



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



**Evaluación del efecto antifúngico en *Aspergillus flavus* con antimicóticos  
de diferentes compañías farmacéuticas.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL  
TÍTULO DE:**

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA:**

**NOLASCO PÉREZ ITZEL**

**Director de tesis: Dr. Rubén  
Marroquín Segura**

**Asesor de tesis: MC.  
Maurilio Flores Pimentel**



MÉXICO, D. F. 2011



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.

## DEDICATORIAS

A **Dios** en primer lugar, porque me dio salud, sabiduría, inteligencia y sobre todo porque nunca me dejo sola, siempre me cuida y al mismo tiempo lo hizo con mis seres queridos, los cuales hasta el día de hoy se encuentran conmigo, además de que les dio la fuerza necesaria a todos mis maestros para guiarme y así concluir la meta más importante en mi vida.

A mi **mamá**, por haberme dado la vida, por todos esos años de dedicación que me brindó sin esperar nada a cambio, por todos esos regaños que fueron de gran ayuda, por su cariño y amor inmenso e incondicional que siempre nos ha mostrado a mi hermano y a mí, por su apoyo, porque siempre trata de entenderme, por todas esas situaciones en las que ha estado conmigo tanto en las buenas como en las malas, por su protección, por esos años de desvelo y paciencia, y por los principios y valores que me enseñó, pero sobre todo porque es mi mamá y es la luz de mi vida.

TE AMO MAMI

A mi **papá**, quien ha sido al igual que mi madre uno de los pilares más importantes para concluir mi carrera, por brindarme su tiempo y apoyo, porque siempre me cuida y me protegió, por estar pendiente de mí y no dejarme sola, por sus consejos y su paciencia, por el ejemplo y la educación que me dio, además del amor y cariño incondicional y por ser una de las partes más importantes en mi vida. Gracias papá.

TE AMO PAPI

A mi **hermano**, por esos años de compañía, juegos, alegrías y motivación que me brindó y sobre todo por

el amor de hermanos que ha existido entre nosotros, por esos consejos y apoyo en mis estudios.

A **David**, por ser una persona muy especial para mí, gracias por el amor y cariño que me has brindado en este tiempo, porque siempre tengo en ti a alguien con quien platicar, por ofrecerme tus palabras y tus sonrisas, por tu apoyo y motivación incondicional.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, **UNAM** por haberme permitido entrar a estudiar a uno de sus planteles y tener el honor de pertenecer a la máxima casa de estudios.

A la **Facultad de Estudios Superiores Zaragoza**, por haberme aceptado en su plantel y formarme profesionalmente.

A mi director de tesis **Dr. Rúbén Marroquín Segura**, por el tiempo y conocimientos que me brindo, por la oportunidad de incluirme en uno de sus proyectos, por su paciencia, tolerancia y buen humor.

A mi asesor de tesis **M.C. Maurilio Flores Pimentel**, por su tiempo y disposición durante la realización de mi proyecto.

Al **DR. Luis A. Mora Guevara**, por el tiempo y ayuda que me brindo para realizar un buen trabajo.

A la **Q.F.B. Yolanda flores Cabrera**, por su disposición para resolver ciertas dudas en mi proyecto.

A la **Q.F.B. Estela Valencia Plata** y a la **Q.F.B. Carolina Jiménez López**, por su tiempo y disposición para revisar mi trabajo.

A mis compañeros de carrera: **Angy, Wicha, Ferny, Adame, Tatis, Jazmín, Roger, Nancy y Amigon**, por todos los momentos agradables, tristes y felices que tuvimos durante los últimos semestres.

A todos mis compañeros de laboratorio con los que tuve una buena experiencia.

A mi **abuelita**, por su cariño, su ejemplo y su tiempo que me dedico.

A mis **tías**, por su cariño, sus consejos e impulsos para terminar mi carrera, y que en algunas ocasiones me ayudaron a resolver algunas dudas.

A mis **abuelitos, tíos, tías, primos, primas** que estuvieron conmigo y me apoyaron, además de los buenos consejos que me dieron y del cariño que me brindaron.

A mis amigos de la infancia y adolescencia, con quienes conviví y pase momentos de tristeza y alegría y quienes en algún momento me ayudaron a resolver algunas dudas.



No hay que confundir nunca el  
conocimiento con la sabiduría.  
El primero nos sirve para ganarnos la  
vida;  
la sabiduría nos ayuda a vivir.

[Sorcha Carey](#)



**El ignorante afirma, el sabio duda y reflexiona.**

**Aristóteles**

# ÍNDICE

I.	RESUMEN.....
II.	INTRODUCCIÓN.....
III.	MARCO TEÓRICO.....
3.1.	Definición de micología.....
3.2.	Generalidades de los hongos.....
3.3.	Clasificación.....
3.4.	Hongos venenosos o tóxicos.....
3.5.	Características de los hongos.....
3.6.	Reproducción de los hongos.....
3.7.	Aspergillus.....
3.8.	<i>Características morfológicas, microscópicas y fisiológicas del Aspergillus flavus</i> .....
3.9.	Aflatoxinas.....
3.10.	Aspergilosis.....
3.11.	Micetismo.....
3.12.	Antimicóticos.....
3.13.	CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIFÚNGICOS.....
3.14.	MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ANTIFÚNGICOS.....
3.15.	RELACIÓN ESTRUCTURA-FUNCIÓN DE LOS ANTIFÚNGICOS.....
3.16.	Agentes Antimicóticos.....
3.17.	ESTRUCTURA DE LOS ANTIFÚNGICOS.....
3.17.1	Anfotericina B complejo lipídico (ABLC).....
3.17.2	Fluconazol.....
3.17.3	Ketoconazol.....



3.17.4 Itraconazol.....	
3.17.5 Terbinafina.....	
3.18. Pruebas que se realizan a los principios activos...	
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	
V. OBJETIVO GENERAL.....	
5.1. Objetivos particulares.....	
VI. HIPÓTESIS.....	
VII. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	
VIII.MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS.....	
8.1. Medicamentos. Forma farmacéutica en tabletas.	
8.2. Material Biológico.....	
IX. PROCEDIMIENTO.....	
X. DIAGRAMA DE FLUJO.....	
XI. RESULTADOS.....	
XII. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.....	
XIII.CONCLUSIONES.....	
XIV.ANEXO.....	
XV. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	

## I. RESUMEN

**Introducción:** La Aspergilosis invasiva es una enfermedad de gran importancia, ya que en los últimos 20 años su incidencia ha aumentado entre 5 y 10 veces, presentando una mortalidad que varía desde un 60 a 98 por ciento dependiendo de su localización, principalmente por enfermedades donde hay inmunodepresión. **Objetivo:** Implementar un método para evaluar la actividad biológica de antimicóticos de diversas compañías farmacéuticas, utilizando como microorganismo (M.O.) de prueba al *Aspergillus flavus* y así ver cuál de ellos obtuvo una eficacia mayor. **Método:** La actividad antimicótica de los diferentes medicamentos se evaluó mediante la técnica de pozo en placa, en agar Sabouraud-dextrosa con rosa de bengala, en la cual se utilizó como testigo positivo a la terbinafina, y como testigo negativo a la solución salina. **Resultados:** Nos mostraron que no se tiene el efecto antimicótico en los fármacos probados frente al testigo positivo, el cual fue la compañía K (terbinafina) con una inhibición del 100% frente a las demás; prosiguiendo a esta, las compañías A, B y G (Anfotericina B, Fluconazol e Itraconazol); después las compañías B, G, C y D (Fluconazol, Itraconazol y Ketoconazol); siendo menos eficaces las compañías F, J, E, I, H (Itraconazol, Ketoconazol y Fluconazol), igual actividad a la solución salina, por lo tanto no hay eficacia de los antimicóticos. **Conclusión:** El método es barato, fiable y adecuado para evaluar la actividad biológica de diferentes antimicóticos antes de salir al mercado.

## II. INTRODUCCIÓN

Las micosis se transmiten por contacto directo de persona a persona, por vía percutánea o a través de la penetración de heridas en la piel, inhalación, ingestión, inoculación y por procedimientos diagnósticos o terapéuticos invasivos y en forma endógena, por hongos de la flora comensal. Las micosis se clasifican por localización en: *superficiales*, *subcutáneas*, *sistémicas* y *oportunistas*.

El género *Aspergillus* es causante de una micosis oportunista adquirida mediante la penetración del hongo por vía respiratoria, inoculación percutánea o por contacto directo con las esporas de las diferentes especies del hongo.

Este hongo está ampliamente diseminado en el medio ambiente, presente en agua, aire, suelos, alimentos y plantas; las formas infectantes son las esporas, que se pueden inhalar o introducir por la piel a través de una discontinuidad de la misma.

Como factores de virulencia tenemos las glucoproteínas de la pared celular del hongo, ya que presentan actividad de endotoxina e inducen fenómenos de hemorragia y necrosis; por otro lado, la capacidad invasiva se relaciona con la secreción de elastasa y la producción de sideróforos. Una vez que se han inhalado las esporas del hongo, se instalan y desarrollan micelio, mostrando colonización de la mucosa con la presencia de moco y eosinófilos, y destrucción del epitelio bronquial con infiltrado celular, fibrina y necrosis. La forma invasiva provoca edema con necrosis. La presencia del hongo en las vías respiratorias origina una respuesta de tipo alérgico, en personas con inmunosupresión importante, a partir de la infección pulmonar, se origina una invasión micótica tisular intensa con afección vascular y fenómenos trombóticos; todo esto produce diseminación en diferentes órganos y se conoce como aspergilosis invasiva.

La aspergilosis pulmonar de tipo alérgica con datos de rinitis o broncoalveolar; de tipo asmático con formación de aspergilomas, presenta tos y secreción mucopurulenta, fiebre, disnea y malestar general, esta es causada por inhalación de conidios y genera alveolitis y cuadro asmático, fibrosis pulmonar, edema intersticial y vasculitis.

La forma pulmonar invasiva, propia de personas inmunocomprometidas, causa tos productiva, hemoptisis, disnea, fiebre y ataque al estado general; la aspergilosis diseminada provoca lesiones granulomatosas y necróticas en sistema nervioso, corazón, aparato

digestivo, hígado y bazo; otros sitios afectados son: piel, oídos, ojos y uñas (onicomicosis); la aspergilosis micetomatoide es indistinguible de un micetoma eumicético.

La aspergilosis ótica genera otitis externa, con lesión eritematosa, edema y pequeñas úlceras encostradas, con prurito, ardor y dolor; la forma oftálmica produce queratitis con inflamación, eritema y ulceración corneal, fotofobia, dolor, ardor y puede generar una endoftalmitis. También se ha encontrado en senos paranasales, en vías urinarias y cardíaca.<sup>1</sup>

Esta enfermedad es de gran importancia, por eso se debe tener en cuenta, ya que en los últimos 20 años la incidencia de aspergilosis invasiva ha aumentado entre 5 y 10 veces, presentando una mortalidad que varía desde un 60 a un 98 por ciento dependiendo de su localización, enfermedad de base (inmunodepresión), diagnóstico y tratamiento precoz. A pesar que se ha logrado un importante avance en estos dos últimos decenios, aproximadamente un 50 por ciento de los casos se diagnostican post mortem. También afectan principalmente vías respiratorias causando así asma y aspergilosis broncopulmonar crónica, además de ser causante de contaminación alimentaria y provocar lo que es el micetismo.

