

EVALUACIÓN ANTIFÚNGICA DE 9 EXTRACTOS DE ORIGEN VEGETAL CONTRA *Trichophyton rubrum*

MÉNDEZ ARTOLA SUSANA, CERÓN NAVA ANABELLE, SALAZAR JUAN RODRIGO

Resumen— Los dermatofitos o tiñas son un problema de salud pública ya que son de fácil contagio y por el mal uso terapéutico estos han empezado a generar resistencia. Por eso surge esta idea de exponer a *T.rubrum* ATCC contra diferentes extractos los cuales han de mostrado actividad, con la finalidad de descartar los que no fueran activos contra este hongo y así encontrar alguna posible opción alternativa contra los dermatofitos.

I. INTRODUCCIÓN

Este Proyecto tiene como finalidad buscar una alternativa terapéutica en el tratamiento de micosis superficiales, pues la resistencia antifúngica ha sido un problema de salud emergente en México en los últimos 30 años, esto debido a diversos factores como lo son el diagnóstico, hasta el uso inadecuado de los medicamentos, motivo por el cual se ha provocado falla terapéutica en el tratamiento de las micosis. En este trabajo, se pretende comprobar la capacidad inhibitoria y estática de los diversos extractos de plantas medicinales mexicanas contra un agente etiológico de las tiñas, esto debido a que se trata de una de las dermatofitosis más frecuentes. Este grupo de patologías se presentan principalmente en áreas tropicales de México, aunque estos no se limitan a una sola zona geográfica ya que son considerados como cosmopolitas.

La dermatofitosis o también conocidas como tiñas son micosis superficiales causadas por hongos queratinofílicos estrechamente relacionados, están compuestos por tres géneros: *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton*. Para fines prácticos de este documento sólo nos enfocaremos en el género *Trichophyton* especie *rubrum*. Este hongo afecta la capa cornea de la piel, cabello y uñas ya que la epidermis está compuesta por un plano estratificado queratinizado, esta contiene cuatro tipos de células: queratinocitos, melanocitos, células de Langerhans, células de Merkel. Aunque las más abundantes en un 90 % son los queratinocitos de los cuales estos van a estar distribuidos en las cinco capas para producir queratina.

Susana Méndez Artola pertenece a la carrera Químico Farmacéutico Biólogo de la Facultad de Ciencias Químicas y realizó el proyecto como tesista.

El proyecto fue asesorado por la Mta.-Anabelle Cerón Nava y el Dr. Juan Rodrigo Salazar

Los autores agradecen a la Facultad de Ciencias Químicas de La Universidad La Salle CDMX.

A las tiñas se les considera cosmopolita ya que los tres géneros los vamos a encontrar en cualquier parte del mundo aunque estos prefieren climas de condiciones cálidas y húmedas.

En cuanto a micosis en México se ha encontrado que la dermatofitosis es una de las más altas ya que se constituyen de un 70 - 80 % de todas las micosis, teniendo en primer lugar al género *Trichophyton* especie *rubrum* con un 70 %. Según un estudio realizado de 2,084 casos en diversos hospitales de la ciudad de México a pacientes con dermatofitosis los cinco microorganismos más aislados fueron: (Bonifaz Alexander, 2015)

1. *T. rubrum* (71.2 %)
2. *T. tonsurans* (6.9 %)
3. *T. mentagrophytes* (5.5 %)
4. *M. canis* (4.5 %)
5. *E. floccosum* (1.3 %)

II. GÉNERO

Estos hongos tienen muchas estructuras similares lo cual dificulta hasta cierto punto su identificación, por es de vital importancia conocer sus estructuras microscópicas para poder diferenciarlos. Los tres géneros están constituidos por un micelio hialino septado, microconidios y macroconidio. En la figura 1 podremos observar las estructuras.

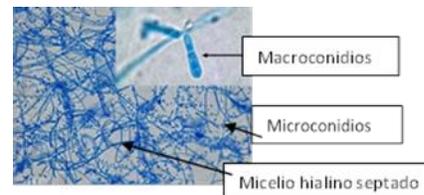


Figura 1. Estructuras de los tres géneros de hongos en estudio.

