la figura 11., de acuerdo con los resultados obtenidos, revela que la CMI del EH fue de 4.0 mg de EH /mL (D). Para el caso del MP se partió de concentraciones de 0.25 mg de MP / mL (G), 0.5 mg de MP / mL (H), 1.0 mg de MP / mL (I), 1.5 mg de MP / mL (J), 2.0 mg de MP / mL (K), 2.5 mg de MP / mL (L), como se aprecia en la figura 12, la cual mostró inhibición de crecimiento con un CMI de 0.25 mg de MP/mL (G). Control positivo *Candida albicans* (ATCC 10231) (M).

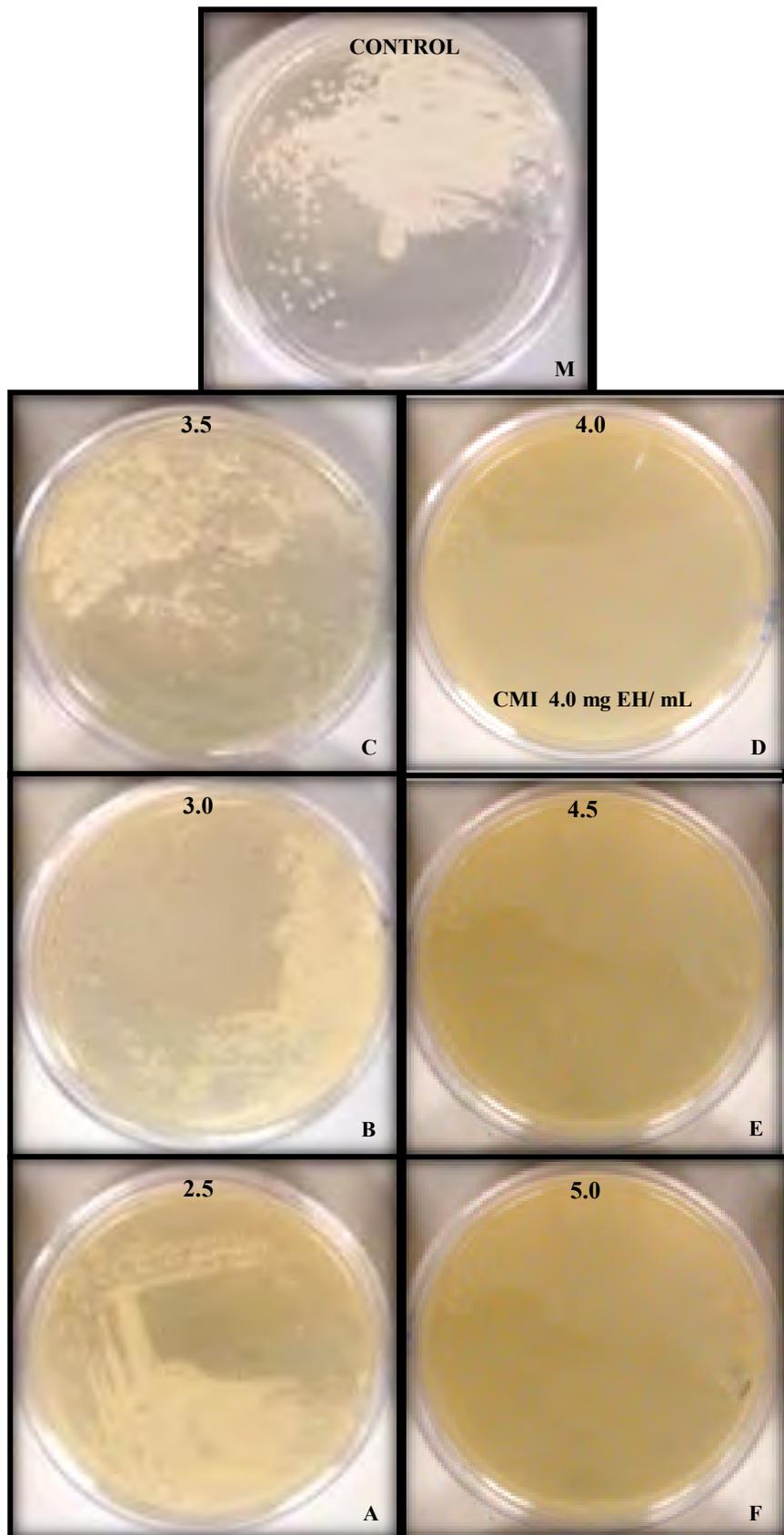


Figura 11. Determinación de CMI del EH contra *Candida albicans* (ATCC 10231), por medio de la técnica de dilución en agar. Fue de 4.0 mg de EH/ mL (D). El ensayo se llevó a cabo por duplicado en experimentos independientes a 35° C por 24 h.

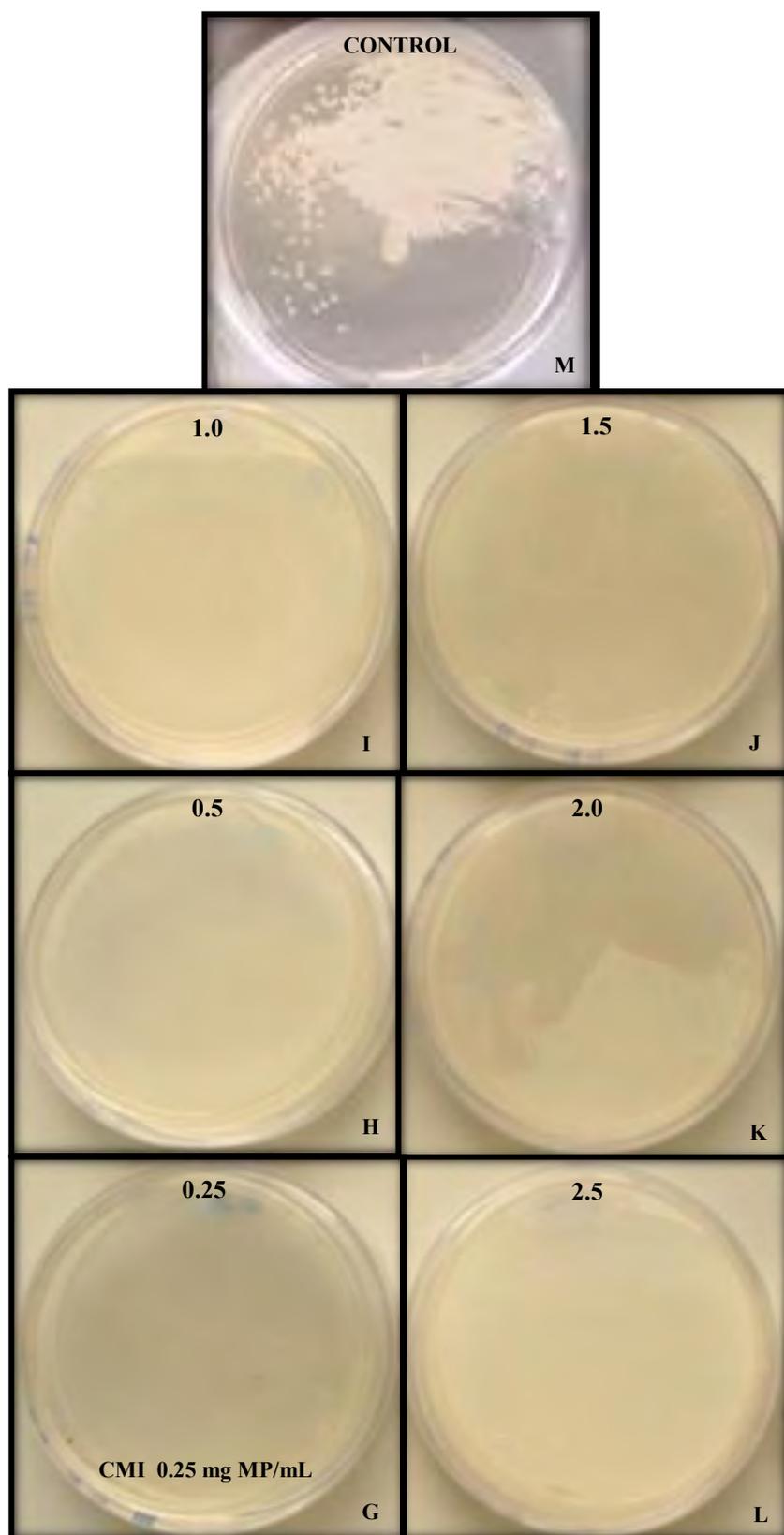


Figura 12. Determinación de CMI del MP contra *Candida albicans* (ATCC 10231), por medio de la técnica de dilución en agar. La CMI del metabolito puro fue de 0.25 mg de MP/mL (H). El ensayo se llevó a cabo por duplicado en experimentos independientes a 35° C por 24 h.

Para determinar la actividad antifúngica del EH y MP sobre el crecimiento de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*, ver figura 13, se partieron de concentraciones de 0.1 mg de EH/mL (A), 0.25 mg de EH/mL (B), 0.5 mg de EH/mL (C), 0.75 mg de EH/mL (D), 1.0 mg de EH/mL (E), 1.5 mg de EH/mL (F) y 0.1 mg de MP/mL (G), 0.25 mg de MP/mL (H), 0.5 mg de MP/mL (I), 0.75 mg de MP/mL (J), 1.0 mg de MP/mL (K), 1.5 mg de MP/mL (L), ver figura 14.

El resultado obtenido demostró inhibición del crecimiento, con un CMI de 0.5 mg EH/mL (C) y con respecto a MP fue de 0.1 mg de MP/mL (G). Control positivo *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (M).

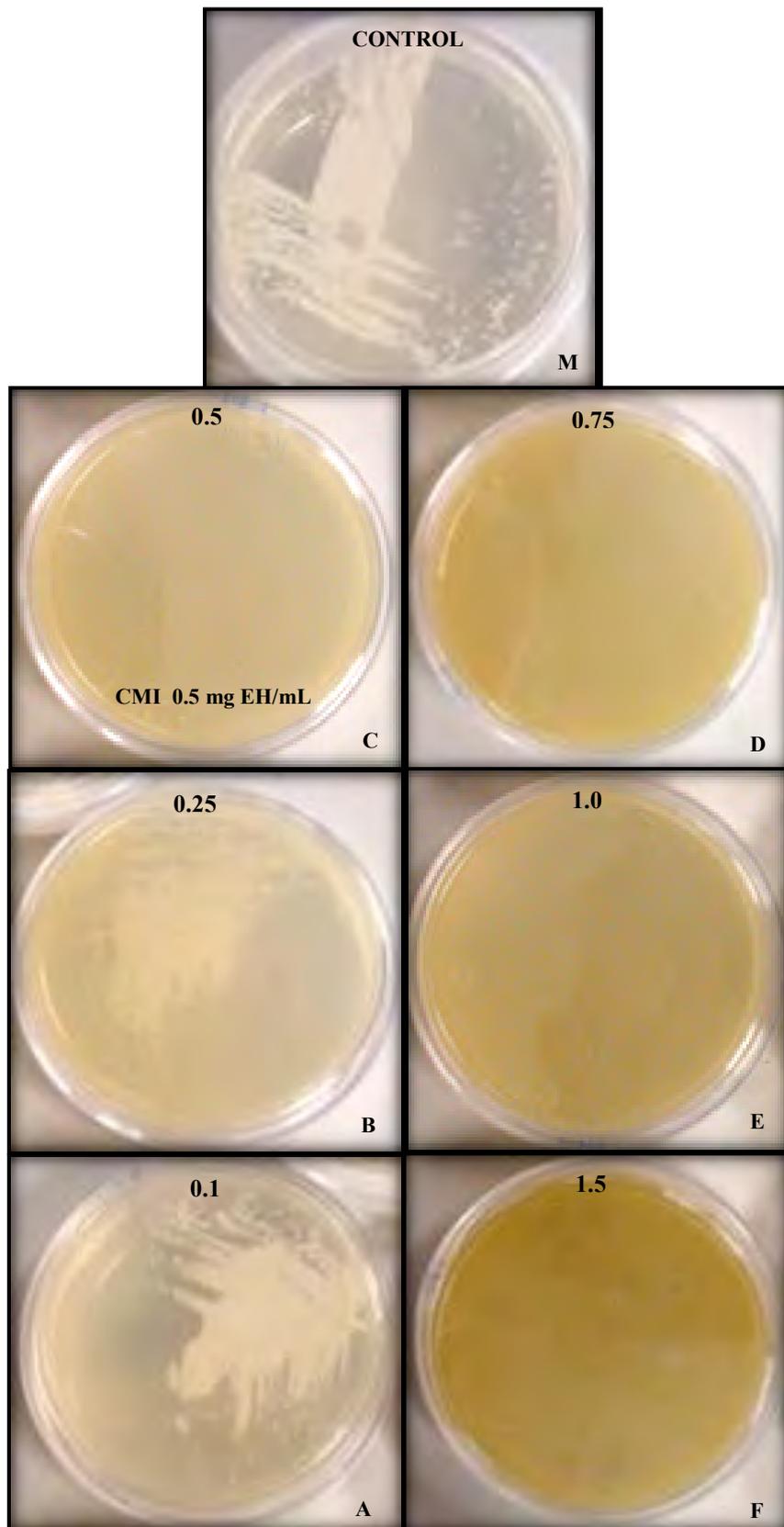


Figura 13. Determinación de CMI del EH contra *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*, por medio de la técnica de dilución en agar. La CMI del EH fue de 0.5 mg de EH/mL (D). El ensayo se llevó a cabo por duplicado en experimentos independientes a 35° C por 48 h.

