



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS CLÍNICO
MÉRIDA- VENEZUELA



**ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE *Cladonia rappii* CONTRA *Candida albicans*
AISLADAS DE MUESTRAS CLÍNICAS, SENSIBLES Y RESISTENTES AL
FLUCONAZOL**

www.bdigital.ula.ve

Autora: Br. Albany M. Antúnez B.

Tutora: Prof. (a) Celina Pérez de Salazar

Mérida, Enero de 2016



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS CLÍNICO
MÉRIDA- VENEZUELA



**ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE *Cladonia rappii* CONTRA *Candida albicans*
AISLADAS DE MUESTRAS CLÍNICAS, SENSIBLES Y RESISTENTES AL
FLUCONAZOL**

(Trabajo Especial de Grado presentado como Requisito Parcial para Optar al Título
de Licenciada en Bioanálisis)

Autora: Br. Albany M. Antúnez B.

Tutora: Prof. (a) Celina Pérez de Salazar

Mérida, Enero de 2016

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
ÍNDICE DE TABLAS	iv
ÍNDICE DE ESQUEMAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	vii
DEDICATORIA	viii
AGRADECIMIENTO	ix
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO	
I EL PROBLEMA	
Planteamiento del Problema	3
Objetivos de la Investigación	
Objetivo General	6
Objetivos Específicos	6
Justificación e Importancia de la Investigación	7
Alcances y Limitaciones de la Investigación	7
II MARCO TEÓRICO	8
Trabajos Previos	8
Antecedentes Históricos o Epistemológicos	13
Bases Teóricas	
Taxonomía y Generalidades de los Líquenes	14
Taxonomía y Morfología del Liquen <i>Cladonia rappii</i>	16

Extractos Liquénicos	17
Técnicas para Evaluar la Actividad Antifúngica de los Líquenes	19
Técnicas para Evaluar la Actividad Antifúngica de Fármacos Comerciales	21
Taxonomía y Generalidades de las Levaduras pertenecientes al género <i>Candida</i>	23
Susceptibilidad Disminuida de <i>Candida sp</i> , a los Antifúngicos	25
Sistema de Hipótesis	26
Operacionalización de las Variables	27
Definición de Términos	28
III MARCO METODOLÓGICO	
Enfoque de la Investigación	31
Tipo y Diseño de la Investigación	31
Población y Muestra	31
Unidad de Investigación	31
Metodología de la Investigación	
Muestra Liquélica a Evaluar	32
Preparación del Extracto Liquélico	32
Microorganismos y Preparación del Inóculo	33
Medio de Cultivo Utilizado	34
Determinación de la Actividad Antifúngica	35
Técnica de Microgota	35
Lectura e Interpretación de la Prueba por la Técnica de Microgota	35
Técnica de Difusión con Discos	35

Lectura e Interpretación de la Prueba por la Técnica de Difusión con Discos	35
Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)	36
Técnica de Microgota	36
Lectura e Interpretación de la Prueba de CIM, por la Técnica de Microgota	36
Técnica de Difusión con Discos	36
Lectura e Interpretación de la Prueba de CIM, por la Técnica de Difusión con Discos	37
Controles	37
IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
Resultados	40
Discusion	43
V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	
Conclusiones	47
Recomendaciones	47
REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS	49

ÍNDICE DE TABLAS

TABLAS	Pág.
1 Clasificación Taxonómica del Liquen <i>Cladonia rappii</i>	16
2 Susceptibilidad de <i>Candida sp.</i> , al fluconazol según el Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) (Documento M27-A3)	22
3 Susceptibilidad de <i>Candida sp.</i> , al fluconazol. Puntos de corte recomendados por el CLSI.	23
4 Clasificación Taxonómica de las Levaduras Pertenecientes al Género <i>Candida</i> .	23
5 Operacionalización de las Variables según los Objetivos Específicos	28
6 Distribución de los Resultados de la Actividad Antifúngica del Extracto de <i>C. rappii</i> contra <i>C. albicans</i> según las Técnicas de Microgota y de Difusión con Discos, en el primer y segundo ensayo	40
7 Distribución de los Resultados de la CIM del Extracto de <i>C. rappii</i> contra <i>C. albicans</i> según las Técnicas de Microgota y de Difusión con Discos, en el primer y segundo ensayo.	42

ÍNDICE DE ESQUEMAS

	ESQUEMAS	Pág.
1	Flujograma de la Preparación de la Solución Madre a Partir del Liquen Recolectado	33
2	Flujograma de la Preparación del Inóculo para las Pruebas Cualitativa y Cuantitativa.	34
3	Flujograma de la Prueba de Actividad Antifúngica y de CIM por la Técnica de Microgota	38
4	Flujograma de la Prueba de Actividad Antifúngica y de CIM por la Técnica de Difusión con Discos	39

www.bdigital.ula.ve

	FIGURAS	Pág.
1	<i>Cladonia rappii</i>	17
2	Técnicas de Microgota y de Difusión con Discos para la Determinación de la CIM de la Cepa LM-66 (SDD al fluconazol)	42

www.bdigital.ula.ve

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
LABORATORIO DE MICOLOGÍA
LINEA DE INVESTIGACIÓN: ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE *Cladonia rappii* CONTRA *Candida albicans*
AISLADAS A PARTIR DE MUESTRAS CLÍNICAS, SENSIBLES Y
RESISTENTES AL FLUCONAZOL

Trabajo Especial de Grado.

Autor: Br. Albany Antúnez

Tutor: Prof. (a). Celina Pérez de Salazar

RESÚMEN

Los líquenes son una simbiosis entre un hongo y un alga. Han sido usados en la medicina tradicional para el tratamiento de patologías en piel, aparato gastrointestinal, entre otros. Esto ha motivado a investigar las diversas propiedades biológicas naturales que poseen, entre ellas la actividad antifúngica. El objetivo de este estudio fue determinar la actividad antifúngica del extracto liquénico de *Cladonia rappii* contra *Candida albicans* aisladas de muestras clínicas, con sensibilidad conocida al fluconazol. **Metodología:** La investigación tuvo un enfoque cuantitativo, de campo, no experimental. Al extracto etanólico de *Cladonia rappii* se le aplicaron pruebas tanto cualitativa como cuantitativa, por las técnicas de microgota y difusión con disco, para la determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de 5 levaduras de la especie *Candida albicans* aisladas de hemocultivo, consideradas sensible (1), sensible dosis dependiente (3) y resistente (1) al fluconazol. **Resultados:** En la prueba cualitativa se observó que 4/5 cepas resultaron inhibidas con el extracto. Sólo 1 cepa sensible dosis dependiente al fluconazol no fue inhibida por el extracto. La CIM estuvo entre 25 y 12,5µg/µL, siendo las de menor concentración 2/3 cepas sensible dosis dependiente y la cepa resistente. Las cepas controles de *C. albicans* y *C. parapsilosis* se inhibieron con 25µg/µL del extracto. La inhibición se evidenció mayormente por la técnica de Microgota. **Conclusiones:** El extracto de *Cladonia* presenta actividad antifúngica contra *Candida albicans*. La técnica de Microgota resultó ser la técnica más reproducible.

Palabras clave: Actividad antifúngica, líquenes, *Cladonia rappii*, *Candida*, actividad biológica, productos naturales.

DEDICATORIA

A **Dios** Todopoderoso y a la **Virgen del Carmen** por guiarme y darme la fortaleza y la sabiduría para cumplir mis metas.

A mis padres **Mariela** y **Antonio** por ser mi ejemplo a seguir y mis pilares fundamentales a lo largo de mi crecimiento personal. Los amo con toda mi corazón.

A cada uno de mis hermanos, **Yodalys**, **Mary**, **Ronald**, **Andreina**, **Adriarvys**, **Adrián** y **Andrés** por ser mi inspiración día a día y mi mayor orgullo. No pude tener mejores hermanos que ustedes, los amo.

A la Familia **Antunez**, **Ballestero** y **Solarte**, por su apoyo incondicional y sincero. Siempre están en mi corazón.

A mi Tutora **Celina Pérez de Salazar**, por sus grandes enseñanzas académicas, de vida y por su amistad.

A ustedes dedico este trabajo científico

Dios los Bendiga y Proteja Siempre

ALBANY

AGRADECIMIENTOS

Gracias Dios Todopoderoso, gracias Virgen del Carmen, por ser mi fortaleza espiritual y mantenerme en el camino correcto.

A la Prof. Celina Pérez de Salazar por sus consejos, calidad humana, amistad, paciencia y ayuda profesional. Muchas gracias.

A la Farm. Claudia Plaza por ayudarme en este camino académico y compartir conmigo todos sus conocimientos; por su amistad. Muchas gracias.

Al personal del Laboratorio de Micología “Dr. Corrado Capretti” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, por su ayuda incondicional y su espíritu de enseñanza.

A todos mis amigos y compañeros de estudio, por brindarme su amistad sincera.

GRACIAS

ALBANY

INTRODUCCIÓN

Los líquenes son organismos formados por una simbiosis entre un hongo y un organismo fotosintético, ya sea una cianobacteria o un alga. Estos se han usado desde la antigüedad en la medicina tradicional para el tratamiento de patologías gastrointestinales, respiratorias, de piel, entre otras. Además, se sabe que los líquenes toleran condiciones climatológicas y nutricionales adversas, razones por la cual se ha motivado el estudio de las diversas propiedades biológicas naturales que poseen, entre las que se encuentra la actividad antifúngica (Yavuz, 2012).

Desde inicios del siglo XX, se han realizado estudios de actividades biológicas a partir de diversos compuestos naturales destinados a la búsqueda de nuevos principios activos, como en el caso de los líquenes. También, se han dedicado esfuerzos a evaluar el comportamiento de las levaduras aisladas de muestras clínicas ante los antifúngicos comerciales, como parte de las funciones de vigilancia epidemiológica con el fin de detectar cepas resistentes a los mismos (Yucel y cols., 2007; Tiwari y cols., 2011).

Gracias a estas investigaciones, se han reportado especies de levaduras como *Candida krusei*, intrínsecamente resistentes al fluconazol (resistencia primaria). También, se han reportado cepas de *Candida* con resistencia secundaria, desarrollada por la administración de antifúngicos comerciales (Manzano- Gayosso y cols., 2008; Tapia, 2009).

La justificación de realizar esta investigación estuvo basada en tres aspectos fundamentales: teóricos, procedimentales y de aplicación. El aspecto teórico buscó revisar lo concerniente a la actividad antifúngica de los líquenes, en particular de la especie *Cladonia rappii*, y su asociación con cepas de levaduras del género *Candida*. El aspecto procedimental permitió contribuir al conocimiento de la metodología que se puede utilizar para evaluar la actividad antifúngica de líquenes ante cepas de *Candida*. La implicación práctica de este, permitió dar aportes en relación a la

actividad antifúngica de estas especies de líquenes asociada a cepas de *Candida* provenientes de aislados clínicos.

La metodología del presente estudio partió de la experiencia anteriormente obtenida en el Laboratorio de Micología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, con la Farm. Claudia Plaza y el Dr. Gerardo Medina, en el estudio de diversas especies de líquenes, entre ellas *C. rappii*, al evaluar la actividad antifúngica frente a cepas controles de la American Type Culture Collection (ATCC). Para esta investigación, se utilizaron cepas de *Candida* aisladas a partir de hemocultivo.

El presente trabajo está estructurado en tres capítulos. El Capítulo I, denominado El Problema, el cual contempla Planteamiento del Problema, Justificación e Importancia, Objetivos General y Específicos, Alcances y limitaciones de la Investigación. El Capítulo II, llamado Marco Teórico, conformado por Trabajos Previos, Bases Teóricas, Definición de Términos, Antecedentes Históricos, Operacionalización de las Variables y Sistema de Variables e Hipótesis. El Capítulo III, titulado Marco Metodológico, que abarca los siguientes aspectos: Enfoque de la Investigación, Tipo y Diseño de la Investigación, Población y Muestra, Metodología de la Investigación y Diseño de Análisis. Capítulo IV, denominado Resultados que abarcan Resultados y Discusión de Resultados y por último el Capítulo V donde se presentan las Conclusiones y Recomendaciones.

El propósito de este estudio fue evaluar la actividad antifúngica del extracto etanólico del líquen *Cladonia rappii* contra cepas de *Candida* aisladas a partir de muestras clínicas.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del Problema

Los líquenes constituyen organismos conformados por una simbiosis entre un hongo y un alga o una cianobacteria. Esta simbiosis les ha permitido tolerar condiciones adversas del ambiente. Además, desde generaciones atrás se les conocen que tienen facultades medicinales por lo cual se han usado para el tratamiento de las diarreas, infecciones en piel, entre otras. Esto ha llevado a incentivar el estudio de las diversas propiedades que naturalmente poseen, por lo que se han dedicado esfuerzos a evaluar las diversas actividades que exhiben (Ingólfssdóttir, 2002; Oksanen, 2006; Illana- Esteban, 2009; Verma, Behera, Parizadeh y Sharma, 2011).

Desde los años 40, se han realizado pruebas de actividades antimicrobianas, que llevaron posteriormente a generar el estudio de las actividades antifúngicas. Esta actividad se refiere a la capacidad que tienen los extractos crudos, en forma de un homogenato, o alguno de sus metabolitos secundarios purificados, para inhibir la reproducción de alguna levadura o moho presente en el cultivo (Halama y Van Haluwin, 2004; Boustie y Grube, 2005; Gregori Valdés, 2005; Mitrović y cols., 2011; Illana-Esteban, 2012).

Es así como Ranković y colaboradores, en el año 2011, publicaron un trabajo realizado en Europa en el cual comparaban la actividad antifúngica de los extractos cetónicos de tres especies de líquenes *Cladonia furcata*, *Lecanora atra* y *L. muralis* contra 10 especies de hongos entre ellos cepas control de *C. albicans* utilizando el método de microdilución en caldo, para la determinación de la Concentración

Inhibitoria Mínima (CIM). *C. furcata* resultó ser la especie liquénica con mayor actividad antifúngica, reportando la menor CIM de 6,25 mg/mL con *C. albicans* (Ranković y cols., 2011).

Con respecto a las levaduras del género *Candida*, estas forman parte de la flora microbiana normal endógena que poseen los humanos, por tanto colonizan distintas zonas del cuerpo, como la región orofaríngea, las vías respiratorias superiores, el tracto gastrointestinal, el aparato genitourinario y la piel, pudiéndose aislar a partir de muestras de orina, secreciones vaginales, secreciones respiratorias, entre otros. A partir de la colonización de dichas superficies, estas pueden eventualmente proliferar y causar infecciones diversas al invadir órganos y tejidos, comprometiendo piel, aparato respiratorio e incluso involucrar el sistema circulatorio y originar candidemias (Eggimann, Garbino y Pittet, 2003; Ostrosky y Pappas, 2006).