III. PATOGÉNI Y TRATAMIENTO

La fuente de infección puede ser a través de fómites o por contacto directo, el sólo contacto con las esporas y/o conidios con la piel puede generar la enfermedad. Cuando los conidios entran en contacto con la piel, estos empiezan a crecer en la capa córnea de manera radial y empiezan a provocar lesiones anulares con reacciones inflamatorias, las lesiones van a tener

un centro aclarado y un borde de color rojizo al cual se le denomina “borde activo” el cual va a estar constituido por pápulas y/o vesículas. Una de las características de este hongo es que sólo van a invadir tejido nuevo, es decir, no vuelven a invadir el centro aclarado.

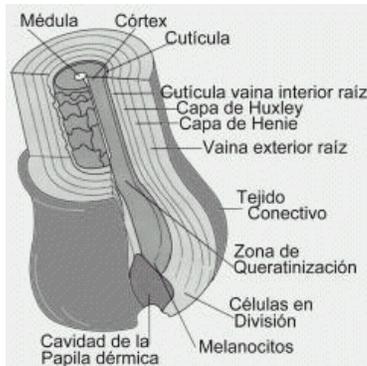


Figura 2. Estructura del pelo.

En el caso de la invasión de cuero cabelludo lo que ocurre es una invasión del micelio dentro de la vaina externa del cabello con crecimiento en el bulbo del cabello (figura 2), este proceso se va a detener hasta llegar a una zona de incompleta queratinización, provocando así cabello debilitado de fácil rompimiento. Para invasión del hongo en uñas se formarán canales los cuales indicarán una destrucción de la queratina, dentro de los cuales se van a presentar las hifas.

Su periodo de incubación va entre 7 a 15 días aunque este dato puede variar dependiendo de la cantidad de inóculo y de la localización.

Las diversas formas clínicas en las cuales se van a presentar este tipo de micosis son las siguientes:

1. Tinea capitis (cabeza)
2. Tinea pedis (pies)
3. Tinea corporis (cuerpo)
4. Tinea cruris (ingle)
5. Tinea unguis (uñas)

A continuación, se mostrará en el cuadro I la frecuencia de estas manifestaciones:

CUADRO I
FRECUENCIA DE MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Tiña de:	1952* %	1979** %	1991***%	2014****%
Cabeza	53.7	3.8	2.6	1.8
Cuerpo	19.6	19.3	16.4	15.1
Pies	17.5	48.0	51.3	51.0
Ingle	0.0	12.6	6.4	5.0
Uñas	9.2	16.0	23.1	27.1

*Garza-Toba,M., **Rodríguez,G., ***Bonifaz,A.

Para este tipo de micosis los antifúngicos más recetados son: Clotrimazol, Fluconazol, Itraconazol y Griseofulvina. La dosis de estos varía dependiendo de la forma farmacéutica, para

estos hongos son de uso tópico debido a que sólo van a estar en tejidos queratinizados.

Para el diagnóstico de estas micosis superficiales se utilizan dos métodos los cuales son los siguientes:

- Examen con luz de Wood
- Procedimientos micológicos
 - Observación directa al microscopio
 - Realizar un cultivo

El diagnóstico rápido empleado para estas micosis consiste en tomar una pequeña muestra del paciente (escama), colocarla en un portaobjetos y añadirle una gota de KOH al 20 %, después calentar ligeramente la muestra para así evitar que se modifique la forma del hongo y con esto poder facilitar la observación al microscopio.

En el caso de la tinea capitis se realiza el examen directo al cabello con KOH 10 % con tinta. En el caso de no contar con cabellos cortos como lo puede ser en el caso de que exista una tinea inflamatoria se realizará el examen directo en escamas y/o pus.

Otra manera de diagnosticarlos es sembrar en medio SDA o PDA, ver su morfología macroscópica y microscópica para tener un diagnóstico más confiable y certero.

IV. METODOLOGÍA

Los extractos utilizados para esta experimentación son los siguientes:

Stenocereus stellatus partes aéreas, *Peniocereus maculatus* partes aéreas, Flor *Yucca filifera* acetato, Flor *Yucca filifera* metanol, Flor *Myrtillocactus geometrizans* acetato, Flor *Myrtillocactus geometrizans* metanol, *Buddleja cordata* partes aéreas, *Buddleja cordata* raíz acetato-metanol y *Buddleja cordata* raíz hexano.

