

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS BIOQUÍMICAS Y BIOTECNOLÓGICAS

PROGRAMA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE *Myrcianthes ferreyrae* "ARRAYÁN" Y DE SUS HONGOS ENDÓFITOS FRENTE A *Candida albicans* ATCC 18804

Tesis presentada por:
Bach. TAPIA MONTESINOS, Maria Alejandra

Para optar el Título Profesional de:
Químico Farmacéutico

Asesor:
José Villanueva Salas Ph. D.

AREQUIPA-PERÚ

2013

ÍNDICE

I. CAPÍTULO I: GENERALIDADES

INTRODUCCIÓN.....	9
OBJETIVOS.....	10
HIPÓTESIS	11
2.1. Candida Albicans	12
2.1.1. Generalidades	12
2.1.2. Taxonomía.....	13
2.1.3. Morfología.....	13
2.1.4. Características del Cultivo.....	17
2.1.5. Candidiasis	19
2.1.5.1. Sinonimia.....	19
2.1.5.2. Definición.....	19
2.1.5.3. Etiopatogénia.....	20
a) Factores de predisposición:.....	20
b) Factores de Virulencia.....	20
2.1.5.4. Cuadro clínico	22
a) Candidiasis de la membrana mucosa:	22
b) Vulvovaginitis candidiásica	23
c) Candidiasis cutánea	24
d) Candidiasis mucocutánea crónica	25
e) Candidiasis sistémica	25
f) Dispositivos médicos y candidemia	26
g) Infecciones diseminadas de <i>candida</i>	26
2.1.5.5. Diagnóstico.....	26
a) Examen directo de muestras clínicas:	26
b) Aislamiento de <i>Candida</i> a partir de muestras clínicas:	27
c) Agar cromogénico	27
d) Formación de tubo germinativo	27

e) Asimilación de azúcares	27
f) Fermentación de azúcares	27
2.1.5.6. Tratamiento	28
2.1.5.7. Prevención	29
2.2. ANTIFÚNGICOS	29
2.2.1. Evolución histórica.....	31
2.2.2. Clasificación.....	31
a. Antifúngicos Poliénicos	32
b. Azoles.....	34
c. Alilaminas	37
d. Lipopéptidos.....	38
e. Pirimidinas.....	39
f. Otros	40
2.3. MICROORGANISMOS ENDOFÍTICOS	41
2.3.1. Hongos endofíticos.....	41
2.3.1.1. Interacciones planta hospedera – hongo endofítico	42
2.3.1.2. Metabolitos bioactivos producidos por hongos endofíticos	45
2.4. MYRTACEAE	48
2.4.1. <i>Myrcianthes ferreyare</i>	48
2.4.1.1. Clasificación taxonómica	49
2.4.1.2. Sinónimos.....	49
2.4.1.3. Características	50
2.5. METABOLISMO SECUNDARIO DE LAS PLANTAS	50
2.5.1. Terpenoides	51
2.5.2. Alcaloides.....	53
2.5.3. Compuestos fenólicos.....	54
CAPÍTULO III	58
MATERIALES Y MÉTODOS.....	58
3.1. CAMPO DE INVESTIGACIÓN	58

3.1.1.	Unidades de Estudio	58
3.1.2.	Ámbito Geográfico y Temporalidad	58
3.2.	MATERIALES.....	58
3.2.1.	Materiales de Laboratorio	58
3.2.2.	Reactivos	59
3.2.3.	Equipos.....	60
3.3.	MÉTODOS.....	61
3.3.1.	Recolección del Material Biológico	61
3.3.2.	Desinfección y Cultivo de Hojas.....	63
3.3.3.	Cultivo de Hongos y Preparación de los Extractos Etanólicos	65
a.	Hongos Filamentosos	65
b.	Extracto Vegetal.....	67
3.3.3.	Preparación del Medio RPMI – 1640.....	67
3.3.4.	Padronización del Inóculo	67
3.3.5.	Ensayo Antifúngico.....	69
3.3.6.	Análisis Fitoquímico Preliminar	78
a.	Determinación de la presencia de Alcaloides.....	78
b.	Prueba CCF para determinar la presencia de uno o más Alcaloides.....	79
c.	Prueba CCF para determinar la presencia de una o más antraquinonas.....	79
d.	Determinación de Flavonoides por medio de la reacción con los álcalis.....	79
e.	Determinación de la presencia de Agliconas Flavonoides	79
f.	Determinación de Chalconas y Flavofenos.....	79
g.	Prueba CCF para determinar la presencia de uno o más Flavonoides	80
h.	Determinación de la presencia de Cumarinas	80
i.	Prueba CCF para determinar la presencia de una o más Cumarinas.....	80
j.	Determinación de la presencia de Saponinas por medio del test de espuma	80
k.	Determinación de la presencia de Saponinas por medio del test de hemólisis	80
l.	Prueba CCF para determinar la presencia de una o más Saponinas.....	81
m.	Determinación de la presencia de taninos gálicos y catéquicos.....	81
n.	Determinación de triterpenos y esteroides	81
	CAPÍTULO IV	83

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	83
4.1 COLECTA DE ESPECÍMENES VEGETALES Y AISLAMIENTO DE HONGOS ENDOFÍTICOS	83
4.2 ENSAYO ANTIFÚNGICO	88
4.3 ANÁLISIS FITOQUÍMICO	94
4.3.1 Determinación de Alcaloides por CCF	95
4.3.2 Determinación de Antraquinonas por CCF	96
4.3.3 Determinación de Cumarinas por CCF	97
4.3.4 Determinación de Flavonoides por CCF	98
4.3.5 Determinación de Saponinas por CCF	99
4.3.6 Determinación de Terpenos por CCF	100
CONCLUSIONES	102
RECOMENDACIONES	103
BIBLIOGRAFÍA	104
ANEXOS	113

GLOSARIO DE TÉRMINOS

ABD	=	Agar batata dextrosa
CCF	=	Cromatografía en capa fina
CLSI	=	Instituto de estándares clínicos y laboratoriales
CMI	=	Concentración mínima inhibitoria
DMSO	=	Dimetilsulfóxido
KOH	=	Hidróxido de potasio
MOPS	=	Ácido 3-[N-morfolino] propanosulfónico
NaOH	=	Hidróxido de sodio
SIDA	=	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

RESUMEN

El presente trabajo de investigación fue realizado con el propósito de evaluar la actividad antifúngica de extractos etanólicos de hojas de la planta *Myrcianthes ferreyrae* “Arrayán” y de hongos endofíticos aislados de la misma, frente a *Candida albicans* ATCC18804. Para eso se recolectó muestras de hojas de *Myrcianthes ferreyrae* “Arrayán” del distrito de Atiquipa en la provincia de Caravelí, de las cuales se aislaron 18 hongos endofíticos. Los hongos se cultivaron en placas petri y la obtención de los extractos se realizó utilizando etanol como solvente extractor. Para la evaluación se utilizó el método de microdilución en caldo basado en el método M27-A2 del Instituto de estándares clínicos y laborales (CLSI) para encontrar la concentración mínima inhibitoria (CMI). Se colectaron 30 muestras de hojas de 10 especímenes de la planta problema, a partir de estas se aislaron 18 hongos endofíticos. Para el método de microdilución se emplearon los 18 extractos etanólicos de hongos endofíticos y 1 extracto de hojas de la planta, de los cuales el de la planta obtuvo una CMI de 31.25 ug/ml, mientras que en el caso de todos los extractos de hongos endofíticos no hubo una concentración inhibitoria. Dado este resultado se realizó el tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de *Myrcianthes ferreyrae* “Arrayán” por medio de pruebas de coloración, precipitación y por cromatografía en capa fina, encontrándose la presencia de antraquinonas, flavonoides como la rutina, ácido clorogénico, hiperósido, vitexina y quercitina, taninos, terpenos como el geraniol, linalol y cineol, triterpenos y esteroides. En conclusión los resultados obtenidos indican que el extracto etanólico de *Myrcianthes ferreyrae* “Arrayán” tiene actividad antifúngica a una concentración de 31.25 ug/ml, mientras que los hongos endofíticos aislados de la planta no presentan actividad hasta una concentración de 200 ug/ml.

ABSTRACT

The present research was made with the aim to evaluate the antifungal activity of ethanolic extracts of plant leaves *Myrcianthes ferreyrae* “Mirtle”, and endophytic fungi isolated from them, against *Candida albicans* ATCC 18804. The leaves samples were collected in Atiquipa district, in the province of Caravelí of which was isolated 18 endophytic fungi. The fungi were cultured in Petri dishes and obtaining the extracts was performed using ethanol as solvent. The extracts were evaluated by microdilution method based on Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M27-A2 standard to find the minimum inhibitory concentration (MIC). 30 Samples were collected from 10 specimens of leaves of the plant; from these were isolated 18 endophytic fungi. For microdilution method we evaluated an extract from the plant leaves and 18 extracts from the endophytic fungi, of which the plant extract obtained a MIC 31.25 ug/ml, while in the case of all endophytic fungi extract there wasn't an inhibitory concentration. The phytochemical screening of ethanolic extracts of *Myrcianthe ferreyrae* “Mirtle” was studied by coloration and precipitation tests, and thin layer chromatography, finding the presence of anthraquinones, flavonoids such as rutin, chlorogenic acid, hyperoside, vitexin and quercitin, tannins, terpenes such as geraniol, linalool and cineole, triterpenes and steroids. In conclusion, the results obtained indicate that the ethanolic extract of *Myrcianthes ferreyrae* “Mirtle” has antifungic activity until a concentration of 31.25 ug/ml, while the endophytic fungi isolated from the plant does not have activity until a concentration of 200 ug/ml.

CAPÍTULO I

GENERALIDADES

INTRODUCCIÓN

En la actualidad el número de casos de morbi-mortalidad por enfermedades infecciosas ha ido en aumento, junto con el aumento de microorganismos resistentes al tratamiento empleado para las mismas.

Entre las poblaciones en riesgo para contraer estas enfermedades se encuentran los pacientes con SIDA, trasplantados, pacientes recibiendo quimioterápicos, inmunosupresores, estas poblaciones a nivel mundial se encuentran en aumento y con estas también el número de casos de enfermedades infecciosas, entre estas las infecciones fúngicas.

Es así que la búsqueda de nuevas moléculas con aplicaciones farmacéuticas es constante en grupos de investigación para las enfermedades mundiales más prevalentes, y dada la alta incidencia de enfermedades infecciosas, el aumento de microorganismos resistentes a los tratamientos utilizados en la práctica médica y los efectos secundarios producidos por los ya existentes, es de vital importancia hacer estudios de bioprospección de nuevas sustancias con efecto antimicrobiano.

Las fuentes naturales han sido el origen de la mayoría de los antibióticos existentes hoy en el mercado, una de estas fuentes son los hongos endofíticos, estos hongos viven asintóticamente en los tejidos de plantas, y sus metabolitos secundarios son una fuente prometedora de sustancias nuevas con aplicaciones tanto en el ámbito médico, agrícola como industrial.

Actualmente la candidiasis originada por *Candida albicans* es una de las infecciones oportunistas más frecuentes en seres humanos, y documentándose resistencia a las drogas antimicóticas usadas su tratamiento (por ejemplo: imidazoles) se hace necesario investigar la actividad antifúngica de la planta *Myrcianthes ferreyrae* "Arrayán", y de los extractos de hongos endofíticos aislados de la misma, sobre cepas de *Candida albicans* "in vitro" y de esta forma se estaría brindando una alternativa de tratamiento.

OBJETIVOS

- i.** Aislar y cultivar los hongos endofíticos de las muestras de hojas de *Myrcianthes ferreyrae* “Arrayán” recolectadas.

- ii.** Preparar el extracto etanólico de las hojas de *Myrcianthes ferreyrae* “Arrayán” y evaluar su actividad antifúngica frente a *Candida albicans* ATCC 18804 in vitro y determinar la concentración mínima inhibitoria.

- iii.** Preparar el extracto etanólico de los hongos endofíticos aislados de las hojas de *Myrcianthes ferreyrae* “Arrayán” y evaluar su actividad antifúngica frente a *Candida albicans* ATCC 18804 in vitro y determinar la concentración mínima inhibitoria.

- iv.** Comparar la actividad antifúngica de los extractos frente a *Candida albicans* ATCC 18804.

- v.** Realizar un tamizaje fitoquímico de los extractos activos para determinar sus posibles componentes.

HIPÓTESIS

Dado que la medicina tradicional atribuye a *Myrcianthes ferreyrae* “Arrayán” propiedades antifúngicas, y que los hongos endofíticos son ubicuos y producen sustancias que protegen a su hospedero frente a situaciones adversas, es probable que tanto las hojas de *Myrcianthes ferreyrae* “Arrayán” como los hongos endofíticos aislados de las mismas produzcan sustancias con actividad antifúngica frente a *Candida albicans*.



CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Candida Albicans

2.1.1. Generalidades

En la actualidad más de 200 levaduras ascomicetos están incluidas en el género *Cándida*, pero solo unas pocas especies son patógenos oportunistas de los humanos, de las cuales *Candida albicans* es la especie más patógena, aunque otras especies como *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* o *C. tropicalis* son aisladas con una frecuencia elevada en las muestras clínicas. ⁽¹⁾

En seres humanos saludables puede colonizar piel y mucosas, por lo cual son comensales de la cavidad bucal, tubo digestivo y mucosa vaginal, causando a menudo infecciones superficiales. ⁽²⁾

Además *Candida albicans* puede entrar al torrente sanguíneo por penetración directa del tejido luego de que este sea dañado, o diseminarse desde biofilmes formados en dispositivos médicos introducidos en el organismo del paciente, ej. Catéteres, implantes dentales, endoprótesis, articulaciones artificiales. ⁽²⁾

La candidiasis ocurre como resultado de un desbalance entre la inmunidad del hospedero y el patógeno oportunista. Este desbalance no es solo debido a una disfunción inmunológica del hospedero, sino también a la habilidad del hongo de adaptarse a nuevos nichos, dependiendo de la expresión de genes asociados a la infección. Estos genes y sus productos contribuyen a la patogenicidad fúngica y son descritos como factores de virulencia. Ghannoum & abu-elteen (1990) describen como determinantes de la patogenicidad de *Candida albicans* y otras especies a algunas características importantes para su virulencia como la composición de su pared celular con la presencia de adhesinas (manoproteínas),

producción de enzimas hidrolíticas (proteasas, fosfolipasas, hialuronidasas y condroitina sulfatasa) y su dimorfismo. ^{(3) (4) (5) (6)}

La capacidad de *Candida albicans* de adquirir resistencia a los fármacos antifúngicos como la anfotericina B, flucitosina, y una serie de azoles, hace importante el desarrollo continuo de nuevos antifúngicos. ⁽⁷⁾

2.1.2. Taxonomía

Los microorganismos involucrados como agentes etiológicos de la candidiasis se encuentran actualmente clasificados taxonómicamente de la siguiente forma:

Reino: Hongo

División: Deuteromycota

Clase: Blastomycetes

Familia: Cryptococcaceae

Género: *Candida*

Especie: *albicans* ⁽⁸⁾

2.1.3. Morfología

- *Cándida albicans* es un hongo dimorfo que forma largas pseudohifas, hifas y blastoconidios (células gemantes subsféricas de 3-8 x 2-7 μ m). A su vez forma clamidosporas unicelulares, redondas u ovaladas, con gruesa pared refringente (8-16 μ m de diámetro), situadas al final de las hifas, pseudohifas o laterales sobre blastoconideos ovalados. ⁽⁹⁾
- Las levaduras se reproducen por brotación, la cual se inicia por la lisis localizada en la pared celular en un punto específico. La presión interna en esta área de la pared celular debilitada hace que la pared se abombe hacia afuera. Esta parte tumefacta aumenta de tamaño, el núcleo se divide por mitosis y un núcleo hijo migra hacia el brote neoformado. El brote naciente puede continuar aumentando de tamaño.

- La pared celular crece en el punto estrechado de adherencia. Finalmente el brote se separa de la célula madre, y el ciclo de multiplicación está terminado y listo para repetirse. ⁽⁴⁾
- Las pseudohifas, son formadas por las células con brotes que se elongan y permanecen conectadas; estas células son más anchas que las hifas verdaderas y están estrechadas en los sitios donde se unen. Tanto las hifas, como las pseudohifas pueden revertir a levaduras y las tres formas pueden verse en los cultivos o en los tejidos. ⁽⁴⁾
- La levadura y las hifas en crecimiento son los estadios predominantes durante la infección en el huésped humano, existe un acuerdo con respecto a que las hifas de *C. albicans* están relacionadas con su capacidad invasiva, y que existen factores que regula la transición de levaduras a hifas así como de hifas a levaduras como se puede ver en la Figura N°2.1, los cuales incluyen la temperatura, pH del medio de crecimiento, oxígeno, medios que contienen sustancias inductoras como suero, N-Acetil-D-glucosamina, L-prolina y expresión de genes como son el PDE2, PES1 y el quórum sensing. ^{(8) (10) (11)}

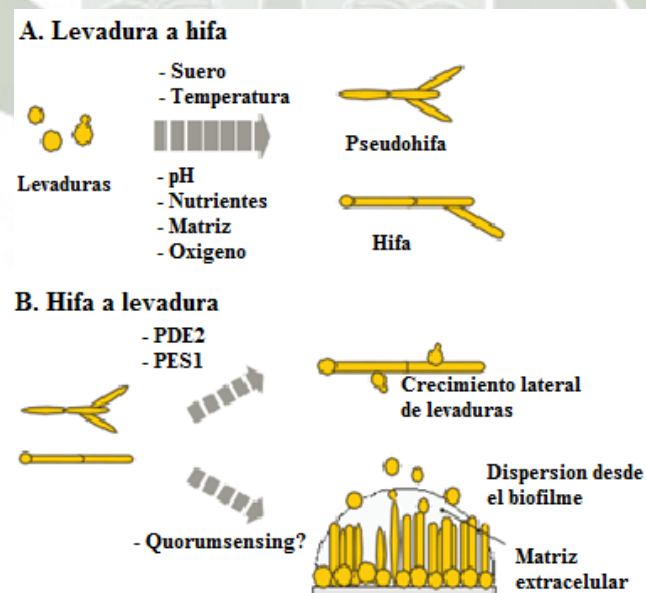


Figura N°2.1: Transiciones morfológicas en *Candida albicans* ⁽¹¹⁾

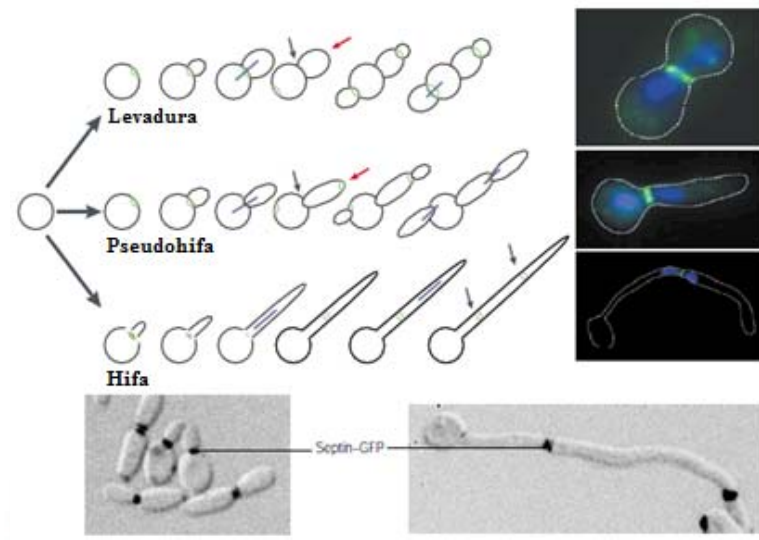


Figura 2.1: Morfología de *Candida albicans* ⁽¹²⁾

Candida albicans puede existir en tres diferentes formas como se puede apreciar en la **Figura 2.1**: levadura (conocida también como blastosporos), las células de levadura son redondas u ovoides y se separan con facilidad entre sí, pseudohifa, se asemejan a células alargadas, que persisten unidas unas a las otras en un sitio de septación y generalmente crecen en un patrón de ramificación que se cree les permite facilitar la búsqueda de alimentos fuera de la célula parental y colonia.

Hifas, son células largas y altamente polarizadas, con lados paralelos, donde no existen constricciones obvias entre las células. ⁽¹²⁾

Existen diferencias importantes entre las levaduras, las pseudohifas y las hifas verdaderas que incluyen el grado de crecimiento polarizado, el posicionamiento del anillo de septina y del tabique verdadero relativo a la célula madre. ⁽¹²⁾

Pruebas fisiológicas: ⁽¹³⁾

Se detallan en la Tabla 2.1:

Tabla 2.1: Pruebas fisiológicas

Prueba	Resultado
Tubo germinativo	+
Hidrólisis de urea	-
Crecimiento en medio de cicloheximida	+
Crecimiento a 37 °C	+

+ Reacción positiva, - reacción negativa

Reacciones de fermentación:

La fermentación se observa con la producción de gas y es independiente de los cambios de pH.

Tabla 2.2: Reacciones de Fermentación⁽¹³⁾

Carbohidrato	Resultado
Glucosa	+
Lactosa	-
Maltosa	+
Sacarosa	v
Galactosa	v
Trehalosa	v
Rafinosa	-

+ Reacción positiva, - reacción negativa, v reacción variable

Pruebas de asimilación:

Tabla 2.3: Pruebas de Asimilación ⁽¹³⁾

Glucosa	+	D-ribosa	v
Galactosa	+	L-ramnosa	-
Sacarosa	v	Etanol	+
Maltosa	+	Glicerol	v
Celobiosa	-	Eritritol	-
Trealosa	v	Ribitol	v
Lactosa	-	D-manitol	+
Melibiosa	-	L-arabinosa	v
Rafinosa	-	D-arabinosa	v
Melecitosa	v	D-Manitol	+
Metanol	-	D-Glucitol	v
D-xilosa	+	Inulina	-
Metil- α -D-glucosa	v	Almidón soluble	+
Salicina	-	L-Sorbosa	v

+ Reacción positiva, - reacción negativa, v reacción variable

2.1.4. Características del Cultivo

En la mayor parte de los medios las especies del género *Candida* no pueden diferenciarse sobre la base del aspecto de sus colonias. Son colonias de crecimiento rápido, circulares, lisas, blancas o cremosas, pastosas y blandas, de bordes precisos, centro ligeramente prominente, con olor a levadura. ⁽⁹⁾⁽¹⁴⁾

Las especies de *Candida* crecen bien en medios de cultivo con agar, peptona, dextrosa, maltosa o sacarosa. Las colonias muy pequeñas aparecen en un lapso de 24 a 36 horas en Agar Sabouraud y miden de 1,5 a 2 mm. de diámetro después de 5 a 7 días. Para aislarlas de las muestras clínicas que siempre llevan bacterias se agregan antimicrobianos como el Cloranfenicol al medio simple. ⁽⁸⁾

En Agar Sabouraud o en otros medios de cultivo similares, las colonias que crecen son lisas, suaves, húmedas y de color y aspecto cremoso como se puede apreciar en la **Figura 2.2**. Estas colonias tienen un tamaño que oscila entre 1,5 y 2 mm. de diámetro, con aspecto de levadura, de consistencia blanda y rápidamente proyectan filamentos hasta la profundidad del agar. Después de 4-5 días se percibe un olor característico de levadura.

Otro medio de cultivo en el cual puede crecer *C. albicans* son: CHROMagar® Candida (CHROMagar), como se puede observar en la **Figura 2.3** las colonias de esta especie de color verde y de aspecto húmedo, *Candida glabrata* se observan colonias de color rosado oscuro y aspecto húmedo, *Candida krusei* se observan colonias de color rosado claro y aspecto seco, y *Candida tropicalis* con colonias de color azul y aspecto húmedo. ⁽¹⁵⁾

Las colonias de *Candida* crecen "in vitro" en condiciones de aerobiosis en medios de cultivo a pH con rango entre 2,5 y 7,5 y temperatura que oscila entre 20°C y 38°C. El crecimiento de colonias se puede detectar entre 48 y 72 horas después de la siembra, y los subcultivos pueden crecer más rápidamente. ⁽⁸⁾

La habilidad de las levaduras de crecer a 37°C es una característica importante a ser considerada en su identificación a partir de muestras clínicas. Las levaduras más virulentas crecen rápidamente a temperaturas que oscilan entre 25°C y 37°C, mientras que las poco virulentas dejan de crecer a 37°C. ⁽⁸⁾



Figura 2.2: Cultivo positivo a levaduras en Agar Sabouraud. ⁽¹⁶⁾

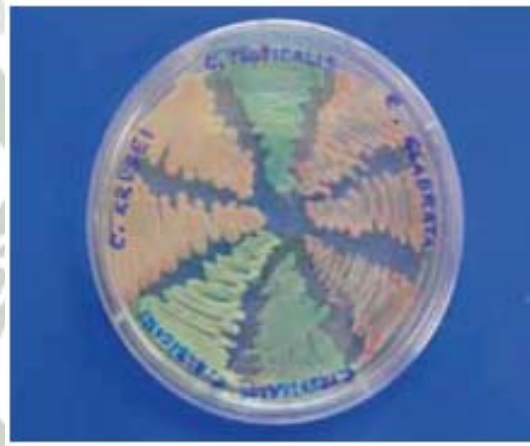


Figura 2.3: Determinación de especies de *Candida* en medio Chromagar. ⁽¹⁶⁾

2.1.5. Candidiasis

2.1.5.1. Sinonimia

Candidosis, moniliasis, *muguet*, algodoncillo.

2.1.5.2. Definición

Micosis primaria o secundaria ocasionada por levaduras endógenas y oportunistas del género *Cándida*, especialmente *C. albicans*. Las manifestaciones clínicas son localizadas, diseminadas o sistémicas; pueden afectar piel, mucosa, estructuras profundas y órganos internos. Las alteraciones histopatológicas varían desde inflamación mínima hasta supuración o granuloma. La evolución es aguda, subaguda o crónica.

2.1.5.3. Etiopatogénia

La candidiasis depende de las alteraciones primarias del huésped, así como de las propiedades patógenas del hongo, por lo cual las infecciones por *C. albicans* son poco frecuentes en individuos sanos. La candidiasis puede dividirse en superficial y profunda, y representan un problema clínico importante. ⁽⁶⁾

a) Factores de predisposición:

La candidiasis se favorece por modificaciones de “terrenos” en el huésped, como:

- Terapéutica con antibióticos, corticoides, citotóxicos u hormonas sexuales (anticonceptivos).
 - Desequilibrios hormonales como embarazo, diabetes o insuficiencia tiroidea.
 - Enfermedades debilitantes como neoplasias, infecciones, inanición, SIDA.
 - Factores locales múltiples como prótesis dentarias mal ajustadas que ocasionan pérdida del espacio interdental; humedad, heridas y quemaduras.
 - Factores fisiológicos como embarazo, edad avanzada, lactancia.
 - Intervenciones quirúrgicas y otras medidas: cirugía, cateterismo, traqueotomía.
 - Otros factores tales como el contacto con alimentos de alto contenido de azúcares (pasteleros, empaques de frutas); hábitos de chuparse los dedos, manicura y pedicura defectuosas; uso de prendas de vestir de material sintético (botas de plástico, pañales desechables); malos hábitos higiénicos.
- (17)

b) Factores de Virulencia

Los factores de virulencia expresados por las especies de *Candida* varían dependiendo del tipo, etapa y sitio de infección, y de la naturaleza de la respuesta inmune del hospedero. Los principales factores de virulencia son la formación de biofilme, producción de proteínasa ácida, fosfolipasa, etc. Una vez que se hace el

contacto las enzimas facilitan la adherencia, dañando o degradando la membrana celular y proteínas extracelulares, permitiendo que la levadura ingrese al hospedero. ⁽¹⁸⁾

Además en *C. albicans* la virulencia está asociada a la transición levadura – hifa. Las especies de *Candida* se encuentran tanto como levaduras e hifas en el ambiente del hospedero. En el estado comensal, la forma levaduriforme permite un rápido transporte a través de la superficie de mucosas por medio de los fluidos corporales (e.g. saliva, secreciones vaginales, agua), en contraste con la filariforme que permiten una fijación rápida, la formación de biofilmes, y la obtención de nutrientes. Durante la infección sistémica se cree que la forma levaduriforme es importante para la difusión rápida hacia los órganos diana a través del torrente sanguíneo, y la forma filariforme a mostrado un rol importante en la lisis de macrófagos y neutrófilos, formación de biofilmes, tigmotropismo y evasión inmune por medio de variación antigénica, es así que la expresión de los genes de virulencia aumenta cuando se encuentra en estado filariforme como podemos apreciar en la **Figura 2.4.** ⁽¹⁹⁾

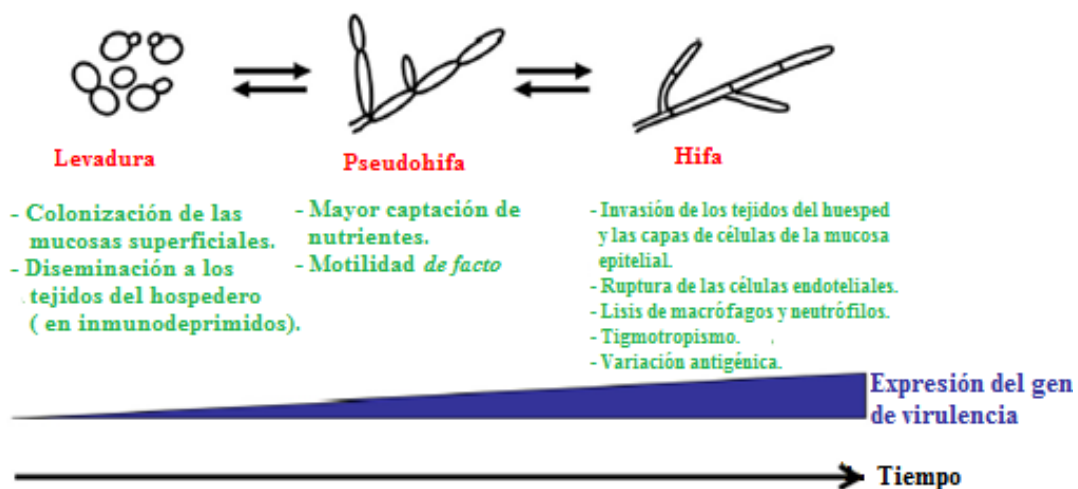


Figura 2.4: Modelo para la evolución de la morfología y virulencia en especies de *Candida*. ⁽¹⁹⁾

2.1.5.4. Cuadro clínico

La candida causa un amplio espectro de enfermedades. Desde infecciones mucocutáneas superficiales, hasta enfermedades invasivas que envuelven órganos internos así como infecciones sanguíneas. Los avances en la tecnología médica han creado nuevas oportunidades para que la Candida tenga acceso a la circulación sanguínea y a tejidos profundos. Las especies de Candida han emergido como una causa importante de las infecciones nosocomiales: 8-10% de todas las infecciones del torrente sanguíneo nosocomiales son causadas por especies de Candida.

