

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
CARRERA DE QUIMICA FARMACEUTICA



TESIS

“Estudio *in vitro* de la actividad antibacteriana y antifúngica de extractos vegetales del género *Baccharis* (CARRERA DE CIENCIAS QUIMICAS) sobre Microorganismos fitopatógenos y patógenos humanos (INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FARMACO-BIOQUIMICAS), en el año 2010”

POSTULANTE

HONORIA SILVIA MARTINEZ TAPIA

ASESORES

ENRIQUE TERRAZAS SILES Ph.D.
PATRICIA MOLLINEDO PORTUGAL Ph.D.

LA PAZ - BOLIVIA

2010

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi profunda gratitud a quienes con su ayuda y aliento a cada momento, hicieron posible cumplir una meta.

A los tutores Dra. Patricia Mollinedo y Dr. Enrique Terrazas, por trabajar a su lado y enseñarme con dedicación, compartiendo no solo su conocimiento sino generando un ambiente de amistad.

A mis compañeros del Area de Microbiología, Juan, Kenny, Laura, Reynaldo, Luís, Marina, Rosita y Victor, con quienes compartimos momentos especiales. Así mismo un agradecimiento especial a la Dra. Teresa Alvarez, Dra. Ninoska Flores, Dr. Alberto Giménez, del Instituto de Investigaciones Farmaco-Bioquímicas, por la colaboración en material, reactivos, como también en sugerencias, conocimientos y por sobre todo recibirme brindándome un espacio para efectuar este trabajo.

A mis compañeros Oscar, Maribel, Rodrigo, Zilma y Dra. Giovanna Almanza, por su colaboración y acogida en el Area de Productos Naturales de la Carrera de Ciencias Químicas.

Gracias a todas las personas que me permitieron compartir momentos en su vida, en especial a Américo, Charito, Analía, Esther, Daniela, Julio, Patricia, Ximena, Zulema, Marcela, Saúl.

Gracias a mi familia Gloria, Carlos, Luís, Jorge, Marcia por todo el cariño y comprensión a todo lo largo de los años de vida.

Gracias a Dios por brindarme la gracia de desarrollar este trabajo y compartir con cada uno de Ustedes.

Con infinita gratitud, Silvia

INDICE	PAGINA
ABREVIATURAS	xii
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1 INTRODUCCION	4
2 MARCO TEORICO	7
2.1 FITOPATOGENOS	7
2.1.1. BACTERIAS FITOPATOGENAS	9
2.1.2 HONGOS FITOPATOGENOS	11
2.2 MICROORGANISMOS PATOGENOS HUMANOS	13
2.2.1 BACTERIAS	15
2.2.2 HONGOS	20
2.2.2.1 MICOSIS	21
2.3 FORMAS IMPORTANTES DE INFECCION FUNGICA	24
2.3.1 ASPERGILOSIS	24
2.3.2 CANDIDIASIS	26
2.4. PRODUCTOS NATURALES	31
2.5. BACCHARIS COMO PLANTA UTILIZADA EN MEDICINA TRADICIONAL	37
2.5.1. ESPECIES VEGETALES	42
2.6. ANTIMICROBIANOS	45
2.7. CURVA DE CRECIMIENTO MICROBIANA: FASES Y TIEMPO DE GENERACION	48
2.8. CINETICA DE MUERTE FUNGICA	51

2.9. FACTORES QUE AFECTAN LA POTENCIA DE LA ACCIÓN ANTIMICROBIANA	51
3 OBJETIVOS	55
4 MATERIAL Y METODOLOGIA	57
4.1 MATERIALES	57
4.2 METODOLOGIA DE EXTRACCION	59
4.3. MICROORGANISMOS	62
4.4 ANTIMICROBIANOS	63
4.5. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS	63
4.6. CONDICIONES GENERALES DE EXPERIMENTACION	64
5 RESULTADOS	76
5.1. BACTERIAS	76
5.2. HONGOS. PRUEBA DE SCREENING. PRUEBA DE MICRODILUCION EN PLACA DE EXTRACTOS VEGETALES DEL GENERO <i>BACCHARIS</i>	79
5.3. HONGOS. PRUEBA CUANTITATIVA. PRUEBA DE DILUCION EN PLACA CON POZO CENTRAL DE INOCULO	85
5.4. PRUEBA CUALITATIVA. PRUEBA DE DILUCION EN MICROPLACA TC96 PARA LEVADURAS (M27-A)	92
5.5. METODO DE SUSCEPTIBILIDAD POR DIFUSION BAUER- KIRBY DE DISCOS DE PAPEL APLICADO CON EXTRACTOS SOBRE AGAR PARA <i>Candida albicans</i>	94
5.6. PRUEBA DE LA DINAMICA DE ACCION MICROBICIDA. CURVAS DE LETALIDAD PARA <i>Candida albicans</i>	96
6 DISCUSION	103

6.1 BACTERIAS	103
6.2 HONGOS	105
7 CONCLUSIONES	113
8 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	117
9 ANEXOS	130

INDICE DE ANEXOS	PAGINA
ANEXO A ENFERMEDADES EN PLANTAS	131
Foto A1. Pie negro en tubérculo, causado por <i>Erwinia sp</i>	132
Foto A2. <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>Michiganensis</i> en tomate	132
Foto A3. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Tomato</i> .	133
Foto A4. Infección de frutos de tomate por <i>Phytophthora infestans</i> .	133
Foto A5. <i>Aspergillus flavus</i> en manies	134
Foto A6. Pudrición del grano de maíz ocasionada por <i>Aspergillus spp</i>	134
Foto A7. <i>Phytophthora palmivora</i>	135
Foto A8. Nueces infectadas con <i>Aspergillus niger</i> y <i>Aspergillus flavus</i> .	135
 ANEXO B ENFERMEDADES EN ANIMALES	 136
Foto B1. <i>Staphylococcus aureus</i> en aves de corral.	137
Foto B2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en canes.	137
Foto B3. Dermatitis gangrenosa en aves producida por Bacterias.	138
Foto B4. Fotografía de un Pointer Ingles con Aspergilosis nasal	139
Foto B5. Fotografía de un ave con candidiasis.	139
 ANEXO C ENFERMEDADES EN HUMANOS	 140
Foto C1. <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i> .	141
Foto C2. Infección por <i>Staphylococcus aureus</i> .	141
Foto C3. Otomicosis por <i>aspergillus sp</i> .	142
Foto C4. Aspergilosis pulmonar invasora.	142
Foto C5. <i>Aspergilosis</i> bronquial.	143
Foto C6. Endocarditis por <i>A. niger</i>	143
Foto C7. Paroniquia candidiásica.	144
Foto C8. Candidiasis Interdigital.	144
Foto C9. Otomicosis.	145

FOTO C10. Intertrigo candidiásico	145
FOTO C11. Foliculitis candidiásica.	146
FOTO C12. Candidiasis oral o Mughet oral.	146

ANEXO D ACTIVIDAD INHIBITORIA DE EXTRACTOS VEGETALES DEL GENERO *BACCHARIS* **147**

Foto D1. Método de susceptibilidad por Difusión Bauer-Kirby contra bacterias y <i>Candida albicans</i> .	148
Foto D2. Método de Dilución de Extractos vegetales del género <i>Baccharis</i> con Agar y Pozo Central de Inoculo frente a <i>Aspergillus niger</i> .	149
Foto D3. Actividad antifúngica del Extracto etanólico de <i>Baccharis latifolia</i>	150
Foto D4. Método de dilución de extractos del género <i>Baccharis</i> con agar y pozo central de inoculo de <i>Phytophthora palmivora</i>	151
Foto D5. <i>Candida albicans</i> , sin diluciones.	152
Foto D6. <i>Candida albicans</i> , con diluciones.	153
Foto D7. Actividad del Fármaco Fluconazol frente a <i>Candida albicans</i>	154
Foto D8. Actividad del Fármaco Ketoconazol KC frente a <i>Candida albicans</i> .	155
Foto D9. Actividad del Fármaco Ketoconazol KJ frente a <i>Candida albicans</i> .	156
Foto D10. Extracto de <i>Baccharis genistelloides</i> S1P contra <i>Candida albicans</i> .	157
Foto D11. Extracto de <i>Baccharis genistelloides</i> S3P contra <i>Candida albicans</i> .	158
Foto D12. Extracto de <i>Baccharis latifolia</i> S2P frente a <i>Candida albicans</i> .	159
Foto D13. Extracto de <i>Baccharis latifolia</i> E20 frente a <i>Candida albicans</i> .	160
Foto D14. Extracto de <i>Baccharis latifolia</i> E10 frente a <i>Candida albicans</i> .	161

INDICE DE FIGURAS		PAGINA
Figura 1.	Esquema en el que se muestra la interferencia que sobre los vegetales ocasionan algunos tipos comunes de enfermedades.	9
Figura 2.	Procariotas Fitopatógenos.	11
Figura 3.	<i>Phytophthora palmivora</i> en medio agar PDA.	12
Figura 4.	<i>Escherichia coli</i> .	16
Figura 5.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	18
Figura 6.	<i>Staphylococcus aureus</i> .	19
Figura 7.	Puertas de entrada de hongos patógenos y hongos oportunistas que provocan micosis.	20
Figura 8.	Principales tejidos que afectan la micosis profunda en comparación con la micosis superficial, cutánea y subcutánea.	24
Figura 9.	<i>Aspergillus niger</i> visto al microscopio y placa de incubación.	26
Figura 10.	<i>Candida albicans</i> a) vista al microscopio y b) en medio agar Sabouraud Dextrosa.	28
Figura 11.	Mercado europeo de la Fitoterapia en el 2003.	36
Figura 12.	Distribución geográfica del género <i>Baccharis</i> .	39
Figura 13.	<i>Baccharis genistelloides</i> .	43
Figura 14.	<i>Baccharis latifolia</i> .	44
Figura 15.	Esquema de la codificación de extractos no polares de especies vegetales del genero <i>Baccharis</i> .	60

Figura 16.	Esquema de la codificación de extractos polares acuosos de especies vegetales del genero <i>Baccharis</i> .	61
Figura 17.	Esquema de la codificación de extractos polares etanólicos de especies vegetales del genero <i>Baccharis</i> .	62
Figura 18.	Representación del crecimiento radial mediante el método de difusión en disco.	68
Figura 19.	Representación del crecimiento radial mediante el método de microdilución en microplaca con pozo central de inóculo.	69
Figura 20.	Representación del crecimiento radial mediante el método de dilución en placa con pozo central de inóculo.	70
Figura 21.	Esquema de una microplaca con el rango de concentraciones utilizadas.	74
Figura 22.	Porcentaje de Inhibición a dos concentraciones de extractos no polares del genero <i>Baccharis</i> sobre <i>Aspergillus niger</i> .	82
Figura 23.	Porcentaje de Inhibición a dos concentraciones de Extractos Polares acuosos del genero <i>Baccharis</i> sobre <i>Aspergillus niger</i> .	83
Figura 24.	Porcentaje de Inhibición a dos concentraciones de Extractos polares etanólicos del género <i>Baccharis</i> sobre <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus niger</i> .	84
Figura 25.	Extracto no polar R5 de <i>Baccharis papillosa</i> contra <i>Aspergillus niger</i> .	85
Figura 26.	Cinética del crecimiento con extractos polares del genero <i>Baccharis</i> con Acido clorhídrico, que afectan a <i>Aspergillus niger</i> Control negativo C(-).	86

Figura 27.	Porcentaje de Inhibición de extractos polares del genero <i>Baccharis</i> sobre <i>Phytophthora palmivora</i> .	89
Figura 28.	Cinética del crecimiento con extractos acuosos del genero <i>Baccharis</i> con ácido clorhídrico sobre <i>Phytophthora palmivora</i> Control negativo C (-).	90
Figura 29.	Microdilución de extractos polares y no polares con ácido clorhídrico de plantas del genero <i>Baccharis</i> frente a <i>Candida albicans</i> Control Negativo C(-)	93
Figura 30.	Halos de Inhibición en mm de extractos polares de plantas del género <i>Baccharis</i> frente a <i>Candida albicans</i> .	95
Figura 31.	Actividad antifúngica de extractos polares acuosos de <i>Baccharis genistelloides</i> de La Paz contra <i>Candida albicans</i> Control negativo C.A.	97
Figura 32.	Actividad antifúngica de extractos polares acuosos de <i>Baccharis genistelloides</i> de Cochabamba contra <i>Candida albicans</i> Control negativo C.A.	98
Figura 33.	Actividad antifúngica de extractos polares de <i>Baccharis latifolia</i> contra <i>Candida albicans</i> Control negativo C.A.	99
Figura 34.	Actividad antifúngica de extractos polares etanólicos de <i>Baccharis latifolia</i> contra <i>Candida albicans</i> Control negativo C.A.	100

	INDICE DE TABLAS	PAGINA
Tabla 1.	Actividad Antibacteriana de Extractos no Polares del género <i>Baccharis</i> (Cs. QUIMICAS-IIFB).	76
Tabla 2.	Actividad Antibacteriana de Extractos Polares etanólicos del género <i>Baccharis</i> (Cs. QUIMICAS-IIFB).	77
Tabla 3.	Actividad Antibacteriana de Extractos Polares acuosos del género <i>Baccharis</i> (Cs. QUIMICAS-IIFB).	78
Tabla 4.	Porcentaje de inhibición de extractos vegetales no polares del género <i>baccharis</i> y solventes sobre <i>Aspergillus niger</i> (Cs. QUIMICAS-IIFB).	79
Tabla 5.	Porcentaje de inhibición de extractos polares etanolicos del género <i>baccharis</i> sobre <i>Aspergillus niger</i> (Cs. QUIMICAS-IIFB).	84
Tabla 6.	Porcentaje de inhibición de extractos polares acuosos del género <i>baccharis</i> sobre <i>Aspergillus niger</i> (Cs. QUIMICAS-IIFB).	85
Tabla 7.	Velocidad de crecimiento de extractos polares del género <i>Baccharis</i> sobre <i>Aspergillus niger</i> (Cs. QUIMICAS-IIFB).	87
Tabla 8.	Porcentaje de inhibición de extractos polares del género <i>Baccharis</i> sobre <i>Phytophthora palmivora</i> (Cs. QUIMICAS-IIFB).	88
Tabla 9.	Velocidad de crecimiento de extractos polares del género <i>Baccharis</i> sobre <i>Phytophthora palmivora</i> (Cs. QUIMICAS-IIFB).	91
Tabla 10.	Porcentaje de inhibición de extractos polares del género <i>Baccharis</i> sobre <i>Candida albicans</i> (Cs. QUIMICAS-IIFB).	94

ABREVIATURAS Y CODIGOS

B1	Extracto etanólico de <i>B. oftusifolia</i>
B2	Extracto etanólico de <i>B. santelicis</i>
B3	Extracto etanólico de <i>B. latifolia</i>
B4	Extracto etanólico de <i>B. papillosa</i>
B5	Extracto etanólico de <i>B. genistelloides</i> de los Yungas de La Paz
B6	Extracto etanólico de <i>B. genistelloides</i> de Cochabamba
R3	Extracto no polar de <i>B. papillosa</i> en diclorometano por 18 horas
R4	Extracto etanólico de <i>B. latifolia</i> por 37 horas
R5	Extracto no polar de <i>B. papillosa</i> en diclorometano por 2 horas
S1	Extracto acuoso de <i>B. genistelloides</i> La Paz
S1C	Extracto acuoso de <i>B. genistelloides de La Paz</i> con acido cítrico
S1P	Extracto acuoso de <i>B. genistelloides de La Paz</i> con acido clorhídrico
S3	Extracto acuoso de <i>B. genistelloides</i> de Cochabamba
S3C	Extracto acuoso de <i>B. genistelloides</i> de Cochabamba con acido cítrico
S3P	Extracto acuoso de <i>B. genistelloides</i> de Cochabamba con acido clorhídrico
S2O	Extracto fenólico de polaridad media de <i>B. latifolia</i>
S2	Extracto acuoso de <i>B. latifolia</i>
S2C	Extracto acuoso de <i>B. latifolia</i> con acido cítrico
S2P	Extracto de <i>B. latifolia</i> acuoso con acido clorhídrico
E10C	Extracto etanólico de <i>B. latifolia</i> con acido cítrico
E10P	Extracto etanólico de <i>B. latifolia</i> con acido clorhídrico
E20C	Extracto etanólico de <i>B. latifolia</i> con acido cítrico
E20P	Extracto etanólico de <i>B. latifolia</i> con acido clorhídrico
K	Ketoconazol comprimidos 200 mg
KJ	Ketoconazol Jarabe 200mg/100 ml
F	Fluconazol I.V.
ETOL	Etanol
DMSO	Dimetil Sulfóxido

RESUMEN

En el Area de Productos Naturales de la Carrera de Ciencias Químicas como en el Area de Microbiología del Instituto de Investigaciones Fármaco-Bioquímicas (IIFB), con la finalidad de buscar alternativas para el control del crecimiento de microorganismos, se investigó la actividad antibacteriana y antifúngica de plantas del género *Baccharis*, utilizando extractos no polares y polares, de las especies *Baccharis latifolia*, *Baccharis genistelloides*, *Baccharis obtusifolia*, *Baccharis papillosa*, *Baccharis santelicensis*, sobre cepas ATCC de microorganismos fitopatógenos y patógenos humanos.

Para bacterias, cuando se utilizó 2 mg de extracto, la *Escherichia coli* 25922 ATCC fue sensible al extracto no polar R3, mientras que *Staphylococcus aureus* 25923 ATCC presenta sensibilidad al extracto no polar R5. Los extractos polares B1, B2, B3, B4, B5, B6, R4, S1C, S2C, S3P, S3C fueron activos a *Escherichia coli* 25922 ATCC. *Staphylococcus aureus* 25923 ATCC presentó sensibilidad al extracto polar B2. *Pseudomona aeruginosa* 27853 ATCC fue sensible al extracto polar S1P y S3P.

Frente a *Aspergillus niger* y *Phytophthora palmivora*, el extracto de *B. latifolia*, acuoso S2 y el extracto fenólico de polaridad media S2O tienen actividad inhibitoria a 50 mg/mL. Frente a *Aspergillus niger* el extracto de *B. latifolia* etanólico E20 a 50 mg/mL y con 20 mg/mL para *Phytophthora palmivora*.

Sobre *Candida albicans*, cuando se utilizó 1mg del extracto acuoso S2 y 0,5 mg de extracto etanólico E20, de *Baccharis latifolia*, se observa inhibición del crecimiento. El extracto fenólico de polaridad media S2O presenta actividad fungistática a 1 mg y por debajo de 0,5 mg el extracto etanólico E20.

Baccharis genistelloides tiene actividad fungistática frente a *Candida albicans* a 1 mg tanto para el extracto polar acuoso S1 (La Paz) como para el extracto S3 (Cochabamba).

Por lo tanto, se observa que los extractos de *Baccharis* presentan un efecto inhibitorio frente a fitopatógenos y patógenos humanos.

ABSTRACT

In the Area de Productos Naturales, to the Carrera de Ciencias Químicas and Area of Microbiology to the Instituto de Investigaciones Farmaco-Bioquímicas (IIFB), the research goal was to find alternatives for controlling the growth of microorganism. Thus antibacterial and antifungal activity was determined from plants of the genus *Baccharis*, using non-polar and polar extracts, of *Baccharis latifolia*, *Baccharis genistelloides*, *Baccharis obtusifolia*, *Baccharis papillosa*, *Baccharis santeliciis* species on ATCC strains of microorganism phytopathogens and human pathogens.

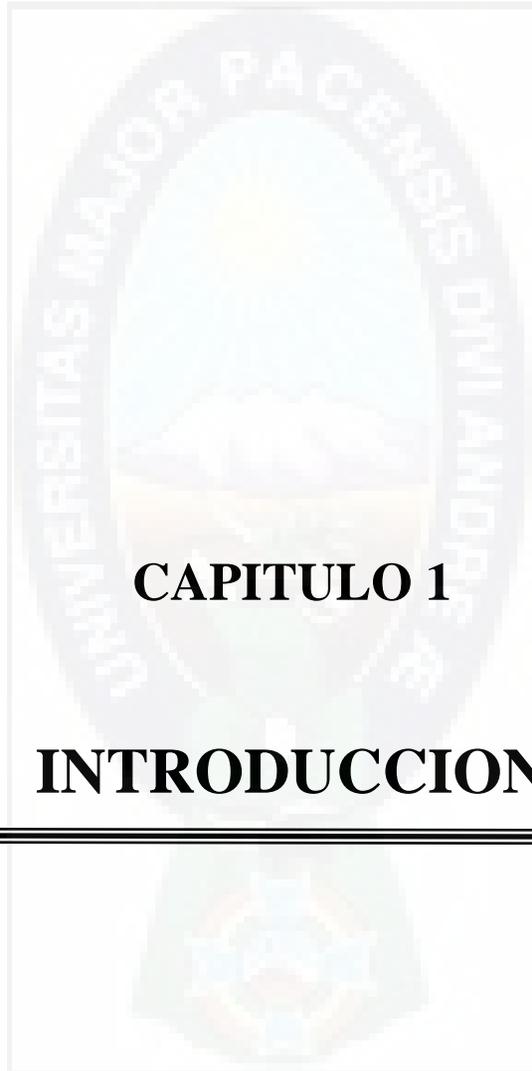
For bacteria when used 2 mg of extract, *Escherichia coli* ATCC 25922 was sensitive to extract nonpolar R3, while *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 has sensibility to extract nonpolar R5. The polar extracts B1, B2, B3, B4, B5, B6, R4, S1C, S2C, S3P, S3C were active against *Escherichia coli* ATCC 25922. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 was sensitive to the polar extract B2. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 was sensitive to S1P and S3P polar extract.

When used 50 mg/mL extract for *Aspergillus niger* and *Phytophthora palmivora* have inhibitory activity *B. latifolia* aqueous polar extract S2 and the phenolic extract of medium polarity S2O. Only against *Aspergillus niger* ethanol extract E20 to 50 mg/mL and with 20 mg/mL for *Phytophthora palmivora*.

On *Candida albicans* when using 1 mg aqueous extract S2 and 0,5 mg of ethanol E20 extract of *Baccharis latifolia*, growth inhibition was observed. The phenolic extract of medium polarity S2O has fungistatic activity at 1 mg and below 0,5 mg of ethanol extract E20.

Baccharis genistelloides has fungistatic activity against *Candida albicans* at 1 mg for both the polar aqueous extract S1 (La Paz) to the S3 extract (Cochabamba).

Therefore the plants of the genus *Baccharis* extracts have an inhibitory effect against phytopathogen and human pathogens.



CAPITULO 1

INTRODUCCION

1. INTRODUCCION.

Dado el continuo crecimiento de la población humana, se requiere incrementar la producción de alimentos. Una forma de conseguir este objetivo es la reducción de las pérdidas en cultivos agrícolas provocadas por organismos causantes de enfermedades y plagas (insectos, bacterias y hongos patógenos de vegetales). Uno de los métodos que más se utilizan para contrarrestar estos males es el uso de agroquímicos. Estos productos desempeñan un papel muy importante en la reducción de los daños económicos en los cultivos. Sin embargo, la toxicidad elevada de algunos de ellos, su persistencia en el medio y su mal uso han llevado a un replanteamiento de las estrategias de control de plagas.^{1,2}

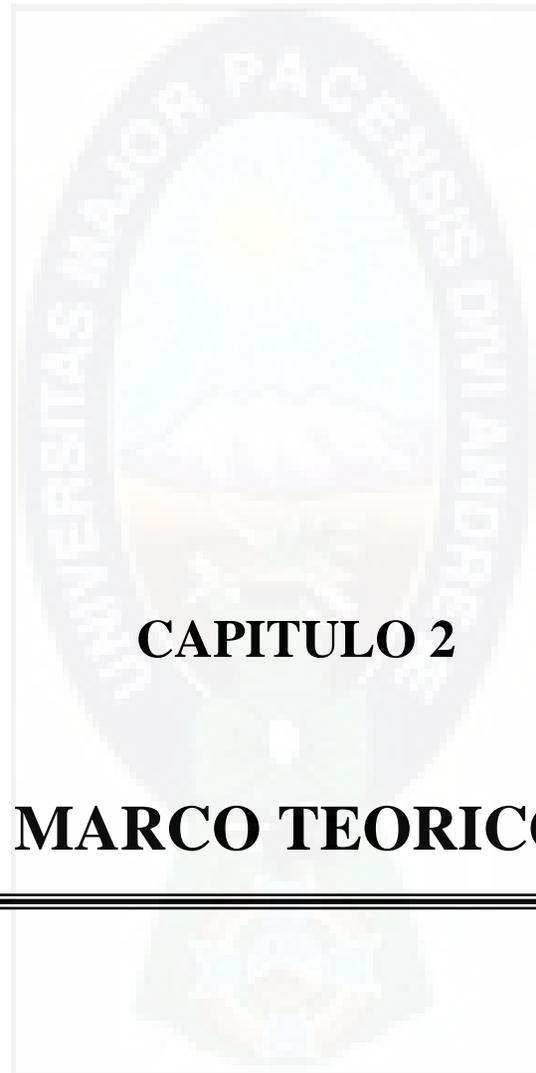
A nivel mundial los fitopatógenos originan pérdidas que ascienden a miles de millones de dólares al año. El daño que ocasionan no sólo se refiere a las pérdidas de producción económica, sino también a las pérdidas en la producción biológica, es decir a la alteración que existe en el crecimiento y desarrollo de las plantas hospedantes atacadas por estos microorganismos. De los diversos microorganismos fitopatógenos que atacan a las plantas, los hongos son el grupo que más enfermedades ocasiona y por lo tanto sobre el que más investigación se ha realizado. Se sabe que más de 8,000 especies de hongos pueden causar enfermedades en las plantas.^{3,4}

Todas las plantas pueden ser infectadas y dañadas por más de una especie de hongo fitopatógeno y una especie de hongo puede atacar a más de una especie de planta. Algunos géneros y especies presentan una gran capacidad de adaptación y se encuentran ampliamente distribuidos, mientras que otros presentan características de adaptación más limitadas o bien son sumamente especializados, lo cual restringe su distribución. La cantidad de estudios e investigaciones en algunos grupos depende en gran parte de la importancia económica de los cultivos o plantas que dañan.⁵⁻⁷

Por otro lado, también existe un marcado incremento de la frecuencia y gravedad de las infecciones bacterianas y micóticas tanto en pacientes humanos como animales. Estas infecciones pueden deberse a alteraciones inmunológicas asociadas con quimioterapia anticancerígena, trasplantes, nutrición parenteral, uso de antibióticos de amplio espectro, síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) y aparición de diferentes formas de patologías clínicas clásicas y de nuevas infecciones bacterianas y fúngicas, lo que ha ocasionado un mayor empleo de antimicrobianos, motivando el desarrollo de investigaciones para la obtención y formulación de nuevas moléculas.⁸⁻¹²

El consumo de antimicrobianos altera la flora microbiana del paciente, favorece la resistencia y predispone al desarrollo de infecciones por patógenos oportunistas, donde, en el caso de bacterias la *P. aeruginosa* es de los más comunes, que resulta resistente a la mayoría de los antimicrobianos utilizados en la práctica clínica. También, existen medicamentos como Anfotericina B, Fluconazol o Fluorocitosina y otros antimicóticos, pero las tasas de fracasos en determinadas patologías son superiores al 50%, hecho en el que actúan diversos factores como las enfermedades subyacentes a las micosis que padecen los pacientes. Los problemas de seguridad y toxicidad de los fármacos antifúngicos o la aparición de resistencias, motiva el desarrollo de nuevos antifúngicos que aporten ventajas apreciables respecto a los actuales fármacos.¹³⁻¹⁵

Consecuentemente existen dificultades en encontrar nuevos antimicrobianos, dada la diversidad de especies potenciales destinatarias, además la presencia de múltiples dianas, la inestabilidad genética entre el grupo de patógenos, así como la reducida selectividad en el mecanismo de acción del antimicrobiano, unas no poseen amplio espectro de acción, otras no son selectivas para el microorganismo siendo tóxicas para el huésped y muchos actúan solo deteniendo el proceso y no como biocida, produciendo recurrencia. A esto se suma la aparición de cepas resistentes a antimicrobianos de uso clínico, que es uno de los problemas más difíciles de solucionar.^{16,17}



CAPITULO 2

MARCO TEORICO

2. MARCO TEORICO

2.1. FITOPATOGENOS

El desarrollo de la enfermedad es el resultado de su interacción con las plantas, según una secuencia de etapas denominadas patogénesis. Algunas de estas etapas, cruciales para el establecimiento de tal patogénesis son:

- Unión a la superficie de la planta.
- Germinación sobre dicha superficie y formación de estructuras de infección.
- Penetración en el huésped.
- Colonización de los tejidos del huésped.

En un principio, la reacción de la planta ante el agente que ocasiona su enfermedad se concentra en la zona enferma y es de naturaleza química e invisible. Sin embargo, poco tiempo después la reacción se difunde y se producen cambios histológicos que se hacen notorios y constituyen los síntomas de la enfermedad, las células y los tejidos afectados de las plantas enfermas comúnmente se debilitan o destruyen a causa de los agentes que ocasionan la enfermedad (Anexo A). La capacidad que tienen esas células y tejidos para llevar a cabo sus funciones normales disminuye o se anula por completo; como resultado, la planta muere o merma su crecimiento. Los tipos de células o tejidos que son infectados determinan el tipo de función fisiológica de la planta que será afectada. Así, la infección de la raíz (por ejemplo, la pudrición), dificulta la absorción del agua y de los nutrientes del suelo.^{6,7,18-21}

Las enfermedades de las plantas se clasifican en:

a) Enfermedades infecciosas de las plantas

1. Enfermedades ocasionadas por hongos
2. Enfermedades ocasionadas por procariontes (bacterias y micoplasmas)
3. Enfermedades ocasionadas por plantas superiores parásitas

4. Enfermedades ocasionadas por virus y viroides
5. Enfermedades ocasionadas por nemátodos
6. Enfermedades ocasionadas por protozoarios

b) Enfermedades no infecciosas de las plantas debidas a:

1. Temperaturas muy altas o muy bajas
2. Falta o exceso de humedad en el suelo
3. Falta o exceso de luz
4. Falta de oxígeno
5. Contaminación atmosférica
6. Deficiencia de nutrientes
7. Toxicidad mineral
8. Acidez o alcalinidad del suelo (pH)
9. Toxicidad de los plaguicidas
10. Prácticas agrícolas inadecuadas

Para los millones de personas que habitan la Tierra y cuya existencia depende de los productos vegetales, las enfermedades de las plantas pueden marcar la diferencia entre una vida normal y una vida acosada por el hambre o incluso conducir a la muerte por inanición, provocar que los agricultores sufran pérdidas económicas que varían desde porcentajes mínimos hasta pérdidas de un cien por ciento. Las pérdidas ocasionadas por las enfermedades de las plantas varía de acuerdo a la especie de planta o los productos que se obtienen de ella, así como al agente patógeno, la localidad, el medio ambiente, las medidas de control practicadas, etc., o con base en la combinación de todos estos factores, propiciar el aumento en el precio de los productos y destruir la belleza del medio ambiente al dañar a las plantas en las ciudades como en el campo y bosques. Las enfermedades de las plantas reducen la variedad de plantas que pueden desarrollarse en una determinada zona geográfica al destruir a todas las plantas de ciertas especies que son muy susceptibles a una enfermedad en particular.¹⁹

2.1.1. BACTERIAS FITOPATOGENAS

Se conocen más de 10^3 especies de bacterias, la cuales en su mayoría son saprofitas, llevan a cabo importantes funciones en la eliminación de residuos vegetales, animales, industriales y contaminantes del ambiente. Algunas tienen la capacidad de utilizar la luz o ciertos compuestos inorgánicos como fuentes de energía para la biosíntesis (bacterias autótrofas) también hay bacterias asociadas de múltiples formas con organismos superiores, como las fijadoras de nitrógeno en las leguminosas y las habitantes del tracto digestivo de los rumiantes.^{6,7,20}

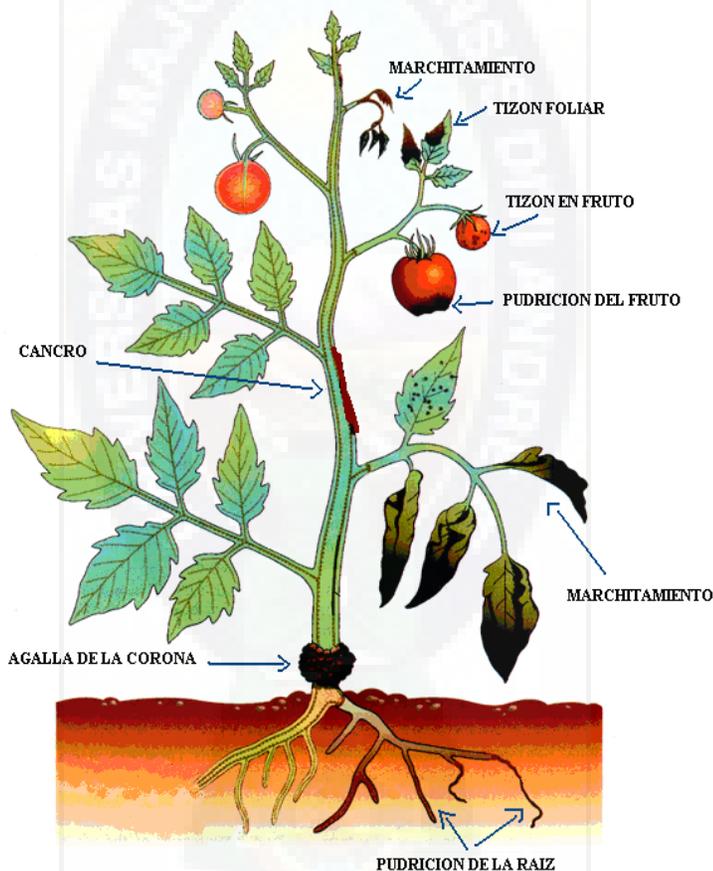


Figura 1. Esquema en el que se muestra la interferencia que sobre los vegetales ocasionan algunos tipos comunes de enfermedades.

Las bacterias fitopatógenas ocasionan manchas y tizones foliares, pudriciones blandas de frutos, raíces y órganos almacenados, marchitamientos, crecimientos excesivos, sarnas, canchros, etc. (Figuras 1 y 2). Cualquiera de estos tipos de

síntomas puede ser producido por las bacterias patógenas de varios géneros y cada género contiene algunos patógenos capaces de producir diferentes tipos de enfermedades.^{6,7,18-21}

- a) ***Erwinia***. Causa la pudrición suave de muchos cultivos, el tizón de fuego de las rosáceas y la marchites de Stewart en el maíz. Bacilos gram negativos
- b) ***Pseudomonas***. Causa cancos en árboles y manchas foliares en numerosos cultivos o crecimientos excesivos o proliferación de los órganos Bacilos gram negativos
- c) ***Xanthomonas***. Causa tizones foliares y lesiones necróticas en frutos de muchos cultivos, la pudrición negra de crucíferas y el cancro de los cítricos. Bacilos gram negativos.
- d) ***Clavibacter***, causa entre otras enfermedades cancos en tomate. Bacilos gram positivos
- e) ***Agrobacterium***. Causa la agalla de la corona en muchas plantas dicotiledóneas. Crecimientos excesivos o proliferación de los órganos Bacilos gram negativos
- f) ***Xylella***. Incluye solo a *X. fastidiosa*, causante de enfermedades en múltiples hospedantes. Bacilo gram negativo
- g) ***Streptomyces*** sólo producen sarnas o lesiones en los órganos subterráneos de las plantas.
- h) ***Rhizobium*** inducen la formación de nódulos en las raíces de las leguminosas

i) *Ralstonia* es un genero con pocas especies, pero de gran importancia económica por incluir a *R. solanacearum*, causante de marchites en numerosos cultivos, sobre todo en áreas tropicales y subtropicales. Bacilos gram negativos.

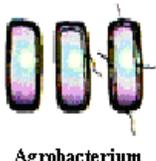
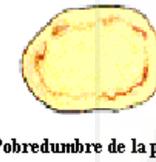
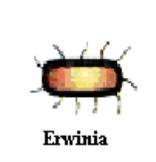
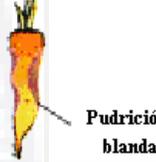
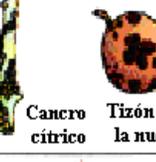
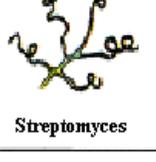
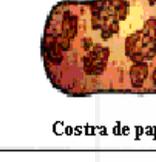
 Agrobacterium	 Agalla de la corona	 Agalla en rama	 Agalla en caña	 Raíces peludas		
 Clavibacter	 Pobredumbre de la papa	 Cancro y Marchitamiento	 Pudrición del fruto	 Pudrición del cuello		
 Erwinia	 Plaga	 Marchitamiento	 Pudrición blanda			
 Pseudomonas	 Mancha foliar	 Mancha foliar	 Agalla	 Marchitamiento	 Plaga	 Cancro
 Xanthomonas	 Mancha foliar	 Pobredumbre	 Venas negras	 Pudrición de bulbo	 Cancro cítrico	 Tizón de la nuez
 Streptomyces	 Costra de papa	 Pobredumbre de suelo de papa dulce	 Rhizobium	 Nódulos en raíces de leguminosas		

Figura 2. Procariotas Fitopatógenos

2.1.2. HONGOS FITOPATOGENOS

Las enfermedades causan anualmente a la agricultura mundial pérdidas del 10% de la cosecha total. El grupo principal de organismos fitopatógenos es el de los hongos, de estos, actualmente se conocen más de 8,000 especies que pueden producir enfermedades. Se sabe que el 80% se presenta en forma esporádica y el

20% en forma endémica, gracias a que la mayor parte de los hongos necesita de condiciones especiales para su desarrollo. Los hongos que atacan a la parte aérea destruyen el follaje causando manchas foliares y tizones. Los que atacan a las raíces retardan el desarrollo de la planta restándole vitalidad o causándole la muerte. Los hongos son una de las principales causas de rendimientos bajos y deterioro del producto.^{16,17,19-21}

a) *Phytophthora*

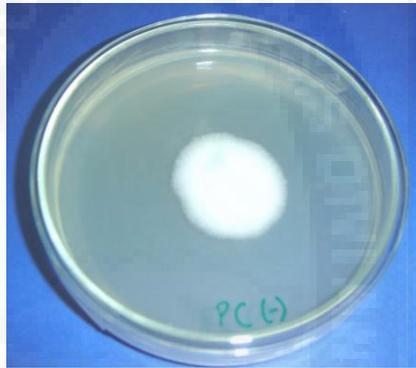


Figura 3. *Phytophthora palmivora* en medio agar PDA.

Se tienen varias especies del hongo *Phytophthora* (Figura 3), los que afectan a muchas especies de plantas: Cacao, Manzano, Frambuesa, Tomate, etc. Este hongo vive en la tierra y cuando se dan las condiciones ideales, coloniza las raíces y la zona del cuello de las plantas. La causa principal que activa al patógeno es el encharcamiento, el exceso de agua o por regar demasiado. Los síntomas que se observan de manera general son:

- a) Hojas amarillas que se marchitan, volviéndose a continuación marrones. La planta termina muriendo por la pudrición de raíces y el cuello.
- b) Puede aparecer zonas secas en tallos o troncos, con manchas oscuras en el tejido debajo de éstas.
- c) El follaje es escaso y clorótico.
- d) La planta se va secando hasta morir.

Las especies de *Phytophthora* viven y se reproducen principalmente en el suelo y por lo común atacan las plantas susceptibles a nivel de la superficie del suelo o por debajo de ella. Sin embargo, en algunas ocasiones las esporas del hongo son diseminadas hacia la corteza dañada de una rama o bien hacia los frutos que se localizan a poca altura, de ahí que produzcan infecciones en esos órganos. El hongo ataca a las raíces, también puede atacar y destruir a las plántulas antes o después de haber emergido del suelo (produciendo así los síntomas del ahogamiento) y en algunos casos, ataca y produce la pudrición parcial o completa de algunos frutos, como tomate, pimiento, cacao, cítricos, etc.

Se utilizan varios fungicidas sistémicos como el Metalaxyl, Fosetyl Al, Ethazol y Propamocarb, los cuales se emplean para tratar semillas y suelos o se aplican como inmersiones de trasplante o como aspersiones, o bien utilizando agua de riego. En el caso de algunos cultivos como la fresa, la pudrición de la raíz por *Phytophthora* se ha logrado controlar eficazmente fumigando los suelos con una mezcla de Bromuro de Metilo y Cloropicrina.^{6,7,18-21}

2.2. MICROORGANISMOS PATOGENOS HUMANOS.

Dentro de la amplia gama de bacterias también ocupan un lugar preponderante las causantes de enfermedades tanto en animales (ANEXO B) como en el hombre (cólera, tuberculosis, tétano), los animales (ántrax, mastitis, diarreas) (Anexo C). Finalmente hay otras utilizadas en procesos industriales (Industria Láctea) e investigaciones biotecnológicas (Ingeniería genética) que generan beneficios a la humanidad.

Las infecciones bacterianas oportunistas afectan a poblaciones variadas pero con una característica en común la inmunosupresión, que sumadas a la patología de base, agravan el cuadro y por lo tanto incrementan la morbilidad y mortalidad de los pacientes. Entre las patologías, cuya etiología sean infecciones bacterianas podemos mencionar: la neumonía bacteriana y la bacteriemia en pacientes infectados con el

virus de la inmunodeficiencia humana provocados por *Pseudomonas aeruginosa*, la sepsis neonatal con sus agentes etiológicos *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, las infecciones del tracto urinario ocasionados por *Escherichia coli* y las infecciones nosocomiales con su principal agente *Pseudomonas aeruginosa*.