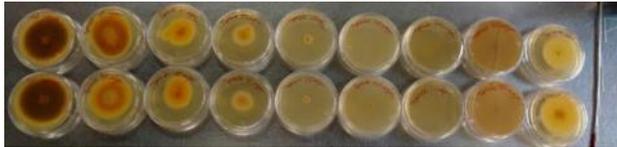
Se realizó la estandarización del método con los siguientes antifúngicos: Clotrimazol y Fluconazol utilizando las siguientes concentraciones, para Clotrimazol 30, 60, 90, 120 y 150 µg/mL, para Fluconazol 30, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 µg/mL. Una vez comprobado que el método funciona correctamente se prosiguió con la siguiente parte.

Se utilizó el método de difusión en placa, se emplearon 9 concentraciones diferentes las cuales fueron las siguientes: 30, 60, 90,120, 150, 250, 500, 1000, 2000, 3000 µg/mL, cabe mencionar que se metió un control positivo de crecimiento para asegurar que no hubiera problema alguno con el hongo, todo esto fue por duplicado.

Este método se utilizó tanto para la cepa ATCC de *T.rubrum* como para la cepa de muestra clínica de *T.rubrum*.

V. RESULTADOS

Los resultados que obtuvimos para estos hongos fueron variados ya que sólo se pudo registrar la concentración mínima inhibitoria (MIC) de dos extractos los cuales fueron: *B.cordata* raíz acetato-metanol (figura 3), *B.cordata* raíz hexano (figura 4). A continuación se mostrará un resumen de los resultados obtenidos (cuadro II y III):

Figura 3. Cepas ATCC *T.rubrum* con *B.cordata* acetato-metanolFigura 4. Cepas ATCC *T.rubrum* con *B.cordata* HexanoCUADRO II
RESULTADOS MIC PARA ATCC DE *T.rubrum*

Extracto	Control de crecimiento	30 µg/mL	60 µg/mL	90 µg/mL	150 µg/mL	3000 µg/mL
Clotrimazol	5/5 cm	S/C	N/A	N/A	N/A	N/A
Fluconazol	5/5 cm		S/C	N/A	N/A	N/A
Stenocereus Stellatus	5/5 cm	5/5 cm		5/5 cm	5/5 cm	5/5 cm
Peniocereus maculatus	5/5 cm	4/3.8 cm		2.9/2.5 cm	1.7/1.5 cm	N/A
Yucca filifer Acetato	3.5/3.5 cm	3.5/3.5 cm		3.5/3.5 cm	3.5/3.5 cm	1.2/1.2 cm
Yucca filifer Metanol	5/5 cm	3.5/3.5 cm		3.5/3.5 cm	3.5/3.5 cm	0.6/0.6 cm
Myrtillocactus geometrizan acetato	5/5 cm	5/5 cm		5/5 cm	5/5 cm	5/5 cm
Myrtillocactus geometrizan metanol	5/5 cm	5/5 cm		5/5 cm	5/5 cm	5/5 cm
Buddleja cordata partes aéreas	5/5 cm	5/5 cm		5/5 cm	5/5 cm	5/5 cm
Buddleja cordata hexano	5/4.8 cm	1.9/1.8 cm		MIC	N/A	N/A
Buddleja cordata Acetato metanol	5/4.8 cm	4/4.5 cm		2.4/2.2 cm	MIC	N/A

°S/C.- Sin Crecimiento °N/A.- No Aplica °MIC.- Concentración Mínima Inhibitoria °Medida de diámetro de crecimiento (cm)

CUADRO III
RESULTADOS MIC PARA *T.rubrum*

Extracto	Control de crecimiento	30 µg/mL	90 µg/mL	150 µg/mL	500 µg/mL	3000 µg/mL
Buddleja cordata hexano	4.3/4 cm	3.9/3.9 cm	3.8/3.7 cm	2.7/2.5 cm	MIC	N/A
Buddleja cordata acetato metanol	4.5/4.5 cm	4/4 cm	3.2/3.1 cm	MIC	N/A	N/A

°N/A.- No Aplica °MIC.- Concentración Mínima Inhibitoria °Medida de diámetro de crecimiento (cm)

VI. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Como podemos observar en el cuadro I localizada en la sección de resultados, sólo dos de los nueve extractos mostraron actividad contra este hongo. En el caso de *P.maculatus* la actividad se le atribuye al disolvente utilizado y esto se pudo observar en el control de disolvente el cual demostró inhibir el hongo.