Las infecciones por Candida se dividen en dos categorías: Infecciones localizadas de la membrana mucosa o piel e infecciones sistémicas. ⁽²⁰⁾

a) **Candidiasis de la membrana mucosa:**

Los sitios más comunes de las infecciones por candida de la membrana mucosa son la cavidad oral y el canal vaginal. *C.albicans* coloniza la mucosa oral entre el 5-50% de los individuos sanos. La infección oral fue notada y descrita por Hipócrates. ⁽²⁰⁾

Entre los factores predisponentes está la alta concentración de carbohidratos en la cavidad oral, cambios en la flora microbiana luego de terapia antibiótica prolongada, pH alcalino en las secreciones salivares del recién nacido, e inmunosupresión. De un modo general la candidiasis oral puede ser definida como “ la enfermedad del paciente enfermo”, ya que siempre va a precisar de uno o varios factores facilitadores para poder provocar patología en la boca. La candidiasis oral es ahora reconocida como una condición que define el SIDA: Casi el 100% de los pacientes con SIDA tiene esta enfermedad. ⁽²¹⁾

El muguet se manifiesta por placas blancas en la lengua y en la mucosa oral (Figura N° 2.5), estas placas son asintomáticas o se acompañan de sensación de quemadura, sequedad de boca y sabor metálico. A pesar de que *C. albicans* es la causante primaria del muguet, una especie cercana, *C. dubliniensis*, ha sido implicada en esta condición. ⁽¹⁹⁾



Figura N° 2.5: Candidiasis oral

Ocasionalmente la candidiasis oral se puede extender a otras áreas del tracto gastrointestinal. Pueden ocurrir infecciones al esófago. La unión gastroesofágica en particular es un sitio común para las infecciones por *Candida*, probablemente dado el pH ácido de ese sitio. ⁽²⁰⁾

El tracto respiratorio es frecuentemente colonizado por especies de *Candida*, especialmente en pacientes hospitalizados. Existen casos raros de infecciones a la tráquea, laringe y bronquios. ⁽²⁰⁾

b) Vulvovaginitis candidiásica

Candida es la causa común de vulvovaginitis. Se estima que el 75% de las mujeres experimentan un caso de vaginitis candidiásica en su vida, siendo la segunda causa más frecuente del síndrome de flujo vaginal. *C. albicans* es el agente causante del 85-90% de los casos, el restante es causado por otras especies de *Candida*, siendo las más comunes *C. glabrata* y *C. tropicalis*. ⁽²²⁾ ⁽²⁰⁾

La candidiasis vaginal es una enfermedad inflamatoria de la vagina, secundaria generalmente a condiciones fisiológicas alteradas que determinan disminución en la inmunidad local y se caracteriza por la presencia de leucorrea blanquecina,

espesa y grumosa; prurito intenso, sobretodo premenstrual y extensión de las lesiones a la vulva y al periné. La mucosa vaginal muestra placas blanquecinas, amarillentas o pseudomembranosas.

Está favorecida por el uso abusivo de jabones ácidos, por una higiene deficiente o la utilización de ropa interior sintética.

Estudios de prevalencia muestran que el 20-25% de mujeres sanas y asintomáticas tienen resultados positivos a cultivos de *C. albicans*. Los factores envueltos en la transformación de la colonización asintomática a vaginitis sintomática no están completamente resueltos. ⁽²⁰⁾

c) Candidiasis cutánea

Las infecciones de la piel ocurren comúnmente en áreas de la piel cálidas, húmedas y con pliegues como las axilas y la ingle, así como entre los dedos de las manos y pies. La dermatitis de pañal en bebés es también una infección por *Candida* común Figura N°2.6. Los folículos del pelo, las comisuras de la boca Figura 2.7 y las uñas Figura N° 2.8 pueden infectarse con *Candida*. ⁽²⁰⁾



Figura N° 2.6: Dermatitis de pañal



Figura N° 2.7: Queilitis angular



Figura N° 2.8: Onicomycosis

d) Candidiasis mucocutánea crónica

Este grupo de infecciones por *Candida* de la piel, cabello, uñas y membranas mucosas tiene un curso prolongado. Estas condiciones están generalmente asociadas a trastornos endocrinos o inmunológicos: Enfermedad de Addison, diabetes mellitus, hipotiroidismo, enfermedades autoinmunes, y otras condiciones similares. ⁽²⁰⁾

e) Candidiasis sistémica

La *Candida* se extiende desde el sitio original de infección y entra en el torrente sanguíneo. Los factores de riesgo para una candidemia (infección del torrente sanguíneo) incluyen tratamiento con antibióticos de amplio espectro, nutrición parenteral, quimioterapia, agentes inmunosupresores seguidos de un trasplante de órganos, y el uso de dispositivos médicos permanentes. En pacientes

hospitalizados las especies de *Candida* son la cuarta causa de infecciones del torrente sanguíneo. Las tasas de mortalidad de pacientes con candidemia son altas, aun cuando el paciente es tratado con drogas antifúngicas. ⁽²⁰⁾

f) Dispositivos médicos y candidemia

Dispositivos como catéteres vasculares, tubos endotraqueales, prótesis, catéteres urinarios, catéteres de hemodiálisis, válvulas prostéticas, marcapasos y dispositivos de asistencia ventricular representan un mayor riesgo para la candidemia. Las células microbianas crecen en la superficie de los dispositivos implantados formando biofilmes. Los organismos en biofilmes son relativamente refractarios a las drogas antifúngicas. Por lo tanto, las infecciones asociadas a los biofilmes pueden repetirse y la eliminación del dispositivo médico puede ser necesaria. Los catéteres venosos centrales son el factor de riesgo más común en pacientes hospitalizados con candidemia. ⁽²⁰⁾

g) Infecciones diseminadas de *candida*

Una vez que el microorganismo entra en el torrente sanguíneo inician la infección en cualquier órgano interno. Se han reportado infecciones por *Candida* en los ojos, riñones, válvulas cardíacas, meninges, sistema musculo-esquelético, hígado, y médula. Muchas de estas infecciones a los órganos se deben a candidemia, aunque algunas son causadas también por implantes médicos o por infección directa durante cirugías. ⁽²⁰⁾

2.1.5.5. Diagnóstico

El diagnóstico se puede llevar a cabo en el laboratorio por medio de diferentes procedimientos:

a) Examen directo de muestras clínicas:

Se utiliza solución de hidróxido de potasio al 10-30 % para distinguir hongos en secreciones mucosas, piel, pelo o uñas. Permite la observación del tamaño y forma de los microorganismos, morfología y gemaciones, la presencia de pseudohifas o artroconidias.

b) Aislamiento de *Candida* a partir de muestras clínicas:

Candida crece bien en medios micológicos de rutina. Para esto se puede utilizar Agar Sabouraud dextrosa o agar cromogénico. La temperatura de incubación es importante, ya que las levaduras patogénicas crecen a 37 °C, mientras que los organismos saprofitos prefieren una temperatura menos de crecimiento. Se evidencia crecimiento a las 24 horas, mientras que las colonias típicas se visualizan a las 48 horas.

c) Agar cromogénico

Se puede hacer una identificación presuntiva de más de 10 especies de *Candida* con el agar cromogénico. El CHROMagar *Candida* es un medio el cual se basa en la liberación diferencial de productos de degradación de diversos sustratos cromogénicos como resultado de la actividad enzimática. CHROMagar es útil en la identificación presuntiva de *C. albicans*, *C. krusei*, y *C. tropicalis*.

d) Formación de tubo germinativo

Es uno de los test más rápidos y simples para la identificación presuntiva de *C. albicans*. Otras especies, como *C. dublinsiensis*, y *C. tropicalis*, también forman tubo germinativo, pero la morfología del tubo germinativo formado por *C. tropicalis* difiere del formado por *C. albicans*.

e) Asimilación de azúcares

La identificación de las levaduras hasta el nivel de especies se basa en la asimilación de carbohidratos. Este test mide la capacidad de las levaduras de utilizar específicos carbohidratos como fuente única de carbono. ⁽²⁰⁾

f) Fermentación de azúcares

La identificación de las levaduras se realiza por la degradación anaeróbica de determinados sustratos, lo cual conlleva a la formación de gas. ⁽²³⁾

2.1.5.6. Tratamiento

El tratamiento de las infecciones por *Candida* depende de un número de factores:

- La anatomía del sitio de la infección.
- Las enfermedades subyacentes del paciente y su estado inmunológico.
- Los factores de riesgo del paciente.
- Las especies de *Candida* específicas, responsables de la infección.
- La susceptibilidad de la cepa infectante a los fármacos antifúngicos.

La candidiasis oral se puede tratar con antifúngicos tópicos como nistatina, clotrimazol y anfotericina B, o fluconazol o itraconazol oral. La infección por *Candida* del esófago requiere terapia sistémica generalmente con itraconazol o fluconazol. ⁽²⁰⁾

Las infecciones genitales por *Candida* pueden ser tratadas por agentes antifúngicos tópicos o por una dosis de itraconazol oral. Las tasas de curación suelen ir de 80 a 95%, con las diferentes alternativas terapéuticas. ⁽²⁰⁾

Las candidiasis cutáneas localizadas pueden ser tratadas por medicación antifúngica tópica, como clotrimazol, miconazol, ketoconazol, y nistatina. ⁽²⁰⁾

Las infecciones por *Candida* del tejido suave, alrededor de las uñas, puede ser tratado por fluconazol o itraconazol oral. Si se presenta un absceso en el tejido, este debe ser drenado antes de la terapia con drogas. ⁽²⁰⁾

Las infecciones de uñas son tratadas con itraconazol oral. El tratamiento se debe seguir por algunos meses. ⁽²⁰⁾

En las infecciones por *Candida* que incluyen catéteres urinarios, los catéteres deben ser removidos o reemplazados. En pacientes no-cateterizados con infección urinaria, el fluconazol es usado generalmente. ⁽²⁰⁾

Las infecciones de órganos internos requieren terapia antifúngica sistémica. Se usa generalmente fluconazol y anfotericina B. ⁽²⁰⁾

Para la candidemia, el fluconazol es la droga de elección. Opciones alternativas incluyen la caspofungina, voriconazol y anfotericina B. ⁽²⁰⁾

El tratamiento de las candidiasis invasivas con anticuerpos monoclonales fungicidas está aun bajo investigación. ⁽²⁰⁾

2.1.5.7. Prevención

Existen estrategias para la prevención de la candidiasis nosocomial. ⁽²⁰⁾

- La primera estrategia es el correcto lavado de manos del personal hospitalario. El uso de alcohol y clorhexidina reduce el riesgo de adquirir una infección por *Candida* del personal hospitalario.
- La segunda estrategia es mejorar el cuidado de los catéteres venosos centrales.
- La tercera estrategia consiste en hacer hincapié en la importancia de la exposición a antibióticos como factor de riesgo para la candidemia. Además la profilaxis antifúngica puede ser considerada en pacientes con bajo recuento de neutrófilos en sangre, la administración de fluconazol ha demostrado ser eficaz en la disminución de las infecciones por *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*.

2.2. ANTIFÚNGICOS

Durante casi 30 años la anfotericina, a pesar de causar problemas de nefrotoxicidad significativa, fue el único fármaco disponible para el tratamiento de infecciones fúngicas severas. La aprobación de los imidazoles y triazoles a

finales de 1980 y principios de 1990 fueron avances importantes en el tratamiento seguro y eficaz de infecciones fúngicas locales y sistémicas. ⁽⁵⁾

Hay tres familias principales de fármacos antifúngicos utilizados en la actualidad: Los polienos (anfotericina B, nistatina), los azoles (fluconazol, ketoconazol e itraconazol), y las alilaminas (terbinafina), también existe un grupo de compuestos misceláneos como la flucitocina y la griseofluvina que no pertenecen a un grupo de drogas en especial. A pesar de que drogas sintéticas como los azoles y las alilaminas contribuyen la mayor proporción de antifúngicos, los antifúngicos naturales obtenidos de diversas fuentes como plantas, bacterias y animales, juegan también un rol importante, es así que el campo de desarrollo de nuevos antifúngicos se encuentra en constante desarrollo. Su mecanismo de acción es variado como podemos ver en la **Figura N°2.9**. ⁽²⁴⁾

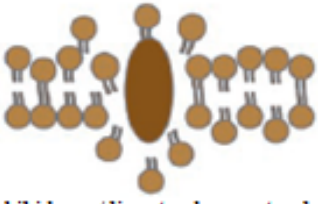
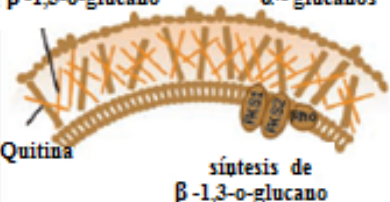
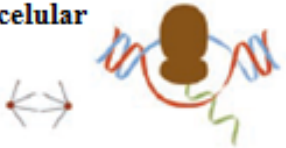
Mecanismo de acción	Tipo de droga	Drogas
Membrana celular  Inhibidores / ligantes de ergosterol	Azoles (Inhibidores de 14- α -demetilasa)	Imidazoles Ketoconazol Miconazol Triazoles Fluconazol, itraconazol, voriconazol.
	Polienos (Ligantes de ergosterol)	Anfotericina B
	Alilaminas (inhibe la escualeno - epoxidasa)	Terbinafina
Pared celular  β -1,3-o-glucano Manoproteínas y α -glucanos Quitina síntesis de β -1,3-o-glucano	Equinocandinas (inhibidor de la síntesis de β-1,3-o-glucano)	Anidulafungina, caspofungina.
Intracelular 	Análogos de la pirimidina/ inhibidores de la timidilato sintetasa)	Flucitosina
	Inhibidor mitótico	Griseofulvina

Figura N°2.9: Sitios y mecanismos de acción de agentes antifúngicos sistémicos. ⁽²⁵⁾

2.2.1. Evolución histórica

La síntesis de estos fármacos comenzó en el siglo XX, desarrollándose antifúngicos de uso tópico y sistémico (griseofulvina, imidazoles, inhibidores de la síntesis de pirimidinas y polienos).

En la década de los '90 se incorporaron los triazoles, siendo el itraconazol el primer antifúngico oral con actividad sobre un espectro amplio de hongos. También se desarrollaron nuevas formulaciones de poliénicos, las alilaminas (naftifina y terbinafina). En pleno siglo XXI las investigaciones continúan y periódicamente aparecen nuevos agentes como el voriconazol, la caspofungina, entre otros.⁽²⁶⁾

En la Figura N°2.10 se puede apreciar, en una línea del tiempo, la evolución histórica de los antifúngicos hasta el día de hoy.

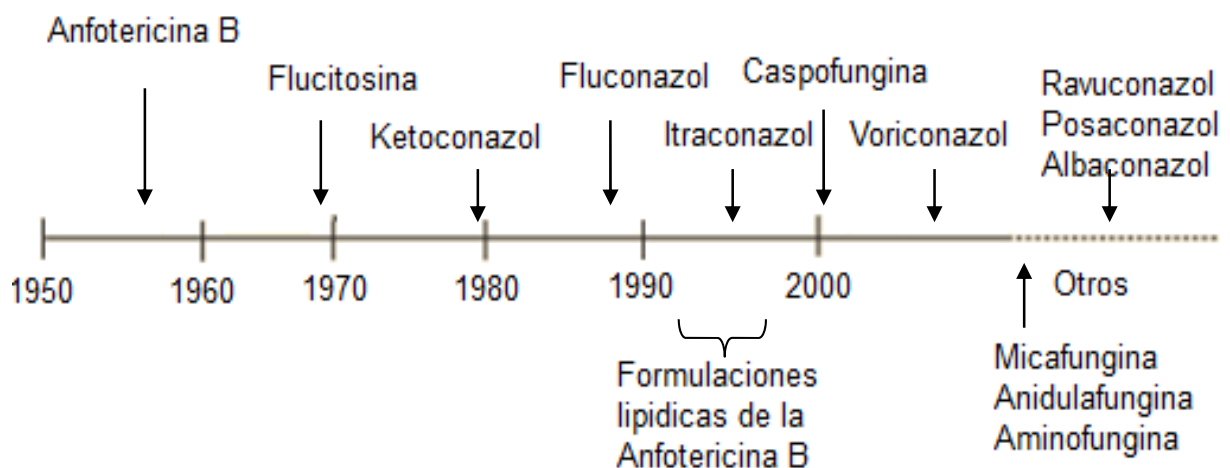


Figura N° 2.10: Evolución histórica de los antifúngicos⁽²⁶⁾

2.2.2. Clasificación

Los antifúngicos pueden clasificarse según criterios convencionales que atienden a su estructura: polienos, azoles, alilaminas, lipopéptidos, pirimidinas entre otros, como se puede apreciar en la Tabla N° 2.4; o de acuerdo con su mecanismo de acción, como en la Tabla N° 2.5.

Tabla N° 2.4: Clasificación de los antifúngicos por su estructura ⁽²⁶⁾

Tipo de droga	Droga
Polienos	Nistatina, anfotericina B
Azoles	Imidazoles: miconazol, clotrimazol, ketoconazol
	Triazoles: fluconazol, itraconazol
	Triazoles de segunda generacion: voriconazol, posaconazol.
Alilaminas	Terbinafina, naftifina
Lipopéptidos	Papulacandinas
	Triterpenos glicosilados
	Equinocandinas: caspofungina, anidofungina, micafungina.
Pirimidinas	Flucitosina
Otros	Griseofulvina

Tabla N° 2.5: Clasificación de los antifúngicos según su mecanismo de acción ⁽²⁶⁾

Mecanismo de acción	Tipo de droga
Antifúngicos que actúan sobre la membrana citoplasmática	Polienos
	Azoles
	Alilaminas
Antifúngicos que actúan sobre la pared	Lipopéptidos
Antifúngicos que actúan sobre el núcleo	Pirimidinas
	Misceláneos

a. Antifúngicos Poliénicos

Son macrólidos poliénicos que se obtienen a partir del hongo *Streptomyces*.

Los más empleados e importantes son la Nistatina y la Anfotericina B.

Actúan al unirse al ergosterol de las membranas celulares de los hongos, lo cual altera la permeabilidad de las mismas y produce poros que permiten la salida de iones intracelulares y ocasionan muerte por lisis celular. ⁽²⁷⁾

La anfotericina B, Figura N°2.11, es el agente más conocido de esta familia, producido por la bacteria *Streptomyces nodosus*. La nefrotoxicidad es el principal inconveniente de la anfotericina B. Para reducirla se han desarrollado nuevas formas farmacéuticas con la misma eficacia y menos efectos tóxicos. ⁽²⁶⁾

- Anfotericina B liposomal: Es una formulación liofilizada de anfotericina B incorporada dentro de un pequeño liposoma unilaminar.
- Anfotericina B complejo lipídico: Es una suspensión de anfotericina B que forma complejos con 2 fosfolípidos en una proporción molar fármaco: lípido 1:1.
- Anfotericina B de dispersión coloidal: Es una dispersión coloidal de un complejo estable de anfotericina B y colesteryl sulfato sódico que forman micropartículas uniformes discoides. ⁽²⁸⁾

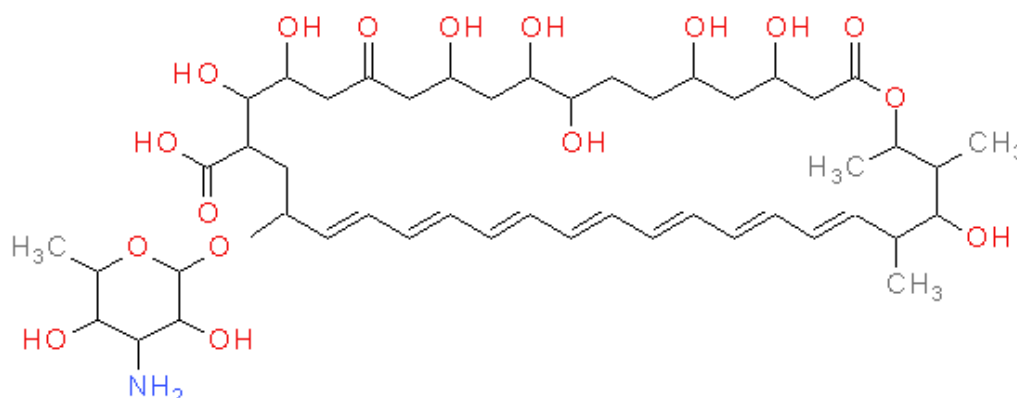


Figura N° 2.11: Estructura química de la anfotericina B

Otro miembro de esta familia es la nistatina, Figura N°2.12, el primer antifúngico tópico en utilizarse en la práctica clínica. ⁽²⁶⁾

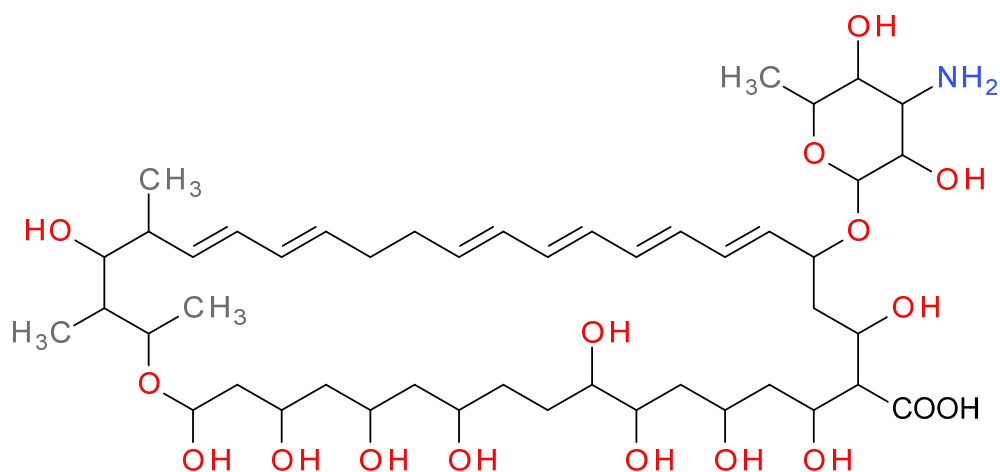


Figura N° 2.12: Estructura química de la nistatina

b. Azoles

Los azoles tienen un anillo con átomos de N libres unidos mediante enlace C-N a otros anillos aromáticos. La naturaleza de estos anillos modifica las propiedades fisicoquímicas, efecto terapéutico, toxicidad, etc.

Son antimicóticos de amplio espectro, actúan contra mohos y levaduras, tienen actividad antibacteriana y contra protozoarios. Los imidazoles constituyeron un gran avance en el tratamiento de las micosis. Una sustitución N de los imidazólicos creó la familia de los triazoles, que tienen el mismo mecanismo de acción, similar o más amplio espectro, pero con menos efecto sobre la síntesis de esteroides en humanos.

Actúan inhibiendo a la enzima 14 α - demetilasa, esta enzima es clave en la conversión de lanosterol a ergosterol. Sin el ergosterol, las membranas celulares de los hongos se vuelven inestables. Este cambio en las propiedades de la membrana reduce la viabilidad de la célula. ^{(26) (29)}

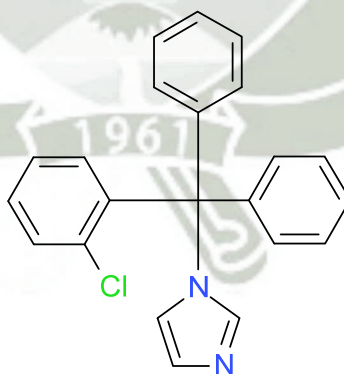
Su mecanismo de acción es selectivo para hongos ya que estos requieren síntesis endógena de esteroides.

Los azoles se clasifican en:

- Imidazoles:
 - Ketoconazol
 - Clotrimazol
- Triazoles
 - Fluconazol
 - Itraconazol
- Triazoles de segunda generación (Protocolos en fase de investigación II/III)
 - Voriconazol (derivado de fluconazol)
 - Posaconazol (derivado del itraconazol)⁽²⁹⁾

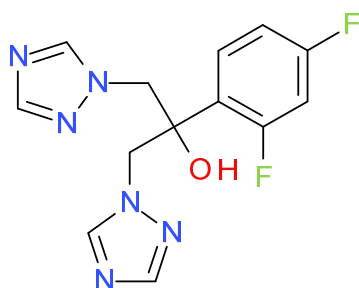
También inhiben enzimas mitocondriales como citocromo oxidasa, peroxidasa y catalasa; lo que da lugar a la acumulación de peróxidos y lisis celular. Se ha documentado resistencia, particularmente en *Cándida*.

Azoles disponibles en el mercado: Clotrimazol (Fig. N°2.13), Fluconazol (Fig. N°2.14), Itraconazol (Fig. N° 2.15) y Voriconazol (Fig. N° 2.16).



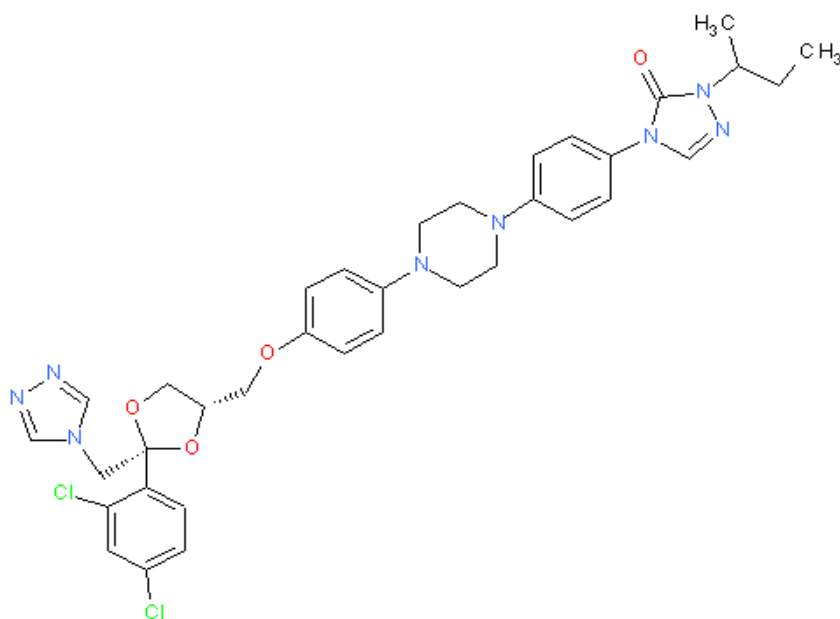
Nombre IUPAC: 1-[(2-clorofenil)-difenilmetil]imidazol

Figura N° 2.17: Estructura química del clotrimazol



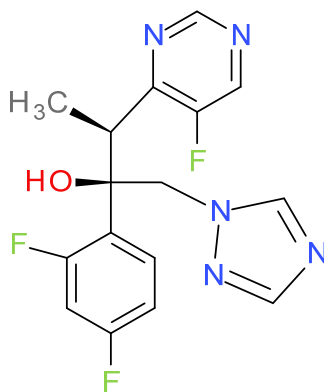
Nombre IUPAC: 2-(2,4-difluorofenil)-1,3-bis(1,2,4-triazol-1-il)propan-2-ol

Figura N° 2.14: Estructura química del fluconazol



Nombre IUPAC: 2-butan-il-4-[4-[4-[4-[[[2R,4S)-2-(2,4-diclorofenil)-2-(1,2,4-triazol-1-ilmetil)-1,3-dioxolan-4-il]metoxi]fenil]piperazin-1-il]fenil]-1,2,4-triazol-3-ona

Figura N° 2.18: Estructura química del itraconazol



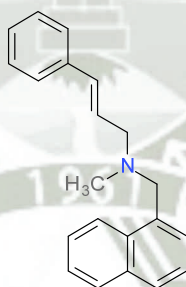
Nombre IUPAC: (2R, 3S)-2-(2,4-difluorofenil)-3-(5-fluoropirimidin-4-il)-1-(1,2,4-triazol-1-il)butan-2-ol

Figura N° 2.19: Estructura química del voriconazol

c. Alilaminas

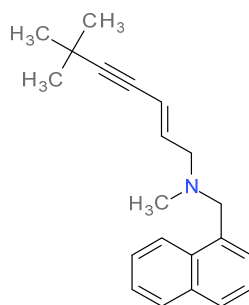
Son antimicóticos sintéticos, descubiertos accidentalmente en la década de los '70, fungicidas y actúan por interferencia con la epoxidación del escualeno. Bloquean la síntesis del lanosterol y por ende del ergosterol y colesterol. ⁽²⁷⁾

Entre ellos tenemos: la Naftifina (Fig. N° 2.19) y la Terbinafina (Fig. N°2.20).