De los microorganismos que producen patología, los hongos son los elementos emergentes y la causa frecuente de lesión tisular.^{22,23} La mayoría de las aproximadamente 100.000 especies de hongos conocidas son saprofitas; sólo 8.000 pueden causar enfermedades en una o más especies vegetales y tan sólo 100 son patógenas de humanos o animales.^{24,25} De ellos los más habituales son *Candida* y *Aspergillus*, aunque hay otras como *Fusarium*, *Alternaria*, etc., que están empezando a producir un gran impacto.²⁶ *Candida* y *Aspergillus* son los agentes etiológicos más frecuentes y los sitios mas frecuentemente involucrados son: pulmón, hígado y bazo; menos frecuente: cerebro, tracto gastrointestinal.²⁷⁻²⁹

Hasta hace poco tiempo se entendía que las infecciones fúngicas nosocomiales eran esporádicas, pero en los últimos años también aparece como brote epidémico con fuente exógena adquiriéndose a partir de infecciones cruzadas entre personas dentro del hospital o de su propio ambiente.^{30,31}

Entre los diversos factores que han contribuido al incremento significativo de la expectativa de vida durante el siglo pasado se encuentra el control de numerosas enfermedades infecciosas gracias a intervenciones como vacunas y antibióticos específicamente. Por otro lado, la resistencia es un fenómeno creciente con implicaciones sociales y económicas enormes dadas por el incremento de morbilidad y mortalidad, aumento en los costos de tratamientos y de permanencia hospitalarias.^{32,33} La infección en establecimientos sanitarios representa un problema siempre presente que lejos de haber sido solucionado o paliado, ha ido aumentando y haciéndose más complejo. Por un lado, se atienden a pacientes que son especialmente vulnerables a los

gérmenes y por otro lado se utilizan procedimientos tecnológicos avanzados, que son en muchas ocasiones nuevas fuentes de entradas para las infecciones. La utilización de catéteres, la asistencia respiratoria, alimentación parenteral, el tratamiento farmacológico, la utilización de procedimientos invasivos, tanto diagnósticos como terapéuticos han dado lugar a un fenómeno propicio para la invasión microbiana, convirtiendo así a las Unidades de Cuidados Intensivos en las áreas de mayor riesgo y en las que se registran las tasas más elevadas de infecciones nosocomiales.³⁴⁻³⁶

El incremento de las infecciones, su trascendencia económica y social, su importancia clínica y epidemiológica como altas tasas de morbilidad y mortalidad, propician la investigación, descubrimiento y comercialización de nuevas sustancias, con espectros antimicrobianos más amplios y de menor toxicidad que ofrezcan una alternativa terapéutica para el tratamiento de estas patologías.³⁷

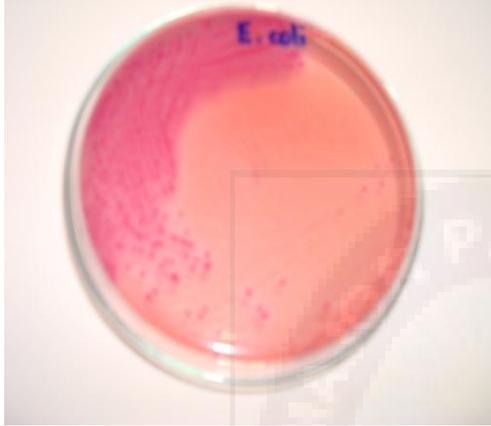
2.2.1. BACTERIAS

Casi 200 especies de bacterias son patógenas para el ser humano, es decir, causantes de enfermedades. El efecto patógeno varía mucho en función de las especies y depende tanto de la virulencia de la especie en particular como de las condiciones del organismo huésped. Entre las bacterias más dañinas están las causantes del cólera, del tétanos, de la gangrena gaseosa, de la lepra, de la peste, de la disentería bacilar, de la tuberculosis, de la sífilis, de la fiebre tifoidea, de la difteria y de muchas formas de neumonía.^{21,22}

a) *Escherichia coli*

Escherichia coli, es una bacteria (Figura 4) que se encuentra generalmente en los intestinos animales (incluido el humano) y por ende en las aguas negras. Reacciona negativamente a la tinción de Gram, es anaerobio facultativo, móvil por flagelos peritricos (que rodean su cuerpo), no forma esporas, fermenta la glucosa y la

lactosa. Conjuntamente con otras bacterias son necesarias para el funcionamiento correcto del proceso digestivo, siendo además productora de vitaminas B y K.



Reino: Bacteria
Filo: Proteobacteria
Clase: Gamma Proteobacteria
Orden: Enterobacteriales
Familia: Enterobacteriaceae
Género: *Escherichia*
Especie: *E. coli*

Figura 4. *Escherichia coli*

La fuente de infección son las personas infectadas, alimentos y agua contaminada. La diseminación es por vía fecal-oral. Carne poco cocida o leche pasteurizada. *E. coli* puede causar infecciones intestinales y extra-intestinales generalmente severas, tales como infecciones del aparato excretor, meningitis, peritonitis, mastitis, septicemia y neumonía Gram-negativa.

- ***E. coli* enteropatogénica (ECEP)**

Es el agente causal predominante de diarrea en niños que viven en países en vía de desarrollo. EPEC interacciona con las células epiteliales produciendo una lesión histopatológica característica: “adherencia/destrucción” o lesión A/E (*attaching and effacing*).

- ***E. coli* enterotoxigénica (ECET)**

Se parece mucho a *V. cholerae*, se adhiere a la mucosa del intestino delgado, no invade y elabora toxinas que producen diarrea no sanguinolenta. Sin cambios histológicos en las células de la mucosa y poca inflamación.

- ***E. coli* enteroinvasiva (ECEI)**

Es inmóvil, no fermenta la lactosa. Invade el epitelio intestinal causando diarrea sanguinolenta en niños y adultos. Libera el calcio en grandes cantidades impidiendo la solidificación ósea, produciendo artritis y en algunos casos arteriosclerosis.

- ***E. coli* enterohemorrágica o verotoxigénica (ECEH)**

Produce verotoxinas que actúan en el colon. Sus síntomas son: primero colitis hemorrágica, luego síndrome hemolítico ureico (lo anterior más infección del riñón, posible entrada en coma y muerte), y por último, púrpura trombocitopénica trombótica (lo de antes más infección del sistema nervioso central).

- ***E. coli* enteroagregativa (ECEA)**

Los estudios realizados sobre la capacidad adherente de la *E. coli* a células heteroaploides (HEp-2) muestran que, además de la adherencia localizada, existen otros 2 mecanismos: uno llamado difuso, que se produce cuando las bacterias se unen al citoplasma celular y otro agregativo, que se forma cuando las bacterias se acumulan en forma de empalizada tanto en la superficie celular como en el vidrio de la preparación.

- ***E. coli* adherencia difusa (ECAD)**

No se ha demostrado que pueda causar diarrea en niños mayores de un año de edad ni en adultos.

b) *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa, es una bacteria Gram-negativa, aeróbica, agrupados en parejas de cadenas cortas o aisladas, que poseen un flagelo polar, aunque raras veces poseen 2 o 3, son móviles y no esporulados, considerado como patógeno oportunista para los humanos y plantas. Como otras *Pseudomonas*, *P. aeruginosa* (Figura 5) secreta

una variedad de pigmentos, como la piocianina (azul verdoso), la fluoresceína (amarillo verdoso fluorescente) y la piorubina (rojo pardo).



Reino: Bacteria
Filo: Proteobacteria
Clase: Gamma Proteobacteria
Orden: Pseudomonadales
Familia: Pseudomonadaceae
Género: *Pseudomonas*
Especie: *P. aeruginosa*

Figura 5. *Pseudomonas aeruginosa*

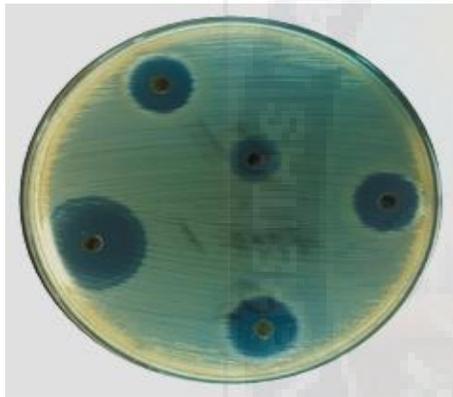
P. aeruginosa comúnmente se la encuentra en el polvo, el agua, las plantas y verduras, medio ambiente marino y animales. Puede crecer bien en diferentes medios y soporta gran variedad de condiciones físicas. Si bien su predilección son los ambientes húmedos, *P. aeruginosa* es primariamente un patógeno hospitalario y causa enfermedad en forma frecuente a huéspedes normales produciendo infecciones cuando el huésped tiene alteradas las defensas, principalmente en pacientes con quemaduras extensas, leucémicos, transplantados, etc.

Los factores que predisponen a una infección por *Pseudomonas* son: hospitalización prolongada, ingreso en Unidad de Tratamiento Intensivo, ambiente húmedo, utilización previa de antibióticos de amplio espectro, sonda vesical, etc. El agua se halla también implicada como fuente de epidemias hospitalarias por *P. aeruginosa*. La contaminación del agua corriente, de piletas, palanganas, tanques de hidroterapia, máquinas de hielo y otros reservorios del medio ambiente hospitalario han sido fuente de infección de *P. aeruginosa*.

La contaminación de las manos de los trabajadores de la salud con *P. aeruginosa*, puede contribuir a la infección cruzada entre pacientes.

c) *Staphylococcus aureus*

El género *Staphylococcus* comprende microorganismos que están presentes en la mucosa y en la piel de los humanos y otros mamíferos y aves, incluyendo a 35 especies y 17 subespecies, muchas de las cuales se encuentran en los humanos. Las especies que se asocian con más frecuencia a las enfermedades en humanos son *Staphylococcus aureus* (el miembro más virulento y conocido del género), *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus capitis*, "Staphylococcus afarensis" y *Staphylococcus haemolyticus*.



Reino: Bacteria
Filo: Firmicutes
Clase: Bacilli
Orden: Bacillales
Familia: Staphylococcaceae
Género: *Staphylococcus*
Especie: *S. aureus*

Figura 6. *Staphylococcus aureus*

El *S. aureus* (Figura 6) es un coco inmóvil, de 0.8 a 1 micrómetro de diámetro, que se divide en tres planos para formar grupos de células irregulares semejantes a racimos de uvas. Unas pocas cepas producen una capsula o capa de baba que incrementa la virulencia del microorganismo. El *S. aureus* es un microorganismo grampositivo pero las células viejas y los microorganismos fagocitados se tiñen como gramnegativos.

El *Staphylococcus aureus* es un agente patógeno que actúa como un microorganismo saprofito, se encuentra en la piel del individuo sano pero en ocasiones en que las defensas de la piel caen puede causar enfermedad. El principal grupo de riesgo son pacientes hospitalizados o inmunocomprometidos. Causan infección de piel y partes blandas, neumonía, sepsis con o sin metástasis

(osteítis, artritis, endocarditis, abscesos localizados), orzuelos. Enfermedades por toxinas (síndrome de la piel escaldada, síndrome del shock tóxico y gastroenteritis).

2.2.2. HONGOS

Se han detectado casi 700 géneros y especies causantes de micosis en el hombre, de ellos los más habituales en nuestro entorno son *Candidas*, *Aspergillus*, etc., aunque hay otras como *Fusarium*, *Alternaria*, etc que están empezando a producir impacto.¹¹⁻²³ El desarrollo de una infección fúngica depende del estado de los mecanismos defensivos del hospedador, los factores de virulencia del hongo y la dosis infectante o tamaño del inóculo fúngico.^{5-10,53}

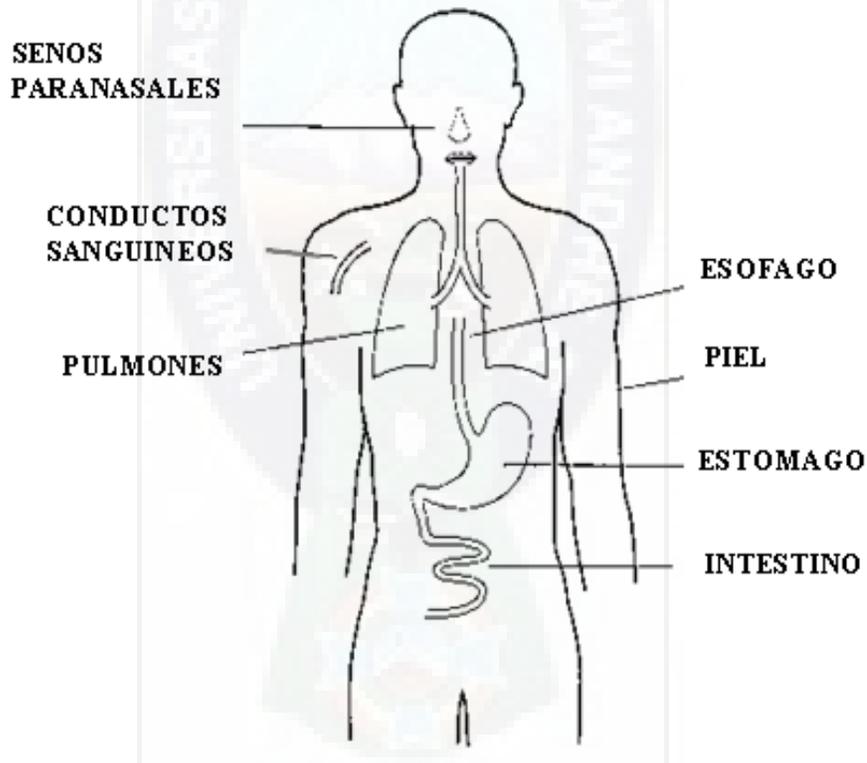


Figura 7. Puertas de entrada de hongos patógenos y hongos oportunistas que provocan micosis.

Las enfermedades por hongos patógenos humanos (Figura 7), las podemos diferenciar en dos grandes grupos: a) las ocasionadas por patógenos verdaderos, en donde el hongo es capaz de producir enfermedad en el huésped normal cuando el

inoculo es suficientemente grande y b) un segundo grupo en que el desarrollo de la afección se relaciona más con la respuesta inmunitaria deprimida del individuo, denominándose infección oportunista. Los hongos oportunistas han emergido como causa importante de morbilidad y mortalidad y el aumento de estas micosis emergentes va en paralelo al incremento de pacientes inmunodeprimidos.^{38,39}

2.2.2.1. MICOSIS

En una micosis, se puede distinguir entre dos fuentes de infección:

- a) **Endógenas.** Las infecciones endógenas están causadas por especies de hongos que se encuentran entre los organismos comensales que habitan naturalmente en el cuerpo, como *Candida albicans*. Los cambios en el cuerpo debidos a una medicación o a una enfermedad, como la diabetes, pueden activar el paso de la fase no infecciosa (saprofítica) a la infecciosa (parasitaria).
- b) **Exógenas.** En una infección exógena, los hongos se transmiten desde el exterior del cuerpo.

Los hongos pueden originar patologías muy variadas que pueden ser clasificadas (Figura 8) de acuerdo con su localización inicial en:

a) MICOSIS SUPERFICIALES

Son aquellas adquiridas por contacto y que afectan a la capa externa del estrato córneo de la piel y a la cutícula del pelo. Algunos de los agentes etiológicos causantes de este tipo de infecciones son *Malassezia* spp. (*Pitiriasis versicolor*), *Trichophyton mentagrophytes* y *Fusarium* spp.

b) MICOSIS CUTANEAS

Difieren de las superficiales en que pueden afectar a capas más profundas de la piel provocando la respuesta inmunitaria del huésped. Los dermatofitos son los

principales causantes de este tipo de infecciones cutáneas siendo *Trichophyton*, *Epidermophyton* y *Microsporum* los géneros más frecuentemente implicados. La etiología de las infecciones cutáneas no se encuentra limitada a este grupo de hongos ya que algunos hongos no dermatofitos pueden también estar implicados en dicha infección. Así por ejemplo *Candida* spp, puede originar candidiasis mucocutánea. Las micosis cutáneas pueden evolucionar ocasionando lesiones subcutáneas.

c) MICOSIS SUBCUTANEAS

La infección se produce frecuentemente por inoculación traumática. Los agentes causales de este tipo de micosis pertenecen a un grupo heterogéneo de microorganismos de escasa capacidad patógena, aislados frecuentemente del suelo o a partir de materia orgánica en descomposición. Afectan a las capas profundas de la dermis y tejido celular subcutáneo pudiéndose extender a músculo y hueso.

d) MICOSIS SISTEMICAS

En las micosis sistémicas se produce la afectación de dos o más órganos. Pueden afectar a huéspedes sanos, siendo los hongos dimórficos los agentes causales, los cuales han desarrollado mecanismos para proliferar en los tejidos del huésped inmunocompetente. Sin embargo, son mucho más frecuentes en pacientes inmunocomprometidos, siendo en este caso ocasionadas por hongos oportunistas que usualmente no causan infección en el huésped sano.

• HONGOS OPORTUNISTAS

Reciben el nombre de hongos oportunistas un grupo heterogéneo de hongos del suelo, que presentan una distribución geográfica amplia y que tradicionalmente son considerados como no patógenos. Sin embargo, en determinadas circunstancias en las que el huésped se encuentra inmunocomprometido, pueden causar un cuadro infeccioso. Generalmente suelen ser pacientes con alteraciones en la respuesta

inmunitaria inespecífica, como los neutropénicos o aquellos en los que la afectación inmunitaria incluye también la respuesta adaptativa, como es el caso de individuos sometidos a tratamientos sistémicos con corticoides o radioterapia y/o quimioterapia antineoplásica. Así también el incremento de la incidencia de las infecciones oportunistas está relacionado, y evoluciona paralelamente con los avances en la cirugía de trasplantes de órganos sólidos y de médula ósea que, aunque permiten prolongar la vida de pacientes con enfermedades malignas, provocan un estado de inmunodepresión severa que predispone al establecimiento de este tipo de infecciones, como en aquellos con implantaciones prolongadas de catéteres intravasculares, terapias antimicrobianas continuas, prótesis o heridas traumáticas, fármacos antitumorales o radiación, aparecen también en pacientes tratados con hormonas, como el cortisol, en sujetos con diabetes y en quienes han seguido tratamiento antibiótico durante mucho tiempo, procedimientos terapéuticos, como el uso indiscriminado de antibióticos y esteroides, citotóxicos, nutrición parenteral así como a drogadicción, neoplasias, colagenopatías y diabetes mellitus.⁹⁻¹⁵

La aparición del SIDA a finales de la década de los 70 como enfermedad inmunosupresiva, ha contribuido también a incrementar el desarrollo de infecciones oportunistas, entre las cuales las micosis ocupan un importante lugar. La severidad de las micosis oportunistas depende principalmente de la incapacidad del sistema inmune del individuo para limitar el proceso infeccioso, de los factores de virulencia del hongo y de las condiciones del microambiente en que se lleva a cabo la interacción hospedero-parásito.

Los hongos que se suelen aislar en estos casos es *Aspergillus*, hongos que pertenecen al género *Candida*, en especial *Candida albicans* (el cual produce candidiasis), que pueden infectar los órganos internos y las membranas mucosas de la boca, garganta y tracto genital. En personas con inmunidad deteriorada, este organismo puede originar una infección crónica.^{8-23,40-42}

MICOSIS PROFUNDA

MICOSIS SUPERFICIAL

MICOSIS CUTANEA

MICOSIS SUBCUTANEA

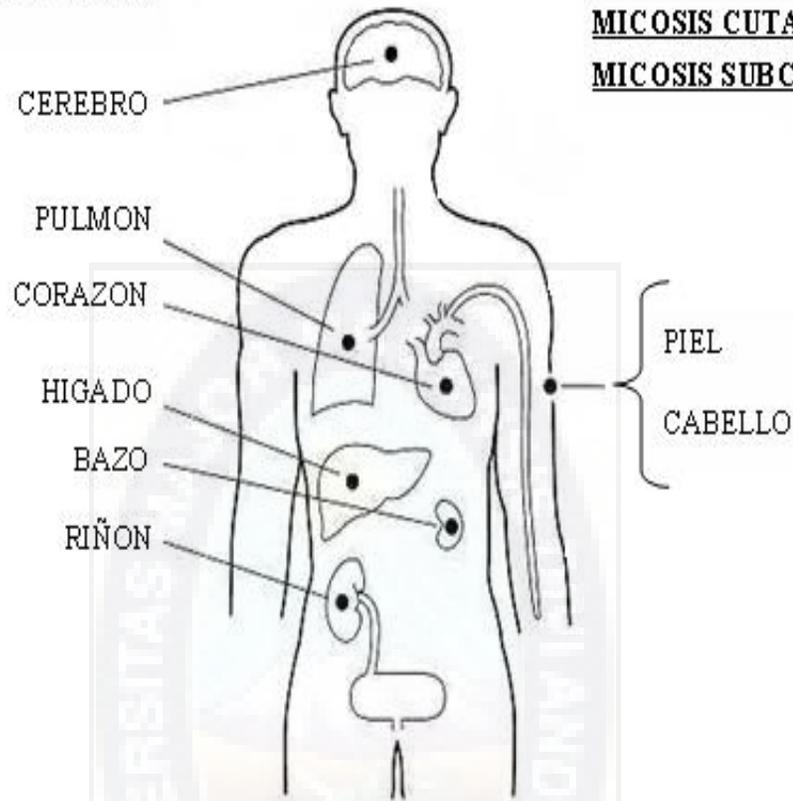


Figura 8. Principales tejidos que afectan la micosis profunda en comparación con la micosis superficial, cutánea y subcutánea.

2.3. FORMAS IMPORTANTES DE INFECCION FUNGICA

2.3.1. ASPERGILOSIS

Son un amplio y heterogéneo grupo de enfermedades oportunistas causadas por hongos filamentosos del genero *Aspergillus* spp, no contagiosas, esporádicas, producidas por diferentes mecanismos patogénicos (Figura 9). Las formas clínicas de presentación son de diferente gravedad y dependen de factores relacionados con el huésped. Por lo cual la definición excluye a las enfermedades causadas por toxinas (micotoxinas).^{43,44}

a) Epidemiologia

El género *Aspergillus* es uno de los más frecuentemente identificados en los casos descritos de infecciones fúngicas que afectan fundamentalmente a pacientes inmunocomprometidos. Estudios ambientales indican que el hombre “sano” puede inhalar diariamente cientos de esporas de *Aspergillus* que son fácilmente eliminadas por el sistema inmune, pero presenta patologías en personas con prolongada y severa granulocitopenia, como pacientes con enfermedades hematológicas, receptores de órganos sólidos y de médula ósea y pacientes con elevadas dosis de corticosteroides.⁴⁵⁻⁴⁷ Pacientes sometidos a procedimientos quirúrgicos como: cirugía cardiovascular, también implantes protésicos como los de cadera. Pacientes en hemodiálisis. Pacientes con patología pulmonar previa como bronquitis crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fibrosis quística, tuberculosis. Pacientes inmunosuprimidos, inmaduros, recién nacidos pretérmino.^{48,49}

La enfermedad se produce como consecuencia de la inhalación de esporas contenidas en el aire, por lo que los senos paranasales y los pulmones son los sitios en que asienta primariamente la enfermedad con mayor frecuencia. También pueden invadir el oído externo y la piel traumatizada. En inmunocompetentes la enfermedad suele ser invasiva, diseminada, grave y muchas veces fatal.⁵⁰⁻⁵²

b) Etiologia

Las numerosas especies del género *aspergillus* se encuentran ampliamente distribuidas en el medio ambiente. Por lo tanto son especies cosmopolitas de distribución universal. Solo unas pocas especies de las más de 500 incluidas en este género se han descrito como causantes de patología en el hombre. *A. fumigatus* es la de mayor interés, por ser invasiva en enfermos

inmunodeprimidos. Otras especies que pueden causar enfermedad son *A. Flavus*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. nidulans*, *A. versicolor*, *A. glaucus*, etc.

Las especies del genero *Aspergillus* son termófilas, capaces de crecer a temperaturas superiores a 50 °C, lo cual posibilita su desarrollo en restos orgánicos como estiércol, vegetación muerta, al calentarse por reacción de fermentación bacteriana.

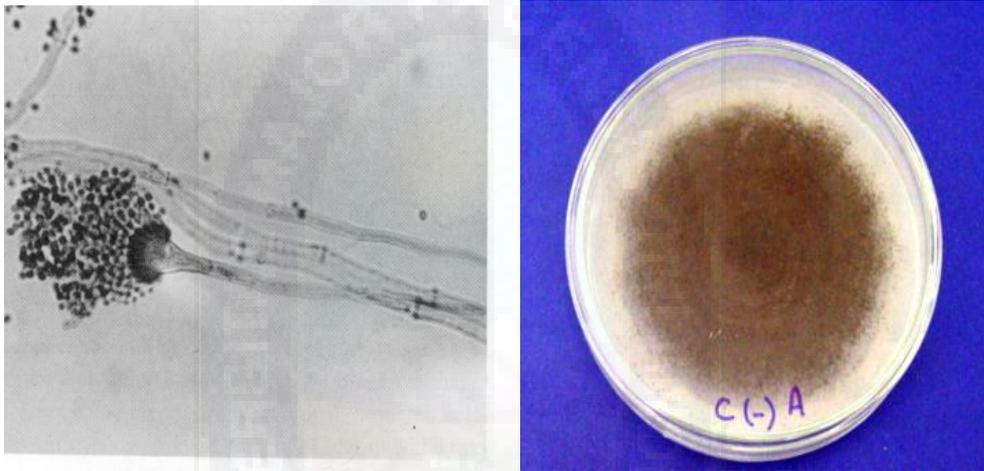


Figura 9. *Aspergillus niger* visto al microscopio y placa de incubación.

2.3.2. CANDIDIASIS

Candida albicans forma parte de la micro biota normal humana del tracto gastrointestinal, urinario, genital y es considerado un patógeno oportunista de enfermedades denominadas “candidosis o candidiasis”, causando enfermedades fúngicas que se presentan generalmente en individuos inmunosuprimidos o sometidos a tratamientos extensos con antibióticos, aunque la mayoría de las infecciones producidas por *Candida albicans* son de origen endógeno, es posible la transmisión inter-humana, como ser la de la madre vía vaginal al hijo y también puede adquirirse en ambientes hospitalarios. Se reporta que las candidiasis más frecuentes que se detectan en pacientes son de tipo vaginal y en uñas. El agente primario para el tratamiento en mucosas es la Nistatina y

cutáneas es el Clotrimazol vía tópica, para el sistema digestivo Ketoconazol y para las diseminadas Anfotericina B, también se utiliza Fluconazol por sus diferentes formulaciones, vías de administración y la relativa carencia de toxicidad. Aunque existen estos y otros antifúngicos, algunos de ellos presentan desventajas serias, debido a que actúan sólo como fungistáticos o causan daños colaterales, así como existe un aumento de resistencia a las drogas clásicas y tratamientos tradicionales con antifúngicos por mutación de cepas previamente sensibles y en otros casos existen proteínas transportadoras en el huésped que están en concentración elevada provocando la salida del fármaco, reduciendo su acumulación intracelular.^{36,50,51}

En *Candida albicans* (Figura 10) el dimorfismo presenta características especiales ya que cuando se encuentra colonizando las mucosas se desarrolla fundamentalmente como levadura, mientras que cuando invade los tejidos se observan levaduras e hifas.

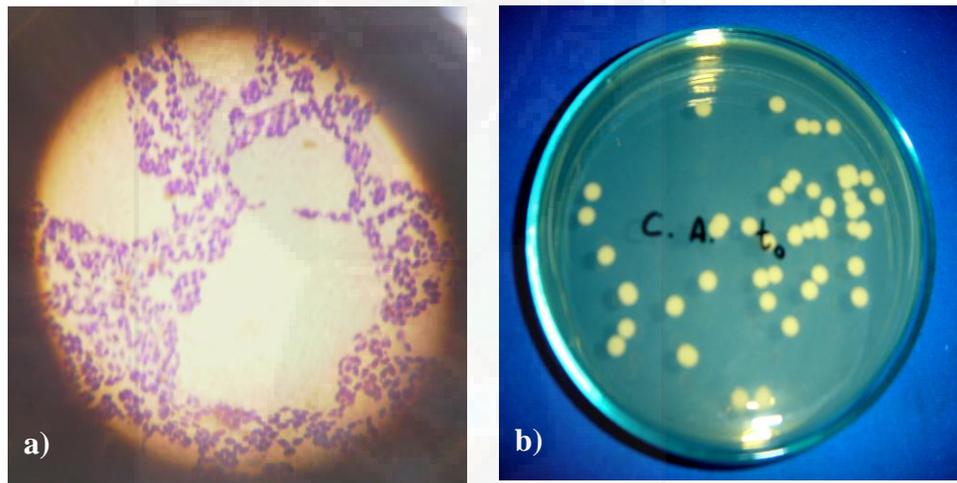


Figura 10. *Candida albicans* a) vista al microscopio y b) en medio agar Sabouraud Dextrosa.

Los filamentos de *Candida albicans* facilitan la adhesión a las células del hospedador, penetración tisular, a la vez que dificultan la fagocitosis. Las hifas son más difíciles de fagocitar que las levaduras y permiten el escape del interior

de la célula fagocítica al romper la membrana citoplásmica del fagocito. La adhesión de los hongos a las superficies del hospedador es un paso fundamental en la patogenia de la infección fúngica. Han sido caracterizadas un gran número de adhesinas, siendo en su mayor parte proteínas o glicoproteínas que se unen a receptores del hospedador de naturaleza similar. En *Candida albicans* se han descrito también adhesinas para materiales plásticos utilizados en medicina como las prótesis y los catéteres.⁵⁰⁻⁵²

Las infecciones fúngicas adquieren diferentes formas aún habiendo penetrado en una misma zona cutánea, algunas descripciones más frecuentes de candidiasis en anatomía patológica son:

- Candidiasis cutáneas: Se produce una dermatitis crónica en la que el hongo se extiende hasta el estrato corneo del epitelio.
- Candidiasis sistémicas: *C. albicans* forma microabscesos en los que se aprecian grandes cantidades de hifas y levaduras.

La micosis oportunista más frecuente es la candidiasis, se estima que la enfermedad es responsable de casi la cuarta parte de las defunciones micóticas. Una de las formas clínicas más comunes de la enfermedad es la estomatitis micótica o Muget, que se caracteriza por placas blancas ligeramente adheridas a la mucosa bucal, también puede encontrarse en faringe y en esófago. La dermatitis de los pañales y las quelitis son causadas frecuentemente por *Candida albicans*. El intertrigo de los grandes pliegues, muget vulvovaginal y onixis con perionixis (especialmente en mujeres adultas cuyo trabajo exige la inmersión frecuente de las manos en el agua). En el adulto la candidiasis casi siempre se asocia a enfermedades o condiciones debilitantes, tales como diabetes, tuberculosis, sífilis, cáncer, obesidad, transplantes de órganos, VIH-SIDA y otras.^{40,46}

Aunque la candidiasis suele limitarse a las mucocutáneas, puede darse la infección sistémica por diseminación sanguínea, sobre todo en pacientes muy debilitados y sometidos durante un tiempo prolongado a tratamiento con antibióticos. Estos casos muchas veces se presentan por lesiones ocasionadas por exploración médica con catéteres, inserción de estos instrumentos en la uretra o por intervenciones quirúrgicas. La localización puede ser en estos casos en cualquier órgano y con mayor frecuencia en ojos, riñones y huesos. La alimentación rica en hidratos de carbono puede ser otro elemento que facilita la colonización del agente. La mayor parte de las infecciones tiene una fuente endógena. La infección puede transmitirse por contacto con las secreciones de la boca, piel, vagina y heces de enfermos o portadores.^{38,46}

La transmisión puede ser por ropas, objetos y también por contacto sexual. Estos hongos están siempre presentes en la piel y en la mucosa del tracto digestivo, genitourinario y respiratorio de la mayoría de las personas, pero se encuentran controlados por otros microorganismos no patógenos. Cuando se produce un desequilibrio, el aumento desmedido de la población de hongos produce esta u otras micosis.

En los animales son especialmente sensibles los jóvenes. En cachorros de perro, gato, terneros y potros, se produce una estomatitis y enteritis de origen micótico, observándose placas de color blanco a grisáceo como consecuencia de inflamación pseudomembranosa de la mucosa. En adultos las formas patogénicas dependen de la especie. En cerdos se presentan infecciones en la porción terminal del esófago y en la zona esofágica del estómago. En las úlceras estomacales puede hallarse *C. candidum*, sin embargo en vacas es corriente la mastitis producida por *C. albicans*, así como la aparición de metritis y/o vaginitis, al igual que en las yeguas. En los machos, especialmente

en caballos y toros sementales, la forma clínica más frecuentemente observada es la candidiasis genital. En gallina, pavo y otras aves, puede haber infección bucal, del esófago y del buche con zonas blanquecinas pseudomembranosas, generalmente en las aves jóvenes.⁵³⁻⁵⁵

a) Epidemiología

La candidiasis afecta normalmente las zonas húmedas y cálidas de la piel y las mucosas, como las axilas, la boca, uñas, el glande y la vagina; las erupciones cutáneas asociadas con el uso de pañales suelen ser de este tipo. Representa un 25% de las micosis cutáneas. Coloniza la piel, el tracto gastrointestinal o vagina de individuos sanos. Las infecciones por *Candida spp.*, se producen por tres mecanismos: por invasión de cepas que colonizan del tracto gastrointestinal o la piel; como consecuencia de transmisión vertical en el neonato, o en raras ocasiones por transmisión horizontal. Es posible la transmisión nosocomial a través de comida, objetos inanimados y contacto directo. En el paciente oncológico, el origen de la candidiasis diseminada suele ser endógeno, aunque también es común que sea por infección del catéter. Los pacientes con infección VIH se colonizan con frecuencia por múltiples cepas de *C. albicans*. Las recurrencias de candidiasis oral o esofágica que ocurren tras el tratamiento pueden ser debidas a la misma cepa o hasta en la mitad de los casos a una cepa diferente de la inicial. La candidiasis es la causa más frecuente de vaginitis, al ser *Candida albicans* parte de la flora normal de la vagina. Las condiciones patógenas pueden producirse por el uso de duchas, que eliminan parte de los microorganismos que controlan (como los lacto bacilos) su desarrollo elevado. Las probabilidades de contraer candidiasis aumentan en pacientes obesos y diabéticos; el consumo de antibióticos y anticonceptivos también incrementa el riesgo, así como alteraciones hormonales debidas al embarazo. En pacientes con deficiencia inmunológica, neoplasias, diabetes, lupus eritematoso y

linfomas, la infección puede extenderse, con consecuencias bastante graves.^{6,9,16,52-55}

b) Etiología.

Los hongos están siempre presentes en el cuerpo humano, pero la presencia natural de otros microorganismos, previenen su crecimiento descontrolado. Sin embargo, perturbaciones externas, como el uso de ciertos detergentes, variaciones del pH, o internas, como cambios hormonales o fisiológicos, pueden causar alteraciones de la biota y resultar en un crecimiento anormal de los hongos. El embarazo, uso de anticonceptivos, sexo vaginal después de sexo anal, uso de lubricantes que contienen glicerina, son factores relacionados con infección por hongos. La diabetes y el uso de antibióticos también parecen tener incidencia en la micosis.

Aunque se han comunicado unas 200 especies de *Candida*, sólo 10 se han descrito asociadas a enfermedad. La más frecuente, es *Candida albicans*, que supone entre el 60-80% del total causante de enfermedad, cada vez se describen con más frecuencia otras especies de *Candida no albicans*, que incluyen *C. parapsilosis*. Las infecciones fúngicas adquieren diferentes formas aun habiendo penetrado en una misma zona cutánea.

2.4. PRODUCTOS NATURALES

La aplicación excesiva e indiscriminada de bactericidas y fungicidas para el control de enfermedades agrícolas ha ocasionado un sin número de problemas de resistencia, afectando al medio ambiente y ocasionando complicaciones a la salud humana. Además de que elevan los costos de producción por la utilización de esta clase de sustancias. Ante esta situación, el nuevo enfoque en el combate de los fitopatógenos trata de integrar nuevas opciones encaminadas a la protección y aumento de cosechas pero con alternativas no perjudiciales; en este caso la utilización de sustancias de

origen natural, que las mismas plantas han desarrollado a través de la evolución pueden ser una alternativa para limitar poco a poco el uso de agroquímicos. Esto pudiera eliminar varios efectos adversos causados por el uso de compuestos sintéticos debido a la rápida biodegradabilidad de los metabolitos orgánicos, ya que estos desaparecen con facilidad del medio ambiente aéreo y del suelo después de que son aplicados en el campo.⁵⁶⁻⁵⁸

Como parte de su metabolismo, las plantas producen una diversidad de compuestos orgánicos, de los cuales la mayoría no parece tener participación directa en su crecimiento y desarrollo. A estos componentes se les conoce como metabolitos secundarios, el reconocimiento de las propiedades de los metabolitos secundarios ha conducido a la búsqueda de nuevos fármacos, antibióticos, insecticidas y herbicidas. Ejemplos de agroquímicos derivados de productos naturales son los piretroides sintéticos, la azadiractina, la nicotina, la rotenona, la sabadilla y la ryania. Por su lado, la industria farmacéutica muestra el descubrimiento de medicamentos originados a partir de productos naturales, entre otros la aspirina, la digoxina, la morfina y la quinina.⁵⁹⁻⁶¹

La Fitoterapia es una parte de la Terapéutica, cuyo desarrollo nos permite disponer de medicamentos a base de plantas, para prevenir, atenuar o para curar un estado patológico, generalmente con una actividad suave o moderada, con márgenes terapéuticos relativamente amplios, que dan lugar a tratamientos menos agresivos. Por lo cual se considera a la Fitoterapia, útil en el tratamiento de afecciones leves o moderadas, así como en afecciones crónicas. Civilizaciones antiguas han utilizado los productos naturales o productos de origen vegetal, así los egipcios las utilizaban para preservar a sus muertos; los griegos utilizaban para algunas enfermedades comunes de la época como indigestión y neumonía, también como conservadores de sus alimentos. El conocimiento empírico acerca de las plantas y sus efectos curativos se acumuló durante muchos milenios y posteriormente pasó a ser parte integral de

sistemas y tradiciones curativas de las Culturas. La información sobre principios y prácticas era transmitida mediante la tradición oral de generación en generación. Sólo una mínima parte de estos conocimientos iban acompañados de instrucciones escritas. Es así que históricamente, las plantas medicinales siempre han estado ligadas con el bienestar del ser humano. Particularmente drogas y extractos, han pasado de tener un papel hegemónico en el arsenal terapéutico, de un discreto segundo plano, para volver a tener, en las dos últimas décadas una presencia cada vez mayor en la terapéutica.^{60,61}

En Latino América a través de cerámicas, tejidos y grabados, actualmente se tiene bastante información acerca del uso de plantas medicinales en tiempos precolombinos. Aunque en el siglo pasado el empuje de la industria farmacéutica, fundamentada en el empleo de plantas se consideraba como una práctica primitiva e irracional, en décadas recientes, la fitoterapia ha experimentado un extraordinario resurgir. Esta disciplina defiende que frente a los tratamientos químicos las plantas medicinales ofrecen numerosas ventajas. Los principios activos están equilibrados en las especies vegetales por la presencia de sustancias complementarias que se potencian entre sí y no se acumulan en el organismo limitando los efectos secundarios. Por lo tanto la principal ventaja de la fitoterapia reside en su propio modo de acción ejerciendo un efecto más suave y profundo sin agredir al organismo humano.

El retorno hacia el uso de los productos de origen natural en terapéutica se ha visto favorecido por:

- El descubrimiento de graves efectos secundarios en fármacos de síntesis.
- Un mayor conocimiento químico, farmacológico y clínico de las drogas vegetales y sus productos derivados.
- El desarrollo de nuevas formas de preparación y de administración de las drogas vegetales y sus extractos.
- El desarrollo de métodos analíticos que garantizan un mejor control de calidad.

- El aumento de la automedicación, ya que los productos fitoterápicos son, en general, menos peligrosos y por tanto más aptos para la automedicación.
- El cambio del perfil del consumidor que, desde finales de la década de 1980, prefiere los productos naturales en vez de los productos sintéticos en todos los segmentos del mercado, abarcando de esta manera los sectores de salud, alimentación, higiene y vestimenta.

En Europa y Estados Unidos y Canadá ha renacido el interés por los productos naturales estimulado por un mayor conocimiento de la acción de las plantas y la elaboración de normas relativas a la seguridad, calidad y fiabilidad de estos preparados. Por ello y por el enorme potencial curativo que posee el mundo vegetal, la fitoterapia se está transformando en una práctica muy distinta a la de nuestros antepasados. Los medicamentos utilizados en esta nueva fitoterapia, medicamentos herbarios, fitoterápicos o medicamentos fitoterápicos, deben ajustarse a los requerimientos actuales de seguridad, eficacia y calidad necesarios para cualquier medicamento. Por lo cual, la Organización Mundial de la Salud (OMS) en la resolución WHA 42.43 (1989) de la Asamblea Mundial de la Salud sugirió a los países miembros a realizar una comprensiva evaluación de los sistemas tradicionales de salud a efectos de llevar a cabo, respecto a las plantas, un listado de especies a ser incorporadas en las farmacopeas nacionales, pero que se ajusten a los estándares de seguridad, eficacia y calidad recomendados para los productos de salud humana.⁶⁰⁻⁶⁵

Muchas de las drogas vegetales internacionalmente reconocidas y utilizadas como materia prima de medicamentos (manzanilla, pasiflora, ginseng, ginkgo, etc.) ya tienen su incorporación en las Farmacopeas internacionales, con normas que definen su identidad y calidad. Así mismo, muchas Universidades y entidades gubernamentales han centrado sus investigaciones en la certificación de seguridad y eficacia a través de estudios farmacológicos, toxicológicos y clínicos. Hoy en día, la Farmacopea Europea y la USP-NF (United State Pharmacopoeia-National Formulary)

incluyen una gran cantidad de monografías de drogas vegetales. En nuestra región de América del Sur, las investigaciones botánicas, químicas o farmacológicas sobre plantas o drogas vegetales autóctonas representan un verdadero desafío, donde recopilar esa información y desarrollar metodologías de análisis para la identificación y evaluación de calidad de dichas drogas representa una importante contribución tanto a la Industria Farmacéutica, así como a la salud de la población en general.⁶¹⁻⁶⁴

En la actualidad el consumo mundial de las llamadas plantas medicinales y sus derivados se traduce en volúmenes considerables de intercambio comercial. Solo en Estados Unidos, en el año 2002, las ventas en tiendas minoristas de productos a base de drogas vegetales alcanzaron casi 350 millones de dólares, sin encontrarse incluidas en estas cifras las ventas producidas en otros canales de comercialización. En Europa el mercado de los fitofármacos era estimado en el año 2002 en 400 millones de dólares, con un crecimiento anual del 12%.

Si bien la medicina moderna está bien desarrollada en la mayor parte del mundo, grandes sectores de la población de los países en desarrollo todavía dependen de las plantas medicinales y los medicamentos herbarios para su atención primaria. La organización mundial de la Salud estima que la atención médica del 80% de la población mundial depende de la medicina tradicional, incluyendo la herboristería (Figura 11). De esta manera las plantas juegan un papel primordial en los sistemas de salud pública de países en desarrollo. Es más, durante las últimas décadas, el interés del público en las terapias naturales ha aumentado enormemente en los países industrializados y se halla en expansión el uso de plantas medicinales y medicamentos cuyas materias primas son drogas vegetales o sus extractos.

Desde tiempos remotos hasta nuestros días, las plantas han sido empleadas por las diferentes civilizaciones para aliviar los males de la humanidad. Indudablemente, la fitoterapia es considerada la medicina más ancestral por excelencia.⁶²⁻⁶⁴ El campo de

las medicinas alternativas o medicinas complementarias se ha incrementado notablemente durante los últimos años, tal es así que según estadísticas de la OMS el 80% de la población utiliza la medicina natural.⁶⁵⁻⁶⁷

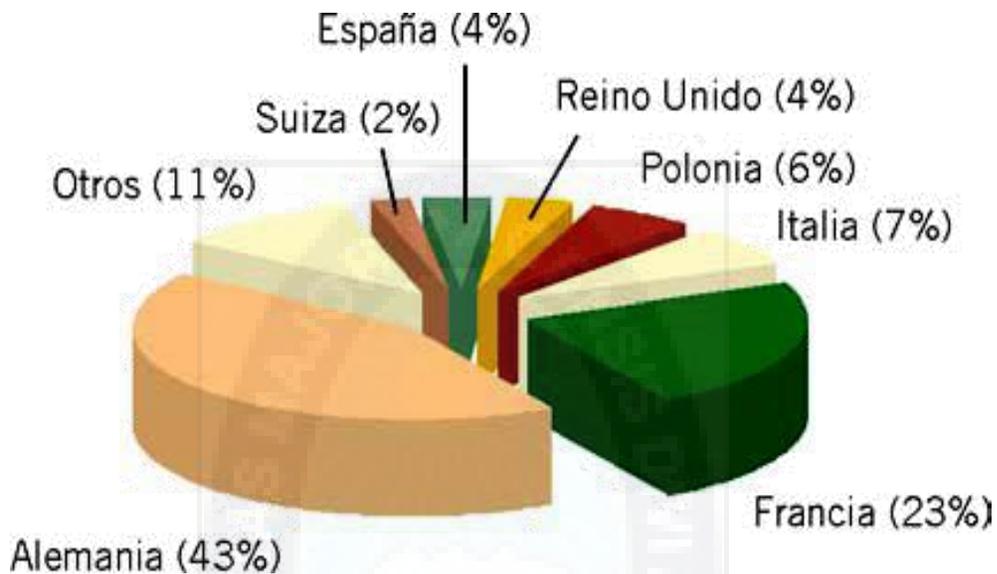


Figura 11. Mercado Europeo de la Fitoterapia en el 2003

Todo lo anterior nos lleva a la necesidad de investigar un nuevo, seguro y efectivo antimicrobiano, que es el principal desafío de la industria farmacéutica. El uso de fitocomponentes con propiedades microbicidas y/o microbistáticas, además de incrementar el gradiente de acción en el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos, también promueve el uso alterno de ciertas plantas y el desarrollo de las regiones donde ellas crecen, incentivando al lugareño a asentarse y tener un medio de sustento familiar.