Dentro del género *Candida*, *C. albicans* es considerada la especie mayormente aislada en las diversas muestras clínicas, seguida de las especies *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* y *C. krusei*. El uso frecuente de los antifúngicos, en particular los del grupo de los azoles, ha llevado a la aparición de cepas de *Candida* con resistencia a dichos fármacos (Mujica, Finquelievich, Jewtuchowicz y Iovannitti, 2004; Dolande y cols., 2008; Johnson, 2008; Gasparoto y cols., 2009; Llovera-Suárez, 2010).

En tal sentido, diversos estudios han reportado levaduras pertenecientes al género *Candida* entre los rangos de sensibles dosis dependiente (SDD) y resistentes al fluconazol. Entre ellos, se han observado especies de *C. albicans* resistentes a fluconazol entre un 1,1 y 14,29%, y consideradas SDD entre un 3 y 9,53%; *C. tropicalis* resistente al fluconazol en un 6,3%; *C. glabrata* resistente en un 11-100%; *C. parapsilosis* resistente en el 1%. *C. krusei* es conocida como intrínsecamente resistente al fluconazol (De Bedout y cols., 2003; Fernández y cols., 2007; Dolande y cols., 2008; Llovera-Suarez, 2010).

En la actualidad, la industria farmacéutica busca investigar nuevos principios activos a partir de extractos naturales con actividades biológicas que pudieran servir

de alternativas terapéuticas, ante las dificultades de tratar las infecciones por hongos ya sea en la industria agroalimentaria, o como en el caso de la actividad médica asistencial, debido al aislamiento de cepas de levaduras del género *Candida* con resistencia a los antifúngicos comerciales como es el fluconazol (Mitrovic y cols., 2011).

En base a esto, los extractos líquénicos se han sometido a pruebas de actividad antifúngica, en particular con levaduras del género *Candida*, con el objeto de buscar principios activos con actividad farmacológica que pudieran resultar en nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de entidades micóticas (Tay y cols., 2004; Haek-Sook y cols., 2009; Mitrovic y cols., 2011).

Por lo antes expuesto se plantean las siguientes interrogantes:

- ¿Cuál es la actividad antifúngica de la especie de liquen *C. rappii* contra *Candida albicans* aisladas a partir de muestras clínicas?
- ¿Cuál es la CIM de la especie de liquen *C. rappii* contra *Candida albicans* aisladas a partir de muestras clínicas?
- ¿Cuál es la variación en la respuesta de la actividad antifúngica del liquen *C. rappii* contra *Candida albicans* aisladas a partir de muestras clínicas, siendo sensibles o resistentes al fluconazol?
- ¿Cuál es la técnica, entre la técnica de Microgota y la de difusión en disco, que con mayor frecuencia pone en evidencia la CIM de *C. albicans* por parte del extracto de *C. rappii*?

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Determinar la actividad antifúngica del extracto liquénico de *Cladonia rappii* contra *Candida albicans* aisladas a partir de muestras clínicas, con sensibilidad conocida al fluconazol.

Objetivos Específicos

- Definir la actividad antifúngica de *C. rappii* ante *C. albicans* provenientes de muestras clínicas.
- Definir la CIM del extracto liquénico *C. rappii* con *C. albicans* aisladas de muestras clínicas, en relación a la sensibilidad o no al fluconazol.
- Comparar las técnicas de Microgota y de difusión en disco para la determinación de la CIM del liquen *C. rappii* con *C. albicans* aisladas de muestras clínicas.

Justificación e Importancia de la Investigación

El presente estudio permitió realizar una búsqueda bibliohemerográfica asociada a la actividad antifúngica del extracto líquénico, en particular de la especie de *Cladonia rappii*, con levaduras del género *Candida*, con el fin de adquirir conocimientos relacionados al tema. Los aspectos metodológicos permitieron adquirir experiencia en la realización de las técnicas que evaluaron la susceptibilidad antifúngica de sustancias naturales biológicamente activas, ante cepas de *Candida*. La aplicación práctica de este, permitió brindar aportes concernientes a la actividad antifúngica de esta especie de líquen contra levaduras del género *Candida* aisladas a partir de muestras clínicas, lo cual a su vez generó un aporte social pudiendo servir como antecedente para futuros estudios en el área de la industria farmacéutica y agroalimentaria.

Alcances y Limitaciones de la Investigación

Esta investigación permitió familiarizar a la comunidad científica y afines con un tema como las actividades biológicas de productos naturales, en particular la actividad antifúngica de los extractos provenientes de líquenes y la relación que pudiera existir con distintas especies de levaduras del género *Candida*, aisladas a partir de muestras clínicas. Posteriormente, en base a los datos obtenidos, se estableció una correlación entre las variables que permitieron evaluar las hipótesis planteadas. Para la realización del presente estudio, no existió limitación alguna para llevar a cabo el mismo. En la fase experimental, se utilizaron recursos ya existentes en el Laboratorio de Biotecnología, Instituto de Investigaciones, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, de la ULA, bajo la asesoría de la Farm. Claudia Plaza y el Dr. Gerardo Medina, para el procesamiento del líquen y la obtención del extracto; y además, se usaron recursos presentes en el Laboratorio de Micología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, de la ULA, para la realización de las pruebas de actividad antifúngica. Esta investigación se consideró factible.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos Previos

Ranković y cols. (2009), publicaron su estudio en la revista *Biología*, titulado Antimicrobial activity of extracts of the lichens *Cladonia furcata*, *Parmelia caperata*, *P. pertusa*, *Hypogymnia physodes* and *Umbilicaria polyphylla*. El objetivo fue investigar la actividad antimicrobiana de extractos en los solventes acetona, metanol y agua, de 5 especies de líquenes. Entre los líquenes estudiados, se evaluó *C. furcata* y su actividad contra diversos microorganismos entre los que se encuentra *C. albicans* y diversas especies de mohos. El enfoque de la investigación fue de tipo cuantitativo, con un diseño no experimental, de campo, explicativo. Los extractos fueron obtenidos por medio de las columnas de Soxhlet y luego filtrados; posteriormente, los extractos acuosos se concentraron por evaporación en baño de María, y los extractos en acetona o en etanol concentrados con un rotor-evaporador. Dichos autores realizaron dos técnicas para evaluar la actividad antifúngica: primero usaron la técnica de difusión con disco para constatar el halo de inhibición que produce el extracto y posteriormente, utilizaron la técnica de macrodilución para la determinación de la CIM. Estos prepararon un inóculo a 10^6 UFC/mL y fue sembrado en la superficie del medio agar Sabouraud. En la técnica de difusión con disco, se aplicaron discos de papel de filtro, de 7 mm de diámetro, los cuales se impregnaron con 15 μ L del extracto a una concentración de 50mg/mL. Los autores observaron que al someter *C. albicans* el extracto acuoso, no se produjo halo de inhibición, pero con los extractos en acetona y en etanol, los halos fueron de 10mm de diámetro; halos estos considerados de menor tamaño en comparación con los obtenidos con otros hongos evaluados.

Sin embargo, la CIM resultó ser mayor con *Candida albicans* (6,2 mg/mL vs 25 mg/mL) tanto en acetona como en etanol, al comparar lo observado con los otros hongos estudiados. Este trabajo respaldó la investigación debido a que evaluaron la actividad antifúngica de un líquen correspondiente al género *Cladonia* ante levaduras de la especie *C. albicans* (Ranković, Mišić y Sukdolak, 2009).

Ranković y colaboradores (2010), llevaron a cabo una investigación titulada: Antioxidant and Antimicrobial Activity of Some Lichen Species, cuyos resultados fueron publicados en la revista *Microbiology*. El objetivo de este estudio fue explorar *in vitro* la actividad antioxidante, el contenido total de fenoles y el potencial de reducción así como la actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos de los líquenes *Cetraria pinastri*, *Cladonia digitata*, *Cladonia fimbriata*, *Fulgensia fulgens*, *Ochrolechia parella* y *Parmelia crinita*. El enfoque de la investigación fue de tipo cuantitativo, con un diseño no experimental, de campo, explicativo. El experimento consistió en evaluar varias actividades biológicas entre las que se encontraba la actividad antifúngica de extractos metanólicos de dichos líquenes contra 17 microorganismos, tanto bacterias, mohos como levaduras, entre ellas *C. albicans* (ATCC 10259). Estos microorganismos provenían de la colección del Laboratorio perteneciente al Departamento de Biología de la Universidad de Kragujevac (Serbia). Los hongos se conservaron en agar Sabouraud dextrosa a 4°C y se subcultivaron cada 15 días. Los extractos metanólicos fueron preparados a partir de 100g de líquenes, los cuales fueron pulverizados y secados. Posteriormente, se le agregó 1 L de metanol y se procesaron en un extractor de Soxhlet durante 7 horas. Luego, el extracto fue filtrado usando papel de filtro Whatman N° 1 y concentrado bajo presión reducida en un rotor- evaporador. Los extractos secos se almacenaron a -18°C hasta el momento que se utilizaron en las pruebas. Para la aplicación de la prueba, los extractos secos de los líquenes fueron disueltos en metanol hasta una concentración final de 30 mg/mL y esterilizados por filtración con Miliporos de 0.45µ. En el caso de *C. albicans*, esta especie fue cultivada en medio agar papa dextrosa, a 30°C por 48 horas. Para la preparación del inóculo, se utilizó un espectrofotómetro a 530 nm, para ajustar la

densidad a 0,5 McFarland (10^6 UFC/mL). De este inóculo se usaron 100 μ L que se mezclaron con agar Sabouraud dextrosa y se colocaron en placas hasta su solidificación.

Para estudiar la actividad antimicrobiana los autores aplicaron la técnica de difusión con disco, con papel de filtro (6mm de diámetro) impregnados con 10 μ L de una solución preparada a base de 10 μ L de metanol y el extracto liquénico seco, equivaliendo a 300 μ g/disco. Estos discos fueron colocados sobre la superficie del medio de cultivo con el inóculo previamente incluido. Las placas se incubaron a 37 °C por 72 horas. El metanol fue utilizado como control negativo. En el caso de las levaduras se utilizó ketoconazol como control positivo. La actividad antimicrobiana se evaluó mediante la medición de la zona de inhibición contra los microorganismos probados. Luego, para la determinación de la CIM, estos autores utilizaron la técnica de macrodilución, con el extracto liquénico en un rango de 30 a 0,12 mg/mL, disueltos en DMSO. Para los hongos, se realizaron diluciones seriadas del extracto evaluado, en el medio Sabouraud dextrosa en caldo. Se definió como CIM la última dilución con ausencia de crecimiento visible del microorganismo. Los resultados obtenidos con *C. albicans*, mostraron que el extracto metanólico de *C. fimbriata* presentó mayor actividad antifúngica (18 mm) y una CIM de 7 mg/mL que con respecto al extracto de *C. digitata*, el cual no mostró actividad frente a dicha levadura (Rankovič, Rankovič y Maric, 2010). Este trabajo apoyó la presente investigación debido a que se utilizaron dos especies del mismo género liquénico evaluado en el presente estudio

Açıkgöz y colaboradores (2013) publicaron un trabajo en la revista *Zeitschrift für Naturforschung* titulado Screening of Antimicrobial Activity and Cytotoxic Effects of two *Cladonia* Species. El objetivo del mismo fue evaluar la actividad antimicrobiana de extractos metanólicos y en cloroformo de *Cladonia rangiformis* y *Cladonia convoluta* contra algunas bacterias Gram negativas, bacterias Gram positivas y *C. albicans*, al igual que la actividad citotóxica de estos. El estudio tuvo un enfoque cuantitativo, con un diseño no experimental, de campo, explicativo. Para ello determinaron la actividad antifúngica y la CIM por medio de la técnica de difusión

con disco. Los líquenes fueron secados a temperatura ambiente, triturados y posteriormente sometidos al Soxhlet, para obtener el extracto. Luego, estos se filtraron usando papel de filtro (Whatman N° 1) y se colocaron en un rotor-evaporador para su desecación. Las levaduras estudiadas se repicaron en caldo nutritivo (NB-No. 3, para microbiología, Alemania) y se incubaron a 37°C por 48 horas. Posteriormente, se ajustaron los inóculos a 0,5 McFarland y se sembraron en la superficie del medio agarizado de Müller-Hinton (Sigma-Aldrich, Alemania). La determinación de la actividad antifúngica fue realizada con los extractos liquénicos disueltos en solventes orgánicos (metanol y cloroformo) a una concentración final de 16,6 mg/ml y 1,5 mg/ml, respectivamente. Los discos de papel de filtro, de 6 mm de diámetro (Whatman N° 1), fueron impregnados con 20 µL de la solución del extracto, permitiendo la evaporación del solvente durante su aplicación. Las placas fueron incubadas por 24 horas y luego, se midieron los diámetros de las zonas de inhibición en milímetros. Posteriormente, con el fin de determinar la CIM, estos autores realizaron diluciones seriadas 1 a 10 veces, a partir de las soluciones anteriormente mencionadas. Los solventes fueron usados como controles negativos; y usaron el fluconazol como control positivo en el caso del estudio con las levaduras. Los resultados obtenidos mostraron que los extractos de *Cladonia convoluta* en cloroformo presentaron actividad antifúngica (12 mm), la cual no fue observada con los extractos metanólicos. Sin embargo, la especie *C. rangiformis* resultó con mayor actividad antifúngica con el extracto metanólico (17 mm) en comparación con el extracto en cloroformo (12 mm). Por otra parte, la CIM fue menor con el extracto de *C. rangiformis* en cloroformo (9,6 µg/mL), seguida del extracto de *C. convoluta* (12 µg/mL) y el extracto metanólico de *C. rangiformis* (161 µg/mL) (Açıkgöz, Karaltı, Ersöz, Coşkun, Çobanoğlu y Sesal, 2013). Este trabajo apoyó la presente investigación debido a que se utilizó el mismo género liquénico y una metodología similar con la levadura *C. albicans*.