Por tal motivo para la aspergilosis y para otras enfermedades se han diseñado una gran variedad de medicamentos como: Terbinafina, Ketoconazol, Itraconazol, Fluconazol, Anfotericina B, entre otros, también existen medicamentos compuestos como por ejemplo: Azitromicina-Fluconazol-Tinidazol, Itraconazol-Secnidazol, Fosfato de clindamicina-Ketoconazol, además de que tienen diferentes formas farmacéuticas (tabletas, cápsulas, óvulos, suspensiones inyectables, etc), complicando aún más el panorama terapéutico por la gran diversidad de concentraciones que presentan estos medicamentos.<sup>2</sup>

El mejor procedimiento para evaluar su efectividad sería que todas las compañías realizaran la prueba de actividad biológica para asegurar que los medicamentos tuvieran una efectividad del 100%, sin embargo, algunas empresas no realizan la prueba. Por lo tanto, el cometido de este trabajo es evaluar en algunos antimicóticos su eficacia mediante esta prueba y así corroborar el efecto terapéutico del medicamento.

### III. MARCO TEÓRICO

#### 3.1. Definición de micología

La micología médica es una rama de la microbiología, interrelacionada con diversas especialidades de la medicina, y tiene por objeto estudiar a los hongos y las enfermedades que producen.

Los hongos se consideraron originalmente como plantas inferiores en la categoría de las criptógamas y en la división (*Phylum*) *Thallophitas*. Desde 1969, Whittaker los colocó en el reino Fungae y agrupo a los seres vivos en cinco reinos en la escala biológica: Monera, Protista, Fungae, Plantae y Animalia. En el reino Monera, se incluían las bacterias, los actinomicetos y algunas algas verdes y azules; en el reino Protista, los protozoarios y el resto de algas; en el Plantae, los vegetales superiores, y en el Animalia, los animales superiores. En 2002, Kendrick, aunando esto a otras técnicas, la inmunología y la biología molecular, los clasifica hoy en día en siete reinos: *Archeabacteria*, *Eubacteria*, *Chromista*, *Protozoa*, *Fungi*, *Plantae* y *Animalia*.<sup>3</sup>

El mundo de los hongos ha estado en contacto con el hombre desde su origen mismo, a través de los años éstos han tenido múltiples usos y fines, quizás en un inicio fueron utilizados como ornato y en el afán del hombre por encontrar nuevas fuentes nutricionales, como alimento.

Hasta el siglo XVIII, los únicos hongos conocidos fueron los macromicetos o setas, pero gracias a la creación del microscopio por Leeuwenhoek, se nos ha permitido asomarnos al mundo no perceptible por el ojo humano, y por ende hemos encontrado el vasto grupo de los hongos microscópicos, con los que el hombre ha obtenido múltiples beneficios, como el desarrollo de variados antibióticos; también ha descubierto los microorganismos patógenos para él, animales, plantas e insectos.<sup>4</sup>

### 3.2. Generalidades de los hongos

Los hongos constituyen un complejo y fascinante grupo de organismos, tan grande que se calculan más de 70 000 especies, pero se cree que hay más de un millón y medio; viven en los medios más variados y sólo alrededor de 100 son necesariamente patógenos para mamíferos, pero también hay patógenos de vegetales, insectos (entomógenos) o de otros hongos (microparásitos), y unos pocos cientos son hongos oportunistas.

Los hongos mejor conocidos por todos son los macroscópicos, denominados también setas o champiñones, con tamaño, forma y color de lo más variado.

Los hongos tienen como característica común la ausencia de clorofila, por lo tanto, no pueden realizar la fotosíntesis y deben nutrirse a partir de materia orgánica; tienen la habilidad de descomponer organismos muertos o sus productos (saprófitos o saprotrofos) y obtener el nutrimento de otros organismos vivos o huésped (parásitos). Algunos hongos se asocian a otro organismo para nutrirse mutuamente (simbiosis) como los líquenes, la combinación de hongos y las algas, así como las micorrizas, asociación de hongos y raíces de plantas, que sirven para incrementar la absorción de nutrientes del suelo.

Los hongos tienen características ecológicas estratégicas que les permiten llenar sus requerimientos nutricionales junto con su ambiente físico, como temperatura, actividad acuosa y aerofilia. Los hongos patógenos son especies zootrópicas que requieren tejido vivo para el crecimiento, al menos durante una parte de su ciclo; en cambio, los hongos oportunistas son necrotróficos o saprotrofos, es decir, utilizan componentes orgánicos generados por vertebrados o compuestos orgánicos de invertebrados. Los hongos necrotróficos pueden dividirse en queratinofílicos (utilizan queratina), lipofílicos (usan lípidos), osmofílicos (que viven en ambiente con poca actividad acuosa), simbioses endógenos (*Candida*), urofílicos y coprofílicos (*Trichosporon* y *P. boydii*).

Los hongos tienen gran importancia para conservar el equilibrio de la naturaleza, ya que desintegran o reciclan casi todos los restos orgánicos; intervienen en la producción del humus del suelo, muy importante para su fertilidad; a esto se denomina “biodesintegración” y es indispensable en la biosfera, pero también participan de manera indispensable en el biodeterioro; algunos hongos se encuentran disponibles incluso para programas de control biológico.

Por sí mismos, los hongos sirven como alimento o se utilizan en la elaboración de otros: pan, vino, cerveza y quesos: se usan para elaborar salsa de soja, fermentar la mandioca o yuca y producir tapioca; se utilizan en procesos industriales, como la elaboración de ácido cítrico (*Aspergillus niger*); también sirven para obtener antibióticos como la penicilina, las cefalosporinas, la griseofulvina y el ácido fusídico, así como hormonas y enzimas.

Por sus usos en la industria, se ha perfeccionado mucho la ingeniería genética, sobre todo en levaduras. Por otra parte, pueden ser una seria amenaza para los cultivos; entre los fitopatógenos, los parásitos fúngicos originan 70% de las enfermedades importantes; pueden destruir maderas, pieles, telas, obras de arte, lubricantes, cocinas, baños o alimentos que consume el ser humano o los animales. En la ganadería son sensibles de ocasionar grandes pérdidas económicas por enfermedades digestivas, abortos, dermatosis o micosis sistémicas.

En seres humanos, la micopatología es variada. Al envenenamiento producido por la ingestión de un hongo macromiceto (setas tóxicas) se llama micetismo.

Se conoce como micotoxicosis las alteraciones producidas por la ingestión de alimentos que contienen metabolitos o sustancias precursoras de toxinas de hongos, como las aflatoxinas (*Aspergillus*), las fusarinas (*Fusarium*) que se desarrollan sobre maíz, cacahuates (maní) y otros sustratos utilizados como alimento para seres humanos o animales, son sustancias muy activas que afectan a los alimentos y pueden originar mas hepatomas en animales de laboratorio y se cree que producen cáncer de hígado en seres humanos; y ergotoxinas. También pueden ocurrir fenómenos alérgicos de hipersensibilidad en personas normales o atípicas, fundamentalmente asma y rinitis (*Penicillium*, *Aspergillus*).<sup>3</sup>

### 3.3. Clasificación

La actual clasificación de los hongos propuesta por Alexopoulos y Mims (1979), siguiendo las reglas internacionales, propusieron que el reino *Fungae*, se organizara de la siguiente forma:

Cuadro 3.3.1. Clasificación actual del reino *fungae* <sup>4</sup>

Reino	División	Subdivisión	Clase
<i>Fungae</i> o <i>Mycetae</i>	<i>Gymnomycota</i> <i>Mixomycotina</i>	<b>Hongos acuáticos o inferiores</b>	
		<i>Zygomycotina</i>	<i>Zygomycetes</i>
	<i>Trichomycetes</i>		
	<i>Ascomycotina</i>		<i>Ascomycotina</i>
	<i>Amastigomycota</i>	<i>Basidiomycotina</i>	<i>Basidiomycotina</i>
		<i>Deuteromycotina</i>	<i>Deuteromycetes o Fungi Imperfecti</i>

En el cuadro 3.3.1, sólo se hace énfasis en la división *Amastigomycota*, que equivale a la *Eumycota* (anterior clasificación), debido a que aquí se incluyen los grupos de hongos de interés médico.

Existen hongos de mayor interés como son: ornamentales, nutricionales, tóxicos, alucinógenos, medicinales, contaminantes y patógenos. <sup>4</sup>



### **3.4. Hongos venenosos o tóxicos**

El hombre, al descubrir en los hongos una gran fuente de alimentos, fue ingiriendo a su paso todos los que encontraba a su alrededor, de algunos no sólo obtuvo una nueva variedad de nutrientes, sino ciertos malestares, trastornos, e incluso la muerte. Ahora sabemos que hay setas y mohos que contienen potentes tóxicas.

A pesar de que existen setas sumamente tóxicas, éstas vienen siendo una pequeña parte, pero han dejado en la gente una sensación mítica de peligro, de aquí que surjan múltiples consejos acerca del conocimiento popular de los hongos dañinos como son: “el ennegrecimiento de la plata o de la cebolla”, que no son ciertos, y solo causan confusiones. En la Edad Media se utilizó el sistema del “gato o perro” para observar su comportamiento después de la ingestión de los hongos.

Los hongos miceliales o mohos también son capaces de dar intoxicaciones severas, quizás el más conocido de estas es el *Aspergillus flavus*, que tiene potentes aflatoxinas hepatotóxicas.<sup>4</sup>

### **3.5. Características de los hongos**

La identificación de las levaduras, como la de las bacterias, implica la realización de pruebas bioquímicas. Sin embargo, los hongos multicelulares se identifican sobre la base de su aspecto físico, que incluyen las características de las colonias y las esporas reproductivas.

#### **➤ Estructuras vegetativas**

Las colonias se describen como estructuras vegetativas por que están compuestas por células que participan en el catabolismo y en el crecimiento.

#### **➤ Hongos filamentosos (mohos) y hongos carnosos.**

El tallo (cuerpo) de los hongos filamentosos o carnosos está formado por filamentos largos de células unidas; estos filamentos, que se denominan hifas, pueden crecer hasta proporciones inmensas.

Las hifas de casi todos los hongos filamentosos contienen tabiques que las dividen en unidades separadas similares a una célula mononucleada (un núcleo). Estas hifas se denominan tabicadas. En algunas clases de hongos las hifas no contienen tabiques y aparecen como células continuas y largas con muchos núcleos. Estas hifas se denominan cenocíticas. Incluso en los hongos con hifas tabicadas hay aberturas en los tabiques que forman un continuo de citoplasma de células adyacentes; estos hongos en realidad también son organismos cenocíticos.

Las hifas crecen alargándose desde sus extremos. Cada parte de una hifa puede crecer y cuando se desprende un fragmento puede alargarse para formar una hifa nueva. En el laboratorio los hongos suelen cultivarse a partir de fragmentos obtenidos del tallo.

La porción de una hifa que obtiene nutrientes se denomina hifa vegetativa; la porción que participa en la reproducción es la hifa reproductiva o aérea, llamada así por que se proyecta sobre la superficie del medio en el que está creciendo el hongo. A menudo las hifas aéreas poseen esporas reproductivas. Cuando las condiciones ambientales son convenientes las hifas crecen hasta formar una masa filamentososa denominada micelio que es visible a simple vista.<sup>5</sup>

### **3.6. Reproducción de los hongos**

Una de las características más importantes de los hongos es que siempre se reproducen por esporas y puede ser sexuada (teleomorfa) o asexuada (anamorfa). Los hongos que presentan ambas formas se llaman holomorfos. En la reproducción sexuada o perfecta existen células y órganos sexuales diferenciados, que pueden llevar a cabo la fusión de dos núcleos, y por lo tanto hay intercambio de material genético, con la posibilidad de que aparezcan nuevas propiedades, en tanto que la asexuada o imperfecta (hongos mitospóricos), se da a partir de un micelio aéreo o reproductor, sin fusión de los núcleos. Las esporas o elementos celulares que sirven a la dispersión se denominan propágulos.