Nombre IUPAC: (E)-N-metil-N-(naftalen-1-ilmetil)-3-fenilprop-2-em-1-amina.

Figura N° 2.19: Estructura química de la naftifina



Nombre IUPAC: (E)-N,6,6-trimetil-N-(naftalen-1-ilmetil)hept-2-en-4-in-1-amina.

Figura N° 2.20: Estructura química de la terbinafina

d. Lipopéptidos

Comprenden 3 familias de compuestos inhibidores de la síntesis de glucanos: papulacandinas, equinocandinas y triterpenos glicosilados. Todas estas sustancias son derivados de la fermentación producida por hongos, cuyo efecto es fungicida. Estos agentes no afectan a las células de mamíferos ya que estos carecen de las proteínas alvo de estos compuestos. ⁽²⁶⁾

Las equinocandinas fueron descubiertas en 1974, corresponden a hexapeptidos cíclicos, N-acilados con cadena de ácidos grasos de longitud variable. ⁽³⁰⁾

Las características principales de las equinocandinas como antifúngicos son:

- Espectro mejorado contra *Candida* spp. incluyendo candidas no albicans
- Actividad fungicida frente a *Candida* spp
- Perfil de seguridad mejorado en comparación con los azoles y polienos.
- La reducción de las interacciones fármaco-fármaco mediadas por el citocromo, en comparación con azoles. ⁽³¹⁾

La primer equinocandina, caspofungina, fue autorizada para su uso en el 2001, así se marcó el inicio de una nueva clase de antifúngicos. ⁽³²⁾

Han prosperado en las investigaciones y se destacan como novedades importantes la aparición de la caspofungina, anidulafungina y micafungina. ⁽²⁷⁾

Las papulacandinas son glicolípidos descubiertos en 1970, son producidas por hongos. A pesar de los esfuerzos ninguna de las papulacandinas o sus similares se han convertido en drogas, básicamente por su limitada potencia en modelos experimentales con animales.

Los inhibidores de la síntesis de glucano más recientes son los triterpenos, que contienen una parte polar (ácida). Esta parte polar puede ser un glicósido (en enfumafungina), un succinato (arundifungina). A pesar que estos compuestos son inactivos o de poca actividad en modelos in vivo en ratones, representan un nuevo paradigma en la búsqueda de compuestos antifúngicos, y con este mecanismo de acción podrían ser útiles en el desenvolvimiento de nuevas drogas. ⁽²⁹⁾

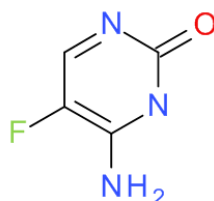
En la Tabla N° 2.5 se encuentran diferentes productos naturales que inhiben la síntesis del glucano. ⁽²⁹⁾

Tabla N° 2.5: Productos naturales inhibidores de la síntesis del glucano ⁽³¹⁾

Compuesto	Especies productoras	Referencia
Lipopéptidos		
Equinocandina B	<i>Aspergillus nidulans</i>	Nyfelner & kelles 1974
	<i>A. rugulosus</i>	
Pneumocandinas	<i>Glarea lozoyensis</i>	Schwartz et al 1992
	<i>Cryptosporiopsis sp.</i>	Noble et al 1991
Criptocandinas	<i>Cryptosporiopsis quercina</i>	Strobel et al 1999
Glicolípidos		
Papulacandinas	<i>Papularia sphaerosperma</i>	Traxler et al 1977
Fusacandinas	<i>Fusarium sambucinum</i>	Yeung et al 1996
Ácidos terpenoides		
Ergoconina A	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Vicente et al 2001
	<i>T. viride</i>	

e. Pirimidinas

La flucitosina (Fig. N° 2.21), se desarrolló en la década de los '50, como un potencial agente antineoplástico, fue ineficiente como antitumoral, pero se demostró su actividad antifúngica. Es químicamente una pirimidina, inhibe el crecimiento y reproducción de los hongos. Este fármaco se convierte en 5-fluorouracilo, el cual es fosforilado e incorporado al ARN, convirtiéndose en un desoxinucleótido. Este compuesto inhibe a la timidato sintetasa e impide la síntesis de proteínas de la célula. ^{(26) (27)}

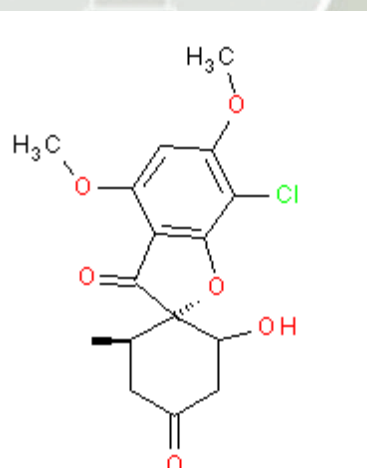


Nombre IUPAC: 6-amino-5-fluoro-1H-pirimidin-2-ona

Figura N° 2.21: Estructura química de la flucitosina

f. Otros

Aquí se encuentra catalogada la griseofulvina (Fig. N° 2.22), fué el primer agente antifúngico aislado de un *Penicillium* en 1939. Es un compuesto insoluble en agua, se deposita principalmente en las células precursoras de queratina, en las cuales inhibe la mitosis, al destruir el huso mitótico necesario para efectuar la división celular. ⁽²⁷⁾



Nombre IUPAC: (2S, 5'R)-7-cloro-3',4,6-trimetoxi-5'-metilspiro(1-benzofuran-2,4'-ciclohex-2-eno)-1',3-diona

Figura N° 2.22: Estructura química de la griseofulvina

2.3. MICROORGANISMOS ENDOFÍTICOS

Son aquellos que pueden ser detectados en un momento particular dentro de los tejidos de una planta hospedera, aparentemente sana. La colonización puede ser inter o intracelular, localizada o sistémica. ⁽³³⁾

La metodología más común para detectar y cuantificar estos organismos es el aislamiento de los mismos a partir de superficies desinfectadas de tejidos de las plantas hospederas.

El rango de hospedadores de las diferentes especies de endofíticos también es variable, habiendo especies con un único hospedador y especies muy generalistas. ⁽³⁴⁾

La proporción de estructuras novedosas producidas por endófitos (51%) es considerablemente mayor a la producida por aislados del suelo (38%), lo que demuestra que los endófitos son sin duda fuente de nuevos metabolitos secundarios. ⁽³⁵⁾

2.3.1. Hongos endofíticos

Estimaciones recientes de los número globales de especies de hongos consideran que existen 5.1 millones de especies de hongos, y es aceptable afirmar que solo se ha descubierto el 7% de todos los hongos, y aun queda un 93% por descubrir. ⁽³⁶⁾
^{(37) (38) (39)}

El número de hábitats donde se encuentran los hongos es enorme, algunos de los hábitats donde se les encuentra incluyen el rumen de los mamíferos herbívoros, algas, líquenes, musgos, plantas marinas, trozos de madera, piedras, y escamas de insectos. ^{(40) (41)}

Los hongos endofíticos son aquellos que colonizan los tejidos vivos de plantas sin causar efectos negativos inmediatos, manifiestos. Esta definición incluye prácticamente toda la gama de interacciones simbióticas en las cuales los hongos y las plantas participan: parasitismo, comensalismo y mutualismo. ⁽⁴²⁾

Investigaciones de hongos en diversos huéspedes durante los últimos años han demostrado que la colonización endofítica de plantas es ubicua, ya que se conoce de hongos endofíticos de plantas que crecen en climas templados, tropicales, boreales, bosques y mares, incluyendo en plantas de hábitats extremos como el ártico y ambientes xéricos. ⁽⁴³⁾ ⁽⁴⁴⁾ ⁽³³⁾

Debido a que las infecciones endofíticas son discretas, y la diversidad de especies de la microbiota interna es relativamente alta (tanto dentro como entre especies hospedadoras individuales), y solo una proporción relativamente pequeña de especies hospedadoras han sido examinados, los endófitos pueden representar un considerable número de hongos no descubiertos aún. ⁽⁴²⁾

Los hongos endofíticos son de gran importancia biotecnológica una vez que nuevos compuestos farmacéuticos, agentes de control biológico, agentes para biorremediación, enzimas y otros pueden ser obtenidos por medio de una mayor exploración de los mismos.

Una alta proporción de hongos endofíticos (80%) produce compuestos biológicamente activos en las pruebas antibacterianas, antifúngicas y herbicidas.

Entre los compuestos sintetizados por estos hongos se incluyen alcaloides, terpenoides, flavonoides, y esteroides; y estos pueden presentar actividad antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiinflamatoria, antitumoral, antidiabética, lo que abre nuevas perspectivas para el tratamiento de las diversas enfermedades ^(45,35)

2.3.1.1. Interacciones planta hospedera – hongo endofítico

Las interacciones planta-hongo son precedidas por un encuentro físico, seguido de la superación de varias barreras físicas y químicas para establecer con éxito una asociación. Los hongos descritos como endofíticos característicamente exhiben un periodo prolongado y discreto en el cual el crecimiento y la colonización puede cesar temporalmente, reanudándose luego de un cambio en el huésped físico o maduracional. Este crecimiento episódico es una característica definitoria de los

endofíticos para saber si se consideran saprobios comensales, patógenos latentes o mutualistas de protección. ⁽⁴⁶⁾ ⁽⁴²⁾

A pesar de que la naturaleza asintomática de la ocupación fúngica en el tejido vegetal induce a una clasificación de relacionamiento mutualista o simbiótico, la diversidad de hongo endofíticos sugiere que estos también puedan ser saprofitos o patógenos oportunistas.

La hipótesis del “antagonismo balanceado” se propuso inicialmente para abordar la forma en que el hongo endofítico evita la activación de las defensas del huésped, antes de ser incapacitado por los metabolitos tóxicos de este, creciendo dentro de la planta hospedera sin causar manifestaciones visibles de infección o enfermedad **Figura N° 2.23a**. Esta hipótesis propuso que la colonización asintomática es un antagonismo balanceado entre el hospedero y el endófito, los endófitos y los patógenos poseen muchos factores de virulencia que son tomados en cuenta por los mecanismos de defensa de la planta. Si la virulencia fúngica y las defensas de la planta se encuentran en balance, la asociación sigue siendo aparentemente asintomática y avirulenta. Esta fase es un estado transitorio donde los factores ambientales juegan un rol importante para desestabilizar el equilibrio entre los antagonismos. Si los mecanismos de defensa de las plantas contrarrestan los factores de virulencia del hongo, este perecerá. Por otro lado, si la planta perece ante la virulencia del hongo, la relación planta-patógeno llevara a la planta a la enfermedad **Figura N° 2.23b**.

Dado que muchos endófitos son patógenos latentes debe de existir cierta influencia intrínseca o de los factores ambientales que sirva para expresar los factores que llevan a la patogenicidad: ⁽⁴⁶⁾

Recientemente se reveló que la interacción planta endófito no puede ser solo el equilibrio entre la virulencia y la defensa, sino una interacción mucho más compleja y controlada de manera precisa. **Figura N° 2.23d**. ⁽⁴⁶⁾

Los hongos endofíticos comprenden un grupo diverso de especies cuyas funciones simbióticas y ecológicas son variadas, estos hongos tienen impacto sobre la

supervivencia y el estado de la planta. Se han descrito endofíticos que producen sustancias protectoras contra los insectos, herbívoros, y muchos hongos también producen metabolitos secundarios activos como antifúngicos, antibacterianos e insecticidas, a pesar de esto no se tiene la certeza de si estos metabolitos son producidos en las plantas durante el periodo de ocupación latente del tejido del huésped, o si se producen en la cantidad suficiente para beneficiar al huésped con un efecto mutualista de protección. ^{(34) (42)}

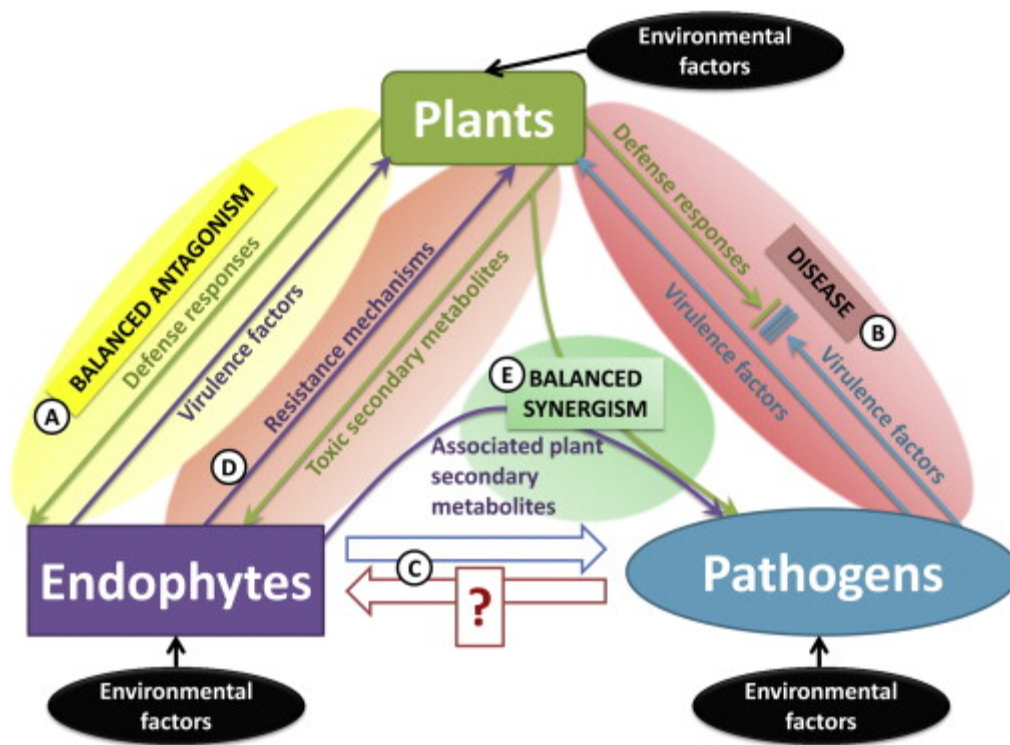


Figura N° 2.23: Esquema Ecológico - químico sobre la interpretación de las interacciones costo-beneficio de la planta con el hongo endofítico ³⁶.

- Hipótesis del antagonismo balanceado
- Enfermedad de la planta causada por un hongo fitopatógeno.
- Reciprocidad demostrada entre los hongos patógenos – endofíticos. La marca de interrogación (?) indica que este fenómeno no parece ser universal y que es necesaria mayor investigación para verificarlo.
- Estrategia de supervivencia del endófito.
- Sinergismo balanceado.

2.3.1.2. Metabolitos bioactivos producidos por hongos endofíticos

Con el descubrimiento de la penicilina, sintetizada por el hongo *Penicillium notatum* por Fleming y Chain, los científicos se comprometieron con el descubrimiento y aplicación de metabolitos microbianos con actividad contra patógenos vegetales y humanos. Es evidente que los compuestos basados en productos naturales tienen un gran impacto en la medicina moderna. ⁽⁴⁷⁾

Strobel (2002) reportó que los hongos endofíticos que residen en plantas podrían producir metabolitos similares o con mayor actividad que los de sus respectivos hospederos, es así que desde el descubrimiento del hongo endofítico *Taxomyces andreanae*, aislado de la planta *Taxus brevifolia* Nutt. que produce la droga anticancerígena taxol, los estudios de hongos endofíticos asociados a plantas medicinales aumentaron, bajo la hipótesis de que estos podrían ser una fuente importante para el screening de nuevos compuestos bioactivos que tengan un valor económico potencial, dirigiendo las investigaciones a plantas que son usadas por poblaciones indígenas para propósitos medicinales, plantas que crecen en ambientes extremos, o aquellas que son endémicas. ⁽⁴⁸⁾

Existen posibilidades interesantes para la explotación de los hongos endofíticos para la producción de una gran cantidad de metabolitos activos conocidos y biológicamente nuevos. Por ejemplo, usando condiciones controladas de fermentación (medio, pH, temperatura, agitación, etc), la producción de compuestos por los endófitos podría ser optimizada y esto conducir a una opción rentable, amigable con el medio ambiente, reproducible y continua que cumpla con los requerimientos comerciales. ⁽⁴⁶⁾

Se espera que el estudio de hongos endofíticos se convierta en un componente importante de la biología fúngica del siglo 21. ⁽⁴⁹⁾

Los hongos endofíticos aislados de plantas medicinales pueden ser fuentes ricas en metabolitos funcionales como se puede apreciar en la **Tabla N° 2.6** ^{(50) (51) (48) (52)} :

Los hongos endofíticos pueden producir algunos tipos de metabolitos originalmente característicos de sus hospederos, y este hecho puede estar relacionado a recombinaciones genéticas ocurridas entre el endofítico y la planta a lo largo de años de evolución. Los metabolitos secundarios difieren según la planta de la cual se aíslan los hongos endofíticos. Esto puede significar que la planta hospedera influencia en la habilidad sintetizadora de los hongos endofíticos que hospeda, por lo tanto la bioprospección de los productos de estos hongos se debe basar en la planta hospedera y no en el taxón del hongo endofítico. ⁽⁵³⁾

Según Strobel & Daisy (2003) muchas especies de endofíticos son frecuentemente aislados de una misma planta hospedera, pero solamente algunos de estos aislados tienen la capacidad de producir altos índices de moléculas con actividad biológica. Identificar microorganismos endofíticos productores de la misma sustancia bioactiva producida por plantas medicinales eliminaría las etapas de plantación, recolección y extracción de metabolitos de plantas raras, de crecimiento lento o en peligro de extinción, además de esto el precio del producto se reduciría, ya que podría ser producido por medio de procesos fermentativos. ⁽⁵⁴⁾

Mientras muchos endofíticos muestran un espectro relativamente amplio de actividad biológica, es importante enfatizar que este espectro amplio de actividad se podría deber a la secreción de múltiples compuestos por el endofíticos en vez de deberse a un solo compuesto inhibitorio. ⁽⁵⁵⁾

Entre las moléculas bioactivas producidas a partir de hongos endofíticos se destacan:

Criptocandina Polipéptido aislado de *Criptosporiopsis quercina* asociado a la planta medicinal *Tripterigeum wilfordii*, familia Celastraceae. Este metabolito demostró una excelente actividad antifúngica contra algunos patógenos humanos como *Candida albicans* y *Trichophyton spp.* ⁽⁵⁴⁾

9- Deacetoxifumigaclavina C: Alcaloide aislado del cultivo de *Aspergillus fumigatus*, el cual tiene actividad citotóxica comparable con la actividad de la doxorubicina, frente a células humanas de leucemia.⁽⁵⁶⁾

Taxol: Diterpeno utilizado en el control del cáncer, inicialmente fue encontrado en pequeñas cantidades en la corteza del árbol de la especie *Taxus brevifolia*, perteneciente a la familia Taxaceae. Posteriormente se descubrió que el hongo endofítico *Taxomyces andreanae* aislado del árbol citado produce el diterpeno paclitaxel.⁽⁵⁴⁾

Campotericina: Alcaloide quinolina pentacíclica, inicialmente fue aislada del árbol *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae), la campotericina y su análogo 10-hidroxicampotericina son dos de los agentes antineoplásicos más efectivos. Puri et al reportaron el 2005 que el hongo endofítico *Entrophospora infrequens* obtenido de *Nothapodytes foetida* tiene la capacidad de producir campotericina.⁽⁵⁷⁾

Sustancias L-783,283: Metabolito fúngico no péptido obtenido de los hongos *Pseudomassaria sp.* Isolados de una planta colectada en la floresta tropical africana, que posee la capacidad de mimetizar la acción de la insulina, y a diferencia de la insulina, esta no es destruida en el tracto digestivo, por lo que puede ser dada vía oral.⁽⁵⁸⁾

Pestacina y Isopestacina: Obtenidos de *P. microspora*, aislado de la planta *Terminalia morobensis*, familia Combretaceae, ambos exhiben actividad antimicrobiana y antioxidante.⁽⁵⁴⁾

Se estima que existen aproximadamente 1.5 millones de especies de hongos en el planeta, siendo que apenas cerca de 70 mil solamente fueron descritos, es así que las oportunidades de estudiar nuevas especies fúngicas, así como de encontrar especies que sinteticen moléculas bioactivas es grande.⁽³⁹⁾

2.4. MYRTACEAE

La familia Myrtaceae comprende árboles o arbustos perennifolios, cuyas hojas contienen sustancias polifenólicas y terpenoides aromáticos, perteneciente a la orden Myrtales.

Familia con aproximadamente 40 géneros y más de 3000 especies distribuidas principalmente en las zonas tropicales y subtropicales, esta familia se divide en dos subfamilias, Myrtoideae y Leptospermoideae, siendo la primera de hojas opuestas y frutos carnosos, generalmente baya o drupa, mientras que la subfamilia Leptospermoideae tiene hojas alternadas y frutos secos, generalmente nuez o cápsula. ^{(59) (60) (61)}

La familia Myrtaceae es reconocida en el Perú por presentar 20 géneros y 165 especies. Las myrtaceae endémicas se encuentran principalmente en las regiones bosques húmedos amazónicos y mesoandina, entre los 100 y 3600 m de altitud. ^{(62) (63)}

Especies de Myrtaceae son empleadas principalmente en disturbios gastrointestinales, estados hemorrágicos, enfermedades infecciosas, pudiendo estar relacionada su acción a las propiedades astringentes de la planta. ⁽⁶⁴⁾

2.4.1. *Myrcianthes ferreyare*

Myrcianthes ferreirae (Mc Vaugh) Mc. Vaugh es una especie endémica del Perú, este árbol forma pequeños bosques en las cimas de las laderas con vegetación de lomas. ⁽⁶³⁾

Esta especie es de interés ya que viene de una zona árida al sur de los andes peruanos, donde no se conoce que otra especie de *Myrtaceae* crezca. La infusión de sus hojas es utilizada para aliviar problemas del corazón, purificar la sangre, para problemas digestivos, del cabello y la piel. Además, a sus aceites esenciales se les atribuye propiedades rejuvenecedoras. Sus frutos son utilizados para elaborar vino y también son consumidos directamente. ^{(41) (63) (65)}

En la Figura N° 2.24 se puede apreciar un árbol de *Myrcianthes ferreyrae* “Arrayán” de las Lomas de Atiquipa en la provincia de Caravelí, departamento de Arequipa.



Figura N° 2.24: Árbol de *Myrcianthes ferreyrae* “Arrayán”

2.4.1.1. Clasificación taxonómica

- Reino: Plantae
- Phylum: Magnoliophyta
- Clase: Magnoliopsida
- Orden: Myrtales
- Familia: Myrtaceae
- Género: Myrcianthes
- Especie *Myrcianthes Ferreyrae* ⁽⁶⁶⁾

2.4.1.2. Sinónimos

Eugenia ferreyrae

2.4.1.3. Características

Es un arbusto o árbol de hasta 6-7 metros de altura, las ramas, yemas vegetativas, inflorescencias, y hojas jóvenes densamente estrigosas con pelos blancos o de color marrón de hasta 0.5 mm de largo. ⁽⁴¹⁾

Esta especie es de particular interés ya que procede de una zona árida del sur andino del Perú, donde no se tiene conocimiento de que existan otras especies nativas de la familia *Myrtaceae*. ⁽⁶⁷⁾

2.5. METABOLISMO SECUNDARIO DE LAS PLANTAS

Se entiende por metabolismo secundario de las plantas al conjunto de procesos metabólicos que originan compuestos que no poseen una distribución universal en los vegetales, ya que no son necesarios para todas las plantas. Al contrario del metabolismo primario, el metabolismo secundario no es esencial para el desenvolvimiento del vegetal, pero es imprescindible para su supervivencia dentro de un ecosistema, viabilizando la adaptación del individuo al ambiente, respondiendo a las relaciones e interacciones entre las plantas y su ambiente. ⁽⁶⁸⁾

Las sustancias, productos del metabolismo secundario de las plantas, son conocidas principalmente como “principios activos”. Esos metabolitos aun no poseen funciones fisiológicas dilucidadas, pero su producción está asociada a la defensa de la planta contra el ataque de patógenos, radiación solar, herbivoría, o actúan también en la competición entre plantas y la atracción de organismos benéficos como polinizadores, dispersores de semillas y microorganismos simbiotes, y también en alelopatías. ⁽⁶⁹⁾ ⁽⁶⁸⁾

Estos metabolitos, además de ser muy diversos, poseen propiedades biológicas interesantes, muchas de estas empleadas comercialmente para la industria alimentaria, agrónoma, y principalmente la farmacéutica, a pesar de encontrarse en concentraciones bajas en las plantas, la mayoría como alcaloides, terpenoides, antocianinas, esteroides, flavonoides, quinonas y

ligninas son utilizadas como fármacos, colorantes, aromas, insecticidas, aceites, fibras etc. ⁽⁷⁰⁾ ⁽⁶⁹⁾

Basados en su origen biosintético, los metabolitos secundarios se pueden dividir en tres grupos Los terpenoides, los alcaloides y los fenilpropanoides o compuestos fenólicos. Todos los terpenoides, incluyendo tanto los del metabolismo primario así como más de 25000 metabolitos secundarios, derivan del precursor isopentenil difosfato (IPP).

Los 12000 alcaloides, que contienen uno o más átomos de nitrógeno, son principalmente biosintetizados de los aminoácidos. Los 8000 compuestos fenólicos son producidos por la vía del ácido shikímico o por la vía malonato/acetato. ⁽⁷¹⁾

2.5.1. Terpenoides

Es quizás la clase de metabolitos secundarios estructuralmente más variada. El nombre terpenoides, o terpeno, deriva del hecho que los primeros compuestos se aislaron de la turpentina (“terpentina” en alemán). ⁽⁷¹⁾

Todos los terpenoides derivan de la fusión de 5 carbonos ramificados basados en el esqueleto del isopentano. Estos monómeros están relacionados con las unidades de isopreno dado que la descomposición térmica de varios terpenoides produce el gas alqueno isopreno como producto y porque bajo condiciones químicas adecuadas se puede inducir la polimerización del isopreno en múltiplos de cinco carbonos, generando numerosos esqueletos terpenoides. Los terpenoides son a menudo llamados isoprenoides, aunque los investigadores han sabido por más de 100 años que en sí no es el isopreno el precursor biológico de esta familia de metabolitos. ⁽⁷¹⁾

Su clasificación es hecha de acuerdo con la cantidad de unidades de isopreno que contienen: hemiterpenoides (C₅); monoterpenoides (C₁₀); sesquiterpenoides (C₁₅); diterpenoides (C₂₀); triterpenoides (C₃₀); y carotenoides (C₄₀). ⁽⁷²⁾

Ejemplos de estas estructuras pueden observarse en la siguiente Figura N° 2.25.