Plaza y colaboradores, en el año 2015, realizaron en la Sección de Biotecnología del Instituto de Investigaciones y en el Laboratorio de Micología, de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la U.L.A., la evaluación de la actividad antifúngica de

diversos líquenes provenientes del Estado Mérida, entre los que estaba *Cladonia rappii* (datos no publicados). El estudio fue de tipo cuantitativo, diseño no experimental, de campo, descriptivo. El objetivo fue comprobar la actividad antifúngica del extracto liquénico. Dichos autores realizaron la desecación de las muestras y posteriormente las sometieron a maceración con diversos solventes orgánicos como agua, etanol y diclorometano. El extracto obtenido se separó por filtración. Para el estudio, utilizaron 5 especies del género *Candida*, pertenecientes a la American Type Culture Collection (ATCC), las cuales fueron *Candida albicans* (ATCC 90028), *Candida glabrata* (ATCC 90030), *Candida krusei* (ATCC 6258), *Candida tropicalis* (ATCC 50628), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) y además, una cepa de *Cryptococcus neoformans*, aislada a partir de una muestra clínica. La actividad antifúngica cualitativa se evaluó por 4 técnicas: aplicación directa del extracto seco, microgota, difusión con discos y difusión con pozos. Posteriormente, la actividad cuantitativa fue realizada con la determinación de la CIM por la técnica de microdilución. Dichos autores encontraron que el extracto de *C. rappii* en etanol, permitió poner en evidencia la actividad antifúngica de dichas especies de líquenes con todas las 5 especies de *Candida* ATCC evaluadas (Datos no publicados).

Antecedentes Históricos o Epistemológicos

Desde tiempos antiguos los extractos naturales han sido usados en el área de la cosmetología y textil. En este sentido, un ejemplo de ello constituyen los líquenes, usados por los romanos y los egipcios como colorantes para teñir las togas. También, estos han servido como insumo para la elaboración de perfumes y como constituyente de alimentos para animales y humanos, como ha sido el caso de *C. rangiferina* (Muggia, Schmitt y Grube, 2009).

Sin embargo, uno de los grandes aportes de los líquenes ha sido su aplicación en la medicina natural y tradicional para el tratamiento de las enfermedades de animales y de seres humanos, como por ejemplo en infecciones bacterianas y fúngicas de la mucosa oral y lengua, como es la candidiasis. En este sentido, algunas propiedades antimicrobianas y antisépticas de los extractos liquénicos se han conocido desde hace siglos por distintas civilizaciones del mundo, como la china y la egipcia. Posteriormente, al purificar los compuestos de estos extractos liquénicos, se descubrió en el siglo XVII al ácido úsnico, como principal metabolito secundario. Desde entonces, este se ha considerado un potente inhibidor de las bacterias Gram positivas, razón por la cual uno de los usos del ácido úsnico ha sido en el tratamiento de infecciones bacterianas en piel (Francolini y cols., 2004; Illana-Esteban, 2012).

En el año 1944, Burkholder y otros, se dedicaron a la evaluación, comprobación y comparación de la actividad antibacteriana de diversos extractos de líquenes, entre ellos varios ejemplares pertenecientes al género *Cladonia*. Siguiendo este orden de ideas, varios años después, en el 2006 en América, Ribeiro y otros, realizaron un estudio en el cual reportaron que los extractos liquénicos provenientes de *C. substellata*, presentaban actividad antifúngica frente a varios hongos patógenos, aunque no fue así contra la cepa de *C. albicans* estudiada.

Para el año 2009, Rankovič, Mišić y Sukdolak se dedicaron al estudio de la actividad antifúngica de los extractos provenientes del liquen *C. furcata* con

levaduras de la especie *C. albicans*, cuyos resultados mostraron que estos líquenes pueden ser potentes inhibidores de levaduras, obteniéndose una CIM de 6,25mg/mL.

En base a esto, existe experiencia diversa al evaluar la actividad antifúngica de extractos del género *Cladonia*. Aunque, cabe mencionar que hasta los momentos no se han encontrado reportes sobre la actividad antifúngica específicamente con la especie liquénica *C. rappii* que se evaluó en el presente trabajo.

Bases Teóricas

Taxonomía y Generalidades de Los Líquenes.

El término liquen es una palabra de origen griego que significa musgo de árbol (Coutiño y Montañez, 2000). Representan el resultado de una compleja unión simbiótica entre un hongo conocido como organismo micobionte, y uno o varios componentes de algas o cianobacterias conocidos como organismo fotobionte, que además se comporta como fotoautótrofo (Ingólfssdóttir, 2002; Oksanen, 2006; Illana-Esteban, 2009; Verma y cols., 2011).

Según Oksanen (2006), los líquenes pueden ser considerados como un ecosistema donde la interacción de sus componentes, integrados por dos o más organismos, da origen a una forma de vida distinta a la que tienen cuando son cultivados por separado; esta interacción les permite una mayor probabilidad de supervivencia.

En este sentido, debido a que el organismo fúngico es único, éste domina la asociación y constituye la razón por la cual los líquenes son considerados un tipo de hongo, llamados “hongos liquenizados”. Es por ello que taxonómicamente los líquenes se ubican en la división a la cual pertenece el organismo micobionte. Es así como, la mayoría de los líquenes se clasifican dentro de la división *Ascomycota*, en las clases *Arthoniomycetes*, *Eurotiomycetes* o *Lecanoromycetes*, y en menor

proporción, se encuentran perteneciendo a la división *Basidiomycota* (Oksanen, 2006; Lücking, Rivas-Plata, Chaves, Umaña y Sipman, 2009).

Por tanto, la identificación depende de las características macroscópicas y microscópicas del talo, de las estructuras que las sujetan al sustrato, de los cuerpos fructíferos y los elementos de reproducción que presentan. Por otra parte, en cuanto al organismo fotobionte, este posee su propio nombre científico, pudiendo ser algas verdes (géneros *Trebouxia*, *Coccomyxa*) o algas verde-azuladas (géneros *Nostoc*, *Scytonema*) (Ramírez y Cano, 2005; Oksanen, 2006; Farci y cols., 2011).

En los líquenes, las estructuras del hongo rodean a las algas o a las cianobacterias. De acuerdo al aspecto externo y forma de crecimiento que presentan los líquenes, estos se agrupan en tres grandes grupos: en forma de costra denominados Crustáceos, en forma laminar que reciben el nombre de Foliáceos, o en forma de un diminuto arbusto llamados Fruticulosos. Además, dentro de estos tres grupos, existen otras morfologías como los líquenes compuestos o dimórficos, los gelatinosos, los escumulosos, los pulverulentos, entre otros (Farci y cols., 2011).

De acuerdo a su distribución, los líquenes son organismos cosmopolitas y se encuentran mundialmente en lugares con condiciones climatológicas extremas, tales como regiones desérticas, trópicos, bosques, zonas polares e incluso, en el mar. Un ejemplo de esto es la Antártida marítima, y en donde habitan más de 350 especies de líquenes, pudiendo alcanzar a vivir hasta miles de años. Hecho que ha llamado la atención (Sancho y Pintado, 2011).

En estos lugares, los mismos se encuentran sobre superficies diversas, desde rocas, hasta corteza de árboles, troncos caídos, suelos, superficies vegetales y tejidos muertos de animales, como la concha de las tortugas y el exoesqueleto de los insectos, entre otros (Coutiño y Montañez, 2000; Farci y cols., 2011).

Sin embargo, su distribución en el ambiente se ve afectada por varios factores, entre ellos: la disposición de agua, la temperatura, la luz y la contaminación atmosférica, los cuales pueden romper el balance que existe entre los componentes de

la simbiosis. Razón por la cual, los líquenes son utilizados como bioindicadores de la contaminación ambiental (Canseco, Anzen y Franken, 2011; Sancho y Pintado, 2011).

A nivel mundial se han llegado a identificar unas 17.500 especies de líquenes (Ramírez y Cano, 2005; Oksanen, 2006; Farci y cols., 2011) y en Venezuela, existen unas 1.300 especies, pertenecientes a 64 familias diferentes, recolectadas principalmente en los estados Bolívar (1.431 muestras), Amazonas (1.259 muestras), Mérida (1.238 muestras), Distrito Capital (675 muestras) y Miranda (664 muestras) (Feuerer, 2008; Hernández, 2012).

Taxonomía y Morfología del Liquen *Cladonia rappii*

La clasificación taxonómica de la especie de liquen *C. rappii* al cual se le dedicó el presente estudio, se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación Taxonómica del Liquen *C. rappii*

Reino	Fungi
División	<i>Ascomycota</i>
Clase	<i>Lecanoromycetes</i>
Familia	Cladoniaceae
Género	<i>Cladonia</i>
Especie	<i>C. rappii</i>

Fuente: Cannon y Kirk, 2007.

Los líquenes representantes de la familia Cladoniaceae (Fig. 1), constan de un talo, por lo general dimórfico, con un talo primario crustáceo, folioso o escumuloso, que consta de prolongaciones sólidas o huecas. Algunas veces presentan soledios. Los apotecios son lobulados, sin un margen bien diferenciado, generalmente de colores brillantes. Forman ascos cilíndricos claviformes, engrosados en el ápice en forma de

“J”. Las ascosporas son aceptadas e hialinas, siendo el género *Cladonia* el más abundante dentro de la familia Cladoniaceae (Cannon y Kirk, 2007).



Fig. 1 *Cladonia rappii*
Fuente: Antunez, 2015

Extractos Liquénicos

Para evaluar las actividades biológicas de los líquenes, se puede iniciar el estudio a partir de la obtención de los extractos liquénicos. Estos están conformados por los metabolitos extracelulares, de bajo peso molecular, que se depositan en forma de cristales sobre la superficie de las hifas y son los responsables de las diversas actividades biológicas (Yilmaz, Ozdemir, Tay y Kivanc, 2004; Baral y Maharjan, 2011).

Al respecto, una manera de obtener estos compuestos, es en forma de un homogenato o también llamados extractos crudos. Para esto, los líquenes se pulverizan y se dejan macerar por un período de tiempo determinado en solventes orgánicos, como pueden ser en: agua, acetona, etanol, diclorometano, cloroformo, dietil-éter, entre otros. Luego de cumplido el plazo del macerado, se pueden separar por las técnicas de filtración para obtener el extracto líquido, del resto del liquen en su forma sólida, o en su defecto, por medio del uso de columnas con el extractor Soxhlet, que separa los componentes por condensación según su polaridad. En un paso posterior, el extracto líquido derivado de la maceración con agua (extracto acuoso), se envasa hasta el momento del estudio. Los extractos líquidos logrados luego de la maceración con acetona, etanol, diclorometano, cloroformo, dietil-éter, entre otros, se pueden someter a la desecación, a temperatura ambiente o con ayuda

de un rotor-evaporador, con la finalidad de evaporar estos solventes y concentrar el extracto. Así, este desecado estará listo para ser diluido en un solvente inerte como el dimetilsulfóxido (DMSO), para su posterior estudio (Yilmaz y cols., 2004; Baral y Maharjan, 2011).

De este modo, estos extractos crudos en forma de homogenato, constituyen una forma sencilla y económica, de evaluar de manera global el extracto natural producido por los líquenes. Además, representan una fase previa para la obtención de metabolitos secundarios específicos, responsables de las propiedades biológicas naturales. Cabe mencionar que los metabolitos primarios, son compuestos que se encargan de la estructura y metabolismo de los líquenes, los cuales pueden estar conformados por lípidos, carbohidratos, proteínas, entre otros compuestos orgánicos (Mitrovic y cols., 2011).

A partir de estos extractos crudos u homogenatos, se podría efectuar un paso siguiente, más laborioso, el cual busca la separación de cada uno de sus componentes, con el fin de purificarlos y así obtener los metabolitos secundarios o principios activos que conforman dicho extracto. Para esto, se pueden realizar técnicas cromatográficas y electroforéticas, con el objeto de lograr separar cada uno de los compuestos químicos estructurales y funcionalmente complejos, diferentes a los producidos por las plantas superiores. Es así como hoy en día se conocen alrededor de 800 metabolitos, entre los que se pueden mencionar: ácido úsnico, antranorin, ácido fumarprotocetrárico, depsonas, dépsidos, depsidonas, xantonas, dibenzofuranos, derivados terpénicos y ácido pulvínico, entre otros, los cuales son responsables de las diversas actividades biológicas de los líquenes (Yilmaz y cols., 2004; Chand, Singh y Rai, 2009; Muggia y cols., 2009; Rankovič, 2011; Verma y cols., 2011).

En la actualidad, a nivel mundial, se realizan estudios de investigación con líquenes y sus productos metabólicos, para evaluar sus actividades antioxidantes, antiproliferativas, mutagénicas y antimutagénicas, citotóxicas, antiinflamatorias, antipiréticas, antiparasitarias, antibacterianas y antifúngicas (Tiwari y cols., 2011; Shahi, Shahi y Upreti, 2012; Thadani, Choudhary, Khan y Karunaratne, 2012).

Técnicas para Evaluar la Actividad Antifúngica de los Líquenes

La actividad antifúngica se define como la capacidad que tienen una o varias sustancias o compuestos de producir una alteración en la estructura de la célula fúngica, que consigue inhibir su desarrollo alterando su posibilidad de supervivencia directa o indirectamente. La evaluación de la susceptibilidad antifúngica *in vitro* de levaduras se realiza al confrontar la levadura en estudio con una concentración determinada de un antifúngico o de un extracto liquénico, como es el caso que nos compete en el presente estudio, en búsqueda de algún grado de inhibición del crecimiento de la cepa. Entre los géneros de líquenes conocidos por sus propiedades antifúngicas, se encuentra el género *Cladonia*, el cual ha demostrado tener efecto inhibidor contra levaduras del género *Candida* (Gregorí Valdés, 2005; Ribeiro y cols., 2006; Rankovič y cols., 2011).

Para tal efecto, se han descrito diversas técnicas que buscan evaluar la actividad antifúngica de los mismos. Una de ellas es la descrita por Hae-Sook y colaboradores en el año 2009, en la cual en el medio agar Extracto de Malta, sembraron cuerpos fructíferos obtenidos de los líquenes, incubados por unos 2-3 meses. Luego, se observaron al microscopio la presencia de hifas y esporas. Si estaban presentes, se realizaba un subcultivo. Posteriormente, unos 2-3 meses antes de la prueba, se colocó un cuerpo fructífero que había sido subcultivado, a un lado de una placa de 6cm de diámetro, contentiva de dicho medio. Posterior a los 2-3 meses de incubación, se sembró el hongo (en este caso fue *Collectotrichium*) en el centro de la placa. Se incubó nuevamente por 7 días, y luego se observó si había inhibición o no del crecimiento del hongo.