Por un fenómeno de pleomorfismo, el hongo sufre una mutación irreversible, pierde sus órganos de reproducción y se transforma en un hongo veloso de micelio estéril, (*Mycellia sterillia*).<sup>3,4</sup>

En la actualidad hay una tendencia taxonómica que indica que cuando se usa la palabra o término ESPORA solo se debe a una forma de reproducción sexuada, y para CONIDIA, se refiere a la imperfecta o asexuada. Uno de los inconvenientes que tiene esta clasificación es que el término “espora” sigue siendo muy trivial y semánticamente se usa para referirse a las formas de los hongos, no importando que se indique específicamente a cuáles (sexuadas o asexuadas).<sup>4</sup>

### 3.7. Aspergillus

Estructuralmente consta de un conidióforo, una vesícula, mótulas, fiálides y conidias; las hifas son multinucleadas, el conidióforo se desarrolla de una hifa vertical, a partir de una célula horizontal llamada célula pie. Sobre la vesícula pueden desarrollarse las mótulas y las fiálides, formando una segunda capa.<sup>6</sup>

Las especies de *Aspergillus* son mohos de crecimiento rápido con *hifas tabicadas* ramificadas y una disposición característica de conidios en el conidióforo. Aparecen colonias esponjadas en uno a dos días y para el quinto día pueden cubrir toda la placa con su crecimiento pigmentado. Las especies se definen con base en las diferencias de la estructura del *conidióforo* y la disposición de los conidios (figura 3.7.1).<sup>7</sup>

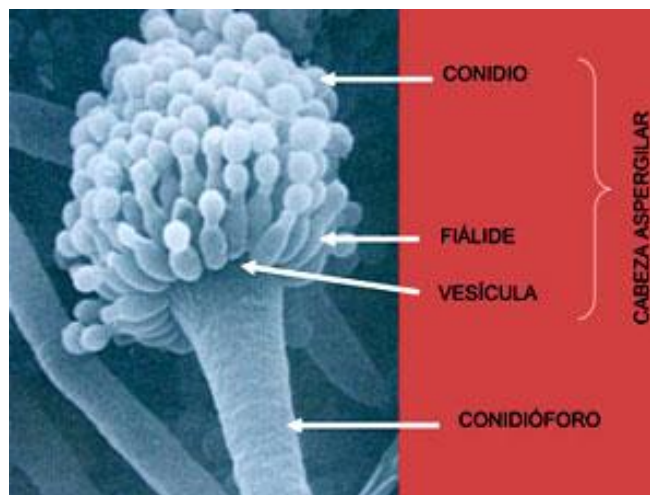


Figura 3.7.1. Estructuras de reproducción asexual de *Aspergillus* sp. (Microscopio electrónico).

### 3.8. Características morfológicas, microscópicas y fisiológicas del *Aspergillus flavus*

Las colonias crecen rápidamente en 5 días a 25°C y tienen un micelio aéreo algodonoso y bien desarrollado que presenta cierta tonalidad de amarillo, marrón o verde-amarillo cuando madura.

➤ **Morfología macroscópica:** Colonias filamentosas, aterciopeladas, de color verde amarillento o café. El reverso puede ser café rojizo o dorado, vesículas redondas, esporulación en toda la superficie, puede haber fiálides solas (uniseriado) o con métulas (biseriado).

➤ **Morfología microscópica:** Conidióforos rugosos con vesículas esféricas de 20 a 60 micras, son globulosas y la esporulación ocurre en toda la superficie. Las fiálides se originan en la vesícula (uniseriado) o en una hilera primaria de métulas que dan origen a fiálides en la vesícula (biseriado). Las fiálides a su vez dan origen a cortas cadenas o masas globulosas de conidias elípticas a esféricas, de 3-5 µm de diámetro y de color amarillo o amarillo-anaranjado que se tornan equinulados con el tiempo. Los conidios pueden ser de dos órdenes en disposición radial, equinulados, y de longitud variable.<sup>8,9.</sup>

Cuadro 3.8.1. Características del *Aspergillus flavus*<sup>10,11.</sup>

Colonia	Conidióforos	Vesícula	Disposición de conidios	Conidios	Fiálides	T° de desarrollo óptimo
Aspecto filamentoso color verde- amarillento.	Rugosos	Esféricas y voluminosas, 35 a 45 µ.	Una o dos órdenes en disposición radial.	Equinulados ó globosos, verde- amarillentos	1 ó 2 series radiadas	37°C

### 3.9. Aflatoxinas

Además de las infecciones que pueden ocasionar los hongos, existen otro tipo de daños que pueden causar al hombre, por ejemplo, existen casos donde un gran número de personas se enferman por el consumo de alimentos contaminados por toxinas producidas por hongos denominadas micotoxinas.

Estas micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por mohos que pueden causar diferentes síntomas toxicológicos como intoxicaciones y lesiones agudas o crónicas.

Entre las principales micotoxinas se encuentran las aflatoxinas, las cuales son compuestos cíclicos planares que se intercalan con los ácidos nucleicos de las células y actúan como mutagenos de cambio de fase y carcinógenos. Ocurre principalmente en el hígado, donde se convierten en derivados inestables.

Los mohos pueden crecer rápidamente en los granos y en el maíz cuando estos productos se almacenan en condiciones de humedad.

Los carcinógenos derivados de los hongos incluyen las aflatoxinas y las fumonisinas. Las aflatoxinas se producen habitualmente en granos húmedos y en productos de frutos secos.<sup>12</sup>

Cuadro 3.9.1. Micotoxicosis producida por micotoxinas de hongos en animales domésticos.<sup>13</sup>

Enfermedad	Hongo	Micotoxina	Productos alimenticios contaminados	Animales afectados
Aflatoxicosis	<i>Aspergillus flavus</i>	Aflatoxinas	Arroz, maíz, sorgo, cereales, cacahuates, soja.	Aves de corral, cerdos, ganado bovino, ovejas, perros.

Estas aflatoxinas son producidas por ciertas cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus*, tanto el hongo como la toxina se han aislado de alimentos como cebada de maíz, semillas de algodón, cacahuates, harina de cacahuates, arroz, soja, trigo, garbanzo, chicharos, etc.

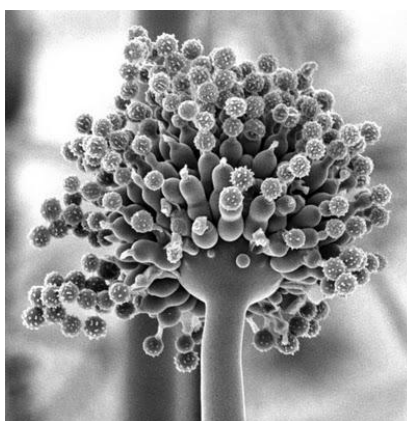


Figura 3.9.1. Estructura del *Aspergillus flavus*

Las aflatoxinas son metabolitos tóxicos producidos por *Aspergillus flavus* o *A. parasiticus* en los alimentos y piensos (alimento procesado proveniente de los desperdicios de comida). Son probablemente las micotoxinas más conocidas y las que se investigan más intensamente del mundo. Las aflatoxinas han sido asociadas a varias enfermedades. La presencia de aflatoxinas depende de ciertos factores ambientales y de la susceptibilidad de las instalaciones a la invasión por parte de los hongos antes de los periodos de cosecha, del almacenaje, y del procesado. Las aflatoxinas han recibido mayor atención que cualquier otro tipo de micotoxinas porque han demostrado tener un potente efecto carcinógeno en animales de laboratorio susceptibles, y efectos toxicológicos agudos en humanos.

Hay cuatro aflatoxinas principales: B1, B2, G1, G2. Donde la designación de aflatoxinas B1 y B2 viene de que bajo la luz ultravioleta exhiben fluorescencia azul (B:blue), mientras que las designadas como G se refieren a que muestran en sus estructuras relevantes fluorescencia amarilla verdosa (G:green) bajo la luz ultravioleta. Además, dos de los productos metabólicos, aflatoxina M1 y M2, son contaminantes directos significativos de alimentos y piensos. Estas aflatoxinas fueron aisladas de la leche de animales alimentados con piensos contaminados; la designación con la letra M, proviene de milk.

Estas toxinas tienen estructuras muy parecidas y forman un grupo único de compuestos heterocíclicos altamente oxigenados, de forma natural.<sup>14</sup>

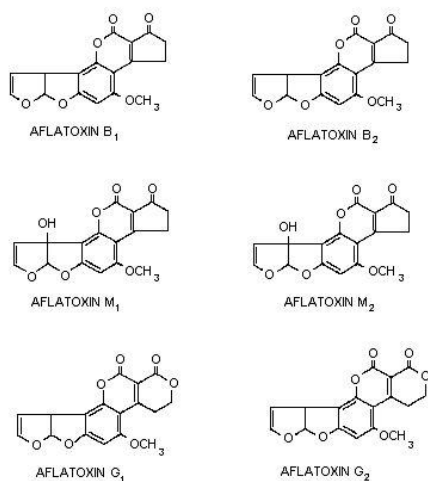


Figura 3.9.2. Estructura de las aflatoxinas<sup>14</sup>

### 3.10. Aspergilosis

Es una micosis causada por un género ubicuo y de bajo poder de patogenicidad. La invasión puede estar localizada y afectar un solo órgano o tejido, o bien, ser sistémica. El grado de diseminación depende de la gravedad y duración de los factores predisponentes como puede ser cáncer, uso de esteroides de alta potencia, desnutrición, quemaduras, etc.

De todos los hongos que causan enfermedades en los seres humanos, ninguno esta tan ampliamente distribuido en la naturaleza como las especies de *Aspergillus*, este es omnipresente, se encuentra allí donde haya restos orgánicos, especialmente en el suelo, en la materia vegetal en descomposición, el polvo domestico, los materiales de la construcción, en algunos alimentos y en el agua. La causa habitual de la aspergilosis suele ser *Aspergillus fumigatus*. *Aspergillus flavus* es la segunda especie más importante, especialmente en la enfermedad invasiva de los pacientes inmunodeprimidos. La enfermedad invasiva suele causar infección pulmonar (con fiebre, dolor pectoral y tos) que se disemina al cerebro, los riñones, el hígado, los huesos o la piel. En los pacientes inmunocompetentes, *Aspergillus* típicamente causa sinusitis alérgica, bronquitis alérgica o una infección broncopulmonar leve y localizada.

La principal puerta de entrada de *Aspergillus* se encuentra en el tracto respiratorio. La inhalación de conidiosporas puede causar varios tipos de aspergilosis pulmonar.

1.- *Aspergilosis alérgica*, con reacción de hipersensibilidad del árbol bronquial, que se manifiesta con un cuadro asmático y eosinofilia. En los pacientes con transplante de pulmón se han descrito cuadros de traqueobronquitis invasiva.

2.- *Aspergilosis primaria invasiva*, a consecuencia de la entrada masiva de *Aspergillus*, por vía aérea.

3.- *Aspergilosis secundaria no invasiva (Aspergilosis broncopulmonar)*, caracterizada por la proliferación dentro de una cavidad orgánica neoformada, como puede ser una caverna tuberculosa limpia con el tratamiento antituberculoso, de numerosas hifas del hongo acumuladas formando una pelota, denominada *aspergiloma*. Los aspergilomas, al irritar la pared de la cavidad donde asientan, pueden dar lugar a hemoptisis.

4.- *Aspergilosis secundaria masiva*, en pacientes en estado de inmunodepresión.

El tratamiento en las formas invasivas de aspergilosis requiere la administración intravenosa de anfotericina B.

El diagnóstico de laboratorio de la aspergilosis se basa en la identificación, bien al examinar directamente muestras patológicas o al aislar y caracterizar el hongo. El tratamiento se basa en el tratamiento de la enfermedad subyacente, para aumentar la resistencia del huésped. Se administra itraconazol.<sup>15, 16.</sup>

### **3.11. Micetismo**

#### ***Aspergillus flavus como contaminante en alimentos básicos.***

Una de las preocupaciones más apremiantes de los países en vías de desarrollo es la producción insuficiente de alimentos básicos, como son los granos y semillas. La disponibilidad de granos depende de una serie de factores entre los que se encuentran las pérdidas ocasionadas por plagas. Se estima que en México se pierde del 25 al 30% de los granos a causa de insectos, roedores y hongos.