Por otro lado, las bacterias y hongos causan importantes pérdidas a la agricultura mundial, estos patógenos son importantes porque causan enfermedades devastadoras. La aplicación excesiva e indiscriminada de bactericidas y fungicidas para el control de enfermedades agrícolas ha ocasionado un sin número de problemas de resistencia, afectando al medio ambiente y ocasionando complicaciones a la salud humana. Además de elevar los costos de producción. Ante esta situación, el nuevo enfoque en

el combate de los fitopatógenos trata de integrar nuevas opciones encaminadas a la protección y aumento de cosechas pero con alternativas no perjudiciales; en este caso la utilización de sustancias de origen natural, que las mismas plantas han desarrollado a través de la evolución pueden ser una alternativa para limitar poco a poco el uso de agroquímicos. Esto pudiera eliminar varios efectos adversos causados por el uso de compuestos sintéticos debido a la rápida biodegradabilidad de los metabolitos orgánicos, ya que estos desaparecen con facilidad del medio ambiente aéreo y del suelo después de que son aplicados en el campo.^{11-13,59,68,69}

Como parte de su metabolismo, las plantas producen una diversidad de compuestos orgánicos, de los cuales la mayoría no parece tener participación directa en su crecimiento y desarrollo. A estos componentes se les conoce como metabolitos secundarios, el reconocimiento de las propiedades de los metabolitos secundarios ha conducido a la búsqueda de nuevos fármacos, antibióticos, insecticidas y herbicidas. Ejemplos de agroquímicos derivados de productos naturales son los piretroides sintéticos, la azadiractina, la nicotina, la rotenona, la sabadilla y la ryania. Por su lado, la industria farmacéutica muestra el descubrimiento de medicamentos originados a partir de productos naturales, entre otros la aspirina, la digoxina, la morfina y la quinina.⁷⁰⁻⁷²

2.5. BACCHARIS COMO PLANTA UTILIZADA EN MEDICINA TRADICIONAL.

Dada la gran biodiversidad de nuestra región, debido a las condiciones ambientales extremas, como ser cambios de temperatura entre el día y la noche, la gran altura y el aislamiento, han permitido el desarrollo de un equilibrio ecológico, sensible a la contaminación y a la intervención del hombre, las especies vegetales que crecen en esta región constituyen un valioso material de estudio para el desarrollo de diferentes investigaciones que permitan alcanzar un mayor conocimiento de la vegetación con el

fin de contribuir a preservar el recurso vegetal y permitir una explotación racional de su vegetación autóctona medicinal, es así que la composición química de las diferentes especies, en unión a sus propiedades farmacológicas, microbiológicas, permitirán valorizarlas, ofreciendo un respaldo científico que avale su aplicación en la medicina tradicional. Tenemos varias familias de plantas que incluyen especies que producen exudados resinosos que están presentes en Bolivia, especialmente en la zona del Altiplano, entre ellas se encuentran las especies de la familia *Asteraceae*, del género *Baccharis* que tienen como característica la producción de resinas en la superficie de hojas y tallos.^{28,33}

La familia *Asteraceae* es un grupo sistemático muy numeroso dentro de las Angiospermas, comprende cerca de 1.100 géneros y 25.000 especies. Son plantas de aspecto extremadamente variado, incluyendo principalmente pequeñas hierbas o arbustos y raramente árboles. Cerca de 98% de los géneros están constituidos por plantas de pequeño porte y se encuentran en todos los tipos de habitats, principalmente en las regiones tropicales, montañosas de América del Sur.⁷³

Las plantas de esta familia son estudiadas en cuanto a su composición química y actividad biológica, algunas están proporcionando o desarrollando nuevos fármacos, insecticidas, entre otros. Numerosos trabajos científicos realizados con las especies de la familia *Asteraceae* reportan el aislamiento de una variedad de metabolitos secundarios donde destacan los Flavonoides, de reconocida importancia para la medicina, en el tratamiento y prevención de varias dolencias.^{74,75}

El género *Baccharis* es el más rico en especies dentro de la tribu *Asteraceae*, estimándose su número entre 400 y 500. Su distribución geográfica (Figura 12) es exclusivamente americana: se extiende desde el sur de los Estados Unidos de América hasta el extremo austral de Argentina y Chile. En esta vasta área se encuentra

profusamente diversificado, ocupando gran variedad de ambientes y constituyendo un importante elemento en numerosas formaciones vegetales.^{76,77}

Las especies del género *Baccharis* son en general arbustos, miden como media de 0,5 a 4,0 m de altura. Presentan un elevado valor socio-económico, sirven de cerco de delimitación de espacios, ayudan a evitar la erosión de los suelos, con amplia dispersión en las regiones andinas del país, donde un gran número son utilizadas en la medicina popular para el control o tratamiento de varias dolencias. Se consumen principalmente en forma de infusiones para males del estómago, hígado, úlceras, diarrea, anemias, diabetes, inflamaciones urinarias, amigdalitis, dolencias de la próstata, en forma de cataplasmas para inflamaciones, siendo también descritas como remedio para el proceso de desintoxicación del organismo.^{78,79}



Figura 12. Distribución geográfica del género *Baccharis*.

El estudio de especies del género *Baccharis* ha mostrado grandes avances debido a su reputación en el uso de la medicina casera en América Latina. Su fitoquímica destaca la presencia de Flavonoides, Diterpenos y Triterpenos, observándose mayor acumulo de Flavonas, Flavonoides y Diterpenos Labdanos y Clerodanos.⁸⁰⁻⁸²

Debido a que varios tipos de flavonoides son conocidos por conferir resistencia frente al ataque de microorganismo, se han realizado estudios químicos-estructurales realizados en estas especies, lo que ha llevado al aislamiento y determinación estructural de flavonoides.⁸³⁻⁸⁵

Los flavonoides, a pesar de ser sustancias propias del metabolismo secundario, desempeñan funciones importantes para la propia planta productora y para el medio en que la rodea. Tiene funciones esencialmente ecológicas. Los flavonoides proporcionan a las plantas colores que atraen a los insectos para efectuar la polinización cruzada, y también disuasorios nutritivos de defensa frente a los animales fitófagos. Los flavonoides son una respuesta adaptativa de las plantas a la intensa radiación Ultravioleta, donde estos componentes protegen a las plantas de los nocivos efectos de los rayos solares, así los antocianinos son pigmentos rojos o azules, las catequinas y proantocianidinas son incoloras pero fluorescentes al UV. Algunos flavonoles son amarillos, mientras que otras como la Quercetina y las flavonas son blancas.⁸⁶⁻⁸⁸

En la búsqueda de productos naturales que presenten una actividad inhibitoria del crecimiento de microorganismos patógenos y fitopatógenos, se investiga el papel que desempeñarían los exudados resinosos producidos por plantas, se ha propuesto que ellos serían la primera barrera protectora, otorgando por una parte una protección puramente mecánica a través de sus propiedades pegajosas atrapando a los predadores y por otra dando una protección química por la presencia de los metabolitos secundarios^{89,90} que la componen, que le otorgarían a la resina propiedades antimicrobianas, antioxidantes y citotóxicas entre otras.⁹¹⁻⁹³

Estudios sobre el género *Baccharis* muestran la presencia de Labdanos, Clerodanos, Kauranos, Acido Cumárico, Flavonoides y Terpenoides.⁹⁴⁻⁹⁶ También presentan actividad antioxidante que parece correlacionar con esta actividad antiinflamatoria y

con el contenido de compuestos Fenólicos.^{97,98} Además presentan otras actividades biológicas como ser antimicrobiana, espasmolítica, antiviral, gastroprotectiva, antileucémica ^{99,100} De manera general los usos de las *Baccharis* en la medicina tradicional incluyen el tratamiento de úlceras, fiebre, enfermedades gastrointestinales, anemias, inflamaciones, diabetes, dolencias de la próstata, también como diuréticos, analgésicos y en el tratamiento de infecciones bacterianas y fúngicas.^{101,102}

Se las ingiere preparadas en infusiones o decocciones de las partes aéreas, en aplicaciones de emplastos sobre contusiones.¹⁰³⁻¹⁰⁵ Se han reportado datos sobre:

- *Baccharis glutinosa* sobre *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Fusarium poae* y *Fusarium moniliforme*.
- *Baccharis trinervis*, *Baccharis latifolia*, sobre *Trichophyton rubrum* y *Candida albicans*.
- *Baccharis spartioides* sobre *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. cereus*, *M. luteus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *Klebsiella sp.*, *Proteus sp.*, *Pseudomonas sp.* y *C. albicans*.
- *Baccharis trimera* sobre *S. cereviceae*, *C. albicans* y *A. niger*
- *Baccharis nitida* frente a *Staphylococcus aureus*, *enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*.

Se tienen pocos estudios realizados de Latinoamérica, acerca de las infecciones por hongos, reportándose estudios multicéntricos, los que muestran afecciones por *C. albicans*: Argentina con 53%, Brasil con 12.5%, Colombia con 16% y Venezuela con 45% cuyos reportes datan de la década de los años 90.¹⁰⁶

Desde 2003 al 2004 se tuvo 40.9% de casos con *C. albicans* en 11 centros médicos de 9 ciudades más importantes de Brasil.¹⁰⁷ Un estudio desde 1999 al 2000 muestra la identificación de 40,75% de aislamientos de *C. albicans* en Argentina.^{108,109}

Estudios realizados en Chile muestran un 50% de pacientes con *C. albicans*.¹¹⁰ En México, se realizó un estudio transversal en pacientes del Hospital Regional General Ignacio Zaragoza, de junio de 1999 a mayo de 2000, encontrando 68.6% con *C. albicans* y 31.4 % *Candida no albicans*.¹¹¹

En nuestro medio, según estadísticas de los análisis de muestras de pacientes realizados en el Laboratorio de Análisis micológicos del Hospital de Clínicas, no publicadas, de la Dra. Trigo, se reportan 20 casos de *Candidiasis*, alrededor de 4 casos de *Aspergilosis*, por año. (Reporte verbal). También en el Laboratorio de Bacteriología del Hospital Obrero se determinó la frecuencia de aislamiento en un 37,8% de *Candida sp.*¹¹²

Tomando en cuenta la gran biodiversidad de nuestra región, recurso que no se aprovecha totalmente y a pesar de que el uso de estas especies en el tratamiento de diversas enfermedades es ancestral en Bolivia, principalmente en poblaciones rurales, lo cual permitió acumular un conocimiento etno-farmacológico, costumbre que se ha conservado hasta nuestros días y la reciente importancia de productos fitofármacos en el mercado con la existencia de productos fitoterapéuticos elaborados de manera artesanal, vemos que es necesario realizar estudios de desarrollo e investigación, de cultivos e industrialización de estos recursos naturales, como un aporte al desarrollo de Bolivia, con el fin de generar cadenas productivas de investigación, producción agraria, preparación, formulación y comercialización de un recurso natural renovable, otorgándole un valor agregado, apoyando al desarrollo de la región y de las familias asentadas en aquella.

2.5.1. Especies vegetales

Las especies medicinales se recolectaron e identificaron para luego realizar el secado, que se ha realizado bajo sombra, en un lugar ventilado, libre de humedad, extendiendo las muestras con circulación de aire, por espacio de dos semanas para

luego ser trituradas y proceder a su conservación. Posteriormente se prepararon extractos polares, de polaridad media y apolares, conservándolos dentro de envases de vidrio esterilizados, para luego proceder a su preparación para el ensayo.

a) *Baccharis santelicens*

Denominada comúnmente como *ñaka*, *ñakat'ula*. Es un arbusto resinoso, característico de la transición entre los tolares y pajonales. Medicinalmente, se usa como purgante, para la vesícula y dolor de estómago. También para “sacar el frío”, reumatismos y empachos. Para ello se usa en infusión. Porque es pegajosa sirve, además, como emplastro o parche. En invierno bota una miel dulce al paladar. La comen los burros y también los corderos, estos últimos cuando están enfermos.

b) *Baccharis genistelloides* (La Paz y Cochabamba)



- **Nombre científico:** *Baccharis genistelloides*.
- **Nombres comunes:** callua-callua, cuchu-cuchu, ischu tullma, karkeja, quinsa cuchu, taya, carqueja.

Figura 13. *Baccharis genistelloides*.

- **Usos:** Utilizada para la digestión y la gastritis, antipalúdico, litiasis biliar, ictericia, insuficiencia de la secreción biliar, cirrosis, cólicos biliares, diabetes, impotencia masculina y la infertilidad femenina. Gran depurativo en el caso de furunculosis rebeldes, urticarias y abscesos.
- **Contraindicaciones:** Hipertensión arterial

- **Observaciones:** La mujeres gestantes y en periodo de lactancia así como bebes deben usarlo bajo supervisión médica.

c) *Baccharis latifolia* (La Paz Cota-Cota) *Baccharis latifolia* (Ruiz & Pav.) Pers.

E: chilca



- **Nombre científico:** *Baccharis latifolia*.
Familia: Asteráceas
- **Nombres comunes:** Chilca, chilca negra, chilca blanca; ch'íllka en lengua quechua.

Figura 14. *Baccharis latifolia*.

- **Usos:** La chilca se encuentra distribuida desde Venezuela hasta el norte de Argentina entre los 1,000 y 4,000 m.s.n.m. Es útil como cercas vivas, para fijar suelos en laderas y terrazas, como leña. Es utilizada en agroforestería para la protección y conservación del suelo. Sus tallos se emplean en cestería y la ceniza de éstos para la elaboración de Lliptta, polvo que acompaña el masticado de coca. Su madera es utilizada como material de construcción. En medicina popular se usó para tratar el reumatismo, dislocaduras de huesos y como activador de la circulación de la sangre y como antiinflamatorio y antirreumático.

d) *Baccharis papillosa*

Arbusto de 0,3 a 2 m, comúnmente denominado Chua Chua, Muyu thola y Chilca redonda. Se utiliza como tónico, debido a que muestra una acción protectora para

dolores estomacales, como antiséptico y antiinflamatorio. Presenta Drupanine, Artepillin C, Rhamnocitrin y ent-clerodanes, Ermanine, Isokamferine, 5,7,5',4'-tetrahydroxy-3-methoxiflavone.

e) Baccharis obtusifolia

Baccharis obtusifolia Kunth B., comúnmente denominada Chilca redonda, t'ant'a t'ola (a). Las ramas se utilizan para hacer escobas. Es utilizada en forma de decocciones de las partes aéreas para el tratamiento de reumatismo, úlceras, malestares del hígado y como antiinflamatorio.

2.6. ANTIMICROBIANOS

2.6.1. CIPROFLOXACINA

Es una fluoroquinolona de segunda generación, presenta un F en la posición 6 y un grupo piperacínilo en posición 7. Posee un amplio espectro de actividad antibacteriana, presenta elevada disponibilidad oral, exhibe una buena distribución tisular, obteniendo niveles significativos en los fluidos intersticiales, se elimina parcialmente por el metabolismo y parcialmente por excreción renal.

La ciprofloxacina corresponde al 1-ciclopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-7-(1-piperazínil)-3-quinolina ácido carboxílico. La ciprofloxacina, posee carácter iónico positivo y negativo a la vez, es decir tiene una función ácida pK de 8,8 y básica pK de 6,0), con un punto isoeléctrico de 7,4. Tiene acción predominantemente bactericida y posee un amplio espectro que abarca cocos y bacilos Gram-positivos y Gram-negativos, aerobios, facultativos y anaerobios, *Mycoplasma*, *Chlamydia*, *Rickettsia* y *Micobacterium*. La actividad es particularmente alta sobre enterobacterias y *Pseudomonas* tanto en fase de crecimiento exponencial como en

fase estacionaria, aumentando su potencia bactericida a pH alcalino y no influyendo las condiciones de aerobiosis o anaerobiosis.

La unión a proteínas es baja, de 20 a 28%. La vida media de eliminación se sitúa entre 3 y 5 horas. Como consecuencia de la eliminación preferentemente renal, Ciprofloxacino alcanza en orina concentraciones muy elevadas. Debe su efecto a la inhibición de la girasa del ácido desoxirribonucleico inhibiendo su replicación.^{113,114}

2.6.2. KETOCONAZOL.

El Ketoconazol es un Imidazol sintético de amplio espectro antifungico. Su posología oral le otorga ventajas sobre otros miembros de la misma familia de antifungicos como el Miconazol o Clotrimazol. Está indicado para algunas infecciones fúngicas superficiales y como agente sinérgico en combinación con otros compuestos.

Los imidazoles presentan su actividad mediante mecanismos que aumentan la permeabilidad de la membrana, inhibición de la penetración de moléculas precursoras del RNA y DNA y síntesis de enzimas oxidativas y peroxidativas, contribuyendo a la degradación de los orgánulos celulares, conduciendo a una necrosis celular.

In Vitro tiene una amplia actividad inhibitoria exceptuando a *Aspergillus* spp. In vivo ha demostrado eficacia en candidiasis mucocutáneas.

La absorción de Ketoconazol debe estar mediada por la acidez gástrica. El fármaco al ser una base libre, se transforma en el estomago en sal clorhidratada. El tratamiento con otros fármacos que reducen la secreción gástrica (antiácidos, Ranitidina) o la ingesta de comida previos a la dosis, disminuyen la biodisponibilidad de Ketoconazol. La mayor parte del Ketoconazol se metaboliza y

es muy poca la cantidad de fármaco que se excreta por cualquier vía, la ruta mas importante parece ser la biliar, vertiendo metabolitos inactivos al tracto gastrointestinal.¹¹⁵⁻¹¹⁷

2.6.3. FLUCONAZOL.

Se trata de un antifúngico de la familia de los azoles, con modificaciones en su estructura de anillos (triazólico). Tiene amplio espectro de actividad, escasos efectos secundarios y buena tolerancia, es utilizado como parte de la terapia en pacientes inmunocomprometidos.

Su mecanismo de acción permite la unión e inhibición de la enzima fúngica ligada al citocromo P450, lanosterol dimetilasa. Altera la fluidez y permeabilidad de la membrana fúngica al interrumpir el paso de lanosterol a ergosterol componente de la membrana, interrumpe la actividad de las enzimas ligadas a las membranas e impide la replicación celular. Parece no inhibir la biosíntesis de esteroides y no muestra un efecto claro en el metabolismo del cortisol.^{118,119}

Tiene acción fungistática frente a la mayoría de las especies fúngicas, debido a su dependencia in Vitro a los medios de cultivo, pH, tamaño de inóculo o tiempo de incubación, lo que hace que los resultados in vivo difieran enormemente de los realizados en laboratorio. Especies de *Aspergillus spp.*, *Candida* han mostrado ser sensibles a Fluconazol, exceptuando *C. krusei* y *C. glabrata*.

Presenta una penetración a tejidos/fluidos muy buena, como ser saliva, esputo, tejido vaginal o piel, incluso penetra al Líquido Cefalorraquídeo, la eliminación del fármaco sin transformar es por vía renal principalmente.

Se utiliza para el tratamiento de candidiasis orofaríngea-esofágica, infección del tracto urinario, peritonitis y neumonía por *Candida*. para tratamiento agudo y

seguido de terapia de mantenimiento en pacientes con SIDA. También se usa en Candidiasis diseminada.^{120,121}

2.7. CURVA DE CRECIMIENTO MICROBIANA: FASES Y TIEMPO DE GENERACION

2.7.1. Curva de crecimiento

El crecimiento de una población se estudia analizando la curva de crecimiento de un cultivo microbiano.^{122,123} La curva resultante tiene cuatro fases diferentes:

a) Fase de latencia.

Cuando se introducen microorganismos en un medio de cultivo fresco, normalmente no se produce un aumento inmediato del número de células o de masa, por lo cual a este período se denomina fase de latencia. Aunque la división celular no se produce inmediatamente y no hay un incremento neto de masa, la célula está sintetizando nuevos componentes.

Una fase de latencia previa al comienzo de la división celular puede ser necesaria por diversas razones:

- Las células pueden ser viejas y poseer una cantidad reducida de ATP, cofactores esenciales y ribosomas; estas sustancias deben sintetizarse antes de que se inicie el crecimiento.
- El medio puede ser diferente al anterior donde crecían los microorganismos. En este caso, necesitará nuevas enzimas para usar otros nutrientes.
- Quizás, los microorganismos hayan sido alterados y necesiten un tiempo de recuperación.

Cualquiera que sea el motivo, finalmente, las células se adaptan al medio nuevo, replican su ADN, comienzan a incrementar su masa y se dividen. La duración de la fase de latencia varía considerablemente según la condición de los microorganismos y la naturaleza del medio. Esta fase puede ser bastante larga si el inóculo procede de un cultivo viejo o de uno que haya sido refrigerado. La inoculación de un cultivo en otro químicamente diferente provoca también una fase de crecimiento exponencial vigoroso a un medio nuevo de la misma composición, la fase de latencia se acorta o no se produce.

b) Fase exponencial.

Durante la fase exponencial o logarítmica, los microorganismos crecen y se dividen hasta el nivel máximo posible, en función de su potencial genético, el tipo de medio y las condiciones en que crecen. La velocidad de crecimiento es constante; es decir, los microorganismos se dividen y duplican en número a intervalos regulares. Como cada célula se divide en un momento ligeramente diferente del resto, la curva de crecimiento aumenta suavemente, en lugar de realizar discretos saltos. Durante esta fase, la población es más uniforme, química y fisiológicamente; por ello, los cultivos en fase exponencial se utilizan normalmente en estudios bioquímicos y fisiológicos.

c) Fase estacionaria.

Fase donde el crecimiento de la población cesa y la curva de crecimiento se vuelve horizontal. Las bacterias llegan normalmente a esta fase estacionaria cuando el nivel de población es de aproximadamente 10^9 células por mililitro. El tamaño final de la población depende de la disponibilidad de nutrientes y otros factores, así como del tipo de microorganismo que se cultive. En la fase estacionaria el número total de microorganismos viables permanece constante. Este hecho puede ser resultado del equilibrio entre la división y la muerte de las

células o simplemente, que la población deja de dividirse, aunque sigue activa metabólicamente.

Las poblaciones microbianas entran en fase estacionaria por varias razones. Un factor es la limitación de nutrientes; si se reduce intensamente la concentración de un nutriente esencial, la población crecerá lentamente. Los organismos aerobios están limitados a menudo por la disponibilidad de O_2 . El oxígeno no es muy soluble y puede reducirse tan rápidamente que sólo la superficie del cultivo tenga una concentración de O_2 adecuada para el crecimiento. En este caso, las células situadas por debajo de la superficie no podrán crecer, salvo que el cultivo se agite o airee de otra forma.

El crecimiento de una población puede también cesar debido a la acumulación de productos residuales tóxicos. Parece que este factor limita el crecimiento de muchos cultivos anaerobios.

d) Fase de muerte.

Los cambios ambientales, como privación de nutrientes y acumulación de residuos tóxicos, originan la disminución del número de células viables, hecho que caracteriza a esta fase. La muerte de una población microbiana, al igual que su crecimiento durante la fase exponencial, es normalmente logarítmica. Este modelo es válido aun cuando el número total de células permanece constante.

A menudo, la única forma de decidir si una bacteria es viable consiste en incubarla en un medio fresco; si no crece ni se multiplica, se considera que está muerta. Aunque la mayor parte de una población microbiana normalmente muere en forma logarítmica, la velocidad de la mortalidad puede disminuir después de reducirse drásticamente la población. Esto se debe a la supervivencia prolongada de algunas células particularmente resistentes.

2.7.2. Tiempo de generación

a) Crecimiento de poblaciones.

El crecimiento se define como un incremento en el número de células microbianas en una población, lo cual también puede ser medido como un incremento en la masa microbiana. La velocidad de crecimiento es el cambio en el número de células o masa celular por unidad de tiempo. El tiempo requerido para que a partir de una célula se formen dos células se denomina tiempo de generación. A veces a este tiempo también se le conoce como tiempo de duplicación.

2.8. CINETICA DE MUERTE FUNGICA

Estudia el efecto que producen los antifungicos sobre la viabilidad de los microorganismos (levadura *Candida albicans*) a lo largo del tiempo. El periodo de tiempo para la incubación: 48 horas para una población celular de partida entre 1 a 5×10^5 UFC/ml, a intervalos regulares de 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 y 48 horas, se toman alícuotas de los cultivos, se siembran en placas de agar y se incuban en estufa. Cuando el número de células por mililitro es elevado, se realizan diluciones en solución salina. El recuento de las colonias se realiza tras 24 horas de incubación en estufa. Los resultados obtenidos se registran en una grafica donde el eje de abscisas representa el tiempo y el de las ordenadas la cantidad de microorganismos medida en logaritmos decimales de las UFC/ml.^{124,125}

2.9. FACTORES QUE AFECTAN LA POTENCIA DE LA ACCIÓN ANTIMICROBIANA

La efectividad de un agente particular está determinada en gran parte por condiciones en la cual actúa:

a) Concentración del agente.

Muchos agentes son letales para las bacterias sólo cuando se los usa en concentraciones muy elevadas. Otros en concentraciones muy bajas pueden estimular, retardar o hasta destruir al microorganismo. Sin embargo, la concentración necesaria para producir un efecto determinado, así como el espectro de concentraciones dentro del cual un efecto determinado es demostrable, varían con el antimicrobiano, el microorganismo y el método de ensayo.

b) Tiempo.

Cuando las bacterias se exponen a una concentración específica del agente bactericida, aun en exceso, no todos los microorganismos mueren al mismo tiempo sino que más bien se produce una disminución gradual en el número de células viables.

c) pH.

La concentración del ión hidrógeno influye sobre la acción bactericida al afectar tanto al microorganismo como al antimicrobiano. Cuando las bacterias están suspendidas en un medio de cultivo de pH 7 tienen una carga negativa. Un aumento del pH aumenta la carga y puede alterar la concentración efectiva del antimicrobiano sobre la superficie de la célula. El pH también determina el grado de ionización del antimicrobiano. En general la forma no ionizada de un agente disociable pasa a través de la membrana celular con mayor facilidad que las formas iónicas relativamente inactivas.

d) Temperatura.

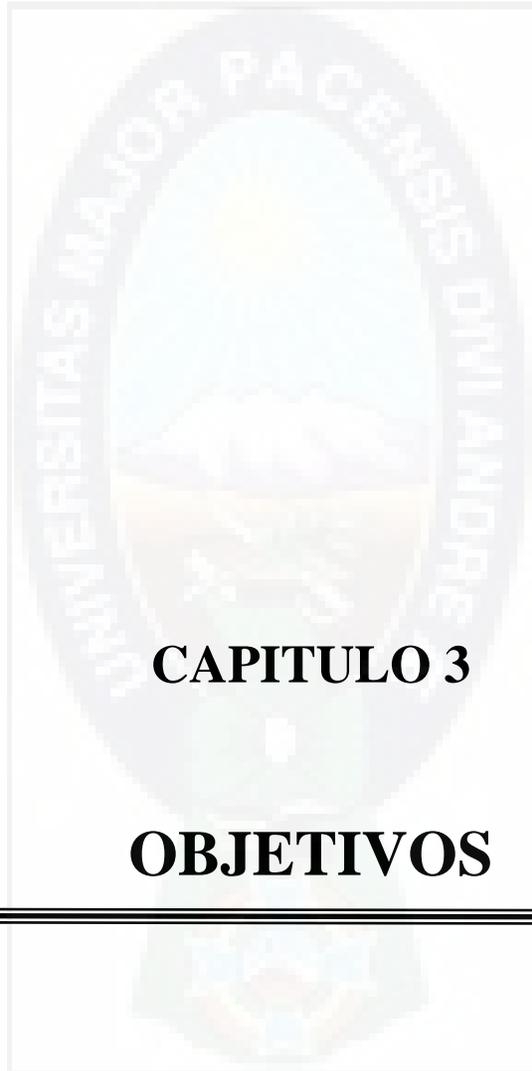
La destrucción de las bacterias por los antimicrobianos aumenta junto con la temperatura. A temperaturas bajas, por cada 10°C de incremento de la temperatura se produce una duplicación del índice germicida. En el caso de algunos agentes,

como el fenol, el índice se incrementa de cinco a ocho veces, lo que sugiere una reacción más compleja y la participación de factores adicionales.

e) Naturaleza del microorganismo.

La eficacia de un agente determinado depende de las propiedades del microorganismo contra el cual se lo esté probando. Las más importantes de estas propiedades consisten en la especie de microorganismo, la fase del cultivo, la presencia de estructuras especiales, como esporas o cápsulas, los antecedentes del cultivo y el número de microorganismos en el sistema en ensayo.





CAPITULO 3

OBJETIVOS

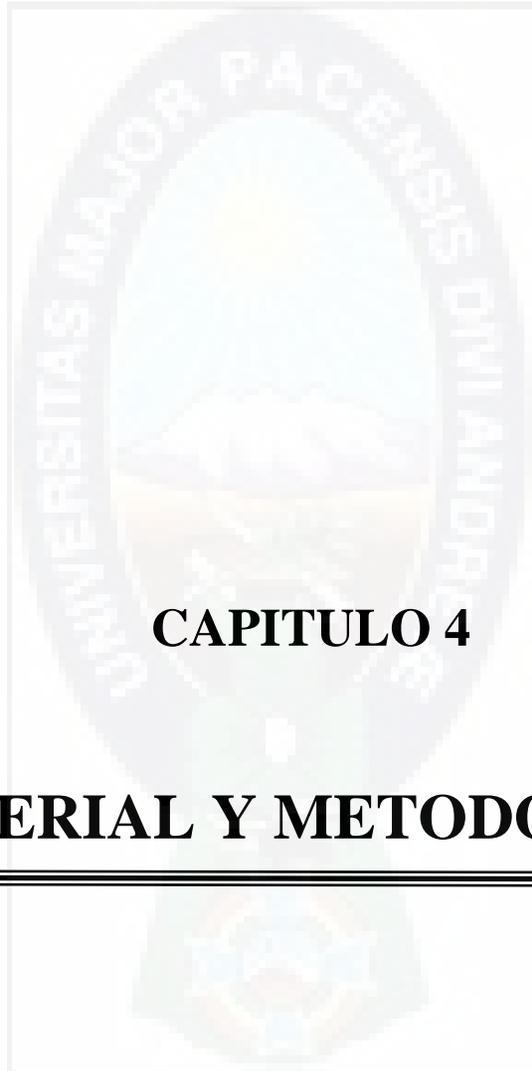
3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general:

Estudiar *in vitro* la actividad antibacteriana y antifúngica de extractos vegetales del género *Baccharis*, realizados en el Area de Productos Naturales de la Carrera de Ciencias Químicas, sobre cepas ATCC de microorganismos fitopatógenos y patógenos humanos del Area de Microbiología del Instituto de Investigaciones Fármaco-Bioquímicas.

3.2. Objetivos específicos:

- Identificar, utilizando la prueba de susceptibilidad por difusión, los posibles extractos antimicrobianos de naturaleza vegetal, contra cepas ATCC de bacterias de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y de *Pseudomonas aeruginosa*.
- Determinar la cantidad de extracto del género *Baccharis* capaz de inhibir el crecimiento de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y de *Pseudomonas aeruginosa*. Utilizando el Método de Difusión en disco Bauer-Kirby.
- Identificar, utilizando la prueba de susceptibilidad por difusión, los posibles extractos antimicrobianos de naturaleza vegetal, contra cepas ATCC de hongos fitopatógenos y patógenos humanos: *Aspergillus niger*, *Phytophthora palmivora* y *Candida albicans*.
- Determinar la velocidad de crecimiento con los extractos vegetales activos empleando *Aspergillus niger* y de *Phytophthora palmivora*, utilizando el Método de Dilución con pozo central de Inóculo.
- Determinar la cantidad de extracto vegetal del género *Baccharis* con acción fungicida y fungistática sobre *Candida albicans*, utilizando el Método de Curvas de Letalidad



CAPITULO 4

MATERIAL Y METODOLOGIA

4. MATERIAL Y METODOLOGIA

4.1. MATERIALES.

4.1.1. Material biológico

Cepa de *Candida albicans* 98001 ATCC

Cepa de *Aspergillus niger* QS07

Cepa de *Phytophthora palmivora* QK08

Cepas de *Escherichia coli* 25922 ATCC

Cepa de *Staphylococcus aureus* 25923 ATCC

Cepa de *Pseudomona aeruginosa* 27853 ATCC

4.1.2. Material de laboratorio

Matraces erlenmeyer de 1000 y 250 ml

Probetas de 500 ml 100ml 50 ml

Cajas petri de 200 mm de diámetro

Cajas petri de 90 mm de diámetro

Cajas petri de 60 mm de diámetro

Microplacas TC 96

Microplacas TC 24

Tubos de ensayo de 150 x 20 mm

Tubos de hemólisis

Tubos de ensayo con tapa rosca de 200x25 mm

Micropipetas de 10, 100, 200 y 5000 μ l

Tips 100, 200 y 5000 μ l

Asa y aguja bacteriológicas

Portaobjetos

Pinzas metálicas punta fina

Sacabocados de acero inoxidable

Algodón y gasa

Parafilm

Gradillas metálicas
 Tijeras
 Papel madera grueso
 Hilo grueso de algodón
 Viales de 10 ml y 100 ml

4.1.3. Medios de cultivo

Agar Sabouraud Dextrosa
 Agar Muller Hinton
 Agar Papa Dextrosa
 Agar Agar
 Medio RPMI
 Dextrosa

4.1.4. Reactivos

Alcohol al 70%
 Hipoclorito de sodio
 Agua destilada
 Azul de metileno
 Tinción Gram

4.1.5. Antibióticos

ANTIBIOTICO	BACTERIAS	HONGOS	
		MICRODILUCION	DILUCION
Ketoconazol		20 µg/mL	1000 µg/mL
Fluconazol		40 µg/mL	1000 µg/mL
Ciprofloxacina Inyectable I.V.	4 µg/mL		

4.1.6. Equipos

Espectrofotómetro UV

Balanza analítica

Microscopio

Campana de flujo laminar

Autoclave

Cámara Neubauer

Vortex

Estufa incubadora

Refrigerador

4.2. METODOLOGIA DE EXTRACCION

4.2.1. EXTRACTOS VEGETALES.

Las especies vegetales estudiadas fueron del género *Baccharis*, como ser: *Baccharis latifolia*, *Baccharis genistelloides*, *Baccharis obtusifolia*, *Baccharis papillosa*, *Baccharis santilices*. Su recolección se llevó a cabo en el departamento de La Paz, en las zonas de Pampahasi (3840 m.s.n.m.), Cota Cota (3800 m.s.n.m.) y en el departamento de Cochabamba en el Parque Nacional Tunari (2200–4400 m.s.n.m.). Se emplearon las partes aéreas, tallos y hojas, que fueron secados en un ambiente libre de humedad y a la sombra. Una vez secas, se trituran. Se describe a continuación la variedad de extractos realizados según el solvente utilizado para su obtención.

4.2.1.1. EXTRACTOS NO POLARES EN DICLOROMETANO

Se prepararon los extractos no polares y los de polaridad media S2O siguiendo la metodología estandarizada por el área de Productos Naturales del Instituto de

Investigaciones Químicas, de la Carrera de Ciencias Químicas. Para el extracto etanólico denominación E, se utilizó 100g de planta triturada y 450 ml de etanol al 96%. La extracción se hizo mediante maceración por 24 horas, luego filtración a través de papel filtro.

Los extractos obtenidos se concentran en un rotaevaporador. Los extractos obtenidos se guardaron en frascos de vidrio, en ambiente seco y oscuro.

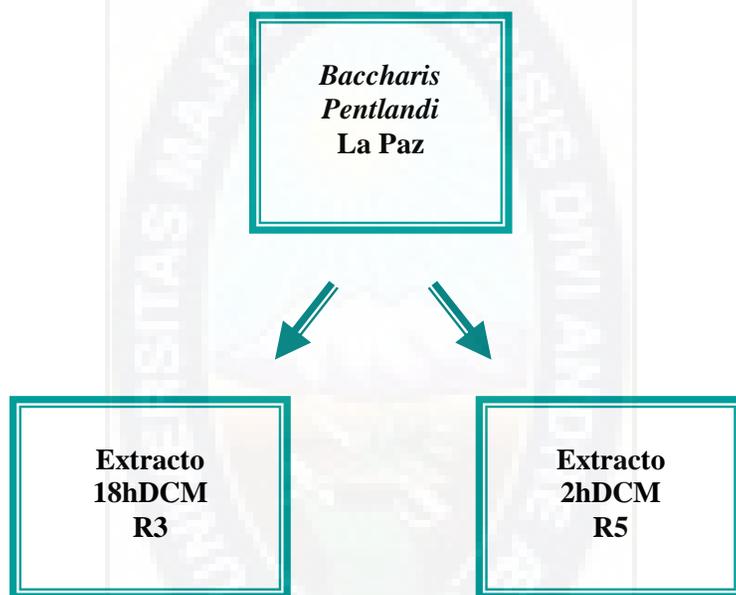


Figura 15. Esquema de la codificación de extractos no polares de especies vegetales del género *Baccharis*.

4.2.1.2.EXTRACTOS POLARES ACUOSOS

Los extractos acuosos se prepararon en base al método descrito por Abad M.J.⁴⁵ con algunas modificaciones desarrolladas por el área de Productos naturales del Instituto de Investigaciones Químicas, de la Carrera de Ciencias Químicas. Los residuos secos obtenidos se guardan en frascos estériles en ambiente seco y oscuro.

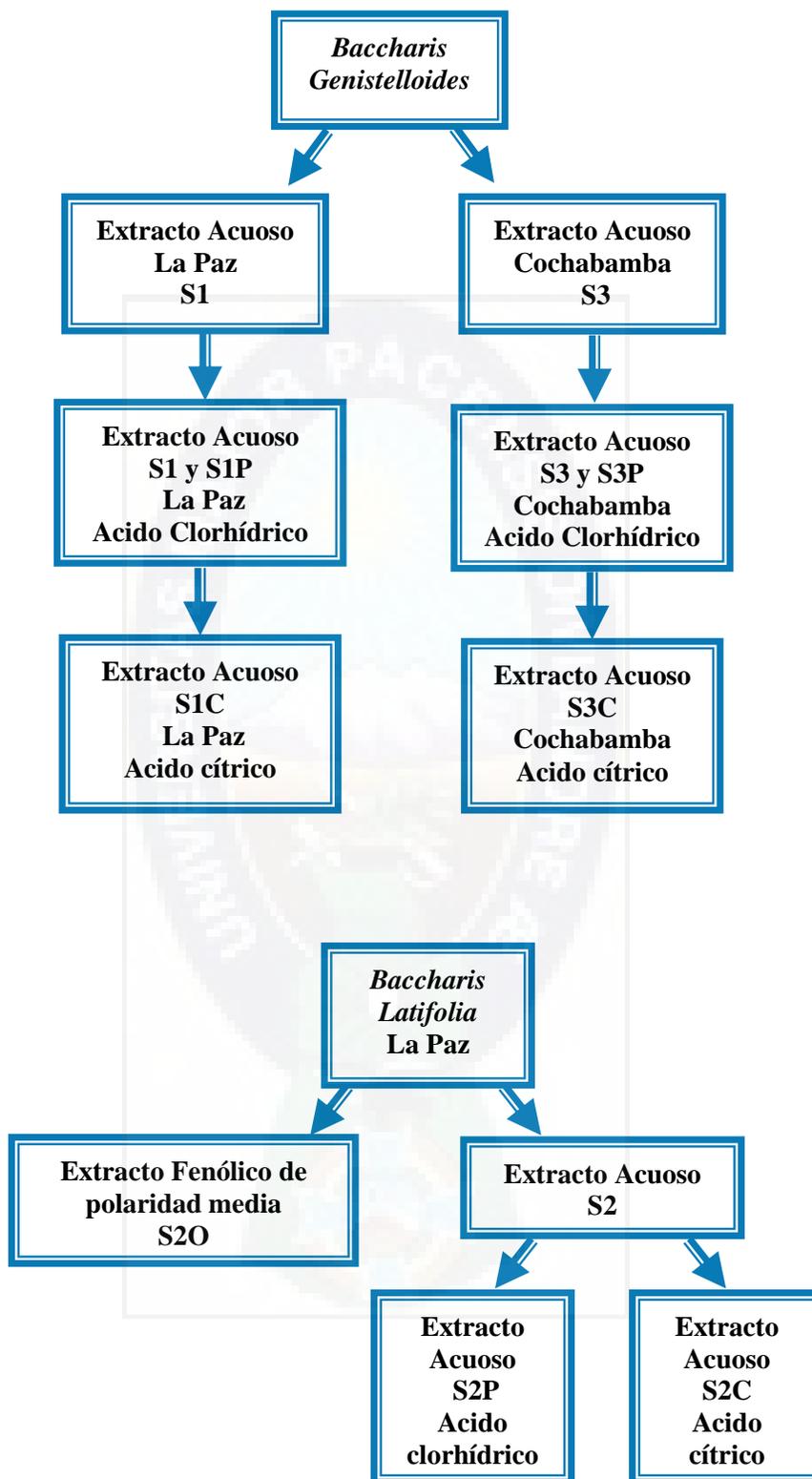


Figura 16. Esquema de la codificación de extractos polares acuosos de especies vegetales del genero *Baccharis*.

4.2.1.3. EXTRACTOS POLARES ETANOLICOS

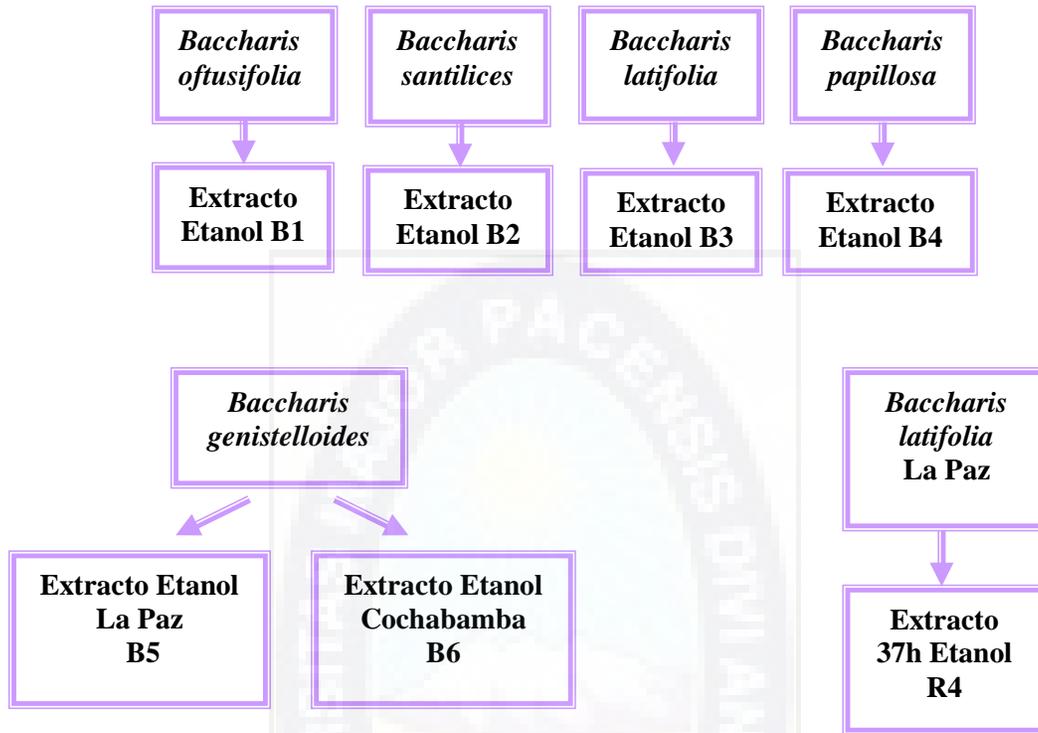


Figura 17. Esquema de la codificación de extractos polares etanólicos de especies vegetales del género *Baccharis*.

