

REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA  
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS  
ESCUELA DE BIOANÁLISIS  
MÉRIDA EDO. MÉRIDA

**ESTUDIO *in vitro* DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS  
VEGETALES DE *Hura crepitans* L. (EUPHORBIACEAE) SOBRE  
CEPAS DE *Candida albicans***

(Trabajo de Grado para optar al título de Licenciada en Bioanálisis)

**Autora:** Azuaje P. Mariangel C.

**Tutora:** MSc. Silvana B. Villarreal R.

**Cotutor:** Dr. Luis B. Rojas Fermín

MÉRIDA, SEPTIEMBRE DEL 2016

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por ser maravilloso, el que me da la fuerza y fe necesaria para mostrarme que lo imposible era posible de culminar, por mantenerme con ánimo de pie en esta lucha, aunque en momentos olvide que con mucho esfuerzo todo se puede.

A mi tutora; sin palabras para describir a un ser humano que entre todas las imperfecciones es perfecta, su constancia, amor, dedicación, consejos y conocimientos, su manera de trabajar, pero sobre todo por confiar en mí. No dejarme sola en este camino, por mostrarme las puertas más grandes para el éxito, a ti Silvana Villarreal gracias por ser mi guía y mi ejemplo a seguir.

A Luis Rojas; por darme la oportunidad de ser mi cotutor, por brindarme la confianza de trabajar en su laboratorio, estar allí en las buenas y en las malas, siempre con un regaño o un consejo acertado, pues de eso se crece y se es mejor persona. Por ello estaré siempre agradecida sin usted esto no sería posible.

A Clara Díaz; hay personas en la vida que tienen que llegar a nuestras vidas para enseñar algo fundamental y único, indudablemente en esto esa es usted, conocimientos puros y únicos, sin contar el apoyo transmitido en los momentos más difíciles. Gracias totales.

Al Ingeniero Juan Carmona; quien dedicó su tiempo a la localización, identificación taxonómica y recolección de la especie estudiada, siempre comprometido conmigo y mi proyecto.

Al Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, por abrirme las puertas y hacerme sentir lo

---

más cómoda en aquellos largos y tediosos trabajos para la obtención de los extractos de la planta estudiada.

A todas aquellas personas, que de una manera u otra han estado presentes, mis más sentidas palabras para agradecer la ayuda en esta meta cumplida.

Un verdadero amigo es alguien que te conoce tal como eres, comprende donde has estado, te acompaña en tus logros y fracasos, celebra tus triunfos, alegrías, comparte tu dolor y jamás te juzga por tus errores. Dios te puso en mi camino y sin ti indudablemente nada de esto sería posible. Aquí y en otra vida miles de gracias Dessire Rodríguez.

**¡Gracias!**

www.bdigital.ula.ve

## DEDICATORIA

A Dios todo poderoso y a la Virgen de Coromoto; quienes iluminaron mi mente y caminos para llegar donde estoy, escoger esta carrera y convertirme en Bioanalista. Siempre guiándome y llevándome por el camino del bien con los mejores valores.

A mis padres; Madre esto no es mas de nadie que tuyo, por ti y para ti, nunca dejaste de confiar en mí, esos regaños, charlas, consejos, no fueron de gratis sin eso no sería la mujer que soy hoy en día, esos valores tan apreciados que me transmitiste y la humildad necesaria para avanzar en mis caídas y aceptar mis errores, mi mayor ejemplo a seguir en esta vida, pues quiero ser como tú.

Padre que desde el Cielo has sido mi ángel, me dabas fuerzas para no desmayar en los momentos y caminos más difíciles, sabiendo que deseabas verme graduada. Dije en vida que confiaras en mí, hoy no estás físicamente para verlo pero sé que desde el cielo sonrías conmigo, sin esa fuerza que me envías no podría haberlo logrado, también sé que cada persona extraordinaria que está en mi camino es un complot entre Dios y tú, para que desde arriba estés orgulloso de mí y me veas sonreír diciendo ¡lo logre! Te extraño más que nunca.

A mis hermanos Rafa y Carlos; sin ustedes esto no tendría sentido así que no sería real. Gracias por siempre estar allí y por su amor son mis más grandes inspiraciones. ¡Los adoro!