Entre otras técnicas usadas se encuentran:

- Microgota: Esta técnica ha sido utilizada por diversos autores, la cual lleva por nombre en inglés, “spot-on-lawn”. La misma consiste en aplicar sobre la superficie del medio de cultivo contentivo del inóculo de un microorganismo, una Microgota a

un volumen y una concentración conocida de una determinada sustancia a estudiar, para evaluar si presenta alguna propiedad antifúngica. Luego del período de incubación, se observa la presencia o no de inhibición del crecimiento en la zona donde fue colocada la Microgota (Vera, Salvucci, Sesma y Nader-Macias, 2007; Lizcano y cols., 2012).

- Difusión en Disco: la metodología de ésta, es la misma que se usa en el método de difusión con disco de Kirby Bauer, descrito por la National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) en 1993, y ampliamente utilizado para evaluar las cepas de bacterias aisladas a partir de muestras clínicas y sometidas a la prueba de antibiograma, con el fin de definir la acción antibacteriana que ejercen ciertos antibióticos comerciales. Además, desde el año 2004, esta metodología fue aprobada para ser usadas con las levaduras, ante los antifúngicos comerciales (Cantón, Martín y Espinel-Ingroff, 2007; Koneman, 2008).

En esta técnica, de igual manera, para evaluar la actividad antifúngica de los líquenes, se impregnan discos de papel de filtro, Whatman N° 1, con el extracto diluido. Se dejan secar y luego se colocan sobre la superficie del agar, con la cepa previamente incluida en el medio de cultivo o sembrada en la superficie del mismo. Las placas se dejan en incubación y luego, se registra la presencia o no del halo de inhibición alrededor del disco (Yilmaz y cols., 2004).

- Difusión en Pozos: esta se basa en la realización de pozos de milímetros de diámetro, cortando la superficie de un agar en la cual ha sido previamente sembrada la cepa en estudio, con la ayuda de cilindros plásticos o metálicos de diámetro definido. En la cavidad de los pozos, se coloca el extracto que se desea evaluar, a una concentración determinada. Luego, el extracto difundirá a través del medio de cultivo, e inhibirá o no la cepa sembrada, formando un halo de inhibición del crecimiento de la misma, alrededor del pozo (Swathy y cols., 2010; Baral y Maharjan, 2011).

En un paso posterior, al observar que el extracto tiene alguna actividad antifúngica, se puede llegar a determinar la CIM, para lo cual se pueden utilizar las

técnicas de difusión en disco o con pozos, descritas previamente, al realizar diluciones seriadas del extracto y colocar en cada disco o pozo, una concentración determinada del extracto. Luego del período de incubación, se registrará la menor concentración en la cual hubo inhibición de la cepa, o sea en la que se produjo el menor diámetro de halo de inhibición (Yilmaz y cols., 2004, Baral y Maharjan, 2011).

- Microdilución: esta también es otra técnica que permite evaluar la CIM utilizada en diversos estudios con extractos liquénicos. En esta técnica se usan placas de microtitulación de 96 pozos, en las filas se colocan las cepas y en cada columna de pozos, se coloca una concentración conocida del extracto. Concluido el período de incubación de las microplacas, se da lectura de la misma con ayuda de un lector de ELISA o de un espejo, y se registrará el pozo con la menor concentración en donde no hubo crecimiento (ópticamente visible si la lectura se realiza con ayuda de un espejo) (Mitrovic y cols., 2011).

- Macrodilución: en esta técnica se usa el mismo fundamento que la técnica de Microgota, aunque se realiza en tubos y requiere de mayor cantidad de medio de cultivo, diluyente orgánico, inóculo, sustancia biológica a evaluar. En esta técnica se observan las diferencias de densidades de crecimiento, de acuerdo a la concentración que hay en el tubo (Rankovič, Rankovič y Maric, 2010).

Técnicas para Evaluar la Actividad Antifúngica de Fármacos Comerciales

Fernández y colaboradores (2007), señalan que “las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos constituyen en la actualidad una de las principales líneas de investigación en todos los laboratorios de referencia debido al incremento de las micosis en el mundo entero” (pág.113). Entre las técnicas que se han empleado para evaluar la susceptibilidad antifúngica se encuentran las técnicas de difusión con disco y la de difusión con pozos. Por medio de estas técnicas, se busca la formación de halos de inhibición alrededor de la concentración conocida del antifúngico, y de

acuerdo a los milímetros del halo, se considerarán como susceptible (S), susceptible dosis dependiente (SDD) o resistente (R). Estos valores se han estandarizado según el CLSI, como se muestra en la tabla a continuación.

Tabla 2. Susceptibilidad de *Candida sp*, al fluconazol según Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) (Documento M27-A3)

	Halo de inhibición (mm)
Susceptible (S)	>19
Susceptible dosis dependiente (SDD)	15 – 18
Resistente (R).	<14

Fuente: Cantón; Martín y Espinel-Ingroff, 2007

Por otra parte, están las técnicas que utilizan medios líquidos, como la de microdilución y la de macrodilución, con el objeto de determinar la CIM, es decir la menor concentración de un antifúngico que genera una reducción visible en el crecimiento del microorganismo en estudio. Las mismas, son consideradas de referencia para el estudio de aislados clínicos y han sido descritas por Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) y el Comité Europeo de Susceptibilidad Antimicrobiana (EUCAST) (CLSI, 2008; EUCAST, 2008).

Una manera de simplificar la técnica para la determinación de la CIM, es a través del uso de tiras de papel impregnadas con diferentes concentraciones del antifúngico, como las tiras de Etest® (AB Biodisk, Solna, Suecia). También, se han creado dispositivos electrónicos digitales, como el BIOMIC (Giles Scientific, 1999, Santa Bárbara, CA), que en la técnica de difusión con disco, permiten la lectura digital de los halos de inhibición en milímetros, originados con los discos impregnados con una concentración determinada de antifúngico y posteriormente, dichos milímetros son convertidos en CIM, gracias a una curva de regresión. Además, existen otras técnicas como ATB- fungus 3, métodos colorimétricos, entre otros (De Aquino Lemos y cols., 2009; Duarte y cols., 2010; Maldonado y cols., 2011).

A su vez, con la determinación de la CIM, se han definido rangos para considerarlos como susceptible (S), susceptible dosis dependiente (SDD) o resistente (R), con el fin de facilitar su interpretación. Dichos datos se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Concentración Inhibitoria Mínima de *Candida sp.*, al Fluconazol. Puntos de Corte Recomendados por el (CLSI) (Documento M27-A2).

	CIM ($\mu\text{g/ml}$)
Susceptible (S)	≤ 8
Susceptible dosis dependiente (SDD)	16 – 32
Resistente (R)	≥ 64

Fuente: Fernández y cols., 2007; Dolande y cols., 2008

Taxonomía y Generalidades de las Levaduras Pertenecientes al Género *Candida*

La clasificación taxonómica del género *Candida*, ha variado en el transcurso del tiempo. Una de las razones ha sido por el desconocimiento de su fase sexuada de reproducción, motivo por el cual antes eran consideradas dentro de la división *Deuteromycota*. En la actualidad, las levaduras del género *Candida* se clasifican de la siguiente manera (Tabla 4):

Tabla 4. Clasificación Taxonómica de las Levaduras Pertenecientes al Género *Candida*.

Reino	Fungi
División	<i>Ascomycota</i>
Clase	<i>Ascomycetes</i>
Orden	<i>Saccharomycetales</i>
Familia	<i>Saccharomycetaceae</i>
Género	<i>Candida</i>
Especies	<i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> y <i>C. tropicalis</i> . Otras menos frecuentes son: <i>C. lusitaniae</i> , <i>C. guilliermondii</i> , <i>C. kefyr</i> , <i>C. rugosa</i> , <i>C. famata</i> , <i>C. inconspicua</i> , <i>C. norvegensis</i> , <i>C. dubliniensis</i> , <i>C. lipolytica</i> , <i>C. zeylanoides</i> , <i>C. pelliculosa</i> ...

Fuente: Bedout y Gómez, 2010; Gómez y cols., 2010.

Dentro de este género, existen más de 150 especies, siendo 17 especies las causantes de enfermedades en el ser humano y sólo 5, las mayormente aisladas como agentes causales. Entre estas, *C. albicans* es la especie predominante (Tabla 4).

De acuerdo a la morfología, las levaduras pertenecientes a este género micótico presentan una estructura oval o redondeada de 3 a 7 μm de diámetro. Se reproducen a

través de la formación de blastoconidias y algunas especies pueden formar pseudomicelio (Ugalde, 2008; Forbes, Sahm y Weissfeld, 2009).

En torno a su hábitat, este género micótico forma parte de la flora saprófita del ser humano y de animales, pudiendo colonizar mucosas del tracto intestinal, cavidad oral, vagina y piel. Sin embargo, cuando ocurre la proliferación de las mismas, dichas levaduras pueden desencadenar un tipo de micosis denominada, micosis oportunista (Torres y cols., 2009; Almirante y Cuenca Estrella, 2011; Marcos-Zambrano y cols., 2013).

Al respecto, estas micosis pueden ser secundarias a un estado de inmunosupresión del individuo, como en la diabetes, infección por el Virus de Inmunodeficiencia Humana, leucemia, etc.; por el uso de algunos fármacos como los antibióticos de amplio espectro, quimioterápicos, inmunosupresores e inmunomoduladores; por el uso de dispositivos inertes como catéteres intravasculares, sondas de succión o de drenaje, entre otros. En consecuencia, esto ha llevado a la administración de medicamentos antifúngicos, como los derivados azólicos, particularmente el fluconazol, lo cual ha generado la aparición de resistencia a nivel mundial (Tortora, Funke y Case, 2007; Gómez y cols., 2010; Almirante y Cuenca-Estrella, 2011; Maldonado y cols., 2011).

Es por ello, que esta situación ha motivado a los investigadores y a la industria farmacéutica a la búsqueda de alternativas terapéuticas a partir de productos naturales con actividad biológica entre los que se encuentran los extractos líquénicos (Yucel y cols., 2007; Tiwari y cols., 2011).

Susceptibilidad Disminuida *Candida sp*, a los Antifúngicos.

En los últimos años, se han aislado cepas de levaduras que presentan resistencia o susceptibilidad disminuida ante el tratamiento con medicamentos antifúngicos, principalmente a los derivados azólicos como el fluconazol (Manzano-Gayosso, Méndez, Hernández y López, 2008).

Por tanto, el término de resistencia antifúngica se refiere a la pérdida de la sensibilidad de mohos y levaduras frente a un antifúngico (Gregorí Valdés, 2005). Autores como Mellados y cols., (2002), Silva y cols., (2002) y Tapia (2009 y 2012), definen dos tipos de resistencia: la resistencia microbiológica y la resistencia clínica. La primera puede subdividirse en:

- Resistencia intrínseca o innata, es aquella que presentan todas las especies de un mismo hongo y no guarda relación con la exposición al antifúngico, como por ejemplo *C. krusei* y diversos hongos filamentosos al fluconazol.
- Resistencia primaria, ocurren en especies de cepas normalmente sensibles a un antifúngico, y que de manera espontánea, comienzan a aparecer cepas resistentes, sin el antecedente del contacto previo con el antifúngico. Tal es el caso de *C. krusei* frente al fluconazol.
- Resistencia secundaria o adquirida, donde cepas originalmente susceptibles se transforman en organismos resistentes debido a la exposición previa al antifúngico. Como por ejemplo, se puede mencionar lo previamente reportado con diversas especies de *Candida* en la práctica médica.

Con respecto a la resistencia clínica, esta surge como consecuencia de concentraciones sub-terapéuticas del fármaco en tejido y/o sangre, a una interacción antagónica entre fármacos o a la severidad del estado de inmunosupresión del paciente.

En este sentido, uno de los estudios dedicados a evaluar la susceptibilidad antifúngica de aislados clínicos es el realizado por Torres y colaboradores, en Colombia, y en el cual compararon tres técnicas de susceptibilidad antifúngica al fluconazol de varias especies de *Candida* aisladas a partir de hemocultivos. Según los datos reportados por los autores, las especies *C. albicans* y *C. lusitaniae*, resultaron dentro de los parámetros considerados como SDD, con CIMs de 16 µg/mL y 32 µg/mL, respectivamente, según los criterios del CLSI (Torres, Álvarez y Rondón, 2009).

En la actualidad, existen diversos reportes de la presencia de resistencia a los antifúngicos. Uno de los que se pudiera mencionar es el publicado por Ortigoza y Arroyo (2014) efectuado en México y en el cual estudiaron la susceptibilidad *in vitro* de *Candida* a los antifúngicos comerciales, entre ellos *C. albicans* aisladas de muestras de aspirado bronquial y hemocultivos durante el año 2012. En esta investigación los autores efectuaron la determinación de la sensibilidad a diversos antifúngicos comerciales por medio de la técnica de difusión con discos. Este estudio reportó que 5 de las 83 cepas de *C. albicans* evaluadas resultaron resistentes a fluconazol con CIM ($\geq 64\mu\text{g/mL}$) de acuerdo a los valores de referencia estipulados por el CLSI. En tal sentido, dichos autores señalaron que la sensibilidad disminuida de estas levaduras a los antifúngicos comerciales, entre ellos fluconazol, se debía a la administración descontrolada de los mismos como terapia antifúngica de primera línea.

Sistema de Hipótesis

En base a lo antes expuesto, conociendo la situación actual del objeto de estudio y formuladas las preguntas de esta investigación, se plantearon las siguientes hipótesis:

H_{a1}: Existe actividad antifúngica del extracto de *C. rappii* contra *Candida albicans* aisladas a partir de muestras clínicas.

H_{a2}: Existe variación en la respuesta antifúngica del extracto de *C. rappii* contra *Candida albicans* aisladas a partir de muestras clínicas, según su sensibilidad o resistencia al fluconazol.

H_{a3}: Existe variación de la CIM del extracto de *C. rappii* contra *Candida albicans* aisladas de muestras clínicas, según la técnica implementada.

H_{o1}: No existe actividad antifúngica del extracto liquénico de *C. rappii* contra *Candida albicans* aisladas de muestras clínicas.

H₀₂: No existe variación en la respuesta antifúngica del extracto de *C. rappii* contra *Candida albicans* aisladas a partir de muestras clínicas, según su sensibilidad o resistencia al fluconazol.

H₀₃: No existe variación de la CIM del extracto de *C. rappii* contra *Candida albicans* aisladas de muestras clínicas, según la técnica implementada.

Operacionalización de las Variables

Con referencia a esta investigación, la Variable Independiente es la concentración química del extracto líquénico de *C. rappii*, la Variable Dependiente es la actividad antifúngica frente a *Candida albicans*, aislada de muestras clínicas y la Variable Interviniente es la sensibilidad o no al fluconazol (Tabla 5). En el presente estudio las variables son de naturaleza cuantitativa. Se medirán variables continuas, es decir aquellas que se presentan como números fraccionados o decimales.