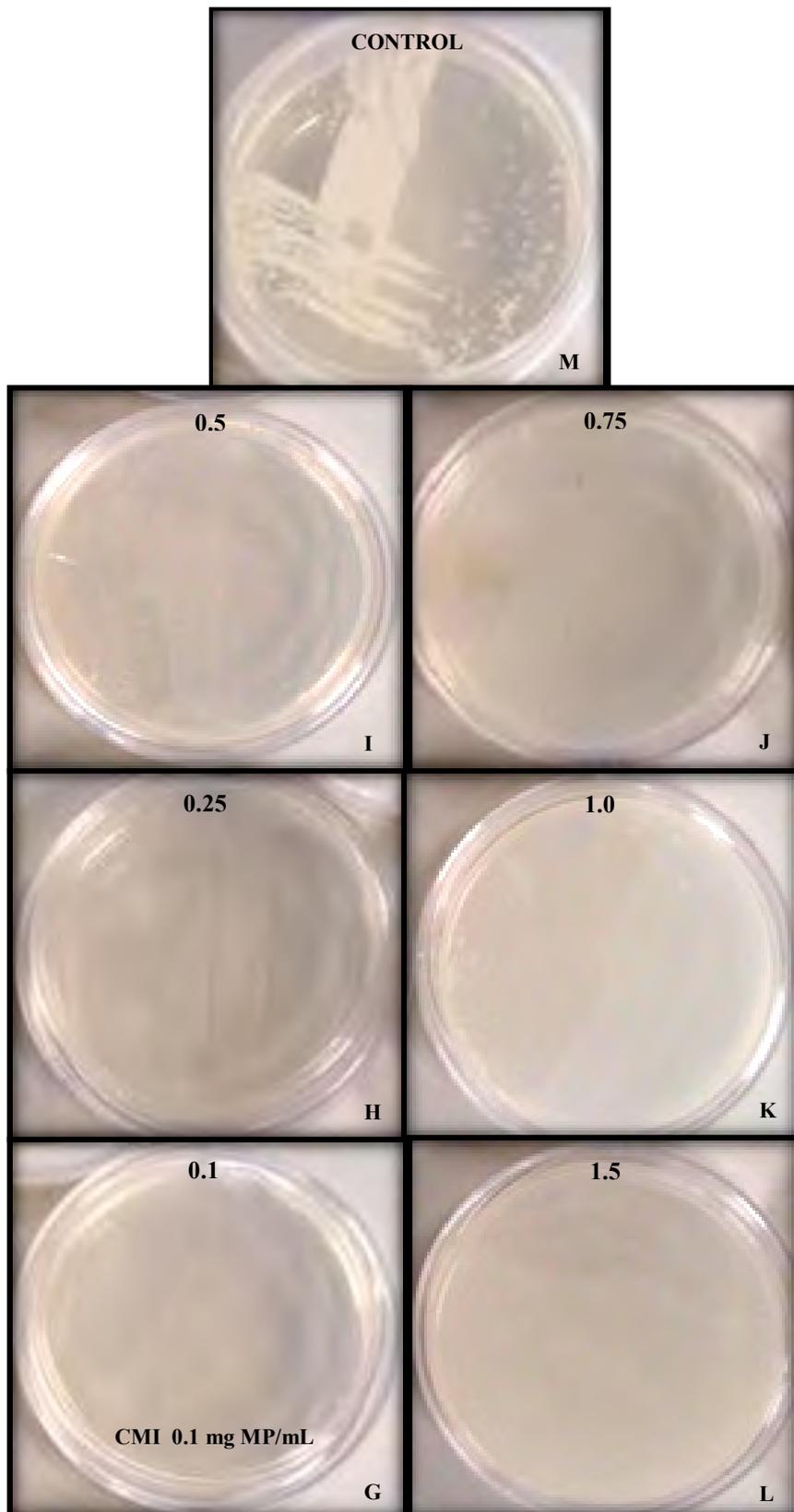


Figura 14. Determinación de CMI del MP contra *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* por medio de la técnica de dilución en agar. La CMI del MP fue de 0.1 mg de MP/mL (H). El ensayo se llevó a cabo por duplicado en experimentos independientes a 35° C por 48 h.

### CONCENTRACIÓN MÍNIMA FUNGICIDA (CMF)

La CMF es la menor concentración del antifúngico (EH y MP) que no muestra crecimiento o bien, éste es inferior a tres colonias, la cual corresponde a 99.5 % de la actividad fungicida. Dicho de otro modo, es la concentración del compuesto que inhibe un 99–99.5 % de hongos levaduriformes, así que se puede distinguir la concentración fungicida a una concentración fungistática, como podría ser la CMI. En la figura 15 en el cuadrante (A), se partió con concentraciones de 2.5 mg de EH/mL, 3.0 mg de EH/mL, 3.5 mg de EH/mL, 4.0 mg de EH/mL y en el cuadrante (B) 4.5 mg de EH/mL, 5 mg de EH/mL, control positivo (C+) *Candida albicans* (ATCC 10231) y control negativo sin inoculación. La CMF fue de 4.0 mg de EH/mL (A).

Para el MP se enfrentó contra *Candida albicans* (ATCC 1023), en el cuadrante (C) se partió de 0.25 mg de MP/mL, 0.5 mg de MP/mL, 1.0 mg de MP/mL y 1.5 mg de MP /mL, y para el cuadrante (D), 2.0 mg de MP/mL, 2.5 mg de MP/mL, control positivo (C+) *Candida albicans* (ATCC 10231) y control negativo sin inoculación. La CMF fue de 1.0 mg de MP/mL (C), ver figura 15.

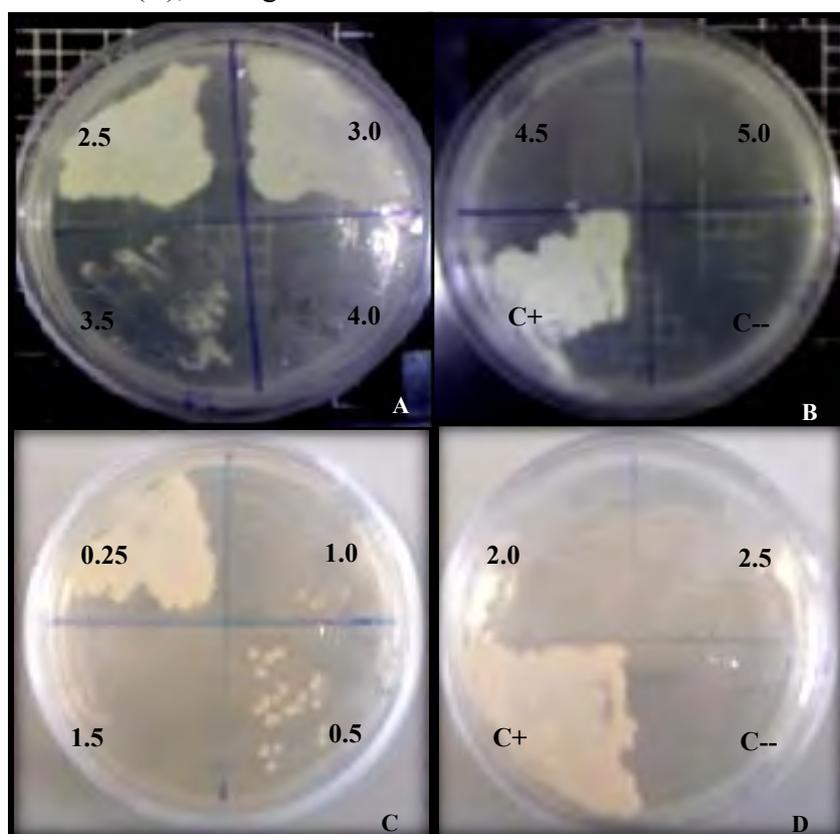


Figura 15. Determinación de CMF de EH y MP, frente a *Candida albicans* (ATCC 10231). La fue 4.0 mg de EH/ mL (A) y 1.0 mg de MP/mL (C) El ensayo se llevó a cabo por duplicado en experimentos independientes a 35° C por 24 h.

En la figura 16 se observan los resultados de la CMF frente a *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*, partiéndose con concentraciones de 0.1 mg de MP/mL y 0.25 mg de MP/mL (A), 0.5 mg de MP/mL y 0.75 mg de MP/mL (B), 1.0 mg de MP/mL, 1.5 mg de MP/mL y el control positivo (C+) cuadrante (C), la CMF fue de 0.75 mg de MP/mL (B). Para el EH se partió de 0.1 mg de EH/mL y 0.25 mg de EH/mL (D), 0.5 mg de EH/mL y 0.75 mg de EH/mL (E), 1.0 mg de EH/mL y 1.5 mg de EH/mL (F). La CMF del EH fue de 0.25 mg de EH/mL (D).

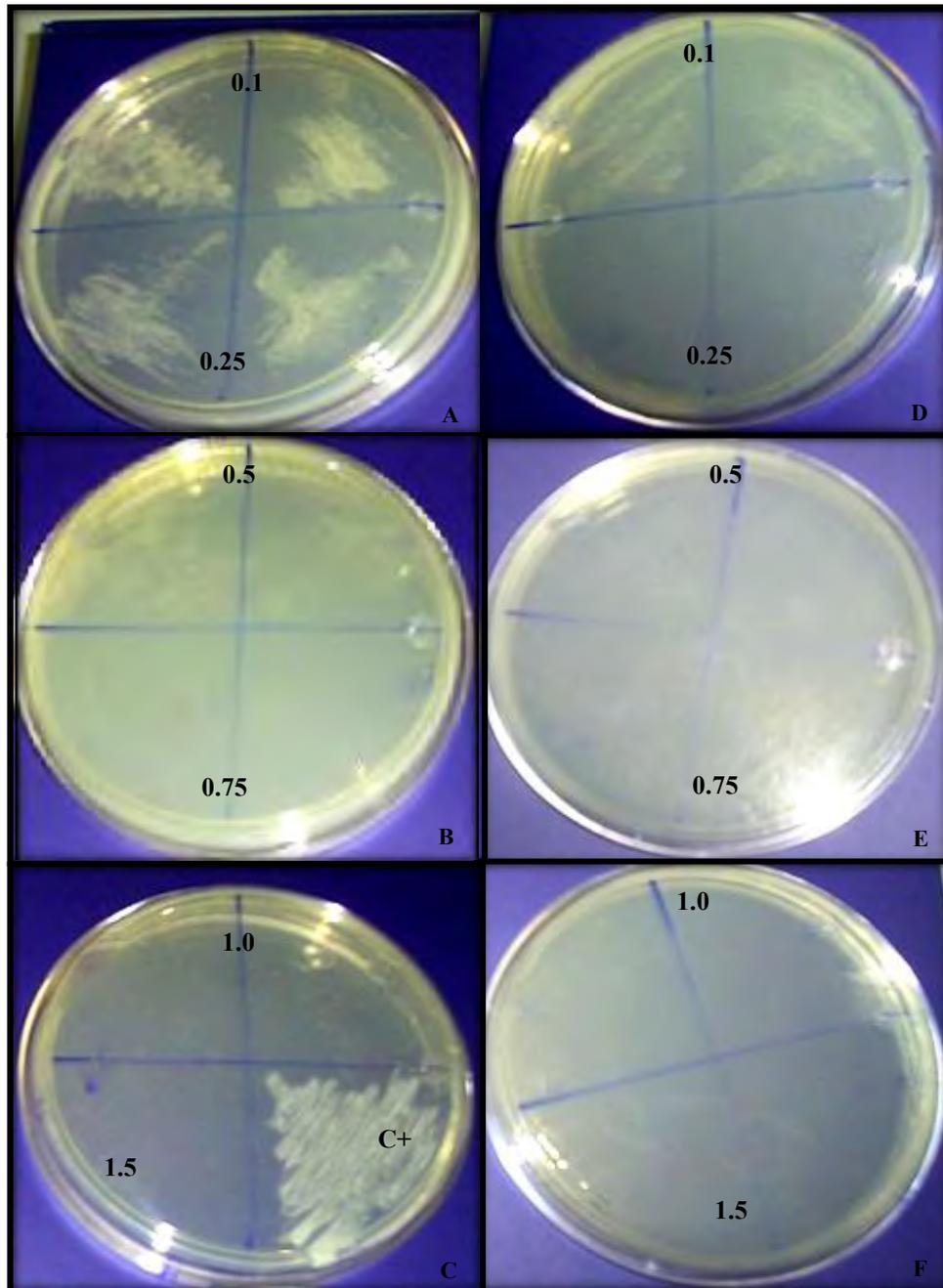


Figura 16. Determinación de CFM de MP y EH contra *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* fue de 0.75 mg de MP/mL (B) y 0.25 de EH/mL (D). El ensayo se llevó a cabo por duplicado en experimentos independientes a 35° C por 48 h.

**INHIBICIÓN DEL TUBO GERMINATIVO**

En la gráfico 1 muestra que hay diferencia significativa en la disminución de la longitud del tubo germinativo tratado con 4 mg de EH/mL, así como la longitud de las células (conidios) y el 97% de las células observadas presentaron formación del tubo germinativo ver gráfico 2, con respecto al control, sin embargo, para la concentración de 1.0 mg de MP/mL hubo inhibición total del tubo germinativo y disminución significativa de la longitud de las células, ver figura 17.