Los hongos causan ennegrecimiento de los granos y semillas y algunas especies producen micotoxinas.

Entre las micotoxinas más conocidas se encuentran las aflatoxinas producidas por *Aspergillus flavus*, sustancias carcinógenas que afectan principalmente el hígado y el pulmón.

Para evitar la contaminación por hongos, además de los métodos preventivos, se ha recurrido a diferentes opciones como son: la búsqueda de cultivo resistente, la regulación de la humedad del grano y el uso de productos químicos.

El método de control más utilizado es el químico, sin embargo, los compuestos usados comercialmente para este fin, pueden ocasionar daño a la flora y fauna silvestre, y su toxicidad en el hombre y los animales domésticos se manifiesta como teratogénesis, carcinogénesis y esterilidad; además inducen la aparición de plagas resistentes.<sup>17</sup>



### **3.12. Antimicóticos**

Los antimicóticos surgen por las frecuentes infecciones en humanos producidas por los hongos, las cuales si no son atendidas a tiempo pueden llegar a causar hasta la muerte.

Se entiende por antifúngico o antimicótico a toda sustancia que tiene la capacidad de evitar el crecimiento de algunos tipos de hongos o incluso de provocar su muerte. Dado que los hongos además de tener usos beneficiosos para el ser humano (levadura del pan, hongos de fermentación de los quesos, los vinos, la cerveza, entre otros muchos ejemplos) forman parte del colectivo de seres vivos que pueden originar enfermedades en el ser humano, el conocimiento y uso de los antifúngicos es de vital importancia a la hora de tratar muchas enfermedades.

En la síntesis de estos fármacos es muy importante tener en cuenta la relación de su estructura-función, pues sobre la base de ellos se garantiza la muerte del hongo sin provocar graves daños al organismo hospedero.

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

### **3.13. Clasificación de los antifúngicos**

Los antimicóticos incluyen una amplia variedad de sustancias con diferentes estructuras químicas y mecanismos de acción. La clasificación se realiza según criterios convencionales que atienden a su estructura en: polienos, azoles, alilaminas, entre otros; de acuerdo con su origen en sustancias producidas por organismos vivos o derivados de síntesis química; de acuerdo con su espectro de acción en: amplio o restringido y de acuerdo con el sitio de acción (cuadro 3.13.1.).

Cuadro 3.13.1. Clasificación de los antifúngicos por su estructura

<b>GRUPOS</b>	<b>ANTIMICOTICOS</b>	<b>SITIO DE ACCIÓN</b>
<b>Polienos</b>	Nistatina, natamicina, amfotericina B	Membrana celular
<b>Azoles</b>	a) Imidazol: miconazol, clotrimazol, ketoconazol b) Triazoles: fluconazol, itraconazol, c) Triazoles de segunda generación: voriconazol, ravuconazol, posaconazol	Membrana celular
<b>Alilaminas</b>	Terbinafina, naftifina	Membrana celular
<b>Lipopéptidos</b>	a) Papulacandinas b) Triterpenos glicosilados c) Equinocandinas: caspofungina, anidulofungina, micafungina	Pared celular
<b>Pirimidinas fluoradas</b>	Flucitosina	Núcleo

### 3.14. Mecanismo de acción de los antifúngicos

La gran similitud entre las células mamíferas y fúngicas resulta un problema a la hora de diseñar la molécula antifúngica, pues esta debe ser selectiva de la célula patógena y no de la célula humana sana. Los agentes antifúngicos comúnmente son utilizados ante infecciones de las mucosas de las cuales una de cuatro están relacionadas con hongos patógenos.

El mecanismo de acción de los medicamentos que inhiben el crecimiento de hongos, depende del lugar en el que actúen, lo cual está relacionado con la estructura química del antifúngico.

#### ➤ *Acción del antifúngico sobre la membrana celular del hongo*

La membrana celular de la célula humana así como la de los hongos, desempeña una importante función en la división celular y en el metabolismo. Las complejas partículas lipídicas llamadas esterolatos, son aproximadamente el 25 % de la membrana celular.

Sin embargo, el contenido de esterol de la célula fúngica y mamífera es diferente. En las células de los mamíferos el colesterol es el que predomina y en las células fúngicas el primario es el ergosterol.

La diferencia del contenido de esteroides ha sido explotada como blanco de acción en los medicamentos antifúngicos. Dentro de ellos se tiene a los polienos, azoles y alilaminas.

**Polienos.** Los medicamentos que se encuentran en este grupo, se unen al ergosterol presente en la membrana celular fúngica, donde se forman poros que alteran la permeabilidad de la membrana lo que permite una pérdida de proteínas, glúcidos y cationes monovalentes y divalentes, causas de la muerte celular .

**Azoles.** Estos inhiben al citocromo P-450-3-A de la célula fúngica, a través de la inactivación de la enzima C-14- $\alpha$ -dimetilasa, con lo cual se interrumpe la síntesis del ergosterol en la membrana celular. Debido a la falta de ergosterol se comienzan a acumular esteroides tóxicos intermedios, aumenta la permeabilidad de la membrana y se interrumpe el crecimiento del hongo.

**Alilaminas.** Trabajan de forma similar a los azoles, conceptualmente ellas inhiben la síntesis del ergosterol. Sin embargo, este grupo actúa en un paso temprano de la síntesis del ergosterol.

Las alilaminas inhiben a la enzima escualeno epoxidasa, de esta forma disminuye la concentración de ergosterol, aumentan los niveles de escualeno, aumenta la permeabilidad de la membrana celular, se interrumpe la organización celular y disminuye el crecimiento del hongo.

### **3.15. Relación estructura-función de los antifúngicos**

Las estructuras de los antifúngicos tienen gran variedad pero la presencia de ciclos de 5 átomos en los cuales el nitrógeno o azufre forman parte del ciclo, pudiera considerarse un grupo farmacóforo, pues en ausencia de este las moléculas pierden su actividad biológica contra los hongos.

En muchos casos la aparición de anillos bencénicos con sustituyentes halogenados como cloro o flúor, cercanos al anillo de imidazol o triazol, ayudan a aumentar la respuesta biológica de la molécula, pues le confieren lipofilia y mayor eficiencia frente a infecciones fúngicas, ejemplo que se aprecia en los azoles.<sup>18</sup>

### 3.16. Agentes Antimicóticos

Los hongos son microorganismos eucariotas. Tienen una membrana celular citoplásmica compuesta de ergosterol y zimosterol. La membrana celular está circundada por una pared celular compuesta por manoproteínas, quitina y glucanos ( $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glucano y  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-glucano). La división clásica de los hongos incluye tres tipos: levaduras, mohos y hongos dimórficos. Las levaduras, como *Candida* spp., son microorganismos redondos que se reproducen mediante gemación asexual. Los hongos, como *Aspergillus* spp., están compuestos por estructuras tubulares conocidas como hifas y crecen mediante ramificación. Las hifas suelen describirse como septadas (con divisiones) o no septadas (sin divisiones). Los hongos dimórficos, como *Histoplasma capsulatum*, existen como mohos en el ambiente y crecen como levaduras cuando se exponen a la temperatura corporal.<sup>19</sup>

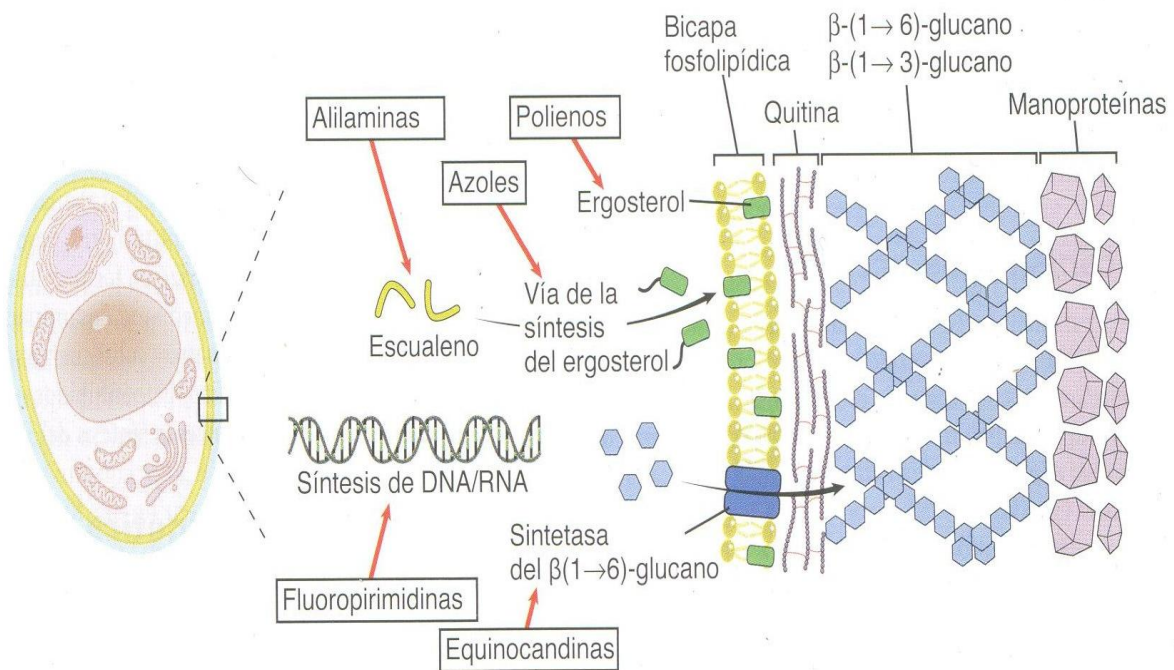


Figura 3.16.1. Síntesis de la membrana celular y la pared celular del hongo, y blancos de los agentes antimicóticos.<sup>19</sup>

### 3.17. Estructura de los antifúngicos

#### 3.17.1 Anfotericina B complejo lipídico (ABLCL)

Es un antibiótico y antifúngico, tiene una constitución química poliénica (heptaeno), conteniendo además una hexosamina (micosamina), grupos ácidos (ácido carboxílico) y básicos (amina primaria). Es insoluble en agua y en la mayoría de los disolventes orgánicos. La estructura básica de los polienos se compone de un gran anillo lactónico con una cadena lipofílica rígida que contiene entre tres y siete enlaces dobles, y una porción hidrofílica flexible que porta un número variable de grupos hidroxilo

*Interacción con el sitio activo:* La anfotericina B forma complejos con el ergosterol de la membrana gracias a la conformación de cinta que presenta, quedando el ergosterol atrapado en ella. La anfotericina B como rodea al ergosterol puede asociarse con este a través de asociaciones intermoleculares del tipo Van der Waals tipo London entre la parte lipofílica del fármaco y del ergosterol. También pueden formarse puentes de hidrógeno entre las regiones hidrofílicas del fármaco.

La configuración en cinta de ABLCL la convierte en un complejo herméticamente condensado. Este complejo proporciona cantidad disminuida de droga libre y puede ser esta la causa de su reducida toxicidad.

*Mecanismo de acción:* La anfotericina B se fija al ergosterol, el principal esteroide de la membrana de los hongos, esta unión altera la permeabilidad de la membrana aumentándola, y altera su fluidez originando la producción de canales iónicos (poros) que destruyen la integridad osmótica de la membrana, provocando así la pérdida de constituyentes intracelulares como: iones sodio, potasio e hidrogeniones, provocando la muerte del hongo.<sup>19, 20, 21</sup>

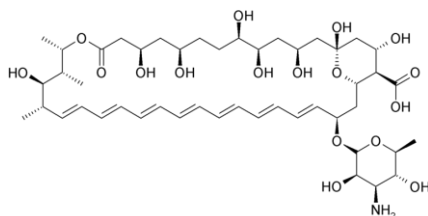


Fig. 3.17.1. Estructura de la anfotericina B.