4.3. MICROORGANISMOS

Se emplearon cepas de: *Candida albicans* 98001 ATCC, *Aspergillus niger* QS07, *Phytophthora palmivora* QK08, *Escherichia coli* 25922 ATCC, *Staphylococcus aureus* 25923 ATCC, *Pseudomonas aeruginosa* 27853 ATCC. Para su conservación los microorganismos se mantuvieron a 4°C en viales con agar Sabouraud. A partir de estos viales las cepas se utilizaron y sembraron en agar Sabouraud para obtener los microorganismos viables y poder trabajar con ellos, se mantuvieron en la nevera a 4°C y se atemperaron a temperatura ambiente cada vez que se fueran a emplear en una prueba.

Las especies de hongos utilizadas *Aspergillus niger* QS07, *Phytophthora palmivora* QK08, fueron cultivadas en forma inclinada, en pico de flauta, en agar papa dextrosa (PDA) a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 7 días en tubos de ensayo (18x150mm). Posteriormente, se preparó una suspensión de esporas de los hongos *Aspergillus niger* y *Phytophthora palmivora*, agregando a cada tubo 10 mL de solución salina (0,9%). Las esporas fueron desprendidas del micelio con una varilla de vidrio estéril. La suspensión obtenida se transfirió a otro tubo de ensayo estéril y se determinó su concentración, la cual se ajustó a 1×10^6 UFC/mL.

Para *Candida albicans* 98001 ATCC se preparó suspensiones de colonias de 1 a 5×10^5 UFC/mL, siempre se contaba con repiques de la placa para tener una población en la fase de crecimiento, preparados 24 horas antes de la realización del ensayo.

4.4. ANTIMICROBIANOS

Se emplearon como medios de control positivo (inhibición del crecimiento):

ANTIBIOTICO	BACTERIAS	HONGOS	
		MICRODILUCION	DILUCION
Ketoconazol		20 $\mu\text{g/mL}$	1000 $\mu\text{g/mL}$
Fluconazol		40 $\mu\text{g/mL}$	1000 $\mu\text{g/mL}$
Ciprofloxacina Inyectable I.V.	4 $\mu\text{g/mL}$		

4.5. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

Cada uno de los medios de cultivo se prepararon cuidadosamente a fin de evitar contaminaciones y el uso de antibióticos como Cloranfenicol, que pudieran dar falsos positivos. También en el preparado de los extractos se evito el uso de solventes como el DMSO o etanol, debido a que en pruebas preliminares que se

realizaron, se observó que tienen capacidad a distintas concentraciones de inhibir el crecimiento o modificar el aspecto en color o forma de crecimiento del microorganismo.

Se utilizó solución salina o fisiológica al 0,9%, estéril para preparar las soluciones y realizar las diluciones, tanto de extractos como de los microorganismos de ensayo.

4.6. CONDICIONES GENERALES DE EXPERIMENTACION

Para evitar repeticiones en cuanto a los métodos empleados se considerarán:

- Tanto para *Aspergillus niger* como para *Phytophthora palmivora*, se utilizaron una suspensión de esporas de concentración alrededor de 10^6 UFC/ml en comparación a los tubos de concentración de McFarland y por recuento en Cámara de Neubauer.
- Preparación de inóculos en fase exponencial. Se tomaron de 3 a 4 colonias de *Candida albicans*, con un tamaño superior a 1 mm de diámetro de una placa de agar con 24 horas de incubación y se disolvieron en 5 ml de solución salina atemperada estéril. El ajuste del número de células se realizó por medida de la transmitancia en espectrofotómetro a 530 nm correlacionando que 70% de Transmitancia corresponde a 10^6 UFC/ml. También se utilizó el recuento de viables en placa, aplicando esta técnica para averiguar el número de levaduras existentes en un cultivo a partir de muestras de cultivo, para lo cual se realizaron diluciones y se sembraron alícuotas por extensión con asa de Drigalsky en placas de agar, se incubaron a 37°C durante 24 horas y se procedió al recuento de colonias crecidas, estuvo comprendido entre 30 a 300 por placa. Por otro lado se utilizó también la cámara de Neubauer para el recuento de las colonias obtenidas.

- Curvas de crecimiento. La determinación del crecimiento libre, en ausencia de agente antifúngico, para cada uno de los microorganismos se determinó mediante recuento de viables en placa. Se partió de un inóculo de levadura suspendida en solución RPMI a una concentración de $1-5 \cdot 10^5$ UFC/ml. Desde la hora 0 hasta las 48 horas del experimento se tomaron muestras de los cultivos a intervalos de tiempo regulares, sembrándose en agar para el recuento. Con cada uno de los valores se obtiene una curva de crecimiento, representada por el número de UFC/ml en el eje de ordenadas y por el tiempo en horas en el eje de abscisas.

4.6.1. METODO DE SUSCEPTIBILIDAD POR DIFUSION BAUER-KIRBY CON DISCO DE PAPEL

El método que actualmente recomienda el Comité de Ensayos de Susceptibilidad del Laboratorio Internacional de Referencia (Nacional Committee for Clinical Laboratory Standards o NCCLS), es el Método de Kirby-Bauer. Este es el método de difusión en disco en que se han desarrollado estándares para su interpretación y está apoyado por datos clínicos y de laboratorio.

- **Estándar de turbidez para preparación del inóculo**

Para estandarizar la densidad del inóculo para una prueba de susceptibilidad, se utiliza estándar de turbidez de BaSO_4 equivalente a un estándar 0.5 de la escala McFarland o su equivalente óptico. El cual está compuesto por una solución de 0,5 mL de la solución $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ al 1,175 % (p/v) en 99,5 mL de una solución de ácido sulfúrico 1 %. El mismo se puede conservar durante 6 meses a la temperatura ambiente, en la oscuridad y herméticamente cerrado.

- **Preparación del inóculo**

Método de crecimiento

Al menos 3 a 5 colonias bien aisladas y del mismo tipo de morfología se seleccionan de un agar de cultivo. Se toca la colonia por arriba con un asa y el crecimiento se transfiere a un tubo con 4 a 5 mL de un medio de cultivo adecuado, tal como caldo Müller-Hinton.

El caldo de cultivo es incubado a 36°C hasta que alcance la turbidez del estándar de 0.5 McFarland o (10^6 UFC/ml).

- **Inoculación de las placas**

En un lapso de tiempo de 15 minutos después de ajustar la turbidez de la suspensión del inóculo, se sumerge un hisopo estéril en ella. El aplicador debe ser rotado varias veces y presionado contra la pared interna del tubo sobre el nivel de líquido para remover el exceso de líquido.

Se inocular la superficie de una placa de Agar Mueller–Hinton extendiendo el hisopo de un extremo a otro sobre toda la superficie. Este procedimiento es repetido dos o más veces rotando la placa, aproximadamente 60° después de cada aplicación, para asegurar una distribución constante del inóculo.

Como paso final se pasa cerca y sobre los bordes de la placa con agar. La tapas de la placa pueden quedar entreabiertas por 3 a 5 minutos, pero no más de 15, para permitir que un exceso de humedad de la superficie se absorba antes de aplicar el disco.

- **Aplicación de los discos a las placas inoculadas**

Los discos se dispensan sobre la superficie del agar. Cada disco debe ser presionado para asegurar contacto pleno con la superficie del agar. Ya sea que el disco se ponga individualmente o con un dispensador, deben ser distribuidos en forma constante y no debe quedar a menos de 24 mm de distancia entre centros. Debido a que algunos compuestos difunden casi instantáneamente, un disco no debe ser colocado nuevamente una vez que haya tomado contacto con la superficie del agar. Las placas son invertidas y puestas en un incubador a 36°C en el lapso de 15 minutos después de aplicados los discos.

- **Lectura de las placas e interpretación de los resultados**

Después de 24 horas de incubación, cada placa es examinada. Las zonas de inhibición resultantes deben ser uniformemente circulares en una capa homogénea de crecimiento. Si aparecen colonias individuales, el inóculo estaba muy diluido y la prueba debe ser repetida.

Los diámetros de la zona de inhibición completa son medidos en mm pasando por el centro del disco. La placa petri se mantiene a una distancia de pocos centímetros sobre un fondo negro no reflectante y se ilumina con luz reflejada. El margen de las zonas debe ser tomado como el área donde no se observa crecimiento visible. Un crecimiento pobre de pequeñas colonias, las que se detectan con lente de aumento al borde de la zona de crecimiento inhibido, son ignoradas. Los tamaños de las zonas de inhibición son interpretados como susceptible o sensible, intermedio, o resistente a los antimicrobianos que se han probado.

• Interpretación de los resultados de la prueba de difusión en disco.

Categorías interpretativas

Sensible: La categoría "sensible" implica que una cepa puede ser apropiadamente tratada con la dosis de extracto antimicrobiano.

Resistente: Las cepas resistentes no son inhibidas por la concentración utilizada del extracto antimicrobiano.

• Lectura

Con una regla de doble decímetro se medirá el diámetro de los halos de inhibición de crecimiento alrededor de los discos, estos deben ser medidos por el fondo de la placa y se anotaran los resultados. Se interpretará como sensible, resistente o intermedio. El borde de la zona de inhibición se aprecia a simple vista y es en general netamente delimitado.

La bacteria inoculada se enfrenta sobre la superficie del medio de agar a una solución antibiótica absorbida en discos de papel de filtro. El medio de cultivo más frecuentemente empleado es el de Mueller-Hinton. Su pH debe estar entre 7,0 - 7,4 y grosor entre 4 a 6 mm. El inóculo bacteriano debe tener una turbidez similar al 0,5 de la escala de McFarland y la inoculación se debe efectuar con hisopo de algodón estéril. La lectura se realiza entre las 18 a 24 horas.

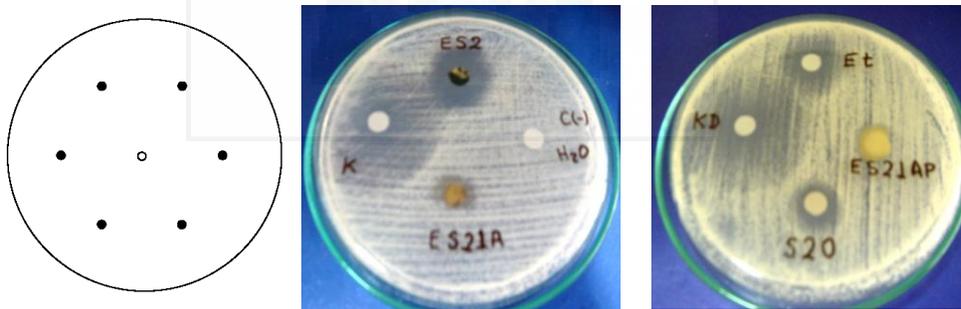


Figura 18. Representación del crecimiento radial mediante el método de difusión en disco.

4.6.2. PRUEBA DE MICRODILUCION

Para estandarizar la densidad del inóculo para una prueba de susceptibilidad, se utiliza estándar de turbidez de BaSO_4 equivalente a un estándar 0.5 de la escala McFarland o su equivalente óptico. Luego se inoculara con micropipeta la suspensión de esporas preparadas a una concentración de 10^6 U.F.C. en la parte central de cada pocillo (Figura 19). En el área en donde la concentración del antibiótico sea insuficiente para inhibir el crecimiento, se observará un margen donde no se presentará desarrollo del microorganismo.

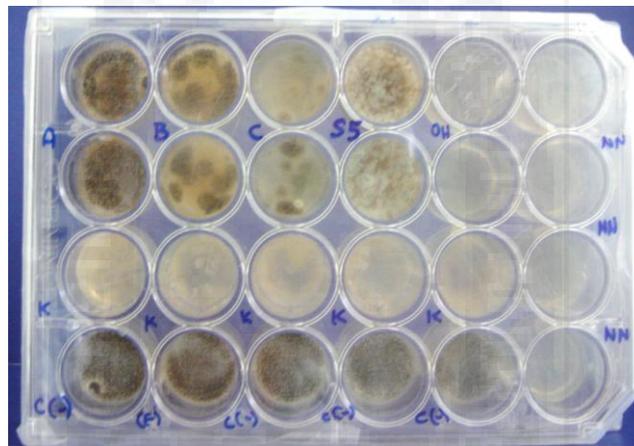


Figura 19. Representación del crecimiento radial mediante el método de microdilución en microplaca con pozo central de inóculo.

4.6.3. DILUCION EN PLACA CON POZO CENTRAL DE INOCULO

La técnica de dilución en placa con pozo central de inóculo en agar, permite observar el área en donde la concentración del antibiótico sea insuficiente para inhibir el crecimiento (Figura 20).

1. Preparar una mezcla de una cantidad de extracto y agar PDA tal que se obtenga una concentración de 20 y 50 mg/mL y dejar solidificar.
2. Permitir que las placas de la mezcla de agar con el extracto prueba alcancen la temperatura ambiente antes de utilizarlos.

3. Preparar una suspensión en solución salina estéril a partir de un cultivo fresco. La turbidez de la suspensión se debe ajustar a 0.5 en la escala de McFarland (10^6 UFC/ml). Utilizar esta suspensión para inocular los pozos centrales de las placas de agar PDA antes de 15 minutos.
4. Colocar con micropipeta la suspensión de esporas.
5. No permitir el desborde del inóculo sobre la superficie del medio de cultivo.
6. Una vez inoculadas las placas, deben ser incubadas..
7. La incubación se realiza a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por el tiempo de desarrollo del Control negativo (-).
8. Realizar la lectura de la prueba mediante determinación del diámetro de la zona de crecimiento o de inhibición
9. Colocar la placa sobre una superficie oscura pero bien iluminada (luz directa a 45°), con el fondo hacia arriba y la tapa hacia abajo.
10. Medir el diámetro de crecimiento con una regla milimétrica al milímetro más cercano.

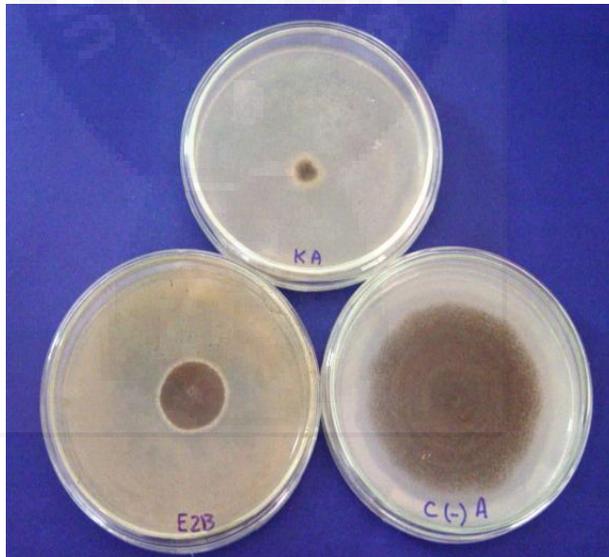


Figura 20. Representación del crecimiento radial mediante el método de dilución en placa con pozo central de inóculo.

4.6.4. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIFUNGICOS

a) Curvas de mortalidad-tiempo

La técnica para determinar las curvas de mortalidad tiempo es sencilla como larga. Básicamente, consiste en inocular una serie de tubos que contienen concentraciones conocidas de antifúngico, con una concentración conocida de levaduras. A determinados tiempos se toma una muestra de la solución que, diluida convenientemente, se siembra en placas de *agar Sabouraud*. Después de incubarlas de 24 a 48 horas se cuenta el número de colonias por placa (UFC). Multiplicando el número de colonias por la dilución ensayada, obtendremos el número de células sobrevivientes.

Normalmente de cada concentración se ensayan dos o tres diluciones y más de una placa por dilución. De las placas sembradas se cuentan aquellas que tienen entre 10 y 100 colonias, aunque si sólo se tienen placas con menos de 10 colonias se pueden utilizar para los cálculos pero interpretándolas con cautela. Como norma, la diferencia en el número de colonias entre las placas de la misma concentración y tiempo no debe ser mayor del 10%. En caso contrario debemos analizar lo que ocurre.

Los resultados de los recuentos de colonias de las placas se pueden expresar en UFC/ml con respecto al tiempo. Una vez hechos los cálculos es conveniente trasladarlos a una gráfica de papel semilogarítmico poniendo en el eje de las ordenadas el logaritmo del número de células supervivientes y en abscisas el tiempo. De la gráfica se puede determinar:

- Si la actividad es fungicida o fungistática, y la relación entre la concentración y la letalidad producida;
- El tiempo en el que se inicia la actividad fungicida

- La mínima concentración de antifúngico con acción fungicida
- El número de células viables a las 24 y 48 h de incubación;
- El incremento máximo de UFC con respecto al número inicial
- El tiempo en que la diferencia en UFC entre el control y el antifúngico es de 3 unidades de logaritmo.

La relación entre la concentración y la letalidad la estableceremos, calculando la tasa de crecimiento y/o letalidad de cada concentración. Esta tasa es la pendiente de la curva de letalidad y puede determinarse matemáticamente, representa la velocidad a la que mueren las células y se mide en UFC/tiempo

b) Cálculo de la curva de Inhibición

Una vez determinadas las UFC en cada tiempo y concentración, debemos ajustar los datos obtenidos a una función matemática. Los antifúngicos, como los antibióticos pueden mostrar distintas cinéticas: Mono exponencial, en la que la letalidad aumenta proporcionalmente con el tiempo de incubación. Biexponencial o bifásica, en la que hay dos velocidades de letalidad, una rápida y otra más lenta, en este caso se obtienen dos pendientes. La letalidad también puede seguir una curva *sigmoidea*, es decir, que hay una fase de latencia antes de empezar la letalidad, seguida de una fase rápida y, finalmente, otra fase en la que la letalidad se mantiene constante o bien no aumenta significativamente. Las pruebas de sensibilidad de las levaduras a los extractos antifungicos se realizaron de acuerdo con las normas de la NCCLS:

- Medio de cultivo. El medio de cultivo recomendado por la NCCLS para las pruebas de sensibilidad a los antifungicos es el RPMI 1640. Los componentes se disolvieron en 90 ml de agua y se agitaron hasta su

completa disolución. Se ajustó el pH a 7 con NaOH 1N y se enrasó con agua destilada hasta un volumen de 100 mL. El medio se esterilizó por filtración y se guardó en la nevera a 4 °C al mismo tiempo que se protegió de la luz.

- Preparación y almacenado de los antifúngicos. Se utilizaron las instrucciones de la NCCLS. Cualquier modificación en el color de los antifungicos o variación de la densidad de la solución hizo que se descarte el empleo de la sustancia
- Los tubos que contenían las diluciones seriadas de los extractos y controles se diluyeron 1:100 en RPMI. Se utilizaron microplacas de noventa y seis pocillos en ocho filas (A-H) y con doce columnas (1-12), Con micro pipeta, se dispensaron 100 μ L de cada concentración de antifúngico en cada columna de la microplaca, comenzando por la de mayor concentración (columna 12A-12H) hasta llegar a la de menor concentración (columna 3A-3H). La columna 2A-2H se usó como control de esterilidad del medio de cultivo y la última columna (1A-1H) como control de crecimiento de las cepas (Figura 21).
- Las microplacas eran selladas para evitar la evaporación del líquido y se inocularon con 100 μ L de la suspensión del inóculo. Se incubaron entre 35 \pm 2°C
- La lectura de los resultados se realizó de forma visual con ayuda de un espejo. Cada pocillo fue comparado con aquel que contenía el control de crecimiento sin antifúngico y los resultados se evaluaron mediante una escala numérica indicada desde 0 a 4 con cruces, como se muestra en la Figura 21, de manera detallada se tiene:

0 = Pocillos ópticamente claros, sin crecimiento (100% de inhibición de crecimiento)

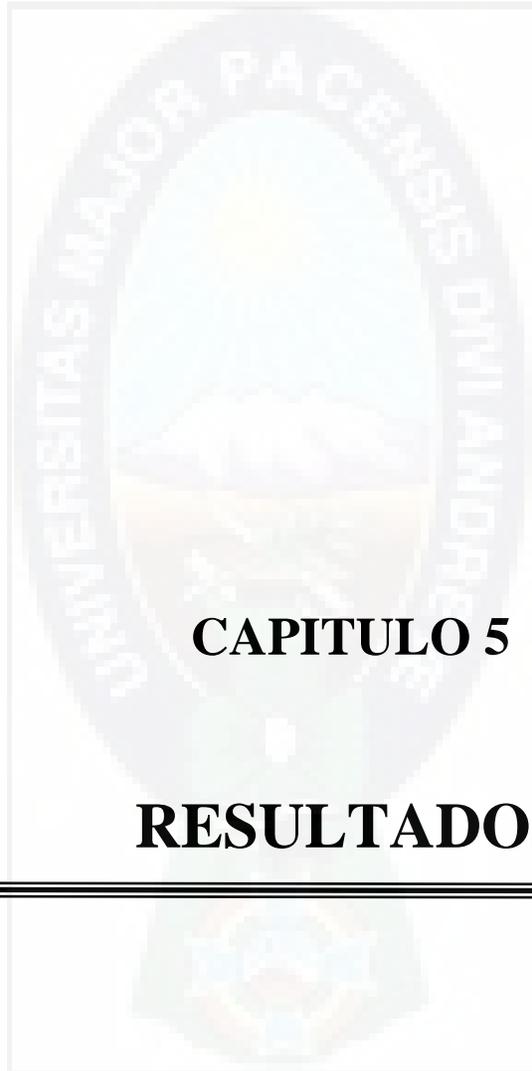
1 = Escaso crecimiento (75% de inhibición de crecimiento)

- 2 = Moderado crecimiento (50% de inhibición de crecimiento)
- 3 = Abundante crecimiento (25% de inhibición de crecimiento)
- 4 = Crecimiento igual que el pocillo control de crecimiento (0% de inhibición de crecimiento)



	C(-)		E	F	K	KJ	$\frac{1}{32}$	$\frac{1}{16}$	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{2}$	1
B1	4	0	0	0	0	0	4	4	3	2	2	1
B2	4	0	0	0	0	0	4	4	3	3	2	1
B3	4	0	0	0	0	0	4	4	3	3	2	2
B4	4	0	0	0	0	0	4	4	4	3	3	2
B5	4	0	0	0	0	0	4	4	3	2	2	1
B6	4	0	0	0	0	0	4	3	3	3	2	2
R3	4	0	0	0	0	0	4	4	3	3	2	2
R4	4	0	0	0	0	0	4	4	3	2	2	1

Figura 21. Esquema de una microplaca con el rango de concentraciones utilizadas.



CAPITULO 5

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. BACTERIAS.

Mediante el Método de Susceptibilidad por Difusión Bauer-Kirby con Disco de Papel impregnado con Extracto sobre Agar, se estudio a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, de la colección de cultivos tipo ATCC del cepario del IIFB, con el fin de obtener una primera serie de resultados, para determinar cuál de los extractos tiene actividad antibacteriana. Cada uno de los extractos vegetales fueron acondicionados en el rango de pH de 6,0 a 7,0 con Acido Clorhídrico denotado al finalizar el código del extracto como P y con Acido Cítrico como C, para poder realizar una comparación de la actividad al interactuar diferentes ácidos, debido a que el acido cítrico es utilizado en la formulación de productos farmacéuticos y comparar la actividad del extracto al variar el tipo de ácido.

Tabla 1. Actividad Antibacteriana de Extractos no Polares de extractos del género *Baccharis* (Cs. QUIMICAS-IIFB).

HALOS DE INHIBICION (mm) DE 2 mg DE EXTRACTOS NO POLARES DEL GENERO <i>Baccharis</i>			
BACTERIA	R3	R5	CONTROL (+) CIPROFLOXACINA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	38
<i>Escherichia coli</i>	20	15	35
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	34	26

Nota. R3 es el Extracto no polar de *B. papillosa* en diclorometano por 18 horas, R5 es el Extracto no polar de *B. papillosa* en diclorometano por 2 horas.

La actividad antibacteriana se observa en la Tabla 1, expresada como halos de inhibición en mm, de extractos no polares en Diclorometano a diferentes tiempos de extracción. La actividad más alta de 34 mm se determinó para *Staphylococcus aureus* con R5, que es el extracto no polar de *B. papillosa* en diclorometano por 2 horas.

Tabla 2. Actividad Antibacteriana de Extractos Polares etanólicos del género *Baccharis* (Cs. QUIMICAS-IIFB).

HALOS DE INHIBICION (mm) DE 2mg DE EXTRACTOS POLARES ETANOLICOS DEL GENERO <i>BACCHARIS</i>								
BACTERIA	B1	B2	B3	B4	B5	B6	R4	CONTROL (+) CIPROFLOXACINA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	–	–	–	–	–	–	–	38
<i>Escherichia coli</i>	20	21	18	20	18	20	19	35
<i>Staphylococcus aureus</i>	12	15	12	–	–	–	12	26

Nota. B1 es el Extracto etanólico de *B. obtusifolia*, B2 es el Extracto etanólico de *B. santilices*, B3 es el Extracto etanólico de *B. latifolia*, B4 es el Extracto etanólico de *B. papillosa*, B5 es el Extracto etanólico de *B. genistelloides* de los Yungas de La Paz, B6 es el Extracto etanólico de *B. genistelloides* de Cochabamba, R4 es el Extracto etanólico de *B. latifolia* por 37 horas.

La actividad antibacteriana de extractos polares etanólicos del género *Baccharis* se muestra en la Tabla 2, expresada como la medida del diámetro del halo de inhibición en mm. Se considera los valores que son iguales o mayores al valor medio del control de inhibición positivo que es Ciprofloxacina. Por lo cual los extractos que manifestaron actividad inhibitoria del crecimiento sobre *Staphylococcus aureus* fueron B1, B2, B3 y

R4. Mientras que *Escherichia coli* presentó sensibilidad a B1, B2, B3, B4, B5, B6 y R4. Con el símbolo – se identifica a los extractos que no tienen actividad inhibitoria.

Tabla 3. Actividad Antibacteriana de Extractos Polares acuosos del género *Baccharis* (Cs. QUIMICAS-IIFB).

HALOS DE INHIBICION (mm) DE 2mg DE EXTRACTOS POLARES ACUOSOS DEL GENERO <i>BACCHARIS</i>								
BACTERIA	S1P	S1C	S2P	S2C	S2O	S3P	S3C	CONTROL (+) CIPROFLOXACINA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20	12	–	12	–	18	–	38
<i>Escherichia coli</i>	–	18	14	20	15	18	20	35
<i>Staphylococcus aureus</i>	–	–	10	12	–	–	–	26

Nota. S1C es el Extracto acuoso de *B. genistelloides* de La Paz con ácido cítrico, S1P es el Extracto acuoso de *B. genistelloides* de La Paz con ácido clorhídrico, S2P es el Extracto acuoso de *B. latifolia* con ácido clorhídrico, S2C es el Extracto acuoso de *B. latifolia* con ácido cítrico, S2O es el Extracto fenólico de polaridad media de *B. latifolia*, S3P es el Extracto acuoso de *B. genistelloides* de Cochabamba con ácido clorhídrico, S3C es el Extracto acuoso de *B. genistelloides* de Cochabamba con ácido cítrico.

Se muestra en la Tabla 3, la actividad antibacteriana expresada como el diámetro de halos de inhibición en mm, donde el extracto que tiene actividad sobre las tres bacterias es S2C. Contra *Pseudomonas aeruginosa* es sensible a S1P y S3P. Sobre *Escherichia coli* actúan S1C, S2C, S2O, S3P y S3C. Mientras que *Staphylococcus aureus* es sensible a S2P y

S2C. Con el símbolo – se identifica a aquellos extractos que no presentaron actividad inhibitoria.

5.2. HONGOS. PRUEBA DE SCREENING. PRUEBA DE MICRODILUCION EN PLACA DE EXTRACTOS VEGETALES DEL GENERO *BACCHARIS*

a) *ASPERGILLUS NIGER*

Se determinó de actividad antifúngica frente a *Aspergillus niger* por el método de microdilución en agar PDA, con extractos de plantas del genero *Baccharis*.

Tabla 4. Porcentaje de inhibición de extractos vegetales no polares del género *Baccharis* y solventes sobre *Aspergillus niger* (Cs. QUIMICAS-IIFB).

MUESTRA	20 mg/ml	50 mg/ml
R3	10	25
R5	30	55
K	60	80
KJ	75	90
ETOH	100	100
DMSO	60	100
H2O	0	0
C(-)	0	0

Nota. R3 es el Extracto no polar de *B. papillosa* en diclorometano por 18 horas, R5 es el Extracto no polar de *B. papillosa* en diclorometano por 2 horas. Los controles positivos Ketoconazol comprimidos simbolizado como K, KJ representa a Ketoconazol Jarabe y F representa a Fluconazol I.V. Los solventes ETOL que es Etanol y DMSO que es Dimetil Sulfóxido.

Se muestra en la Tabla 4 la actividad antibacteriana expresada como el porcentaje de inhibición de los solventes: agua destilada estéril, etanol y dimetil sulfoxido. También los extractos no polares de plantas del genero *Baccharis*, utilizadas en la medicina tradicional como antimicrobianas.

Para un ensayo posterior, se toma en cuenta solamente aquellos porcentajes mayores o iguales a 40% de Inhibición, por lo cual, se observa que el extracto R5 (no polar) es el que presenta inhibición a una concentración de 50 mg/mL.

Tabla 5. Porcentaje de inhibición de extractos polares etanólicos del género *Baccharis* sobre *Aspergillus niger* (Cs. QUIMICAS-IIFB).

MUESTRA	20 mg/ml	50 mg/ml
B1	0	20
B2	0	10
B3	0	10
B4	0	10
B5	10	25
B6	10	25
E10	15	25
E20	15	40
C(-)	0	0

Nota. B1 es el Extracto etanólico de *B. obtusifolia*, B2 es el Extracto etanólico de *B. santeliciis*, B3 es el Extracto etanólico de *B latifolia*, B4 es el Extracto etanólico de *B. papillosa*, B5 es el Extracto etanólico de *B. genistelloides* de La Paz, B6 es el Extracto etanólico de *B. genistelloides* de Cochabamba.

Se muestra en la Tabla 5 el porcentaje de inhibición de extractos no polares en Diclorometano a diferentes tiempos de extracción. La actividad que se toma en cuenta son los porcentajes mayores o iguales al 40% de Inhibición, por lo cual como se observa los extractos polares etanólicos no llegan a este porcentaje de inhibición del crecimientos ninguna de las concentraciones de prueba, por lo cual para un posterior ensayo cuantitativo no se tomaran en cuenta estos extractos.

Tabla 6. Porcentaje de inhibición de extractos polares acuosos del género *Baccharis* sobre *Aspergillus niger* (Cs. QUIMICAS-IIFB).

MUESTRA	20 mg/ml	50 mg/ml
R4	0	10
S1	10	25
S2O	25	55
S2	25	45
S3	10	25
C(-)	0	0

Nota. R4 es el Extracto etanólico de *B. latifolia* por 37 horas, S1 es el Extracto acuoso de *B. genistelloides* de La Paz, S2 es el Extracto acuoso de *B. latifolia*, S2O es el Extracto fenólico de polaridad media de *B. latifolia*, S3 es el Extracto acuoso de *B. genistelloides* de Cochabamba. El control negativo C (-) es *Aspergillus niger*.

Se muestra en la Tabla 6 el porcentaje de inhibición de extractos polares acuosos de especies vegetales del genero *Baccharis*. La actividad que se toma en cuenta son los porcentajes mayores o iguales al 40% de Inhibición, de lo cual S2O, S2 y E20 presentan valores de 55 %, como de 45% y de 40% respectivamente, por lo cual se consideran para un ensayo posterior.

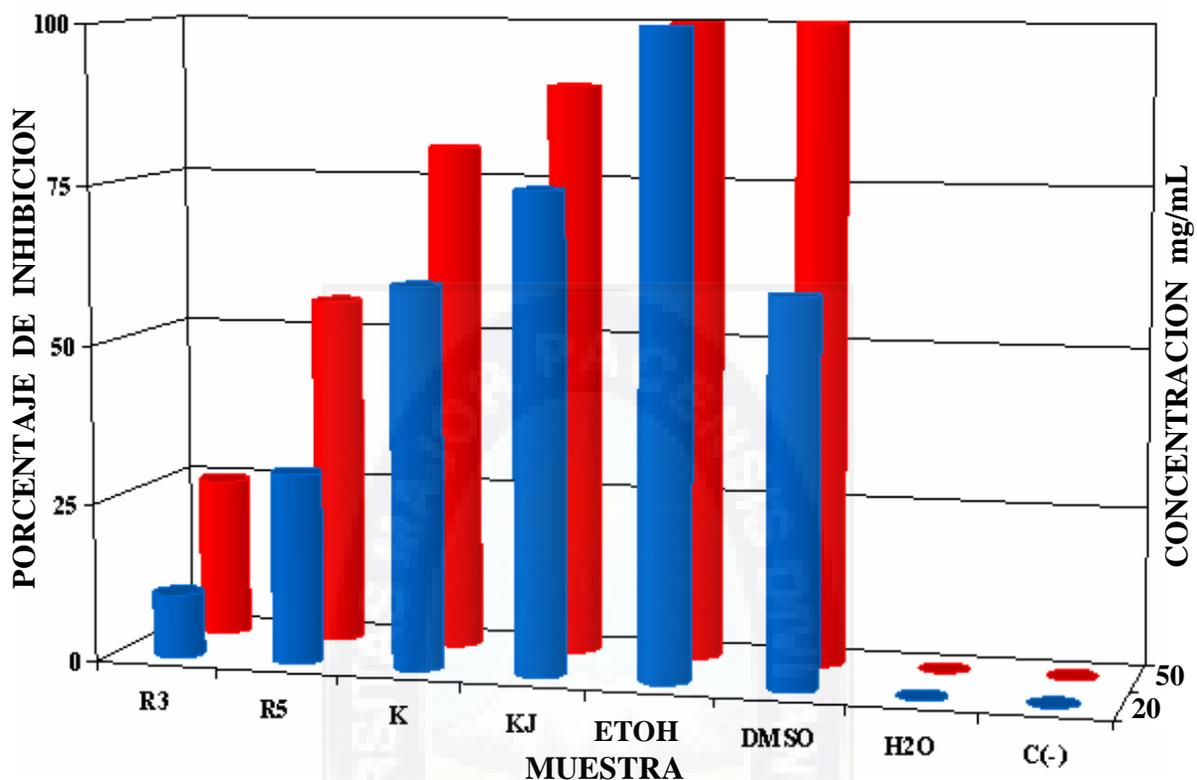


Figura 22. Porcentaje de Inhibición a dos concentraciones de Extractos no polares del género *Baccharis* sobre *Aspergillus niger*.

Nota. R3 es el Extracto no polar de *B. papillosa* en diclorometano por 18 horas, R5 es el Extracto no polar de *B. papillosa* en diclorometano por 2 horas. Los controles positivos Ketoconazol comprimidos 200 mg simbolizado como K, KJ representa a Ketoconazol Jarabe y F es Fluconazol I.V. Los solventes ETOL que es Etanol y DMSO que es Dimetil Sulfóxido. El control negativo C (-) es *Aspergillus niger*.

Los datos de los porcentajes obtenidos de los halos de inhibición de cada extracto se muestran en las Tablas 4, 5 y 6, por otro lado en la Figura 22 se representan los datos de los extractos no polares del género *Baccharis*.

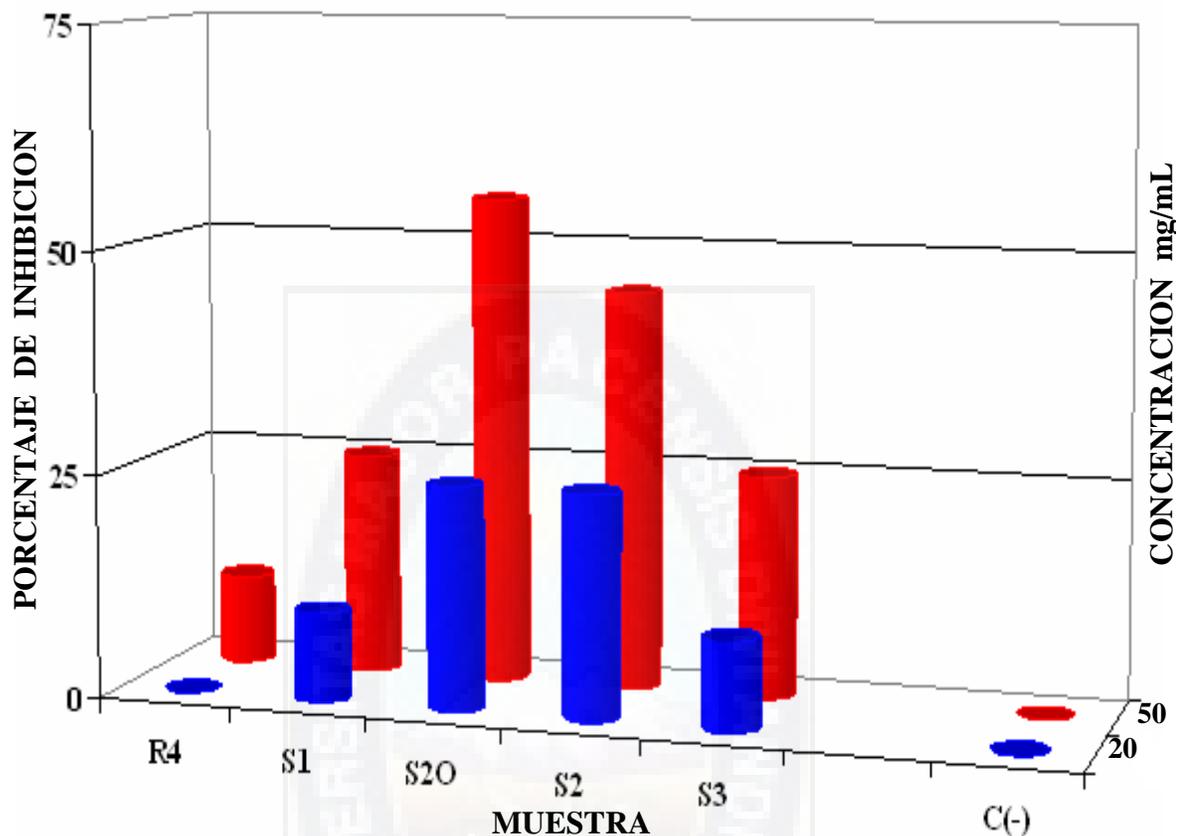


Figura 23. Porcentaje de Inhibición a dos concentraciones de Extractos polares acuosos del género *Baccharis* sobre *Aspergillus niger*.

Nota. S1 es el Extracto acuoso de *B. genistelloides* de La Paz, S2 es el Extracto acuoso de *B. latifolia*, S2O es el Extracto fenólico de polaridad media de *B. latifolia*, S3 es el Extracto acuoso de *B. genistelloides* de Cochabamba. El control negativo C (-) es *Aspergillus niger*.

Los datos de los porcentajes obtenidos de los halos de inhibición de cada extracto se muestran en las Tablas 4, 5 y 6, por otro lado en las Figuras 22 y 23, se representan estos datos, los cuales indican que de los extractos polares acuosos de *Baccharis latifolia*, solamente S2O, S2 presentaron un porcentaje de inhibición de 55 y 45 por ciento respectivamente.

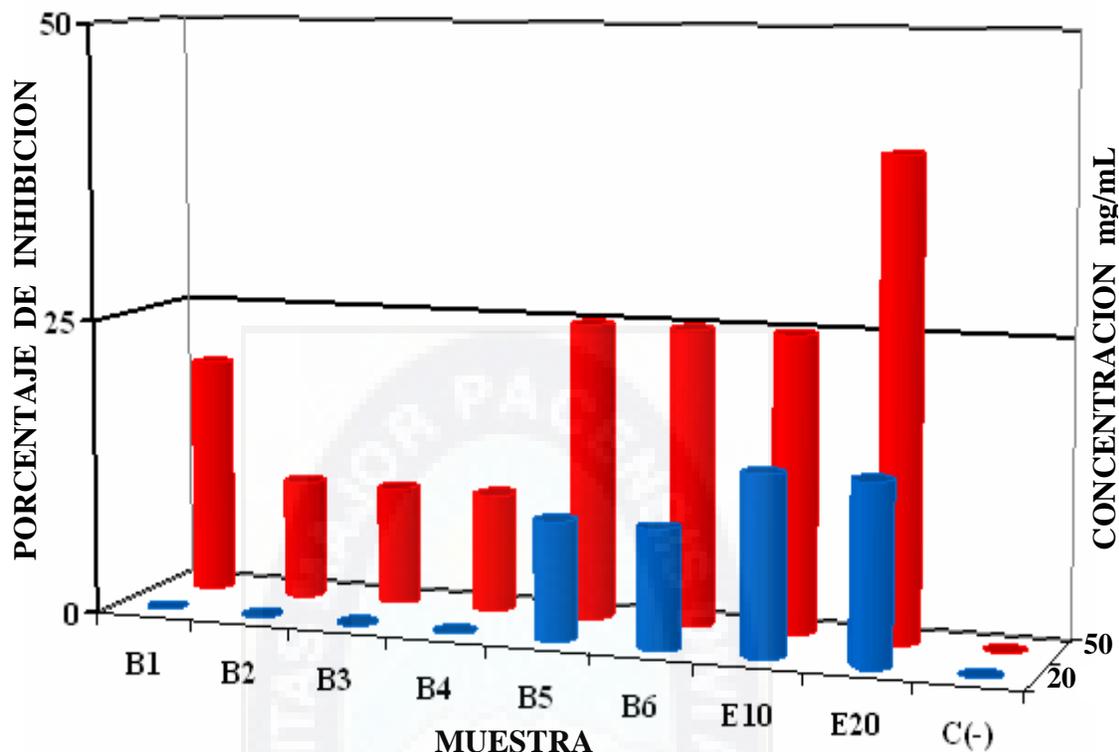


Figura 24. Porcentaje de Inhibición a dos concentraciones de Extractos polares etanólicos del género *Baccharis* sobre *Aspergillus niger*.

Nota. B1 es el Extracto etanólico de *B. obtusifolia*, B2 es el Extracto etanólico de *B. santelicensis*, B3 es el Extracto etanólico de *B. latifolia*, B4 es el Extracto etanólico de *B. papillosa*, B5 es el Extracto etanólico de *B. genistelloides* de los Yungas de La Paz, B6 es el Extracto etanólico de *B. genistelloides* de Cochabamba, R4 es el Extracto etanólico de *B. latifolia* por 37 horas. El control negativo C (-) es *Aspergillus niger*.

Los datos de los porcentajes obtenidos de los halos de inhibición de cada extracto polar etanólico se muestran en la Tabla 5 y se representan en la Figura 24, estos indican que de los extractos polares etanólicos de *Baccharis latifolia*, solamente E20 presentó un porcentaje de inhibición de 40 por ciento para una concentración de 50 mg/mL.

5.3. HONGOS. PRUEBA CUANTITATIVA. PRUEBA DE DILUCION EN PLACA CON POZO CENTRAL DE INOCULO

Para la determinación de la actividad antifúngica de cada extracto vegetal se realizó la siembra en pozo central de inóculo tanto de *Aspergillus niger* como de *Phytophthora palmivora* en medio PDA. Se diluyó cada extracto vegetal en agar, obteniendo una concentración final de 0.05 g/ml, Posteriormente se aplicó en el pozo el inóculo, una suspensión de esporas de $1-5 \times 10^6$ UFC, para luego cultivarlas a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, midiendo el diámetro de crecimiento, utilizando una regla de Este a Oeste y de Norte a Sur, para luego obtener un promedio y graficar estos datos en una curva de crecimiento y comparar los diferentes extractos utilizados frente a un control positivo como Ketoconazol y frente al control negativo según sea el caso *Aspergillus niger* o *Phytophthora palmivora*.