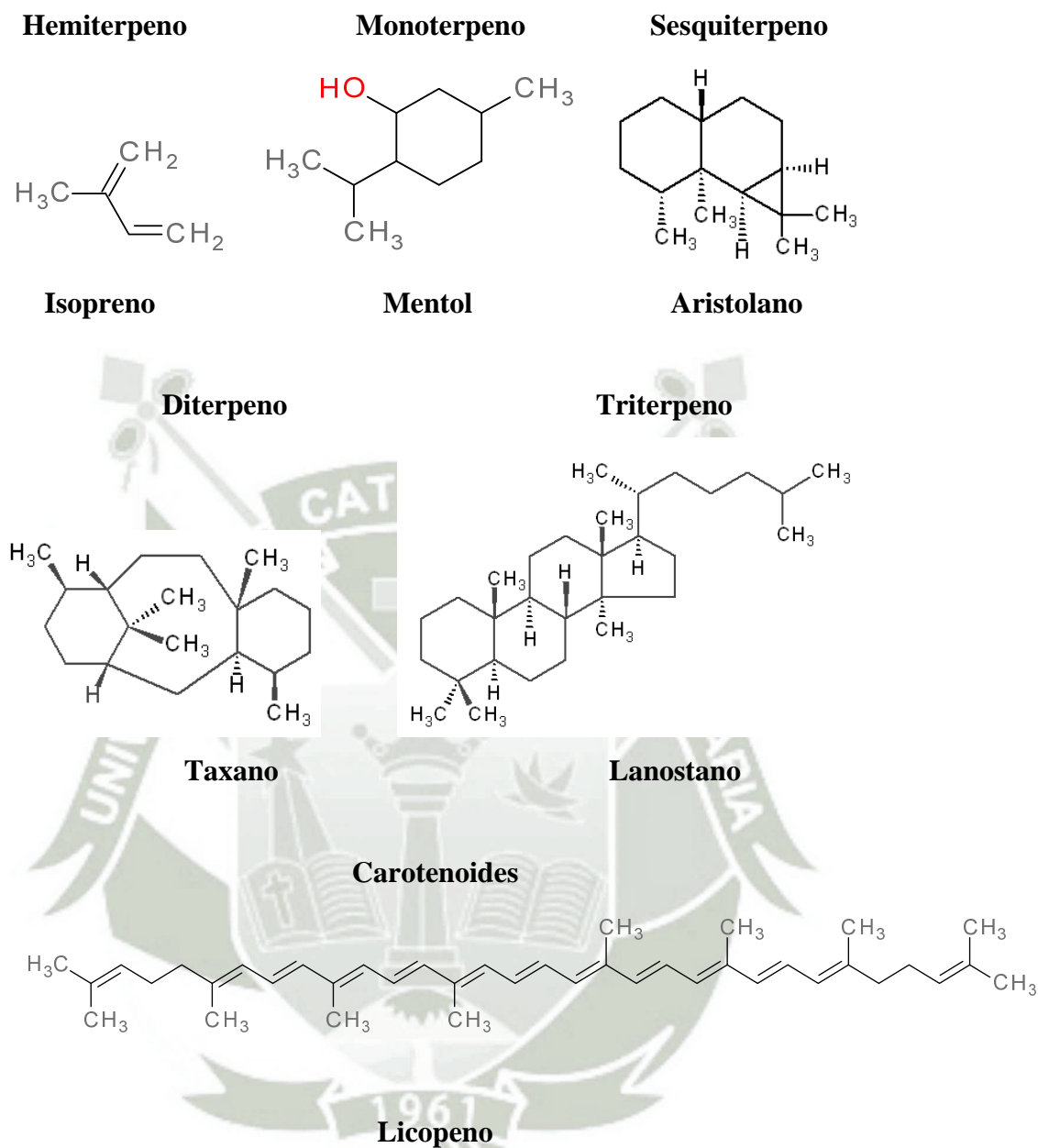


Figura N° 2.25: Ejemplos de los diferentes tipos de terpenos

Los terpenos están envueltos en diferentes funciones en los vegetales, los monoterpenos son los más conocidos como componentes de los aceites esenciales en hierbas y especias, así como en la esencia volátil de flores.

Los sesquiterpenos se encuentran en los aceites esenciales, además numerosos sesquiterpenos actúan como fitoalexinas, compuestos antibióticos producidos por las plantas en respuesta al desafío microbiano, y como antialimentadores, desalentando la herbivoría oportunista. ⁽⁷¹⁾

Los diterpenos incluyen el fitol, fitoalexinas, importantes metabolitos farmacológicamente activos como el taxol, o forskolina que es un compuesto usado en el tratamiento del glaucoma. ⁽⁷¹⁾

Los triterpenos incluyen los brasinoesteroides, ciertas fitoalexinas, varias toxinas y elementos de disuación de alimentación y componentes de ceras de la superficie tales como el ácido oleanólico de las uvas. ⁽⁷¹⁾

Los tetraterpenos más encontrados son los carotenoides, que tienen funciones esenciales en la fotosíntesis. ⁽⁷¹⁾

Los politerpenos. Son aquellos que contienen más de 8 unidades de isopreno destaca el caucho encontrado en el látex, que es un polímero enormemente largo, con una masa molecular promedio de más de 10^6 Da. ⁽⁷¹⁾

Los metabolitos secundarios originados por vías biosintéticas mixtas que derivan parcialmente de los terpenoides son llamados meroterpenos. Por ejemplo las citoquinas y numerosos compuestos fenilpropanoides contienen cadenas de isopreno. Algunos alcaloides, incluyendo drogas anticancerígenas como la vincristina y la vinblastina, contienen fragmentos terpenoides en su estructura. ⁽⁷¹⁾

2.5.2. Alcaloides

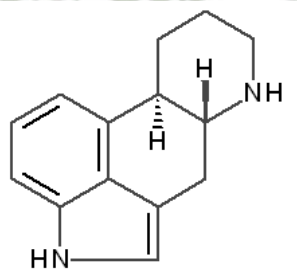
Se definen como compuestos básicos sintetizados por organismos vivos que contienen uno o más átomos de nitrógeno heterocíclico, derivados de aminoácidos (con algunas excepciones) y farmacológicamente activos. El nombre de esta clase está directamente relacionado con el hecho de que casi todos los alcaloides son compuestos básicos (alcalinos). ⁽⁷²⁾

Esta clase de compuestos es conocida por la presencia de sustancias con acentuado efecto sobre el sistema nervioso, muchos de ellos son tóxicos y

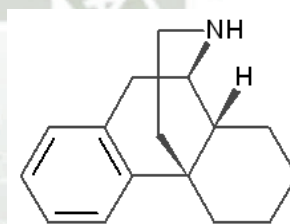
pueden causar la muerte, incluso con pequeñas cantidades. Algunos tienen acción antibiótica y otros interfieren con patrones de comportamiento, como los antidepresivos (reserpina) y alucinógenos (mescalina). Parece que la función de los alcaloides en las plantas y animales está relacionada con los mecanismos de defensa. ⁽⁷²⁾

Los alcaloides están en su mayoría formados a partir de L-aminoácidos (triptófano, tirosina, fenilalanina, lisina y arginina) ya sea solo o en combinación con un esteroide, secoiridoides, o de terpenoides. Una o dos transformaciones pueden convertir a estos aminoácidos ubicuos de metabolitos primarios en sustratos para el metabolismo de alcaloides altamente específicos. ⁽⁷¹⁾

Algunos ejemplos de alcaloides se encuentran en la Figura N° 2.26.



Ergolina



Morfina

Figura N° 2.26: Ejemplos de alcaloides

2.5.3. Compuestos fenólicos

Grupo pertenece a una clase de compuestos con estructuras bastante diversas, que poseen por lo menos un anillo aromático en el cual, por lo menos un hidrogeno esta sustituido por un grupo hidroxilo –OH. Los compuestos fenólicos tienden a solubilizarse en agua y pueden estar ligados a azúcares. Son compuestos fácilmente oxidables en pH alcalino. ⁽⁷³⁾

Desde el punto de vista farmacológico poseen actividad antiséptica, antiinflamatoria, y pueden inhibir la actividad enzimática. La unión de los

hidroxilos al anillo aromático le confiere poder antioxidante. Existen cerca de cinco mil fenoles, entre ellos destacan los flavonoides, ácidos fenólicos, fenoles simples, cumarinas, taninos, ligninas y tocoferoles. ⁽⁷⁴⁾

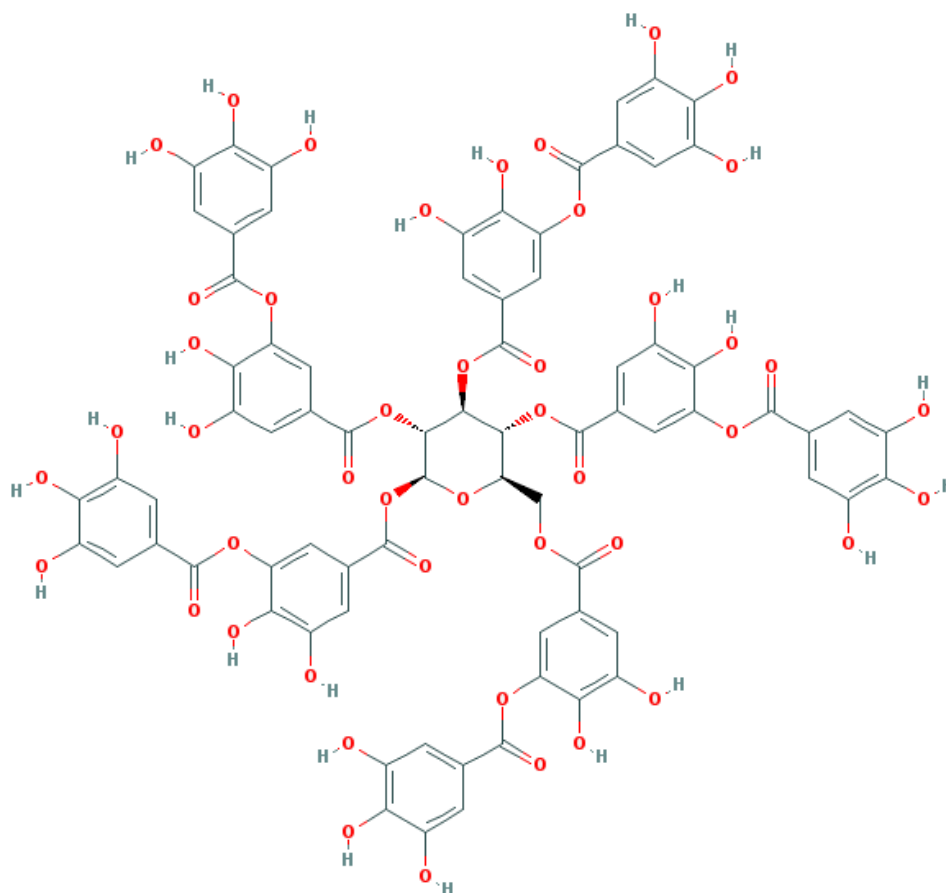
La mayoría de los compuestos fenólicos vegetales derivan de las vías del fenilpropanol y fenilpropanol acetato, y cumplen una gama amplia de funciones biológicas en la planta. Por ejemplo las ligninas polimericas refuerzan las paredes celulares, y permiten el transporte de agua y minerales desde las raíces hasta las hojas de las plantas, los lignanos ayudan a defender a las plantas contra varios patógenos o actúan como antioxidantes en flores, nueces, semillas, raíces. ⁽⁷¹⁾

Los flavonoides comprenden un grupo muy diverso de más de 4500 compuestos. Entre sus subclases se encuentran las antocianinas (pigmentos), proantocianinas o taninos condensados (disuasivos alimentarios y protectores de la madera), y las isoflavonas (productos defensivos y moléculas de señalización). ⁽⁷¹⁾

Las cumarinas, furanocumarinas y estilbenos protegen contra los patógenos bacterianos y fúngicos, disuaden la herbivoría, e inhiben la germinación de las semillas. ⁽⁷¹⁾

En la Figura N° 2.27 se pueden observar ejemplos de estructuras de taninos, en la Figura N° 2.28 de flavonoides y cumarinas.

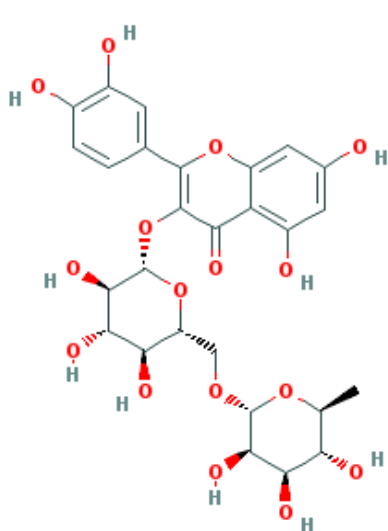
Taninos



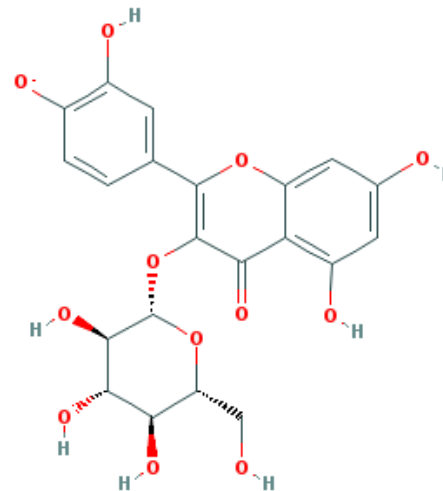
Ácido tánico

Figura N° 2.27: Ejemplo de la estructura de un tanino

Flavonoides

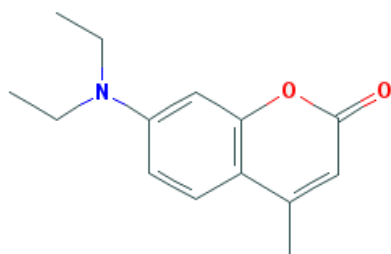


Rutina



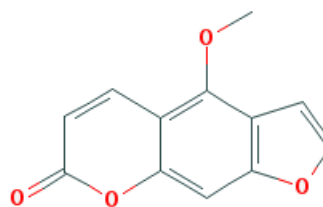
Isoquercitina

Cumarina



7-Dimetilamino-4-metilcumarina

Furanocumarina



Bergapteno

Figura N° 2.28: Ejemplos de estructuras de flavonoides y cumarinas

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Campo de Investigación

3.1.1. Unidades de Estudio

Para realizar el presente trabajo de investigación se utilizaron como muestra el extracto etanólico de hojas de *Myrcianthes ferreyrae* “Arrayán”, y 18 extractos etanólicos de hongos endofíticos aislados de hojas de *Myrcianthes ferreyrae* “Arrayán”.

3.1.2. Ámbito Geográfico y Temporalidad

Este trabajo de investigación se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología ubicado en el pabellón H- 403, y en el Laboratorio de Farmacognosia ubicado en el pabellón H – 102 de las instalaciones de la UCSM de la ciudad de Arequipa – Perú, durante los meses de Mayo 2011 – Junio 2013.

3.2. Materiales

3.2.1. Materiales de Laboratorio

- **Material de vidrio**
- Capilares sin heparina
- Cuba cromatográfica
- Fiola de 1000 ml
- Frascos graduados de 1000ml
- Frascos de penicilina
- Matraz Erlenmeyer de 500, 1000ml
- Pera de decantación de 125ml
- Pipetas de 1, 2, 5, 10ml
- Probetas graduadas de 10, 100, 500, 1000ml
- Tubos de ensayo 13 x 100mm , 20 x 150mm
- Varillas de vidrio

- Vasos precipitado de 100, 500, 1000ml
- **Otros**
- Algodón
- Asa de siembra
- Atomizador
- Filtro millipore
- Gradilla de tubos
- Guantes
- Micro pipeta automática 10-250 ul
- Papel aluminio
- Papel filtro
- Papel kraft
- Pizeta
- Placas de sílica gel 60F₂₅₄
- Placas petri estériles 10 x 150mm
- Tips de 20-1000 ul
- Trípode

3.2.2. Reactivos

- | | |
|---------------------------|------------------------|
| • Acetato de etilo | P.A. Merck |
| • Ácido acético | P.A. Merck |
| • Ácido clorhídrico cc | Q.P. Merck |
| • Ácido fórmico | Q.P. Lab. Chemie |
| • Ácido sulfúrico | Q.P. Merck |
| • Anhídrido acético | P.A. Fisher scientific |
| • Benceno | Q.P. Merck |
| • Cloranfenicol | Lafar |
| • Cloroformo | P.A. Fermont |
| • Cloruro de sodio | P.A. J.T. Baker |
| • Dietilamina | Q.P. Merck |
| • Dimetilsulfóxido (DMSO) | P.A. Merck |
| • Etanol puro | P.A. Delta Química |

- Gelatina Himedia
- Hidróxido de amonio P.A. Merck
- Hidróxido de potasio P.A. Merck
- Hidróxido de sodio P.A. Merck
- Cinta de magnesio
- Metanol P.A. Induquímica
- MOPS P.A. J.T. Baker
- Reactivo de anisaldehído sulfúrico (ver Anexo N° 1)
- Reactivo de KOH etanólico al 5 % (ver Anexo N° 1)
- Reactivo de productos naturales (ver Anexo N° 1)
- Reactivo de vainillina sulfúrica (ver Anexo N° 1)
- Reactivo Dragendorff (ver Anexo N° 1)
- Reactivo Lieberman – Bouchard (ver Anexo N° 1)
- Reactivo Mayer (ver Anexo N° 1)
- Solución de cloruro férrico 1% (ver Anexo N° 1)
- Solución de NaOH 1M (ver Anexo N° 1)
- Tolueno Q.P. Merck

- **Medios de cultivo**
- Agar base sangre (ver Anexo N° 2) Becton Dickinson
- Agar batata dextrosa (ver Anexo N° 2) Merck
- Agar Sabouraud (ver Anexo N° 2) Merck
- RPMI – 1640 (ver Anexo N° 2) Biological Industries Kibbutz
beit Haemek

- **Estandar de referencia**
- Anfotericina B P.A. Sigma Aldrich

3.2.3. Equipos

- Autoclave Sturdy SA 260MA
- Balanza analítica Ohaus Pioneer PA214
- Baño María Memment
- Bomba de vacío Welch gem 8890

- Campana de flujo laminar Esco Class II Type A2
- Estufa de secado y esterilización Fanem 315 SE
- Estufa J.P. Selecta
- Lámpara UV Camag
- Microscópio Beltec scientific
- pHmetro Hanna PH210

3.3. Métodos

3.3.1. Recolección del Material Biológico

El proceso de recolección de la planta se llevó a cabo el 1 de mayo del 2011, en las lomas de Atiquipa Figura N° 3.1, que se encuentran en el distrito de Atiquipa, provincia de Caravelí, departamento de Arequipa como se observa en el mapa de la Figura N° 3.2.

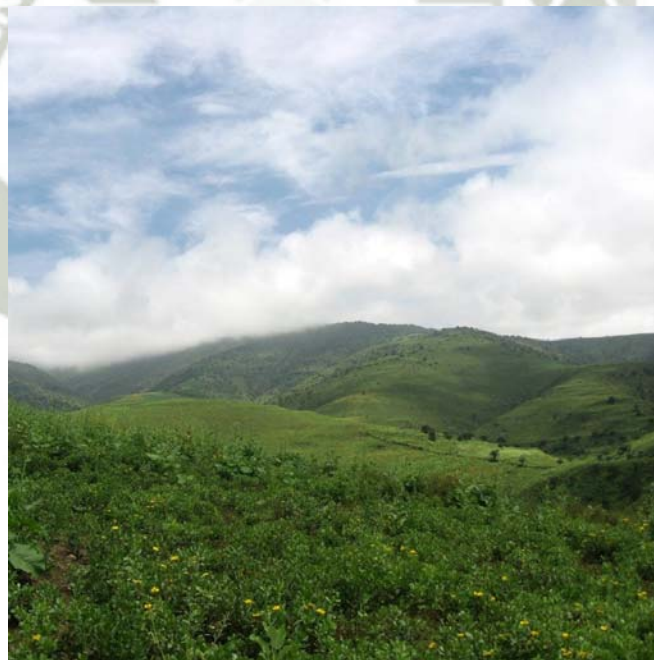


Figura N° 3.1: Lomas de Atiquipa



Figura N° 3.2 Mapa de Ubicación de la zona de recolección Atiquipa – Caravelí, Arequipa

Se procedió de la siguiente manera:

- Se identificó 10 individuos de la planta como se puede ver en la Tabla N° 3.1.
- Se seleccionó 3 ramas cuyas hojas sean aparentemente sanas al azar, de extremos opuestos.
- El material recolectado se colocó en bolsas de papel identificadas, con la finalidad de evitar el deterioro durante su traslado.

Tabla N° 3.1: Lugar de recolección de las plantas

Individuo	Altitud (msnm)	Latitud	Longitud
I1	647	-15°46.558	-74°22.370
I2	639	-15°46.568	-74°22.347
I3	647	-15°46.588	-74°22.360
I4	647	-15°46.736	-74°22.565
I5	734	-15°46.728	-74°22.589
I6	757	-15°46.747	-74°22.588
I7	758	-15°46.735	-74°22.603
I8	759	-15°46.721	-74°22.603
I9	767	-15°46.722	-74°22.586
I10	786	-15°46.722	-74°22.619

3.3.2. Desinfección y Cultivo de Hojas

Se lavaron las hojas con agua potable, se cortaron 3 fragmentos de las hojas de 5mm x 5mm y estos se desinfectaron superficialmente por inmersión en soluciones de hipoclorito de sodio 0.525% (2 minutos), alcohol etílico 70% (2 minutos), y agua destilada (2 minutos).⁽⁷⁵⁾

Luego de la desinfección superficial, los fragmentos fueron transferidos a placas petri conteniendo Agar Batata Dextrosado (ABD), suplementado con cloranfenicol (100ug/ml) como se muestra en la Figura N° 3.3.

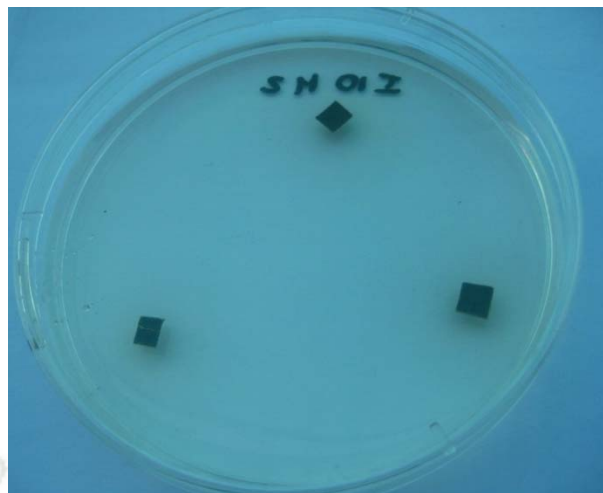


Figura N° 3.3: Cultivo de fragmentos de hojas de *Myrcianthes ferreyrae* “Arrayán” en medio ABD

Alicuotas del agua destilada estéril utilizada al final del proceso de desinfección también se plaqueó en medio ABD para asegurar que solamente hongos endofíticos serán aislados como se muestra en la Figura N° 3.4.



Figura N° 3.4: Muestra de agua destilada del proceso de desinfección plaqueada en medio ABD

Se incubaron las placas a temperatura ambiente, por un periodo de 30 días, y los hongos aislados (Figura N° 3.5) se transfirieron a placas de petri 10 x 150mm con medio ABD para la purificación del hongo.

Se determinó la frecuencia de colonización como el número total de muestras de tejido colonizado por endófitos dividido por el número total de muestras incubadas y expresada en porcentaje.

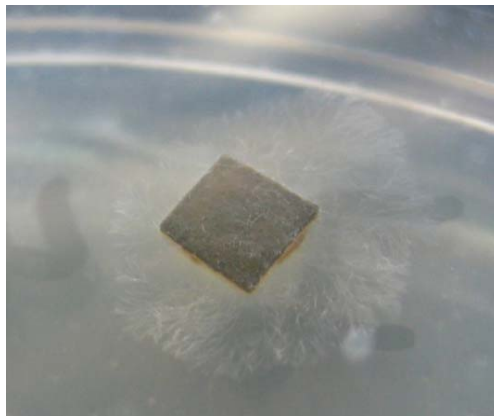


Figura N° 3.5: Hongo endofítico creciendo de un fragmento de hoja de *Myrcianthes ferreyrae* “Arrayán”

Los hongos filamentosos obtenidos se preservaron por duplicado, en agua destilada estéril como se muestra en la Figura N° 3.6.



Figura N° 3.6: Frascos de penicilina conteniendo fragmentos de hongos endofíticos en agua destilada

3.3.3. Cultivo de Hongos y Preparación de los Extractos Etanólicos

a. Hongos Filamentosos

Los hongos filamentosos obtenidos se cultivaron en placas petri de 10 x 150 mm conteniendo ABD a temperatura ambiente. Luego de 14 días de crecimiento, el

medio de cultivo con el crecimiento micelial se transfirió a tubos de ensayo de 20 x 150 mm (Figura N° 3.7). Para la obtención del extracto etanólico se adicionó 20ml de etanol PA y se dejó en maceración por 48 horas (Figura N° 3.8), luego el sobrenadante filtrado de cada tubo se transfirió a frascos de penicilina rotulados para proceder al secado en la estufa a 50 °C hasta sequedad.

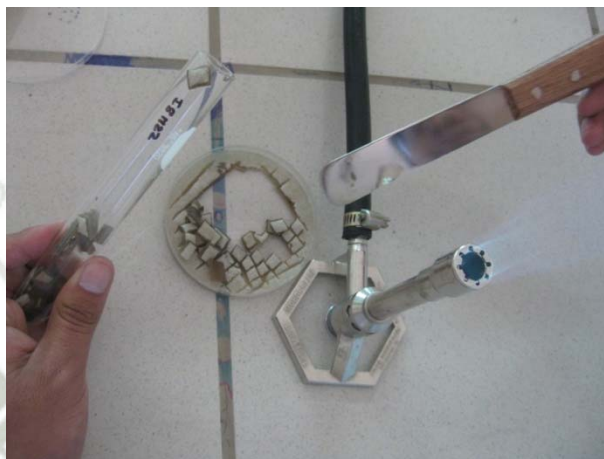


Figura N° 3.7: Transferencia de medio con hongo endofítico a tubo de ensayo



Figura N° 3.8: Maceración etanólica de medio con hongos endofíticos de *Myrcianthes ferreyrae*

Los extractos etanólicos secos obtenidos se redisolviéron en DMSO a una concentración de 20mg/ml y se mantuvieron a -20°C hasta su utilización para el test antifúngico.

b. Extracto Vegetal

Se colectó 20 g de hojas de los 10 individuos muestreados, se lavó con agua, se pulverizó y colocó en un frasco de vidrio de 500 ml con 250 ml de etanol (PA) por 48 horas, luego el sobrenadante filtrado se transfirió a tubos de ensayo para su secado a temperatura ambiente, hasta un volumen aproximado de 10 ml, luego se transfirió a frascos de penicilina estériles para su secado en estufa a 50 °C hasta sequedad.

El extracto etanólico seco obtenido se disolvió en DMSO a una concentración de 20mg/ml y se mantuvo a -20°C hasta su utilización para el test antifúngico.

3.3.3. Preparación del Medio RPMI – 1640

Se disolvió 10.4g del medio RPMI-1640 en 900ml de agua destilada, se agregó 34.53g de tampón MOPS (ácido 3-[N-morfolino] propanosulfónico), se agitó hasta disolver completamente. Se ajustó el pH a 7.0 a 25°C usando NaOH 1M, el color que toma es anaranjado como se observa en la Figura N° 3.9. Luego se agregó agua destilada suficiente para obtener un volumen final de 1L, y finalmente se esterilizó por filtración y almacenó a 4°C. ⁽⁷⁶⁾



Figura N° 3.9: Preparación de medio RPMI – 1640

3.3.4. Padronización del Inóculo

El inóculo de la levadura se padronizó por medio de la escala Mac Farland N°0.5 en densidad óptica, lo que corresponde a 1×10^6 a 5×10^6 UFC/ml.

Las levaduras crecieron en agar sabouraud dextrosado a 35°C por 24 horas como se puede observar en la Figura N° 3.10. Cinco colonias se suspendieron en solución salina estéril 0.145 mol/L (NaCl 0.85%). La densidad óptica se ajustó con espectrofotómetro hasta obtener una absorbancia equivalente a la de la solución patrón Mac Farland n°0.5, con una longitud de onda de 530nm.

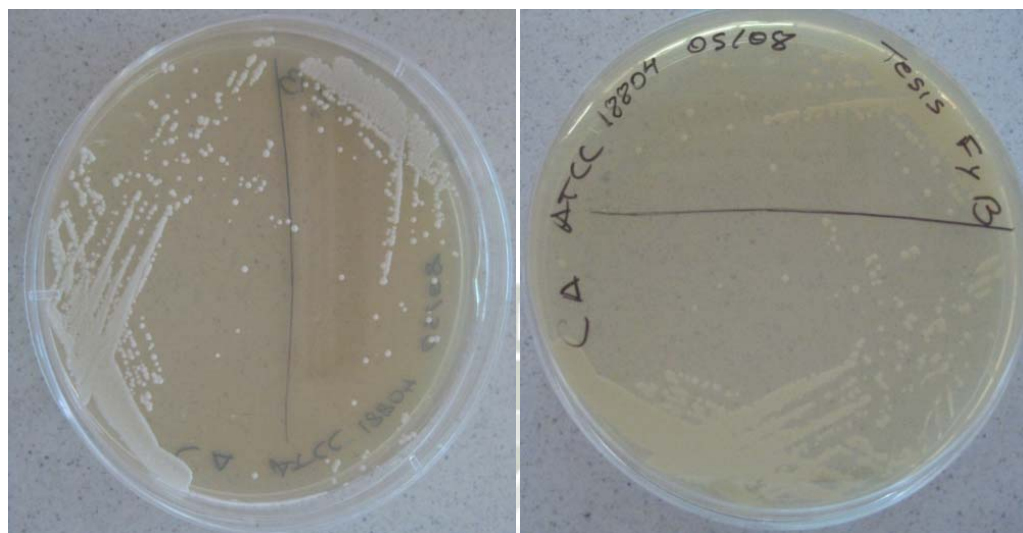


Figura N° 3.10: Repique de levadura *Candida albicans* ATCC 18804

La suspensión patrón de levaduras se mezcló por 15 segundos, y se diluyó 1:50 y luego 1:20 con el medio de cultivo RPMI, para obtener un inóculo 2X concentrado (de 1×10^3 a 5×10^3 UFC/ml) como se puede ver en la Tabla N° 3.1.