Tabla 5. Operacionalización de las Variables según los Objetivos Específicos

Objetivo Específico	Variable	Dimensiones	Indicador
Definir la actividad antifúngica de <i>C. rappii</i> ante <i>C. albicans</i> provenientes de muestras clínicas.	Actividad antifúngica	Inhibir al microorganismo.	Presencia o ausencia de zona o halo de inhibición del crecimiento del microorganismo.
		No inhibir al microorganismo.	
Definir la CIM del extracto liquénico <i>C. rappii</i> con <i>C. albicans</i> aisladas de muestras clínicas, en relación a la sensibilidad o no al fluconazol.	CIM	Inhibición del crecimiento.	Menor concentración a partir de la cual no hay crecimiento visible del microorganismo.
		No inhibición del crecimiento.	
Comparar las técnicas de Microgota y de difusión con disco para la determinación de la CIM del líquen <i>C. rappii</i> con <i>C. albicans</i> aisladas de muestras clínicas.	Técnicas de Microgota y de difusión en disco	Evidencia de inhibición del crecimiento del microorganismo	Mayor o menor frecuencia de la evidencia de inhibición del crecimiento de acuerdo a la técnica.
		No evidencia de inhibición del crecimiento del microorganismo	

Fuente: Pérez y Antunez, 2015

Definición de Términos

Apotecios: tipo de ascoma o estructura de reproducción sexual del micobionte, en forma de copa o disco (Farci y cols., 2011).

Ascomycota: es la división del Reino de los Hongos, cuya reproducción sexuada se caracteriza por producir ascos con ascosporas (Farci y cols., 2011).

Ascosporas: estructuras reproductivas en forma de saco que contienen esporas (ascosporas) (Farci y cols., 2011).

Ascosporas: son las esporas que se producen dentro de los ascos (Farci y cols., 2011).

Basidiomycota: es la división del Reino de los Hongos, cuya reproducción sexuada se caracteriza por producir basidios y basidiosporas (Farci y cols., 2011).

Cepas Resistentes: es una cepa en donde no se espera ningún éxito terapéutico, sea cual fuere la dosis utilizada (Tapia, 2009; Cuenca y cols., 2013)

Cepas Sensibles: es una cepa que presenta buena probabilidad de éxito terapéutico, con dosis habituales (Tapia, 2009; Cuenca y cols., 2013).

Cepas Sensibles Dosis Dependiente: es una cepa que presenta buena probabilidad de éxito terapéutico, con dosis por encima de las habituales (Tapia, 2009; Cuenca y cols., 2013).

Concentración Inhibitoria Mínima (CIM): es la concentración más baja de un agente antimicrobiano, capaz de inhibir el crecimiento visible de un microorganismo después de su incubación (Espinel-Ingroff y cols., 2002; NCCLS 2002).

Cuerpos Fructíferos: son estructuras especializadas de reproducción, que en los *Ascomycota* se denominan ascomas y en los *Basidiomycota* reciben el nombre de basidiocarpo (Farci y cols., 2011).

Dimorfo: son líquenes que se caracterizan por presentar dos formas diferentes de crecimiento. Se emplea para designar a aquellos talos compuestos de dos partes diferentes: una fruticulosa y otra crustácea o escumulosa (Farci y cols., 2011).

Elementos de Reproducción: constituyen las ascosporas en los *Ascomycotas* o las basidiosporas en los *Basidiomycotas* (Farci y cols., 2011).

Fotobionte: es el organismo de la simbiosis o el simbiote del liquen, que realiza la fotosíntesis del mismo. Este puede ser un alga o una cianobacteria (Farci y cols., 2011).

Micobionte: es el organismo de la simbiosis o el simbiote del liquen, compuesta por el hongo (Farci y cols., 2011).

Paráfisis: filamento ascendente que se presentan en el himenio entre los ascos (Farci y cols., 2011).

Rizoides: son estructuras de fijación o de absorción (Farci y cols., 2011).

Simbiosis: es la relación ecológica, entre organismo de distinta especie en la cual se producen beneficios mutuos (Farci y cols., 2011).

Soredios: unidad de dispersión en los líquenes, formado por grupos de células algas e hifas del hongo en los líquenes (Farci y cols., 2011).

Sustrato: base que sirve de soporte al liquen (Farci y cols., 2011).

Talo: es la parte vegetativa del liquen (Farci y cols., 2011).

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Enfoque de Investigación

Este estudio tiene un enfoque cuantitativo debido a que se obtuvieron datos que posteriormente fueron sometidos a una medición numérica, con el fin de evaluar la relación entre las variables la cual fue enunciada con números.

Tipo y Diseño de la Investigación

El presente estudio fue una Investigación de Campo Explicativa, debido a que se realizó un análisis sistemático del problema planteado, para describirlo, interpretarlo, explicar sus causas. Además se aplicó un diseño no experimental debido a que no se manipularon las variables y se registraron los hechos tal cual se presentaron.

Población y Muestra

Unidad de Investigación

La unidad de investigación estuvo representada por los extractos etanólicos de la especie de líquen *C. rappii*, conservados en la Sección de Biotecnología del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, ULA.

Metodología de la Investigación

Muestra Liquénica a Evaluar.

El líquen *Cladonia rappii* (A. Evans), fue colectada en febrero de 2012, en un sector del estado Mérida-Venezuela: en San Rafael, vía El Morro; colocada en bolsas de papel y trasladada a la Fundación Instituto Botánico de Venezuela “Dr Tobias Lasser”, Universidad Central de Venezuela, en Caracas, donde fue identificada por la Farm. Claudia Plaza y el Lic. Jesús Hernández, utilizando claves taxonómicas estándares (Lücking y Bernecker-Lücking, 2000; Nash, Ryan, Diederich, Gries, y Bungartz, 2004; Cáceres, Lücking y Rambold 2007; Farci y cols, 2011).

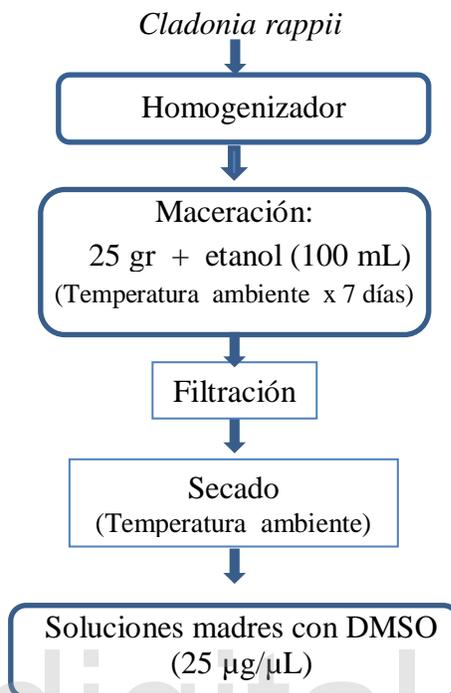
La muestra de líquen identificada, fue depositada en el Herbario MERF, de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, bajo el número C2.

Preparación del Extracto Liquénico.

La muestra liquénica se dejó secar por 7 días, aproximadamente. El extracto se procesó en el Laboratorio de Biotecnología, Instituto de Investigaciones, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes (ULA). La muestra seca se sometió a un homogenizador. Para la maceración, se tomaron 25 gr del líquen, y se le agregaron 100 mL de etanol; se dejaron a temperatura ambiente por 7 días. Posteriormente, el extracto obtenido se filtró con ayuda del papel Whatman N° 1 (Whatman International Ltd., England). Luego, se dejó secar a temperatura ambiente y posteriormente se almacenó a 8°C, hasta ser usado.

A partir del extracto seco, se preparó una solución madre a una concentración de 25 µg/µL. (Mitrovic y cols., 2011). (Esquema 1).

Esquema 1. Flujograma de la Preparación de la Solución Madre a Partir del Liquen Recolectado.



Microorganismos y Preparación del Inóculo.

Se utilizaron 7 levaduras, de las cuales 6 pertenecían a la especie *Candida albicans* aisladas de hemocultivos, con sensibilidad conocida al fluconazol (1 sensible, 3 sensibles dosis dependiente y 1 resistente), cuyas CIM al fluconazol fueron determinadas por la prueba de E-Test®, en etapa previa al presente estudio. Estas cepas fueron conservadas en la micoteca del Laboratorio de Micología, de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, ULA. La cepa sensible al fluconazol fue la designada como LM-59 con una CIM: 0,50 µg/mL; las cepas sensibles dosis dependiente al fluconazol fueron: LM-64, LM-66 y LM-68, todas con CIM: 4 µg/mL; y la resistente al fluconazol representada por: LM-27 que tuvo una CIM de >256 µg/mL. Además, se usaron dos cepas controles: *C. albicans* (ATCC 90028) y *C. parapsilosis* (ATCC 22019).

El inóculo se preparó a partir del crecimiento en medio Agar Sabouraud Dextrosa con antibiótico, incubadas a 35°C por 24-48 horas. De estos cultivos, se tomaron 2 colonias y se diluyeron en agua destilada, hasta obtener una densidad de 0,5 McFarland, con ayuda del patrón McFarland, correspondiendo a $1-5 \times 10^6$ UFC/MI (Esquema 2). (NCCLS, 2002; Gualtieri, Villalta, Guillén, Lapenna y Andara, 2004; Rankovič, Mišić y Sukdolak, 2007).

Esquema 2. Flujograma de la preparación del inóculo para las pruebas cualitativa y cuantitativa.

C. albicans (1 S)
C. albicans (3 SDD)
C. albicans (1 R)
C. albicans (ATCC)
C. parapsilosis(ATCC)

Agar Sabouraud Dextrosa con antibiótico
(35°C por 24-48 horas)

Ajuste de la densidad del inóculo:
Patrón 0.5 de McFarland

$1-5 \times 10^6$ UFC/mL

Medio de cultivo utilizado.

Se utilizó el medio Agar Müeller–Hinton modificado (Agar Müeller-Hinton BBT® 38 g/L, glucosa 20 g/L, azul de metileno 500 µg/L) (NCCLS, 2002), el cual fue distribuido a razón de 20 mL por tubo. Al momento de aplicar la prueba a ensayar, se fundió el medio de cultivo, al cual se le agregaron 2 mL del inóculo previamente preparado. Luego, se sirvió en la placa de Petri y se dejó solidificar.

Determinación de la Actividad Antifúngica

Para determinar la actividad antifúngica del extracto de *C. rappii* evaluado, se usaron las técnicas de Microgota y de difusión en disco. Dichas pruebas se realizaron por duplicado.

Técnica de Microgota

A partir de la solución madre a estudiar (25 µg/µL), se aplicaron 5 µL sobre la superficie del medio Agar Müeller-Hinton modificado contenido del inóculo previamente incluido (Vera y cols., 2007; Lizcano y cols., 2012). Las placas se incubaron a 35°C por 24-48 horas (Esquema 3).

Lectura e Interpretación de la Prueba por la Técnica de Microgota (Esquema 3):

- Presencia de zona de inhibición del crecimiento: susceptible (+).
- Ausencia de zona de inhibición del crecimiento: resistente (-).

Técnica de Difusión con Discos

Para esta técnica se utilizaron discos de papel de filtro Whatman® N° 1 (Whatman International Ltd., England) de 6 mm de diámetro, impregnados con un volumen de 15 µL del extracto liquénico de la solución madre (25 µg/µL). Posteriormente, se esperó que se evaporara el solvente y luego, se colocó el disco sobre la superficie del medio Agar Müeller-Hinton modificado con el inóculo incluido. Las mismas se incubaron a 35 °C por 24-48 horas (Esquema 4).

Lectura e Interpretación de la Prueba por la Técnica de Difusión en Disco (Esquema 4):

- Presencia de halo de inhibición del crecimiento: susceptible (+).
- Ausencia de halo de inhibición del crecimiento: resistente (-).

Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

Para la determinación de la CIM, se prepararon soluciones seriadas a partir de la solución madre (25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), disolviéndolas en DMSO para obtener un rango de concentración entre 25-0,781 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. el ensayo se realizó por duplicado.

Técnica de Microgota

Inicialmente, se colocó un papel como patrón por debajo del fondo de la placa, con la distribución de las diferentes concentraciones a evaluar, partiendo de la solución madre. Siguiendo dicho patrón, se aplicaron microgotas de 5 μL con cada una de las 6 concentraciones del extracto líquénico sobre la superficie del medio Agar Müeller-Hinton modificado contentivo del inóculo previamente incluido (Vera y cols., 2007; Lizcano y cols., 2012). Las placas se incubaron a 35°C por 24-48 horas (Esquema 3).

Lectura e Interpretación de la Prueba de CIM, por la Técnica de Microgota (Esquema 3):

Para esto se registró la presencia o ausencia de una zona de mayor o menor inhibición del crecimiento de las cepas en estudio obtenidas por acción del extracto líquénico evaluado y se interpretaron de la siguiente manera:

- La concentración capaz de inhibir el crecimiento visible de un microorganismo en aproximadamente un 50% o más: susceptible (+)
- Ausencia de inhibición del crecimiento: resistente(-).

Técnica de Difusión con Discos

Inicialmente, se colocó un papel como patrón por debajo del fondo de la placa, con la distribución de las diferentes concentraciones a evaluar. Para esta técnica se utilizaron discos de papel de filtro Whatman® N° 1 (Whatman International Ltd., England) de 6 mm de diámetro, impregnados con un volumen de 15 μL del extracto líquénico de las distintas concentraciones en estudio. Se esperó que se evaporara el solvente y posteriormente, estos discos fueron colocados en la superficie del medio

Agar Müeller-Hinton modificado contentivo del inóculo previamente incluido. Las mismas se incubaron a 35 °C por 24-48 horas (Esquema 4).