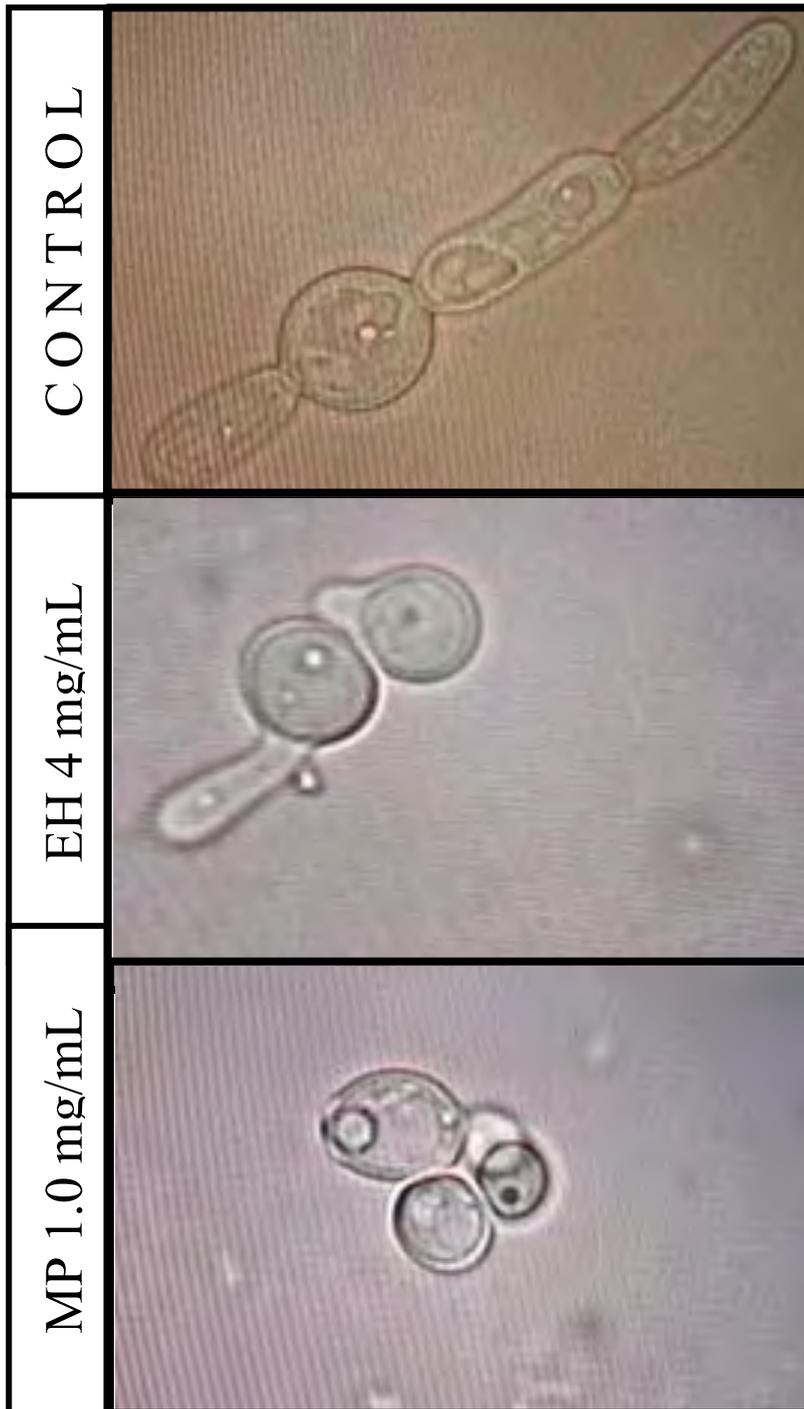


Figura 17. Tubo germinativo de *Candida albicans*, a través del microscopio óptico a 100x.

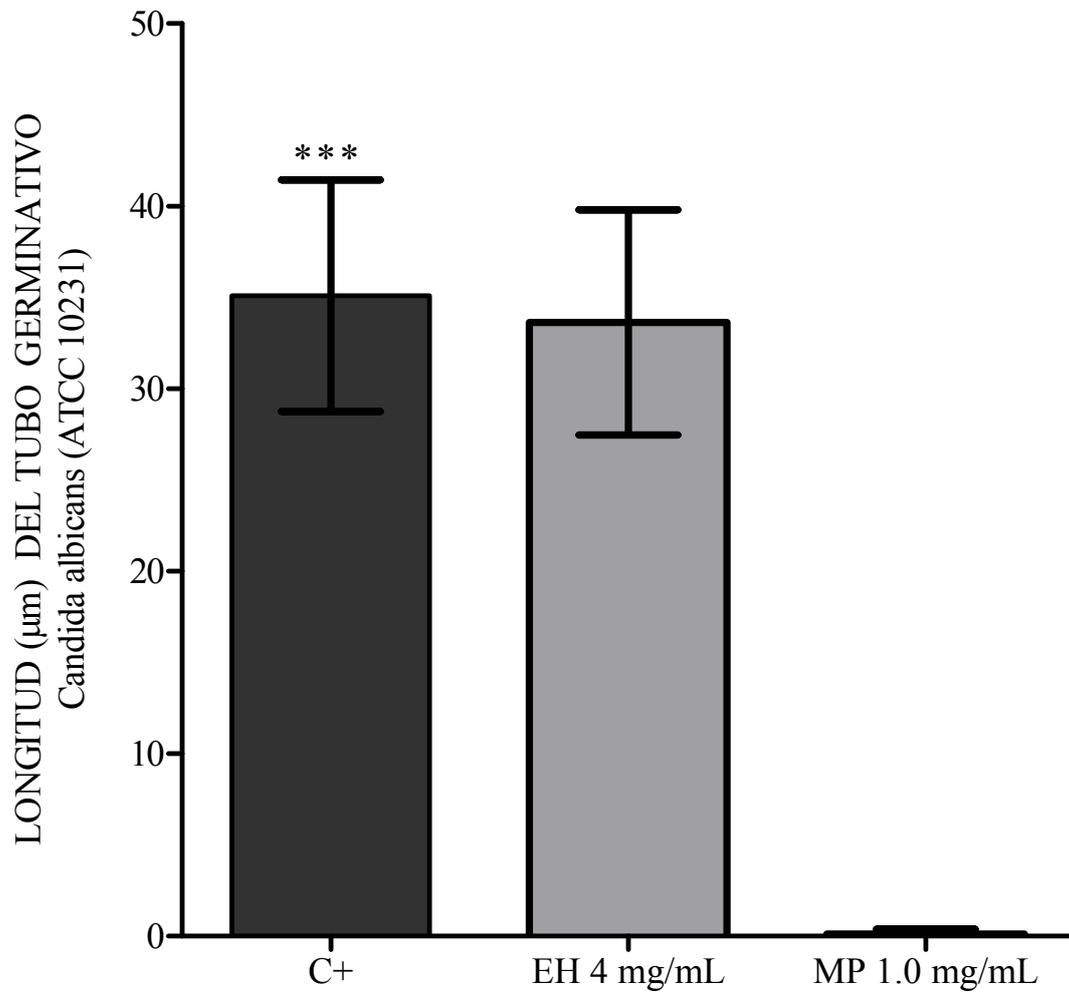


Gráfico 1. Longitud del tubo germinativo, a concentraciones de 4 mg de EH/mL y 1.0 mg de MP/mL. El análisis estadístico se realizó con la prueba de comparación múltiple Tuckey's con ANOVA, usando el programa GraphPad Prism versión 5.01. (C+ vs MP 1.0 mg/mL y 4 mg de EH/mL vs MP 1.0 mg/mL \*\*\* $p < 0.0001$ ).

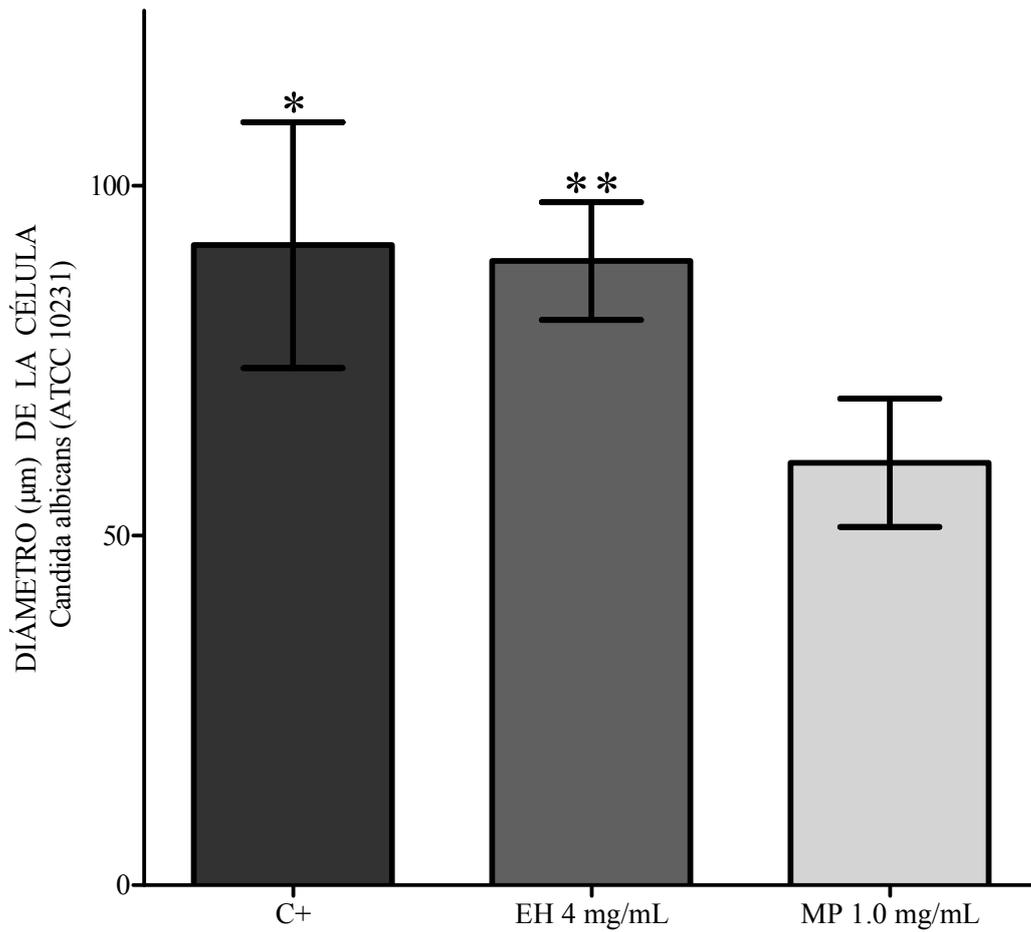


Gráfico 2. Diámetro de las células, a concentraciones de 4 mg de EH/mL y 1.0 mg de MP/mL. El análisis estadístico se realizó con la prueba de comparación múltiple Tuckey's con ANOVA, usando el programa GraphPad Prism versión 5.01. (C+ vs 1.0 mg de MP/mL \*  $p < 0.01$ ) y (4 mg de EH/mL vs 1.0 mg de MP/mL \*\* $p < 0.001$ )

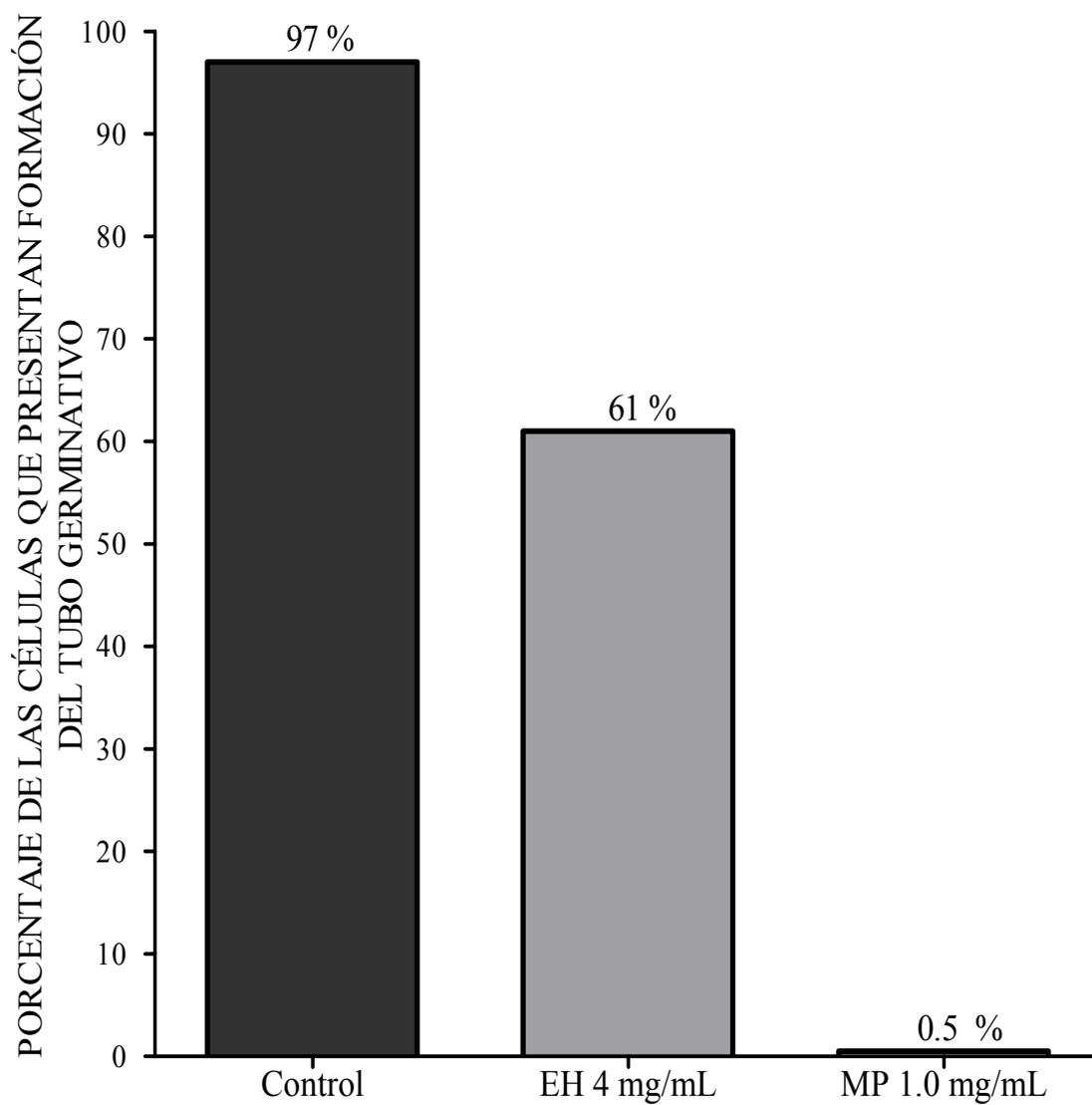


Gráfico 3. Porcentaje de células que presentan formación del tubo germinativo a concentraciones de 4 mg de EH/mL y 1.0 mg de MP/mL.

## **EVALUACIÓN DEL CAMBIO MORFOLÓGICO**

Se observó cambio morfológico en tamaño, forma y número de células por campo, medidas mediante análisis de imágenes, con el programa Image Pro-Express Versión 4 de *Candida albicans* (ATCC 10231) y *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*.

En el gráfico 4 se muestra que hay diferencia significativa en la disminución de la longitud de las células de *Candida albicans* (ATCC 10231), tratadas con 5 mg de EH/mL, 4 mg de EH/mL, 5 mg de MP/mL y 1.0 mg de MP/mL, comparándose con el control durante 0, 24 y 48 horas. En los gráficos 4, 5 y 6, se aprecia disminución muy considerable en el número de células observadas por campo, así como cambios en la morfología de manera visible, observándose de diversos tamaños, alargadas y/o amorfas, ver figuras 18 y 19.