Tabla N° 3.1: Tabla de diluciones del inóculo

	Escala Mac Farland N 0.5	Solucion madre	Tubo 1	Tubo 2
Inoculo ml			0.2	0.5
Medio ml			9.8	9.5
Volumen final ml		5	10	10
Dilucion			1:50	1:20
Concentracion	1×10^6 a 5×10^6 UFC/ml	1×10^6 a 5×10^6 UFC/ml	2×10^4 a 10×10^5 UFC/ml	1×10^3 a 5×10^3 UFC/ml

Se agregó 100 ul de inóculo en los pozos de la placa de 96 pozos.

El inóculo se diluyó 1:1 en el momento de la inoculación de los pozos con los 100 ul inoculados previamente de extracto, antifúngico o medio, obteniendo la concentración final deseada de inóculo de 0.5×10^3 a 2.5×10^3 UFC/ml. ⁽⁷⁶⁾

3.3.5. Ensayo Antifúngico

La determinación de la actividad antifúngica de los extractos fúngicos y vegetales se realizó por el método de microdilución en placa y se utilizó las siguiente levadura blanco: *Candida albicans* ATCC 18804.

Las diluciones seriadas de extracto etanólico de hojas de *Myrcianthes ferreyrae* “Arrayán”, a partir de la solución madre de 20 mg/ml se detalla en la Figura N°3.11, donde se puede observar que se va diluyendo el contenido del tubo anterior con el del posterior en una proporción de 1:1, desde el tubo numero 2 al 6, mientras que del para el caso del tubo 1 se toma una menor cantidad de solución madre (Ver Anexo N°3).

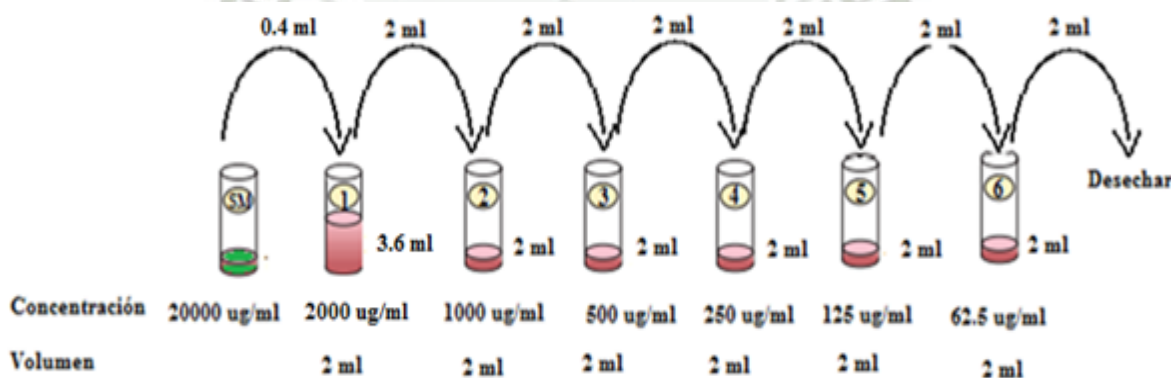


Figura N° 3.11: Esquema de diluciones seriadas de 2000 ug/ml a 62.5 ug/ml del extracto etanólico de hojas de *Myrcianthes ferreyrae* “Arrayán”

Luego de obtener las concentraciones deseadas en los tubos se prosigue a inocular 100 ul de estas soluciones en los pozos de la placa de 96 pozos por duplicado, y luego se inocula también el inóculo de levaduras (100 ul), lo cual diluyó nuestra concentración final a la mitad, como se muestra en la Tabla N°3.2.

Tabla N° 3.2: Tabla de inoculación de diluciones de extracto etanólico de hojas de *Myrcianthes ferreyrae* “Arrayán” en la placa de 96 pozos

	Pozo 1	Pozo 2	Pozo 3	Pozo 4	Pozo 5	Pozo 6
Solución tubo 1 concentración 2000 ug/ml	100 ul					
Solución tubo 2 concentración 1000 ug/ml		100 ul				
Solución tubo 3 concentración 500 ug/ml			100 ul			
Solución tubo 4 concentración 250 ug/ml				100 ul		
Solución tubo 5 concentración 125 ug/ml					100 ul	
Solución tubo 6 concentración 62.5 ug/ml						100 ul
Inóculo de <i>Candida albicans</i> ATCC 18804	100 ul	100 ul	100 ul	100 ul	100 ul	100 ul
Volumen final	200 ul	200 ul	200 ul	200 ul	200 ul	200 ul
Concentración final	1000 ug/ml	500 ug/ml	250 ug/ml	125 ug/ml	62.5 ug/ml	31.25 ug/ml

Para el caso del extracto de hojas, se emplearon las concentraciones de 1000ug/ml, 500 ug/ml, 250 ug/ml, 125 ug/ml, 62.5 ug/ml, 31.25 ug/ml como concentraciones finales en la placa de 96 pozos. La placa resultante se puede apreciar en la Figura N°3.12.

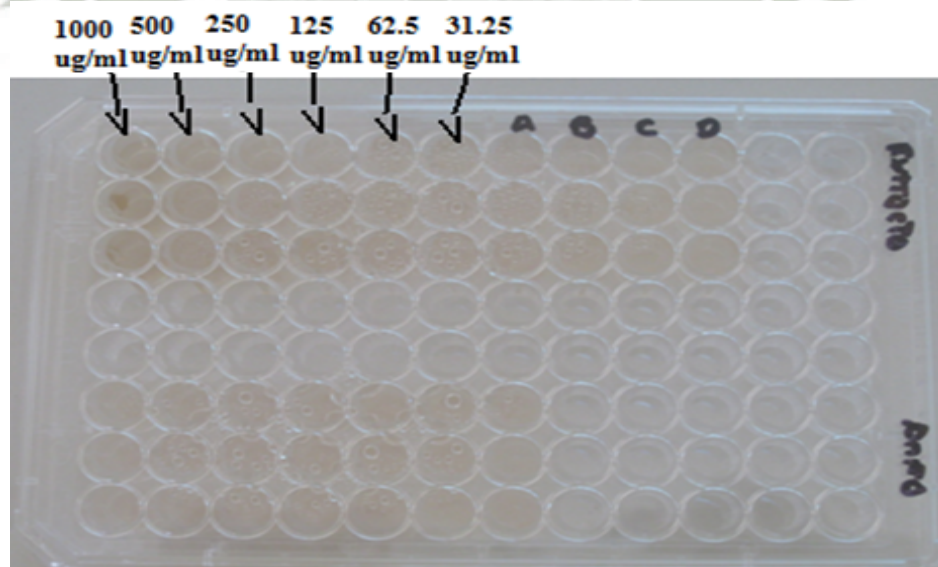


Figura N° 3.12: Placa de 96 pozos inoculada con las diluciones del extracto etanólico de hojas de *Myrcianthes ferreyrae* “Arrayán”

Luego se incubó la placa a 35 °C por 24 horas y se procedió a la lectura de placas.

Dado que a las concentraciones evaluadas no se encontró crecimiento visible de levaduras se procedió a hacer una nueva evaluación a concentraciones menores para poder hallar la CMI.

Se realizó nuevas diluciones seriadas, (Ver Anexo N°3), a partir de la solución madre de 20000 ug/ml como se detalla en la Figura N°3.13.

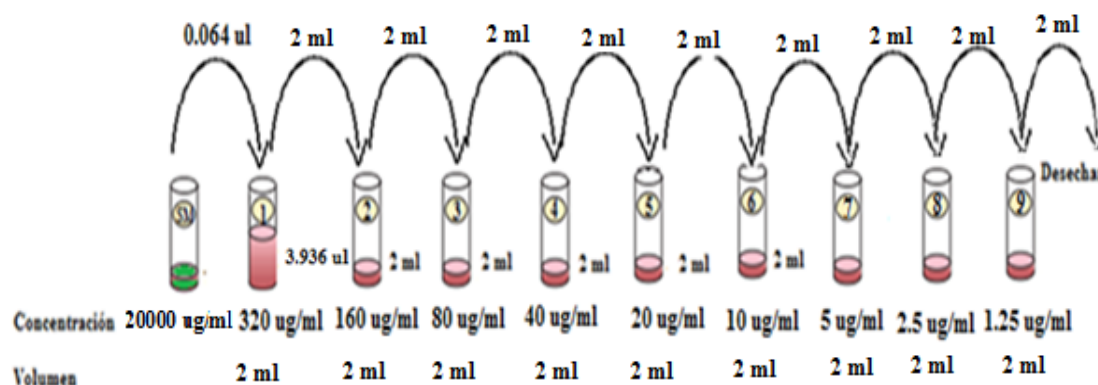


Figura N° 3.13: Esquema de diluciones seriadas de 320 ug/ml a 1.25 ug/ml del extracto etanólico de hojas de *Myrcianthes ferreyrae* "Arrayán"

Luego de obtener las concentraciones deseadas en los tubos se prosigue a inocular 100 ul de estas soluciones en los pozos de la placa de 96 pozos por triplicado, y luego se inoculó también el inóculo de levaduras (100 ul), lo cual diluyó nuestra concentración final a la mitad, como se muestra en la Tabla N° 3.3.

Tabla N° 3.3: Tabla de inoculación de diluciones seriadas de 320 ug/ml a 1.25 ug/ml de extracto etanólico de hojas de *Myrcianthes ferreyrae* “Arrayán” en la placa de 96 pozos

	Pozo 1	Pozo 2	Pozo 3	Pozo 4	Pozo 5	Pozo 6	Pozo 7	Pozo 8	Pozo 9
Solución tubo 1 concentración 320 ug/ml	100 ul								
Solución tubo 2 concentración 160 ug/ml		100 ul							
Solución tubo 3 concentración 80 ug/ml			100 ul						
Solución tubo 4 concentración 40 ug/ml				100 ul					
Solución tubo 5 concentración 20 ug/ml					100 ul				
Solución tubo 6 concentración 10 ug/ml						100 ul			
Solución tubo 7 concentración 5 ug/ml							100 ul		
Solución tubo 8 concentración 2.5 ug/ml								100 ul	
Solución tubo 9 concentración 1.25 ug/ml									100 ul
Inóculo de <i>Candida albicans</i> ATCC 18804	100 ul	100 ul	100 ul	100 ul	100 ul	100 ul	100 ul	100 ul	100 ul
Volumen final	200 ul	200 ul	200 ul	200 ul	200 ul	200 ul	200 ul	200 ul	200 ul
Concentración final	160 ug/ml	80 ug/ml	40 ug/ml	20 ug/ml	10 ug/ml	5 ug/ml	2.5 ug/ml	1.25 ug/ml	0.625 ug/ml

Se evaluaron las siguientes concentraciones finales en los pozos 160 ug/ml, 80 ug/ml, 40 ug/ml, 20 ug/ml, 10 ug/ml, 5 ug/ml, 2.5 ug/ml, 1.25 ug/ml, 0.625 ug/ml como se muestra en la Figura N°3.14.

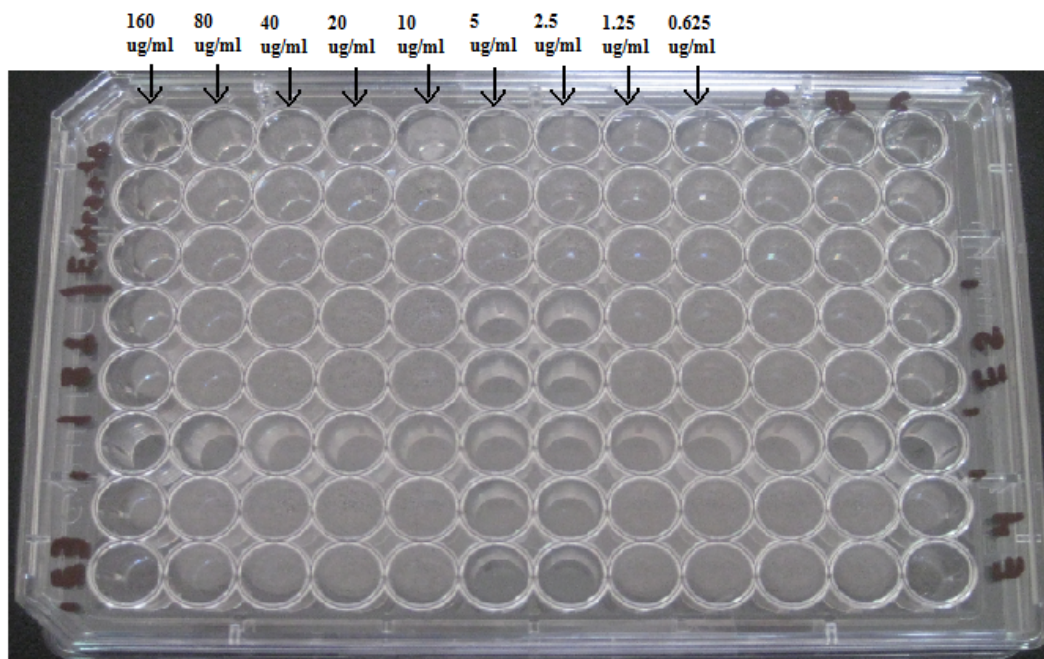


Figura N° 3.14: Placa de 96 pozos inoculada con las diluciones del extracto etanólico de hojas de *Myrcianthes ferreyrae* “Arrayán”

Las diluciones seriadas de extractos etanólicos de los hongos endofíticos aislados, a partir de la solución madre de 20 mg/ml se detalla en la Figura N° 3.15, (Ver Anexo N°3).

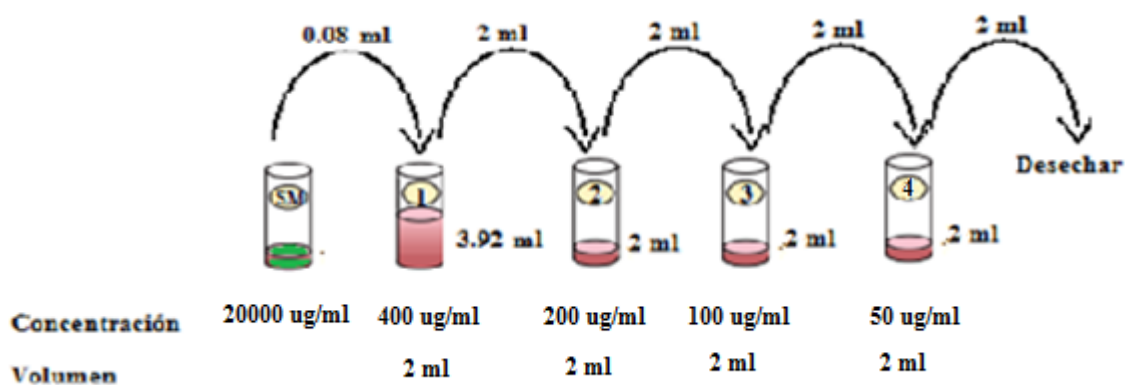


Figura N° 3.13: Esquema de diluciones seriadas de 400 ug/ml a 50 ug/ml de los extractos etanólicos de hongos endofíticos aislados de las hojas de *Myrcianthes ferreyrae* “Arrayán”

Luego de obtener las concentraciones deseadas en los tubos se prosigue a inocular 100 ul de estas soluciones en los pozos de la placa de 96 pozos por duplicado, y luego se inocula también el inóculo de levaduras (100 ul), lo cual diluyó nuestra concentración final a la mitad, como se muestra en la Tabla N°3.4.

Tabla N° 3.4: Tabla de inoculación de diluciones seriadas de 200 ug/ml a 25 ug/ml de extracto etanólico de hojas de *Myrcianthes ferreyrae* “Arrayán” en la placa de 96 pozos

	Pozo 1	Pozo 2	Pozo 3	Pozo 4
Solución tubo 1 concentración 400 ug/ml	100 ul			
Solución tubo 2 concentración 200 ug/ml		100 ul		
Solución tubo 3 concentración 100 ug/ml			100 ul	
Solución tubo 4 concentración 50 ug/ml				100 ul
Inóculo de <i>Candida albicans</i> ATCC 18804	100 ul	100 ul	100 ul	100 ul
Volumen final	200 ul	200 ul	200 ul	200 ul
Concentración final	200 ug/ml	100 ug/ml	50 ug/ml	25 ug/ml

Para la realización del ensayo antifúngico ensayó 3 concentraciones finales de cada extracto de hongo endofítico: 200ug/ml, 100ug/ml, 50ug/ml y 25 ug/ml como se puede observar en la Figura N°3.15.

Luego se incubó la placa a 35 °C por 24 horas y se procedió a la lectura de placas

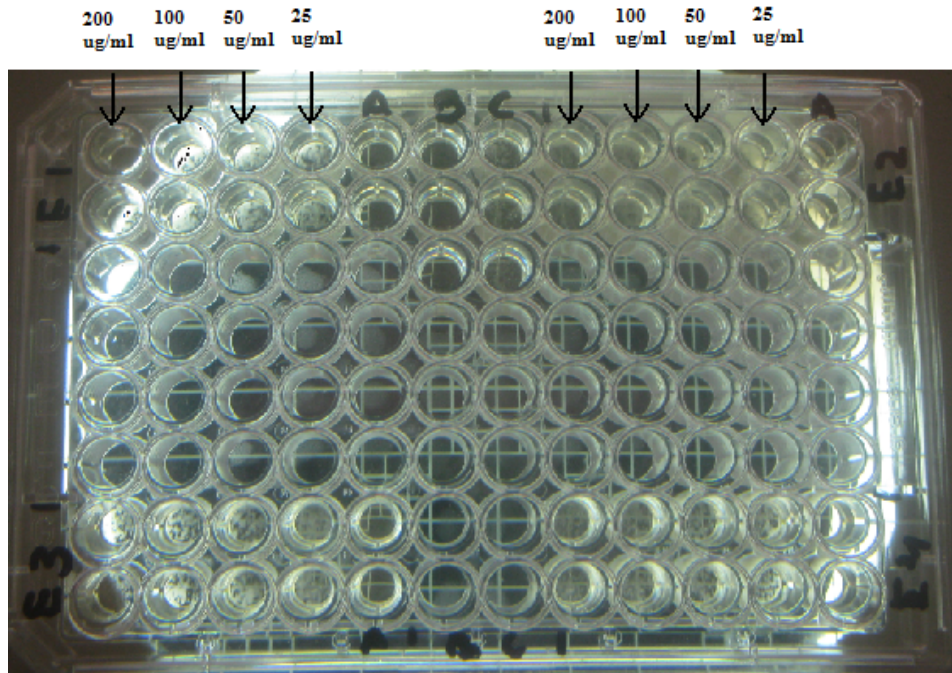


Figura N° 3.15: Placa de 96 pozos inoculada con las diluciones de los extractos etanólicos de hongos endofíticos aislados de las hojas de *Myrcianthes ferreyrae* “Arrayán”

Las diluciones seriadas de anfotericina B, a partir de la solución madre de 2 mg/ml se detalla en la Figura N°3.16, (Ver Anexo N°3)

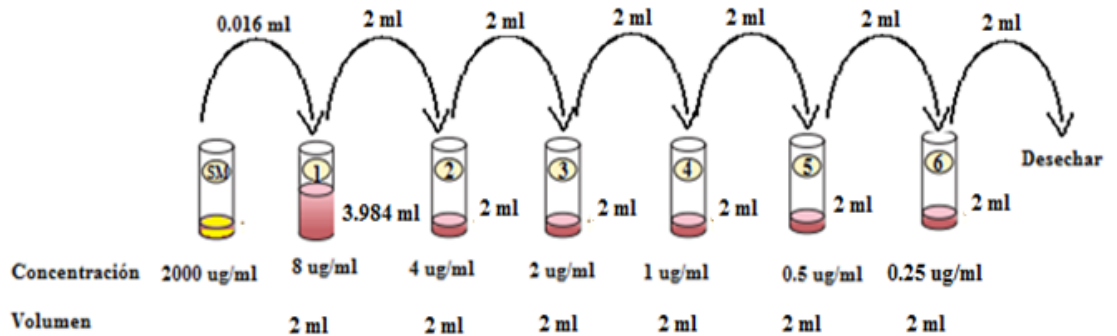


Figura N° 3.16: Esquema de diluciones seriadas de 8 ug/ml a 0.25ug/ml de la solución de Anfotericina B

Luego de obtener las concentraciones deseadas en los tubos se prosigue a inocular 100 ul de estas soluciones en los pozos de la placa de 96 pozos por triplicado, y luego se inocula también el inóculo de levaduras (100 ul), lo cual diluyó nuestra concentración final a la mitad, como se muestra en la Tabla N°3.5.

Tabla N° 3.5: Tabla de inoculación de diluciones seriadas de 8 ug/ml a 0.25 ug/ml de solución de Anfotericina B

	Pozo 1	Pozo 2	Pozo 3	Pozo 4	Pozo 5	Pozo 6
Solución tubo 1 concentración 16 ug/ml	100 ul					
Solución tubo 2 concentración 8 ug/ml		100 ul				
Solución tubo 3 concentración 4 ug/ml			100 ul			
Solución tubo 4 concentración 2 ug/ml				100 ul		
Solución tubo 5 concentración 1 ug/ml					100 ul	
Solución tubo 6 concentración 0.5 ug/ml						100 ul
Inóculo de <i>Candida albicans</i> ATCC 18804	100 ul	100 ul	100 ul	100 ul	100 ul	100 ul
Volumen final	200 ul	200 ul	200 ul	200 ul	200 ul	200 ul
Concentración final	4 ug/ml	2 ug/ml	1 ug/ml	0.5 ug/ml	0.25 ug/ml	0.125 ug/ml

Para la solución estándar de anfotericina B se utilizaron las concentraciones de 4 ug/ml, 2 ug/ml, 1 ug/ml, 0.5 ug/ml, 0.25 ug/ml, 0.125 ug/ml como se observa en la Figura N°3.17.

Luego se incubó la placa a 35 °C por 24 horas envuelta en papel aluminio ya que la anfotericina B es fotosensible, y se procedió a la lectura de placas.

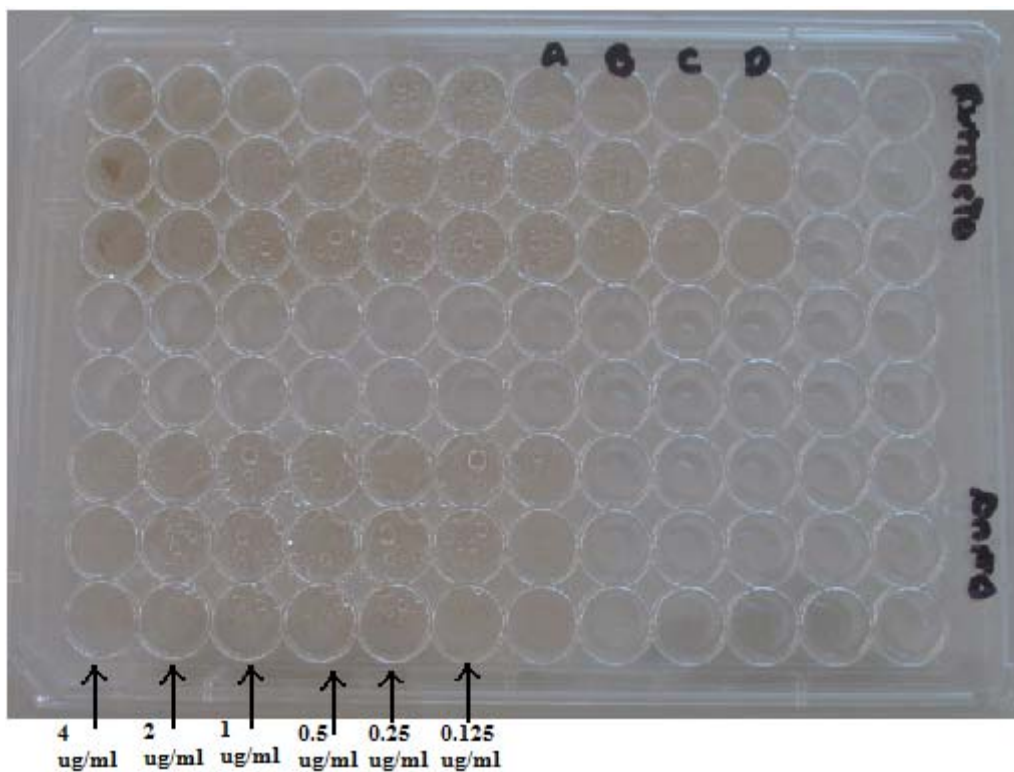


Figura N° 3.17: Placa de 96 pozos inoculada con las diluciones de solución de Anfotericina B

Para la lectura se consideró la ausencia o presencia de crecimiento visible, el valor de CMI se consideró como la concentración mínima en la cual no hay crecimiento visible, la cual es la anterior al punto de corte como se observa en la Figura N° 3.18.

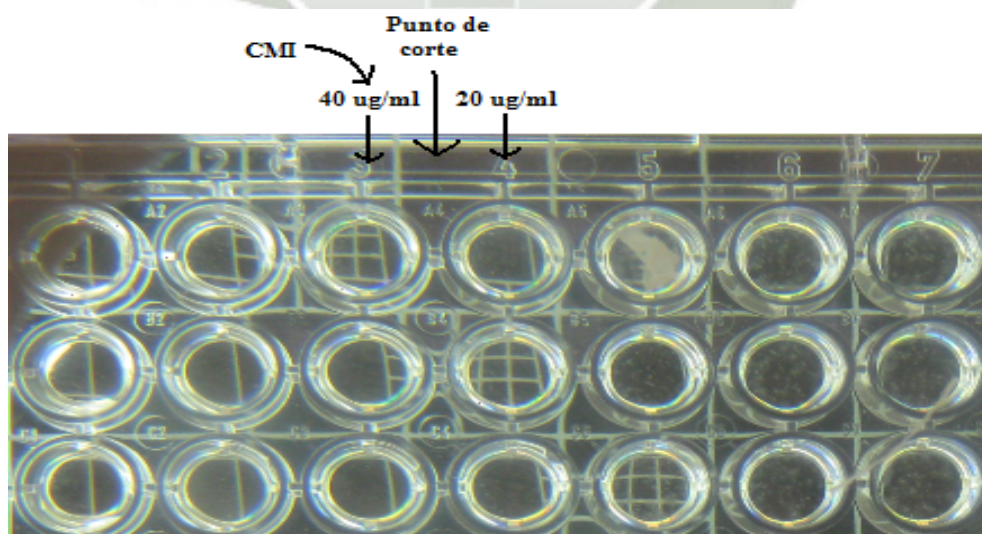


Figura N° 3.18: Lectura de placas de microdilución e identificación de punto de corte y CMI

Se preparó 4 controles en duplicado (Figura N° 3.19):

- Control de extracto (A): Última dilución de extracto.
- Control de extracto (B): 100ul de extracto.
- Control negativo (C): 100ul de medio (RPMI-1640+DMSO1%).
- Control positivo (D): 100ul de medio (RPMI-1640+DMSO1%) + 100ul de inóculo.



Figura N° 3.19: Placa de microdilución inoculada con *Candida albicans* ATCC 18804 con sus respectivos controles

3.3.6. Análisis Fitoquímico Preliminar

El material que se utilizó como muestra fue el extracto etanólico de hojas maceradas de *Myrcianthes ferreyrae* “Arrayán” ya filtrado. A este extracto se le realizaron la totalidad de las pruebas descritas a continuación para la determinación de las principales familias de metabolitos secundarios:

a. Determinación de la presencia de Alcaloides

Se tomó una alícuota de 10 ml, se evaporó a sequedad en baño maría, el residuo que se obtuvo se disolvió en 3ml de HCl al 2%, esta suspensión se dividió en 3 alícuotas de 1 ml cada una, a cada una de esas alícuotas se les agregó Reactivo de Mayer y Reactivo de Dragendorff, reacción de precipitación representaron la presencia de alcaloides. ^{(77) (78)}

b. Prueba CCF para determinar la presencia de uno o más Alcaloides

Esta prueba se realizó a pesar que la prueba química arrojó resultados negativos.

Se tomó una alícuota de 5 ml y se concentraron a 100ul en baño maría, se realizó una aplicación de la muestra en la cromatoplaca de silicagel 60 F254.

Se utilizó como fase móvil Tolueno: Ácido acético: Dietilamina (70:20:10), detección: Reactivo de Dragendorf a 254 VIS. ⁽⁷⁷⁾ ⁽⁷⁸⁾

c. Prueba CCF para determinar la presencia de una o más antraquinonas

Se tomó una alícuota de 5 ml y se calentó 5 minutos a 60 °C, se filtró y se le aplicó una muestra del filtrado a una cromatoplaca de silicagel 60 F254. Se usó como fase móvil acetato de etilo-metanol-agua (100:17:13), para la detección se usó solución etanólica de KOH al 5%.