Lectura e Interpretación de la Prueba de CIM, por la Técnica de Difusión con Disco (Esquema 4):

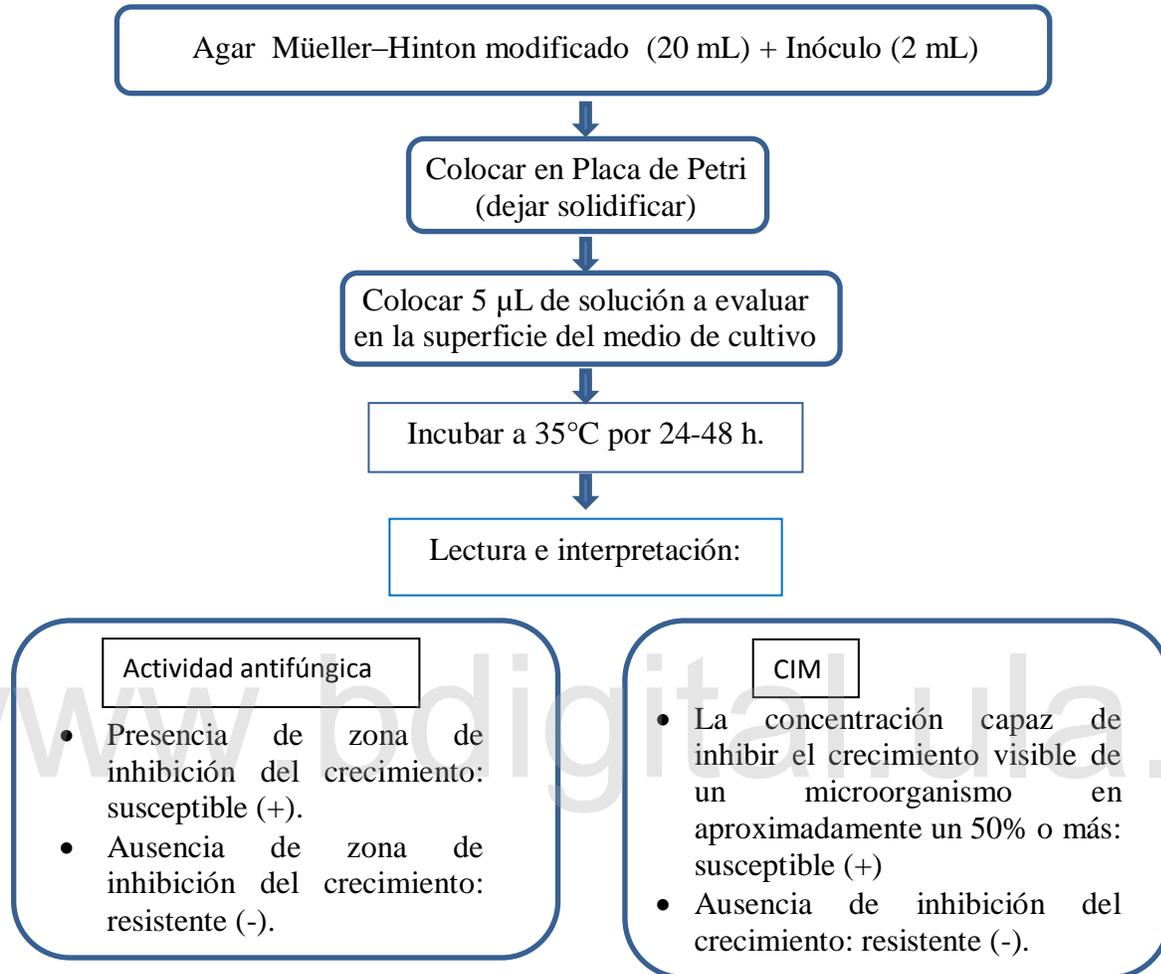
Se registró la presencia o ausencia de un halo de inhibición del crecimiento alrededor del disco de papel y se interpretaron de la siguiente manera:

- Presencia de un halo de inhibición del crecimiento alrededor del disco con la menor concentración del extracto líquénico: susceptible (mm).
- Ausencia de un halo de inhibición del crecimiento alrededor del disco con el extracto líquénico: resistente (-).

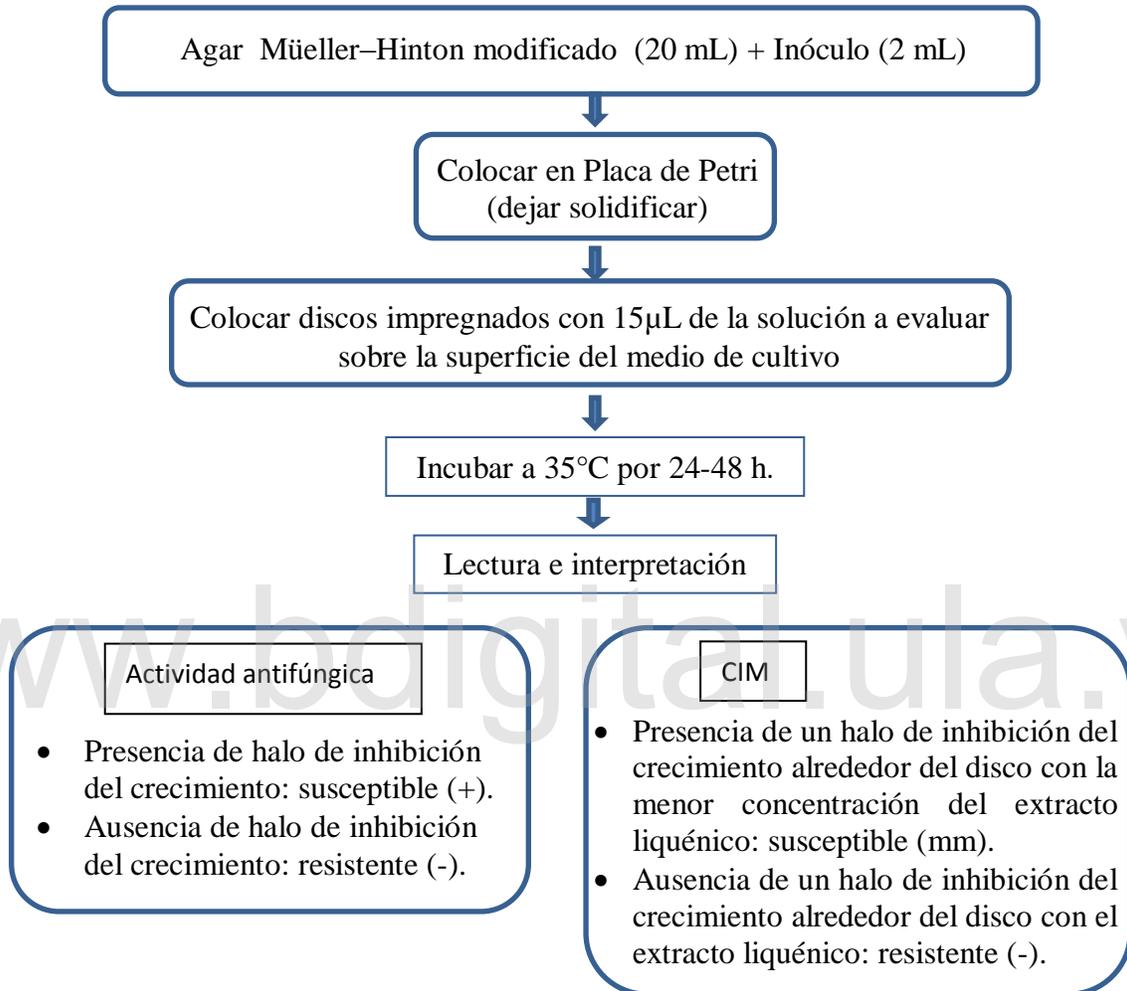
Controles

Se impregnaron discos con DimetilSulfóxido (DMSO, HPLC grade) (Scharlau Chemie S.A), como control negativo, los cuales fueron colocados en cada una de las placas. Los discos de fluconazol (Laboratorio Colmed International[®]) de 25 µg, también se pusieron en la superficie del medio como controles positivos de inhibición (Ramírez y Marín, 2009).

Esquema 3. Flujograma de la Prueba de Actividad Antifúngica y de CIM por la Técnica de Microgota.



Esquema 4. Flujograma de la Prueba de Actividad Antifúngica y de CIM por la Técnica de Difusión con Discos.



CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados

Al evaluar la actividad antifúngica del extracto de *Cladonia rappii* contra levaduras de la especie *Candida albicans*, aisladas de hemocultivos, con CIM conocida ante el fluconazol, se observó que resultaron ser susceptibles a dicho extracto las cepas LM-59, LM-66, LM-68 y LM-27, observándose con mayor claridad en la cepa LM-66 (Figura 2), además de las 2 cepas controles (*C. albicans* y *C. parapsilosis*), evidenciado con mayor frecuencia por la técnica de Microgota (Tabla 6).

Tabla 6. Distribución de los Resultados de la Actividad Antifúngica del Extracto de *C. rappii* contra *C. albicans* según las Técnicas de Microgota y de Difusión con Discos, en el primer y segundo ensayo.

	Cepas	Fluc	G/D
1	LM-59	S	+ / -
2	LM-64	SDD	- / -
3	LM-66	SDD	+ / +
4	LM-68	SDD	+ / +
5	LM-27	R	+ / +
control	<i>C. albicans</i> ATCC	S	+ / +
control	<i>C. parapsilosis</i> ATCC	S	+ / +

G: Técnica de Microgota; D: Técnica de Difusión con Discos (mm); Fluc: fluconazol; S: sensible; SDD: sensible dosis dependiente; R: resistente; +: inhibición del crecimiento (susceptible); -: ausencia de inhibición del crecimiento (resistente).

Como se puede observar en la Tabla 6, la cepa LM-64 no fue inhibida por dicho extracto liquénico. Posteriormente, en la determinación de la CIM se observó que el rango inhibitorio que ejerció efecto en 4 de las 5 cepas evaluadas estuvo entre 25 y 12,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ con la inhibición de su crecimiento en un 50% a la concentración de 25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ del extracto de *C. rappii* por la técnica de Microgota, en uno de los ensayos realizados (Tabla 7). Por tanto, no se observó inhibición con las concentraciones del extracto liquénico evaluado en el rango comprendido entre 6,25 y 0,78 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Tabla 7).

A su vez, de las 3 cepas conocidas como SDD al fluconazol (LM- 64, LM-66 y LM-68), sólo en 2 se observó que la CIM del extracto estuvo representada por la concentración de 12,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. De misma manera, esta concentración resultó ser la inhibitoria mínima en la cepa LM-27 de *C. albicans* conocida como resistente al fluconazol. Por tanto, se pudo evidenciar una menor concentración inhibitoria del extracto liquénico en cepas conocidas como SDD y R al fluconazol (LM-66, LM-68 y LM-27), en comparación con la cepa S a dicho antifúngico (LM-59) (Tabla 7). Con las cepas ATCC de *C. albicans* y *C. parapsilosis*, se evidenció inhibición del crecimiento con la concentración de 25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ del extracto, mayormente por la técnica de Microgota.

Finalmente, tal como se puede apreciar en la Tabla 7, al comparar las técnicas usadas para evaluar la CIM, se observó que la técnica de Microgota permitió poner en evidencia con una mayor frecuencia, el efecto de inhibición que ejercieron las concentraciones de 25 y 12,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ del extracto liquénico en estudio, con respecto a la técnica de difusión en disco (14 vs 8 pruebas para la determinación de la CIM, respectivamente). Como control positivo, se constató el halo de inhibición formado por el efecto del fluconazol, no así con el DMSO, como control negativo.

Tabla 7. Distribución de los resultados de la CIM del extracto de *C. rappii* contra *C. albicans* según las Técnicas de Microgota y de Difusión en disco, en el primer y segundo ensayo.

	Cepas	Fluc	25 µg/µL		12,5 µg/µL	
			a G/D	b G/D	a G/D	b G/D
			+ ó - / mm			
1	LM-59	S	+ / -	-	-	-
2	LM-64	SDD	-	-	-	-
3	LM-66	SDD	+ / 8	+ / 7	-	+ / -
4	LM-68	SDD	-	+ / 8	-	+ / -
5	LM-27	R	+ / 8	+ / 8	+ / -	+ / -
control	<i>C. alb</i> ATCC	S	+ / 8	+ / 7	-	-
control	<i>C. parap</i> ATCC	S	+ / 8	+ / -	-	-

a: primer ensayo; b: segundo ensayo; *C. alb* ATCC: *C. albicans*; *C. parap* ATCC: *C. parapsilosis*; Fluc: fluconazol; S: sensible; SDD: sensible dosis dependiente; R: resistente; G: Técnica de Microgota; D: Técnica de Difusión en disco; +: inhibición del crecimiento $\geq 50\%$ con la técnica de Microgota; - : ausencia de inhibición del crecimiento con las técnicas de Microgota y de Difusión en disco.

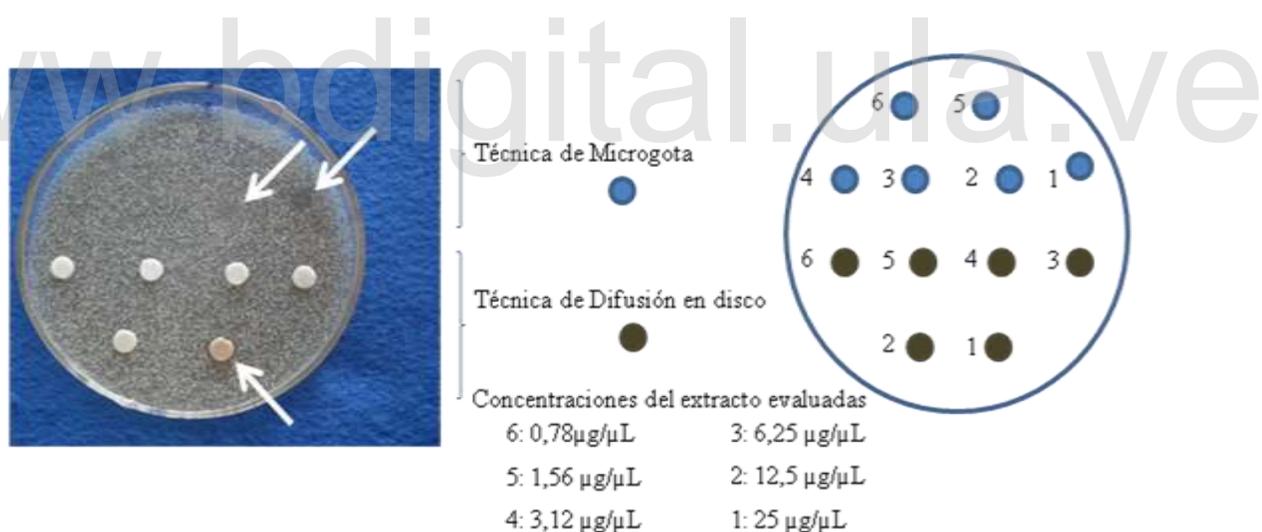


Figura 2. Técnicas de Microgota y de Difusión con Discos para la Determinación de la CIM de la Cepa LM-66 (SDD al fluconazol).