5.3.1. *Aspergillus niger*

De los extractos utilizados se observa en Anexo B que los extractos acuosos S20, E20, comparados con el control negativo, presentan un mejor comportamiento de inhibición del crecimiento de *Aspergillus niger*, desde un inicio, hasta pasadas las 100 horas de incubación. Así también el extracto no polar R5 como se observa en la Figura 25.

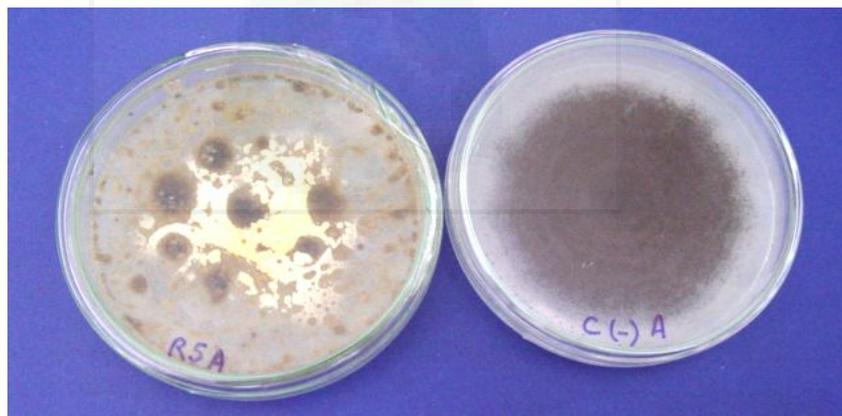


Figura 25. Extracto no polar R5 de *Baccharis papillosa* contra *Aspergillus niger*.

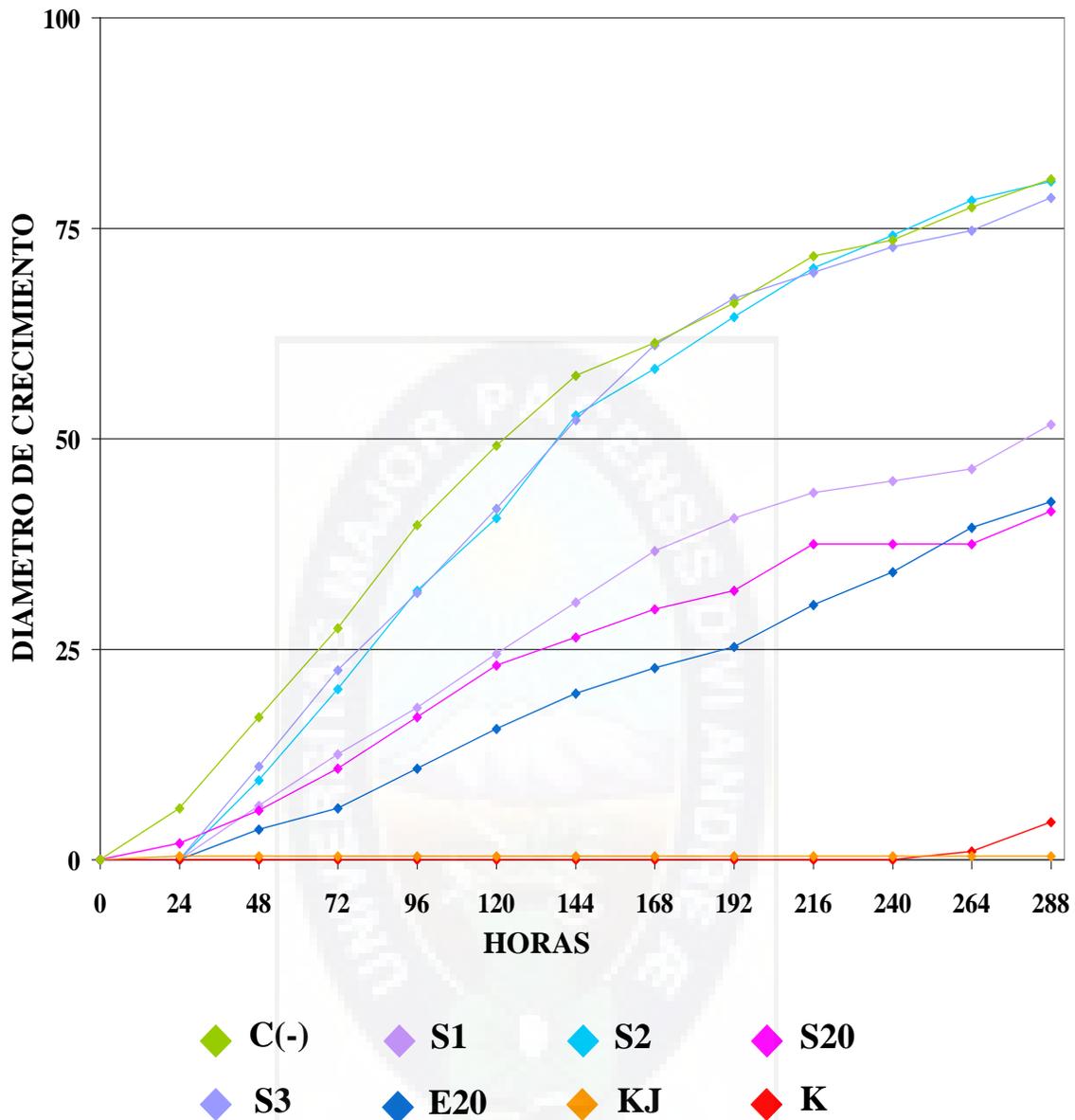


Figura 26. Cinética del crecimiento con Extractos Polares del genero *Baccharis*, que afectan a *Aspergillus niger* Control negativo C(-).

Nota. S1 es el Extracto acuoso de *B. genistelloides* de La Paz, S2 es el Extracto acuoso de *B. latifolia*, S2O es el Extracto fenólico de polaridad media de *B. latifolia*, S3 es el Extracto acuoso de *B. genistelloides* de Cochabamba y E20 es el extracto polar etanólico de *B. latifolia*. Los controles positivos Ketoconazol comprimidos simbolizado como K, luego KJ representa a Ketoconazol Jarabe y F es Fluconazol I.V.

Tabla 7. Velocidad de crecimiento de extractos Polares del género *Baccharis* sobre *Aspergillus niger* (Cs. QUIMICAS-IIFB).

EXTRACTO	COEFICIENTE DE CORRELACION R	VELOCIDAD DE CRECIMIENTO (mm/h)
C (-)	0,997	0,4355
S1	0,9997	0,253
S2	0,9985	0,4392
S2O	0,9932	0,2143
S3	0,999	0,4309
E20	0,9912	0,1657
K	0	0,0
KJ	0	0,0

Nota. S1 es el Extracto acuoso de *B. genistelloides* de La Paz, S2 es el Extracto acuoso de *B. latifolia* S2O es el Extracto fenólico de polaridad media de *B. latifolia*, S3 es el Extracto acuoso de *B. genistelloides* de Cochabamba y E20 es el extracto polar etanólico de *B. latifolia*. Los controles positivos Ketoconazol comprimidos representado por K y KJ es Ketoconazol Jarabe.

La velocidad de crecimiento (Tabla 7 y Figura 26), comparando con el control negativo *Aspergillus niger* que crece a 0,4355 mm/hora, mientras que S2 y E20, crecen a una velocidad de 0,2143 y 0,1657 mm/hora respectivamente.

También se observa que los controles positivos Ketoconazol comprimidos y Ketoconazol Jarabe inhiben el crecimiento totalmente hasta pasados los 10 días de estudio.

5.3.2. *Phytophthora palmivora*

Se tomó en cuenta a los extractos que presenten actividad antifúngica sobre *Phytophthora palmivora* en valores de porcentaje de inhibición mayor o igual al 40% para un siguiente ensayo, para determinar la velocidad de inhibición en medio sólido.

Tabla 8. Porcentaje de inhibición de extractos polares del genero *Baccharis* sobre *Phytophthora palmivora* (Cs. QUIMICAS-IIFB).

MUESTRA	20 mg/ml	50 mg/ml
S1	10	20
S2	25	50
S2O	50	60
S3	10	20
E10	20	30
E20	50	75
K	60	75
KJ	70	80
H2O	0	0
C(-)	0	0

Nota. S1 y S3 son Extractos acuosos de *B. genistelloides* de La Paz y Cochabamba respectivamente, S2 es el Extracto acuoso de *B. latifolia*, S2O es el Extracto fenólico de polaridad media de *B. latifolia* y E20 es el extracto polar etanólico de *B. latifolia*. Los controles positivos Ketoconazol comprimidos K y KJ Ketoconazol Jarabe.

Se muestra en la Tabla 8 el porcentaje de inhibición de extractos polares acuosos de especies vegetales del genero *Baccharis*. La actividad que se toma en cuenta son los

porcentajes mayores o iguales al 40% de Inhibición, de lo cual S2O, S2 y E20 presentan valores de 55 %, como de 45% y de 40% respectivamente, por lo cual se consideran para un ensayo posterior.

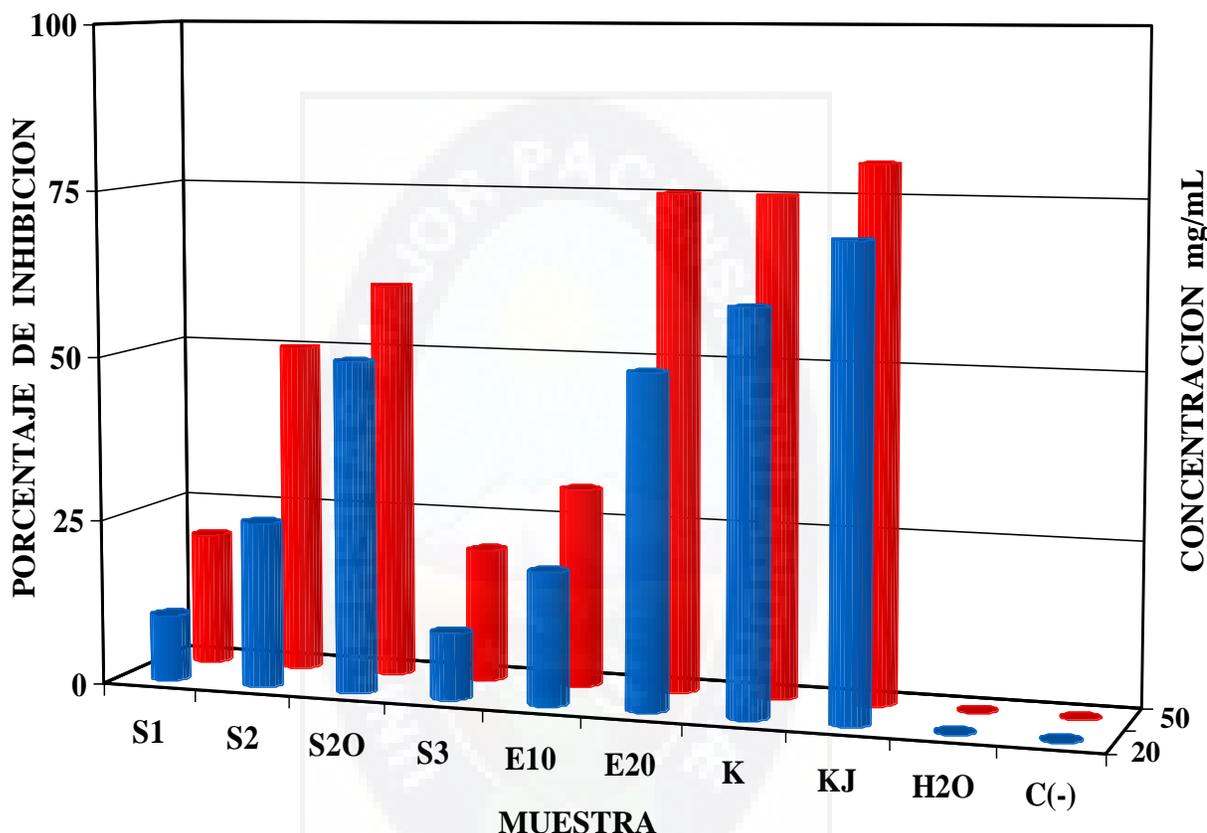


Figura 27. Porcentaje de Inhibición de extractos polares del genero *Baccharis* sobre *Phytophthora palmivora*.

De los extractos polares de *Baccharis* ensayados (Tabla 8 y Figura 27), solamente *B. latifolia* presenta actividad inhibitoria con el extracto de polaridad media S2O de 50% a 20 mg/mL y de 60% a 50 mg/mL. El extracto acuoso S2 inhibió 50% a 50 mg/mL y el extracto etanólico E20 tuvo 50% de inhibición a 20 mg/mL y de 75% a 50 mg/mL.

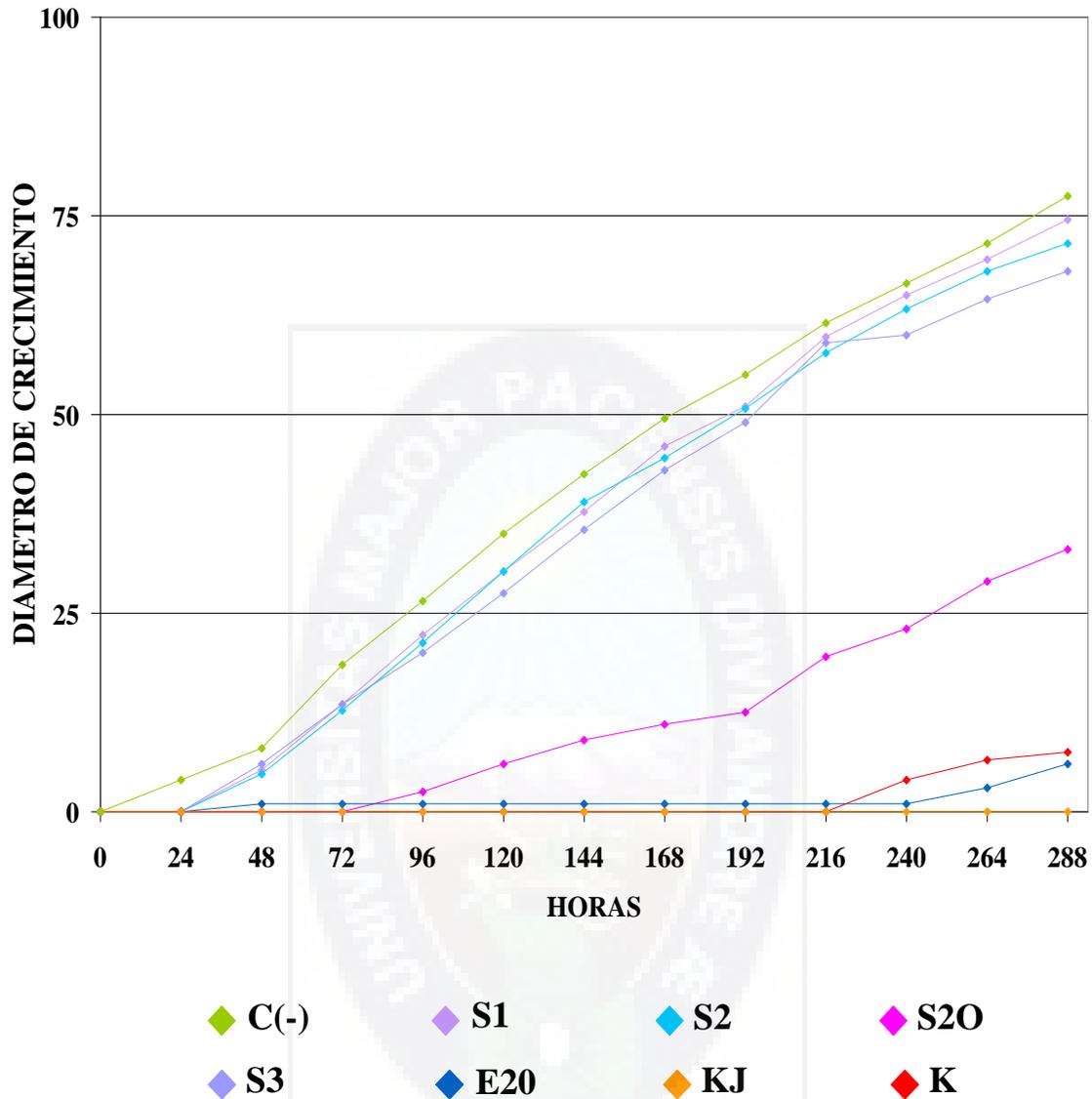


FIGURA 28. Cinética del crecimiento con extractos polares del genero *Baccharis* con ácido clorhídrico sobre *Phytophthora palmivora* Control negativo C(-).

Nota. Donde S1 es el Extracto acuoso de *B. genistelloides* de La Paz, S2 es el Extracto acuoso de *B. latifolia*, S2O es el Extracto fenólico de polaridad media de *B. latifolia*, S3 es el Extracto acuoso de *B. genistelloides* de Cochabamba y E2 es el extracto polar etanólico de *B. latifolia*. Los Controles positivos Ketoconazol comprimidos simbolizado como K y KJ representa a Ketoconazol Jarabe.

Tabla 9. Velocidad de crecimiento de extractos polares del genero *Baccharis* sobre *Phytophthora palmivora* (Cs. QUIMICAS-IIFB).

MUESTRA	COEFICIENTE DE CORRELACION R	VELOCIDAD DE CRECIMIENTO (mm/h)
C (-)	0,9941	0,3118
S1	0,9977	0,3172
S2	0,9953	0,3127
S2O	0,9239	0,1
S3	0,9981	0,3052
E20	0,3	0,0028
K	0,5362	0,0214
KJ	0	0

Nota. S1 es el Extracto acuoso de *B. genistelloides* de La Paz, S2 es el Extracto acuoso de *B. latifolia*, S2O es el Extracto fenólico de polaridad media de *B. latifolia*, S3 es el Extracto acuoso de *B. genistelloides* de Cochabamba y E2 es el extracto polar etanólico de *B. latifolia*. Los Controles positivos Ketoconazol comprimidos simbolizado como K y KJ representa a Ketoconazol Jarabe.

En la Tabla 9 y Figura 28 vemos que la velocidad de crecimiento es lineal donde *Phytophthora palmivora* se desarrolla a 0,3118 mm/hora, en comparación a extractos de *Baccharis latifolia* como ser el extracto fenólico de polaridad media S2O el cual crece a razón de 0,1 mm/hora y el extracto etanólico E20 crece a 0,0028 mm/hora.

5.4. PRUEBA CUALITATIVA. PRUEBA DE DILUCION EN MICROPLACA TC96 PARA LEVADURAS (M27-A).

5.4.1. *Candida albicans*

Se determinó cualitativamente la inhibición de las diluciones de los extractos, por observación a simple vista de la presencia de turbidez o formación de un botón de agrupamiento de microorganismos, para determinar si existe o no inhibición.

Las diluciones se realizaron desde la más concentrada 50 mg/mL, dividiendo por la mitad cada una de las diluciones hasta completar a una concentración de $\frac{1}{32}$.

Se utiliza como Controles Positivos de Inhibición Fluconazol I.V. (F) y Ketoconazol en forma de Comprimidos (K) y Ketoconazol en forma de Jarabe (KJ). Se utilizaron los extractos de *Baccharis latifolia*, *Baccharis genistelloides* de La Paz y Cochabamba.

Se realizó la prueba cualitativa para screening de dilución en microplaca TC96 para levaduras, estudiando los extractos vegetales frente *Candida albicans* del cepario del IIFB, para determinar aquellos que presenten actividad antimicótica, determinándose mediante análisis visual de la turbidez o presencia de un punto de concentración de partículas, la actividad del extracto frente a la cepa.

No se pudo leer en el equipo de recuento en placa, por la presencia de color de cada extracto vegetal, el cual interfiere en la lectura espectrofotométricamente, utilizando un lector de placa ELISA (Figura 29).

	C(-)	E	F	K	KJ	$\frac{1}{32}$	$\frac{1}{16}$	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{2}$	1
B6	4	0	0	0	0	4	4	3	3	2	2
R3	4	0	0	0	0	4	4	4	3	3	2
R4	4	0	0	0	0	4	4	3	3	2	2
R5	4	0	0	0	0	4	4	3	3	2	2
S1	4	0	0	0	0	4	4	3	3	2	1
S2	4	0	0	0	0	4	3	3	2	1	0
S20	4	0	0	0	0	4	3	3	2	2	1
S3	4	0	0	0	0	4	3	3	2	2	1

FIGURA 29. Microdilución de extractos polares y no polares con ácido clorhídrico de plantas del genero *Baccharis* frente a *Candida albicans* C(-).

Nota. B6 es el Extracto etanólico de *B. genistelloides* de Cochabamba, R3 es el Extracto no polar de *B. papillosa* en diclorometano por 18 horas, R4 es el Extracto etanólico de *B. latifolia* por 37 horas, R5 es el Extracto no polar de *B. papillosa* en diclorometano por 2 horas, S1 es el Extracto acuoso de *B. genistelloides* de La Paz, S2 es el Extracto acuoso de *B. latifolia*, S2O es el Extracto fenólico de polaridad media de *B. latifolia*, S3 es el Extracto acuoso de *B. genistelloides* de Cochabamba.

De los extractos ensayados como se muestra en la Figura 29, se tiene que el extracto acuoso de *Baccharis latifolia* S2 presenta poca o ninguna turbidez, indicio de que existe una actividad inhibitoria en las primeras concentraciones diluidas. Por otro lado se observa la presencia de un poco de turbidez para los extractos S1 y S3, lo que indica que puede existir cierto porcentaje mínimo de inhibición. Todo esto nos permite continuar con la siguiente prueba.

5.5. METODO DE SUSCEPTIBILIDAD POR DIFUSION BAUER-KIRBY DE DISCOS DE PAPEL APLICADO CON EXTRACTOS SOBRE AGAR PARA *Candida albicans*

Continuando con el estudio para determinar la actividad inhibitoria, se aplicó el Método de Susceptibilidad por Difusión BAUER-KIRBY con disco de papel impregnado con extractos vegetales sobre agar, determinándose mediante esta prueba de difusión en disco, la acción inhibitoria del extracto sobre *Candida albicans*.

Tabla 10. Porcentaje de inhibición de extractos polares del genero *Baccharis* sobre *Candida albicans* (Cs. QUIMICAS-IIFB).

MUESTRA	0,5 mg	1 mg
S1	33	42
S2	30	37
S2O	20	35
S3	25	42
E20	10	33
K	17	58
KJ	20	60
C(-)	0	0

Nota. S1 es el Extracto acuoso de *B. genistelloides* de La Paz, S2 es el Extracto acuoso de *B. latifolia*, S2O es el Extracto fenólico de polaridad media de *B. latifolia*, S3 es el Extracto acuoso de *B. genistelloides* de Cochabamba y E20es el extracto polar etanólico de *B. latifolia*. Los Controles positivos Ketoconazol comprimidos simbolizado como K y KJ representa a Ketoconazol Jarabe.

Para conocer el extracto que presenta actividad antifúngica se toma en cuenta los halos de aquellos que fueron igual o están por encima de 30% de inhibición. La Tabla 10 presenta el porcentaje del halo de inhibición de los extractos acuosos de *B. latifolia* S2 de 37 %, de S2O de 35%, también se tomo en cuenta a *B. genistelloides* S1 de la Paz y S3 de Cochabamba ambos extractos acuosos con 42% de inhibición.

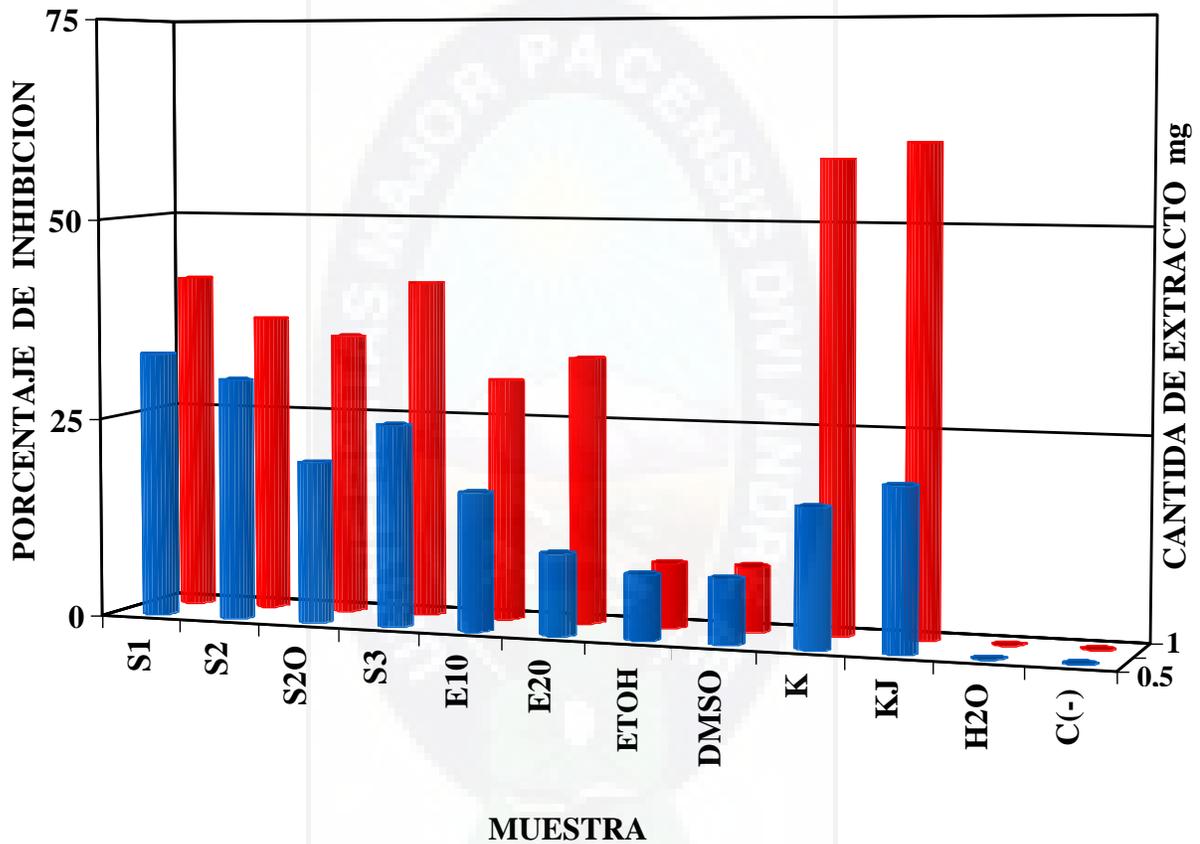


Figura 30. Halos de inhibición en mm de extractos polares de plantas del genero *Baccharis* frente a *Candida albicans*.

Para conocer el extracto que presenta actividad antifúngica se toma en cuenta los halos de aquellos que fueron igual o están por encima de 30% de inhibición. La Tabla 10 y Figura 30 representan el porcentaje del halo de inhibición de los extractos acuosos de *B. latifolia* S2 de 37 %, de S2O de 35%, también se tomo en cuenta a *B. genistelloides* S1 de la Paz y S3 de Cochabamba, ambos extractos acuosos con 42% de inhibición.

5.6. PRUEBA DE LA DINAMICA DE ACCION MICROBICIDA. CURVAS DE LETALIDAD PARA *Candida albicans*.

Los extractos seleccionados como activos de *Baccharis latifolia* y *Baccharis genistelloides*, fueron evaluados por el método por difusión en discos. Es una prueba cuantitativa para determinar la actividad fungicida y/o fungistática.

Para discriminar la actividad fungicida y/o fungistática, se realizó la prueba de la dinámica de acción inhibitoria en el tiempo, donde se obtienen Curvas de letalidad para cada uno de los extractos antimicrobianos, realizándose el ensayo para los extractos activos de *B. latifolia* y *B. genistilloides*, utilizando en este proceso Acido Cítrico al 50 % y Acido Clorhídrico 1N para obtener un rango de pH de 6,0 a 7,0 (Anexo D).

5.6.1. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DEL EXTRACTO A DIFERENTES TIEMPOS DE CONTACTO

Se considera como fungicida aquel extracto que por lo menos tenga 3 unidades logarítmicas de diferencia con el control negativo y además que no recupere en el tiempo la concentración inicial de inóculo aplicado. Mediante las curvas de letalidad se valora la capacidad de inhibición en relación con el tiempo y con distintas concentraciones fijas de antimicrobiano.

También se evaluó a diferentes tiempos el arrastre del antimicrobiano tanto de los controles positivos Ketoconazol y Fluconazol, como de los extractos a diferentes tiempos, observando que se desarrolla normalmente el microorganismo, sin ninguna alteración en el tiempo.

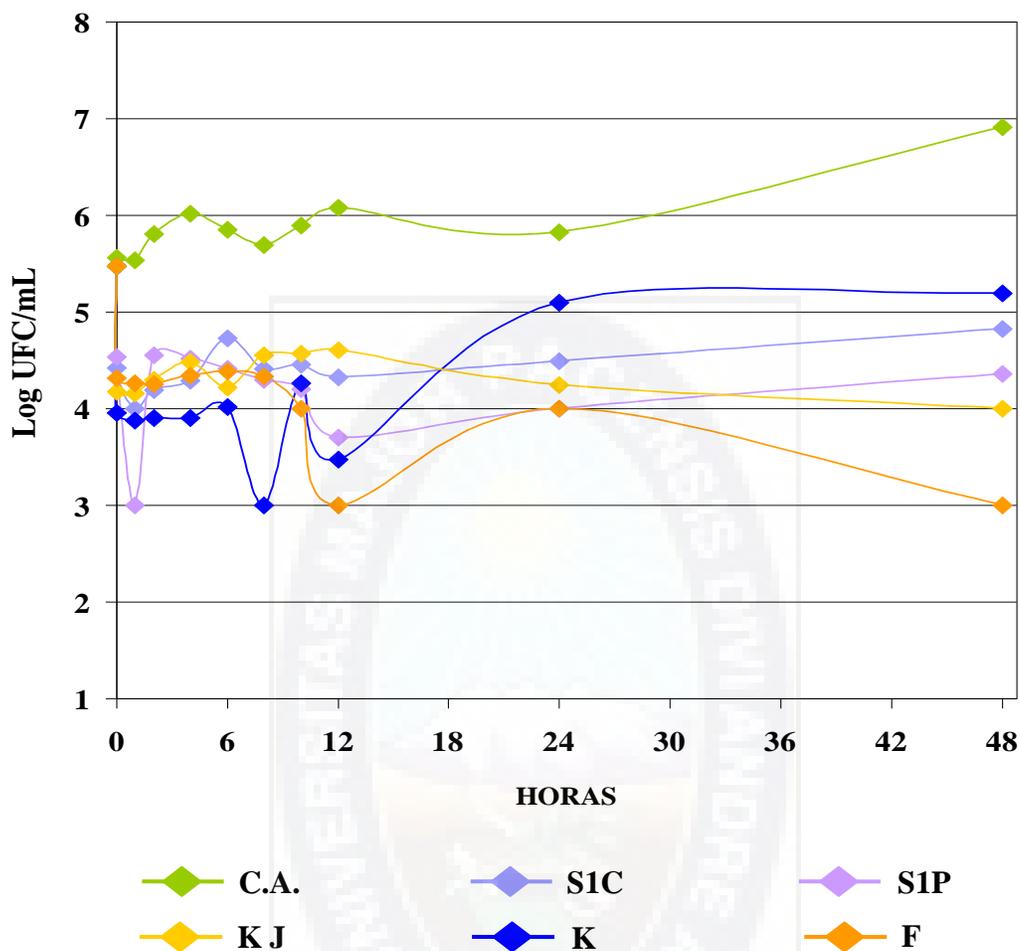
EXTRACTOS ACUOSOS DE *BACCHARIS GENISTILLOIDES* (LA PAZ)

Figura 31. Actividad antifúngica de extractos polares acuosos de *Baccharis genistilloides* de La Paz contra *Candida albicans* Control negativo C.A.

Nota. S1C es el Extracto con ácido cítrico, S1P es el Extracto con ácido clorhídrico. Los Controles positivos Ketoconazol Jarabe simbolizado como KJ y K representa a Ketoconazol comprimidos y F es Fluconazol I.V.

En la Figura 31 podemos ver que las curvas de mortalidad tiempo de los extractos acuosos de *B. genistilloides* de La Paz S1C y S1P que descienden dos unidades logarítmicas en las dos primeras horas, para luego incrementar su concentración cercana al inóculo inicial. Al no presentar tres unidades de logaritmo de diferencia con el control negativo C.A. y llegar a 4,8 y 4,3 log U.F.C./mL respectivamente, podemos considerar

que los extractos de *B. genistelloides* pueden presentar un comportamiento fungistático utilizando cantidades mayores de 1 mg de extracto.

EXTRACTOS ACUOSOS DE *BACCHARIS GENISTELLOIDES* (COCHABAMBA)

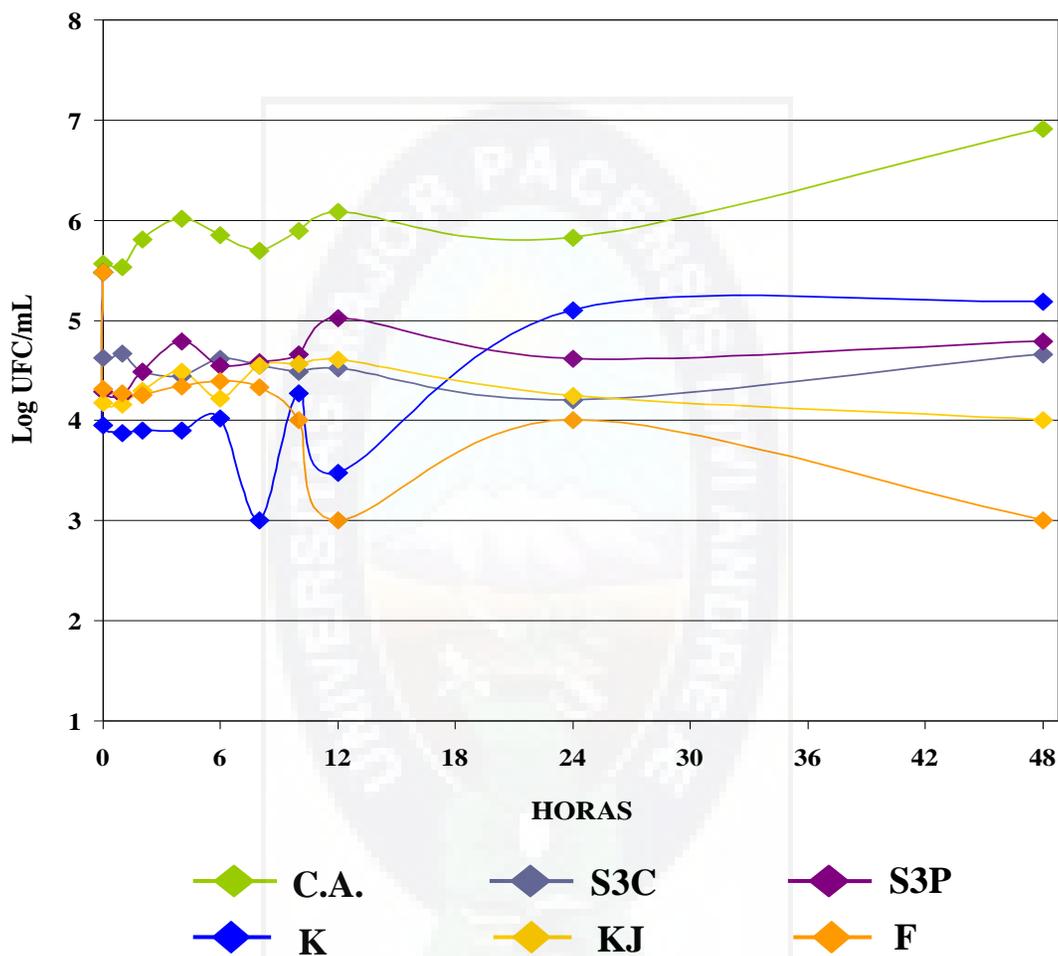


Figura 32. Actividad antifúngica de extractos polares acuosos de *Baccharis genistelloides* de Cochabamba contra *Candida albicans* Control negativo C.A.

Nota. S3C es el Extracto con ácido cítrico, S3P es el Extracto con ácido clorhídrico. Los Controles positivos Ketoconazol Jarabe simbolizado como KJ y K representa a Ketoconazol comprimidos y F es Fluconazol I.V.

Los extractos acuosos en la Figura 32 de *B. genistelloides* de Cochabamba S3C y S3P no descienden más de 1 Log U.F.C./mL, en las dos primeras horas y luego aumenta

ligeramente la población microbiana permaneciendo casi constante muy cerca del valor del inóculo inicial. Comparando con el Control negativo C.A. se puede decir que existe la posibilidad de un comportamiento fungistático a cantidades mayores de 1 mg de extracto acuoso.

EXTRACTOS ACUOSOS DE *BACCHARIS LATIFOLIA*

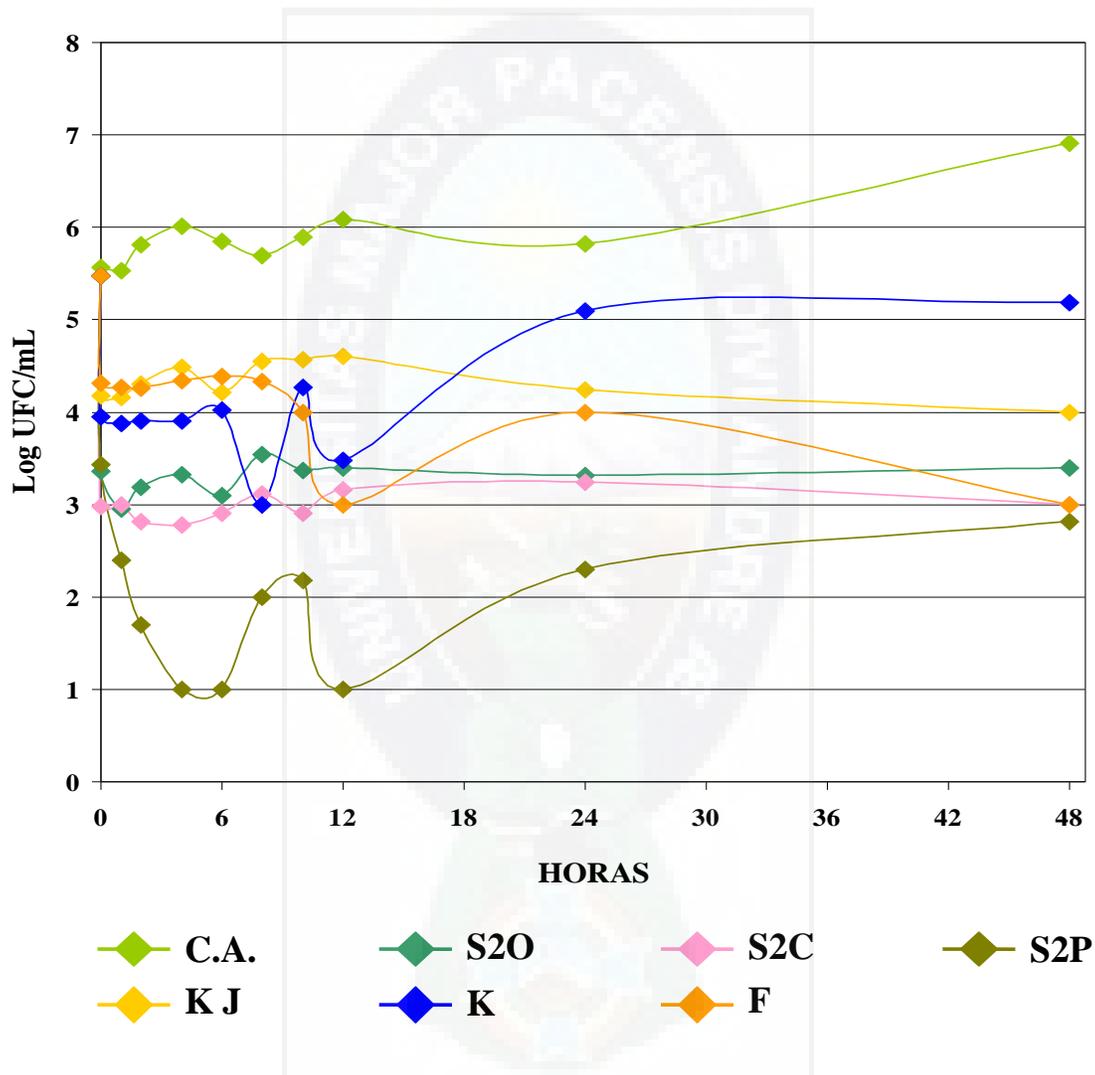


Figura 33. Actividad antifúngica de extractos polares de *Baccharis latifolia* contra *Candida albicans* Control negativo C.A.

Nota. S3C es el Extracto con ácido cítrico, S3P es el Extracto con ácido clorhídrico. Los Controles positivos Ketoconazol Jarabe simbolizado como KJ y K representa a Ketoconazol comprimidos y F es Fluconazol I.V.

Para *Baccharis latifolia* (Figura 33), el extracto S2P inhibe de 5,8 a cerca de 1 U.F.C./mL hasta las 12 horas de ensayo, para luego permitir un moderado incremento de la concentración microbiana llegando a una concentración de 3 log U.F.C./mL. El extracto S2C descenden inicialmente de 5,8 a 3,0 U.F.C./mL hasta las 6 horas, posteriormente incrementa su concentración microbiana de *Candida albicans* hasta permanecer casi constante a 3,5 U.F.C./mL. Pasadas las 2 horas de ensayo el extracto S2O inhibe a cerca de 3 log U.F.C./mL, luego se observa un ligero incremento a 3,6 U.F.C./mL, para continuar estable a lo largo de las otras 24 horas.