### 3.17.2 Fluconazol

Agente antifúngico de baja toxicidad. Como otros triazoles, tiene 2 anillos que contienen 3 átomos de nitrógeno. El anillo bencénico presenta 2 flúor. Su peso molecular es relativamente bajo, 306,3 Da.

Es una molécula polar y simétrica lo que favorece su hidrosolubilidad. Su aspecto es de polvo blanco y cristalino, es una base extraordinariamente débil (pKa 3,7) y no ionizable a pH fisiológico. Esta droga antifúngica es usada en el tratamiento y prevención de infecciones fúngicas superficiales y sistémicas.

*Interacción con el sitio activo:* Este fármaco pudiera asociarse con sitios activos de la enzima a través de puente de hidrógeno entre el grupo C=O de la enzima y el grupo OH del fármaco, interacción que tiene una fuerza de 5 kcal/mol.

*Mecanismo de acción:* El fluconazol inhibe el citocromo P450 fúngico de la enzima 14 $\alpha$ -desmetilasa. Esta inhibición previene la conversión de lanosterol a ergosterol, componente esencial de la membrana citoplasmática, y subsecuente acumulación de 14 $\alpha$ -metil esteroides, alterando así la síntesis de la membrana celular del hongo. El fluconazol es principalmente fungostático, pero puede funcionar como fungicida contra ciertos organismos en una dosis dependiente.<sup>19, 20, 21.</sup>

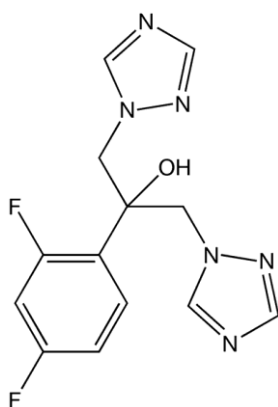


Fig. 3.17.2. Estructura del fluconazol.

### 3.17.3 Ketoconazol

Es un fármaco antimicótico azólico, de la clase imidazol. Como otros imidazoles, tiene 5 estructuras del anillo que contienen 2 átomos de nitrógeno. Este antifúngico es un compuesto lipofílico, propiedad que le permite encontrarse en concentraciones altas en los tejidos grasos aunque sus concentraciones en el fluido cerebroespinal es pobre en presencia de inflamación. Su absorción oral y solubilidad es óptima a pH ácido gástrico.

*Interacción con el sitio activo:* El ketoconazol pudiera asociarse con sitios activos de la enzima a través de asociaciones de Van der Waals  $\text{CH}_3$  del fármaco y  $\text{CH}_3$  de la enzima.

La afinidad de este con las membranas celulares fúngicas es menor comparada con la del fluconazol e itraconazol. El ketoconazol tiene más potencial ante las membranas celulares de mamífero y por ello induce a la toxicidad.

*Mecanismo de acción:* Su oxidación por parte de los sistemas enzimáticos dependientes del citocromo P450 interfiere el metabolismo del lanosterol (dificulta la 14-desmetilación) lo que lleva a una disminución del ergosterol y, de forma secundaria, a un acúmulo de esteroides anómalos (esteroides 14-alfa-metilados). La falta de ergosterol altera la permeabilidad de la membrana de los hongos lo que lleva a una desestructuración de los orgánulos intracelulares y de la capacidad de división. Secundariamente, el acúmulo de esteroides anómalos contribuye a la fragilidad y muerte celular. Esta situación se ve reforzada por un cierto efecto del ketoconazol sobre la síntesis de otros compuestos químicos como son los fosfolípidos y los triglicéridos.<sup>19,20,21</sup>

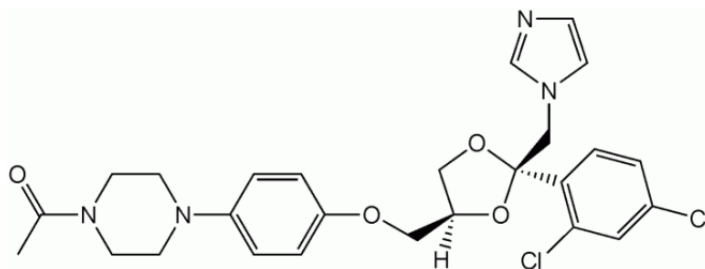


Fig. 3.17.3. Estructura del ketoconazol.

### 3.17.4 Itraconazol

Químicamente es un derivado azólico de la clase triazol lipofílico, se comporta como una base débil, tiene 5 estructuras de anillo que contienen 3 átomos de nitrógeno. El itraconazol es un compuesto lipofílico que se distribuye en tejido grasos y su penetración en fluidos acuosos es limitada.

*Interacción con el sitio activo:* Este fármaco pudiera asociarse con sitios activos de la enzima a través de asociaciones de Van der Waals  $\text{CH}_3$  del fármaco y  $\text{CH}_3$  de la enzima.

*Mecanismo de acción:* Los hongos se caracterizan por tener ergosterol, de estructura similar al colesterol, y que se obtiene por la desmetilación del lanosterol. Esta reacción está catalizada por la enzima CYP51A1, específica de los hongos, la cual es inhibida por el itraconazol. Además, también se considera inhibidor de la glucoproteína P (GpP). La selectividad de esta inhibición viene determinada por el grado de lipofilia del extremo azólico del antifúngico. En el caso del itraconazol, este extremo es muy lipofílico, lo que origina enlaces fármaco-citocromo muy estables, y explica la mayor especificidad por los hongos de este fármaco comparado con otros antifúngicos azólicos (y por tanto, la menor incidencia de reacciones adversas al medicamento). El itraconazol no induce al citocromo p-450 pero es un potente inhibidor de la enzima CYP3A4, lo que tiene trascendencia clínica a la hora de valorar sus interacciones.<sup>19, 20, 21</sup>

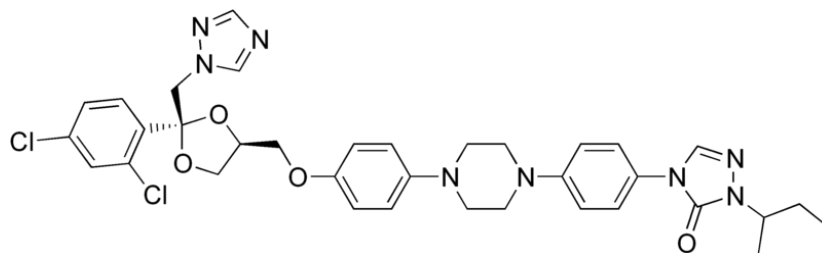


Fig. 3.17.4. Estructura del itraconazol.



### 3.17.5 Terbinafina

Es un antimicótico de amplio espectro, de tipo alilamínico, su fórmula química es: [(E) - N(6,6-dimetil-Z-hepten-4-inil)-N-metil-1-naftalenmetanamida]. Es empleada en el tratamiento de infecciones fúngicas superficiales, tanto de uso tópico como sistémico (dermatofitosis y algunas infecciones por levaduras).

*Interacción con el sitio activo:* Se presume que ocurran asociaciones Van der Waals entre el CH<sub>3</sub> del fármaco y CH<sub>3</sub> de la enzima.

*Mecanismo de acción:* La terbinafina inhibe a la enzima escualeno 2-3 epoxidasa, por lo cual interfiere en la etapa temprana de la síntesis del ergosterol, la cual es el componente fundamental de la membrana del hongo, llevando a una deficiencia de la concentración de ergosterol y a una acumulación del escualeno, dando como resultado la muerte celular.

La ventaja principal de terbinafina se debe a un alto margen de seguridad en el hombre porque no tiene ningún efecto inhibitorio en el sistema citocromo P-450; es más selectiva que los derivados azólicos como el ketoconazol.<sup>19, 20, 21.</sup>

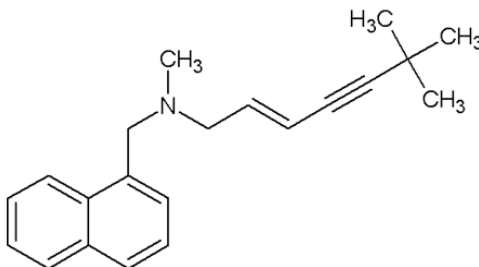


Fig. 3.17.5. Estructura de la terbinafina.

### 3.18. Pruebas que se realizan a los principios activos

A los principios activos se les realizan ciertas pruebas antes de elaborar los medicamentos, como se muestra a continuación. (Cuadro 3.18.)<sup>22, 23, 24.</sup>

Cuadro 3.18. Pruebas que se le realizan a los principios activos.

	Fluconazol	Itraconazol	Ketoconazol	Azitromicina	Terbinafina	Anfotericina B
<b>Descripción</b>		X	X		X	X
<b>Sustancia de referencia</b>	X	X	X	X	X	X
<b>Ensayos de identidad</b>	X	X	X	X	X	X
<b>Uniformidad de dosis</b>		X	X		X	X
<b>Desintegración</b>		X	X		X	X
<b>Sustancias relacionadas</b>	X	X	X	X	X	X
<b>Valoración espectrofotométrica</b>	X	X	X	X	X	X
<b>Transparencia y coloración de las soluciones</b>	X					
<b>Perdida por secado</b>	X	X	X	X	X	X
<b>Residuo de incineración</b>	X			X		
<b>Hierro</b>	X					
<b>Rotación específica</b>		X	X	X	X	X
<b>Cristalinidad</b>				X		
<b>pH</b>				X		
<b>Agua</b>				X		
<b>Solubilidad</b>		X	X		X	X
<b>Temperatura de fusión</b>		X	X		X	X
<b>Metales pesados</b>		X	X	X	X	X
<b>Actividad biológica</b>	NO SE REALIZA LA PRUEBA					

#### **IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Las micosis ocasionadas por *A. flavus* han aumentado en los últimos años, afectando principalmente las vías respiratorias causando asma e incluso casos graves de aspergilosis broncopulmonar crónica, además de causar contaminación alimentaria provocando micetismo, a ello se debe su importancia. En el mercado existe una amplia gama de antimicóticos elaborados por diversas compañías farmacéuticas, sin embargo, la prueba de actividad biológica no la realizan todas las empresas. Por lo que se pretende evaluar la prueba de actividad biológica y así poder determinar su efectividad mediante la observación en la prueba de inhibición antimicótica para saber cuáles cumplen el requerimiento y tienen el efecto biológico deseado.

#### **V. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la actividad antifúngica de antimicóticos de diferentes compañías farmacéuticas, utilizando como microorganismo (m.o.) de prueba el *Aspergillus flavus* para determinar la eficacia.

##### **5.1. Objetivos particulares**

- ✿ Probar diversos antimicóticos de distintas compañías farmacéuticas para evaluar cuál de ellos posee mayor eficacia contra el hongo *Aspergillus flavus*.
- ✿ Observar y cuantificar los halos de inhibición.
- ✿ Determinar cual antimicótico tiene mejor efecto biológico.

#### **VI. HIPÓTESIS**

Debido a las características de crecimiento del *Aspergillus flavus* y a su facilidad para contar propágulos, este será un buen indicador, de gran utilidad para evaluar la actividad biológica de diversos antimicóticos de diferentes compañías farmacéuticas, esperando así que la terbinafina sea el más eficaz debido a que inhibe desde un paso temprano al hongo.

## **VII. DISEÑO EXPERIMENTAL**

### **Tipo de estudio:**

Experimental, prospectivo.

### **Criterios de inclusión:**

Todos aquellos antimicóticos con fecha de expedición vigente y que presenten una buena solubilidad

### **Criterios de exclusión:**

Aquellos antimicóticos que no posean una buena solubilidad y que no tengan vigencia en su periodo de expiración

### **Criterios de eliminación:**

Aquellos cultivos de prueba que presenten contaminación

## VIII. MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS

### *Material*

Tubos de ensaye de 13 x 150 con tapón de rosca.