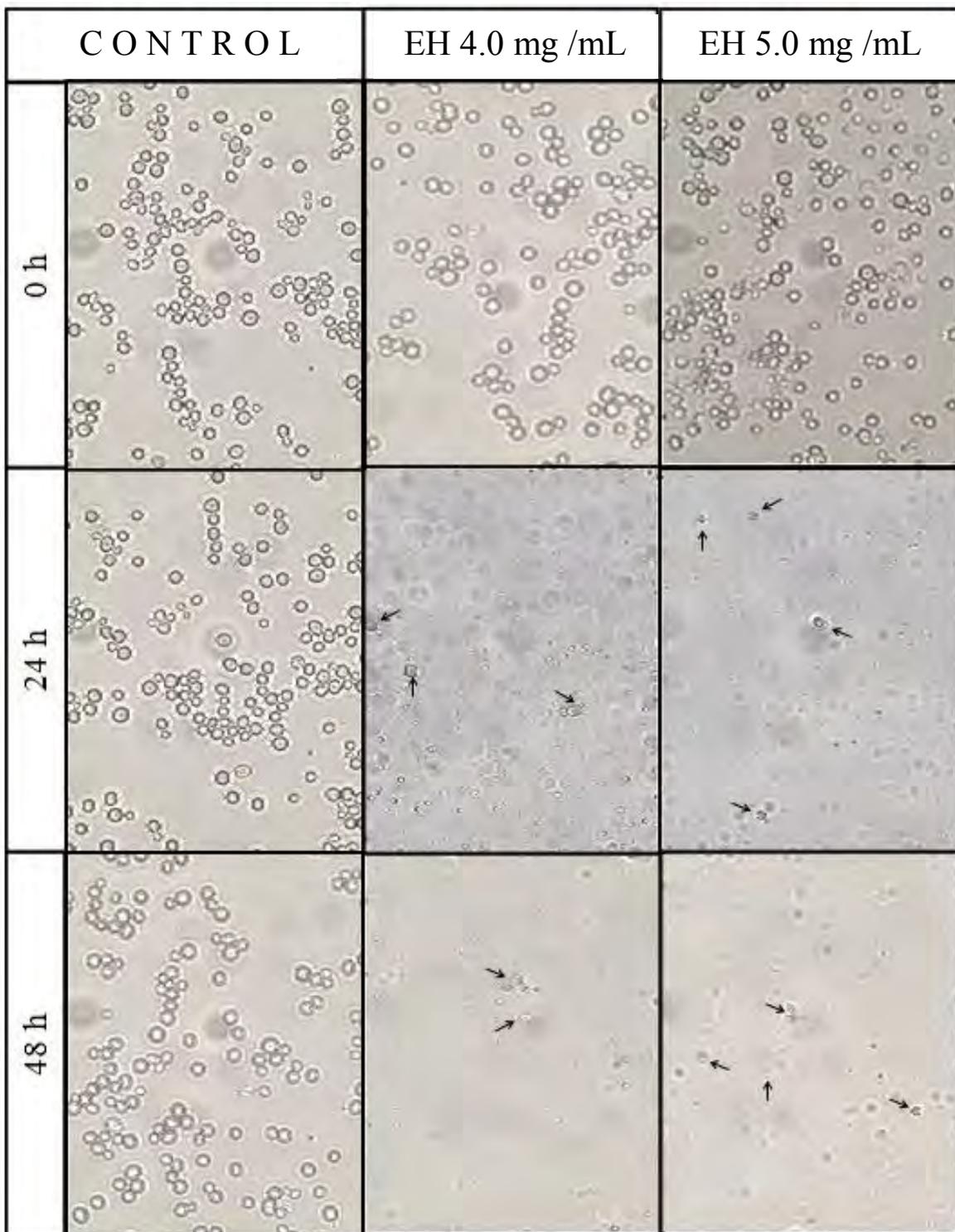


Figura 18. Efecto del EH sobre la morfología y número de células por campo (marcadas con flechas) de *Candida albicans* (ATCC 10231), evaluado con laminillas preparativas en fresco. Fotografías tomadas en el microscopio óptico a 40x.

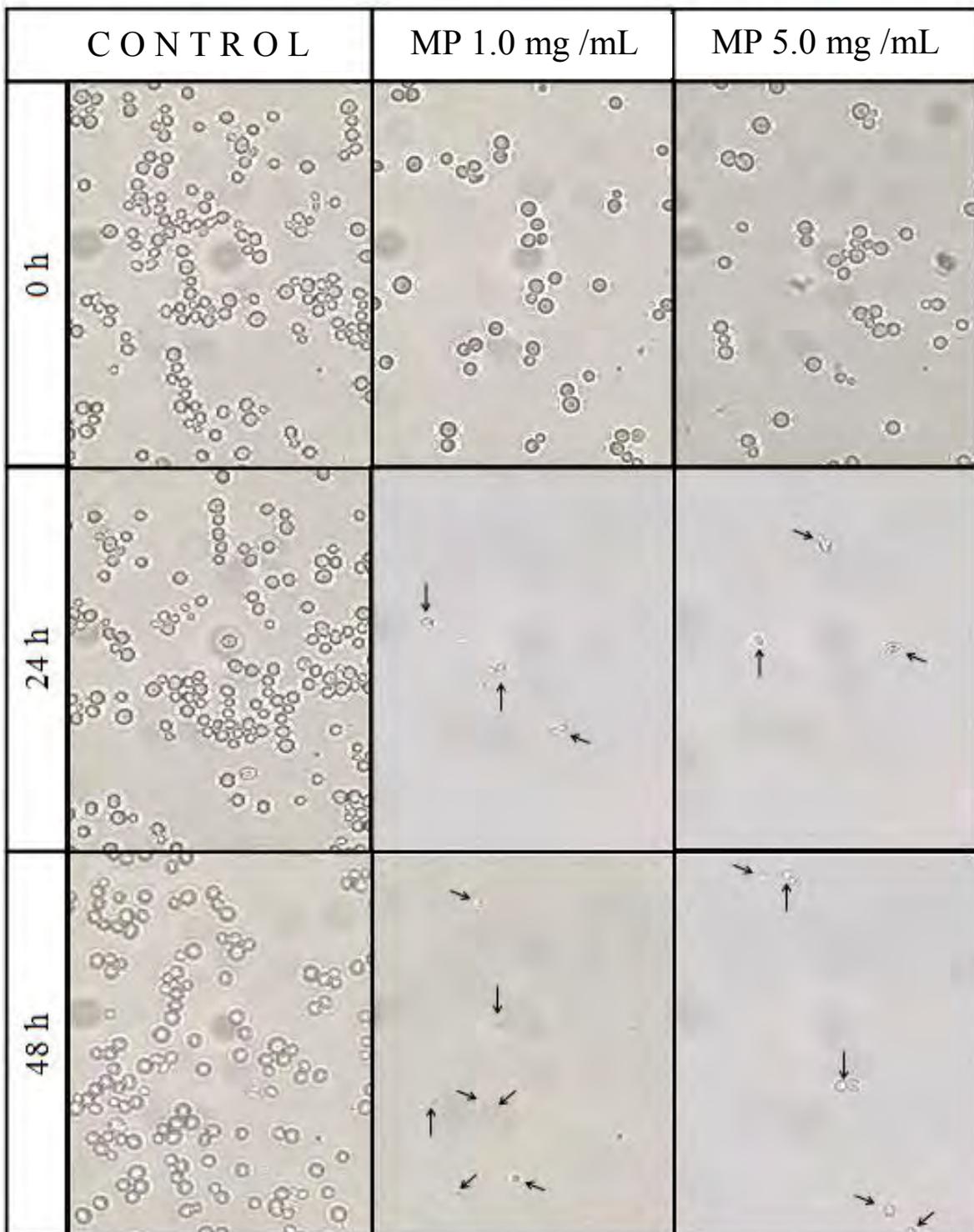


Figura 19. Efecto del MP sobre la morfología y número de células por campo (marcadas con flechas) de *Candida albicans* (ATCC 10231), evaluado con laminillas preparativas en fresco. Fotografías tomadas en el microscopio óptico a 40x.

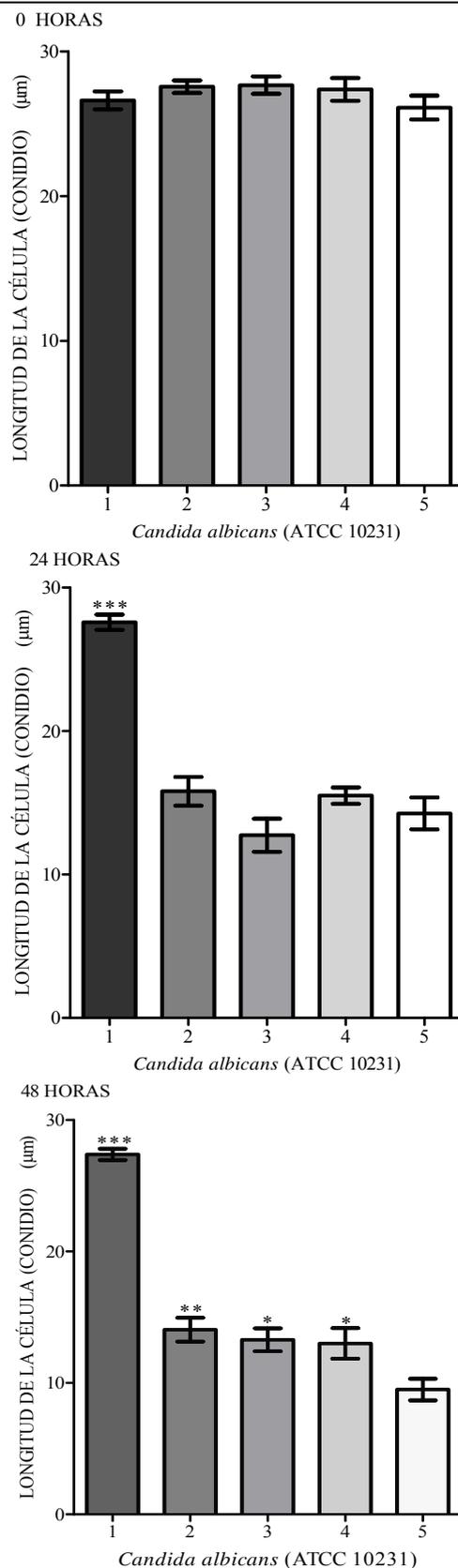


Gráfico 4. Alteración en la longitud de la célula de *Candida albicans* (ATCC 10231), causado por EH y MP a 0, 24 y 48 h. 1. Control, 2. EH 5 mg/mL, 3. EH 4 mg/mL, 4. MP 5 mg/mL, 5. MP 1.0 mg/mL. Diferencias significativas entre las concentraciones estudiadas, esto corresponde a la media error estándar y desviación estándar en las 10 células observadas. (1 vs todas las concentraciones a 24 y 48 h \*\*\* $p < 0.0001$ ), (2 vs 5 a 48 h \*\* $p < 0.001$ ) y (3 vs 5 y 4 vs 5 a 48 h \* $p < 0.05$ ).

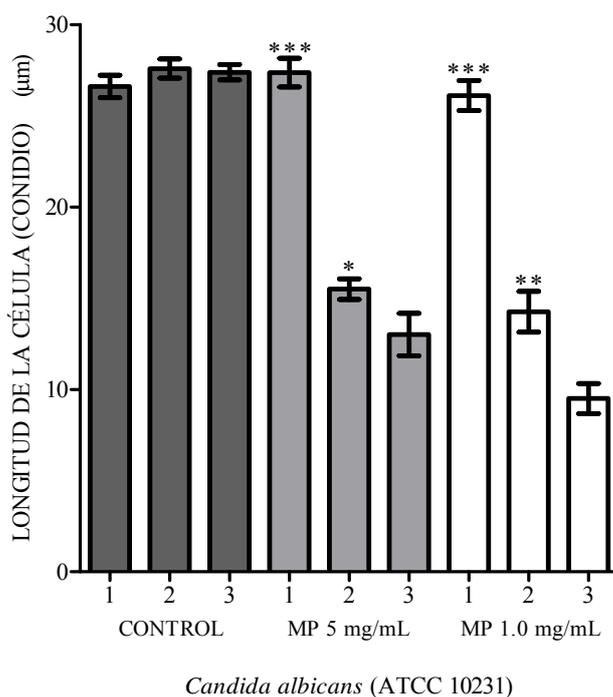
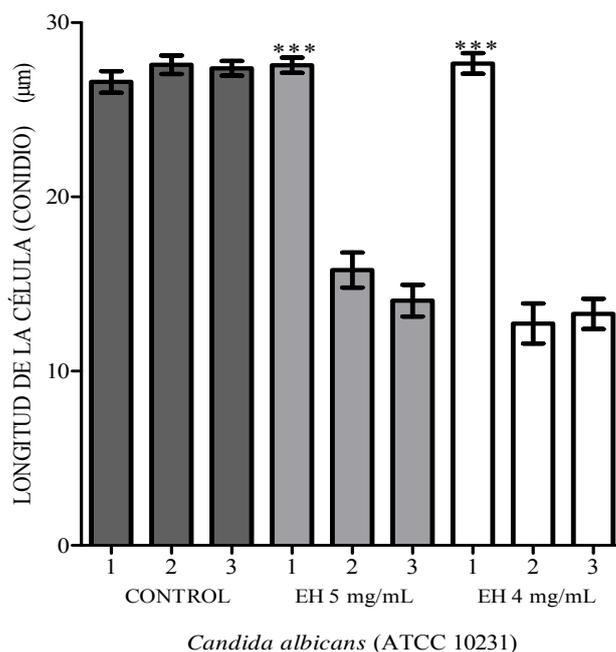


Gráfico 5. Alteración en la longitud de la célula de *Candida albicans* (ATCC 10231), causado por EH (EH 5 mg/mL, EH 4 mg/mL) y MP (MP 5 mg/mL, MP 1.0 mg/mL) comparadas con el Control a 1. 0 h, 2. 24 h y 3. 48 h. Diferencias significativas entre las concentraciones estudiadas, esto corresponde a la media error estándar y desviación estándar en las 10 células observadas. (Control vs todas las concentraciones a 2 y 3 respectivamente \*\*\* $p < 0.0001$ ), (MP 1.0 mg/mL 2 vs 3 \*\* $p < 0.001$ ) y (MP 5 mg/mL 2 vs 3 \* $p < 0.05$ ).