EXTRACTO ETANOLICO DE *BACCHARIS LATIFOLIA*

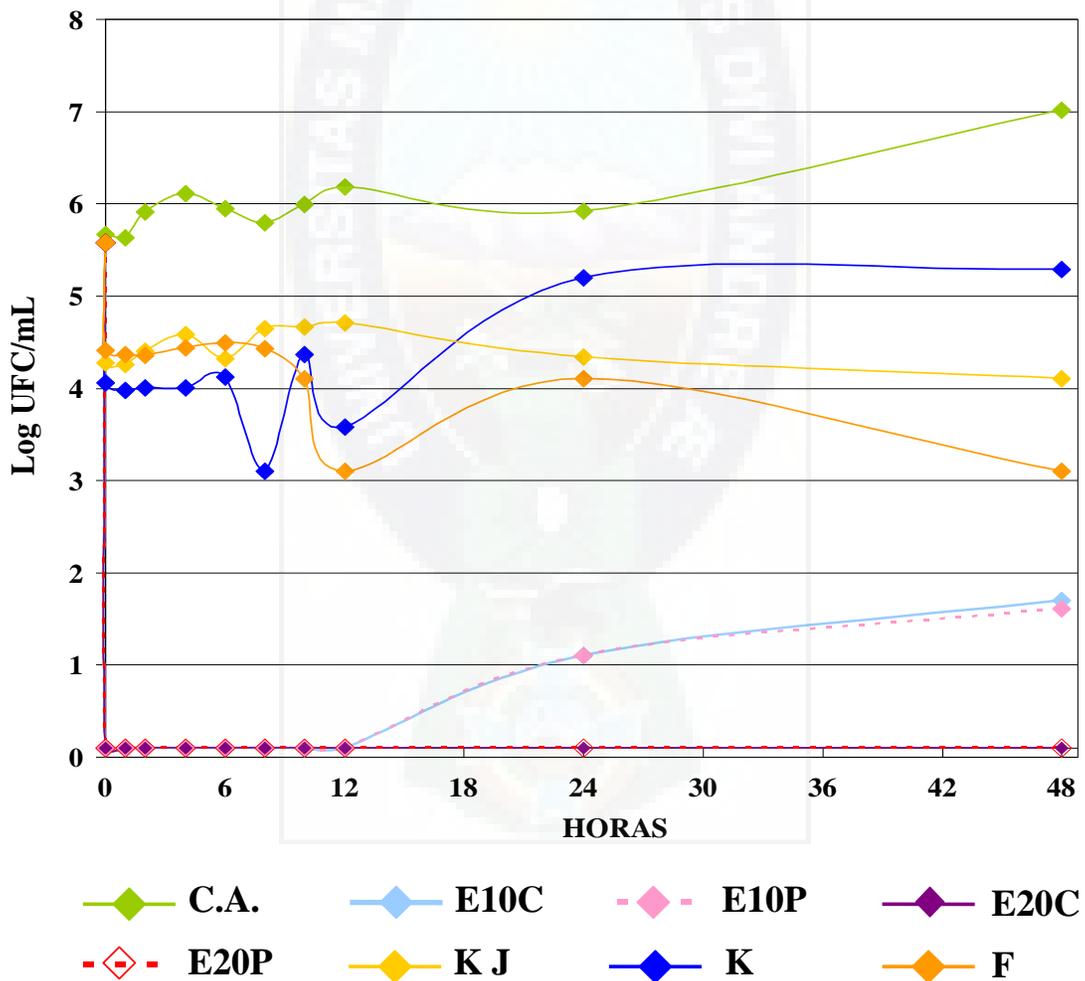
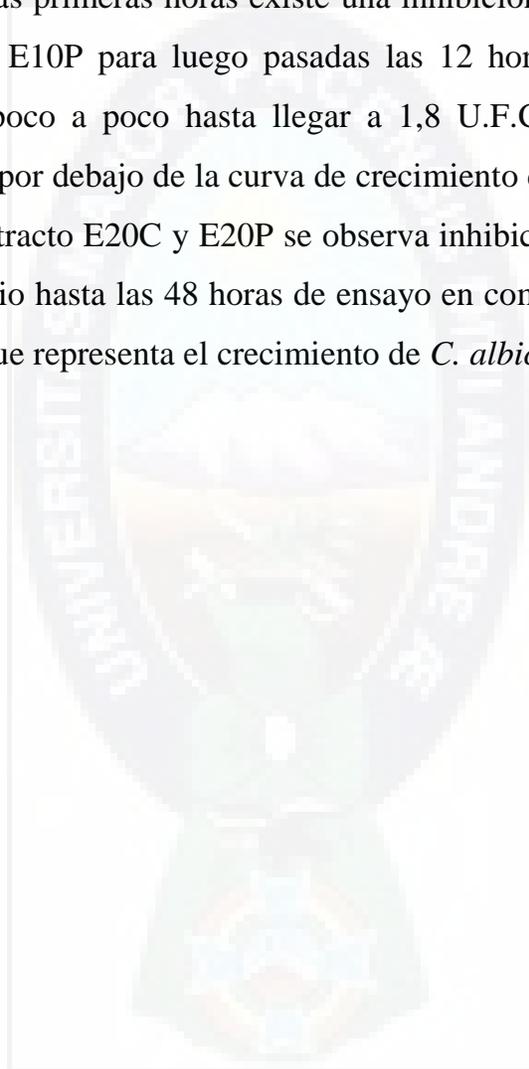
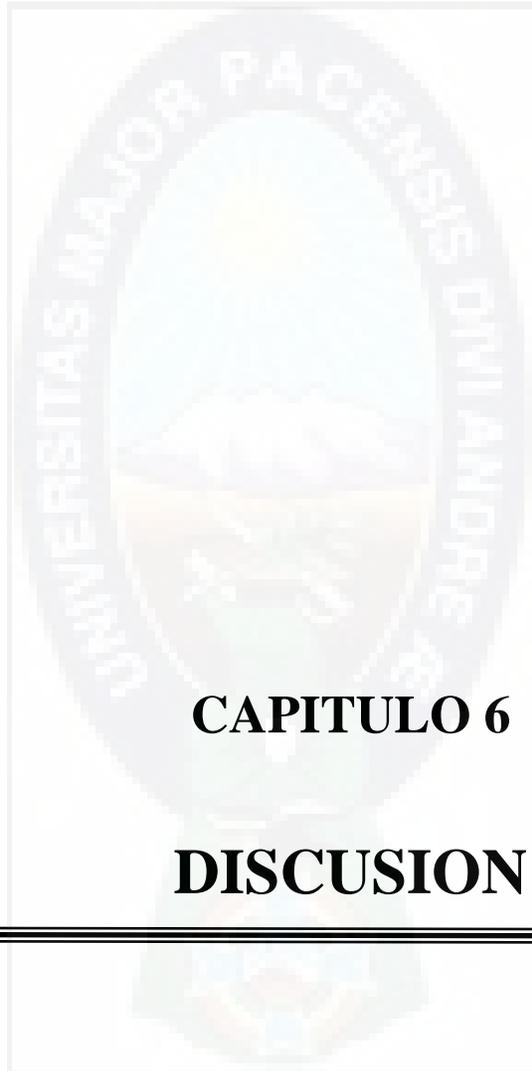


Figura 34. Actividad antifúngica de extractos polares etanólicos de *Baccharis latifolia* de La Paz contra *Candida albicans* Control negativo C.A.

Nota. E10C es el Extracto con ácido cítrico, E10P es el Extracto con ácido clorhídrico, E20C es el Extracto con ácido cítrico y E20P es el Extracto con ácido clorhídrico. Los Controles positivos Ketoconazol Jarabe simbolizado como KJ y K representa a Ketoconazol comprimidos y F es Fluconazol I.V.

La representación de la letalidad de los extractos etanólicos se observa en la Figura 34, donde se tiene que a las primeras horas existe una inhibición total al inóculo de *Candida albicans* con E10C y E10P para luego pasadas las 12 horas comenzar a disminuir su actividad inhibitoria poco a poco hasta llegar a 1,8 U.F.C./mL, pero aun mantiene 3 unidades logarítmicas por debajo de la curva de crecimiento de *Candida albicans* en color verde claro. Con el extracto E20C y E20P se observa inhibición total del desarrollo de *C. albicans* desde un inicio hasta las 48 horas de ensayo en comparación al control negativo en línea verde claro, que representa el crecimiento de *C. albicans*.





CAPITULO 6

DISCUSION

6. DISCUSION

6.1. BACTERIAS

De los ensayos con bacterias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, de la colección de cultivos tipo ATCC del cepario del Area de Microbiología del Instituto de Investigaciones Fármaco-Bioquímicas se puede ver en las Tablas 1, 2 y 3, que la mayoría de los extractos vegetales de especies del género *Baccharis* obtenidos en el Area de Productos Naturales de la Carrera de Ciencias Químicas, fueron activos frente a estos patógenos humanos.

Se visualiza el efecto de un mismo extracto al variar el tipo de ácido para equilibrar el pH, los extractos de *Baccharis genistelloides* de La Paz S1P y S1C, presentaron actividad inhibitoria diferente, el primero frente a *Pseudomonas aeruginosa* y el segundo a *Escherichia coli*. De la misma manera el extracto etanólico B5, de *B. genistelloides* inhibió a *Escherichia coli*. También podemos notar que extractos de *B. genistelloides* de Cochabamba S3P y S3C presentaron actividad inhibitoria, el primero frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, mientras que el segundo solo frente a *Escherichia coli*, mientras que el extracto etanólico B6 inhibió solamente a *Escherichia coli*.

Estos resultados muestran un espectro de acción de los extractos de *Baccharis* en especial la especie *Baccharis genistelloides* sobre bacterias gram-negativas. También es bueno resaltar la susceptibilidad mostrada por *P. aeruginosa*, una bacteria tradicionalmente resistente a muchos antimicrobianos empleados comúnmente.

Se ha encontrado que los extractos presentan actividad inhibitoria del crecimiento de bacterias, utilizando extractos de *Baccharis latifolia*, como es el caso de S2P, S2C, donde el primero actuó sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* mientras que

el segundo es activo frente a los tres patógenos de ensayo, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*. Sin embargo el extracto S2C presenta mayor actividad a la misma concentración frente a *Escherichia coli*. Cuando se empleo el extracto fenólico de polaridad media S2O, presento un menor halo de inhibición frente a *Escherichia coli* y no presenta inhibición sobre *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*.

Utilizando extractos acuosos que permiten una mejor difusión en el medio agar, vemos que podemos mejorar la distribución de los extractos en el medio, lo cual no significa que los extractos poco polares no tengan actividad sino que tienen dificultades en su distribución radial sobre un medio polar como es el agar.

Las bacterias Gram-negativas, generalmente son las menos susceptibles porque poseen una membrana externa con superficie hidrofílica, debido a la presencia de moléculas de lipopolisacáridos que actúan como barrera de penetración de macromoléculas, además de compuestos hidrofóbicos. Es por esta razón que las bacterias Gram-negativas son relativamente resistentes a antibióticos hidrofóbicos y drogas tóxicas, por lo cual los extractos polares ensayados pueden actuar inhibiendo su desarrollo.

En la identificación del extracto vegetal de *Baccharis* capaz de inhibir el crecimiento de cepas de bacterias de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, se realizó la prueba de difusión en placa, BAUER-KIRBY, que nos muestra una respuesta inhibitoria a las 24 horas, por lo cual se recomienda continuar la investigación para determinar la cinética y capacidad inhibitoria frente a estos microorganismos, realizando las curvas de letalidad para así contar con una colección de datos de la cinética de comportamiento de cada uno de los extractos frente a cada uno de los patógenos humanos.

6.2. HONGOS.

Se realizó la prueba de microdilución en agar PDA para determinar cual extracto presenta actividad antimicrobiana frente a *Aspergillus niger* y *Phytophthora palmivora*. Todos los extractos que presentaron valores en porcentaje de inhibición (Tabla 4, 5 y 6), mayor o igual al 40% pasaron a un siguiente ensayo para determinar la velocidad de inhibición en medio sólido.

a) Pruebas con *Aspergillus niger*

De los resultados expuestos en la Tabla 4, podemos ver que el extracto etéreo no polar de *Baccharis papillosa* R5 inhibió con 50 mg/mL a *Aspergillus niger* como se observa en la Figura 22. Sin embargo esta actividad podría estar disminuida por la mezcla heterogénea con el medio polar, del agar PDA.

De los extractos polares de *Baccharis latifolia* que se observan en la Tabla 5 y 6, solamente S20, S2 y E2 presentaron un porcentaje de inhibición de 55, 45 y 40 por ciento respectivamente a una concentración de 50 mg/mL (Figuras 22, 23 y 24), de los cuales se determinó su velocidad de crecimiento (Tabla 7), donde se puede ver que la velocidad de crecimiento disminuye por lo menos la mitad en el caso de los extractos S1, S20 Y E2

Con los resultados obtenidos se puede observar en la Figura 26, que los extractos S1, S20, E2 inhiben cerca del 50% el crecimiento de *Aspergillus niger*.

Esta buena actividad, posiblemente esté relacionado a que los extractos son polares y tienen buena difusión en el medio sólido. Por otro lado esta planta presenta triterpenos y flavonoides que según el uso tradicional tienen actividad como antisépticos o antimicrobianos.

b) Pruebas con *Phytophthora palmivora*

En la Tabla 8 y Figura 27, de los extractos polares de *Baccharis* ensayados, solamente *B. latifolia* presenta actividad inhibitoria con el extracto de polaridad media S2O tanto a 20 mg/mL como a 50 mg/mL por encima del 50%. El extracto acuoso S2 solo inhibe a 50 mg/mL y el extracto etanólico E2 presento inhibición del crecimiento tanto a 20 mg/mL como a 50 mg/mL por encima del 50%.

En la Tabla 9 vemos que la velocidad de crecimiento del Control negativo *Phytophthora palmivora* es de 0,3118 mm/hora, en comparación a extractos de *Baccharis latifolia* como ser el extracto fenólico de polaridad media S2O crece a 0,1 mm/hora y el extracto etanólico E2 a 0,0028 mm/hora. Estos resultados muestran que el extracto etanólico es mucho más efectivo para inhibir a *Phytophthora*. Esto posiblemente se deba a que el etanol extrae tanto compuestos polares como poco polares. Esta mezcla de compuesto podría tener un efecto sinérgico en la inhibición de este fitopatógeno.

De la misma manera en la figura 28, podemos ver mediante la cinética de crecimiento, que el extracto polar acuoso de *Baccharis latifolia* S2O y el extracto etanólico E2, tienen la capacidad de controlar el crecimiento de *Phytophthora palmivora* por debajo del 50 %.

c) Pruebas con *Candida albicans*

Se determinó cualitativamente la inhibición de las diluciones de los extractos, por observación a simple vista de la presencia de turbidez o formación de un botón de agrupamiento de microorganismos para determinar si existe o no inhibición, por el método de microplaca de 96 pozos.

De los extractos ensayados como se muestra en la Figura 29, se tiene que el extracto acuoso de *Baccharis latifolia* S2 inhibe del crecimiento en las primeras concentraciones diluidas (1 y ½) y S2O presentó menor inhibición que el extracto anterior. También *Baccharis genistelloides* S1 de la Paz y S3 de Cochabamba con una menor actividad inhibitoria. Por lo que de forma cualitativa se toma en cuenta también a estos extractos para un posterior ensayo.

Para confirmar los resultados anteriores del método de microplaca, se aplicó el Método de Susceptibilidad por Difusión Bauer-Kirby, determinándose la acción inhibidora. En la Tabla 10 y figura 30 se observan los porcentaje de inhibición donde se corresponde que los extractos de *B. latifolia* S2 y S2O tienen una actividad inhibitoria parecida. Para *B. genistelloides* S1 (La Paz) y S3 (Cochabamba) mostraron un porcentaje de inhibición idéntico. Considerando que el método de microplacas es líquido (RPMI) y el de Bauer-Kirby es sólido, por los porcentajes encontrados podemos correlacionar estos dos métodos cualitativos para considerar que estos extractos pueden presentar una actividad inhibitoria *in Vitro* sobre *Candida albicans*.

Para discriminar la actividad fungicida y/o fungistática, se realizó la prueba de la dinámica de acción inhibitoria en el tiempo, donde se obtienen Curvas de letalidad, realizándose el ensayo para los extractos activos de *B. latifolia* y *B. genistelloides*, utilizando en este proceso Acido Cítrico al 50 % y Acido Clorhídrico 1N para obtener un rango de pH de 6,0 a 7,0. Se considera como fungicida aquel extracto que por lo menos tenga 3 unidades logarítmicas de diferencia con el control negativo y además que no recupere en el tiempo la concentración inicial de inóculo aplicado.

En la Figura 31 y 32 podemos ver que las curvas de mortalidad tiempo de los extractos acuosos de *B. genistelloides* S1C junto a S1P de La Paz y de S3C con

S3P de Cochabamba, presentan un comportamiento similar, pero tienen una diferencia mínima de 1 log U.F.C./mL en relación al control negativo, lo cual nos indica que estos compuestos podrían presentar un comportamiento fungistático al utilizar 1 mg de extracto vegetal.

Para *B. latifolia* en la Figura 33, el extracto S2P tiene una elevada actividad comparada con S2O y S2C a 1 mg, debido posiblemente a la alta concentración de compuestos polares. Por otro lado pasadas las 12 horas se ve un incremento en el desarrollo de *Candida albicans*, posiblemente puede deberse a que esta cepa consigue adaptarse al extracto o por otro lado puede existir algún compuesto que sirva como fuente de alimentación y posterior desarrollo.

Los extractos etanólicos en la Figura 34 de *Baccharis latifolia* E10 y E20 presentan tanto a 0,5 como a 1 mg una actividad fungicida. Esto se debe posiblemente a que el etanol extrajo de la planta tanto compuestos poco polares como polares, lo que genera un efecto inhibitor mayor, al actuar posiblemente conjuntamente produciendo un efecto sinérgico. Además se puede ver que a una cantidad menor de 0,5 mg de extracto se puede generar un efecto fungistático.

De los ensayos realizados, los controles positivos tanto Ketoconazol como Fluconazol, presentan una actividad fungistática, debido posiblemente a que existe una posible adaptación al compuesto por parte de *Candida albicans*, generando resistencia al transcurrir el tiempo de ensayo.

Una de las fuentes de error es no tener en cuenta el efecto del antifúngico arrastrado con la muestra. Otra, también muy importante, es la falta de agitación del tubo (unos 15 segundos) antes de tomar la muestra ya que las levaduras tienden a sedimentar rápidamente y además, al dividirse suelen quedar agrupadas formando grumos. Normalmente de cada concentración se ensayan dos o tres diluciones y

más de una placa por dilución. De las placas sembradas se cuentan aquellas que tienen entre 10 y 100 colonias, aunque si sólo se tienen placas con menos de 10 colonias se pueden utilizar para los cálculos pero interpretándolas con cautela.

De manera general se pudo observar que la actividad de los extractos acuosos de *B. genistelloides* y *B. latifolia* evaluados evidenció una diferencia notable en la capacidad inhibitoria de cada uno de ellos. Es así que el extracto vegetal acuoso S2P de *Baccharis latifolia* tuvo una actividad inhibitoria significativa en los experimentos con 1 mg de extracto. Por otro lado, el extracto etanólico E2 de *B. latifolia* presentó una actividad Inhibitoria elevada, lo cual nos indica que tiene una actividad fungicida a 1 mg de extracto y una capacidad fungistática a una cantidad menor de 0,5 mg de extracto vegetal.

Debido a que la familia del género *Baccharis* químicamente, presenta principalmente Flavonoides y Diterpenos, compuestos predominantes en estas especies, estos puede ser responsables de las diversas propiedades como ser antisépticos o antimicrobianos.

A su vez *Baccharis latifolia* presenta Alcaloides, Terpenos, Taninos, Esteroides, Lactosas sesquiterpénicas, Cumarinas, Antraquinonas, Flavonoides como: 5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona, 5-hidroxi-7,3',4'-trimetoxiflavona, 3,5,4'-trihidroxi-7,3'-dimetoxiflavona, 3,5-dihidroxi-7,3',4'-trimetoxiflavona, 3-hidroxi-5,7,3',4'-tetrametoxiflavona. Además de Nerolidol, Cadineno.

También *Baccharis genistelloides*, presenta Alcaloides, Flavonoides, Taninos, Esteroides, Lactosas sesquiterpénicas, Cumarinas, Glicosidos cardiotónicos: 5,4''-dihidroxi-7-metoxiflavona Genkwanina, 5,4''-dihidroxi-6,7-Dimetoxiflavona Cirsimaritina, 5,7,4''-trihidroxi-6-metoxiflavona Hispidulina, 5,7,4''-trihidroxiflavona Apigenina, 3,5,7,3',4'-pentahidroxiflavona Quercetina, 5,7, 3',4''-tetrahidroxiflavona Luteolina, 5,7,3',4'-tetrahidroxiflavona Nepetina

Por lo anterior, al estar presentes tanto compuestos terpénicos y flavonoides, que dan sabores ácidos y picantes a las soluciones acuosas, podemos decir que pueden presentar actividad inhibitoria, tanto el extracto polar S2, S2O, E2, en hongos como bacterias.

Por otro lado varios estudios han demostrado que los terpenoides son los principales contribuyentes de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales, siguiendo en orden de actividad los terpenoides que contienen grupos alcoholes, luego los que poseen aldehídos y por último los que tienen grupos cetónicos. Sin embargo el mecanismo de acción específico de estos compuestos aún hoy no ha sido claramente caracterizado. Aunque actualmente se propone como posible sitio de acción la membrana celular donde los terpenoides actuarían desencadenando una serie de procesos que podrían arribar a la muerte del microorganismo.

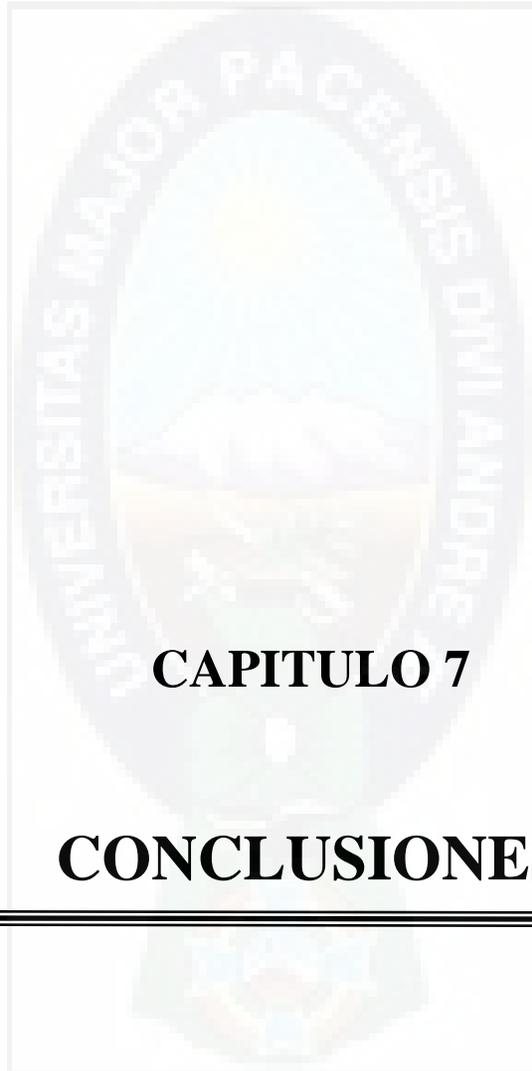
En comparación a la actividad demostrada por los fármacos utilizados como controles positivo, los extractos vegetales presentan una mayor actividad *in Vitro*. La utilización de extractos vegetales y su modo de extracción nos permiten presentar características especiales como ser su origen natural que los convierten en un producto mas seguro para las personas y para el medio ambiente que los fármacos utilizados en la actualidad.

Otra característica es el bajo riesgo para el desarrollo de resistencia por parte de los microorganismos patógenos. Los datos obtenidos en este trabajo aportan conocimientos con respecto a la eficacia práctica de la aplicación de extractos vegetales, de extracción simple o de extracción poco sofisticada, para proteger al hombre y a plantas o productos vegetales sin efectos tóxicos. Esta investigación sustenta la posibilidad de implementar la aplicación de extractos vegetales para controlar patógenos humanos y fitopatógenos tales como los estudiados en esta investigación y otros a los cuales se puede aplicar la metodología y observar el comportamiento según sea el modo de aplicación o condiciones específicas de aplicación.

Dado este proceso de protección *Baccharis latifolia* presenta una coloración rojiza sobre las hojas que están más expuestas a los rayos solares, mientras que las hojas de *Baccharis genistelloides* no presentan esta coloración, lo cual nos indica que puede ser una de las causas por las que el extracto de *B. latifolia* presenta mayor actividad comparando al extracto de *B. genistelloides*.

De acuerdo a revisiones bibliográficas sobre la actividad inhibitoria de los constituyentes de *B. latifolia*, se puede proponer que la actividad antifúngica del extracto vegetal puede deberse a un efecto conjunto de los siguientes componentes: Germacreno D, Eudesmano, Nerolidol, Cadineno y Limoneno, p-hidroxiacetofenonas, diterpenos tipo ent-labdano, ácido cinámico y flavonoides.

Los flavonoides Genkwanina y Apigenina presentan actividad antibacteriana, lo que justifica el uso de estas plantas en la medicina tradicional para la cura de heridas e infecciones, evitando el desarrollo de microorganismos. Estos al estar en una fase soluble en agua permiten una mayor interacción en la fase lípido-acuoso de las membranas de los microorganismos, aunque los mecanismos de acción para inhibir el desarrollo de estas aun no se ha elucidado al actuar este tipo de extractos vegetales.



CAPITULO 7

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

- Con 2 mg de extracto, *Escherichia coli* 25922 ATCC fue sensible al extracto no polar R3 a, mientras que *Staphylococcus aureus* 25923 ATCC presenta sensibilidad al extracto no polar R5. Los extractos polares B1, B2, B3, B4, B5, B6, R4, S1C, S2C, S3P, S3C fueron activos a *Escherichia coli* 25922 ATCC. *Staphylococcus aureus* 25923 ATCC presentó sensibilidad al extracto polar B2. *Pseudomona aeruginosa* 27853 ATCC fue sensible al extracto polar S1P y S3P.
- Utilizando la prueba por dilución en pozo central, se identificaron como agentes con actividad antimicrobiana a los extractos: fenólico de polaridad media S2O y acuoso S2 de *Baccharis latifolia* frente a *Aspergillus niger*, *Phytophthora palmivora*. Solamente frente a *Aspergillus niger* el extracto etanólico E20 a 50 mg/mL y con 20 mg/mL para *Phytophthora palmivora*
- Sobre *Candida albicans*, utilizando el método de las Curvas de Letalidad tenemos a *Baccharis latifolia* con el extracto polar acuoso S2P y el extracto polar etanólico E20, los cuales presentan actividad inhibitoria.

Las concentraciones inhibitorias de extractos vegetales del género *Baccharis* según especie:

- Concentración inhibitoria de extractos vegetales de *Baccharis latifolia*:

SOBRE: *Escherichia coli* 25922 ATCC.

- 2 mg de extractos etanólicos B3 y R4

SOBRE: *Aspergillus niger* QS07.

- 50 mg/ml de extracto fenólico de polaridad media S2O
- 20 mg/ml de extracto etanólico E20

SOBRE: *Phytophthora palmivora* QK08.

- 50 mg/ml de extracto fenólico de polaridad media S2
- 20 mg/ml de extracto etanólico E20

SOBRE: *Candida albicans* 98001 ATCC.

- 1 mg de extracto polar acuoso S2, presenta Actividad fungicida.
- 0,5 y 1 mg de extracto polar etanólico E20 tiene Actividad fungicida.
- <0,5 mg de extracto etanólico E10, presenta Actividad fungistática
- 1 mg de extracto fenólico de polaridad media S2O y de extracto acuoso S2C, muestran Actividad fungistática.

- Concentración inhibitoria de extractos vegetales de *Baccharis genistelloides*:

SOBRE: *Escherichia coli* 25922 ATCC.

- 2 mg de extracto polar etanólico B5 de la Paz y B6 de Cochabamba.

SOBRE: *Pseudomonas aeruginosa* 27853 ATCC

- 2 mg de extracto polar acuoso S1P Y S1C de la Paz y S3P de Cochabamba.

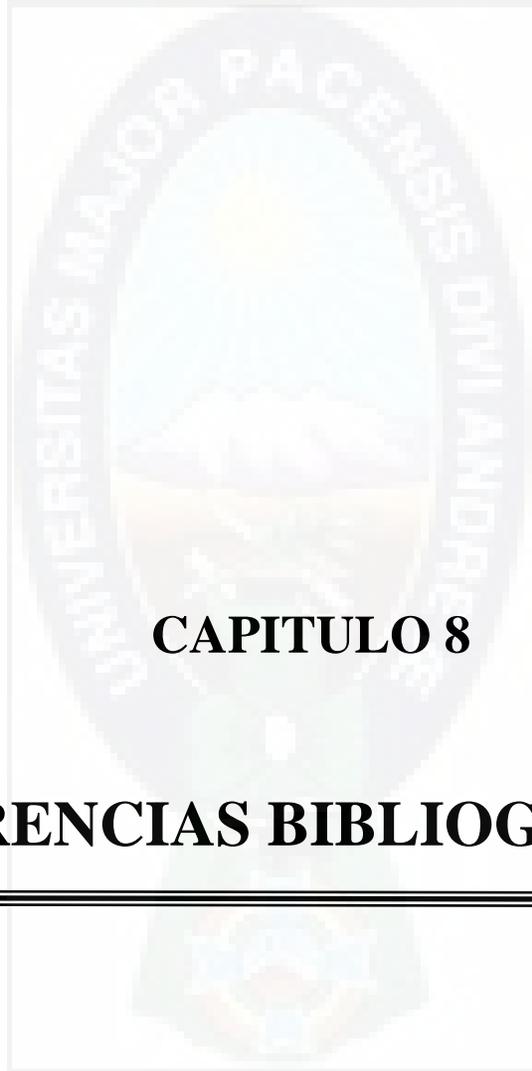
SOBRE: *Candida albicans* 98001 ATCC.

- 1 mg de extracto acuoso S1 (Yungas, La Paz) y S3 (Parque Nacional Tunari, Cochabamba), presenta Actividad fungistática.

Es de mencionar también que en la actualidad la resistencia de los microorganismos a los fármacos existentes tiende a incrementarse, razón por la cual se mantiene el ímpetu en la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos para combatir las infecciones y superar los problemas de resistencia bacteriana y los efectos secundarios de algunos agentes disponibles actualmente.

En tal sentido, lograr que la población disponga de fitofármacos rigurosamente estudiados, es un propósito de muchos investigadores, por ello, en este trabajo se decidió probar la actividad antimicrobiana y antifúngica *in Vitro* de un grupo de extractos vegetales de la especie *Baccharis* frente a microorganismos causantes de diversas patologías en el hombre y plantas. Esto podría llevarnos al desarrollo, a partir de plantas utilizadas tradicionalmente a formular la preparación de diferentes formas farmacéuticas con actividad farmacológica definida y colaborar con la gran demanda social de nuevos agentes antimicrobianos.

Se recomienda continuar con la investigación, realizando ensayos de la mezcla de dos o más de estos extractos para determinar el sinergismo/antagonismo de la combinación de estas sustancias administradas conjuntamente.



CAPITULO 8

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. Hernández Lauzardo A.N., et.al., Prospectiva de Extractos Vegetales para controlar Enfermedades Postcosecha Hortofrutícolas, Rev. Fitotec. Mex. 2007; 30(2):119–123
2. Mendoza, C.B., et.al., Evaluación del efecto de Extractos Vegetales sobre el Crecimiento *in Vitro* de *Phytophthora palmivora* Butl. y *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., Tierra Tropical, 2007; 3(1):81–89
3. Manejo Integrado de Plagas en Hortalizas. Un Manual para Extensionistas, Editora: Susanne, Scholaen, Segunda edición, Deutsche Gesellschaft fur Technische Zusammenarbeit GTZ GmbH. Agosto 2005
4. Biocontrol de Doencas de plantas: Uso e Perspectivas, Editores Wagner Bettiol, Marcelo A.B.Morandi, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP, 2009
5. Davicino, Roberto, et.al., Actividad antifúngica de extractos de plantas usadas en medicina popular en Argentina, Rev. Peru. Biol. 2007; 14(2): 247-251
6. Rivera Coto German, Conceptos Introdutorios a la Fitopatología, Editorial EUNED Universidad Estatal a Distancia, San José, Costa Rica, 2007
7. Arauz Cavallini Luis Felipe, Fitopatología: Un enfoque agroecológico, Editorial Universidad de Costa Rica 1998
8. Azanza J. R., et. al., Farmacología de los azoles, Rev. Iberoam. Micol. 2007; 24:223-227
9. Viudes A., et.al., Actualización de las interacciones farmacológicas de los Antifúngicos Sistémicos, Rev. Española de Quimioterapia 1999; 12 (2)

CAPITULO 8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

10. Carrillo-Muñoz A.J., et.al., Nuevos antifúngicos. Presente y futuro, Rev. Española de Quimioterapia Septiembre 1999; 12 (3):181-204
11. Embid Alfredo, Resistencia de las Bacterias a los Antibióticos, Revista De Medicinas Complementarias. Medicina Holística. N° 53, 45-59
12. Carrillo-Muñoz A.J., et.al., Una nueva generación de fármacos antifungicos, Rev. Iberoam. Micol. 2001; 18: 2-5
13. Pelaéz García Ma. T., et.al., Nuevos Antifungicos, Medicine 1998; 7(91):4251-4262
14. Sánchez Carazo J.L., et.al., Tratamiento actual de las micosis superficiales, Rev. Iberoam. Micol. 1999; 16: S26-S30
15. Organización Mundial de la Salud, Estrategia Mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos. WHO/CDS/CSR/2001.2
16. Rodero Laura, et.al., Transient Fungemia Caused by an Amphotericin B-Resistant Isolate of *Candida haemulonii*, Journal of Clinical Microbiology, 2002; 40 (6):2266–2269
17. Runco Rosa, Candidosis en Pacientes HIV o con otras Inmunodeficiencias Secundarias en Hospitales de la Ciudad de Tucumán (Argentina), Boletín Micológico, 2007; 22: 75–80
18. Loaiza J.E., et.al., Potencial biocida de extractos de *Gliricidia sepium* contra patógenos del cultivo de la papaya (*Carica papaya*), Agronomía Costarricense 2000; 24(1):29–36
19. Rodríguez Dorian A., Efecto del extracto de tres plantas silvestres sobre la *rizoctoniosis*, la mancha sureña del maíz y los patógenos que las causan, Interciencia, 2005; 30(12)
20. González Luís Carlos, Introducción a la Fitopatología, Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, San José, Costa Rica, 1981

21. Ames de Icochea Teresa, Enfermedades Fungosas y Bacterianas de Raíces y Tubérculos Andinos, Centro Internacional de la Papa, 1997
22. Cantón E., et.al., Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2004:2477–2482
23. García-Martos P., et.al., Sensibilidad a Antifúngicos de Levaduras Patógenas Emergentes, Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 2001; 19(6):249–256
24. Myrvik Q.N, Weiser R.S., Bacteriología y micología médicas, Ed. Interamericana S.A. McGraw-Hill, Mexico, 1991
25. Clerihew L, McGuire W. Antimicóticos sistémicos para la micosis invasiva en recién nacidos prematuros, Oxford: John Wiley & Sons, Ltd., 2007
26. Fernández V., F. J., et.al., Urinary infection by *E. coli* complicated with multiple abscesses, An. Sist. Sanit. Navar. 2007; 30(2)
27. Vazquez J. A., et.al., In vitro susceptibilities of *Candida* and *Aspergillus* species to *Melaleuca alternifolia* (tea Tree) oil, Rev. Iberoam. Micol. 2000; 17:60–63
28. Palacio A del, et.al., Tratamiento Antifungico: Ultimos avances en Dermatología, Rev. Iberoam. Micol., 1999;16:86–91
29. Martínez J., et.al., Sensibilidad al fluconazol y a la Anfotericina B en cepas de *Candida* provenientes de aislamientos clínicos, Rev. Iberoam. Micol., 1998;15: 298–299
30. Vanden Bossche H., Mechanisms of antifungal resistance, Rev. Iberoam. Micol., 1997; 14: 44–49
31. Organización Mundial de la Salud, Prevención de las infecciones nosocomiales - Guía Práctica, 2a edición, 2003, WHO/CDS/CSR/EPH/2002.12

CAPITULO 8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

32. Becerra Gerardo, Mecanismo de Resistencia a Antimicrobianos en Bacterias, *Enf. Inf. Microbiol.* 2009;29 (2): 70-76
33. Ortiz Gil Miguel Ángel, et.al., Colonización bacteriana y susceptibilidad antibacteriana de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de pacientes quemados infectados del Hospital Regional de Alta Especialidad de Veracruz, *Enf. Inf. Microbiol.* 2009 29 (1): 11-19
34. Manual de Vigilancia Epidemiológica de las Infecciones Intrahospitalarias, OGE-RENACE/Vig. Hosp. DT 002-99 V.1, Ministerio de Salud, Oficina General de Epidemiología, Lima, Perú, 2000
35. Alpuche Aranda Celia M., Infecciones nosocomiales por bacterias Gram negativas resistentes a Cefalosporinas de espectro extendido: asociación de dos peligrosos enemigos, *Enf. Infec. y Micro.* 2002: 22(4):192-199
36. Velasco Zebadúa M^a E., Bacterias de interés veterinario, *Med. Vet.* 2002; 19(1):1-11
37. Barberán J., et.al., Evidencia Científica y Concepción Global del Tratamiento Empírico de la Infección de vías Respiratorias bajas en la Comunidad, *Rev. Esp. Quimioterap.* 2004;17(4):317-324
38. Arteaga Hernández E., et.al., Micosis oportunistas invasivas en el SIDA. Un estudio de 211 autopsias, *Rev. Iberoam. Micol.*, 1998; 15: 33-35
39. Valenzuela F. E., Actividad antifungica de quitosano carbamato de etilo en *Candida Albicans*, *Boletín Micológico*, 2003; 18:105-110
40. Jabra - Rizk M. A., Fungal Infections and Drug Resistance, *Emergency Medicine & Critical Care Review* 2006: 1-7

41. Salavert L. M., et.al., Los aspectos epidemiológicos cambiantes de la candidemia y sus implicaciones clinicoterapéuticas, Programa de control externo de calidad SEIMC, Año 2005, *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2006; 24:36–45
42. Lander Alfredo, et.al., Tratamiento de tiña pedis y candidiasis interdigital con terbinafina tópica por 7 días y tiña pedis y candidiasis plantar con terbinafina oral por 14 días en un grupo de soldados. *Dermatologia Venezolana*, 1995, 33(3):127–130
43. Monforte Torres Victor, Tesis doctoral “ Profilaxis de la Infección por *Aspergillus* con Anfotericina B nebulizada en pacientes transplantados pulmonares” Departament de Medicina, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, 2004
44. Pemám Garcia J., Aspectos epidemiológicos de la micosis en el paciente crítico, *Rev. Esp. Quimioter.* 2008; 21(19): 7–8
45. Warris A., et.al., Hospital sources of *Aspergillus* species: New routes of transmisión?, *Rev. Iberoam. Micol.*, 2001;18:156–162
46. Sabals P., et.al., Tratamiento de la *Aspergilosis* invasiva, *Rev. Iberoam. Micol.*, 2000;17:S100-S102
47. Abarca Ma. L., Taxonomía e identificación de especies implicadas en la *aspergilosis* nosocomial, *Rev. Iberoam. Micol.*, 2000;17:S79–S84
48. Borges Sá M., et.al., Presentaciones clínicas de la *aspergilosis* nosocomial, *Rev. Iberoam. Micol.*, 2000;17:S85–S89
49. Pontón J., et.al., *Aspergillus* y *Aspergilosis* Nosocomial, *Rev. Iberoam. Micol.* 2000;17:S77–S78
50. Pemán J., *Aspergilosis*, *Revista Española de Quimioterapia* 1999; 12(1): Editorial

51. Pemán J., Diagnóstico de la Aspergilosis invasiva, Rev. Iberoam. Micol. 2000;17:S90–S92
52. Palacio A. del, El diagnóstico de laboratorio de la Aspergilosis invasora, Rev. Iberoam. Micol. 2003; 20: 90–98
53. García M. E., et.al., Principales enfermedades fúngicas que afectan a los animales domésticos, Rev. Iberoam. Micol. 1997; 14: 150–154
54. Pollock C., Fungal diseases of columbiformes and anseriformes, Veterinary Clin. North Am Exot Anim Pract. 2003; 6(2): 351–361
55. Deem S.L., Fungal disease of birds of prey, Veterinary Clin. North Am. Exot. Anim. Pract. 2003; 6(2):363–376
56. Mesa Arango A.C., Productos Naturales con Actividad Antimicótica, Rev. Esp. Quimioterap. 2004;17(4):325–331
57. Kuse Raytes S. M., Uso racional de medicamentos de origen vegetal, Resúmenes del VI Congreso de FeFaS –Abril 2000 –Uruguay
58. Castro-Franco R., et.al., Uso de fitoextractos en el control del crecimiento in Vitro de bacterias enteropatógenas, Rev. Chapingo Serie Zonas Aridas, 2001.96–99
59. Parrillo Susana, De la hierba medicinal al medicamento natural estandarizado. una experiencia en Uruguay, Resúmenes del VI Congreso de FeFaS -Abril 2000- Uruguay
60. Cañigual Salvador, Las monografías de calidad seguridad y eficacia en el uso racional de los preparados a base de plantas medicinales, Rev. de Fitoterapia 2006; 6 (S1):25–29

61. Vazquez Alvaro, Control de Calidad de Medicamentos herbarios: ¿Cómo y Cuánto?, Resúmenes del VI Congreso de FeFaS- Abril 2000 – Uruguay
62. Blumenthal, M., Herb Sales Down in Mainstream Market, Up in Natural Food Stores Herbal Gram 2002; 55: 60
63. Rios C., Cosmética Investem Saúde, Gaz. Merck, 2000; 24: C1–C6
64. Marquez V. R. L., et.al., Actividad antifúngica del extracto total en etanol de las hojas frescas de *Pedilanthus tithymaloides* L.Poit (Ultimorrial), Scientia et técnica Año XIII, 2007; 33:155
65. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la alimentación, IT). El futuro de la agricultura depende de la biodiversidad. 2004
66. Vidaurre de la Riva, et.al., Plantas medicinales en los andes de Bolivia, Botánica Económica de los Andes Centrales, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, 2006:268-284
67. Cañigüeral Salvador, Vila Roser, La Fitoterapia como herramienta terapéutica, Ginecología y Obstetricia Clínica 2005; 6(1):43–51
68. Kuse Raytes S. M., Uso racional de medicamentos de origen vegetal, Resúmenes del VI congreso de FeFaS –Abril 2000 –Uruguay
69. Castro-Franco R., et.al., Uso de fitoextractos en el control del crecimiento in Vitro de bacterias enteropatógenas, Rev. Chapingo Serie Zonas Aridas, 2001:96–99
70. Parrillo Susana, De la hierba medicinal al medicamento natural estandarizado. una experiencia en Uruguay, Resúmenes del VI Congreso de FeFaS -Abril 2000- Uruguay

71. Cañigüeral Salvador, Las monografías de calidad seguridad y eficacia en el uso racional de los preparados a base de plantas medicinales, Rev. de Fitoterapia 2006; 6 (S1):25–29
72. Vazquez Alvaro, Control de Calidad de Medicamentos herbarios: ¿Cómo y Cuánto?, Resúmenes del VI Congreso de FeFaS- Abril 2000 – Uruguay
73. Budel J.M., et.al., O progresso da pesquisa sobre o gênero *Baccharis*, Asteraceae: I- Estudos botânicos, Rev. Brasileira de Farmacognosia, 2005; 15(3):268–271
74. Grotewold Erich, The Science of Flavonoids, Springer Science, USA, 2006
75. Villagrán C., et.al., Etnobotánica del Sur de los Andes de la Primera Región de Chile: Un enlace entre las Culturas Altiplánicas y las de Quebradas Altas del Loa Superior, Chungara, Revista de Antropología Chilena, 2003; 35(1):73–124
76. Siqueira N.C.S. de, et.al., Aspectos farmacognósticos e perfil cromatográfico dos constituintes de *Baccharis articulata* Lam. (Pers.), Compositae, Caderno de Farmácia, 1988; 4(1):63–76
77. Martínez-Florez, S., et.al., Los Flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes, Nutr. Hosp., 2002; XVII(6):271–278
78. Macía M.J., Las plantas de fibra, Botánica Económica de los Andes Centrales, Editores: M. Moraes R., B. Øllgaard, L. P. Kvist, F. Borchsenius & H. Balslev, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, 2006:370–384
79. Madeira Moreira F. P., et.al., Flavonoides e Triterpenos de *Baccharis pseudo tenuifolia* – Bioatividade sobre *Artemia salina*, Quim. Nova, 2003; 26(3):309–311
80. Zapata R. et.al. Reducción del desarrollo de hongos fitopatógenos con Extracto de *Cardón lefaria* (*Cereus deficiens* Otto & Diert), Interciencia, 2003; 28(5):302–306