Para los extractos de *Yucca filifer* acetato y metanol no se llegó a la MIC con las concentraciones empleadas motivo por el cual se creó que es necesario aumentar la dosis por arriba de los 3000 µg/mL para poder conocer la concentración en la cual haya una actividad mucho mayor.

En el caso de los extractos de *Myrtillocactus geometrizan* acetato y metanol no hubo actividad alguna contra este hongo motivo por el cual la decisión de descartarlo fue notoria.

Los dos extractos seleccionados para continuar con la segunda fase de la investigación, la cual consiste en analizar la actividad de estos con la cepa *T.rubrum* de muestra clínica, fueron *B.cordata* acetato-metanol y hexano, debido a que mostraron una MIC de 90 µg/mL para el extracto acetato metanol y para el extracto de hexano 150µg/mL en el caso de la cepa tipo (ATCC).

Una vez conociendo estos valores se realizó la misma metodología. Como podemos ver en los resultados obtenidos para la cepa de muestra clínica son iguales en el caso del extracto de *B.cordata* acetato-metanol de 150 µg/mL pero para el de *B.cordata* hexano la MIC se encontró en una concentración de 500 µg/mL. Esta variación en los resultados entre la cepa tipo y la muestra clínica posiblemente se debe a que la ATCC es una cepa pura la cual no ha estado en contacto alguno con factores ambientales o con algún antibiótico, en cambio la cepa de muestra clínica a estado expuesta a varios factores otorgándole así una resistencia mayor dando como resultado encontrar la MIC en una concentración mayor a la empleada con la de referencia en este caso la ATCC.

VII. CONCLUSIONES

Los extractos seleccionados para este trabajo fueron analizados anteriormente mostrando actividad biológica específicamente como antimicrobianos, por lo que se decidió probar su actividad como antifúngicos para hongos patógenos humanos debido a la incidencia de enfermedades ocasionadas por este tipo de hongos en México.

De estos extractos probados destaca la actividad de *B.cordata* los cuales presenta actividad inhibitoria en las concentraciones de 150 a 500 µg/mL

Gracias a este tipo de investigaciones son importantes como alternativas naturales, pudiendo estas ser menos dañinas al cuerpo como lo pueden ser los antifúngicos sintético. Este trabajo ayuda a dar una mejor visión de lo que son capaces los

extractos naturales contra ciertas infecciones y/o algunas enfermedades.

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer a la Universidad La Salle sobre todo a la Facultad de Ciencias Químicas por permitirnos realizar este proyecto de investigación en las instalaciones

A la Mta. María de Jesús Ramírez Palomares y a los del almacén por otorgarnos el material necesario para la experimentación.

REFERENCIAS

- [1] Bonifaz A. (2015). "MICOLOGÍA MEDICA BÁSICA". México, DF.
- [2] Manzano-Gayoso, P. (2015). "DERMATOFITOSIS." Unidad de Micología, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. México, D.F. Recuperado en: 14-Junio-2016, de: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/dermatofitosis.html>
- [3] Ellis, D. (2016). "Dermatophytosis." The University of Adelaide. Australia. Recuperado en: 17-Junio-2016, de: <http://www.mycology.adelaide.edu.au/Mycoses/Cutaneous/Dermatophytosis/>
- [4] Tangarife, V. (2011). "Trichophyton rubrum." Escuela de Microbiología. Universidad de Antioquia. Colombia. Recuperado en: 14-Ene-2016, de: <http://aprendeenlinea.udea.edu.co/lms/moodle/mod/resource/view.php?inpopup=true&id=100799>
- [5] Juan José Vilata corell. (2006). "Micosis cutáneas." Madrid: Médica Panamericana.
- [6] Rubén López Martínez. (2012). "Micología médica" México.