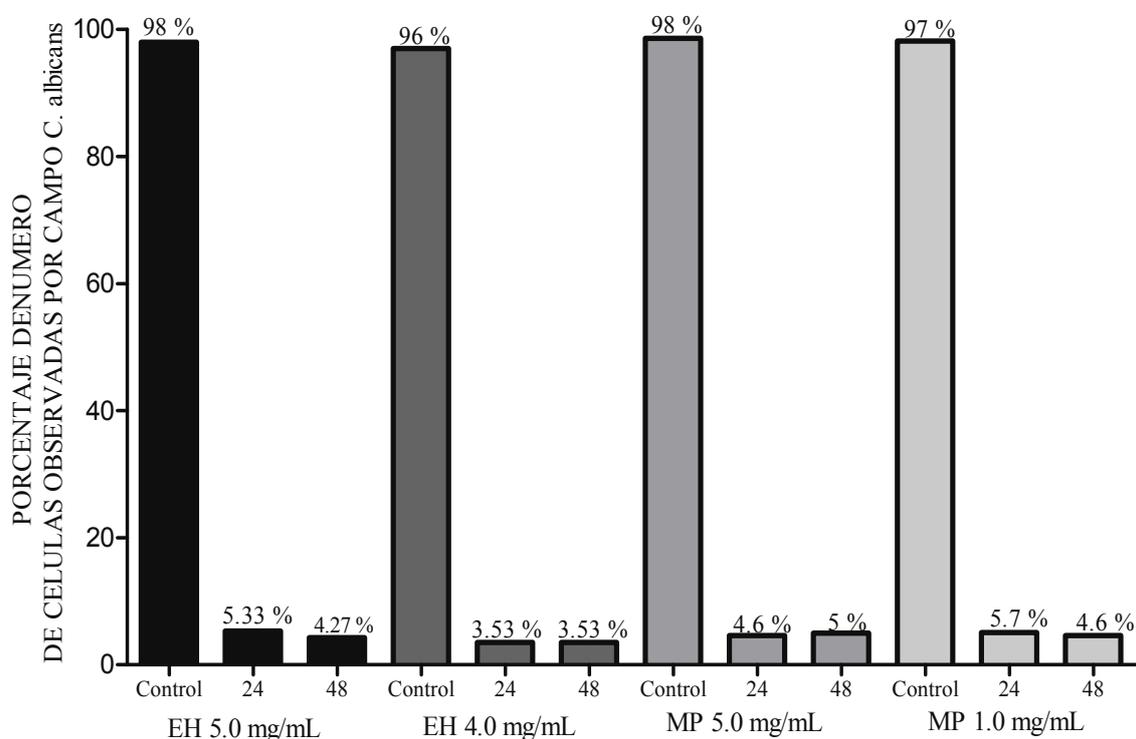


Gráfico 6. Número de célula observadas por campo del EH y MP frente a *Candida albicans* (ATCC 10231), comparándose con el Control, a las 0, 24y 48 h.

También se obtuvo disminución en la longitud de las células de *Cryptococcus neoformans* var. *neoforman*, tratada a concentraciones de 5 mg de EH/mL, 0.25 mg de EH/mL, 5 mg de MP/mL y 0.75 mg de MP/mL y en el número de células (conidios) observados por campo, ver los gráficos 7, 8 y 9. Los cambios morfológicos que se observan en las figuras 20 y 21 son significativos, haciéndolo atractivo para una posible alternativa en el tratamiento de la micosis causado por dichos hongos, además de considerar futuros estudios fitoquímicos y biológicos para demostrar su eficacia.

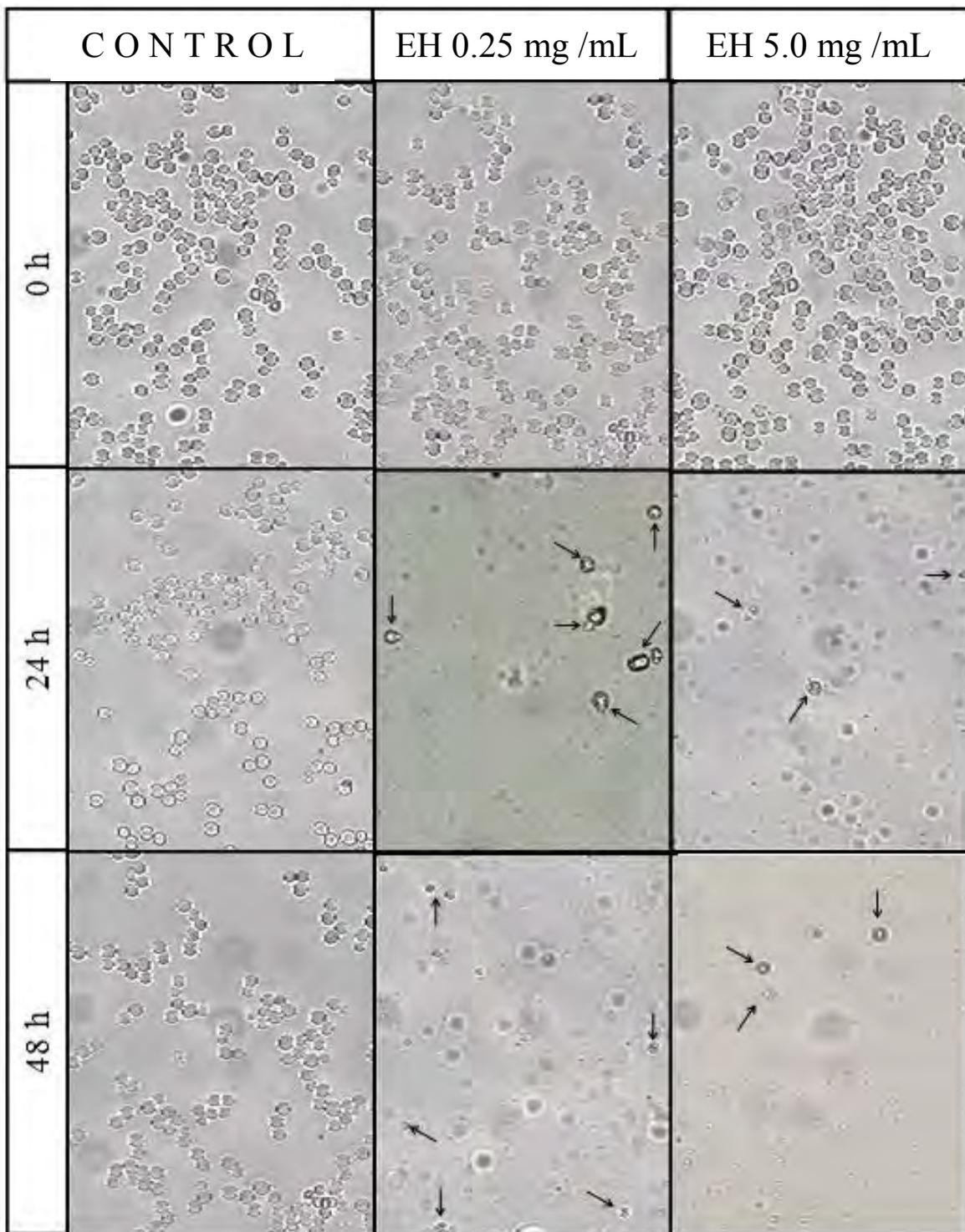


Figura 20. Efecto del EH sobre la morfología y número de células por campo (marcadas con flechas) de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*, evaluado con laminillas preparativas en fresco. Fotografías tomadas en el microscopio óptico a 40x.

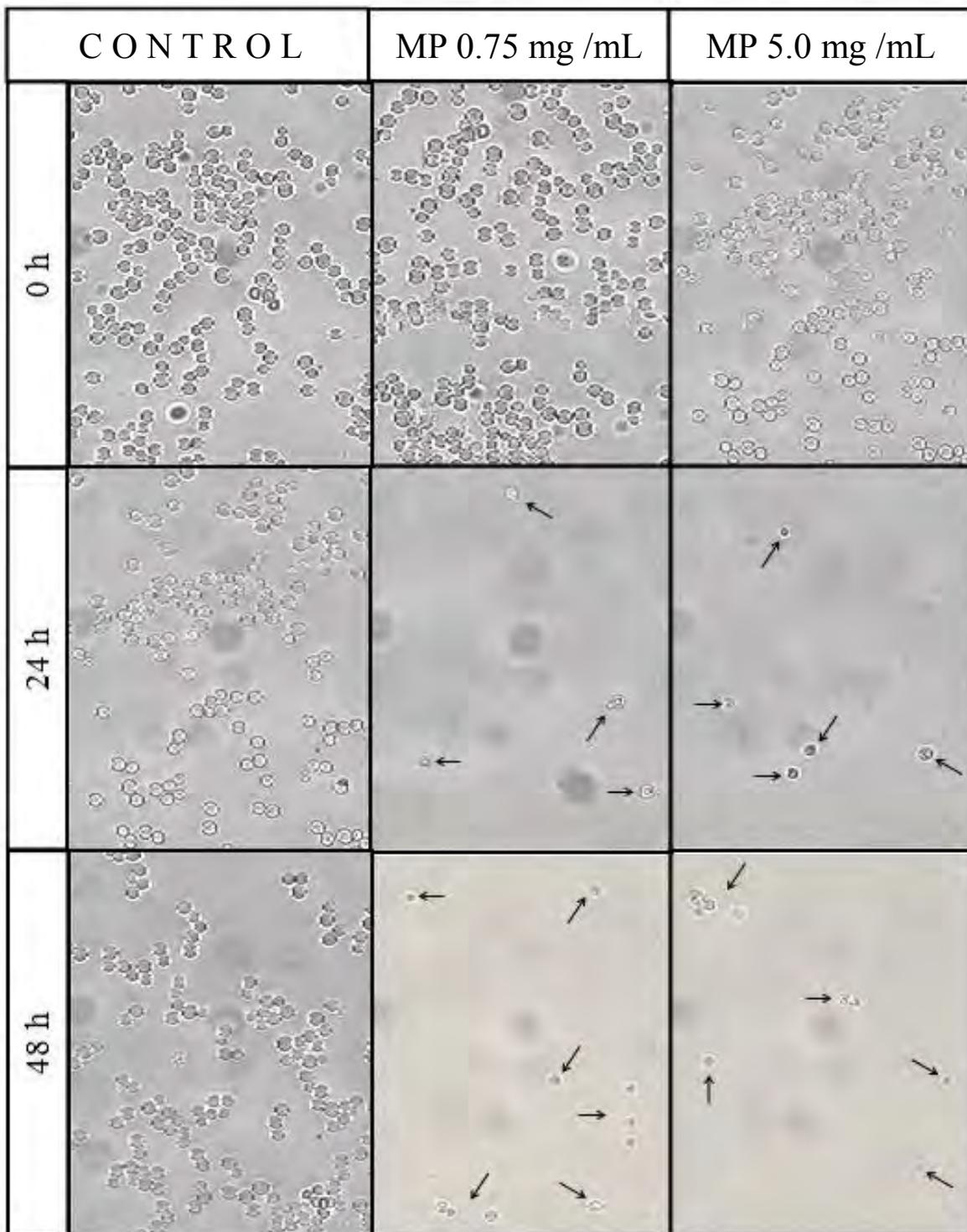


Figura 21. Efecto del MP sobre la morfología y número de células por campo (marcadas con flechas) de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*, evaluado con laminillas preparativas en fresco. Fotografías tomadas en el microscopio óptico a 40x.