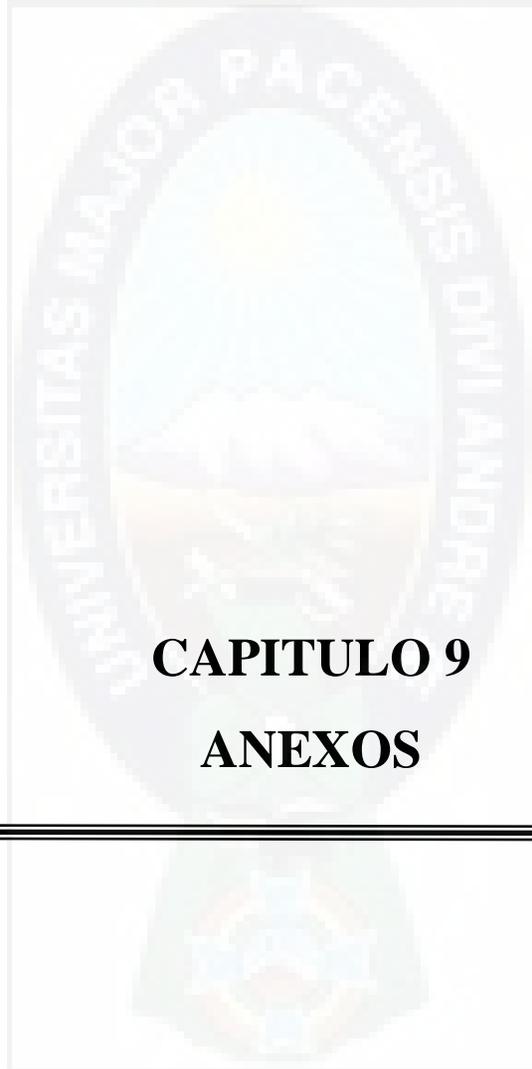
81. Loaiza J. E., et.al., Potencial biocida de extractos de *Gliricidia sepium* contra patógenos del cultivo de la papaya (*Carica papaya*), Rev. Agronomía Costarricense, 2000; 24(1):29–36
82. Davicino R., et.al., Actividad antifúngica de extractos de plantas usadas en medicina popular en Argentina, Rev. Peru. Biol., 2007; 14(2):247-251
83. Marín Ocampo A. M., et.al., Actividad antifúngica de los extractos acuosos de *Baccharis trinervis*, *Baccharis latifolia* y *Solanum dolichosepalum*, Biosalud, 2006; 5:51–59
84. Rangel D., et.al., Actividad antimicrobiana de los extractos etanólico, acetónico y acuoso de *Baccharis nitida* (Ruiz et Pavon) Pers, Revista de la Facultad de Farmacia, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela, 2001; 42:43–46
85. Tequida-Meneses M., et.al., Efecto de extractos alcohólicos de plantas silvestres sobre la inhibición de crecimiento de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium poae*, Rev. Iberoam. Micol., 2002; 19:84–88
86. Castro-Franco R., et.al., Uso de Fitoextractos en el control del crecimiento in Vitro de bacterias enteropatógenas, Rev. Chapingo Serie zonas áridas, 2001:96–99
87. Gene R. M., et.al., Anti-inflammatory effect of aqueous extracts of three species of the genus *Baccharis*, Planta medica 1992; 58:565–566
88. Gene R. M., et.al., Anti-inflammatory and analgesic activity of *Baccharis trimera*, Planta Medica, 1996; 62:232–235
89. Parejo I., et.al., Investigation of Bolivian plant extracts for their radical scavenging activity and antioxidant activity, Life Science, 2003; 73:1667–1681

90. Tapia A., et.al., Free radical scavengers and antioxidants from *Baccharis grisebachii*, Journal of Ethnopharmacology 2004; 95:155–161
91. Escobar Z., et.al., Phenolic compounds from *Baccharis papillosa* Subs. *Papillosa*, Rev. Bol. Quím. 2009; 26 (2):111–117
92. Abad M. J., et.al., *Baccharis* (Compositae): a review update, ARKIVOC 2007; (vii) 76–96
93. Rodrigues-das-Dôres, R.G., Essential oil changes in capsules of carqueja [*Baccharis genistelloides* (Lam.)] Pers. Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, 2006; (8):175–179
94. Chidiak Soley, et.al., Flavonoides aislados de la especie *Baccharis nitida* (Ruiz et Pavon Pers), CIENCIA 2007;15(3), 361–365
95. Gonzaga Verdi L., et.al., Género *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos químicos, económicos e biológicos, Quim. Nova, 2005; 28(1):85–94
96. Almanza G. R., et.al., Estudio Fitoquímico de *Baccharis leptophylla* Biodirigido contra *Neurospora crassa*, Rev. Bol. Quím., 2000; 17 (1):1–8
97. Salcedo Lily, et.al., Aislamiento de Flavonoides y Estudio de la Actividad Tóxica y Antibacteriana de Extractos de *Baccharis Latifolia* Rev. Bol. Quím. 2003, 20 (1): 43–48
98. Abad M.J., et.al., Anti-inflammatory activity of four Bolivian *Baccharis* species (*Compositae*), Journal of Ethnopharmacology, 2006; 103:338–344
99. De las Heras B., et.al., Antiinflammatory and antioxidant activity of plant used in traditional medicine in Ecuador, Journal of Ethnopharmacology 1998; 61:161–166

100. Coelho M.G.P., Anti-arthritic effect and subacute toxicological evaluation of *Baccharis genistelloides* aqueous extract, *Toxicol. Lett.* 2004;154:69–80
101. González M. C., et.al., Evaluación de extractos y fracciones de plantas Colombianas en modelos de inflamación aguda, subcrónica y crónica, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm...*, 2007; 36 (2):166–174
102. Maguna, Fabiana P., Actividad Antimicrobiana de un grupo de Terpenoides, Universidad Nacional del Nordeste Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2006, Resumen:E-057
103. Maguna, Fabiana P., Relación entre la estructura molecular de terpenoides y su actividad antimicótica sobre *Candida albicans*, Universidad Nacional del Nordeste Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2005, Resumen:E-045
104. Lizarraga E., Compuestos Fenólicos Mayoritarios en *Satureja boliviana* (Benth.) Briq. (Lamiaceae), *Acta Farm. Bonaerense* 2004; 23 (2):198–200
105. Domingo D., et.al., Plantas con acción antimicrobiana, *Rev. Esp. Quimioterap.*, 2003; 16 (4):385–393
106. Sandven P., Epidemiology of candidemia, *Rev. Iberoam. Micol.* 2000; 17: 73–81
107. Colombo A.L., et.al., Epidemiology of Candidemia in Brazil: a Nationwide Sentinel Surveillance of Candidemia in Eleven Medical Centers, *Journal of Clinical Microbiology*, 2006:2816–2823
108. Tapia P. C., et.al., Infecciones sistémicas por Levaduras en un Hospital General: Correlación entre estudio de susceptibilidad in vitro y supervivencia de los pacientes al episodio de infección fúngica. *Rev. Méd. Chile*, 2002; 130 (6):661–665

109. Rodero L., et.al., Estudio Multicentrico de Fungemias por Levaduras en la República Argentina, Rev. Argentina de Micología 2005; 37:189–195
110. Silva V., et.al. Prevalencia de serotipos de *Candida albicans* en aislamientos de hemocultivo en Chile y primer caso de candidemia por *Candida dubliensis*, Rev. Iberoam. Micol. 2003; 20: 46-51
111. Hernández-Hernández F., et.al., Frecuencia de micosis en pacientes inmunosuprimidos de un hospital regional de la Ciudad de México, Salud Pública de México, 2003; .45(6)
112. Callisaya H. Juan, et.al., Frecuencia de Gérmenes causantes de Micosis superficiales, BIOFARBO, 2007, 15:21- 28
113. Alós Juan-Ignacio, Quinolonas, Enferm Infecc Microbiol Clin 2003;21(5):261–268
114. Abujheisha Khalil Y. R., Tesis” Determinación de la carga crítica como nuevo método alternativo al estandar de difusión en agar para establecer la sensibilidad y resistencia a los agentes antimicrobianos”, Universidad de Granada, 2005
115. Vanden Bossche Hugo, Mechanisms of antifungal resistance, Rev Iberoam Micol 1997; 14: 44–49
116. Catalán Mercedes,et.al., Antifúngicos sistémicos, Farmacodinamia y farmacocinética, Rev. Iberoam. Micol. 2006; 23:39–49
117. Fortún Abete J., Antifúngicos: Azoles, Imidazoles, Triazoles, Medicine 1998;7(91):4231–4241
118. Clancy Cornelius J., et.al., Fluconazole MIC and the Fluconazole Dose/MIC Ratio Correlate with Therapeutic Response among Patients with Candidemia, Antimicrobial Agents And Chemotherapy, 2005; 49(8):3171–3177

119. Vandenbossche Inge, et.al., Susceptibility Testing of Fluconazole by the NCCLS Broth Macrodilution Method, E-Test, and Disk Diffusion for Application in the Routine Laboratory, *Journal of Clinical Microbiology*, 2002; 40(3):918–921
120. Pai Manjunath P., et.al., Association of Fluconazole Area under the Concentration-Time Curve/MIC and Dose/MIC Ratios with Mortality in Nonneutropenic Patients with Candidemia, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Jan. 2007;51(1):35–39
121. Baddley John W., et.al., Association of Fluconazole Pharmacodynamics with Mortality in Patients with Candidemia, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Sept. 2008;52(9):3022–3028
122. Basualdo Juan angel, Coto Celia E., De Torres ramón Alberto, *microbiología Biomédica*, Editorial Atlante S.R.L., Argentina, 1996
123. Madigan Michael T., Martinko John M., Parker Jack, BROCK. *Biología de los microorganismos*, décima Edición, Editorial PEARSON EDUCACION, S.A., España, 2006
124. Guardiola Gómez Luís, Tesis Doctoral: "Actividad y Farmacodinamia de cinco Antifungicos frente a *Cryptococcus neoformans*", Universidad Complutense de Madrid, 1997
125. Cantón Emilia, et.al., Curvas de Letalidad en antifúngicos, *Rev. Iberoam. Micol.* 1999; 16: 82–85



CAPITULO 9

ANEXOS



ANEXO A

ENFERMEDADES EN PLANTAS



Foto A1. Pie negro en tubérculo, causado por *Erwinia sp*



Foto A2. *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* en tomate.

Síntomas en frutos como el tomate, denominado comúnmente como ojo de pavo, asociados a Cancro bacteriano.



Foto A3. *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato*.

Síntomas en tomate de peca bacteriana.

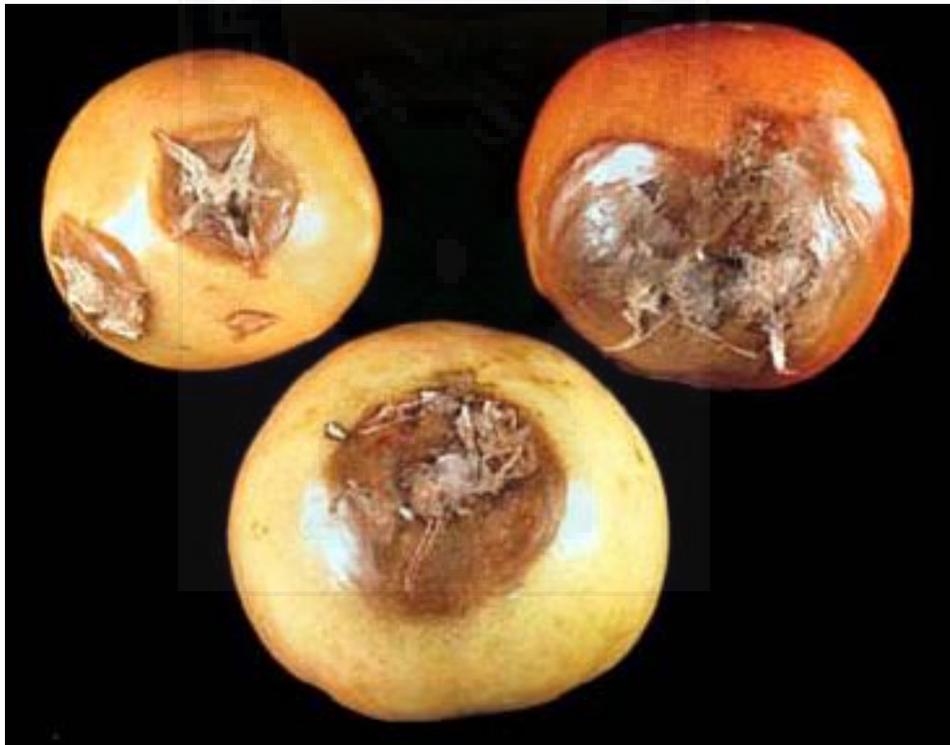


Foto A4. Infección de frutos de tomate por *Phytophthora infestans*.



Foto A5. *Aspergillus flavus* en manies



Foto A6. Pudrición del grano de maíz ocasionada por *Aspergillus spp*

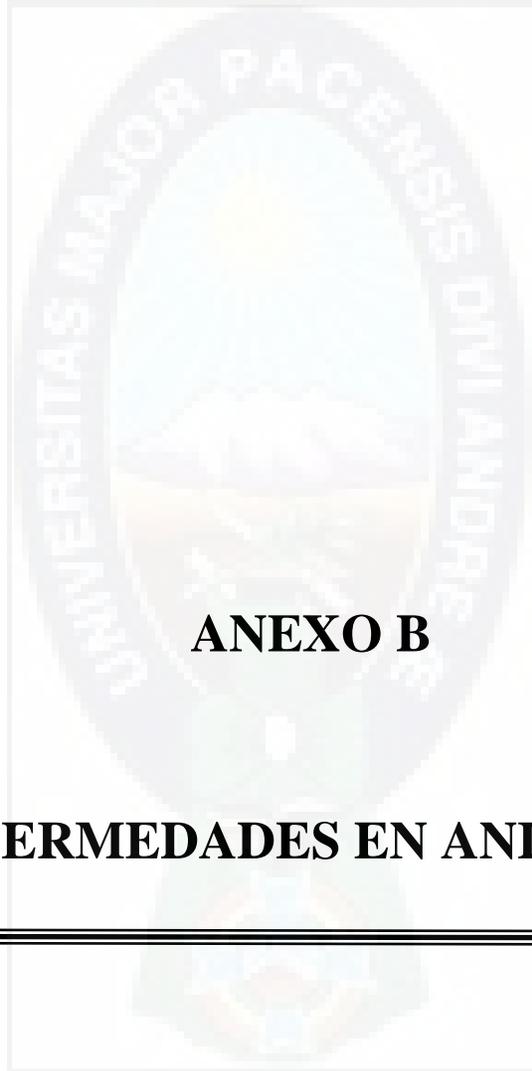


Foto A7. *Phytophthora palmivora*.

Pudrición negra de la mazorca de cacao (*Theobroma cacao*)



Foto A8. Nueces infectadas con *Aspergillus niger* y *Aspergillus flavus*.



ANEXO B

ENFERMEDADES EN ANIMALES



Foto B1. *Staphylococcus aureus* en aves de corral.

Sinovitis con Artritis subaguda positivo a *Staphylococcus aureus* en la región metatarso-falangiana de la pata, en la izquierda de la foto en comparación con la de la derecha que no presenta lesión.



Foto B2. *Pseudomonas aeruginosa* en canes.

Otitis Crónica Supurativa debida a *Pseudomonas aeruginosa* en perro de la raza Labrador Retriever.



Foto B3. Dermatitis gangrenosa en aves producida por Bacterias.

Escherichia coli, *Clostridium perfringens*, *Clostridium sordelli* son bacterias que con mayor frecuencia se aíslan pero también es considerable la actuación de una gran cantidad de factores predisponentes. Se presenta comúnmente en periodo de crianza y desarrollo, en la que se observa zonas necróticas a nivel de la piel y músculos del ala y pechuga, detectándose un desprendimiento de la piel y plumas con mucha facilidad, en determinados momentos se observa el derrame de un líquido serosanguinolento de olor dulzón.

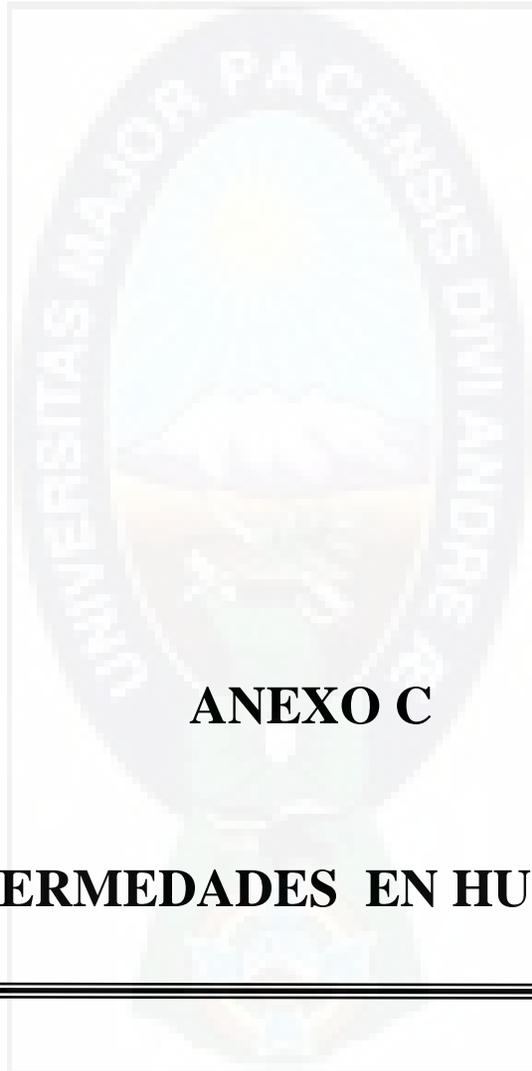


Foto B4. Fotografía de un Pointer Ingles con Aspergilosis nasal



Foto 7. Fotografía de un ave con candidiasis.

Es más comúnmente vista en aves, especialmente polluelos y aves jóvenes. La enfermedad se transmite por vía digestiva, a partir del agua o alimento contaminado por el hongo, con semillas germinadas o comida húmeda o también mediante inhalación y a través de heridas.



ANEXO C

ENFERMEDADES EN HUMANOS

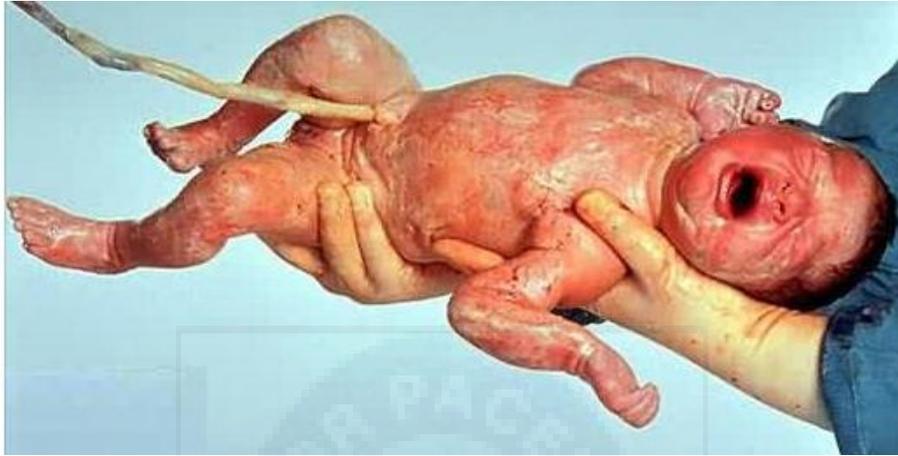


Foto C1. *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*,.

Proceso infeccioso agudo del muñón umbilical. Puede ser de una sepsis al diseminarse la infección por los vasos umbilicales. Básicamente colonizado por: *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, *Klebsiella* y Anaerobios.



Foto C2. Infección por *Staphylococcus aureus*.

Se transmite por simple contacto, convierte las infecciones cutáneas menores en graves problemas de salud, incluyendo casos de necrosis en los que se produce una eliminación del tejido debido a muerte celular y en la mayoría de los casos se trata de infecciones en el torrente sanguíneo.

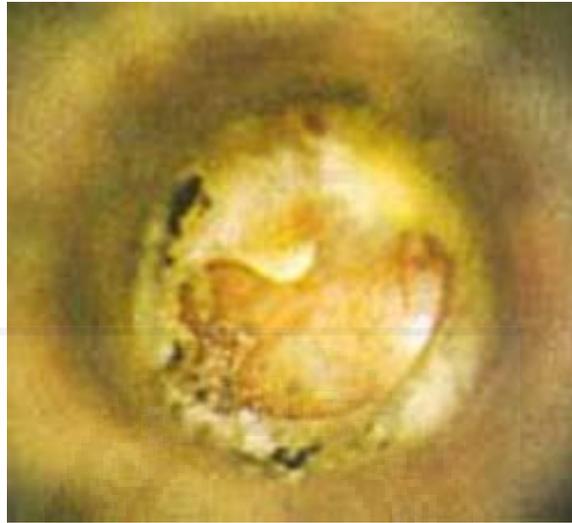


Foto C3. Otomicosis por *aspergillus sp.*

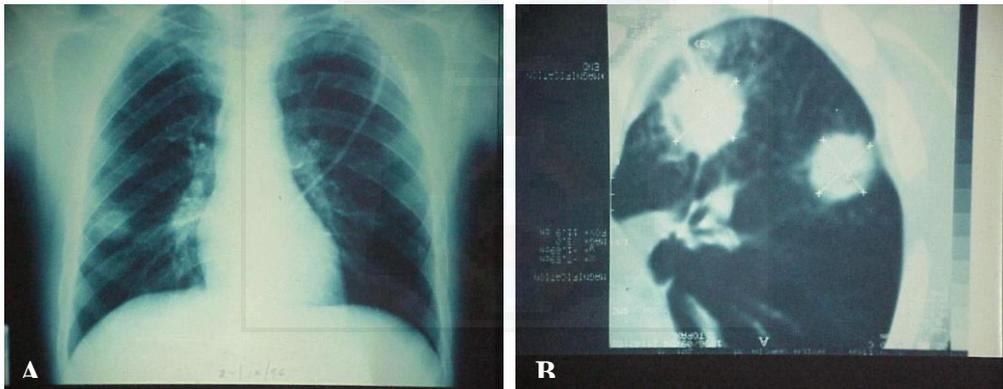


Foto C4. *Aspergilosis* pulmonar invasora

Paciente de 23 años con leucemia aguda, desarrolló *aspergilosis* pulmonar invasora durante la fase de neutropenia postquimioterapia. En la primera imagen **A** se ve la lesión nodular en la radiografía de tórax. La misma imagen en un corte ampliado de TC de tórax se muestra en **B**.

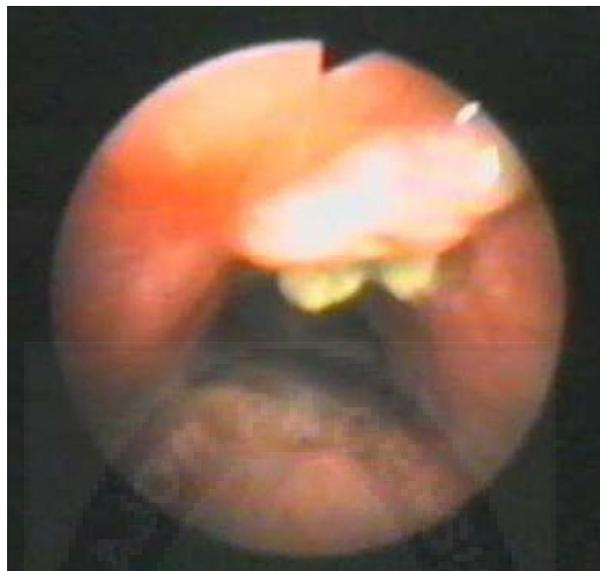


Foto C5. *Aspergilosis* bronquial.

Varón de 63 años con linfoma y trasplante de médula ósea. Presenta fiebre y disnea con radiografía de tórax normal. En broncoscopia se observan lesiones cuya biopsia demostró inflamación necrotizante e hifas de *Aspergillus* spp, que creció en el cultivo.



Foto C6. Endocarditis por *A. niger*.

Paciente con leucemia mieloide, con endocarditis por *A. niger*, después de la autopsia se ve una sección de pulmón de masa oscura.

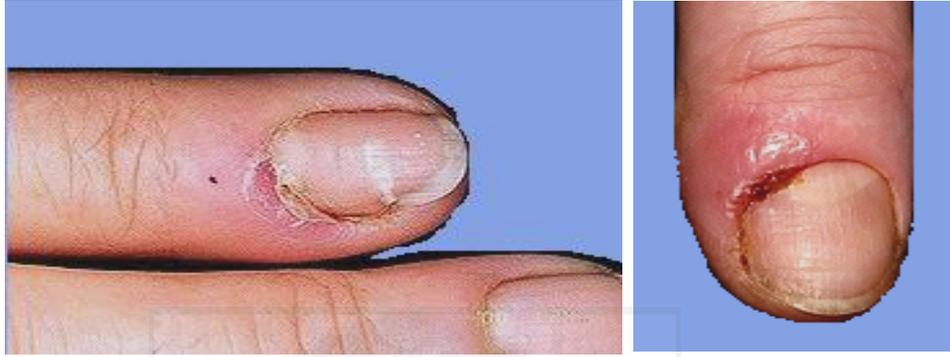


Foto C7. Paroniquia candidiásica.

La pared de la uña se hincha, se enrojece y se ablanda ante la presión y secreta una sustancia supurativa y serosa. Puede producirse una decoloración como consecuencia de alguna infección bacteriana asociada. Por ejemplo, puede adquirir un color verdoso, causado por *Pseudomonas*. La extensión secundaria de la infección hacia la matriz de la uña puede provocar una distrofia de la placa de la uña sin que haya presencia de ningún hongo en la propia uña.



Foto C8. Candidiasis Interdigital.

Lavarse las manos muy frecuentemente y no secárselas correctamente predispone también a la infección. El cuadro clínico está caracterizado por enrojecimiento, grietas, maceración, vesículas y pústulas, generalmente entre el tercer y el cuarto dedo. Los pacientes se quejan de una sensación subjetiva de escozor.



Foto C9. Otomicosis.

La infección ocurre más frecuentemente después de la administración de colirio o de terapia antibiótica local. Además de la descamación y del enrojecimiento, el cuadro clínico puede incluir supuración del conducto auditivo. Prurito y dolor y en algunos casos, de zumbidos en los oídos, que puede progresar a pérdida auditiva temporal.



Foto C10. Intertrigo candidiásico.

Se desarrolla a partir de alteraciones dérmicas macerativas erosivas primarias. Factores de predisposición son la transpiración, la ropa que no permite la respiración de la piel e higiene inadecuada. Los puntos de infección más comunes son ingles, axilas y pliegues cutáneos del pecho y abdomen. El intertrigo candidiásico afecta generalmente a personas con diabetes mellitus, obesidad e inmunodeficiencias.



Foto C11. Foliculitis candidiásica.

Zona de la barba, donde los factores de predisposición son diabetes mellitus, sistema inmunológico debilitado o tratamiento previo con glucocorticoides o antibióticos. También suele haber presencia de seborrea. El cuadro clínico presenta pústulas foliculares y costras amarillentas. La enfermedad sigue a menudo un curso crónico, en muchos casos por un diagnóstico incorrecto de impétigo contagioso, infección por herpes, etc.

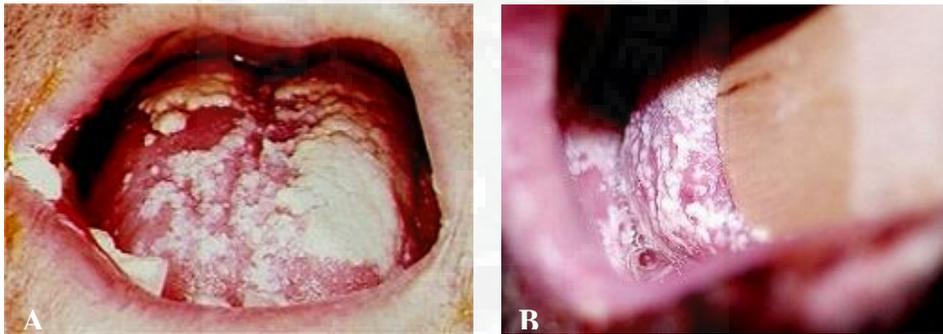
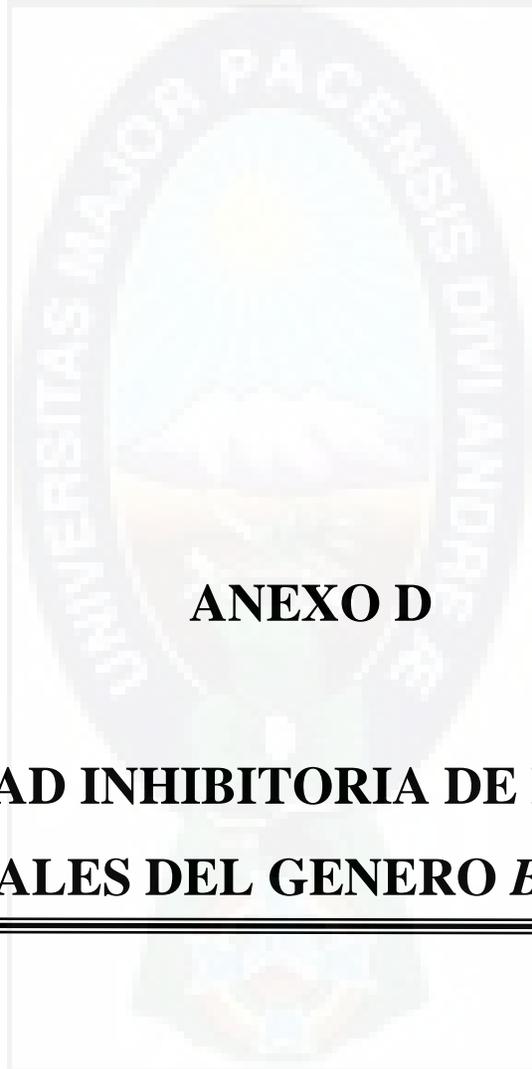


Foto C12. A. Candidiasis o Muguet oral.

Se desarrolla especialmente en personas con un sistema inmunológico débil. Afecta principalmente a recién nacidos y ancianos, también a diabéticos y a individuos en terapia con antibióticos o corticoides. Una prótesis dental mal adaptada también favorece la infección. Afecta aproximadamente al 50% de personas con VIH y aproximadamente a 80% de pacientes con SIDA. La enfermedad se caracteriza por maceraciones blanquecinas, también hemorrágicas, con descamación y costras en las comisuras de los labios.



ANEXO D

**ACTIVIDAD INHIBITORIA DE EXTRACTOS
VEGETALES DEL GENERO *BACCHARIS***

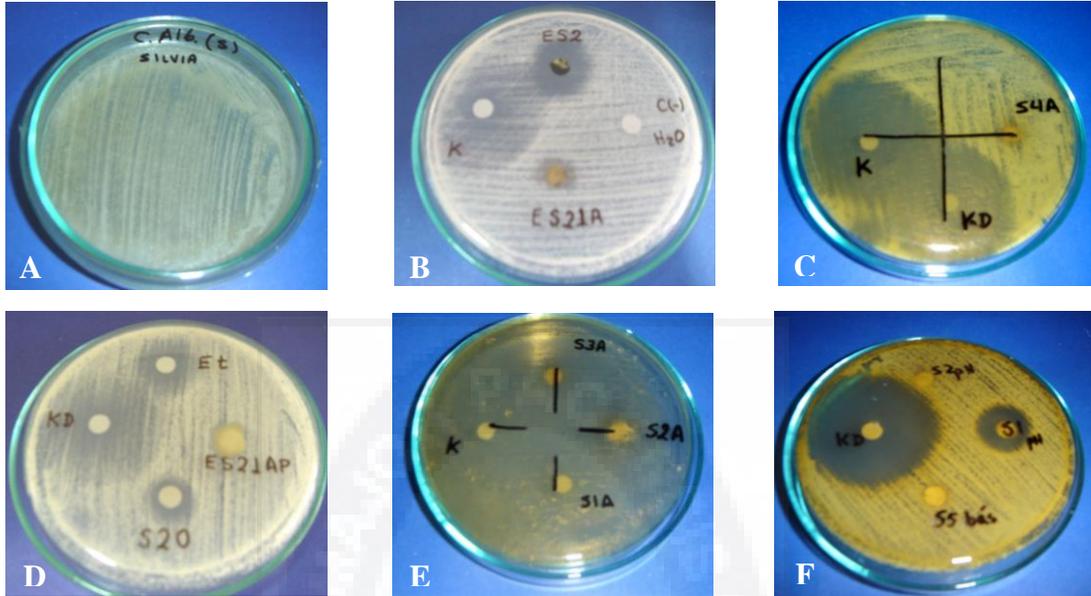


Foto D1. Método de susceptibilidad por Difusión Bauer-Kirby contra bacterias y *candida albicans*.

En A se muestra una vista general de una placa con crecimiento bacteriano como Control Negativo, luego se tienen las Fotos B, C, D, E y F que muestran los diferentes extractos ensayados con cuatro discos humedecidos en las soluciones de los extractos y solventes utilizados para las diferentes pruebas. La zona de color claro que rodea al disco marca las zona en que ese extracto es activo, inhibiendo, con mayor o menor eficacia, el crecimiento del microorganismo en estudio, tal como se observa a la izquierda y en la parte superior de la Foto B, así como a la izquierda y en la parte inferior de la Foto C. En la Foto D existe una variedad de tamaños de halo de inhibición para diferentes tipos de extractos y Controles Positivos como el caso del Ketoconazol a la derecha en la foto D. El disco que no tiene a su alrededor halo de inhibición nos indica la resistencia del microorganismo a ese tipo de extracto utilizado como se observa en la parte derecha de la Foto B en el caso del Agua destilada utilizada como solvente y en la parte inferior de la Foto F un extracto en medio básico. Es de notar, la disminución de la intensidad de crecimiento del microorganismo en la zona interior del halo de inhibición del disco K y KD en la foto B y D, debido probablemente a la aparición de mutantes resistentes de dicho microorganismo capaces de soportar en mayor medida que el resto el efecto del antibiótico Ketoconazol.

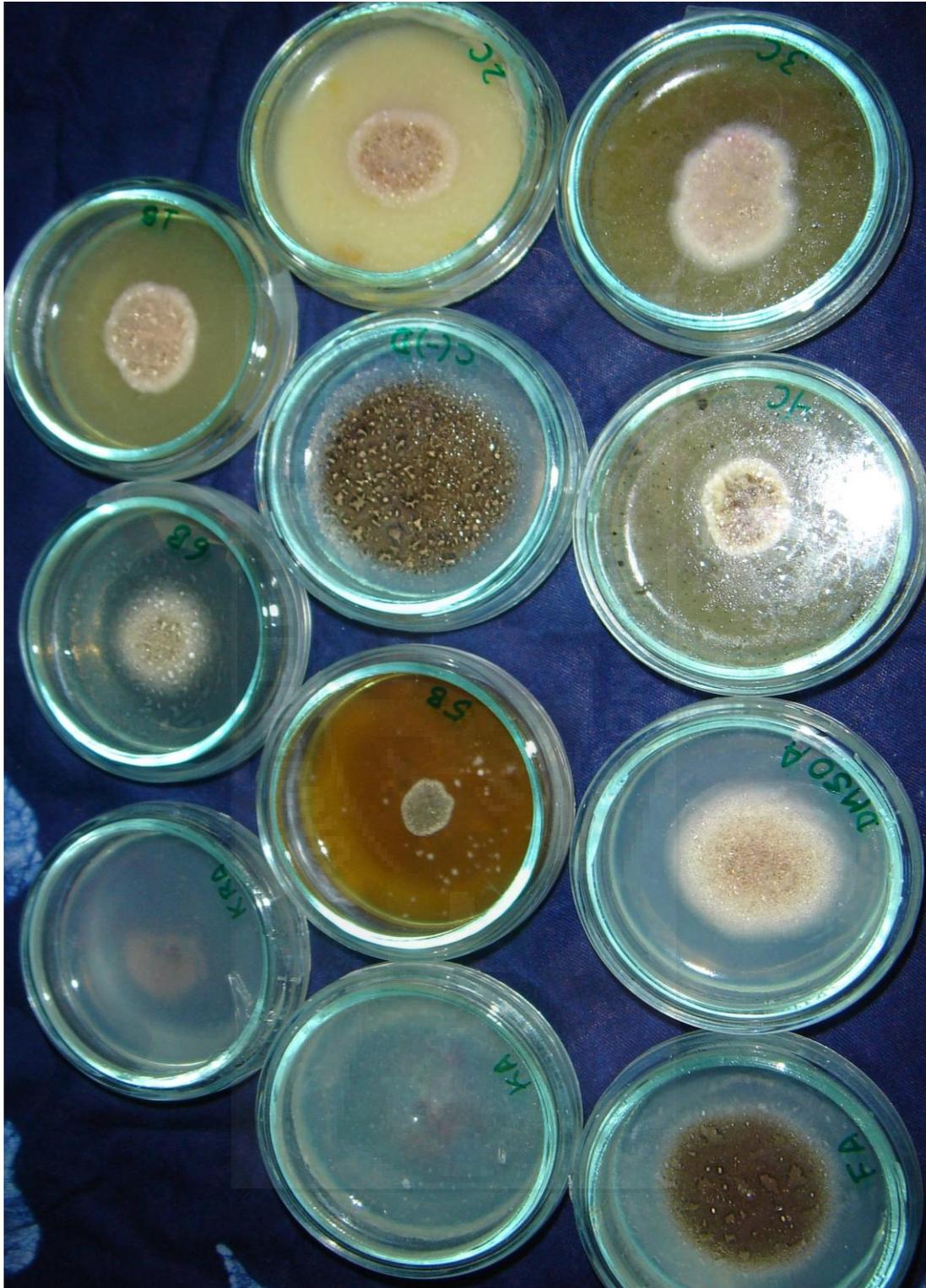


Foto D2. Método de Dilución de Extractos vegetales del género *Baccharis* con Agar y Pozo Central de Inoculo de *Aspergillus niger*.

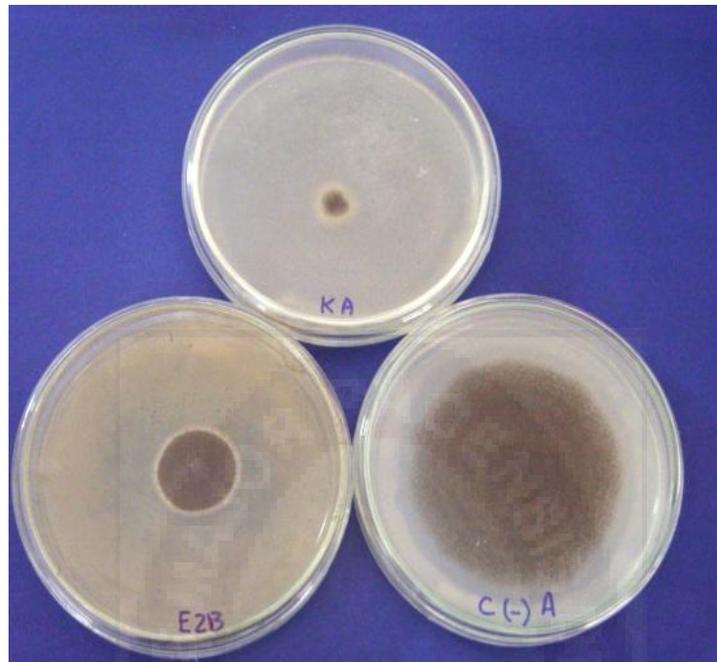


Foto D3. Actividad antifúngica del Extracto etanólico de *Baccharis latifolia*

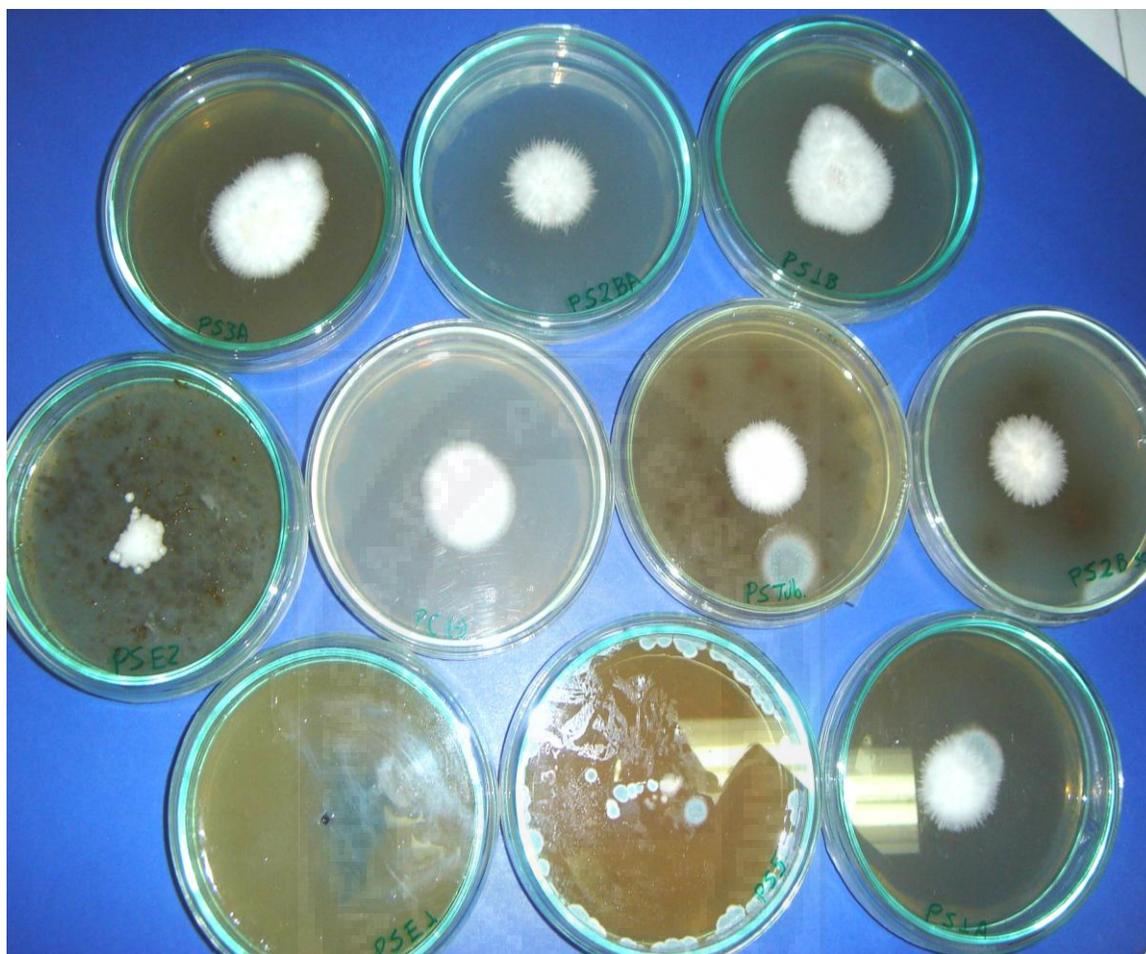


Foto D4. Método de Dilución de Extractos del género *Baccharis* con Agar y Pozo Central de Inoculo de *Phytophthora Palmivora*.

A: C(-) Control negativo *Phytophthora palmivora*. y Control positivo Fármaco Ketoconazol Jarabe. **B:** Extracto etanólico de *Baccharis Latifolia* y C(-) Control negativo *Phytophthora palmivora*. **C:** Control positivo Fármaco Ketoconazol Comprimido y C(-) Control negativo *Phytophthora palmivora*.