Zonas rojas en visible y fluorescencia roja en UV 365nm, representaron la presencia de antraquinonas.

Zonas amarillas en visible y fluorescencia amarilla en UV 365nm, denota la presencia de antranas y antranolas. ⁽⁷⁷⁾ ⁽⁷⁸⁾

d. Determinación de Flavonoides por medio de la reacción con los álcalis

Se tomó en un tubo de ensayo 10 ml del extracto alcohólico, se adicionó 5 gotas de hidróxido de sodio al 10% y se observó si hay cambios de color. ⁽⁷⁷⁾ ⁽⁷⁸⁾

e. Determinación de la presencia de Agliconas Flavonoides

Se tomó una alícuota de 5ml se evaporó, el residuo se disolvió en 2ml de etanol caliente, se adicionó limaduras de Mg + 1ml de HCl concentrado. ⁽⁷⁷⁾ ⁽⁷⁸⁾

Se dejó reposar 10 minutos, una coloración roja representó la presencia de flavonoides. ⁽⁷⁷⁾ ⁽⁷⁸⁾

f. Determinación de Chalconas y Flavofenos

Se preparó 10 ml de extracto acidulado con 6 ml de HCl al 10%, los cuales se calentaron 10 minutos, una coloración inmediata representó la presencia de chalconas y la formación de polímeros insolubles de color café – rojizo, representaron la presencia de flavofenos. ⁽⁷⁷⁾⁽⁷⁸⁾

g. Prueba CCF para determinar la presencia de uno o más Flavonoides

Se aplicó con un capilar el extracto etanólico en la cromatoplaque de silicagel 60 F254, como fase móvil se utilizó acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético-agua (100:11:11:27) y para la detección se utilizó Reactivo de productos naturales (NP/PEG) y se le aplicó fluorescencia en UV a 365 nm, Fluorescencias varias representaron la presencia de flavonoides. ⁽⁷⁷⁾⁽⁷⁸⁾

h. Determinación de la presencia de Cumarinas

Se tomó una alícuota de 5ml, se evaporó, el residuo se disolvió en 1 ml de agua hirviendo, se aplicó un 2 manchas en el papel filtro, se aplicó en una de las dos manchas 1 gota de KOH 0.5M, Se observó la presencia de fluorescencia a longitud de onda de 366nm. ⁽⁷⁷⁾⁽⁷⁸⁾

i. Prueba CCF para determinar la presencia de una o más Cumarinas

Una alícuota de 10 ml se concentró hasta 1 ml, se aplicó con capilar en una cromatoplaque de silicagel 60 F254.

Se utilizó como fase móvil tolueno-acetato de etilo (93:7) y como revelador solución etanólica de KOH al 5%, donde a UV – 365nm se presenta fluorescencia azul o verde. ⁽⁷⁷⁾⁽⁷⁸⁾

j. Determinación de la presencia de Saponinas por medio del test de espuma

Se disolvió en un tubo de ensayo 1 ml del extracto etanólico con 9 ml de agua destilada, se calentó a 60°C por media hora, se procedió a agitar vigorosamente por 10 minutos. La formación de espuma estable por 30 minutos con apariencia de panal de abejas se consideró como prueba positiva. ⁽⁷⁷⁾⁽⁷⁸⁾

k. Determinación de la presencia de Saponinas por medio del test de hemólisis

Se colocó un disco de papel filtro en el medio agar sangre y se le agregó 20 μ l de extracto al disco, se dejó reposar por 24 horas, la presencia de un halo da la prueba positiva. ⁽⁷⁹⁾

l. Prueba CCF para determinar la presencia de una o más Saponinas

Se tomó una alícuota de 10 ml de extracto etanólico, se concentró hasta 5 ml y se aplicó en la cromatoplaque de silicagel 60 F254.

Se utilizó como fase móvil cloroformo-ácido acético-metanol-agua (60:32:12:8), la detección se realizó con el Reactivo de Liebermann-Bouchard: UV 365 nm donde se espera la aparición de zonas azules y verdes de saponinas esteroidales y violetas de triterpenoides. ^{(77) (78)}

m. Determinación de la presencia de taninos gálicos y catéquicos

Se tomó una alícuota de 5 ml, se le agregó 2 ml de agua caliente, se dejó enfriar y se separó en 4 tubos de ensayo (a,b,c,d). ^{(77) (78)}

Al **tubo a** con la porción de alícuota se le agregó 4-5 gotas de gelatina al 1% (p/v).

Al **tubo b** con la porción de alícuota se le agregó 4-5 gotas de solución gelatina sal.

Al **tubo c** con la porción de la alícuota se le agregó 5 gotas de FeCl_3 al 1%.

El **tubo d** se conservó como blanco.

Precipitados y cambios de color, representaron la presencia de taninos gálicos si el color es azul, y de taninos catéquicos si el color es verde.

n. Determinación de triterpenos y esteroides

Se llevó a cabo por medio de la prueba de Liebermann – Buchard: Se colocó el extracto en un tubo de ensayo y se evaporó a sequedad, se dejó enfriar y se

adicionó unas gotas de cloroformo, luego se le añadió anhídrido acético seguido de unas gotas de ácido sulfúrico.

Los cambios de coloración se interpretaron de la siguiente manera: Tonos de azul a verde (esteroles insaturados), tonos de rojo a violeta (triterpenos pentacíclicos) y amarillo pálido (esteroles y triterpenos saturados).

Otra prueba con la cual se verificó la presencia de esta familia de metabolitos es el ensayo de Salkowsky, en el cual se tomó una mínima cantidad de extracto, se mezcló con cloroformo, se dejó deslizar por las paredes del tubo, con sumo cuidado, unas gotas de ácido sulfúrico, si la solución se torna amarilla o roja se considera positiva.⁽⁸⁰⁾



CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Colecta de Especímenes Vegetales y Aislamiento de Hongos Endofíticos

Se colectaron 10 especímenes, de los cuales se separó una muestra para la identificación de la planta en el Herbarium Arequipense de la Universidad Nacional de San Agustín.

A partir de la desinfección superficial de las hojas de *Myrcianthes ferreyrae* “Arrayán” de los 10 individuos recolectados en las lomas de Atiquipa, se obtuvieron 18 hongos filamentosos endofíticos, esto concuerda con lo expresado por Zabalgogezcoa (2008) que indica que los endófitos son ubicuos en el mundo de las plantas, y que no existe ningún reporte de especie de planta que no esté asociada a ellos.⁽⁸¹⁾

Se obtuvo una frecuencia de colonización del 20%, este resultado relativamente bajo se puede deber al hecho de haber tomado de muestra hojas de edad madura, dado que según Kumaresan & Suryanarayanan (2002) el número de especies así como el número de aislados de hongos endofíticos que pueden ser recuperados de las hojas aumenta con la edad de las mismas.⁽⁸²⁾

De acuerdo con Rajagopal et al (2010) la presencia de pocos endófitos en las cinco especies de plantas medicinales que estudió, se pudo deber a la presencia de compuestos antifúngicos en la planta.⁽⁸³⁾

Además, el resultado bajo en la frecuencia de colonización puede estar relacionado a las condiciones climáticas del lugar de recolección, dado que este es un desierto, esto concuerda con lo dicho por Zabalgogezcoa (2008) en un contexto geoclimático, las asociaciones endofíticas son mayores en las zonas tropicales que en las zonas templadas o frías del mundo.

Según Arnold & Lutzoni (2007) encontraron una frecuencia de colonización por hongos endofíticos más baja de la que esperaban por la latitud en la que muestrearon en el Desierto de Sonora, el cual tiene condiciones semejantes al Desierto de Costero del Perú, en el cual se encuentran las Lomas de Atiquipa, concluyendo en su estudio realizado para comparar las comunidades endofíticas a lo largo de una gradiente latitudinal desde el Ártico Canadiense hasta la selva tropical del centro de Panamá, que aumenta la incidencia, diversidad, colonización de hospederos desde el ártico hasta la selva tropical. Según su estudio las plantas experimentan fundamentalmente diferentes entornos simbióticos en relación a su localidad biogeográfica.^{(40) (81)}

En otra investigación realizada por U'Ren et al (2012) se concluyó que la frecuencia de colonización de hongos endofíticos aumenta con aumento de precipitaciones y la duración de la temporada de crecimiento en plantas vasculares. Según los registros mensuales de temperatura media, precipitación y captación de neblina entre Febrero 2005 y Febrero 2006 de Sotomayor resalta el mes de Setiembre como el mes con mayor precipitación, 20 mm y mayor captación de neblina con 65 l/m²/día, teniendo un promedio de precipitación anual bajo, y según Vidella et al (1999) el desierto de Atacama en sí tiene un periodo de crecimiento corto, dato que se podría extrapolar al del Desierto Costero del Perú dado que ambos son parte del Desierto del Pacífico, lo cual influye en la baja frecuencia de colonización de nuestras muestras.^{(84) (85) (86)}

Al ser el lugar de recolección una “pradera de vegetación” en el medio del desierto, esta no tiene similar cantidad de vegetación a la de una selva tropical, dicho esto se tiene que recordar que según Zabalgogezcoa (2008) el tipo predominante de transmisión de endófitos es horizontalmente, esto quiere decir de individuo a individuo, por lo cual dada la poca vegetación hace que la transmisión entre individuos sea baja y por lo tanto concuerda con nuestra baja frecuencia de colonización.⁽⁸¹⁾

Los hongos endofíticos aislados fueron sembrados en medio de cultivo agar batata dextrosa (ABD). Este medio fue seleccionado ya que en numerosas investigaciones se logra un crecimiento óptimo de muchos hongos incluyendo los

endófitos, a pesar de esto según Zabalgoeazcoa (2008) esta técnica no permite aislar biotrofos obligados, u hongos que no crecen bien en este medio, como resultado el número real de especies endofíticas puede ser subestimado. Así mismo existen hongos no cultivables, cuya detección en los tejidos de plantas se realiza con otro tipo de técnicas ya desenvueltas.⁽⁸¹⁾

La descripción macroscópica de sus colonias se encuentra detallada en la Tabla N°4.1, ver las imágenes macroscópicas y microscópicas de los hongos aislados en el Anexo N°4, el 100% de estos hongos endofíticos fueron hongos estériles ya que al observar sus estructuras en el microscopio ninguno produjo estructuras reproductivas, solo se observó hifas. Según Selim *et al* (2011) los hongos de micelio estéril se pueden clasificar en 2 morfoespecies “micelio estéril blanco y micelio estéril oscuro”, en nuestro caso el 100% de los hongos aislados presentó micelio estéril blanco.⁽⁸⁷⁾

Dado que la clasificación convencional de los hongos se basa en gran medida en las estructuras reproductivas que estos producen, a estos hongos no esporulantes, de micelio estéril, no se les puede proporcionar un nombre taxonómico. Para apreciar la gran diversidad de estos micelios estériles en cultivo, se clasifican generalmente en morfotipos basados en caracteres de cultivo similares donde se diferenciaron 12 morfotipos diferentes.⁽⁸⁸⁾

Tabla N° 4.1: Descripción Macroscópica y Tipo de Crecimiento de los Hongos Endofíticos Aislados

CODIGO	DESCRIPCION MACROSCOPICA	TAMAÑO DE COLONIA A LOS 7 DIAS (cm)
I1M13	Colonia grande, de color blanco, superficie algodonosa, bordes filamentosos, el reverso es color anaranjado claro, con presencia de anillos concéntricos y con los bordes de color más claro.	6
I1M23	Colonia grande, de color blanco, superficie algodonosa, bordes filamentosos, el reverso es color anaranjado claro, con los bordes de color más claro.	7
I1M31	Colonia grande, de color blanco, superficie algodonosa, bordes filamentosos, el reverso es color anaranjado claro, con los bordes de color más claro.	6.5
I2M31	Colonia grande, de color blanco, superficie algodonosa, bordes rizoides, el reverso es color blanco uniforme.	5
I3M14F	Colonia grande cerebriforme, de color anaranjado, superficie lisa, borde definido, el reverso es de color anaranjado con la presencia de surcos.	1.2
I3M21	Colonia grande, de color blanco, superficie algodonosa, bordes filamentosos, el reverso es color anaranjado claro, con presencia de anillos concéntricos y con los bordes de color más claro.	6
I3M32	Colonia grande, de color oscuro en el centro y rojizo claro en los bordes, superficie algodonosa, bordes rizoides, el reverso es de color pardo rojizo en el centro y rosado en los bordes, el medio se coloreo de rojo.	8
I3M41	Colonia grande, de color blanco, superficie algodonosa, bordes filamentosos, el reverso es color anaranjado claro, con manchas de color verde - café.	5

Continúa en la siguiente página

I4M14	Colonia grande, de color blanco, superficie algodonosa, bordes rizoides, el reverso es color blanco uniforme.	6
I4M21	Colonia grande, de color blanco, superficie algodonosa, bordes filamentosos, el reverso es color anaranjado claro, con manchas de color verde - café.	5
I5M21	Colonia grande, de color anaranjado, cerebriforme, convexa, borde irregular, lobulado, el reverso es de color anaranjado claro, con surcos.	3
I7M21	Colonia grande, blanca, plana, algodonosa de borde filamentosos, el reverso es de color pardo rojizo con tono más claro en los bordes.	6
I7M31	Colonia grande, crema, algodonosa, borde filamentosos, con un anillo concéntrico de color café, el reverso es color claro con un anillo concéntrico color rojizo, borde de color café claro.	1.3
I8M21	Colonia grande, de color blanco, superficie algodonosa, bordes filamentosos, el reverso es color anaranjado claro, con presencia de anillos concéntricos y con los bordes de color más claro.	5
I8M41	Colonia grande, blanca, cerebriforme, con surcos, con borde lobulado y definido, el reverso es de color crema con bordes translucidos.	1.1
I9M11	Colonia grande, anaranjada, con manchas verdes, plana, algodonosa, con borde rizoide, el reverso es anaranjado con manchas cafés.	5
I10M11	Colonia grande, blanca al inicio y luego café, algodonosa, de borde rizoide, el reverso es color pardo oscuro en el centro y con el borde más claro	4
I10M21	Colonia grande, blanca, con surcos concéntricos, el centro tiene una coloración café, algodonosa, de forma redondeada, con borde filamentosos, el reverso es color café oscuro en el centro y claro en los bordes, el medio se colorea de color café claro.	2.3

4.2 Ensayo Antifúngico

Luego del proceso de cultivo de hongos aislados y extracción etanólica, se obtuvieron 18 extractos etanólicos secos de hongos endofíticos y un extracto etanólico seco de hojas de *Myrcianthes ferreyrae* “Arrayán”, el cual se obtuvo con un rendimiento de 11.3%.

Estos extractos secos fueron redisueltos en DMSO a una concentración de 20 mg/ml, además de la droga antifúngica anfotericina B, de los cuales se realizó la evaluación de la actividad antifúngica frente a *Candida albicans* ATCC 18804, con el fin de detectar el potencial antifúngico de ambos tipos de extractos, y en el caso de la anfotericina B para corroborar la CMI de esta droga frente a *Candida albicans* ATCC 18804, de manera que se pudiera usar como control positivo del ensayo. La especie vegetal fue seleccionada por ser una planta endémica de Atiquipa, además de poseer propiedades farmacológicas.

La evaluación de la actividad antifúngica se realizó contra la levadura *Candida albicans* ATCC 18804 in vitro por el método de micro dilución, tomando como referencia el método de micro dilución de la NCCLS M27-A2 para, poder hallar la CMI de los extractos problema dado por la ausencia de crecimiento fúngico en el pozo. Esta prueba ha sido ampliamente utilizada para los screenings en la búsqueda de compuestos bioactivos tanto frente a microorganismos patógenos como contra células cancerígenas.

En la actualidad la mayoría de las tesis utilizan como método el de difusión en placa ya que tiene ventajas como su simplicidad y bajo costo sin embargo el test de micro dilución tiene ventajas sobre las técnicas de difusión como la sensibilidad que tiene a cantidades pequeñas de extracto, permite distinguir entre los efectos fungicidas o fungistáticos, permite la determinación de la CMI, puede del mismo modo ser utilizado en una gran variedad de microorganismos, no es un método muy costoso sin embargo permite resultados reproducibles. Algunos estudios comparativos de la técnica de difusión en placa y del test de micro dilución, como el realizado por Scorzoni *et al*, concluyen que el método de difusión en placa no es lo suficientemente sensible a algunos extractos, ya que al evaluar 7 extractos de plantas de la familia Verbenaceae, estos mostraron actividad frente a *Candida*

krusei y *Cryptococcus neoformans* por el método de micro dilución, mientras que por el método de difusión en placa ninguno produjo halo de inhibición. ⁽⁸⁹⁾

Se procedió a la lectura de las placas de 96 pozos para hallar la CMI del extracto etanólico de hojas de *Myrcianthes ferreyrae* “Arrayán” y del estándar de Anfotericina B, donde se observa la lectura de la evaluación de la levadura *Candida albicans* ATCC 18804, se muestra el punto de corte entre las concentraciones de 0.25 ug/ml y 0.125 ug/ml, siendo que la CMI es de 0.25 ug/ml, este resultado es igual al encontrado por Heung-Shick & Younhee (2011), la presencia o ausencia de crecimiento se detalla en la Tabla N°4.2. ^(90,91)

Encuanto a la evaluación del extracto etanólico de hojas de *Myrcianthes ferreyrae* “Arrayán”, se realizaron dos placas de evaluación, en la primera placa de 96 pozos evaluada se evaluaron concentraciones desde 1000 ug/ml hasta 31.25 ug/ml, en todas las concentraciones se presentó inhibición del crecimiento de la levadura *Candida albicans* ATCC 18804 evaluada, por lo cual se realizó otra placa de microdilución con concentraciones menores, a fin de encontrar la CMI del extracto, es así que se evaluaron concentraciones desde 160 ug/ml a 0.625 ug/ml, en esta placa se encontró el punto de corte entre las concentraciones 40 ug/ml y 20 ug/ml, si se hubiera hecho solo esta placa de microdilución la CMI sería de 40 ug/ml, pero dado que en la primera placa a la concentración de 31.25 ug/ml no se evidenció crecimiento de la levadura, esta sería la CMI final, estos datos se presentan en la Tabla N° 4.2, de acuerdo con Cos et al. (2006) los extractos de plantas con valores de CMI menores a 100 ug/ml son muy prometedoras: ^{(92) (93)}

La lectura de placas de 96 pozos con los extractos de hongos endofíticos se detalla en la Tabla N° 4.3.

Tabla N° 4.3: Lectura de placa de test de microdilución de extractos etanólicos de hongos endofíticos aislados de hojas de *Myrcianthes ferreyrae* “Arrayán”

N° de extracto	Pozo 1	Pozo 2	Pozo 3	Pozo 4	Control Negativo
	200 ug/ml	100 ug/ml	50 ug/ml	25 ug/ml	
1	+	+	+	+	-
	+	+	+	+	-
2	+	+	+	+	-
	+	+	+	+	-
3	+	+	+	+	-
	+	+	+	+	-
4	+	+	+	+	-
	+	+	+	+	-
5	+	+	+	+	-
	+	+	+	+	-
6	+	+	+	+	-
	+	+	+	+	-
7	+	+	+	+	-
	+	+	+	+	-
8	+	+	+	+	-
	+	+	+	+	-
9	+	+	+	+	-
	+	+	+	+	-
10	+	+	+	+	-
	+	+	+	+	-
11	+	+	+	+	-
	+	+	+	+	-
12	+	+	+	+	-
	+	+	+	+	-
13	+	+	+	+	-
	+	+	+	+	-
14	+	+	+	+	-
	+	+	+	+	-
15	+	+	+	+	-
	+	+	+	+	-
16	+	+	+	+	-
	+	+	+	+	-
17	+	+	+	+	-
	+	+	+	+	-
18	+	+	+	+	-
	+	+	+	+	-

+ Presencia de crecimiento, - ausencia de crecimiento

Al evaluar el efecto de los extractos etanólicos de los 18 hongos endofíticos en la Tabla N° 4.3 se observó que los extractos de hongos endofíticos no presentaron actividad antifúngica ya que aún a la concentración más alta de 200 ug/ml todos los pozos presentaron crecimiento, hay que tener en cuenta que a mayores concentraciones ya no sería un extracto de interés.

Este resultado concuerda con el hecho de que el extracto etanólico de la planta *Myrcianthes hallii* “Arrayán” también presentó efecto antifúngico contra *Candida albicans* ⁽⁹⁴⁾

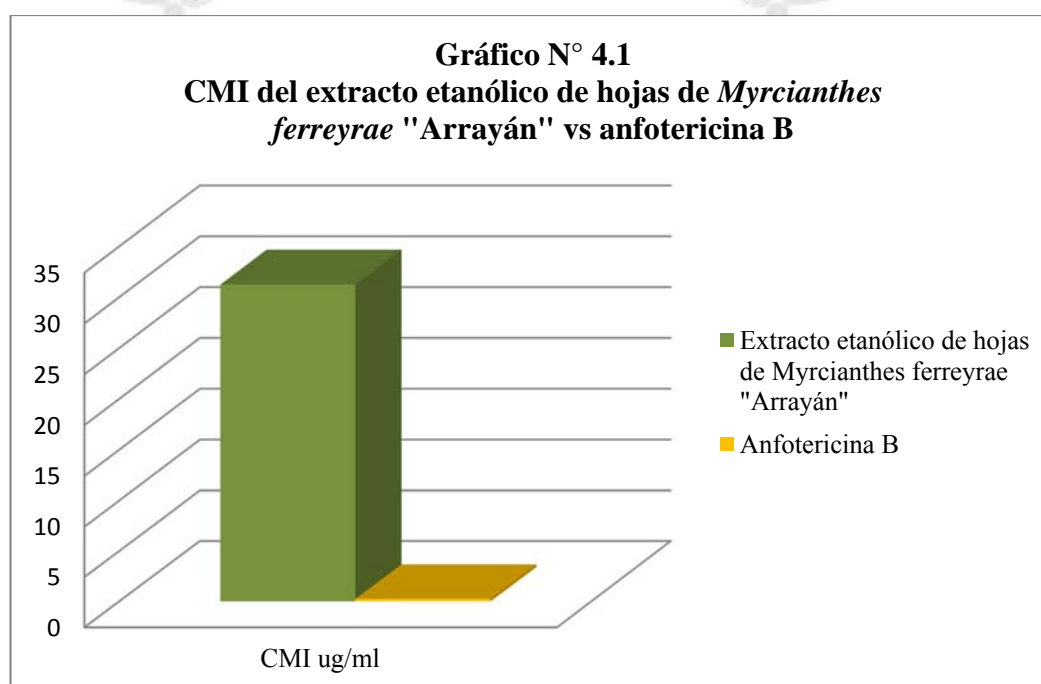
En la Tabla N° 4.4 se puede observar en resumen los resultados de la CMI obtenidos en evaluaciones de los extractos y del estándar.

Tabla N° 4.4: Resultados de Test de Microdilución en caldo de los extractos

N° de extracto	Código	CMI*
1	I1M13	N.P.
2	I1M23	N.P.
3	I1M31	N.P.
4	I2M31	N.P.
5	I3M14F	N.P.
6	I3M21	N.P.
7	I3M32	N.P.
8	I3M41	N.P.
9	I4M14	N.P.
10	I4M21	N.P.
11	I5M21	N.P.
12	I7M21	N.P.
13	I7M31	N.P.
14	I8M21	N.P.
15	I8M41	N.P.
16	I9M11	N.P.
17	I10M11	N.P.
18	I10M21	N.P.
	Planta	31.25 ug/ml
	Estandar	0.25 ug/ml

* N.P. = No presentó concentración mínima inhibitoria

Al comparar la CMI del extracto etanólico de hojas de *Myrcianthes ferreyrae* "Arrayán" de 31.25 ug/ml con el hallado para la anfotericina B de 0.25 ug/ml nos podemos dar cuenta que la droga sintética tiene una acción 125 veces más potente (Ver Gráfico N° 4.1), esto dado que la anfotericina B es una droga pura, mientras que el extracto etanólico es una mezcla de compuestos, por lo menos uno o más de ellos debe de tener la actividad antifúngica, lo cual se podría determinar con una bioautografía, de ser purificados estos compuestos solo serian de interés en caso de dar una CMI menor a 10 ug/ml.



Según Kusari, Hertweck y Spiteller (2012) es probable que los endófitos descartados expresen solo un subconjunto de sus genes biosintéticos bajo las condiciones in vitro de laboratorio, siendo aprovechada solo una pequeña parte de su potencial biosintético. ⁽⁴⁶⁾

Es incluso posible que produzcan cantidades por debajo del límite de detección de compuestos activos, muchas veces junto a un gran trasfondo metabólico.

Es posible que algunos de estos endófitos puedan producir sustancias que puedan prevenir infecciones fúngicas estimulando directamente al huésped.

Así mismo reportan que, extractos fúngicos endofíticos que indicaban baja actividad antimicrobiana podrían tener compuestos activos pero probablemente en las cantidades más pequeñas o los extractos crudos sometidos a revisión podrían producir compuestos más potentes en cuanto hubieran pasado por un poco de purificación.

También extractos que no indicaban actividad antimicrobiana en el bioensayo podrían ser activos contra otros microbios que no fueron evaluados. ⁽⁹⁵⁾

Tan y Zou creen que la razón por la cual algunos endófitos producen ciertos fitoquímicos originalmente característicos del huésped podría estar relacionada con una recombinación genética de los endófitos con el huésped que ocurre en tiempo evolutivo, esto sumado al hecho que la planta problema es comida de los animales que pastorean la zona de Atiquipa ocasiona que el tiempo que se encuentran los endófitos dentro de la planta no sea el suficiente para la realización de una recombinación genética que permita que ambos tengan los mismos compuestos bioactivos. ⁽⁵²⁾

Entonces, la presencia y producción de metabolitos secundarios podría estar relacionado directamente con el hábitat y la interacción directa con su huésped, por tal motivo no se descarta la posibilidad de que estos microorganismos puedan tener algún tipo de actividad biológica diferente a la indagada en esta investigación.

Considerándose que el extracto etanólico de *Myrcianthes ferreyrae* “Arrayán” resultó ser altamente efectivo, se puede decir que la actividad antimicrobiana presentada por éste se debe a los metabolitos secundarios arrastrados por este tipo de solvente, ya que etanol tiende a arrastrar gran cantidad de compuestos polares como taninos, flavonoides y según Villacis (2009) estos compuestos han reportado propiedades antimicrobianas, en el caso de los taninos se cree que su acción antimicrobiana se debe a su interacción sobre las adhesinas, proteínas de la pared celular, y a su capacidad de unirse a polisacáridos, y en el caso de los flavonoides su actividad sobre las bacterias probablemente se deba a su capacidad

de generar complejos con proteínas extracelulares y proteínas solubles, así como una actividad sobre la pared celular muy similar a la de las quinonas., además de que se ha reportado que provocan la muerte bacteriana, al inhibir la síntesis de la pared celular ó a su vez inhibir la síntesis de ADN o ARN, ya que la estructura plana que tienen éstos compuesto es similar a la de las bases púricas y pirimídicas, y se pueden intercalar formando puentes de hidrógeno, alterando así la estructura tridimensional de los ácidos nucleicos, así mismo según Borboa Flores (2010) los terpenos están involucrados en el rompimiento de la membrana a través de los compuestos lipofílicos, otro estudio indica que interfieren con las funciones de permeabilidad de membrana celular, para el caso de la *Candida albicans* éstos compuestos probablemente pueden actuar inhibiendo la biosíntesis de ergosterol o de otros esteroides presentes en la pared celular de la levadura, alterando su permeabilidad. Casi todos los derivados terpenicos estudiados han demostrado tener actividad contra los biofilmes de *C. albicans*, sin embargo el carvacrol, geraniol y tymol son los que tienen mayor actividad.^{(96) (97) (98) (99)}

4.3 Análisis Fitoquímico

Dado que el extracto etanólico de *Myrcianthes ferreyrae* “Arrayán” presenta efecto antifúngico “in vitro”, se consideró necesario realizar un estudio fitoquímico preliminar. Esto permitirá inferir acerca de las probables sustancias químicas presentes en la muestra de estudio.

Al extracto etanólico se le realizó pruebas fitoquímicas para identificar la presencia de metabolitos secundarios como son alcaloides, antraquinonas, cumarinas, flavonoides, saponinas, taninos y triterpenos y esteroides, utilizando para cada uno de ellos su reactivo específico que confirman su presencia.

Las técnicas utilizadas son las referidas por Sharapin N. Se utilizó cromatografía de capa fina como una técnica confirmatoria para alcaloides, antraquinonas, cumarinas, flavonoides, saponinas y terpenos.