Micropipetas

Matraz Erlenmeyer de 500 mL

Cámara de Neubauer

Puntas para pipeta estériles

Bastón de vidrio

Asa bacteriológica

Asa micológica

Cajas de Petri de plástico estériles de 60 x 15 mL

Probeta de 10mL

Probeta de 100 mL

Filtros Millipore de 0.22  $\mu$

Parafilm

Vasos de precipitados de 50 mL

Pipeta graduada de 5 mL

Jeringas de 1mL

Tubos de plástico falcón estériles

Mechero Bunsen

Tripié

### *Reactivos*

Solución Stock de Rosa de Bengala

Agar Sabouraud – Dextrosa

### ***Equipos***

Balanza Analítica (Mettler H33AR)

Microscopio (Zeiss)

Incubadora (Riossa EC)

Olla express (Presto H Steele)

Baño metabólico (Precisión)

Sonicador (Sonics Vibra cell)

Refrigerador (Philips 127 volts-VA)

Micropipetas tipo Eppendorf

#### **8.1. Medicamentos. Forma farmacéutica en tabletas**

Fármacos antimicóticos de venta en el mercado de algunas compañías farmacéuticas

(Anfotericina B) (Compañía A)

Azitromicina, Fluconazol, Tinidazol (Compañía B)

Fosfato de clindamicina, Ketoconazol (Compañía C)

Fluconazol (Compañía D)

(Fluconazol) (Compañía E)

Itraconazol, Secnidazol (compañía F e I)

Itraconazol (compañía G)

Itraconazol (Compañía H)

Ketoconazol (Compañía J)

Terbinafina (Compañía K)

#### **8.2. Material Biológico**

Cepa de *Aspergillus flavus*

## IX. PROCEDIMIENTO

1. Se realizó una resiembra de *Aspergillus flavus* en agar Sabouraud-dextrosa en tubos de ensaye de 13 x 150 de tapón de rosca.
2. Se incubó el hongo a temperatura ambiente por 72 horas o hasta que mostró la coloración característica verde-amarillenta, confirmando a través de un frotis con colorante azul algodón lactofenol que se trataba de *Aspergillus flavus*.
3. Se pesó la cantidad suficiente de los medicamentos para tener una concentración final de 25µg/50µL en solución salina fisiológica (S.S.F).
4. Se preparó agar Sabouraud-dextrosa con solución Stock de rosa de bengala, como medio de crecimiento del hongo, se esterilizó a 15 lb de presión (121°C) durante 15 minutos, se dejó enfriar en baño metabólico a 45°C y se colocaron 10 mL en cada caja de Petri estéril de 60 x 15 mm, se dejó enfriar y después en el centro de la caja se le perforó un pocillo de 5 mm de diámetro, todo en condiciones estériles.
5. Como control positivo se utilizó el fármaco Lamisil® (Terbinafina) en comprimidos de 250 mg. Se disolvió un comprimido en 10 mL de agua destilada, posteriormente se mezclaron 100 µL de esta disolución en 6.15 mL de S.S.F. para una concentración final de 20 µg / 50 µL. Como control negativo se utilizó solución salina fisiológica.
6. Se adicionó con *Aspergillus flavus* esporulado solución salina estéril y se ajustó a una concentración de  $2 \times 10^6$  propágulos/mL, utilizando una cámara de Neubauer, de tal manera que nos dió una concentración final de 100,000 propágulos/50µL. Para obtener la concentración de propágulos se hizo una cuenta de estos en la cámara de Neubauer en donde:

$$\text{N}^\circ \text{ de propágulos/mm}^3 = n/4(\text{mm}^2) 0.1 \text{ mm}$$

n = propágulos contados

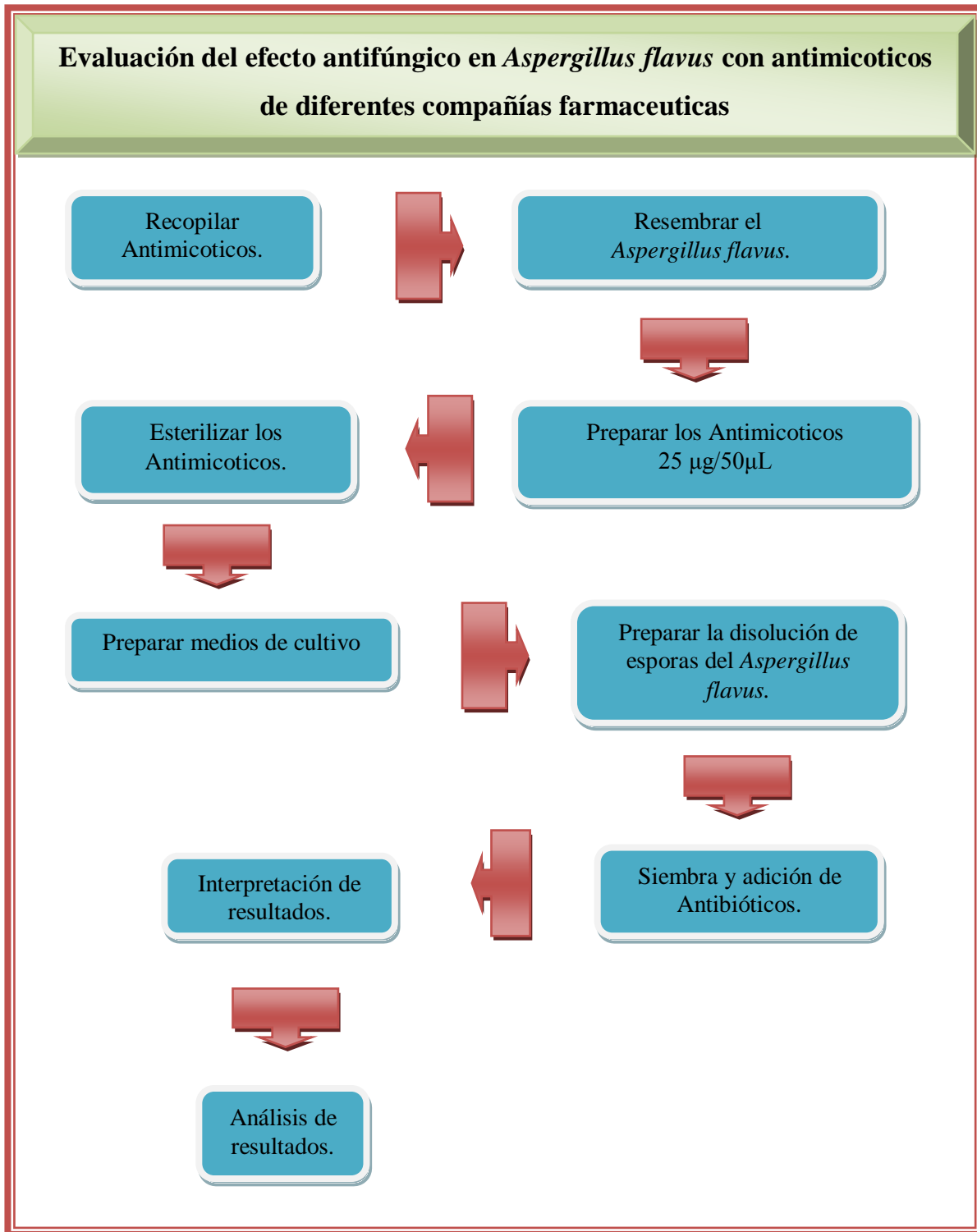
4 = cuadros contados

La cuenta se realizó en los cuadrantes utilizados para la cuenta de glóbulos blancos.

7. Se esterilizaron las soluciones de antimicóticos con las concentraciones finales, con ayuda de filtros milipore de 0.22µm estériles, el filtrado se colectó en tubos de plástico Falcon estériles. Todo en condiciones estériles.
8. Se realizó la inoculación del hongo mediante el vaciado de 50 µL de la solución con la concentración de  $2 \times 10^6$  propágulos/mL en el agar y se esparció homogéneamente en la placa utilizando un bastón de vidrio estéril.
9. Se aplicó en los pocillos 50µL del fármaco a una concentración de 25µg/50µL, el control positivo (terbinafina) y el control negativo (SSF), cada pocillo recibió 50 µL de las soluciones a prueba.
10. Se dejó reposar las cajas durante 72 horas a temperatura ambiente en un lugar oscuro.
11. Se observaron diariamente las placas anotando el número de colonias (las placas se realizaron por quintuplicado). Las placas se esterilizaron en autoclave después de una semana del ensayo. Donde se presentó inhibición total de crecimiento se tomó como una efectividad del 100 % de inhibición, con el testigo negativo del ensayo (salina) el numero de colonias presente es el 100 %. <sup>25, 26, 27.</sup>



## X. DIAGRAMA DE FLUJO



## XI. RESULTADOS

Cuadro 11.1. Día 1: Halo de inhibición

Compañía	Repeticiones		
	1	2	3
A	00	00	00
B	00	00	00
C	00	00	00
D	00	00	00
E	00	00	00
F	00	00	00
G	00	00	00
H	00	00	00
I	00	00	00
J	00	00	00
K	00	00	00
<b>Soln. salina</b>	00	00	00

Cuadro 11.2. Día 2: Halo de inhibición

Compañía	Repeticiones		
	1	2	3
A	1.30	1.50	2.00
B	1.80	1.80	1.50
C	0.70	0.70	0.70
D	0.80	0.70	1.30
E	0.01	0.01	0.70
F	0.70	0.70	0.01
G	0.70	0.70	1.00
H	0.01	0.01	0.01
I	0.50	0.01	0.01
J	0.01	0.80	0.01
K	5.00	5.00	4.50
<b>Soln. salina</b>	0.01	0.01	0.01

Cuadro 11.3. Día 3: Halo de inhibición

Compañía	Repeticiones		
	1	2	3
A	0.90	0.70	0.80
B	0.50	0.50	0.50
C	0.01	0.40	0.40
D	0.01	0.01	0.01
E	0.01	0.01	0.01
F	0.01	0.01	0.01
G	0.50	0.50	0.01
H	0.01	0.01	0.01
I	0.01	0.01	0.01
J	0.01	0.01	0.01
K	5.00	5.00	4.50
<b>Soln. salina</b>	0.01	0.01	0.01

Cuadro 11.4. Día 1: Número de colonias

Compañía	Repeticiones		
	1	2	3
A	0	0	0
B	0	0	0
C	0	0	0
D	0	0	0
E	0	0	0
F	0	0	0
G	0	0	0
H	0	0	0
I	0	0	0
J	0	0	0
K	0	0	0
<b>Soln. salina</b>	0	0	0

Cuadro 11.5. Día 2: Número de colonias

Compañía	Repeticiones		
	1	2	3
A	4	3	5
B	2	5	4
C	4	3	3
D	2	2	3
E	3	6	4
F	2	3	1
G	3	4	4
H	4	4	4
I	1	3	1
J	3	1	2
K	1	1	2
<b>Soln. salina</b>	20	20	40

Cuadro 11.6. Día 3: Número de colonias

Compañía	Repeticiones		
	1	2	3
A	40	40	40
B	40	40	40
C	40	40	40
D	40	40	40
E	40	40	40
F	40	40	40
G	40	40	40
H	40	40	40
I	40	40	40
J	40	40	40
K	1	1	2
<b>Soln. salina</b>	40	40	40

## XII. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

*Los resultados se hicieron con base en los objetivos del presente trabajo, iniciando con:*  
“Probar diversos antimicóticos de distintas compañías farmacéuticas para evaluar cuál de ellos posee mejor eficacia contra el hongo *Aspergillus flavus*.”