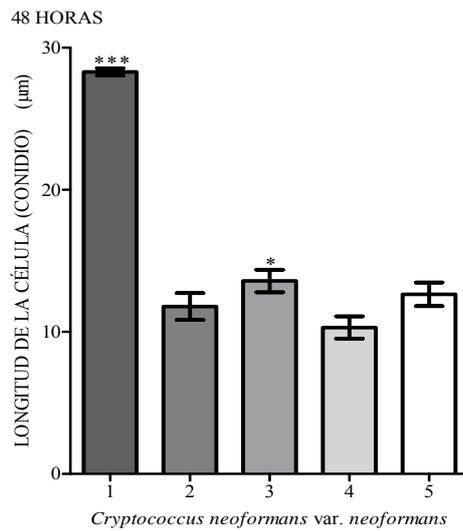
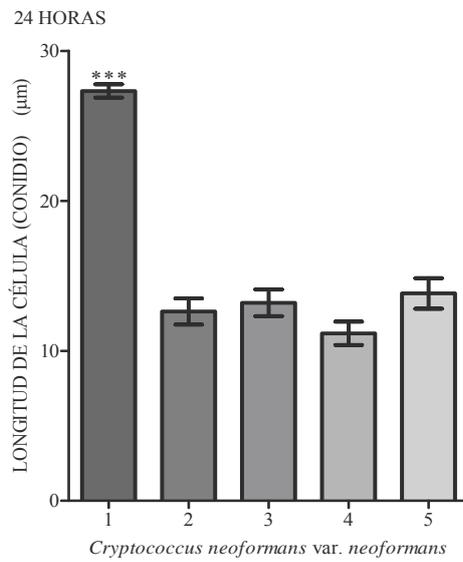
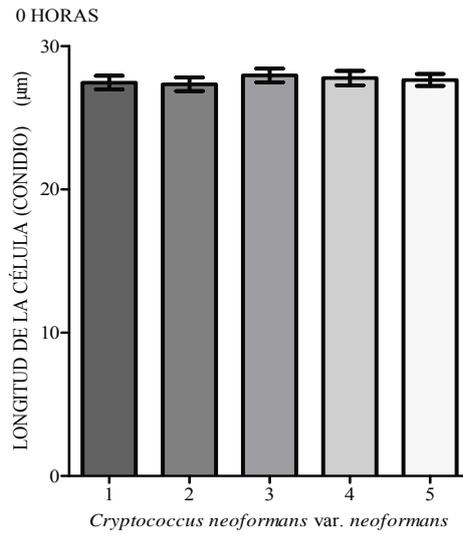
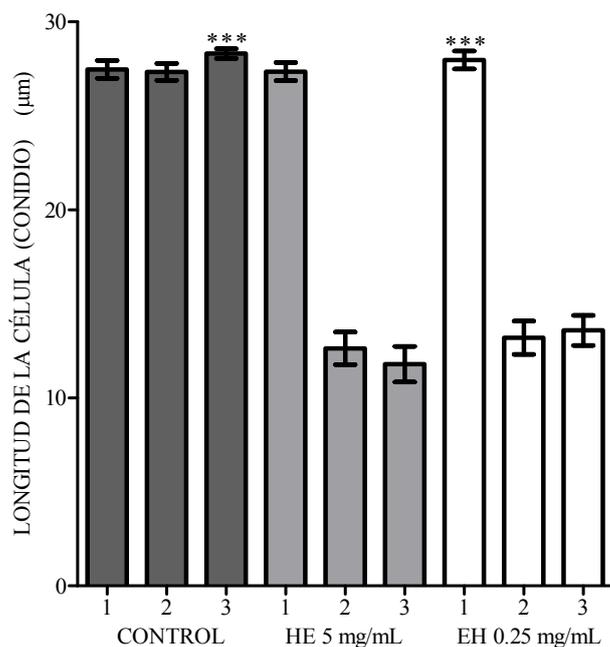
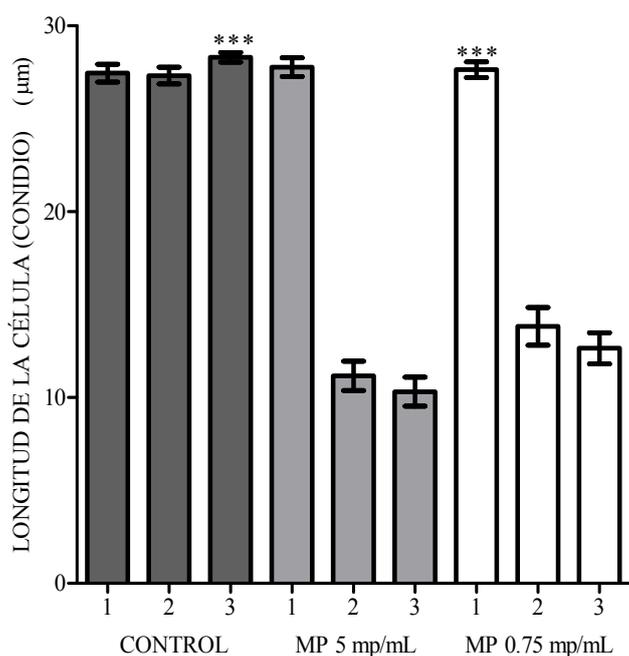


Gráfico 7. Alteración en la longitud de la célula de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*), causado por EH y MP a 0, 24 y 48 h. 1.Control, 2.EH 5 mg/mL, 3.EH 0.25 mg/mL, 4.MP 5 mg/mL, 5.MP 0.75 mg/mL Diferencias significativas entre las concentraciones estudiadas, esto corresponde a la media error estándar y desviación estándar en las 10 células observadas. (1 vs todas las concentraciones a 24 y 48 h \*\*\* $p < 0.0001$ ) y (3 vs 4 a 48 h \* $p < 0.05$ ).



*Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*



*Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*

Gráfico 8. Alteración en la longitud de la célula de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*, causado por EH (EH 5 mg/mL, EH 0.25 mg/mL ) y MP (MP 5 mg/mL, MP 0.75 mg/mL) comparadas con el Control a 1.0 h, 2.24 h y 3. 48 h. Diferencias significativas entre las concentraciones estudiadas, esto corresponde a la media error estándar y desviación estándar en las 10 células observadas. (Control vs todas las concentraciones a 2 y 3 respectivamente

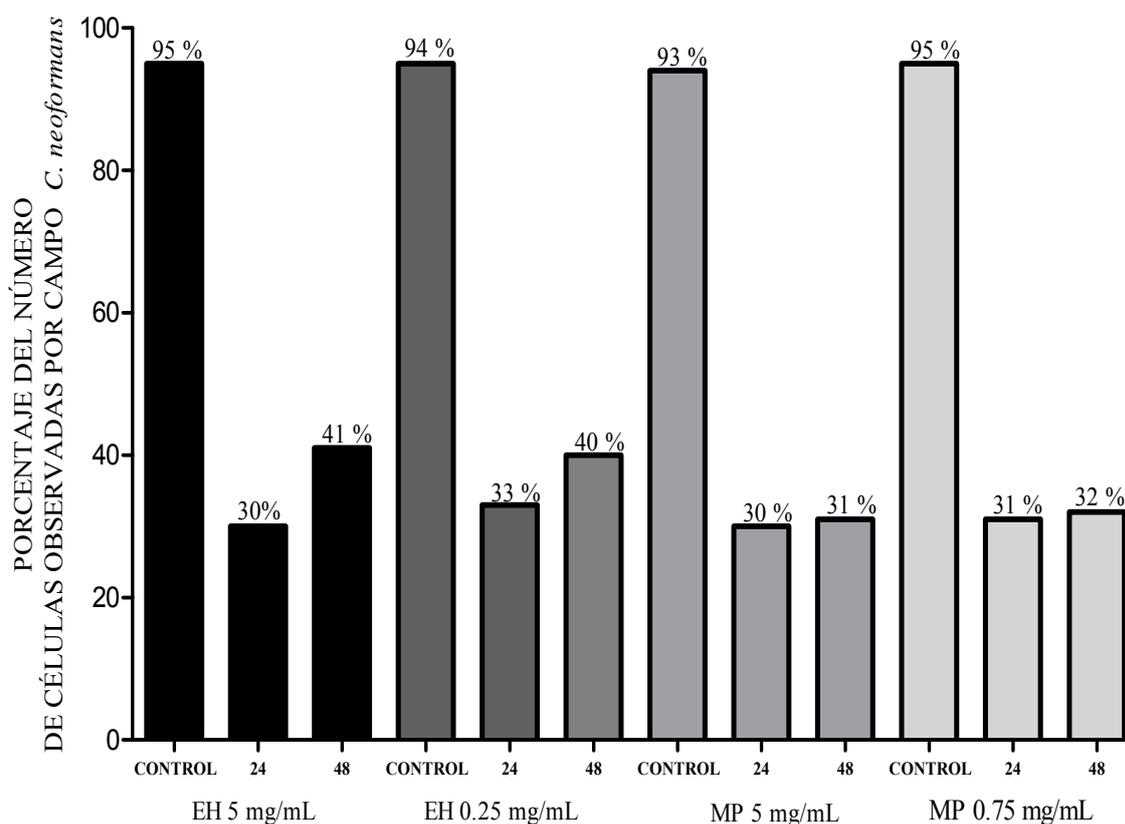


Gráfico 9. Número de las células observadas por campo del EH y MP frente a *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*, evaluado con laminillas preparativas en fresco, comparándose con el Control. a las 0, 24v 48 h.

## 9. DISCUSIÓN

Los alcanos lineales y ramificados de 20 a 40 átomos de carbono forman parte de los metabolitos secundarios de muchos especímenes vegetales y que, además, presentan posible actividad antimicrobiana diversa, aunque en el campo de la investigación esto no ha sido muy estudiado.

Dentro de los alcanos mencionados anteriormente, el triacontano ( $C_{30}H_{62}$ ), el hentriacontano ( $C_{31}H_{64}$ ) y algunos más de cadena entre 32 y 37 átomos de carbono, representan especial interés en el presente trabajo, ya que uno de ellos fue identificado mediante su espectro de resonancia magnética nuclear de hidrógeno y de carbono 13, así como de su espectro de espectrometría de masas, como parte del extracto hexánico de hojas de la planta *Brickellia veronicaefolia* HBK (Gray) "PEXTO", recolectada en la comunidad de Ocopulco Chiautla, Estado de México.

En el espectro de RMN<sup>1</sup>H, como se ilustra en la figura 6, se observa una señal triple centrada en 0.90 ppm, que corresponde a los grupos metilo del alcano y una señal sencilla en 1.27 ppm correspondiente a los grupos metileno del compuesto.

En el espectro de RMN<sup>13</sup>C figura 7, se localizan las siguientes señales: en 14.1 ppm, asignada a los grupos metilo; en 19.7 ppm una señal que se origina por la presencia de los grupos metileno unidos a los grupos metilo; en 29.7 y 29.8 ppm, dos señales que corresponden al resto de los grupos metileno, excepto para los grupos metileno beta a los grupos metilo.

El espectro de masas figura 8, se puede observar una serie de fragmentos que se diferencian por 14 unidades de masa/carga ( $m/z$ ), debido a las fragmentaciones sucesivas de los grupos metileno, y que presentan una abundancia relativa de los mismos en forma de media campana, característica de alcanos de cadena abierta de mediano y alto peso molecular. Además de los fragmentos mencionados, se observan fragmentos derivados de los anteriores, con una o dos unidades de  $m/z$  menores, los cuales se forman debido a la generación de los alquenos y cationes alílicos correspondientes.

Otra característica adicional en el espectro de masas de impacto electrónico de los alcanos de medio o alto peso molecular, es que regularmente el ión molecular es muy pequeño e inclusive no llega a ser detectado. Así, como se observa en el espectro de masas del metabolito secundario puro, en la zona de altos valores de relación  $m/z$ , se puede localizar una serie de picos muy pequeños que llegan hasta un valor apreciable de  $m/z$  cercano a 500.

A partir de esta observación, se propone que el compuesto MP debe de corresponder al hexatriacontano ( $C_{36}H_{74}$ ), considerando que además de las pérdidas consecutivas de los grupos metileno, también es posible proponer la pérdida de una unidad de  $m/z$  a partir de cada carbocatión formado, para dar lugar a la función alqueno que, mediante otra pérdida de una unidad de  $m/z$ , generaría un carbocatión alílico; o bien a partir del carbocatión original de tipo primario, se puede proponer una transposición de hidruro para generar un carbocatión más estable, el cual daría las correspondientes fragmentaciones, lo que en suma hace que el espectro sea grande en la cantidad de fragmentos producidos. Aunado a lo anterior, se determinó el punto de fusión  $68 - 70$  °C, teniendo valores cercanos al reportado  $74 - 75$  °C, por lo que se sugiere que corresponda al hexatriacontano ( $C_{36}H_{74}$ ).

Por otro lado, se han identificado aproximadamente 15 compuestos químicos del espécimen *Brickellia veronicaefolia* HBK (Gray) “PEXTO”, utilizados como agentes antiinflamatorios, relajantes musculares, <sup>1, 2</sup> presentan efecto hipoglucemiante en el tratamiento de la diabetes mellitus, vermífugos; en el tratamiento de gastroenteritis, afecciones del estómago, dispepsia, cólicos biliares, artritis, problemas de diarrea <sup>3, 4</sup> y tratamiento contra el cólera. Sin embargo, en la bibliografía consultada no se han encontrado informes que muestren datos sobre la actividad antifúngica de los compuesto (EH y MP) estudiados en este trabajo sobre *C. albicans* y *C. neoformans* var. *neoformans*.

La capacidad antifúngica del extracto de hoja puede ser atribuida, a que se ha reportado la presencia en su mayoría de compuestos derivados del ácido benzoico <sup>1, 2</sup> y no se

descarta que produzca diversos metabolitos secundarios, mucho de los cuales tienen actividad antifúngica. Sin embargo, es importante mencionar que de manera general, la familia de las compuestas (Asteraceae), ocupa un lugar preponderante en la flora de México, tanto a nivel de géneros como de especies y contribuyen sustancialmente a la enorme riqueza de la flora de nuestro país <sup>56</sup>; además, se caracteriza por ser rico en lactonas sesquiterpénicas del tipo eudesmanólido como isoalantolactonas, 11-13 dihidroalantolactona, 11-13 dihidroisoalantolactona (han mostrado propiedades bactericidas y fungidas *in vitro*), triterpenos como la fridolina, dammarandienol (y su correspondiente acetato), principalmente contienen la tuyona, cuyo principio activo le confiere propiedades vermífugas al paralizar a los parásitos intestinales, además de contener estragol, felandreno, ocimeno, hidroxycumarinas (confiere propiedades antisépticas), alcaloides como la quinina, taninos, nitrato de potasio, absintina, fenoles, germacreno-D-lactona, hidrocarburos sesquiterpénicos y alifánicos, fitoesteroles del tipo  $\beta$  y (-sitosterol y estigdienol y su correspondiente acetato), insulina, flavonoides, sales potásicas, mucílagos y la inulina con acción hipotensora en animales, expectorante, espasmolítica y antihelmíntica y en uso tópico; cicatrizante y antipruriginosa. <sup>53, 57</sup>

Un ejemplo de este comportamiento son los datos obtenidos en este trabajo. El metabolito puro (hexatriacontano ( $C_{36}H_{74}$ )) identificado en la figura 8, corresponde a un compuesto con cadena lineal y ramificado, aún no se han encontrado reportes que demuestren alguna actividad biológica. Sin duda lo hace atractivo como un posible metabolito con actividad antifúngica.