A mis tíos Eduardo Ciangherotti y Omaira Franco de Ciangherotti: mis segundos padres, el papá que me queda vivo, gracias por creer en mí en todo momento, por estar en los momentos buenos y malos, en las alegrías y

---

en las adversidades, nunca dejándome caer diciéndome que la salida era hacia delante, esto también es de ustedes.

A mis primos Adriana, Carlos y Radames, mis otros hermanos, sin su amor y consejos de que lo difíciles es lo que vale la pena, no podría haber llegado a la meta. ¡Gracias!

A mis compañeros de estudios, que con su amor y paciencia me hicieron llegar hasta aquí.

A todos ustedes muchísimas gracias, sin palabras y eternamente agradecida.

**Mariangel Azuaje**

www.bdigital.ula.ve

## INDICE GENERAL

	Pp.
LISTA DE ESQUEMAS.	
LISTA DE TABLAS.	
LISTA DE FIGURAS.	
RESUMEN.	
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULOS.	
I. EL PROBLEMA.	
Planteamiento del Problema.....	4
Objetivos de la Investigación.	
Objetivo General.....	7
Objetivos Específicos.....	7
Justificación de la Investigación.....	8
II. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL.	
Antecedentes de Trabajos Previos.....	10
Antecedentes Históricos Epistemológicos.....	14
Bases Teóricas.	
Familia <i>Euphorbiaceae</i> .....	16
Características Botánicas y Distribución Geográfica de la Familia <i>Euphorbiaceae</i> .....	17
Usos Medicinales de la Familia <i>Euphorbiaceae</i> .....	18
Composición Química de las <i>Euphorbiaceae</i> .....	19
Terpenoides .....	22
Esteroles.....	22
Flavonoides.....	24
Lignanos.....	24
Alcaloides.....	25

Género *Hura* L.

Características Botánicas del Género <i>Hura</i> L. ....	26
Fitoquímica y Usos Tradicionales del Género <i>Hura</i> L.....	27
Especie <i>Hura crepitans</i> L .	
Características Botánicas y Distribución Geográfica de la Especie <i>Hura crepitans</i> L.....	28
Usos tradicionales de la Especie <i>Hura crepitans</i> L. ....	31
Extractos Vegetales.....	31
Consistencia de los Extractos.....	32
<i>Extractos Blandos</i> .....	32
<i>Extractos Firmes</i> .....	32
<i>Extractos Secos</i> .....	32
<i>Extractos Fluidos</i> .....	32
Obtención de los Extractos Vegetales.....	33
<i>Maceración</i> .....	33
<i>Percolación</i> .....	33
Propiedades Antifúngicas de los Extractos Vegetales.....	33
Actividad Antifúngica.....	34
Mecanismo de Acción Antifúngica Sobre la Membrana Celular del Hongo.....	34
<i>Polieno</i> .....	36
<i>Azoles</i> .....	36
<i>Alilaminas</i> .....	36
Mecanismo de Acción Antifúngica Sobre el Núcleo de la Célula Fúngica.....	36
<i>Antimetabolitos</i> .....	36
<i>Agentes Misceláneos</i> .....	37
Hongos.....	37
Mecanismo de Acción de los Hongos.....	38

Género <i>Candida</i> .....	38
<i>Candida albicans</i> .....	40
Diagnóstico de Laboratorio.....	41
<i>Examen Directo</i> .....	41
<i>Cultivos</i> .....	41
<i>Pruebas de Identificación</i> .....	42
<i>Producción de Clamidoconidias</i> .....	42
<i>Auxonograma</i> .....	42
Hipótesis.....	43
Operacionalización de las Variables.....	44
III. MARCO METODOLÓGICO.	
Enfoque de la Investigación.....	45
Tipo de Investigación.....	45
Diseño de la Investigación .....	46
Población y Muestra .....	46
Procedimientos de la Investigación.	
Obtención de los Extractos a Partir de las Hojas de <i>Hura</i> <i>crepitans</i> L.....	48
Evaluación de la Actividad Antifúngica del <i>Hura crepitans</i> L.....	50
<i>Cepas</i> .....	50
<i>Materiales Utilizados</i> .....	50
<i>Impregnación de los Discos</i> .....	50
<i>Preparación del Inoculo Fúngico</i> .....	50
<i>Preparación de las Placas e Inoculación</i> .....	51
<i>Pre-incubación e Incubación</i> .....	51
<i>Lectura del Ensayo</i> .....	51
<i>Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)</i> .....	53
Screening Fitoquímico del Extracto con Actividad	