Cuadro 12.1. Prueba de ANOVA en donde se observa la comparación del número de colonias y del diámetro del halo de inhibición

ANOVA						
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Número de colonias	Inter-grupos	3966.238	11	360.567	1.080	.391
	Intra-grupos	21358.433	64	333.726		
	Total	25324.671	75			
Diámetro del halo de inhibición	Inter-grupos	120.540	11	10.958	88.202	<b>.000</b>
	Intra-grupos	7.951	64	.124		
	Total	128.492	75			

Al realizar la prueba estadística de ANOVA se encontró que el número de colonias se encuentra sin diferencia significativa ( $p > 0.05$ ), con una confianza del 95%, mientras que en el diámetro de inhibición si se encontró diferencia significativa ( $p < 0.05$ ), con una confianza del 95% como se muestra en el cuadro 12.1.

Cuadro 12.2. Analisis Pos Hoc o de contrastes ortogonales por la prueba de Tukey para la comparaci3n del efecto antimic3tico de las diferentes compa1as farmac3uticas.

<b>Diametro del halo de inhibici3n</b>					
HSD de Tukey <sup>a,b</sup>					
Compa1a farmac3utica	N	Subconjunto para alfa = .05			
		1	2	3	4
Soluci3n salina	10	.0100			
Compa1a H	6	.0100			
Compa1a I	6	.0917			
Compa1a E	6	.1250			
Compa1a J	6	.1417			
Compa1a F	6	.2400			
Compa1a D	6	.4717	.4717		
Compa1a C	6	.4850	.4850		
Compa1a G	6	.5683	.5683	.5683	
Compa1a B	6		1.1000	1.1000	
Compa1a A	6			1.2000	
Compa1a K	6				4.8333
Sig.		.209	.095	.091	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homog3neos.

a. Usa el tama1o muestral de la media arm3nica = 6.207.

b. Los tama1os de los grupos no son iguales. Se utilizar3 la media arm3nica de los tama1os de los grupos. Los niveles de error de tipo I no est3n garantizados.

Para saber cuales eran los antimic3ticos que poseen la mejor actividad biol3gica se realiz3 un an3lisis Pos Hoc por la prueba de Tukey como se muestra en la tabla 12.2, encontrandose as3 en el grupo 4 que la compa1a K es la que tiene un mejor promedio en cuanto al halo de inhibici3n por lo tanto es la m3s eficaz que las dem3s compa1as; a esta le siguen la compa1a A, B y G en el grupo 3; prosiguiendo asi las compa1as B, G, C y D en el grupo 2; y siendo menos eficaces las compa1as F, J, E, I, H del grupo 1 que son iguales a la soluci3n salina y por lo tanto no hay una eficacia.

Cuadro 12.3. Análisis de la *t* de Student que se realiza para la igualdad de medias por medio de la Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias		
		F	Sig.			
Diámetro del halo de inhibición	Se han asumido varianzas iguales	.402	.528	1.303	74	.197
	No se han asumido varianzas iguales			1.303	74.000	.197
Número de colonia:	Se han asumido varianzas iguales	.000	.995	-13.461	74	.000
	No se han asumido varianzas iguales			-13.461	72.856	.000

En la tabla 12.3 podemos observar la comparación entre la igualdad de medias, en donde se muestra que el diámetro del halo de inhibición analizado mediante la *t* de Student no posee diferencia significativa ( $p > 0.05$ ), con una confianza del 95%, sin embargo, en el número de colonias si hay diferencia significativa ( $p < 0.05$ ), con una confianza del 95%.

Cuadro 12.4. Estadísticos descriptivos de grupo

Estadísticos de grupo					
	Día de cultivo	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Diámetro del halo de inhibición	Día 2	38	.9276	1.30335	.21143
	Día 3	38	.5382	1.30236	.21127
Número de colonias	Día 2	38	6.18	9.317	1.511
	Día 3	38	36.95	10.568	1.714

En la tabla 12.4 podemos observar que no hay diferencias significativas en el diámetro de inhibición entre el día 2 y el día 3; mientras tanto, en el número de colonias del día 2 y el día 3 si hubo diferencias significativas, la cual es mayor en el día 3.



Al revisar las Cajas de Petri al tercer día de la siembra con *Aspergillus flavus* y con los diferentes antimicóticos pudimos observar que hubo crecimiento similar al del control negativo que fue la solución salina, sin incluir a nuestro control positivo (terbinafina) que si es eficaz, demostrando así que no existe actividad antimicótica en estas compañías.

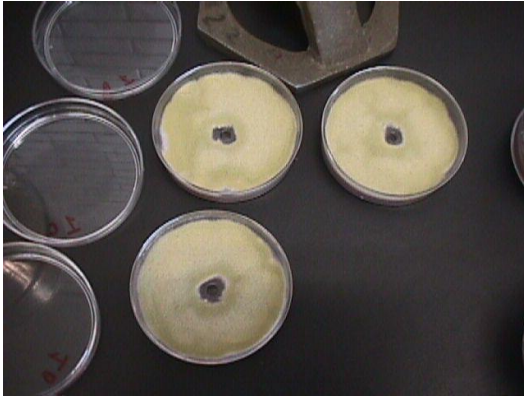


Fig. 12.1. Cajas a prueba con la compañía "A" (1).

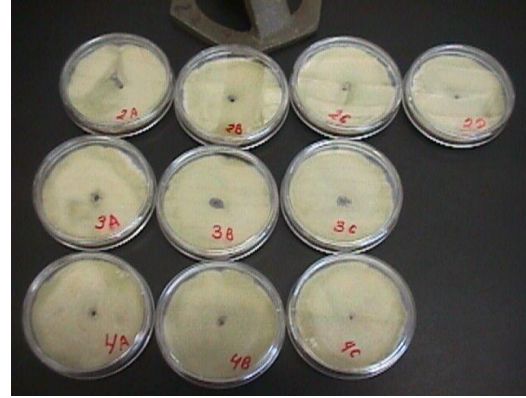


Fig. 12.2. Cajas a prueba con las compañías "D" (2); "G" (3); y "H" (4).



Fig. 12.3. Cajas a prueba con las compañías "C" (5); "B" (6); "J" (7); e "I" (8).

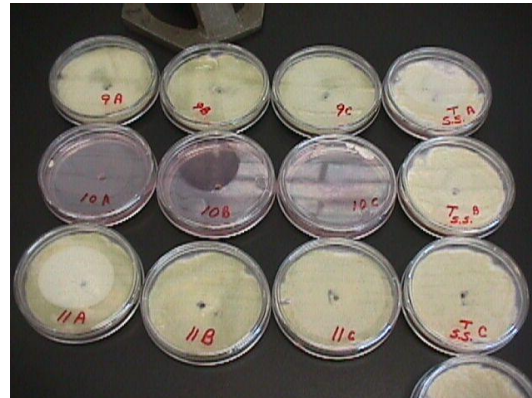


Fig. 12.4. Cajas a prueba con las compañías "F" (9); "K" (10 control positivo); "E" (11); y "SSF" (control negativo).

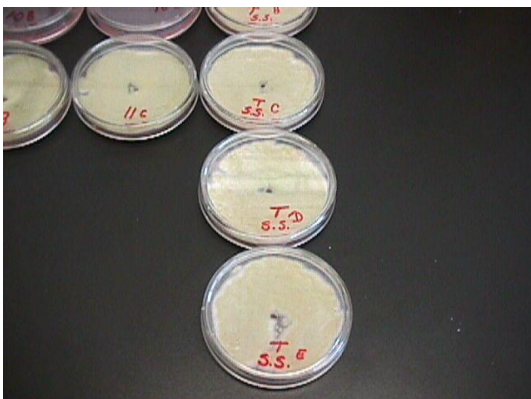


Fig 12.5. Cajas a prueba con la "SSF"

### **XIII. CONCLUSIONES**

Mediante los resultados que obtuvimos al realizar la parte experimental, se comprobó que no todos los antimicóticos de las diferentes compañías poseen eficacia, ya que no todas tienen una buena actividad biológica, lo cual se demostró al compararlas con nuestro control positivo (terbinafina) que es la compañía “K” siendo esta la más eficaz, por no presentar crecimiento de colonias como en las otras que si lo tuvieron.

Es necesario que las compañías farmacéuticas realicen a sus antimicóticos la prueba de actividad biológica para asegurar al público una buena eficacia antes de que estos salgan al mercado, además de que esta prueba es barata, fiable y adecuada para evaluar la actividad biológica de sus productos antes de salir a la venta.

#### **XIV. ANEXO**

Preparación del Agar:

##### **Agar Dextrosa Sabouraud**

Fórmula aproximada para 1000ml

Agar.....15.0 g.

Dextrosa..... 40.0 g.

Peptona de carne.....5.0 g.

Peptona de caseína.....5.0 g.

pH final  $5.6 \pm 0.2$

Método de preparación:

Suspender 65 g. del polvo en un litro de agua purificada. Mezclar perfectamente, calentar con agitación frecuente y hervir durante un minuto hasta disolución. Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.

Preparación de Solución Stock de Rosa de Bengala:

Pesar 0.075 g. de rosa de Bengala en una balanza analítica y se transfiere a un matraz Erlenmeyer de 500 ml con 250 ml de agua destilada

Imágenes de las cajas sembradas con *Aspergillus flavus* y probadas con las diferentes compañías farmacéuticas en el día 2 y 3 después de la siembra.