Se evaluó la actividad antifúngica del MP y EH de *Brickellia veronicaefolia* HBK (Gray) "PEXTO". Para este fin se empleó el método de difusión en disco, que determina de manera relativamente sencilla, si un compuesto es sensible frente a hongos o bacterias, en cuanto a su fundamento, tan pronto como el disco impregnado con los compuestos (MP y EH), toman contacto con la superficie húmeda del agar, el agua se absorbe en el papel de filtro y los compuestos se difunden en el medio que lo rodea. La velocidad de extracción de los compuestos fuera del disco es mayor que su difusión

hacia el interior del medio, de modo que la concentración inmediatamente adyacente al disco puede exceder a la del disco mismo. No obstante, a medida que aumenta la distancia, hay una reducción logarítmica de la concentración de los compuestos, si la placa ya fue inoculada con una suspensión en este caso de *Candida albicans* (ATCC 10231) y *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*, se produce el crecimiento simultáneo de los hongos sobre la superficie del agar. Cuando se alcanza una masa celular crítica de los hongos, se sobrepasa la actividad inhibitoria y así observándose crecimiento de los mismos (interfase), apareciendo bodes definidos con claridad y donde la concentración fue suficiente para evitar el crecimiento, se produce una zona o llamado halos de inhibición (área donde no hay crecimiento).<sup>54, 58</sup> como se ilustra en la figura 9 y 10. La concentración de los compuestos que se difundieron en esta interfase de crecimiento y los hongos inhibidos se conoce como concentración crítica.<sup>58</sup>

La información consignada en las tablas 5 y 6, muestran los resultados obtenidos en la prueba de difusión en agar, se evaluaron considerando activos los extractos que presentaron un porcentaje de inhibición mayor al 20%<sup>8</sup>, sin embargo, hubo variación en los resultados de 5 mg de EH/mL contra *Candida albicans* (ATCC 10231), con un porcentaje de 19.22%, siendo este cercano al 20%. El tamaño del halo que se observa en la prueba de difusión de disco anteriormente descrita, no es significativo por sí solo ya que permite hacer aproximaciones de la CMI de los compuestos *in vitro*.

Se utilizó como control positivo ketoconazol, el cual es uno de los miembros de la familia de los azoles es de gran utilidad para el tratamiento de las micosis causadas por los hongos estudiados en este trabajo y son en muchos casos la terapia de elección, debido a su baja toxicidad y eficacia, entre otras ventajas.<sup>33</sup>

Para todas las concentraciones y los tiempos, al igual que para los controles, se hicieron 3 repeticiones para obtener datos representativos estadísticamente. Se midió el diámetro en milímetros de la zona de crecimiento de los hongos, en intervalos de dos días, tomando como resultado el valor promedio de estas mediciones, determinándose el porcentaje de inhibición del crecimiento de los hongos.

En los últimos años, se han publicado muchas técnicas para determinar la sensibilidad de los hongos a los antifúngicos. Las metodologías que se emplean con mayor éxito en la evaluación de la actividad biológica de extractos de origen natural, es el método de dilución, algunos autores han realizado el método usando diferentes condiciones de ensayo, las ventajas de las pruebas de dilución proporcionan más información de tipo cuantitativo y pueden ser aplicadas a un rango más amplio de aislamiento que las pruebas de difusión, sin embargo, existe un riesgo definido de una mala interpretación<sup>54</sup>.

Los resultados obtenidos para la prueba de sensibilidad por dilución en agar, están dados por el punto límite, representado por la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), que es definido como la menor concentración de un fármaco o agente antimicótico que impide el crecimiento *in vitro* de un microorganismo, por convención; si se desarrolla el crecimiento del hongo en las primeras placas pero no en la que sigue, puede establecerse un valor de CMI.<sup>8, 54, 55</sup> Esto se puede observar en la figura 11, el punto límite está entre 3.5 mg de EH/mL donde se evidencia crecimiento de colonias característica de *Candida albicans* (ATCC 10231) (C) y 4.0 mg de EH/mL como se aprecia en el cuadrante (D) que son inhibidos por la concentración del EH contenidos en la placa, por lo tanto es el valor de CIM. En cuanto al MP ocurre que el valor de CMI es de 0.25 mg de MP/mL (ver figura 12 cuadrante G), la inhibición ocurre a una concentración menor en comparación que el EH.

Similar a lo anterior, se muestra el mismo fenómeno para *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* en la figura 13, el valor de CMI es de 0.5 mg de EH/mL (C) y para el MP es de 0.1 mg de MP/mL (G), ver figura 14. Para tales efectos, lo que se sugiere, es que el MP inhibe a bajas concentraciones en comparación con EH, porque se encuentra puro, en mayor concentración y con ello hay un aumento de potencia.

En cuanto a la CFM, a diferencia de la CMI, es la menor concentración de un compuesto como el EH y MP, que produce la muerte de más del 99.9 % de un inóculo estandarizado<sup>54</sup> de *Candida albicans* (ATCC 10231) y *Cryptococcus neoformans* var *neoformans*. La figura 15 muestra la determinación del CMF contra *Candida albicans* (ATCC 10231) la cual corresponde a 4.0 mg de EH/mL (placa A). Para el MP figura 15,

se determinó que la cantidad de colonias obtenidas a una concentración de 1.0 mg de MP/mL (placa C) es menor al 99.9% del inóculo (o bien 3 colonias después de un periodo de incubación), por lo tanto corresponde a la CMF. Dicha concentración que inhibe o produce la muerte de *Candida albicans* (ATCC 10231) es muy cercana a la CMI se debe encontrar dentro de una o dos diluciones al medio.<sup>54</sup>

Esto también se observa para *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*, En la figura 16 la CMF es de 0.25 mg de EH/mL (placa D). Finalmente para el MP, la CMF es de 0.75 mg de MP/mL (B).

El siguiente punto que se abordó, es la formación del tubo germinativo de *Candida albicans* (ATCC 10231) en presencia de suero fetal bovino y sometida a la acción de EH y MP a una concentración de 4.0 mg de EH/mL y 1.0 mg de MP/mL durante 3 h.

Para el MP se encontró una disminución significativa ( $p < 0.0001$ ) en la longitud del tubo germinativo, en comparación con el control positivo como se demuestra en el gráfico 1, así como disminución en el diámetro de los conidios ( $p < 0.001$ ), ver gráfico 2, finalmente sólo el 0.5% de las células observadas al microscopio óptico presentaron tubo germinativo, de lo anterior se ilustran dichos resultados en la figura 17.

Y para el EH no hay diferencias significativas en la longitud (gráfico 1) y en el diámetro de los conidios (gráfico 2), teniendo que el 61% de las células observadas al microscopio presentaron tubo germinativo (gráfico 3). Ambos compuestos se compararon con el control, la cual no se le adicionó ninguna concentración de EH, MP y cumpliendo con las mismas condiciones de manipulación e incubación que las tratadas.

Con los resultados arrojados en esta prueba, encontramos que es factible utilizar el MP, sin embargo, aunque no hubo diferencias significativas con respecto al EH, mostraron alteraciones en la morfología del tubo germinativo (figura 17), dichos cambios podrían afectar la capacidad de adherencia, colonización del huésped y a su vez en la patogenicidad, lo cual es de gran importancia esta capacidad de filamentación, ya que está relacionada como un factor de virulencia que le permite la invasión y colonización al hospedero a través de poros, mediante el proceso de penetración de las células, tejidos y de adherencia a la superficie epitelial. El hecho de que no pueda sufrir este cambio

morfogenético, hace más susceptible a *C. albicans* para que sea eliminada por el sistema inmunológico del hospedero, incluso, ese es el motivo de que surja la necesidad de desarrollar compuestos antifúngicos que puedan prevenir la formación de hifas y de destruir ambas formas de la levadura.<sup>10, 15, 33</sup>

Otro aspecto importante es la evaluación del cambio morfológico de *Candida albicans* (ATCC 10231) y *Cryptococcus neoformans* var *neoformans*, tratadas de igual manera con EH y MP, mediante el análisis de imagen se realizó con el programa Imagen Pro-Express Versión 4. En el gráfico 4 se muestra que a cero horas no hay alteración en la longitud de los conidios de *Candida albicans* (ATCC 10231). A 24 h en todas concentraciones existen diferencias significativas de  $p < 0.0001$  con respecto al control; pero comparándolas entre ellas, no hay diferencia significativa. Al tiempo de 48 h de incubación hay diferencias significativas de  $p < 0.0001$  con el control y todas las concentraciones tratadas (EH 5 mg/mL, EH 4 mg/mL, MP 5 mg/mL, MP 1.0 mg/mL); entre EH 5 mg/mL vs MP 1.0 mg/mL hay diferencia de  $p < 0.00$ , EH 4 mg/mL vs MP 1.0 mg/mL  $p < 0.05$  y MP 5.0 mg/mL vs MP 1.0 mg/mL también hay diferencia significativa de  $p < 0.05$ , la cual sugiere que el MP a concentraciones muy pequeñas disminuye la longitud de los conidios, por lo tanto se podría tomar la decisión de utilizarlo sin la necesidad de ocupar concentraciones altas para el mismo efecto, esto se vería reflejado en costo-beneficio-efecto, por otro lado, en el gráfico 5 señala que hay diferencia significativa de  $p < 0.0001$  con el control, 0 h contra las concentraciones de EH. No hay diferencia del EH 5 mg/mL vs EH 4 mg/mL a 24 y 48 h, por lo que podría decidir utilizar concentraciones bajas a un tiempo menor, ya que se tiene el mismo efecto (EH 4 mg/mL a 24 h).

Para el MP hay diferencias a 24 y 48 h de MP 5 mg/mL y para MP 1.0 mg/mL, en el gráfico 6 muestra una disminución considerable en el porcentaje de células observadas por campo de 3.53 % a 5.7 % con las concentraciones tratadas contra cada uno de los controles, por lo que se diría que si hubo alteración en cuanto a tamaño y número de conidios observados por campo y sin olvidar otro aspecto importante, el cambio en la forma de las células, la cual se observan en las figuras 18 y 19.

En el gráfico 7 muestra que hay alteraciones en la longitud de la célula de *Cryptococcus neoformans* var. *Neoformans*. Se encontró que al tiempo de 24 h de incubación, todas

las concentraciones tratadas tuvieron diferencias significativas ( $p < 0.0001$ ) con respecto al control, pero no entre ellas (EH 5 mg/mL, EH 0.25 mg/mL, MP 5 mg/mL y MP 0.75 mg/mL); de igual forma, se hace evidente a las 48 h, con una diferencia mínima a una concentración de EH 0.25 mg/mL vs 4.MP 5 mg/mL de  $p < 0.05$ . Con lo anterior se puede sugerir en utilizar concentraciones pequeñas a tiempos cortos, como por ejemplo, a una concentración de EH 0.25 mg/mL a 24 h, inclusive no sería necesario la purificación del MP, esto es porque de acuerdo a los gráficos 7 y 8 se demuestra que a concentraciones bajas o altas tiene el mismo efecto, tomando en cuenta de igual forma el costo-beneficio-efecto, obteniéndose disminución de la longitud de los conidios y porcentajes en el número de células observadas por campo (30% al 41%) con respecto al control (93% al 95%) ver gráfico 9, así como alteración en la forma los conidios como se observan en las figuras 20 y 21 (marcadas con flechas).

La importancia de que se desarrolle cambio en la morfología de *Candida albicans* (ATCC 10231) y de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*, está en que se ha demostrado que un agente antimicótico es una sustancia química o fotoquímica que tiene la capacidad de producir alteraciones en la estructura de una célula fúngica, con el propósito de inhibir su desarrollo, alteración o capacidad de supervivencia, de forma directa o indirecta, lo que facilita el funcionamiento de los sistemas de defensa del hospedero.<sup>59</sup> A continuación se mencionarán algunos ejemplos de grupos que afectan de acuerdo a su sitio de acción<sup>60</sup>; como aquellos grupos de fármacos como es el caso de los polienos (Nistatina), que alteran la membrana citoplasmática, desorganizándola y produciendo inestabilidad osmótica, pérdida de su integridad, dando lugar a la salida de los componentes citoplasmáticos. Otro ejemplo de fármacos que alteran la membrana citoplasmática, son los azoles (Ketoconazol, Itraconazol, Fluconazol, entre otros), alilaminas (Terbinafina y Naftifina) y tiocarbamatos, que disminuyen la síntesis del ergosterol por la inhibición de la enzima del sistema P450, teniendo como consecuencia un aumento en la permeabilidad de la membrana citoplasmática alterando la organización de la célula y provocando disminución en el crecimiento del hongo. Otro ejemplo son los lipopéptidos (Equinocandinas, Papulacandinas y Triterpenos glicosilados) que actúan inhibiendo la síntesis de los glucanos, a través de la inactivación de las enzimas responsables de formación de los polímeros de glucosa, siendo éste esencial para la estructura de la pared celular, ésta se debilita y se torna

incapaz de soportar el estrés osmótico, por lo que la célula fúngica muere. Y el grupo que afecta al núcleo celular, las pirimidinas fluoradas (Fluocitosina) que inhiben el crecimiento y reproducción de los hongos impidiendo la síntesis de proteínas de la célula.<sup>61, 62, 63, 64, 65</sup>

Los resultados obtenidos en este trabajo son la base para profundizar en el mecanismo de acción molecular del EH y MP sobre las levaduras. Esto lo hace atractivo para seguir investigando en la parte fitoquímica como nueva posibilidad contra el tratamiento de las micosis causadas por *Candida albicans* (ATCC 10231) y *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*.

## 10. CONCLUSIONES

A partir de *Brickellia veronicaefolia* (HBK) Gray, conocida como Pexto, se obtuvo un extracto hexánico de las hojas, que presentó actividad antifúngica contra *Candida albicans* (ATCC 10231) y *Cryptococcus neoformans* var. *Neoformans*.

A partir del extracto hexánico de las hojas, se purificó el metabolito secundario mayoritario, el cual se identificó como el hexatriacontano, que también presentó actividad antifúngica contra *Candida albicans* (ATCC 10231) y *Cryptococcus neoformans* var. *Neoformans*.

Se determinó la sensibilidad con el método de difusión en disco, CMI y CMF para el extracto hexánico de las hojas y metabolito puro, concluyendo que se requiere de menor concentración del metabolito puro para obtener la inhibición de ambos hongos, que cuando se emplea el extracto de hojas.

Se demostró alteración morfológica en tamaño, forma y número de células observadas por campo para *Candida albicans* (ATCC 10231) y *Cryptococcus neoformans* var. *Neoformans*. Sin embargo, entre los resultados obtenidos para el extracto de hoja y el metabolito puro, hubo una mínima diferencia estadística del cambio morfológico evaluado.

Hubo inhibición en la formación del tubo germinativo de *Candida albicans* (ATCC 10231), empleando el metabolito puro. Para el extracto de hoja si hubo formación de tubo germinativo, pero con alteraciones en el mismo.

Se sugiere continuar con estos estudios para profundizar acerca del mecanismo de acción del extracto hexánico de hojas y del metabolito puro sobre las levaduras estudiadas y sobre otros hongos de importancia médica.