Antifúngico .....	53
<i>Determinación de Flavonoides</i> .....	54
<i>Identificación de Saponinas</i> .....	54
<i>Ensayo para Alcaloides (Prueba de Dragendorff)</i> .....	55
<i>Identificación de Triterpenos y Esteroides</i> .....	55
Organización de la Información.....	55
IV. RESULTADOS Y DISCUSION.	
Evaluación de la Actividad Antifúngica de <i>Hura crepitans</i> L....	56
Screening Fitoquímico del Extracto Etanólico con Actividad Antifúngica de <i>Hura crepitans</i> L.....	60
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	
Conclusiones.....	62
Recomendaciones.....	63
APÉNDICE.	
Glosario de Términos Botánicos .....	64
REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS.....	68

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema	Pp.
1 Clasificación Taxonómica de la Familia Euphorbiaceae.....	18
2 Clasificación Taxonómica del Género <i>Hura</i> L.....	27
3 Clasificación Taxonómica de la Especie <i>Hura crepitans</i> L.....	30
4 Taxonomía del Género <i>Candida</i> .....	39
5 Taxonomía del Género <i>Candida albicans</i> .....	40
6 Preparación de los Extractos Crudos de <i>Hura crepitans</i> L.....	49
7 Preparación del Inoculo Fúngico .....	51
8 Análisis Antifúngico y Lectura de los Halos de Inhibición.....	52
9 Camino Metodológico.....	56

www.bdigital.ula.ve

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Pp.
1	Usos Medicinales de Especies de la Familia Euphorbiaceae.....	20
2	Nombres Comunes de <i>Hura crepitans L.</i> .....	30
3	Evaluación de la Actividad Antifúngica de los Extractos Vegetales.....	35
4	Operacionalización de las Variables.....	44
5	Concentraciones de los Extractos Vegetales de <i>Hura crepitans</i> .....	57
6	Actividad Antifúngica de los Extractos Vegetales de <i>Hura crepitans L.</i> , (Euphorbiaceae). .....	57
7	Tamizaje Fitoquímico del Extracto Etanólico de las Hojas de <i>Hura crepitans L.</i> , (Euphorbiaceae).....	60

www.bdigital.ula.ve

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Pp.
1 Molécula de Isopreno.....	22
2 Esteroles en Especie de Euphorbiaceae.....	23
3 Flavonoles en Géneros de la Familia Euphorbiaceae.....	24
4 Lignanós en Géneros de la Familia Euphorbiaceae.....	25
5 Alcaloides en Géneros de la Familia Euphorbiaceae.....	26
6 Diterpeno Aislado de <i>Hura polyandra</i> Baill.....	28
7 Ejemplar de la Especie <i>Hura crepitans</i> L. (Euphorbiaceae).....	47
8 Corrida de los Compuestos Presentes en el Extracto Etanólico de las Hojas de <i>Hura crepitans</i> L.....	54
9 Determinación de la Actividad Antifúngica contra <i>Candida albicans</i> CDC 385 por el Método de Difusión en Agar con Discos.....	58
10 Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) del Extracto Etanólico de <i>Hura crepitans</i> L., (Euphorbiaceae) por el Método de Difusión en Agar con Discos contra <i>Candida albicans</i> .....	58

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES

ESTUDIO *in vitro* DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS  
VEGETALES DE *Hura crepitans* L. (EUPHORBIACEAE) SOBRE  
CEPAS DE *Candida albicans*  
(Trabajo de Grado)

Autora: Azuaje P. Mariangel  
Tutora: MSc. Villarreal R. Silvana  
Cotutor: Dr. Rojas F. Luis  
Fecha: Septiembre, 2016