Discusión

Los líquenes han sido estudiados por las diversas facultades biológicas que ejercen sus metabolitos secundarios, los cuales han contribuido en la medicina tradicional, en la cocina, en la industria textil, en la cosmetológica, entre otros. Es por ello que *Cladonia* representa uno de los géneros liquénicos estudiados para evaluar sus actividades biológicas, como las antimicrobianas, antimutagénicas, citotóxicas, antiproliferativas, entre otras (Açıkgöz y cols., 2013; Rankovič y cols., 2009; Rankovič y cols., 2010; Illana-Esteban C, 2012; Shukla, Joshi, Rawat, 2010). Sin embargo, no se conoce literatura que dedique su atención al estudio de la especie *C. rappii*. En este sentido, Plaza y colaboradores (2015), en la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, dedicaron esfuerzos para evaluar las actividades que ejerce dicha especie, como es la actividad antifúngica, evaluada con cepas de levaduras control, pertenecientes a la colección ATCC (datos no publicados).

En el presente trabajo, se evaluó la actividad antifúngica del extracto de la especie de líquen *C. rappii* frente a 5 cepas de *C. albicans*, aisladas de hemocultivos, con CIM conocida al fluconazol. En este, se encontró que el extracto ejerció un efecto inhibitorio en 4 de las 5 cepas evaluadas, entre las que eran conocidas por ser sensibles (1), sensible dosis dependientes (2) y resistente (1) al fluconazol. No obstante, en una de las cepas sensibles dosis dependientes al fluconazol, no se observó inhibición por el homogenato evaluado, pudiendo considerarse éste, un hecho aislado.

Esta evidencia de actividad antifúngica probablemente se deba a la acción de uno o varios de los metabolitos secundarios conocidos, como son el ácido úsnico y el ácido fumarprotocetrárico, metabolitos estos aislados y estudiados en líquenes del género *Cladonia*. También, pudiera ser el producto de la interacción entre los diversos metabolitos que se encuentran en el homogenato y que ejerzan una acción sinérgica o incluso antagónica entre si. Hecho que ha sido afirmado por algunos

autores al estudiar los extractos de diversos líquenes (Shukla y cols., 2010; Kosanić y cols., 2014).

Además, aunque pudiera esperarse que los aislados clínicos experimenten un comportamiento similar a las cepas controles, tal como se observó en el presente estudio con la cepa clínica de *C. albicans* sensible a fluconazol y las cepas controles ATCC, llama la atención la menor CIM registrada de las cepas consideradas como SDD y R al fluconazol ante el extracto liquénico de *C. rappii* evaluado. Posiblemente este comportamiento sea debido a que en estos aislados, con sensibilidad disminuida al fluconazol, actúen compuestos liquénicos diferentes. Experiencia similar fue destacada por Mitrović y colaboradores (2011).

Cabe mencionar que los azoles, como es el fluconazol, actúan inhibiendo la síntesis del ergosterol, particularmente al bloquear la enzima 14- α desmetilasa, lo que conlleva a la acumulación de esteroides 14- α metilo. En el caso de que las cepas resulten con sensibilidad disminuida al fluconazol, como los aislados clínicos sensibles dosis dependientes y el aislado resistente al fluconazol evaluados en el presente estudio, estos pudieran haber desarrollado resistencia secundaria a consecuencia de mutaciones puntuales de genes como ERG11 o CDR1, CDR2 y MDR1 de las levaduras, entre otros, los cuales generan una menor afinidad por los azoles (ERG11) o un aumento de la excreción de los mismos por acción de las bombas de flujo (CDR1, CDR2 y MDR1). Se pudiera pensar que ante el comportamiento observado de estas cepas de *C. albicans* con sensibilidad disminuida al fluconazol ante la presencia de los componentes activos presentes en el homogenato de *C. rappii*, que en las mismas pudieran estar participando vías metabólicas o incluso sitios diana, propiciados por dichas mutaciones puntuales que las hacen más resistentes a concentraciones menores del extracto. En este particular queda por estudiar, el mecanismo molecular de resistencia que presentan estas cepas de *Candida*, y aislar, identificar y evaluar por separado el o los metabolitos secundarios que produce *Cladonia rappii*.

En la actualidad, no se tiene mucha información sobre el mecanismo de acción que ejerce el ácido úsnico sobre las levaduras. Sin embargo, se especula que dicha acción

está relacionada con una modificación de la integridad de la membrana celular que conlleva a un daño en la función mitocondrial (Fidelis, F., 2010). En tal sentido, quedaría por determinar si tienen una mayor expresión los sitios de acción del o de los metabolitos liquénicos, asociada o no a una mayor captación de estos por parte de las levaduras, para buscar una explicación al hecho de que 3 de 4 cepas estudiadas, SDD y R al fluconazol, hayan experimentado una menor CIM al extracto etanólico evaluado. Al respecto, este es el primer estudio que evalúa la relación entre las diferentes CIM de cepas de *Candida albicans* ante el fluconazol aisladas de muestras clínicas y su comportamiento frente a la presencia del extracto liquénico de *Cladonia rappii* (Cuenca M, 2010; Gutiérrez-Martínez y cols., 2012; Fuentes y cols., 2014).

Por otra parte, en el presente estudio, tomando en cuenta que al evaluar la actividad antifúngica y CIM con las técnicas aplicadas, los resultados variaron. Llama la atención que con el uso de la técnica de Microgota, se pudo constatar una menor CIM en comparación con la técnica de difusión con disco. Cabe mencionar, que una dificultad que arrojó la técnica de difusión con disco, fue la no visualización de halos de inhibición con diámetros de tamaño ligeramente mayores a los del disco. Aspecto éste que permitió solventar favorablemente la técnica de Microgota utilizada en el presente trabajo y que sirvió para poner en evidencia la actividad antifúngica con concentraciones menores del extracto. Por tanto, resulta ser conveniente la realización de más de una técnica de manera simultánea, para evaluar adecuadamente y facilitar la detección de variaciones de la actividad antifúngica y CIM de una sustancia biológica en estudio. Incluso, otras técnicas que se pudieran utilizar para revelar dichas sutilezas son la técnica de difusión con pozos, que ponen en evidencia diámetros de hasta 0,1 mm de diferencia o incluso, las técnicas de macro o de microdilución (Mitrović y cols., 2011; Kekuda y cols., 2012).

Además, la técnica de Microgota usada para evaluar la actividad antifúngica en el presente estudio, permitió el uso de una menor cantidad de extracto liquénico. Condición a considerar en circunstancias particulares, como el hecho de necesitar trabajar con muy escasa materia prima de difícil acceso.

Por todo lo antes expuesto, queda en evidencia una vez más la actividad antifúngica del género *Cladonia* y en particular, como una segunda experiencia con la especie *C. rappii*, esta vez ante 4 de 5 aislados de *Candida albicans* provenientes de hemocultivos, y su respuesta ante cepas con sensibilidad conocida al fluconazol. Y además, la utilidad que representa la técnica de Microgota.

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

- Se comprobó la presencia de actividad antifúngica de la especie líquénica evaluada, *Cladonia rappii*, contra cepas de *C. albicans* aisladas de muestras clínicas.
- El presente estudio permitió definir la CIM del extracto etanólico de *C. rappii* frente a 4 de 5 cepas de *C. albicans* aisladas de muestras clínicas, consideradas S, SDD y R al fluconazol, al igual que con las cepas controles.
- Al determinar la CIM del líquen *C. rappii* con *C. albicans* aisladas de muestras clínicas, la técnica de microgota permitió evidenciar una concentración inhibitoria menor en comparación con la técnica de difusión con disco.

Recomendaciones

- Evaluar la actividad antifúngica del extracto etanólico de *C. rappii* con concentraciones de 50 y 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ utilizando la técnica de Microgota y Difusión con Discos, para definir si la única cepa SDD que no fue inhibida a 25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ del extracto, logra ser inhibida a una mayor concentración de éste.

- Repetir el presente estudio con un mayor número de cepas de *C. albicans*, aisladas de muestras clínicas y con sensibilidad conocida ante el fluconazol (S, SDD y R), con el fin de determinar si los resultados son consistentes con lo observado.
- Continuar los estudios con el extracto etanólico de *C. rappii*, con el objeto de aislar, identificar y evaluar los metabolitos secundarios que lo componen y el efecto que ejercen en la actividad antifúngica de dicho líquen.
- Realizar la tipificación molecular de las cepas de *C. albicans* evaluadas, en búsqueda de mutaciones puntuales con el objeto de estudiar si las mismas tienen alguna relación con la actividad inhibitoria ejercida por *C. rappii*.

www.bdigital.ula.ve

REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS

Açıkgöz, B., Karaltı, İ., Ersöz, M., Coşkun, Z. M., Çobanoğlu, G., y Sesal, C. (2013). Screening of antimicrobial activity and cytotoxic effects of two *Cladonia* species. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 68 (5-6), 191-197.

Almirante, B. y Cuenca-Estrella, M. (2011). Candidemia: impacto de los estudios epidemiológicos en la terapéutica y en el pronóstico de una infección grave. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 29 (5), 325-357.

Baral, B. y Maharjan, B. (2011). Assessment of antimicrobial and phytochemical potentials of high altitudinal Nepalese lichens. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*; 1 (2): 98-112.

Bedout, C., y Gómez, B. (2010). *Candida* y candidiasis invasora: un reto continuo para su diagnóstico temprano; *Candida* and candidiasis: the challenge continues for an early diagnosis. *Infectio*, 14 (2), 159-171.

Boustie, J., y Grube, M. (2005). Lichens-a promising source of bioactive secondary metabolites. *Plant Genetic Resources*, 3 (2), 273-287.

Burkholder, P., Evans, A., McVeigh, I., y Thornton, H. (1944). Antibiotic activity of lichens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 30 (9), 250-255.

Cáceres, M., Lücking, R., y Rambold, G. (2007). Phorophyte specificity and environmental parameters versus stochasticity as determinants for species composition of corticolouscrustose lichen communities in the Atlantic rain forest of northeastern Brazil. *Mycological Progress*, 6 (3), 117-136.

Cannon, P. y Kirk, P. (2007). *Fungal Families of the world*. (ed.) USA: CABI Publishing Series, 256-257.

Canseco, A., Anze, R., y Franken, M. (2011). Comunidades de líquenes: indicadores de la calidad del aire en la ciudad de La Paz, Bolivia. *Revista Acta Nova*, 3 (2), 286-307.

Cantón, E., Martín, E., y Espinel-Ingroff, A. (2007). Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documento M27-A3, M38-A, M44-A). *Revista Iberoamericana de Micología*. Disponible en <http://www.guia.reviberoammicol.com/Capitulo15.pdf> [Consulta: 12/11/13].

Chand, P., Singh, M., y Rai, M. (2009). Antibacterial activity of some Indian lichens. *Journal of Ecophysiology & Occupational Health*, 9 (2), 23-29.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2008). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A3.

Coutiño, B., y Montañez, A. (2000). Los líquenes. *Ciencias* 59. 64-65.

Cuenca-Estrella, M. (2010). Antifungicos en el tratamiento de las infecciones sistémicas: importancia del mecanismo de acción, espectro de actividad y resistencias. *Revista Española de Quimioterapia*, 23(4), 169-176.

Cuenca, M., Alastruey, A., Gómez, A., y Monzón, A. (2013). Estudios de sensibilidad en levaduras: actualización y novedades. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*.; 13 (1), 53-58.

De Aquino Lemos, J., Rodrigues, C., Rodrigues, C., Hasimoto, L y Rodrigues, M. (2009). Susceptibility testing of *Candida albicans* isolated from oropharyngeal mucosa of HIV⁺ patients to fluconazole, amphotericin B and Caspofungin. Killing kinetics of caspofungin and amphotericin B against fluconazole resistant and susceptible isolates. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40 (1), 163-169.

De Bedout, C., Ayabaca, J., Vega, R., Méndez, M., Santiago, Á., Pabón, M y Newell, V. (2003). Evaluación de la susceptibilidad de especies de *Candida* al fluconazol por el método de difusión de disco. *Biomédica*, 23 (1), 31-7.

Dolande, M., Vera, R., Panizo, M., Macero, C., Moreno, C., Calvo, A., Selgrad, S., Papatzikos, J., Vergara, V., y Mendoza, M. (2008). Distribución y sensibilidad a los antifúngicos de aislamientos clínicos de *Candida* en seis centros de salud del área Metropolitana de Caracas, Venezuela (2003-2005). *Revista Iberoamericana de Micología*, 25, 17-21.

Duarte, C., Pulido, N., Rivas, P., Sánchez, R., Cortés, J., Cuervo, S., y Parra, C. (2010). Comparación de métodos de microdilución CLSI M27-A2 y EUCAST en aislamientos de *Candida spp.* en pacientes con cáncer. *Infectio*, 14 (2), 107-115

Eggimann, P., Garbino, J., y Pittet, D. (2003). Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *The Lancet infectious diseases*, 3 (11), 685-702.

Espinel-Ingroff, A., Chaturvedi, V., Fothergill, A., y Rinaldi, M. (2002). Optimal testing conditions for determining MICs and minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for uncommon molds: NCCLS collaborative study. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 3776-3781.

Farci G., Herrera M., Roa F. y Hernández J. (2011). Los Líquenes, curioso matrimonio botánico. Cuaderno de Botánica 1. Editorial, Litocolor. UPEL-IPB. Venezuela, 41

Fernández, C., Martínez, G., Illnait, M., Perurena, M., Águila, A., y Brito, M. (2007). Sensibilidad in vitro de cepas de *Candida* frente a fluconazol y anfotericina B. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 59 (2), 113-118.

Feuerer, T. (2008). *Checklist of lichens and lichenicolous fungi of Venezuela*. Versión 1 May 2008. Disponible en <<http://www.checklists.de>> [consulta: 10/2013].

Fidélis Almeida, J. (2010). Desenvolvimento, caracterização e avaliação da atividade antitumoral de nanocápsulas convencionais e furtivas contendo ácido úsnico. Disponible en <<http://hdl.handle.net/123456789/1673>> [consulta: 12/2015].

Forbes, B., Sahm, D., y Weissfeld, A. (2009). *Diagnostico Microbiológico*. (12a.ed.). Buenos Aires: Medica Panamericana, 696-718.

Francolini, I., Norris, P., Piozzi, A., Donelli, G., y Stoodley, P. (2004). Usnic acid, a natural antimicrobial agent able to inhibit bacterial biofilm formation on polymer surfaces. *Antimicrobial agentes and Chemotherapy*, 48 (11), 4360-4365.