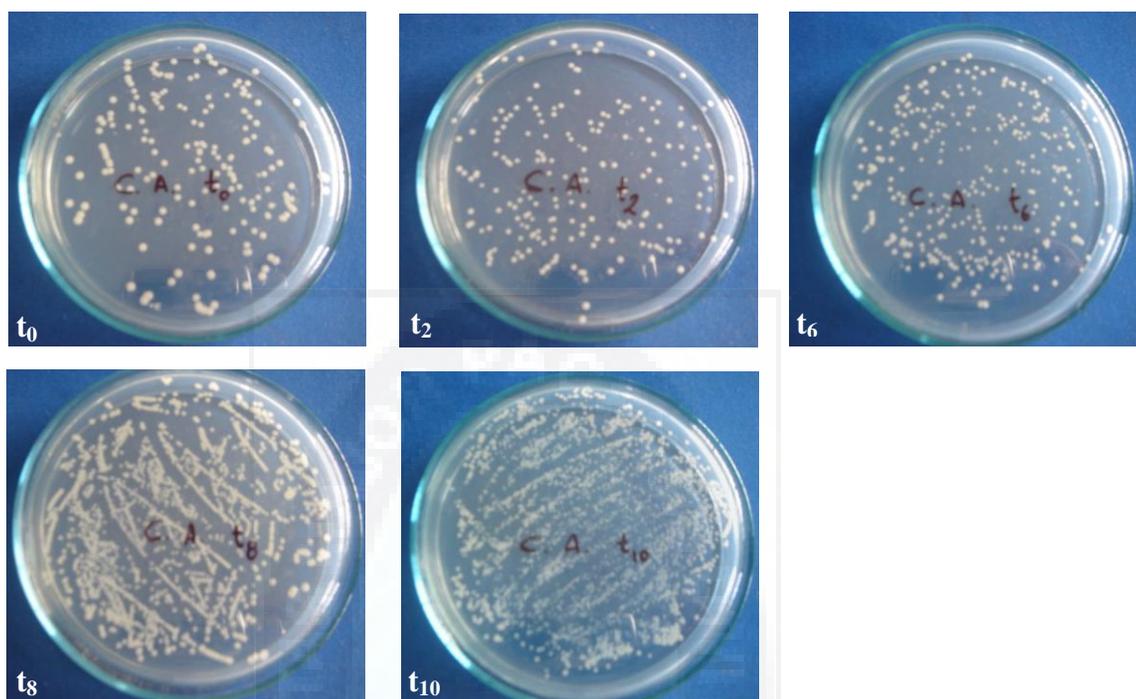


Foto D5. *Candida albicans*, sin diluciones

Control negativo, *Candida albicans*, del Ensayo de la Curva de letalidad para antimicrobianos, sin realizar las diluciones correspondientes para obtener de 10 a 300 UFC para el conteo, donde: t_0 corresponde al tiempo cero de iniciado el ensayo. t_2 corresponde al tiempo de 2 horas de iniciado el ensayo. t_6 corresponde al tiempo de 6 horas de iniciado el ensayo. t_8 corresponde al tiempo de 8 horas de iniciado el ensayo. t_{10} corresponde al tiempo de 10 horas de iniciado el ensayo.

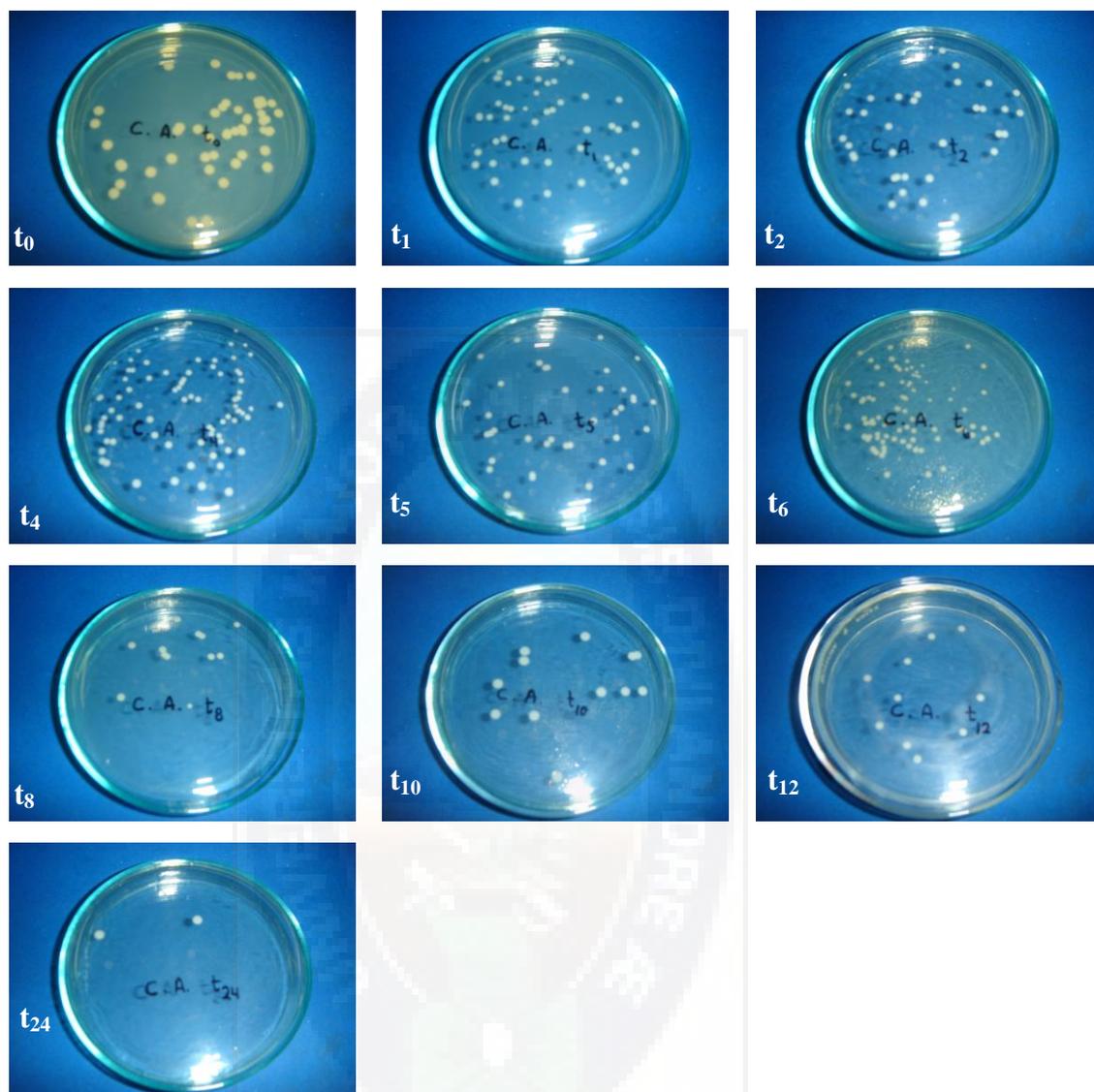


Foto D6. *Candida albicans*, con diluciones.

Control negativo, *Candida albicans*, del Ensayo de la Curva de letalidad para antimicrobianos, con las diluciones correspondientes para obtener de 10 a 300 UFC para el conteo, donde: t_0 corresponde al tiempo cero de iniciado el ensayo. t_1 corresponde al tiempo de 1 hora de iniciado el ensayo. t_2 corresponde al tiempo de 2 horas de iniciado el ensayo. t_4 corresponde al tiempo de 4 horas de iniciado el ensayo. t_5 corresponde al tiempo de 5 horas de iniciado el ensayo. t_6 corresponde al tiempo de 6 horas de iniciado el ensayo. t_8 corresponde al tiempo de 8 horas de iniciado el ensayo. t_{12} corresponde al tiempo de 12 horas de iniciado el ensayo. t_{24} corresponde al tiempo de 24 horas de iniciado el ensayo. t_{48} corresponde al tiempo de 48 horas de iniciado el ensayo.

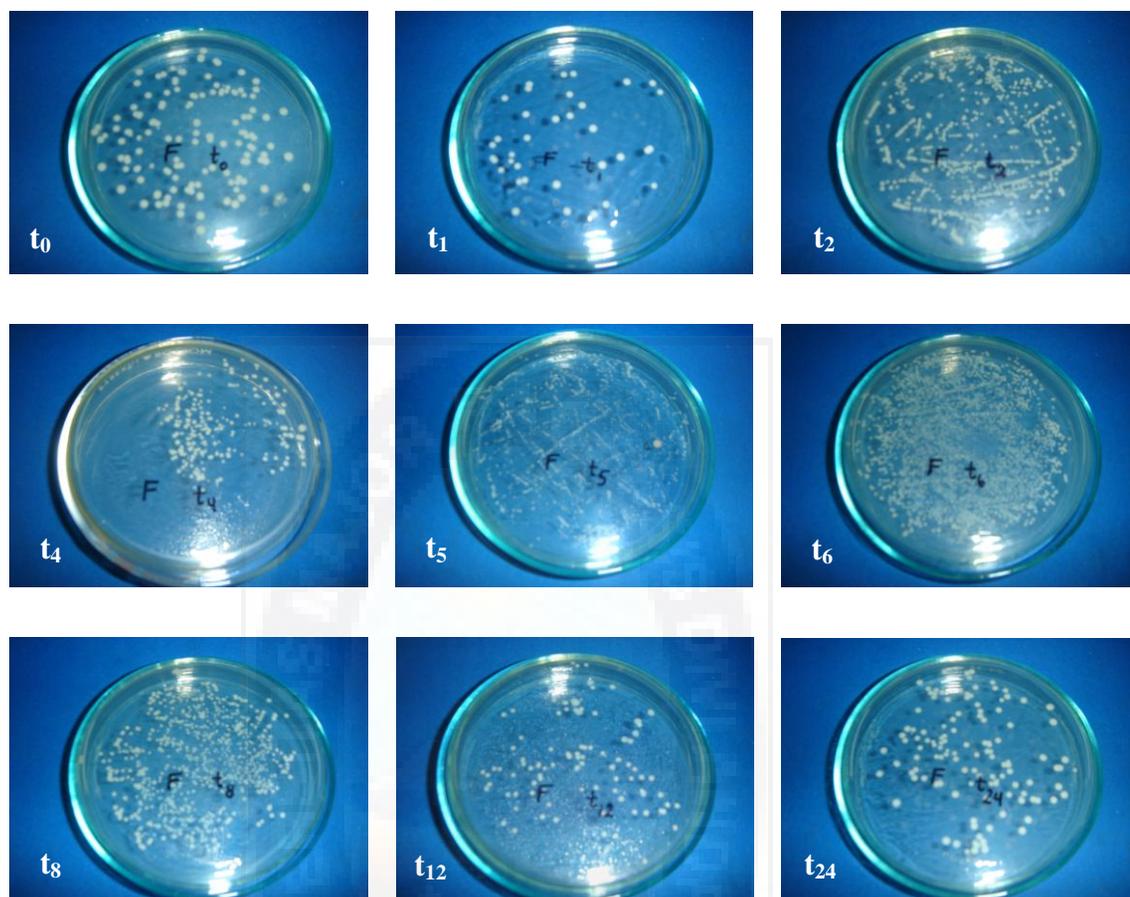


Foto D7. Actividad del Fármaco Fluconazol frente a *Candida albicans*.

Control positivo, Fármaco Fluconazol [Control Positivo C(+)], del Ensayo de la Curva de letalidad para antimicrobianos, con las diluciones correspondientes para obtener de 10 a 300 UFC para el conteo, donde: t₀ corresponde al tiempo cero de iniciado el ensayo. t₁ corresponde al tiempo de 1 hora de iniciado el ensayo. t₂ corresponde al tiempo de 2 horas de iniciado el ensayo. t₄ corresponde al tiempo de 4 horas de iniciado el ensayo. t₆ corresponde al tiempo de 6 horas de iniciado el ensayo. t₈ corresponde al tiempo de 8 horas de iniciado el ensayo. t₁₂ corresponde al tiempo de 12 horas de iniciado el ensayo. t₂₄ corresponde al tiempo de 24 horas de iniciado el ensayo. t₄₈ corresponde al tiempo de 48 horas de iniciado el ensayo.

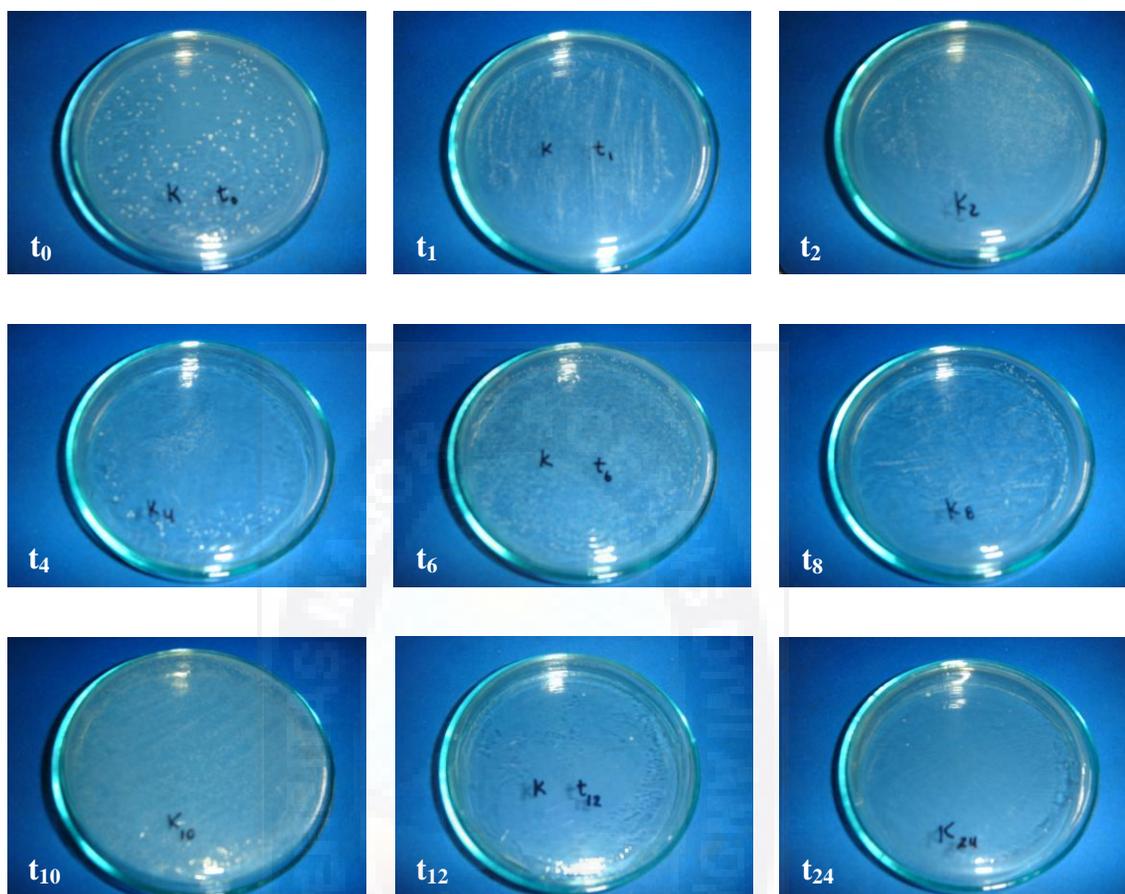


Foto D8. Actividad del Fármaco Ketoconazol KC frente a *Candida albicans*.

Control positivo, Fármaco Ketoconazol (comprimidos) [Control Positivo C(+)] a diferentes Tiempos de contacto frente a *Candida albicans*, del Ensayo de la Curva de letalidad para antimicrobianos, con las diluciones correspondientes para obtener de 10 a 300 UFC para el conteo, donde: t_0 corresponde al tiempo cero de iniciado el ensayo. t_1 corresponde al tiempo de 1 hora de iniciado el ensayo. t_2 corresponde al tiempo de 2 horas de iniciado el ensayo. t_4 corresponde al tiempo de 4 horas de iniciado el ensayo. t_6 corresponde al tiempo de 6 horas de iniciado el ensayo. t_8 corresponde al tiempo de 8 horas de iniciado el ensayo. t_{12} corresponde al tiempo de 12 horas de iniciado el ensayo. t_{24} corresponde al tiempo de 24 horas de iniciado el ensayo. t_{48} corresponde al tiempo de 48 horas de iniciado el ensayo.

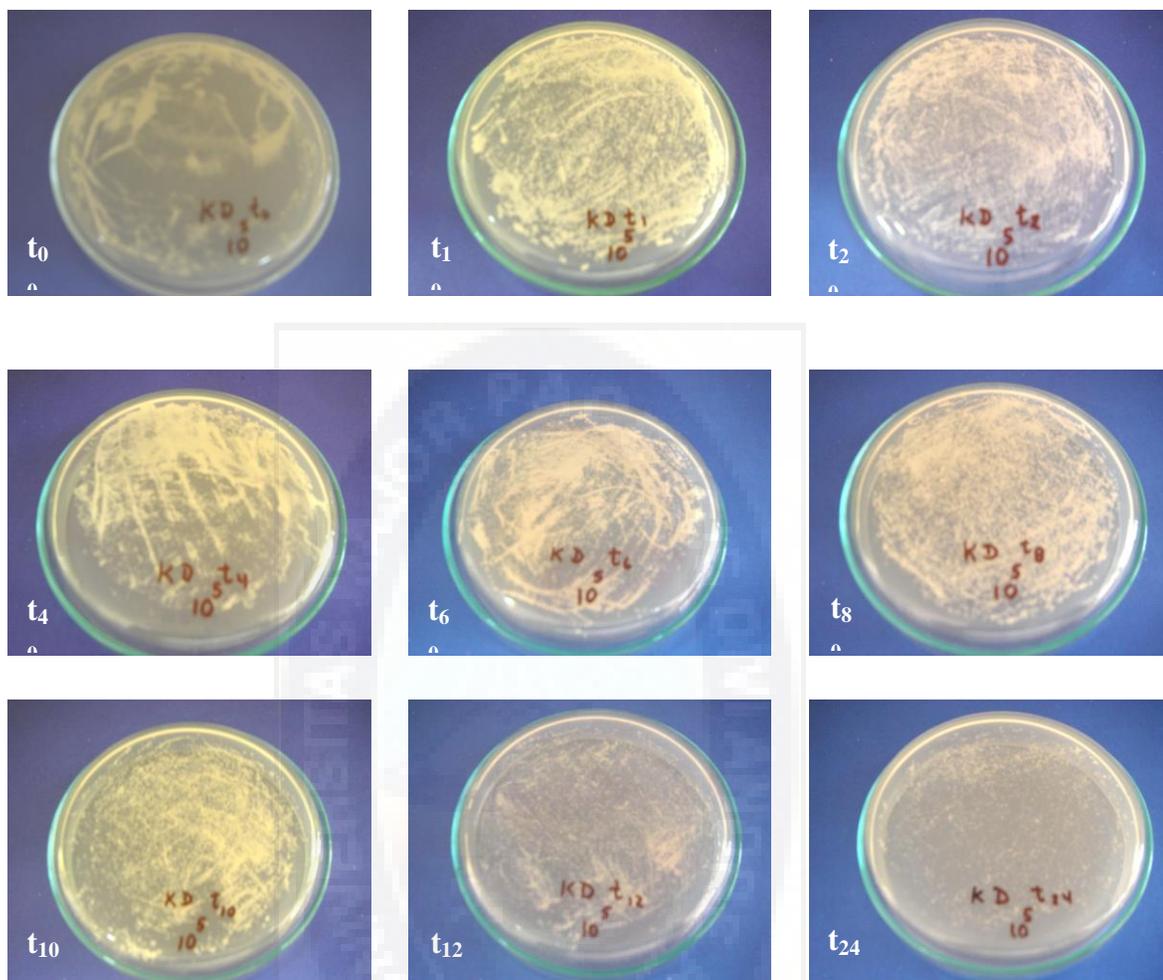


Foto D9. Actividad del Fármaco Ketoconazol KJ frente a *Candida albicans*.

Control positivo, Fármaco Ketoconazol (jarabe) [Control Positivo C(+)] a diferentes Tiempos de contacto frente a *Candida albicans*, del Ensayo de la Curva de letalidad para antimicrobianos, con las diluciones correspondientes para obtener de 10 a 300 UFC para el conteo, donde: t_0 corresponde al tiempo cero de iniciado el ensayo. t_1 corresponde al tiempo de 1 hora de iniciado el ensayo. t_2 corresponde al tiempo de 2 horas de iniciado el ensayo. t_4 corresponde al tiempo de 4 horas de iniciado el ensayo. t_6 corresponde al tiempo de 6 horas de iniciado el ensayo. t_8 corresponde al tiempo de 8 horas de iniciado el ensayo. t_{12} corresponde al tiempo de 12 horas de iniciado el ensayo. t_{24} corresponde al tiempo de 24 horas de iniciado el ensayo. t_{48} corresponde al tiempo de 48 horas de iniciado el ensayo.

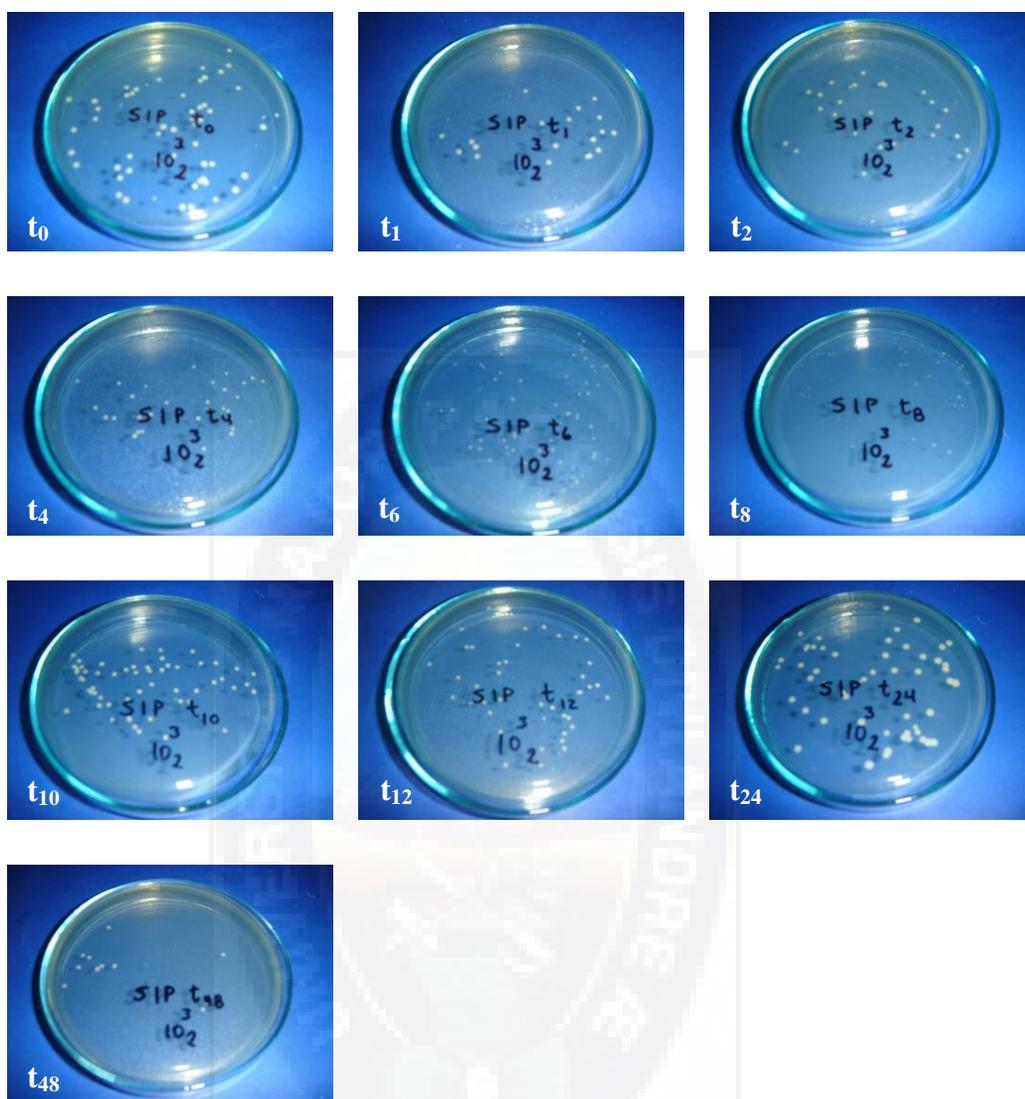


Foto D10. Extracto de *Baccharis genistilloides* contra *Candida albicans*.

Actividad inhibitoria del Extracto acuoso SIP de *Baccharis genistilloides* (Yungas, La Paz), del Ensayo de la Curva de letalidad para antimicrobianos, con las diluciones correspondientes para obtener de 10 a 300 UFC para el conteo, donde: t_0 corresponde al tiempo cero de iniciado el ensayo. t_1 corresponde al tiempo de 1 hora de iniciado el ensayo. t_2 corresponde al tiempo de 2 horas de iniciado el ensayo. t_4 corresponde al tiempo de 4 horas de iniciado el ensayo. t_6 corresponde al tiempo de 6 horas de iniciado el ensayo. t_8 corresponde al tiempo de 8 horas de iniciado el ensayo. t_{10} corresponde al tiempo de 10 horas de iniciado el ensayo. t_{12} corresponde al tiempo de 12 horas de iniciado el ensayo. t_{24} corresponde al tiempo de 24 horas de iniciado el ensayo. t_{48} corresponde al tiempo de 48 horas de iniciado el ensayo.

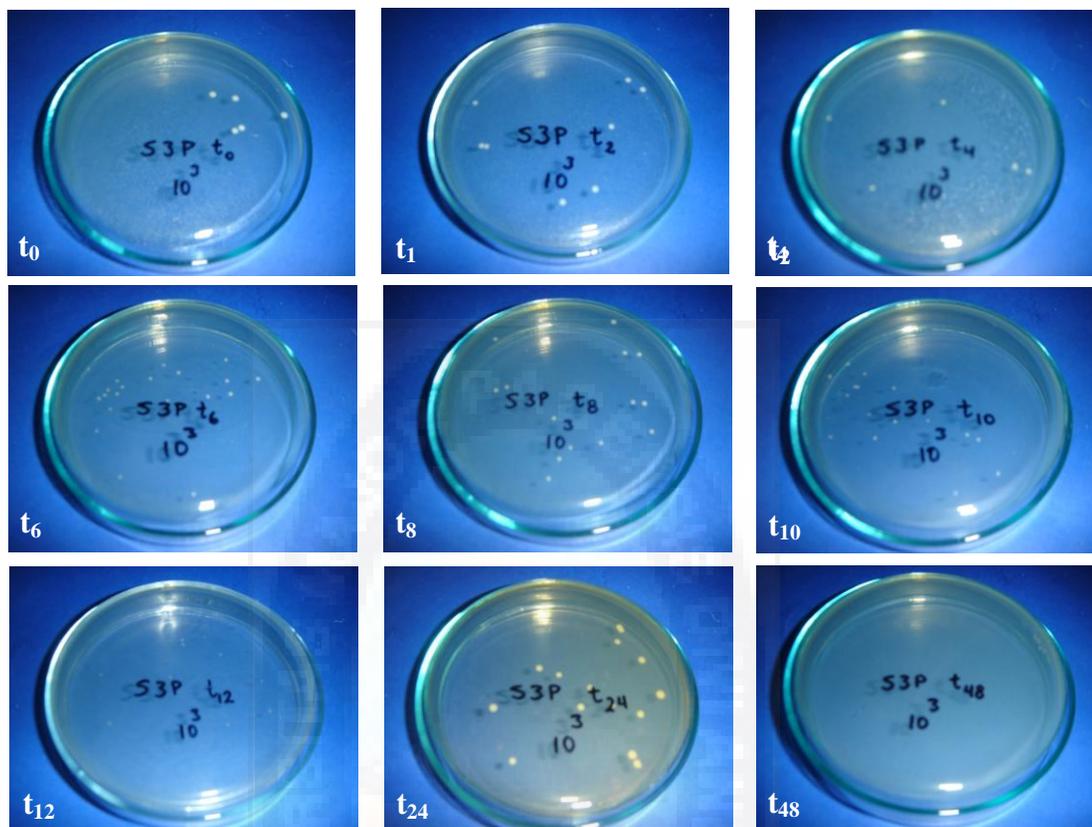


Foto D11. Extracto de *Baccharis Genistilloides* S3P contra *Candida albicans*.

Actividad inhibitoria del Extracto acuoso de *Baccharis Genistilloides* S3P (Cochabamba) a diferentes Tiempos de contacto, frente a *Candida albicans*, con las diluciones correspondientes para obtener de 10 a 300 UFC para el conteo, donde: t₀ corresponde al tiempo cero de iniciado el ensayo. t₁ corresponde al tiempo de 1 hora de iniciado el ensayo. t₂ corresponde al tiempo de 2 horas de iniciado el ensayo. t₄ corresponde al tiempo de 4 horas de iniciado el ensayo. t₆ corresponde al tiempo de 6 horas de iniciado el ensayo. t₈ corresponde al tiempo de 8 horas de iniciado el ensayo. t₁₀ corresponde al tiempo de 10 horas de iniciado el ensayo. t₁₂ corresponde al tiempo de 12 horas de iniciado el ensayo. t₂₄ corresponde al tiempo de 24 horas de iniciado el ensayo. t₄₈ corresponde al tiempo de 48 horas de iniciado el ensayo.

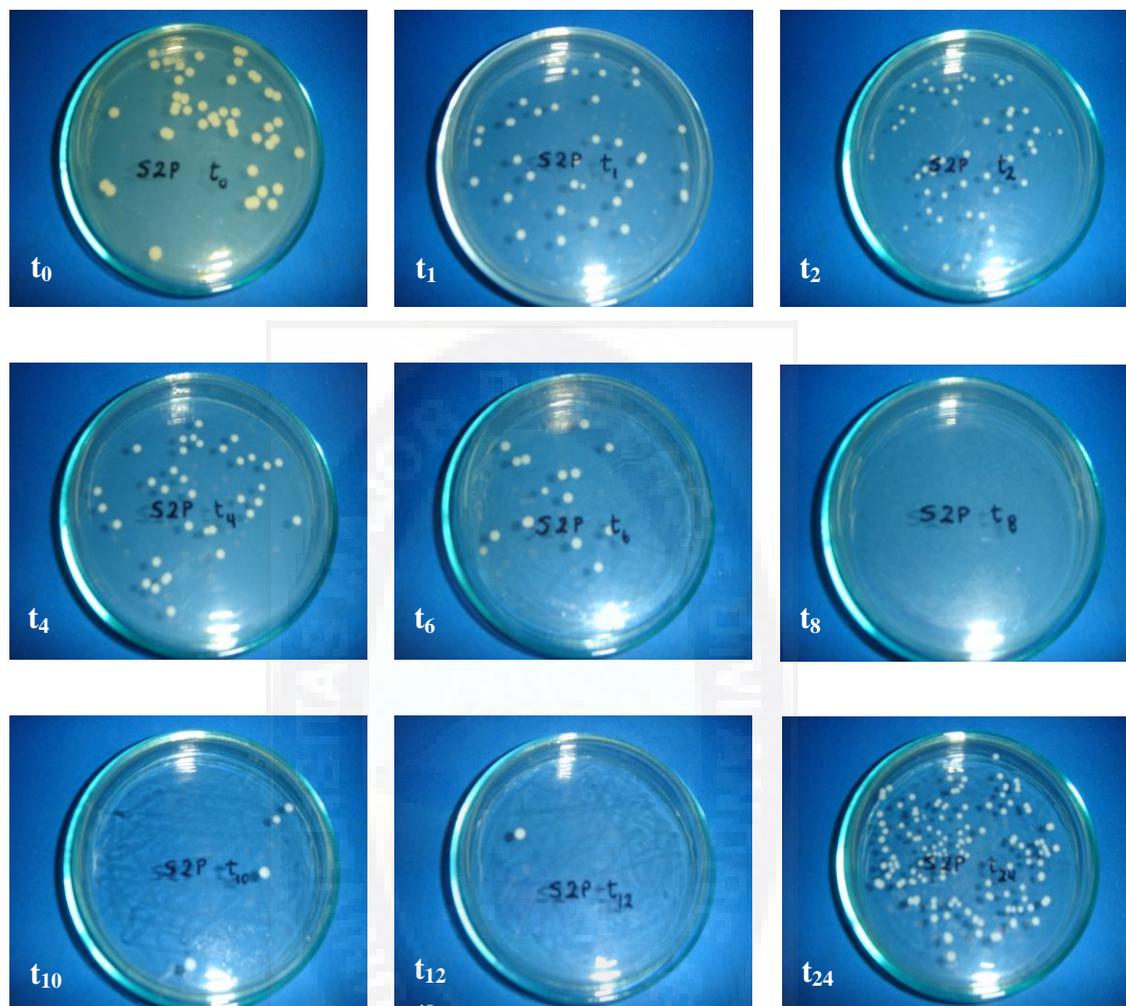


Foto D12. Extracto de *Baccharis latifolia* S2P frente a *Candida albicans*.

Ensayo de la Curva de letalidad para antimicrobianos, con Actividad inhibitoria del Extracto acuoso de *Baccharis latifolia* S2P con las diluciones correspondientes para obtener de 10 a 300 UFC para el conteo, donde: t_0 corresponde al tiempo cero de iniciado el ensayo. t_1 corresponde al tiempo de 1 hora de iniciado el ensayo. t_2 corresponde al tiempo de 2 horas de iniciado el ensayo. t_4 corresponde al tiempo de 4 horas de iniciado el ensayo. t_6 corresponde al tiempo de 6 horas de iniciado el ensayo. t_8 corresponde al tiempo de 8 horas de iniciado el ensayo. t_{10} corresponde al tiempo de 10 horas de iniciado el ensayo. t_{12} corresponde al tiempo de 12 horas de iniciado el ensayo. t_{24} corresponde al tiempo de 24 horas de iniciado el ensayo. t_{48} corresponde al tiempo de 48 horas de iniciado el ensayo.

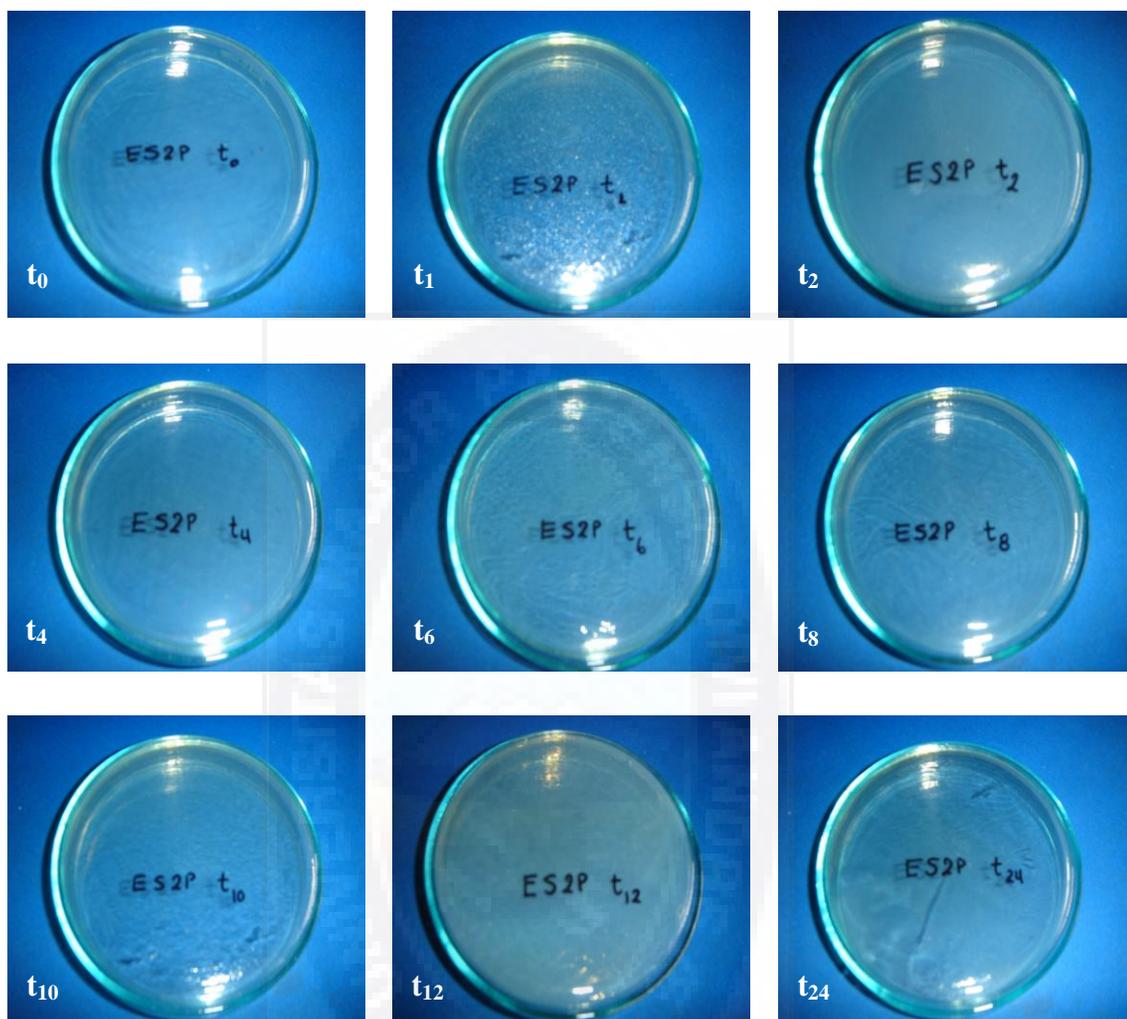


Foto D13. Extracto de *Baccharis latifolia* E20 frente a *Candida albicans*

Ensayo de la Curva de letalidad para antimicrobianos de la Actividad inhibitoria del Extracto etanólico E20 de *Baccharis latifolia*, sin las diluciones correspondientes para obtener de 10 a 300 UFC para el conteo, donde: t_0 corresponde al tiempo cero de iniciado el ensayo. t_1 corresponde al tiempo de 1 hora de iniciado el ensayo. t_2 corresponde al tiempo de 2 horas de iniciado el ensayo. t_4 corresponde al tiempo de 4 horas de iniciado el ensayo. t_6 corresponde al tiempo de 6 horas de iniciado el ensayo. t_8 corresponde al tiempo de 8 horas de iniciado el ensayo. t_{10} corresponde al tiempo de 10 horas de iniciado el ensayo. t_{12} corresponde al tiempo de 12 horas de iniciado el ensayo. t_{24} corresponde al tiempo de 24 horas de iniciado el ensayo. t_{48} corresponde al tiempo de 48 horas de iniciado el ensayo.

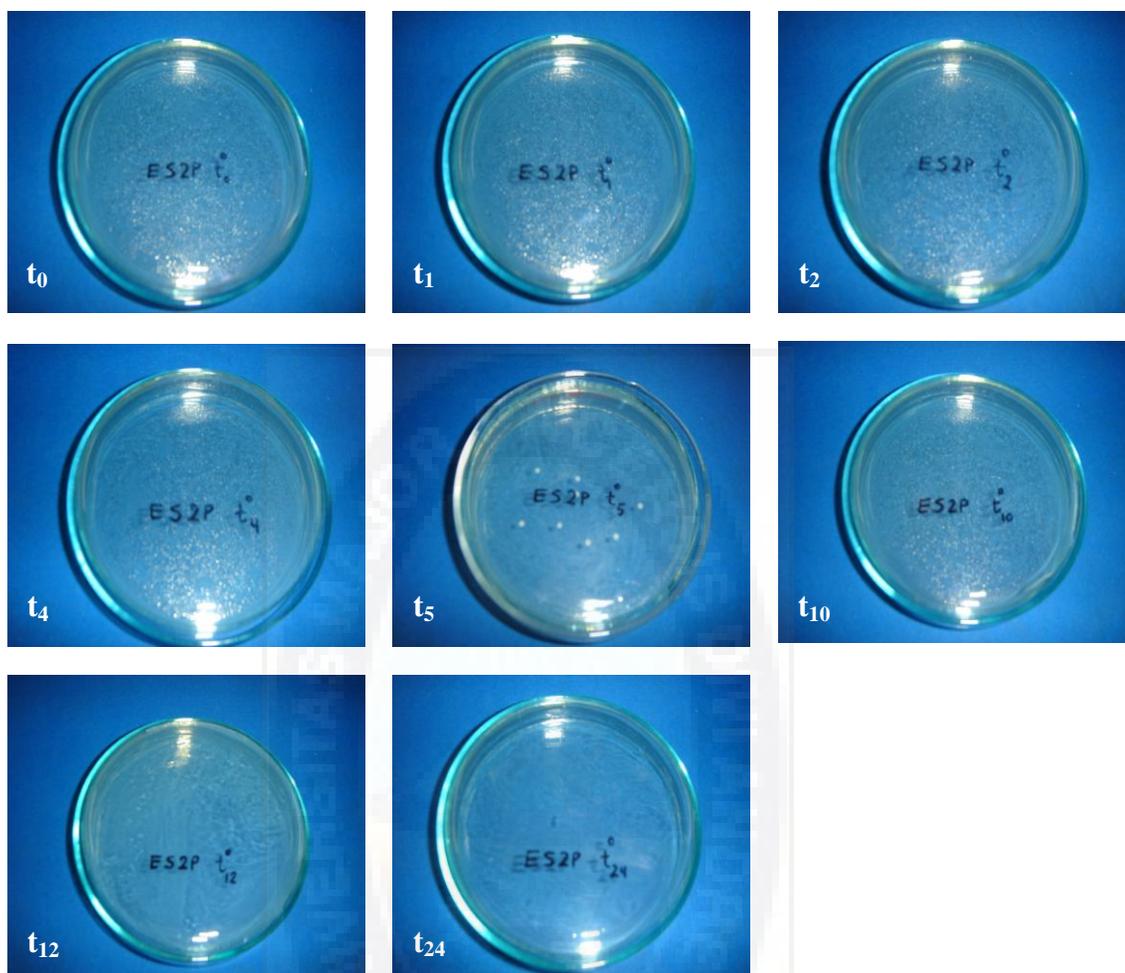


Foto D14. Extracto de *Baccharis latifolia* E10 frente a *Candida albicans*.

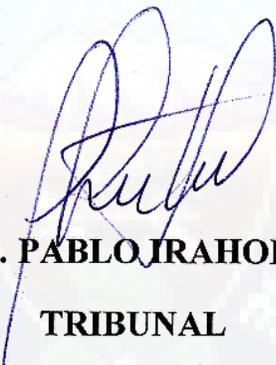
Ensayo de la Curva de letalidad para antimicrobianos de la Actividad inhibitoria del Extracto etanólico E10 *Baccharis latifolia*, frente a *Candida albicans*, sin realizar las diluciones correspondientes donde: t_0 corresponde al tiempo cero de iniciado el ensayo. t_1 corresponde al tiempo de 1 hora de iniciado el ensayo. t_2 corresponde al tiempo de 2 horas de iniciado el ensayo. t_4 corresponde al tiempo de 4 horas de iniciado el ensayo. t_6 corresponde al tiempo de 6 horas de iniciado el ensayo. t_8 corresponde al tiempo de 8 horas de iniciado el ensayo. t_{10} corresponde al tiempo de 10 horas de iniciado el ensayo. t_{12} corresponde al tiempo de 12 horas de iniciado el ensayo. t_{24} corresponde al tiempo de 24 horas de iniciado el ensayo. t_{48} corresponde al tiempo de 48 horas de iniciado el ensayo.



DRA. TERESA ALVAREZ
TRIBUNAL



DRA. CAROLA LOZA
TRIBUNAL



DR. PABLO JRAHOLA
TRIBUNAL