Las pruebas generales de precipitación para alcaloides fueron: Dragendorff, y Mayer, para cumarinas la prueba de fluorescencia con KOH, para flavonoides, las pruebas generales de coloración de Shinoda e Hidróxido de sodio al 0.1N, para la identificación de saponinas el test de espuma y teste de hemolisis, , y para taninos

las pruebas de precipitación con solución de gelatina, gelatina sal y cloruro férrico, para triterpenos y esteroides las pruebas de Lieberman – Buchard y la reacción de Salkowsky, cuyos resultados se muestran en la Tabla N° 4.5.

Según la tabla, se determinó por medio de dos pruebas la ausencia de alcaloides, sin embargo en cuanto a las cumarinas dio positivo, presentando fluorescencia amarilla frente a la luz UV de 366nm, siendo *Myrcianthes ferreyrae* “Arrayán” una de las pocas especies de plantas del genero myrtaceae que contiene cumarinas.

Por medio de la reacción de Shinoda y de álcalis se determino la ausencia de flavonoides en el extracto, igualmente ocurrió con el test de espuma para saponinas, el cual dio resultado negativo.

Las pruebas realizadas para determinar la presencia de taninos dio resultados positivos, presentando un precipitado café verduzco, lo cual evidencia la presencia de taninos catéquicos, los cuales son metabolitos presentes con frecuencia en diversas plantas de la familia Myrtaceae.

La reacción de Lieberman – Buchard y de Salkowsky ambas dieron positivo evidenciando coloraciones rojizas en la interfase lo cual demuestra la presencia de sustancias de tipo esteroideal o triterpenico, de la misma forma se encontraron estos metabolitos en la planta *Psidium guineense* Sw “Choba” que pertenece a la familia Myrtaceae. ⁽¹⁰⁰⁾ ⁽¹⁰¹⁾ ⁽¹⁰²⁾

4.3.1 Determinación de Alcaloides por CCF

Se realizó corridas de cromatografía en capa fina para determinar los diferentes metabolitos secundarios.

La primera cromatografía se desarrolló para la determinación de alcaloides, se realizó con fase móvil: Tolueno:Ácido acético: Dietilamina (70:20:10), la cual se reveló con revelador Dragendorff, como se ve en la Figura N° 4.1 no se obtuvo

ninguna banda de color anaranjado marrón, lo cual indica que en el extracto etanólico de la planta no hay presencia de alcaloides⁽¹⁰³⁾

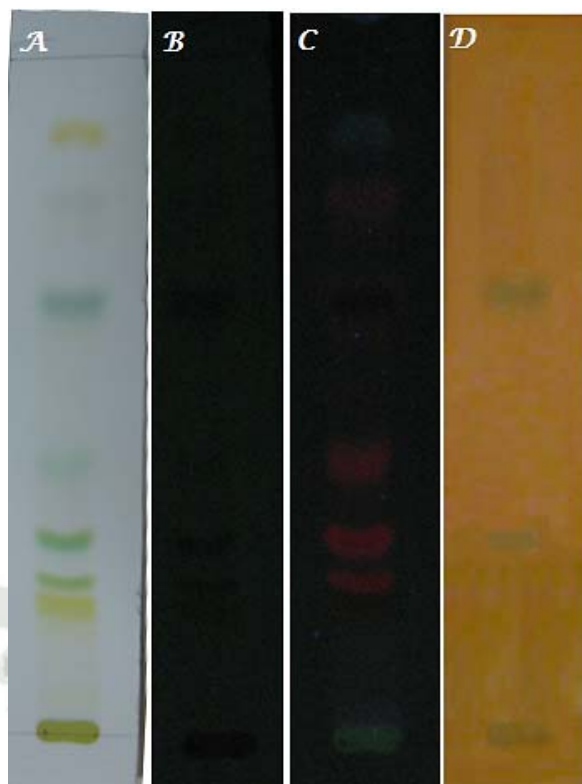


Figura N° 4.1: CCF para determinación de Alcaloides

Fase móvil: Tolueno: Ácido acético: Dietilamina (70:20:10)

Revelador: Reactivo Dragendoff

A: Placa cromatográfica al visible

B: Placa cromatográfica a luz UV 254 nm

C: Placa cromatográfica a luz UV 366nm

D: Placa cromatográfica revelada al visible

4.3.2 Determinación de Antraquinonas por CCF

Para la determinación de antraquinonas en CCF se utilizó como fase móvil: Acetato de etilo: metanol:agua (100:13.5:10) y se utilizó de revelador solución etanólica de KOH 5%, como se ve en la Figura N° 4.2 las manchas que nos interesan son 2 bandas amarillas en visible con Rf 0.24 y 0.12 respectivamente, que luego de usar el revelador y ver las manchas a UV 366nm se puede observar fluorescencia amarilla, típica de antronas o antranoles, sin embargo cabe resaltar

también que en esta corrida se observaron 2 bandas de r_f 0.77 y 0.87 respectivamente que al visible son de color verde mientras que al UV 366nm presentan fluorescencia intensa roja, lo cual nos indica que se trata de bandas de clorofila a y b.⁽¹⁰³⁾

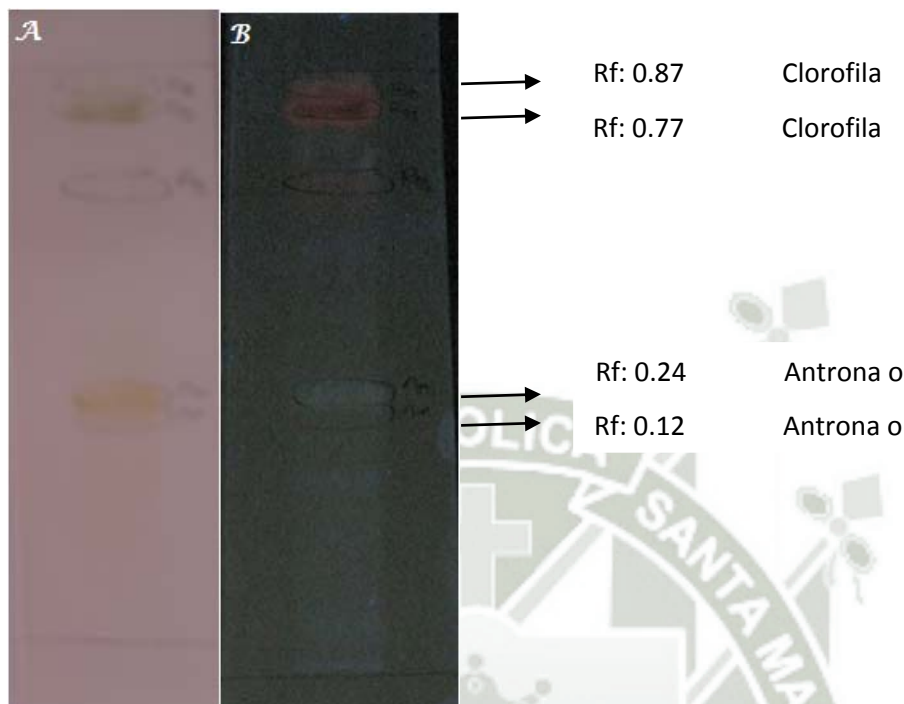


Figura N° 4.2: CCF para determinación de Antraquinonas

Fase móvil: Acetato de etilo: Metanol:Agua (100:13.5:10)

Revelador: Solución etanólica de KOH 10%

A: Placa cromatográfica revelada al visible

B: Placa cromatográfica revelada a la luz UV 366nm

4.3.3 Determinación de Cumarinas por CCF

Para la determinación de cumarinas con CCF se utilizó la fase móvil: Tolueno:éter (1:1) saturada con solución al 10% de ácido acético, y se utilizó como revelador solución etanólica de KOH 5%, luego de someter la placa a los rayos UV 366nm se concluyó que no hay presencia de cumarinas ya que ninguna de las bandas presentan color azul o verde, sin embargo las bandas presentes tienen color rojo como se puede apreciar en la Figura N° 4.3.⁽¹⁰³⁾

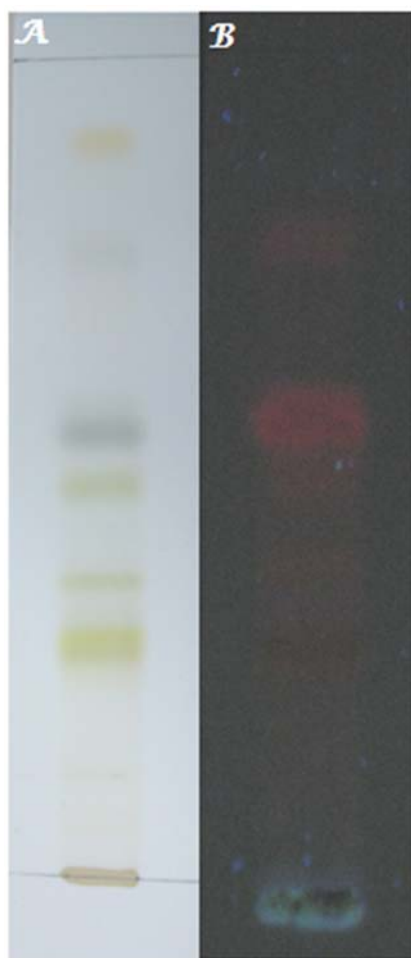


Figura N° 4.3: CCF para determinación de Cumarinas

Fase móvil: Tolueno:Eter(1:1) solución saturada con Ácido acético 10%

Revelador: Solución etanólica de KOH 5%

A: Placa cromatográfica al visible

B: Placa cromatográfica revelada a la luz UV 366nm

4.3.4 Determinación de Flavonoides por CCF

Para la determinación de flavonoides en CCF se utilizó la fase móvil : Acetato de etilo: Acido fórmico: Ácido acético:Agua (100:11:11:27) , se utilizó para su detección el reactivo de productos naturales (NP/PEG) y se realizó la identificación de los flavonoides presentes bajo la lámpara de UV 366nm como se puede apreciar en la Figura N° 4.4, comparando sus R_f y color de fluorescencia con datos de estándares corridos bajo las mismas condiciones, siendo identificadas

5 bandas con los siguientes rf: 0.47, 0.51, 0.66, 0.76, 0.85 y con fluorescencia de color: anaranjada, verde, amarilla, amarilla y roja respectivamente, es así que comparando estos datos con los datos de estándares se pudo identificar la presencia de rutina, ácido clorogénico, hiperósido, vitexina y quercitina. ⁽¹⁰³⁾⁽¹⁰⁴⁾

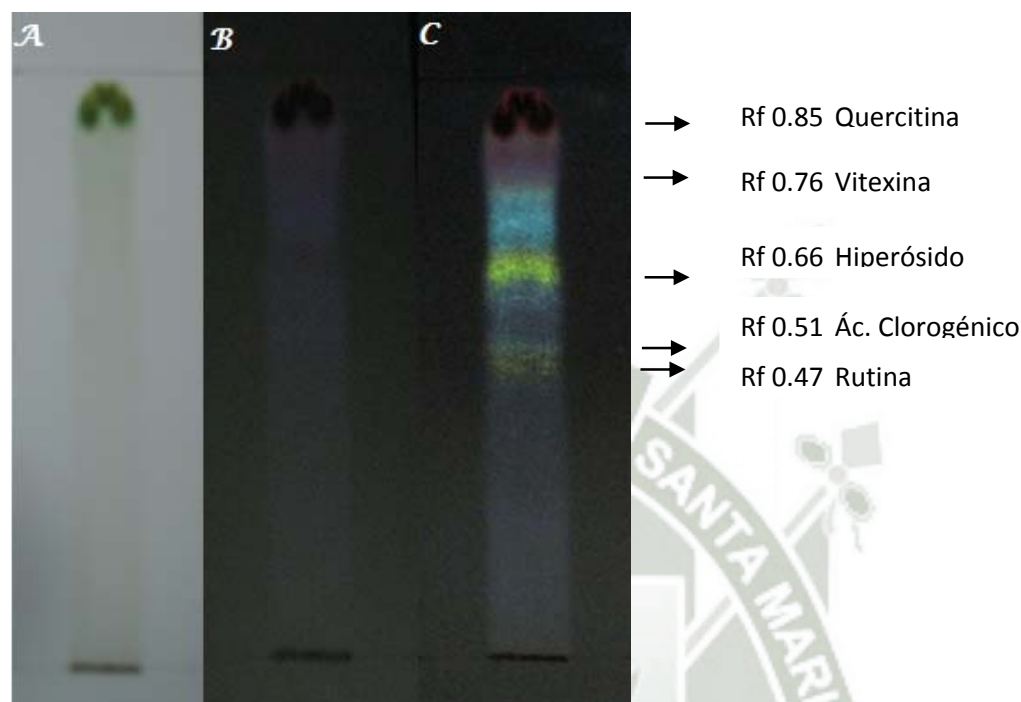


Figura N° 4.4: CCF para determinación de Flavonoides

**Fase móvil: Acetato de etilo:Ácido fórmico: Ácido acético:Agua
(100:11:11:27)**

Revelador: Reactivo de productos naturales (NP/PEG)

A: Placa cromatográfica al visible

B: Placa cromatográfica a la luz UV 366nm

C: Placa cromatográfica revelada a la luz UV 366nm

4.3.5 Determinación de Saponinas por CCF

Para la determinación de saponinas por CCF se utilizó la fase móvil: Cloroformo:Ácido acético:metanol:agua (64:34:12:8) y se utilizó como revelador el reactivo Lieberman –Bouchar, se detectaron en visible 8 bandas con colores amarillo pálido, amarillo oscuro, marrón y morado como se puede apreciar en la Figura N° 4.5, dado que el test de hemolisis y el test de espuma fueron negativos se puede concluir que las bandas de color morado en la placa de sílica gel se deben a triterpenos libres, diterpenos, esteroides o sustancias policíclicas relacionadas

presentes, y las manchas amarillas se deben a esteroides o triterpenos saturados, este resultado es conforme a su vez con el resultado positivo a la presencia de triterpenos y esteroides en las pruebas fitoquímicas (Ver Anexo 5).⁽⁷⁸⁾

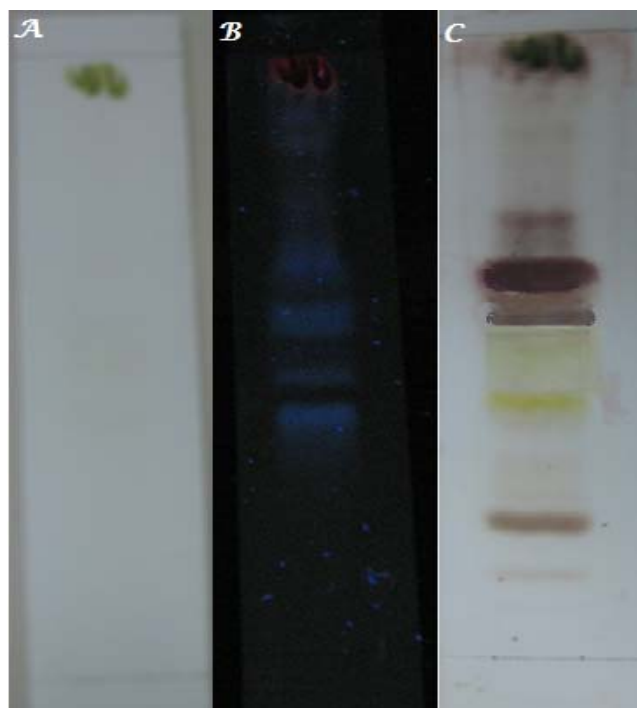


Figura N° 4.5: CCF para determinación de Saponinas

Fase móvil: Cloroformo: Ácido acético: Metanol:Agua (64:34:12:8)

Revelador: Reactivo Lieberman-Bouchardat.

A: Placa cromatográfica al visible.

B: Placa cromatográfica a la luz UV 366nm.

C: Placa cromatográfica revelada, al visible.

4.3.6 Determinación de Terpenos por CCF

Para la determinación de terpenos por CCF se utilizó la fase móvil: Tolueno: acetato de etilo (93:7), y se reveló la placa con vainillina sulfúrica, evidenciándose 11 bandas con colores amarillo, verde, azul y morado al visible como se puede apreciar en la Figura N° 4.6, de las cuales se pudieron identificar 3 en base a sus r_f y coloración en comparación con estándares, siendo las bandas de r_f 0.22, 0.32, 0.38 identificadas como geraniol, linalol, y cineol.

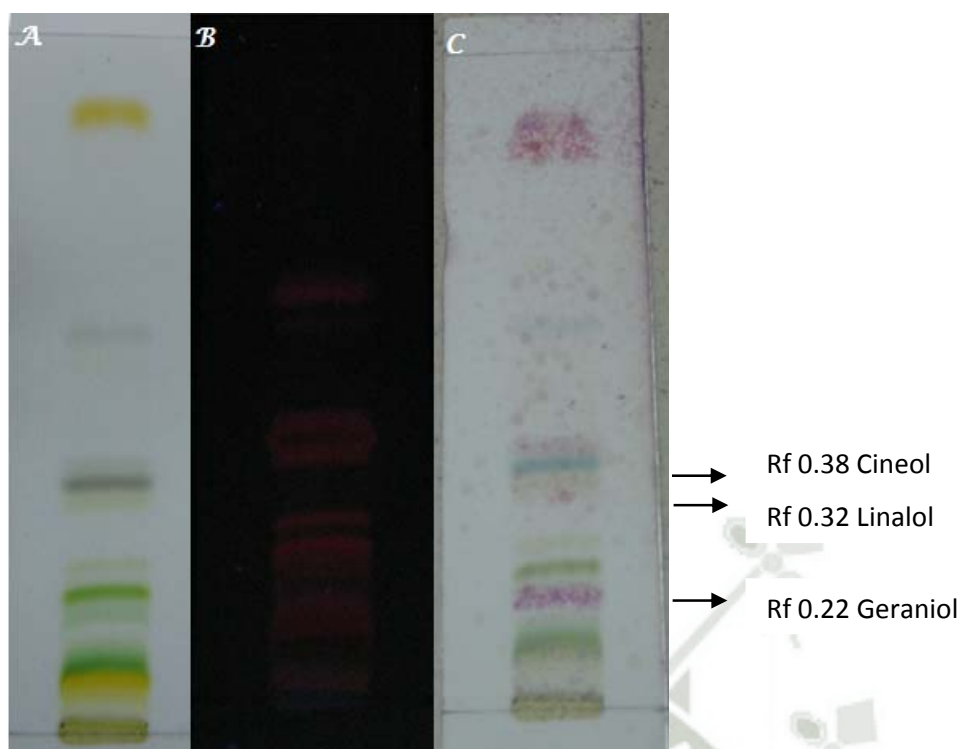


Figura N° 4.6: CCF para determinación de Terpenos

Fase móvil: Tolueno: Acetato de etilo (93:7)

Revelador: Solución de Vainillina sulfúrica

A: Placa cromatográfica al visible

B: Placa cromatográfica a la luz UV 366nm

C: Placa cromatográfica revelada, al visible.

La familia *Myrtaceae* se caracteriza por tener hojas las cuales contienen terpenoides aromáticos y sustancias polifenólicas. ^{(61) (103)}

Plantas del género *Myrtaceae* como por ejemplo *Melaleuca alternifolia*, *Melaleuca cayuputi*, *Melaleuca quinquenervia*, *Eucalyptus globulus*, *Plinia edulis* (Vell.) contienen cineol, mientras que el *Myrtus communis* contiene tanto cineol como linalol. ^{(105) (106)}

Además la actividad antifúngica que obtuvo el extracto etanólico de *Myrcianthes ferreyrae* "Arrayán" se puede deber a la presencia de cineol y geraniol en el extracto, ya que estos componentes tienen actividad contra *C. albicans* comprobada. ⁽⁹⁹⁾

CONCLUSIONES

- Se colectaron hojas de 10 individuos de *Myrcianthes ferreyrae* “Arrayán”, en las lomas de Atiquipa, provincia Caravelí, departamento Arequipa, de los cuales se aislaron 18 hongos endofíticos filamentosos, obteniendo una frecuencia de colonización de 20%.
- Se preparó el extracto etanólico de hojas de *Myrcianthes ferreyrae* “Arrayán” y se realizó el test de microdilución con el cual se obtuvo una CMI de 31.25 ug/ml.
- Se preparó 18 extractos etanólicos de los hongos endofíticos aislados de las hojas de *Myrcianthes ferreyrae* “Arrayán” y se realizó el test de actividad antifúngica por medio de la microdilución, resultando que ninguno de los extractos inhibió el crecimiento de la levadura *Candida albicans* ATCC 18804 a la concentración máxima de 200 ug/ml.
- En base a los test de actividad antifúngica se concluye que las hojas de *Myrcianthes ferreyrae* “Arrayán” tienen actividad antifúngica con una CMI de 31.25 ug/ml frente a *Candida albicans* ATCC 18804, y además que los hongos endofíticos aislados de las mismas no producen los metabolitos antifúngicos que contiene la planta evaluada.
- Los metabolitos secundarios responsables de la actividad antifúngica del extracto de hojas de *Myrcianthes ferreyrae* “Arrayán” pueden ser antronas o antranoles, flavonoides como la rutina, ácido clorogénico, hiperósido, vitexina y terpenos como el geraniol, linalol, y cineol, todos estos encontrados en el extracto etanólico de la planta por CCF.

RECOMENDACIONES

- Aplicar el método de microdilución para determinar la CMI en plantas con actividad comprobada por el método de difusión en placa, además de seguir realizando screenings con plantas endémicas medicinales.
- Realizar el método de microdilución con diferentes extractos de la planta *Myrcianthes ferreyrae* “Arrayán” y de sus hongos endofíticos con una gama más amplia de microorganismos, en la búsqueda de mayores aplicaciones para los mismos.
- Realizar una bioautografía para poder identificar los metabolitos activos del extracto etanólico de las hojas de *Myrcianthes ferreyrae* “Arrayán”.
- Preparar una forma farmacéutica en base al extracto etanólico de hojas de *Myrcianthes ferreyrae* “Arrayán” para los problemas de infecciones por *Candida albicans*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Karkowska-Kuleta J, Rapala-Kozik M, Kozik A. Fungi pathogenic to humans: Molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta biochimica polonica*. 2009; 56(2): p. 211-224.
2. Mavor A, Thewes S, Hube B. Systemic fungal infections caused by *Candida* species: Epidemiology, infection process and virulence attributes. *Current drug targets*. 2005; 6(8): p. 863-874.
3. Brown A, Odds F, Gow N. Infection-related gene expression in *Candida albicans*. *Current opinion in microbiology*. 2007;(10): p. 307-310.
4. Ernst J. Transcription factors in *Candida albicans*-environmental control of morphogenesis. *Microbiology*. 2000; 146(8): p. 1763.
5. Ghannoum M, Rice L. Antifungal agents: Mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clinical microbiology reviews*. 1999; 12(4): p. 501-517.
6. Molero G, Diez-Orejas R, Navarro-Garcia F, Monteoliva L, Pla J, Gil C, et al. *Candida albicans*: Genetics, dimorphism and pathogenicity. *Internat microbiol*. 1998; 1: p. 95-106.
7. Biswas S, Van Dijck P, Datta A. Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphophatogenic determinants of *Candida albicans*. *Microbiology and molecular biology reviews*. 2007; 71(2): p. 348-376.
8. Pardi G, Cardozo E. Algunas consideraciones sobre *Candida albicans* como agente etiológico de candidiasis bucal. *Acta odontol venez*. 2002; 40(1): p. 9-17.
9. Ponton J, Moragues M, Gene J, Guarro J, Quindos G. Hongos y actinomicetos alérgicos. *Revista iberoamericana de micología*. 2002;; p. 25-27.
10. Cárdenas C. Levaduras del género *Candida* de procedencia clínica. Evaluación de métodos de identificación. Tesis doctoral. Universidad de la Laguna; 2000.
11. Uwamahoro N, Traven A. Yeast, filament and biofilms in pathogenesis of *Candida albicans*. *Australian biochemistry*. 2010; 41(1): p. 16-18.
12. Berman J, Sudbery P. *Candida albicans*: A molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nat Rev Genet*. 2002; 3(12): p. 918-930.
13. Kutzmann C, Fell J. *The yeast-a taxonomic study*. Cuarta edición ed. publishers Es, editor. Amsterdam; 1998.

14. Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schrenckenberger P, et al. Koneman diagnóstico microbiológico. sexta edición ed. Argentina: Editorial médica panorama; 2008.
15. Giusiano GE, Mangiaterra ML. Diferenciación e identificación presuntiva rápida de levaduras con el medio CHROM-agar Candida. Revista Argentina de Microbiología. 1998; 30: p. 100-103.
16. Babic M, Hukic M. Candida albicans and non-albicans species as etiological agent of vaginitis in pregnant and non-pregnant women. Bosnian journal of basical medical sciences. 2010; 10(1): p. 89-97.
17. Alexopoulos C, Mins C. Introducción a la micología Barcelona: Omega; 1985.
18. Mohandas V, Ballal M. Distribution of candida species in different clinical samples and their virulence: Biofilm formation, proteinase and phospholipase production. A study on hospitalized patients in Southern India. J Glob Infect Dis. 2011; 3(1): p. 4-8.
19. Thompson D, Carlisle P, Kadosh D. Coevolution of morphology and virulence in Candida species. Eukariotic cell. 2011; 10(9): p. 1173-1182.
20. Treagan L. Candida and its role in opportunistic mycoses. California association for medical laboratory technology. 2011;: p. 1-19.
21. Aguirre J. Candidiasis orales. Revista Iberoamericana de Micología. 2002;(19): p. 17-21.
22. Panizo M, Reviakina V. Candida albicans y su efecto patógeno sobre las mucosas. Rev Soc Ven Microbiol. 2001; 21(2): p. 38-45.
23. Mendoza M. Importancia de la identificación de levaduras. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. 2005; 25.
24. Pore V, Deshpande S, Aher N. Antifungal agents. Expert Opin Ther Patents. 2010; 20(1): p. 137-143.
25. Russell L. Current concepts in antifungal pharmacology. Clin Proc. 2011; 86(8): p. 805-817.
26. Allevato M, Negróni R. Antifúngicos: Ayer, hoy y mañana. Acta terapéutica dermatológica. 2007; 30(8): p. 8-19.
27. Gregori Valdes BS. Estructura y actividad de los antifúngicos. Revista Cubana de Farmacología. 2005; 39(2).

28. Bes D, Sbema N, Rosanova M. Ventajas y desventajas de los distintos tipos de anfotericina en pediatría: Revisión de bibliografía. Arch Argent Pediatr. 2012; 110(1): p. 46-51.
29. Thompson M. Antifúngicos. Rev chil infectol. 2002; 19(1).
30. Romero M, Canton E, Peman J, Gobemado M. Antifúngicos inhibidores de la síntesis del glucano. Revista española de quimioterapia. 2005; 18(4): p. 281-299.
31. Vicente M, Basilio A, Cabello A, Pelaez F. Microbial natural products as a source of antifungals. Clin Microbiol Infect. ; 9(1): p. 15-32.
32. La Fleur M. Candida albicans: Biofilms, heterogeneity and antifungal drug tolerance. The open mycology journal. 2011;(5): p. 21-28.
33. Rosa L, Vaz A, Caligiorne R, Campolina S, Rosa C. Endophytic fungi associated with the Antarctic Grass *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae). Polar biol. 2009; 32(2): p. 161-167.
34. Rodriguez R, White J, Arnold A, Redman R. Fungal endophytes: Diversity and functional roles. New phytologist. 2009; 182: p. 314-330.
35. Schulz B, Boyle C. The endophytic continuum. Mycological research. 2005; 109: p. 661-686.
36. Ahmed M, Abedel-Azeem. The history, fungal diversity, conservation, and future perspectives for micology in Egypt. IMA Fungus. 2010; 1(2): p. 123-142.
37. Blackwell M. The fungi: 1, 2, 3, 5.1 million species? Am J Bot. 2011; 98(3): p. 426-438.
38. Hawksworth D. Global species number of fungi. Are tropical studies and molecular approaches contributing to a more robust estimate? Biodivers Conserv. 2012;(21): p. 2425-2433.
39. Hawksworth D. The magnitude of fungal diversity: 1.5 million species estimated revisited. Mycology research. 2001; 105(12): p. 1422-1432.
40. Arnold A, Lutzoni F. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: Are tropical leaves biodiversity hotspots? Ecology. 2007; 88(3): p. 541-549.
41. Global biodiversity information facility. [Online]. [cited 2012 Diciembre]. Available from: <http://data.gbi.org/species/browse/taxon/114231045>.