Fuentes, M., Hermosilla, G., Alburquenque, C., Falconer, M. A., Amaro, J., y Tapia, C. (2014). Caracterización de los mecanismos de resistencia a azoles en aislados clínicos chilenos de *Candida albicans*. *Revista chilena de infectología*, 31(5), 511-517.

Gasparoto, T., Dionísio, T., de Oliveira, C., Porto, V., Gelani, V., Santos, C., y Lara, V. (2009). Isolation of *Candida dubliniensis* from denture wearers. *Journal of medical microbiology*, 58 (7), 959-962.

Gómez, J., Baños, V., Simarro, E., Ruiz, J., Requena, L., Pérez, J., y Valdés, M. (2010). Fungemias nosocomiales en un hospital general: epidemiología y factores pronóstico. Estudio prospectivo 1993-1998. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 19 (7), 304-307.

Gómez, J., García, E., Hernández, A., Espinosa, C., y Ruiz, J. (2010). Candidemias nosocomiales: nuevos retos de un problema emergente. *Revista Española de Quimioterapia*, 23 (4), 158-168.

Gregorí Valdés, B. S. (2005). Estructura y actividad de los antifúngicos. *Revista Cubana de Farmacia*, 39 (2), 1-1.

Gualtieri, M., Villalta, C., Guillén, A., Lapenna, E., y Andara, E. (2004). Determinación de la actividad Antimicrobiana de los Extractos de la *Azadirachta Indica* A. Juss (Neem). *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*. 35 (1), 12-16.

Guinea, J., Peláez, T., Recio, S., Torres-Narbona, M., y Bouza, E. (2008). In Vitro Antifungal Activities of Isavuconazole (BAL4815), Voriconazole, and Fluconazole against 1,007 Isolates of Zygomycete, *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Scedosporium* Species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 52 (4), 1396-1400.

Gutiérrez-Martínez, M., Araiza-Santibáñez, J., Hernández, M., Chávez-Mayol, J., Rodríguez-Piñeyro, O., y Bonifaz, A. (2012). Estudio in vitro de antimicóticos contra cepas de *Candida* aisladas de pacientes del Hospital General de México OD. *Dermatol Rev Mex*, 56(2), 93-101.

Hae-Sook, J., László, L., Keon, H., Jung-Ae, R., Jung, K., Young, K., y Jae-Seoun, H. (2009). Isolation of lichen-forming fungi from Hungarian lichens and their antifungal activity against fungal pathogens of hot pepper anthracnose. *The Plant Pathology Journal*, 25 (1), 38-46.

Halama, P., y Van Haluwin, C. (2004). Antifungal activity of lichens extracts and lichenic acids. *BioControl*, 49, 95-107.

Hernández, J. (2012). Líquenes del Herbario Nacional de Venezuela (VEN) y sus muestras tipo. *Acta Botánica Venezuelica*, 33 (2), 363-376.

Ingólfssdóttir, K. (2002). Usnic acid. *Phytochemistry* 61, 729–736.

Illana-Esteban, C. (2009). Líquenes comestibles. *Boletín de la Sociedad Micológica de Madrid*, 33, 273-282.

Illana-Esteban, C. (2012). Líquenes usados en Medicina Tradicional. *Boletín de la Sociedad Micológica de Madrid*, 36, 163-174

Johnson, E. M. (2008). Issues in antifungal susceptibility testing. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61 (1), 13-18.

Kekuda P., Raghavendra H., Swathi D., Venugopal T. y Kanivebagilu S. (2012) Antifungal and cytotoxic activity of Everniastrum cirrhatum (Fr.) Hale. *Chiang Mai Journal of Science* 39 (1), 76-83.

Koneman, E., Allen, S., y Dowell, V. (2008). *Diagnóstico Microbiológico Texto y Atlas a Color* (6a. ed.). USA: Médica Panamericana, 933-948

Kosanić, M., Ranković, B., Stanojković, T., Rančić, A., y Manojlović, N. (2014). Cladonia lichens and their major metabolites as possible natural antioxidant, antimicrobial and anticancer agents. *LWT-Food Science and Technology*, 59(1), 518-525.

Lizcano, L., Viloria-Bernal, M., Vicente, F., Berrueta, L., Gallo, B., Martínez-Cañamero, M., Ruiz-Larrea, M., y Ruiz-Sanz, J. (2012). Lipid Oxidative and Inhibitory Effects and Phenolic Composition of Aqueous Extrats from Medicinal Plants of Colombian Amazonia. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 5454-5467.

Llovera, V. (2010). Prevalencia y sensibilidad de *Candida* spp. a fluconazol en la clínica de la Sociedad Anticancerosa de Maracay, Venezuela. *Vitae: Academia Biomédica Digital*, (44), 3-8.

Lücking, R., y Bernecker-Lücking, A. (2000). Lichen feeders and lichenicolous fungi: do they affect dispersal and diversity in tropical folicolous lichen communities. *Ecotropica*, 6 (1), 23-41.

Lücking, R., Rivas, E., Chaves, J., Umaña, L., y Sipman, H. (2009). How many tropical lichens are there... really. *Bibliotheca Lichenologica*, 100, 399-418.

Manzano-Gayosso, P., Méndez-Tovar, L. J., Hernández-Hernández, F., y López-Martínez, R. (2008). La resistencia a los antifúngicos: un problema emergente en México. *Gaceta Médica de México*, 144 (1), 23-26.

Maldonado, I., Fernández, L., Vivot, W., Domecq, P., Davel, G., y Córdoba, S. (2011). Evaluación de tres métodos para la detección de la sensibilidad *in vitro* de especies de *Candida* a los antifúngicos. *Revista argentina de Microbiología*, 43 (2), 120-126.

Marcos-Zambrano, L., Escribano, P., Recio, S., y Guinea, J. (2013). *Candida* y candidiasis invasora: estudio de la actividad antifúngica *in vitro* de arasertaconazol frente a cepas clínicas de *Candida* y caracterización molecular de cepas productoras de candidemia relacionada con el catéter [en línea]. *Dianas*, 2 (1). Disponible en: e20130301. ISSN 1886-8746 dianas.20130301 URI

Mellado, E., Cuenca-Estrella, M., y Rodríguez-Tudela, J. (2002). Importancia clínica de los mecanismos de resistencia de los hongos filamentosos a los antifúngicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología clínica*, 20 (10), 523-530.

Mitrović, T., Stamenković, S., Cvetković, V., Tošić, S., Stanković, M., Radojević, I., y Marković, S. (2011). Antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of five lichen species. *International journal of molecular sciences*, 12 (8), 5428-5448.

Muggia, L., Schmitt, I., y Grube, M. (2009). Lichens as Treasure chests of natural products. *SIM News*, 59, 85-97.

Mujica, T., Finguelievich, L., Jewtuchowicz, V., y Iovannitti, C. (2004). Prevalencia de *Candida albicans* y *Candida no albicans* en diferentes muestras clínicas: Período 1999-2001. *Revista Argentina de Microbiología*, 36 (3), 107-112.

Nash III, T., Ryan, B., Diederich, P., Gries, C., y Bungartz, F. (2004). Lichen flora of the greater Sonoran Desert region, vol. 2, Most of the microlichens, balance of the macrolichens, and the lichenicolous fungi. Lichen Unlimited, Tempe, Arizona, USA. microbial growth inside the historic huts of Ross Island, Antarctica. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 55, 45-53.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2002). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing for yeasts; approved standard

NCCLS document M27-A2. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standard.

Oksanen, I. (2006) Ecological and biotechnological aspects of lichens. *Application Microbiology Biotechnology*, 73, 723-734.

Ortigoza-Medrano E. y Arroyo-Espinosa D, (2014). Susceptibilidad in vitro de las especies de *Candida* a los antifúngicos en el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional de Occidente. *Medicina Interna de México*, 30 (4), 373-380.

Ostrosky-Zeichner, L., y Pappas, P. G. (2006). Invasive candidiasis in the intensive care unit. *Critical care medicine*, 34 (3), 857-863.

Parella, S., y Martins, F. (2010). *Metodología de la Investigación Cuantitativa*. (3a. ed.). Caracas: FEDUPEL.

Plaza, C. (2015). Identificación y estudio de actividades biológicas de nueve especies de líquenes, colectadas en el estado Mérida. Venezuela: Universidad de Los Andes (datos no publicados).

Perry, N., Benn, M., Brennan, N., Burgess, E., Ellis, G., Galloway, D., Lorimer, S., y Tangney, R. (1999). Antimicrobial, antiviral and Cytotoxic activity of New Zealand lichens. *Lichenologist*, 31, 627-636.

Ramírez, A., y Cano, A. (2005). Líquenes de Pueblo Libre, una localidad andina en la Cordillera Negra (Huaylas, Ancash, Perú). *Revista Peruana de Biología*, 12 (3), 383-396.

Ramírez L. y Marín D. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica XV* (42), 263-268.

Ranković, B., Mišić, M., y Sukdolak, S. (2007). Evaluation of Antimicrobial Activity of the Lichens *Lasallia pustulata*, *Parmelia sulcata*, *Umbilicaria crustulosa*, and *Umbilicaria cylindrica*. *Experimental Articles*, 76 (6), 723-727.

Ranković, B., Mišić, M., y Sukdolak, S. (2009). Antimicrobial activity of extracts of the lichens *Cladonia furcata*, *Parmelia caperata*, *Parmelia pertusa*, *Hypogymnia physodes* and *Umbilicaria polyphylla*. *Biologia*, 64 (1), 53-58.

Ranković, B., Rankovic, D., y Maric, D. (2010). Antioxidant and antimicrobial activity of some lichen species. *Microbiology*, 79 (6), 809-815.

Ranković, B., Kosanić, M., y Stanojković, T. (2011). Antioxidant, antimicrobial and anticancer activity of the lichens *Cladonia furcata*, *Lecanora atra* and *Lecanora muralis*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11 (97), 1-8.

Ribeiro S., Pereira E., Buarque-Guzmão N., Falcão E. y Da-Silva N. (2006). Produção de metabólitos bioactivos pelo liquen *Cladonia substellata* Vainio. *Acta Botanica Brasilica*, 20 (2), 265-272.

Sancho, L., y Pintado, A. (2011). Ecología vegetal en la Antártida. *Revista Ecosistemas*, 20 (1), 42-53.

Shahi, M, Shahi, S y Upreti, D. (2012). Broad spectrum antifungal activity of Indian lichen *Peltigera praetextata* extract to control fungal infections. *Current Discovery*, 1 (1), 1-6.

Shukla, V., Joshi, G. y Rawat, M. (2010). Lichens as a potential natural source of bioactive compounds: a review. *Phytochemistry Reviews*, 9 (2), 303-314.

Silva, V., Díaz, M., y Febré, N. (2002). Vigilancia de la resistencia de levaduras a antifúngicos. *Revista Chilena de Infectología*, 19, 149-156.

Swathi, D., Suchitha, Y., Prashith, T., Venugopal, T., Vinayaka, K., Mallikarjun, N., y Raghavendra, H. (2010) Antimicrobial, antihelminthic and insecticidal activity of a macrolichen *Everniastrum cirrhatum* (FR.) Hale. *International Journal of Drug Development and Research*, 2 (4), 780-789.

Tapia, C. (2009). Actualización en pruebas de susceptibilidad antifúngica. *Revista Chilena de Infectología*, 26 (2), 144-150.

Tapia, C. (2012). Antifúngicos y resistencia. *Revista chilena de infectología*, 29 (3), 357-357.

Tay, T., Turk, A., Yilmaz, M., Turk, H., y Kivanc, M. (2004). Evaluation of the antimicrobial activity of the acetone extract of the lichen *Ramalina farinacea* and its (+)-usnic acid, norstictic acid, and protocetraric acid constituents. *Zeitschrift fur Naturforschung C-Journal of Biosciences*, 59 (5-6), 384-388.

Thadhani, V., Choudhary, M., Khan, S., y Karunaratne, V. (2012). Antimicrobial and toxicological activities of some depsides and depsidones. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*, 40 (1), 43-48.

Tiwari, P., Rai, H., Upreti, D., Trivedi, S., y Shukla, P. (2011). Assessment of antifungal activity of some Himalayan foliose lichens against plant pathogenic fungi. *American Journal of Plant Sciences*, 2, 841- 846.

Tiwari, P., Rai, H., Upreti, D. K., Trivedi, S., y Shukla, P. (2011). Antifungal Activity of a Common Himalayan Foliose Lichen *Parmotrema tinctorum* (Despr. ex Nyl.) Hale. *Nature and Science*, 9 (9), 167-171.

Torres, N., Álvarez, C., y Rondón, M. (2009). Evaluación mediante tres técnicas de susceptibilidad a fluconazol en especies de *Candida* aisladas en pacientes con infecciones invasoras: Bogotá-Colombia. *Revista Chilena de Infectología*, 26 (2), 135-143.

Tortora, G., Funke, B., y Case, C. (2007). *Introducción a la microbiología*. (9a. ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana.

Ugalde, C. (2008). *Prevalencia de especies de Cándida en la cavidad oral de pacientes diabéticos tipo 2*. Granada: Universidad de Granada.

Verma, N., Behera, B., Parizadeh, H., y Sharma, B. (2011). Bactericidal Activity of Some Lichen Secondary Compounds of *Cladonia ochrochlora*, *Parmotrema nilgherrensis* & *Parmotrema sancti-angelii*. *International Journal of Drug Development & Research*, 3 (3), 222-232.

Vera E., Salvucci E., Sesma F. y Nader-Macías M. (2007). Different strategies for purification of antimicrobial peptides from Lactic Acid Bacteria (LAB). *Communicating Current Research and Educational. Topics and Trends in Applied Microbiology* A. Méndez-Vilas (Ed.) Formatex 557-568.

Yavúz, M. (2012). Lichens mentioned by pedanios dioscorides. *Ethno Med*, 6 (2), 103-109.

Yilmaz, M., Ozdemir, A., Tay., y T, Kivanc. (2004) The antimicrobial activity of extracts of the lichen *Cladonia foliacea* and its (-)-Usnic acid, atranorin, and Fumarprotocentric acid Constituents. *Zeitschrift fur Naturforschung*, 59, 249-254.

Yucel, O., Odabasoglu, F., Gulluce, M., Zeki, Z., Çalik, A. Ç., Aslan, A. y Halici, M. (2007). Antioxidant and antimicrobial properties of a lichen species, *Cladonia rangiformis* growing in Turkey. *Turkish J. Pharm. Sci*, 4 (2), 101-109.