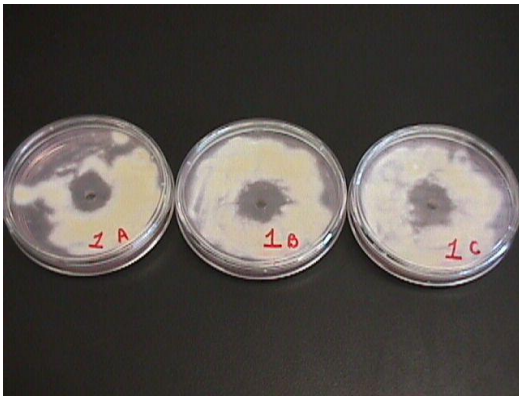


Fig. 14.1. Cajas a prueba con la compañía "A" (1) en el día 2

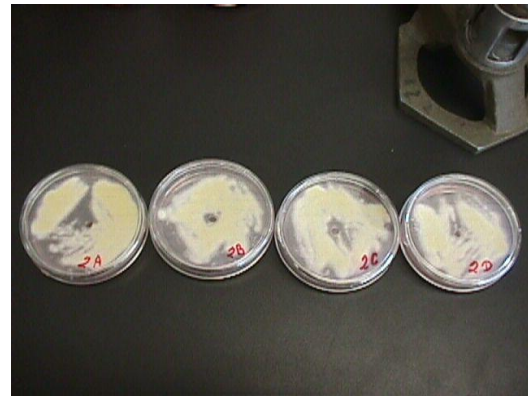


Fig. 14.2. Cajas a prueba con la compañía "D" (2) en el día 2

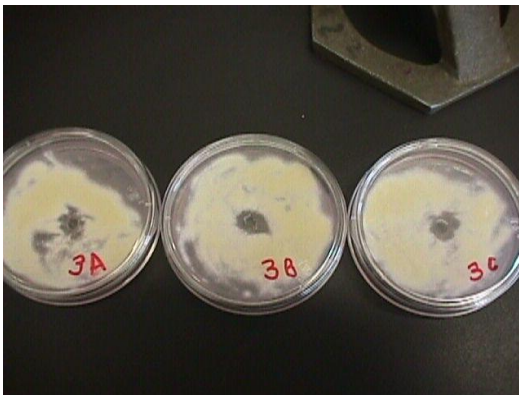


Fig. 14.3. Cajas a prueba con la compañía "G" (3) en el día 2

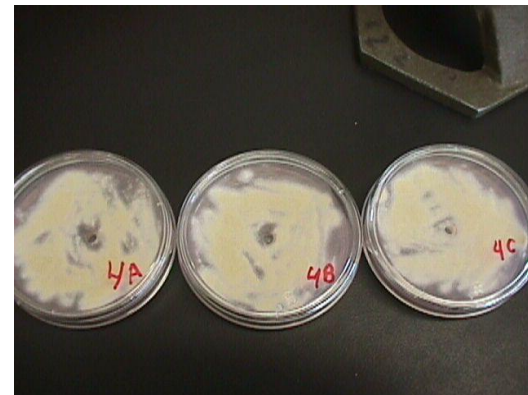


Fig. 14.4. Cajas a prueba con la compañía "H" (4) en el día 2

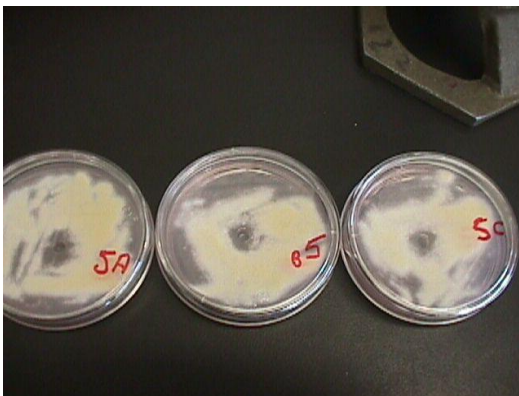


Fig. 14.5. Cajas a prueba con la compañía "C" (5) en el día 2

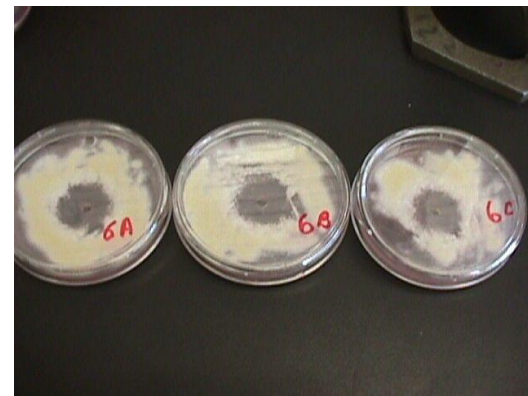


Fig. 14.6. Cajas a prueba con la compañía "B" (6) en el día 2

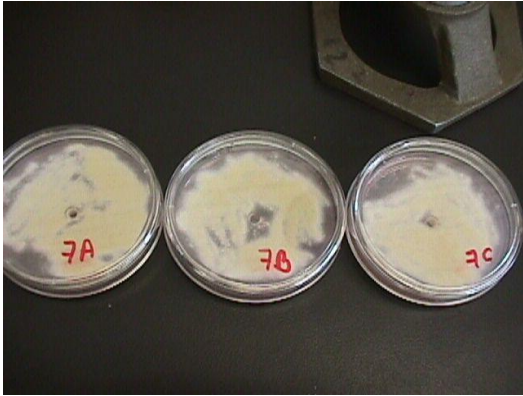


Fig. 14.7. Cajas a prueba con la compañía "J" (7) en el día 2

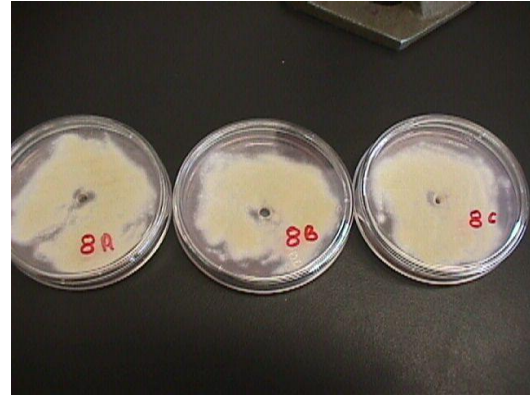


Fig. 14.8. Cajas a prueba con la compañía "I" (8) en el día 2

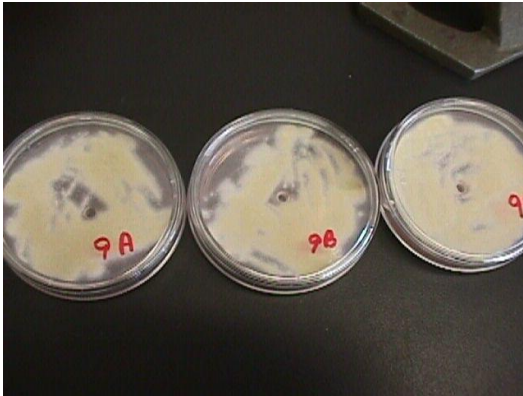


Fig. 14.9. Cajas a prueba con la compañía "F" (9) en el día 2



Fig. 14.10. Cajas a prueba con la compañía "K" (10) en el día 2

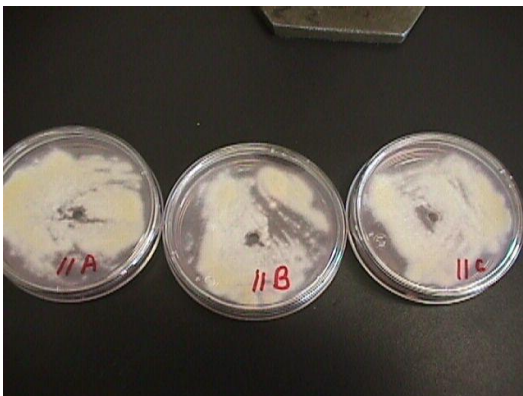


Fig. 14.11. Cajas a prueba con la compañía "E" (11) en el día 2

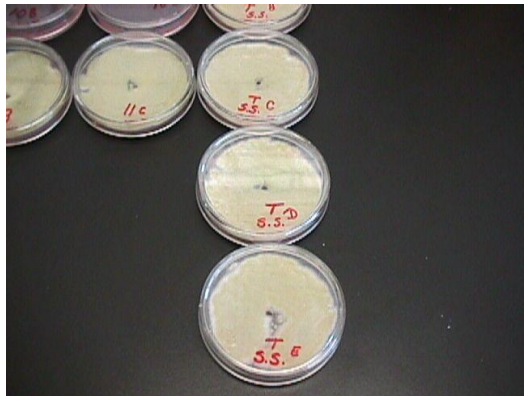


Fig. 14.12. Cajas con la SSF en el día 2



Fig. 14.13. Cajas con todas las compañías al día 3 sin tapa

## XV. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. Romero CR. Microbiología y parasitología humana. 3º ed. Buenos Aires: Panamericana; 2007. p 1105, 1213.
2. < <http://www.who.int/blindness/causes/priority/en/index1.html>> [consulta: 25 mayo 2010]
3. Arenas R. Micología médica ilustrada. 3ª ed. DF.: Interamericana McGraw-Hill; 2008. p 29.
4. Bonifaz A. Micología Médica Básica. 2ª ed. DF.: Méndez editores; 2002. p 3-6, 9-13, 17-19,
5. Tortora JG, Funke RB, Case L.C. Introducción a la microbiología. 9ª ed. Buenos Aires: Panamericana; 2007. p 346-349
6. Castillo TJ. Micología General. D.F.: Limusa; 1987. p 92.
7. Ryan KJ, Ray CG. Sherris. Microbiología Médica. 4ª ed. DF.: Interamericana McGraw-Hill; 2004. p 731.
8. Sánchez VJT, Tay ZJ. Fundamentos de microbiología y parasitología medica. DF.: Méndez Editores; 2003. p 463.
9. Koneman R. Micología (Práctica del Laboratorio). 3ªed. Buenos Aires: Panamericana; 1992. p 116.
10. López MR, Méndez TLJ, Hernández HF, Castañón OR. Micología Médica (Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio). D.F.: Trillas; 1995. p 120.
11. Arenas R. Micología Médica Ilustrada. D.F.: Interamericana. McGraw-Hill; 1993. p 257.
12. Pietro B, Stefano M. Antimycotic activity of 4-thioisosteres of flavonoids towards yeast and yeast-like microorganisms, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 18; 2008. p 3731-3733
13. Willey JM, Sherwood LM, Woolverton CJ. Microbiología de Prescott, Harley y Klein. D.F.: McGraw-Hill; 2008. p 631.

14. Cornejo CJ, Villarroel GO, Compiladores. Antecedentes generales sobre las aflatoxinas y otras micotoxinas y elementos a tener en cuenta para el diseño de prácticas correctas de cultivo y elaboración de nueces. Cuba. Departamento de Alimentos y Nutrición.[en línea]. Consultado el 10 de septiembre de 2010. Disponible en:<http://www.redsalud.gov.cl/portal/url/item/72fd6274dad8792ee04001011f0109e4.pdf>
15. Pera C. Cirugía. Fundamentos, indicaciones y opciones técnicas. 2ª ed. Masson. Tomo I. p 356. [en línea]. Consultado el 10 de septiembre de 2010. Disponible en: [http://books.google.es/books?id=7MG0X4OeEykC&pg=PA356&dq=Aspergilosis+alergica,+Aspergilosis+primaria+invasiva,+aspergilosis+secundaria+no+invasiva+y+aspergilosis+secundaria+masiva&hl=es&ei=X8QMTsDZAZCpsAKW\\_42NCg&sa=X&oi=book\\_result&ct=book-thumbnail&resnum=1&ved=0CC4Q6wEwAA#v=onepage&q=pais%20y%20a%C3%B1o%20de%20edicion&f=false](http://books.google.es/books?id=7MG0X4OeEykC&pg=PA356&dq=Aspergilosis+alergica,+Aspergilosis+primaria+invasiva,+aspergilosis+secundaria+no+invasiva+y+aspergilosis+secundaria+masiva&hl=es&ei=X8QMTsDZAZCpsAKW_42NCg&sa=X&oi=book_result&ct=book-thumbnail&resnum=1&ved=0CC4Q6wEwAA#v=onepage&q=pais%20y%20a%C3%B1o%20de%20edicion&f=false)
16. López MR, Méndez T LJ, Manzano GP, Hernández HF. Principios de microbiología médica, clínica, diagnóstico y terapéutica. DF.: Méndez Editores; 2009. p 141.
17. Jay JM. Microbiología moderna de los alimentos. 4ª ed. Zaragoza: Acribia; 1992. p 30-34.
18. Gregorí VBS. Estructura y actividad de los antifúngicos. Revista Cubana Farmacéutica 2005; 39(2)
19. Scott AW, Andre T. Farmacología y Terapéutica. D.F.: Manual Moderno; 2010. p 179 y 180.
20. Brooks GF, Carroll KC, Butel J S, Morse SA, Mietzner TA. Jawetz, Melnick y Adelberg. Microbiología Médica. 25ª ed. DF.: McGraw-Hill Lange; 2010. p 655-660.
21. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Microbiología Médica. 6ª ed. DF.: Elsevier; 2009. p 701-708.
22. Farmacopea de los Estados Unidos de América, 2007, vol. 2
23. Secretaría de salud. Comisión permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 7ª ed., 2000.II
24. Secretaría de Salud, Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, Comisión Permanente FEUM. 8ª ed. 2004.I



25. Rodríguez PT. Determinación de endotoxinas bacterianas y cuantificación de hongos en partículas de aerosol colectadas en filtros de teflón estériles. [Tesis de Licenciatura]. México. FES Zaragoza UNAM; 2006.
26. Fuentes CF. Evaluación de la actividad antifúngica y su efecto en los radicales libres de los compuestos y extractos de *Tephrosia crassifolia* y *Tephrosia madrensis*. [Tesis de Licenciatura]. México. FES Zaragoza UNAM; 2009.
27. Cardenas ONC, Perez GS, Zavala SMA, Aguirre RJR, Perez GC. Actividad antifúngica de seis plantas sobre *Aspergillus flavus* Link. Revista Mexicana de Ciencias 2005;36: 21-26
28. Pera C. Cirugía: fundamentos, indicaciones y opciones técnicas. España: Elsevier España; 1996. Vol. 1.