42. Stone J, White J, Polishook J. Endophytic fungi. In *Measuring and monitoring biodiversity of fungi*. Boston, MA: Elsevier academic press; 2004. p. 241-270.
43. Bashyal B, Burns A, Liu M, Paranagama P, Seliga C, Turbyville T, et al. Discovery of small molecule bioactive from endophytic fungi of the Sonoran Desert. In Popay A, Thom E. *Proceedings of the 6th international symposium of fungal endophytes of grasses*. Christchurch; 2006. p. 211-214.
44. Flewelling A, Johnson J, Gray C. Bioactive natural products from North atlantic algal endophytes. In *Maritime natural products research conference*; 2011; Saint John. p. 6-7.
45. Baby J, Mini Priya R. Bioactive compounds from endophytes and their potential in pharmaceutical effect: A review. *American journal of biochemistry and molecular biology*. 2011; 1(3): p. 291-309.
46. Kusari S, Hertweck C, Spiteller M. Chemical ecology of endophytic fungi: Origins of secondary metabolites. *Chem Biol*. 2012; 19(7): p. 792-798.
47. Strobel G, Daysi B. Bioprospecting of microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and molecular biology reviews*. 2003; 63: p. 491-502.
48. Strobel G, Ford E, Worapong J, Grant D, Fung P, al e. Isopestacin and isobenzofuranone from *pestalopsis microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities. *Phytochemistry*. 2002; 60: p. 179-183.
49. Maheshwari R. What is an endophytic fungus? *Current science*. 2006 Mayo; 90(10).
50. Jalgaonwala R, BV M, Mahajan R. A review: Natural products from plant associated endophytic fungi. *Journal of microbiology and biotechnology research*. 2011; 1(2): p. 21-32.
51. Mahendra R, Aniket G, Dnyaneshwar R, Mudasir D, Varma A. Review: Mycoendophytes in medicinal plants: Diversity and bioactivities. *Nusantara Bioscience*. 2012; 4(2): p. 86-96.
52. Sun J, Guo L, Zang W, Ping W, Chi D. Diversity and ecological distribution of endophytic fungi associated with medicinal plants. *Sci China C Life Sci*. 2008; 51(8): p. 751-759.
53. Suyanarayanan T, Thirunavukkarasu N, Govindarajulu M. Fungal endophytes and bioprospecting. *Fungal Biology reviews*. 2009; 23((1-2)): p. 9-19.

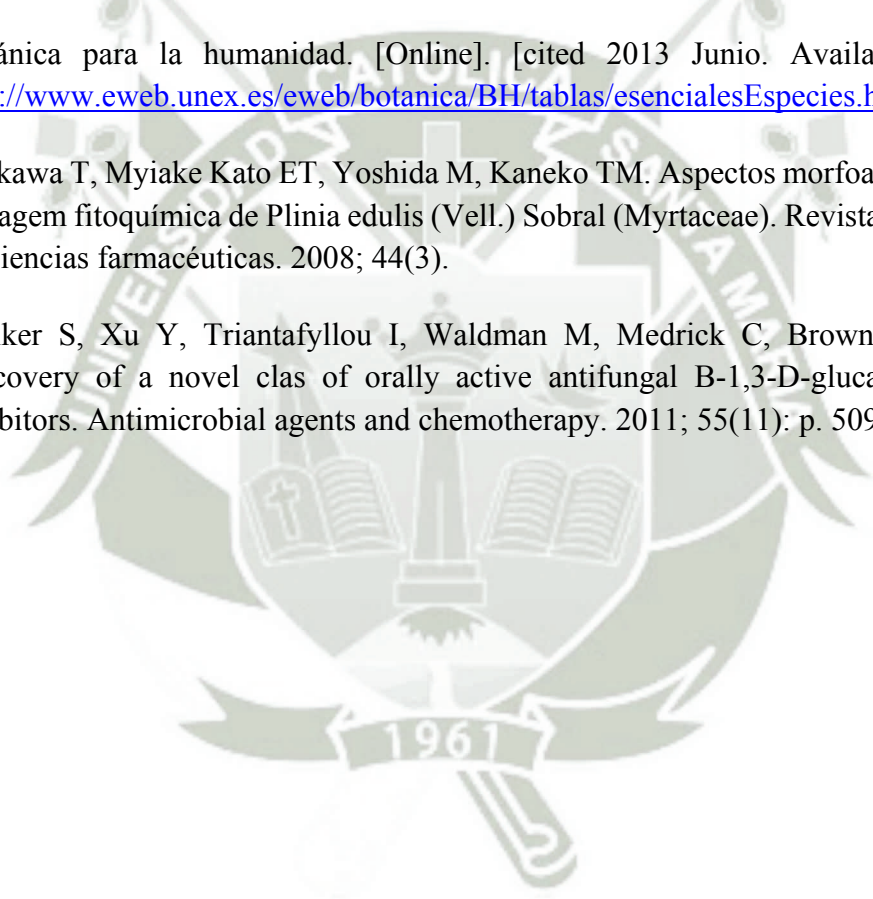
54. Strobel G, Daysi B, Castillo U, J H. Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of natural products*. 2004; 67: p. 257-268.
55. Bascom - Slack C, Ma C, Moore E, Babbs B, Fess K, Greene J, et al. Multiple novel biologically active endophytic actinomycetes isolated from ipper Amazonian rainforest. *Microbial ecology*. 2009; 58(2): p. 374-383.
56. Ge H, Yu Z, Zhang J, Wu J, Tan R. Bioactive alkaloids from endophytic *Aspergillus fumigatus*. *Journal of natural products*. 2009; 72(4): p. 753-755.
57. Zhao J, Zhou L, Wang J, Shan T, Zhong L, Liu X, et al. Endophytic fungi for producing bioactive compounds originally from their host plants. *Current research technology and education topis in applied microbiology and microbial biotechnology*. 2010; 2(1): p. 567-576.
58. Zhang B, Salituro G, Szalkowski D, Zhihua L, Zhang Y, Royo I, et al. Discovery of a small molecule insulin mimetic with antidiabetic activity in mice. *Science*. 1999; 284(5416): p. 974-981.
59. Allerslev Reynertson K. Phytochemical analysis of bioactive constituents from edible myrtaceae fruits. Tesis Doctoral. New York: University of New York; 2007.
60. McVaugh R. Myrtaceae. In *Flora of Peru*. Chicago: Field museum of natural history; 1958. p. 569-818.
61. Landrum L. The myrtle family (myrtaceae) in Chile. *Proceedings of the California academy of sciences*. 1988; 45(12): p. 277-317.
62. Brako L, Zaruchi J. Catalogue of the flowering plants and gymnosperms in Perú. In *Monographs in systematic botany*. St Louis; 1993.
63. Kawasaki L, Holst B. Myrtaceae endémicas del Perú. *Rev Peru Biol*. 2006; 13(2): p. 463-468.
64. Mello de Cruz A, Coelho M. Uso medicinal de especies das familias Myrtaceae e Melastomataceae. *Floresta e ambiente*. 2004; 11(1): p. 47-52.
65. Picardo P. Estudio de la estructura vegetacional y del uso etnomedicinal de las plantas en las Lomas de Atiquipa. Tesis de grado. Arequipa: Universidad Nacional de San Agustín, Departamento de Biología; 2005.
66. Sanchez-Vindas P, Holst B, Pool A. *Tropicos*. [Online].; 1789 [cited 2013 Mayo]. Available from: <http://www.tropicos.org/name/42000198?projectid=7>.

67. Dillon MO, Leiva González S, Zapata Cruz M, Lezama Asencio P, Quipuscoa Silvestre V. Catálogo florístico de las Lomas peruanas. *Arnaldoa*. 2011; 18(1): p. 7-32.
68. Montanari jr I. [Online].; 2002 [cited 2013 Mayo 15. Available from: <http://cpqba.unicamp.br/plmed/index.html>.
69. Lourenco M. Biotecnologia de plantas medicinais: Produção de biomoléculas. *Biologico*. 2003; 65(1): p. 63-65.
70. De la Cruz I, Gonzalez A. Biotecnología aplicada a la producción de metabolitos secundarios. *Revista de ciencias UNICACH*. 2009; 3(2): p. 59-65.
71. Croteau R, Kutchan T, N L. Natural products (Secondary metabolites). In Buchanan B, Gruissem W, Jones R, editors. *Biochemistry and molecular biology of plants*. Rockville, MD: American society of plant biologist; 2000. p. 1250-1318.
72. Agostini - Costa T, Vieira R, Bizzo H, Silveira D, Gimenes M. InTech. [Online].; 2012 [cited 2013 06 15. Available from: <http://www.intechopen.com/book/chromatography-and-its-applications/secondary-metabolites>.
73. Mazid M, Khan T, Mohammad F. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biology and medicine*. 2011; 3(2): p. 232-249.
74. Angelo P, Jorge N. Compostos fenólicos em alimentos - uma breve revisao. *Revista do instituto Adolfo Lutz*. 2007; 66(1): p. 1-9.
75. Arnold A, Maynard Z, Gilbert G. Fungal endophytes in dicotyledoneous neotropical trees: Patterns of abundance and diversity. *Mycol. Res*. 2001; 105(12): p. 1502-1507.
76. NCCLS. Método de referencia para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade antifúngica das leveduras. Segunda edición ed. Wayne, Pennsylvania; 2002.
77. Santizo Rodas IM. Identificación de familias de metabolitos secundarios de *Myrica cerifera*. Tesis de grado. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de ciencias químicas y farmacia; 2004.
78. Sharapin N. Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos Santafé de Bogotá: Convenio Andres Bello; 2000.

79. Lopez L, Farinas M, Amaro M. Evaluación de la actividad hemaglutinante y hemolítica de las esponjas marinas *Niphates erecta* (Ducharraing y Michelotti, 1864) y *Callyspongia vaginalis* (Lamarck, 1814). *Saber*. 2011; 23(2): p. 113-119.
80. Marín Jiménez KDC. Estudio fitoquímico de *Vismia cayennensis* y su posible actividad biológica. Tesis de grado. Cumaná: Universidad de Oriente, Química; 2009.
81. Zabalgoeazcoa. Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens. *Spanish journal of agricultural research*. 2008; 6: p. 138-146.
82. Kumaresan V, Suryanarayanan T. Endophytes assemblages in young, mature and senescent leaves of *Rhizophora apiculata*: Evidence for the role of endophytes in mangrove litter degradation. *Fungal diversity*. 2002;(9): p. 81-91.
83. Rajagopal K, Kalavathy S, Kokila S, Karthikeyan S, Kathiravan G, Prasad R, et al. Diversity of fungal endophytes in few medicinal herbs of South India. *Asian J. Exp. Biol. Sci*. 2010; 1(2): p. 415-418.
84. Sotomayor D, Jimenez P. Condiciones meteorológicas y dinámica vegetal del ecosistema costero Lomas de Atiquipa (Caravelí - Arequipa) en el sur del Perú. *Ecología aplicada*. 2008; 7((1-2)): p. 1-8.
85. Vidiella P, Armesto J, Gutierrez J. vegetation changes and sequential flowering after rain in the southern Atacama Desert. *Journal of arid environments*. 1999; 43: p. 449-458.
86. U'Ren JM, Lutzoni F, Miadlikowska J, Laetsch AD, Arnold AE. Host and geographic structure of endophytic and endolichenic fungi at a continental scale. *American journal of botany*. 2012; 99(5): p. 898-914.
87. Selim K, El-Beih A, AbdEl-Rahman T, El-Diwany A. *Mycosphere*. [Online].; 2011 [cited 2013 Mayo. Available from: http://mycosphere.org/pdfs/MC2_6_No7.pdf.
88. Wang Y, Guo L, Hyde K. Taxonomic placement of sterile morphotypes of endophytic fungi from *Pinus tabulaeformis* (Pinaceae) in northeast China based on rDNA sequences. *Fungal diversity*. 2005; 20: p. 235-260.
89. Scorzoni L, Benaducci T, Almeida A, DHS S, Bolzani V, Mendes - Gianini M. Comparative study of disk diffusion and microdilution methods for evaluation of antifungal activity of natural compounds against medical yeasts *Candida* spp and *Cryptococcus* sp. *Revista de Ciencias Farmaceuticas Básica y Aplicada*. 2007; 28(1).

90. Heung-Shick L, Younhee K. Anticandidal effect of *Polygonum cuspidatum* on *Candida albicans* biofilm formation. *Korean journal oriental physiology & pathology*. 2011; 26(1): p. 74-80.
91. Ncube N, Afolayan A, Okoh A. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. *African Journal of Biotechnology*. 2008 Junio; 7(12).
92. Cos P, Vlietinck AJ, Van der Bergue D, Maes L. Anti infective potential of natural products: How to develop a stronger "in vitro" proof-of-concept. *Journal of ethnopharmacology*. 2006;(106): p. 290-302.
93. Ríos J, Recio M. Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005; 100: p. 80-84.
94. Gomez C. Evaluación de la actividad antibacteriana y antimicótica de los extractos de *Myrcianthes hallii* (Arrayán), *Amaranthus asplundi* (Ataco), *Peperomia peltigera* (Pataku yuyo), especies reportadas en Peguche-imbabura causantes de enfermedades bucofaringeas. Tesis de grado. Sangolqui: Escuela politécnica del ejercito; 2010.
95. Radu S, Yokekqueen C. Preliminary screening of endophyte fungi from medicinal plants in Malaysia from antimicrobial and antitumoral activity. *Malaysial journal of medical sciences*. 2002; 9(2): p. 23-33.
96. Borboa-Flores J, Rueda-Puente O, Acedo-Félix E, Ponce JF, Cruz-Villegas M, García-Hernández JL, et al. Evaluación de la actividad antibacteriana in vitro de aceites esenciales contra *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis*. *Tropical and subtropical agroecosystems*. 2010; 12: p. 534-547.
97. Lambert RJW, Skadamis PN, Coote PJ, Nychas GJ. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of applied microbiology*. 2001; 91(3): p. 453-462.
98. Araújo Díaz J, Salas Asencios R. Del Alba. [Online].; 2008 [cited 2013 Mayo]. Available from: <http://www.apicoladelalba.cl/actividad-antimicrobiana-de-plantas-sci/>.
99. Bink A, Pellens K, Cammue B, Thevissen K. Anti-biofilm strategies: How to eradicate *Candida* biofilms? *The open mycology journal*. 2011; 5: p. 29-38.
100. Neyra Gonzalez AM, Ramirez Gonzalez MB, Sanchez Pinto NL. Estudio fitoquímico y actividad antibacterial de *Psidium guineense* Sw (Choba) frente a *Streptococcus mutans*, agente causal de caries dental. *Rev Cubana Plant Med*. 2005 Diciembre; 10: p. 3-4.

101. Peña Rodriguez C. Caracterización y estudio de la reactividad de extractos tánicos condensados e hidrolizables. Análisis de las propiedades fisico-químicas y mecánicas de resinas fenólicas de tipo novolaca modificada en dichos extractos. Tesis doctoral. Universidad de País Vasco; 2007.
102. Cannas A. Animal science Cornell University. [Online]. [cited 2013 Marzo. Available from: <http://www.ansci.cornell.edu/plants/toxicagents/tannin.html>.
103. Wagner H, Bladt S. Plant drug analysis. A thin layer chromatography atlas. Segunda edicion ed. New York: Springer; 2001.
104. Kaya B, Menemen Y, Saltan FZ. Flavonoids in the endemic species of alchemilla L., (section alchemilla L. Subsection calycanthum rothm. Ser. elatae rothm.) From north-east black sea region in Turkey. Pak. J. Bot. 2012; 44(2): p. 595-597.
105. Botánica para la humanidad. [Online]. [cited 2013 Junio. Available from: <http://www.eweb.unex.es/eweb/botanica/BH/tablas/esencialesEspecies.htm>.
106. Ishikawa T, Myiake Kato ET, Yoshida M, Kaneko TM. Aspectos morfoanatómicos e triagem fitoquímica de *Plinia edulis* (Vell.) Sobral (Myrtaceae). Revista brasileira de ciencias farmacéuticas. 2008; 44(3).
107. Walker S, Xu Y, Triantafyllou I, Waldman M, Medrick C, Brown B, et al. Discovery of a novel clas of orally active antifungal B-1,3-D-glucansynthase inhibitors. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2011; 55(11): p. 5099-5106.



ANEXOS

ANEXO N° 1

Preparación de Reactivos

- **Reactivo de Anisaldehído sulfúrico**

Mezclar 0.5 ml de anisaldehído con 10 ml de ácido acético, seguido de 85 ml de metanol y 5 ml de ácido sulfúrico concentrado, en ese orden.

- **Reactivo de Cloruro Férrico 1 %**

Pesar 1 g de cloruro férrico, y disolverlo en 100 ml de agua.

- **Reactivo de Dragendorff**

Solución A: Pesar 0.85 g de nitrato de bismuto, diluirlo en 10 ml de ácido acético.

Solución B: Pesar 8 g de KI y diluirlo en agua.

Mezclar 25 ml de solución A y 25 ml de solución B en 100 ml de ácido acético glacial, aforar a 500 ml con agua, es estable en un recipiente oscuro y refrigerado por 6 meses.

- **Reactivo de KOH 5%**

Pesar 5 g de KOH, y disolverlo en 100 ml de etanol .

- **Reactivo de Lieberman –Buchard**

Mezclar 5 ml de anhídrido acético con 5 ml de cloroformo, enfriar a 0°C. Luego agregar 1 a 2 gotas de ácido sulfúrico, el reactivo es estable durante 1 día.

- **Reactivo de Mayer**

Solución A: Disolver 1.36 g de HgCl₂ en 60 ml de agua.

Solución B: Disolver 5 g de KI en 20 ml de agua.

Mezclar las dos soluciones y aforar a 100 ml.

- **Reactivo de Productos Naturales**

Solución A: solución metanólica al 1% de

Solución B: solución etanólica de poletilenglicol 4000,

Rociar la placa de CCF con la solución A, y luego con la solución B.

- **Reactivo de Vainillina Sulfúrica**

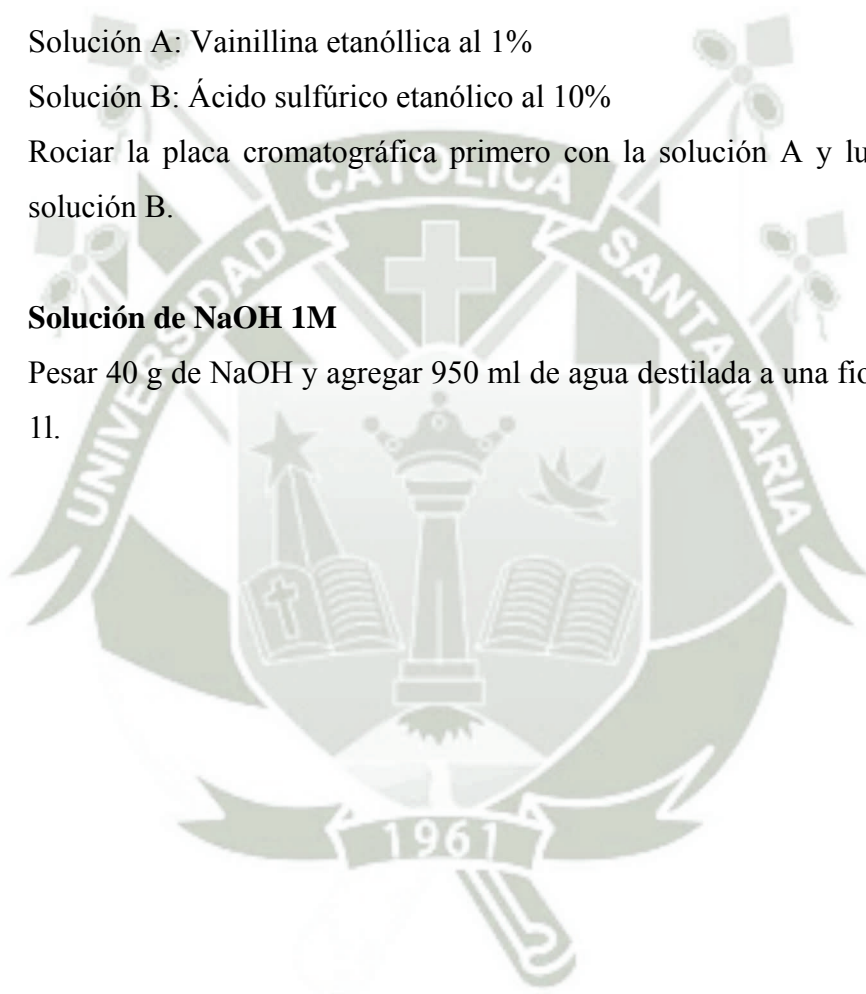
Solución A: Vainillina etanólica al 1%

Solución B: Ácido sulfúrico etanólico al 10%

Rociar la placa cromatográfica primero con la solución A y luego con la solución B.

- **Solución de NaOH 1M**

Pesar 40 g de NaOH y agregar 950 ml de agua destilada a una fiola, aforar a 1l.



ANEXO N°2

Medio de Cultivo

- Agar Base Sangre

Fundamento

Medio para propósitos generales, con la adición de sangre, el medio es útil para el aislamiento de microorganismos aerobios y anaerobios nutricionalmente exigentes a partir de una gran variedad de muestras, como para la observación de reacciones de hemólisis.

La infusión de músculo corazón y la peptona, otorgan al medio un alto valor nutritivo, que permite el crecimiento de una gran variedad de microorganismos, aun aquellos nutricionalmente exigentes. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico.

El agregado de sangre al medio de cultivo, en concentración final de 5 – 10 %, aporta nutrientes para el crecimiento bacteriano y permite detectar hemólisis.

Composición

Infusión de músculo corazón	37.5 g
Peptona	10.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Agar	15.0 g
pH final: 7.3±0.2	

Preparación

Suspender 40 g del polvo en un litro de agua destilada. Mezclar hasta obtener una suspensión homogénea. Calentar con agitación frecuente y hervir 1 minuto. Esterilizar 20 minutos a 121°C. Enfriar a 45-50°C agregar la sangre desfibrinada al 5%. Homogeneizar y distribuir en placas.

El medio preparado se puede observar en la Figura N° 5.1.



Figura N° 5.1: Agar sangre

- **Agar Batata Dextrosa**

Fundamento

Medio de cultivo utilizado para el aislamiento y recuento de hongos y levaduras en muestras clínicas, alimentos, cosméticos y otros materiales.

Tanto la glucosa presente como la infusión de papa favorecen el desarrollo exuberante de hongos y levaduras.

Composición

- Infusión de papa 4.0 g
- Glucosa 20.0 g
- Agar 15.0 g

pH final: 5.6 ± 0.2

Preparación

Disolver 39 g de polvo en un litro de agua destilada. Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos. Distribuir y enfriar a temperatura ambiente antes de su utilización.

El medio preparado se puede observar en la Figura N° 5.2.

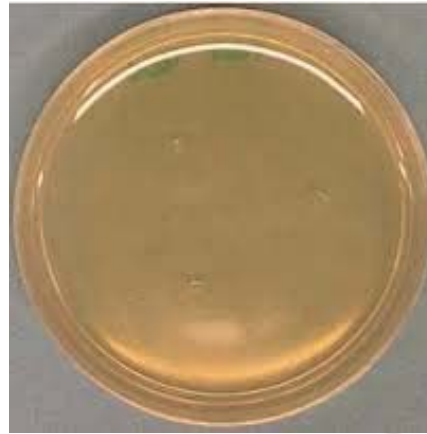


Figura N°5.2: Agar batata dextrosa

- **Agar Sabouraud Glucosa**

Fundamento

Medio de cultivo recomendado para el aislamiento y desarrollo de hongos, particularmente los asociados con infecciones cutáneas (piel, pelo, etc).

En el medio de cultivo, el digerido enzimático de caseína y la glucosa, son los nutrientes para el desarrollo de microorganismos. El alto contenido de glucosa, y el pH ácido, favorecen el crecimiento de hongos sobre bacterias.

Composición

- Digerido enzimático de caseína 10.0 g
- Dextrosa 40.0 g
- Agar 15.0 g
- Agua destilada c.s.p. 1000 ml

pH final 5.6 ± 0.2

Preparación

Suspender 65 g de medio deshidratado en un litro de agua destilada. Calentar agitando frecuentemente y dejar hervir durante 1 minuto para disolver

completamente los ingredientes. Evitar el sobrecalentamiento. Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos. Distribuir y enfriar a temperatura ambiente antes de su utilización.

El agar Sabouraud se puede observar en la Figura N° 5.3.



Figura N° 5.3: Agar Sabouraud dextrosa

- **Medio RPMI 1640**

Fundamento:

Se destina al cultivo de células humanas y de otros animales. Este medio es distribuido deshidratado, en polvo o como líquido. La presentación en polvo tiene la ventaja de mantenerse estable por más de 24 meses conservado bien cerrado y refrigerado. Otra gran ventaja de este medio es la constancia de resultados cuando se programan cultivos celulares a largo plazo, utilizando en ese caso un mismo lote de RPMI. Se utiliza así mismo en los test de sensibilidad a antibióticos con microorganismos como *Candida sp*, *Criptococcus neoformas*, *Aspergillus sp*, *Trichophyton rubrum*. *Fusarium sp*.

Composición:

El medio RPMI es un medio sintético único en comparación con otros medio ya que contiene glutatión y una alta concentración de vitaminas como se aprecia en la Tabla N°5.

Preparación:

Medir aproximadamente 90% del volumen a ser preparado de agua destilada.

Disolver 10.4g del medio RPMI-1640 en 900ml del agua destilada, agregar 34.53g de tampón MOPS (ácido 3-[N-morfolino] propanosulfónico), agitar hasta disolver completamente.

Ajustar el pH a 7.0 a 25°C usando NaOH 1M, el color que toma es anaranjado. Luego agregar agua destilada suficiente para obtener un volumen final de 1L.

Finalmente esterilizar por filtración en membranas de 0.22 μ m y almacenar a 4°C, en la Figura N° 5.4 se puede observar los sachets en los que viene el medio en polvo, y el medio ya reconstituido. ⁽⁷⁶⁾

TABLA N°5: Composición del medio RPMI 1640 (con glutamina y rojo fenol, sin bicarbonato)

Compuesto	g/L de agua	Compuesto	g/L de agua
L-arginina (base libre)	0.200	Biotina	0.0002
L-asparagina (anhidra)	0.050	D-pantoténico	0.00025
L-aspártico, ácido	0.020	Cloruro de colina	0.003
L-cistina.2HCl	0.0652	Fólico, ácido	0.001
L-glutámico, ácido	0.020	Mioinositol	0.035
L-glutamina	0.300	Niacinamida	0.001
Glicina	0.010	PABA	0.001
L-histidina (base libre)	0.015	Piridoxina HCl	0.001
L-hidroxiprolina	0.020	Riboflavina	0.0002
L-iso-leucina	0.050	Tiamina HCl	0.001
L-leucina	0.050	Vitamina B12	0.000005
L-lisina.HCl	0.040	Nitrato de calcio x H ₂ O	0.100
L-metionina	0.015	Cloruro de potasio	0.400
L-fenilalanina	0.015	Sulfato de magnesio (anhidro)	0.04884
L-Prolina	0.020	Cloruro de sodio	6.000
L-serina	0.030	Fosfato de sodio, dibásico (anhidro)	0.800
L-treonina	0.020	D-glucosa	2.000
L-triptofano	0.005	Glutation, reducido	0.001
L-tirosina.2Na	0.02883	Rojo fenol	0.0053
L-valina	0.020		



Figura N° 5.4: Médio RPMI 1640



ANEXO N°3

TABLA N°6: Tabla de diluciones para el test de microdilución

Solución de Anfotericina B									
Paso	Concentración ug/ml	Fuente	Volumen (ml)	+	Medio (ml)	=	Concentración intermedia 2X ug/ml	=	Concentración en pozo ug/ml
1	2000	Solución madre	0.016		3.984		8		4
2	8	Paso 1	2		2		4		2
3	4	Paso 2	2		2		2		1
4	2	Paso 3	2		2		1		0.5
5	1	Paso 4	2		2		0.5		0.25
6	0.5	Paso 5	2		2		0.25		0.125

Extracto etanólico de hojas de <i>Myrcianthes ferreyrae</i> "Arrayán"									
Paso	Concentración ug/ml	Fuente	Volumen (ml)	+	Medio (ml)	=	Concentración intermedia 2X ug/ml	=	Concentración en pozo ug/ml
1	20000	Solución madre	0.4		3.6		2000		1000
2	2000	Paso 1	2		2		1000		500
3	1000	Paso 2	2		2		500		250
4	500	Paso 3	2		2		250		125
5	250	Paso 4	2		2		125		62.5
6	125	Paso 5	2		2		62.5		31.25

Extracto etanólico de hojas de <i>Myrcianthes ferreyrae</i> "Arrayán"									
Paso	Concentración ug/ml	Fuente	Volumen (ml)	+	Medio (ml)	=	Concentración intermedia 2X ug/ml	=	Concentración en pozo ug/ml
1	20000	Solución madre	0.064		3.936		320		160
2	320	Paso 1	2		2		160		500
3	160	Paso 2	2		2		80		250
4	80	Paso 3	2		2		40		125
5	40	Paso 4	2		2		20		62.5
6	20	Paso 5	2		2		10		31.25
7	10	Paso 6	2		2		5		2.5
8	5	Paso 7	2		2		2.5		1.25
9	2.5	Paso 8	2		2		1.25		0.625

Extracto etanólico de hongos endofíticos aislados de hojas de <i>Myrcianthes ferreyrae</i> "Arrayán"									
Paso	Concentración ug/ml	Fuente	Volumen (ml)	+	Medio (ml)	=	Concentración intermedia 2X ug/ml	=	Concentración en pozo ug/ml
1	20000	Solución madre	0.08		3.92		400		200
2	400	Paso 1	2		2		200		100
3	200	Paso 2	2		2		100		50
4	100	Paso 3	2		2		50		25