**11. REFERENCIAS**

1. Rivero CB, Rivero CI, Rodríguez MJ, García RCCM, Mata R, Qualitative and Quantitative Analysis of the Components of the Essential Oil from *Brickellia veronicaefolia* by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, *J. Nat. Prod.* 2006; 69: 1172-1176.
2. Rivero CB, Alejandra RM, Rodríguez SR, García RCCM, Mata R, Smooth Muscle Relaxant Action of Benzyl Benzoates and Salicylic Acid Derivatives from *Brickellia veronicaefolia* on Isolated Guinea-Pig Ileum, *Planta Medicinal.* 2005; 71: 320-325.
3. Blumenthal M, Herbs With Potential to Help Diabetes mellitus, *American Botanical Council*, 2001; 7-11.
4. Andrade CA, Heinrich M, Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes, *Journal of Ethnopharmacology, Review.* 2005; 99: 325-348.
5. Murray Patrick R., et al, 2006. *Microbiología medica* 5ªed., Editorial Elsevier, Madrid, Pág. 717-718, 791.
6. YingYing Cao, BaoDi Dai, Yan Wang, Shan Huang, YongGang Xu, YongBing Cao, PingHui Gao, ZhenYu Zhu, YuanYing Jiang, In vitro activity of baicalein against *Candida albicans* biofilms, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2008; 32 (1): 73-77.
7. Ramírez C.E., Lucas V.L., Virgen C.G., Molina T.J., Fungicidal activity of afinnin and *Heliopsis longipes* crude root extract on two *Sclerotium* species. *Agrociencia.* 2002; 34(2): 207-215.
8. Lizcano G. M.C. Evaluación de la actividad antifúngica del extracto de tomillo *Thymus vulgaris* contra *Botrytis cinérea*, *Fusarium oxysporum* y *Sclerotinia sclerotiorum*. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Bogotá D.C, 2007; 11-64.

9. Davicino R., Mattar A.m., Casali A.Y., Correa G.S., Pettenati M. E. Micalizzi B. Antifungal activity of plant extracts used in folk medicine in Argentina. *Rev. Peru Biol.* 2007; 14(2): 247-251.
10. Marcano A.D., Vargas N. Pire A., Efecto de extractos vegetales y fungicidas sintéticos sobre el crecimiento micelial in vitro de *Sclerotium rolfsii* y *thielaviopsis basicola*, *Rev. Fac. Agron.* 2005, 22: 315-323.
11. Ospina G.P. S., López B.J., Márquez F. E. M., Efecto antimicótico in vitro en el extracto metanólico de macroalgas marinas de la costa caribe colombiana. *Medellin*, 2007; 2:14.
12. David Abbott, P.S. Andrew, 1984. *Introducción a la cromatografía*, Editorial Alhambra. Madrid.
13. Skoog Douglas A. 2001. *Principios de Análisis Instrumental*. 5<sup>a</sup> ed. Editorial Mc Graw-Hill. Madrid.
14. Harris Daniel C. 2001. *Análisis Químico Cuantitativo*, 2<sup>a</sup> ed., Editorial Reverté. Barcelona.
15. Arenas R. G., 2003, *Micológica media ilustrada*, Mac Graw-Hill, Capitulo 2 - 5. México D.F. Pág. 189-211.
16. Lumbreras C., Lizasoain M. y Aguado J.M., Antifúngicos de uso sistémico; *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 2003; 21(7) 366-80.
17. Rippton J. 2003. *Micología. Médica; hongos y actinomicetos patógenos*. MacGraw-Hill, 3<sup>a</sup> ed. México. D.F. Pág. 524-600.
18. Sánchez Vega, J., Trinidad & Tay Z., Jorge. 2003. *Fundamentos de microbiología y parasitología médicas*, Méndez. México, D.F. Pág. 391-403.
19. Tay Z., Jorge. 2003. *Microbiología y parasitología medicas*; 3<sup>a</sup> ed;; Méndez. México D.F. Pág. 683-806.
20. Know-Chung. *Medical Mycology*. Lea & Febiger. Philadelphia. 2002; 300-314.

21. Tay Zavala & José Trinidad Sánchez V. 2004. Fundamentos de Microbiología y Parasitología médica; Méndez Editores; México D.F.
22. Martínez Rubén L. 2004, Micología médica: Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio, 2ª ed. Trillas, México D.F. Pág. 11-23.
23. Galván B. y Mariscal F. Epidemiología de la candidemia en UCI. Rev. Iberoam Micol. 2006; 23:12-15.
24. Rueda R. Micosis superficiales y dermatomicosis. Colombia Médica . 2002; 33: 10-16.
25. Calderone R., Braune P. Candida and candidosis. ASM Press Washington D.C. 2002; 3-10, 15, 25, 67-82, 87-92, 145-155, 159-171.
26. Carlile J. Washington S. And Gooday G. 2001. The fungi. Segund Edition Academic Press California. Pág. 87-92, 95-114, 153, 175-180, 432-440.
27. Alcamo E. Microbes and society an introduction to microbiology. Jones and Bartlett Publishers. USA. 2003; 124-129, 202, 250-251.
28. Webb B.C. Thomas C.J. Willcox D.P., Harry D.W.S., Knox K.W. Candida-associated denture stomatitis. Aetiology and management. A review. Part I. Factors influencing distribution of *Candida* species in the oral cavity. Aust Dent J. 1998; 43: 45-50.
29. Geof B., Botel J.S. Morse S.A. 2005. Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 18ª edición. El manual moderno. México D.F.
30. González G. Ana R. 2002. Curso de Industrialización de Productos Apícolas Fórmulas apiterapéutas. Cosméticos, apifármacos y suplementos nutricionales. Organización Nacional de apicultores. México D.F.
31. Prats G. 2006. Microbiología clínica. Editorial médica panamericana. Madrid.
32. Maestre J.R, y Alou L. Ventajas y desventajas de los antifúngicos de uso tópico. Revista Española de Quimioterapia. 2001; 14:3.

33. Bonifaz A. 2002. *Micología Médica Básica* Méndez, México D.F. Pág. 9-13.
34. López M., Aline T. Correlation of *Candida* species and symptoms among patients with vulvovaginal candidiasis in Maringa; Panamá; Brazil. *Rev. Iberoam. Micol.* 2004; 21: 202- 205.
35. Domínguez S. and Jacques B. 2002. *Candida* and candidiasis. ASM Press. Washington D.C. Pág. 349-373.
36. Sanchez L., Ortiz N., villar M. Point prevalence, microbiology and antifungal susceptibility patterns of oral *Candida* isolates colonizing of infecting Mexican HIV/AIDS patients and healthy persons. *Rev. Iberoam. Micol.* 2005; 83-92.
37. Santos P., Oleastro m. Infecciones fúngicas en pacientes pediátricos con enfermedad granulomatosa crónica. *Rev. Iberoam. Micol* 2002; 6-9.
38. Senet J. And Senet M. Risk factors and physiopathology of candidiasis. *Rev. Iberoam. Micol* 1997; 14: 6-13.
39. Sturtevant J. and Calderone R. *Candida albicans* adhesions: Biochemical aspects and virulence. *Rev. Iberoam. Micol.* 1997; 14: 90-97.
40. Rippon W. J, Willard J.J. 1990. Criptococosis. *Micología Médica Básica*, ediciones Interamericana McGraw-Hill, 3: 629-659.
41. Bonifaz A. 2000. *Criptococcus*. *Micología Médica Básica*. Editores Fernandez. México D.F. 1: 305-317.
42. Quintero E, Castañeda E. Ruiz A., Distribución ambiental de *Cryptococcus neoformans* en el departamento de Cundinamarca-Colombia, *Rev. Iberoam. Micol.* 2005; 22: 93-98.
43. Ordoñez N, Castañeda E., Varieties and serotypes of *Cryptococcus neoformans* clinical isolates in Colombia, *Rev. Iberoam Micol* 2001; 18: 128-130.

44. Baró T. M. Tesis de doctorado. Epidemiología de *Cryptococcus* en España. Caracterización de los aislados de *Cryptococcus neoformans*. 2002.
45. De Oliveira F. F, Wanke B, Agüna S. M, Oshiro V. V, Lina M. R. C, Lazéra M. Cativero de aves como fonte de *Cryptococcus neoformans* na cidaded de Campom Grande, Mato Grosso do Sul. Rev. Soc. Med. Trop. 2002; 35(6): 591-595.
46. Reolonl A, Rodríguez P. L, Leandro R, Mezzarill. Prevalencia de *Cryptococcus neoformans* nos pombos urbanos de cidade de Porto Alegre, rio Grande do Sul. J. Bras Parol. Méd. Lab. 2004; 40(5):1-9.
47. Casadevall A. y Perfect J.R. Virulence factors, Physical Defenses on nonspecific immunity, Specific immunity, Tissue Responses and special topics in immunity. En: *Cryptococcus neoformans* by Arturo Casadevall and Perfect Jhon R. Ed. Biochemistry ASM Press. Washintong D. C. 1998; 71-320.
48. Castañón O.L.R, *Cryptococcus neoformans* criptococosis. En Actualidades de Micología Médica. IV Diplomado en micología médica. UNAM, México D.F. Facultad de Medicina, 2002; 325-339.
49. Bonacini M.J, Nussabaum C.A. Gastrointesntinal, hepatic and pancreatic involvement with *Cryptococcus neoformans* in AIDS. J. Clin GAstroenterol. 1990; 12: 296-297.
50. Martínez M. 1993, Las plantas medicinales de México, 6<sup>a</sup> ed., Editorial Botos, México D.F. Pág. 249.
51. Martínez, M 1987, Catálogos de nombres vulgares y científicos de plantas medicinales, Editorial Fondo de Cultura Económica, México D.F. Pág. 732.
52. NCCLS, 2004, Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Proposed guideline. NCCLS document M44-A. Wayne, Pennsylvania,USA.
53. RATM. <http://ratm74.wordpress.com/category/asteraceae/>

54. Koneman, M.D., 1999, Diagnóstico Microbiológico. Texto y atlas a color, 5<sup>a</sup> ed., Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Pág. 784, 785, 795-802.
55. Gupta A.K., Bluhm R. Ciclopirox (coprox) gel for superficial fungal infections. *Skin. Therapylett.* 2004; 7: 4-5.
56. Balleza J.J., La familia Asteraceae en el Estado de Zacatecas (México), *Acta Botánica Mexicana*. Instituto de Biología UNAM, México D.F., 2002; 59: 5-69.
57. Centeno M.M.L., Plantas medicinales españolas: *Inula helenium* L., *Asteraceae*, *ínula*, *Botánica Complutensis*, Madrid, 2004; 28: 127-132.
58. Achata H.M.E. y Quiroz R.R.J., Determinación de la actividad antifúngica contra *Candida albicans* y *Aspergillus niger* de 10 plantas medicinales de 3 departamentos del Perú, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú, 2005; 1-57.
59. Gregori, B.S. Estructuras y actividad de los antifúngicos. *Rev. Cubana Farm. Ciudad de la Habana.* 2005; 39:2.
60. Vargas, Bernardo P., Carmen Y.R., Arenas E. Antifúngicos de uso clínico. Análisis de un Laboratorio de Micología Ciencia y Trabajo. México D.F. 2005; 15: 9-17.
61. Abete J., Fortín. Antifúngicos: azoles, imidazoles, triazoles. *Medicine*: 1998; 7(91): 4231-4241.
62. Bruton L. Lazo J.S., Parker P. 2006. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Goodman & Gilman, 11<sup>a</sup> ed. Mc Graw-Hill Interamericana. Colombia.
63. Katzung G. 2005. Farmacología clínica y básica. 9<sup>a</sup> ed. El Manual Moderno. México D.F.
64. Mellado E.J., Cuanca M. y Rodríguez J.L. Importancia clínica de los mecanismos de resistencia de los hongos filamentosos a los Antifúngicos. *Enfem Infecc Microbiol clin.* 2002; 20(10): 523-530
65. Pitisuttithum P., Negroni R., Graybill J y Col. Activity of posaconazole in the treatment of central nervous system fungal infections. *J. Antimicrob. Chemother.* 2005; 56: 745-755.

## 12. ANEXOS

### ANEXO 1

#### PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN STOCK

El EH y CP es soluble con los siguientes solventes:

- ✓ Hexano
  - ✓ Acetona
  - ✓ Dimetil sulfóxido (DMSO)
  - ✓ Etanol
  - ✓ Acetato de etilo
- Solución Stock de EH con respecto a la Tabla 8. Se pesó 40 mg de EH en 0.5 mL de DMSO, obteniéndose una concentración de 80 mg / mL.
  - Solución Stock de MP de la Tabla 9. Se pesó 115 mg de MP en 0.25 mL de DMSO, obteniéndose una concentración de 460 mg / mL.
  - Solución Stock de la Tabla 10. Se pesó 25 mg de EH y MP, cada uno en 0.5 mL de DMSO, para obtener una concentración de 50 mg/mL.

### ANEXO 2

#### PREPARACIÓN DE LAS DILUCIONES EXTRACTO DE HOJA (EH)

Tabla No. 7 Diluciones para el extracto de hoja (EH)			
TUBO	mg/mL	mg extracto	μL Stock
1	2.5	12.5	27.17
2	3.0	15	32.60
3	3.5	17.5	38.04
4	4.0	2	43.47
5	4.5	22.5	48.91
6	5	25	54.34

## PREPARACIÓN DE LAS DILUCIONES DE METABOLITO PURO (MP)

Tabla No. 8 Diluciones para el metabolito puro (MP)

TUBO	mg/mL	mg extracto	$\mu\text{L}$ Stock
1	0.25	1.25	15.62
2	0.5	2.5	31.25
3	1.0	5.0	62.5
4	1.5	7.5	93.75
5	2.0	10.0	125.0
6	2.5	12.5	156.2

## ANEXO 3

### PREPARACIÓN DE LAS DILUCIONES

Tabla No. 9 Diluciones para el extracto de hoja y metabolito puro

TUBO	mg/mL	mg extracto	$\mu\text{L}$ Stock
1	0.1	0.5	10
2	0.25	1.25	25
3	0.5	2.5	50
4	0.75	3.75	75
5	1.0	5.0	100
6	1.5	7.5	150