### RESUMEN

Una de las micosis que afecta con mayor frecuencia a los individuos a nivel mundial es la candidiasis, causada por *Candida albicans*, la cual es una levadura oportunista que forma parte de la microbiota habitual del organismo, siendo de gran interés su estudio para diferentes investigadores, ya que se busca encontrar cual es el tratamiento más eficaz para contrarrestar las diferentes afecciones causadas por esta levadura. Dentro de los diferentes estudios realizados para solventar la problemática de salud causada por *C. albicans* se han tomado en cuenta diferentes plantas que poseen actividad antifúngica, encontrándose las especies que forman parte de la familia Euphorbiaceae. Dicho esto, en la presente investigación se evaluó la actividad antifúngica *in vitro* de los extractos hexanoico, etanólico y acetónico obtenidos de las hojas de *Hura crepitans* L., árbol utilizado generalmente como una planta ornamental. El estudio se realizó por el método de difusión en agar con discos (Kirby-Bauer) para obtener la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) contra cepas CDC 385 de *C. albicans* pertenecientes al cepario del Laboratorio de Micología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, arrojando como resultado que los extractos hexanoico y acetónico no poseen actividad, pero el extracto etanólico presentó actividad antifúngica en las diferentes diluciones realizadas contra *C. albicans*, teniendo así una CIM de <20 mg/μL. Asimismo, se realizó el screening fitoquímico del extracto etanólico, encontrándose saponinas y esteroides, teniendo en cuenta que este tipo de compuestos coinciden con la fitoquímica de la planta en estudio. Cabe destacar que este es el primer reporte sobre el estudio de la actividad antifúngica de las hojas de esta especie vegetal.

**Palabras clave:** Actividad antifúngica, extractos vegetales, *Hura crepitans*, Euphorbiaceae, *Candida albicans*.

## INTRODUCCIÓN

El hombre durante su evolución ha hecho uso de los recursos naturales a los fines de satisfacer necesidades básicas como alimento, vivienda y vestido. La introducción de especies animales y vegetales a nuevas regiones desde hace siglos, ha contribuido exitosamente con la ampliación de la distribución geográfica de las mismas y han sentado las bases de la economía de muchos países. En lo que respecta a la diversidad biológica, Venezuela se encuentra posicionada entre los diez primeros países megadiversos del planeta y es el sexto de América Latina. Solamente en plantas posee un total de 16.575 especies identificadas de las cuales, las angiospermas o plantas con flores (monocotiledóneas y dicotiledóneas), son el grupo numéricamente más importante con 14.292 especies identificadas, ocupando el octavo lugar en riqueza de especies de plantas superiores entre todos los países megadiversos (Gordon y Pardo, 2012).

Las plantas medicinales proporcionan estructuras simples o complejas con actividad biológica de gran interés terapéutico; constituyéndose en una fuente importante de medicamentos, las cuales han formado la base de los sistemas tradicionales de medicina, y por ende han existido cientos de años (Fachín, López, Arzubialdes, Gutiérrez y Alva, 2012). Es por ello, que se quiso entrar en el área con el aporte acerca de una Familia tan importante económicamente para el hombre como es la Euphorbiaceae, ya que es una de las familias botánicas mejor representadas en la región Andina (Webster, 2001).

Los compuestos bioquímicos de la familia Euphorbiaceae son muy diversos y especialmente ricos en alcaloides y terpenoides, que les confieren actividad tóxica (Webster, 2001). Estudios etnobotánicos revelan que en la medicina tradicional se hace uso de plantas de esta familia (Kala, Dhyani y

Sajwan, 2006; Muthu, Ayyanar, Raja y Ignacimuthu, 2006; Oryema, Bukenya-Ziraba, Omagor y Opio, 2010), ya que es una de las angiospermas más diversas en hábito, hábitat y morfología (Babillo y Schnee, 1965).

Por consiguiente es importante para el país conocer y estudiar esta diversidad para desarrollar su potencial por medio de diferentes disciplinas científicas, cuyo motivo nace del proceso de desarrollo del conocimiento, en la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes por medio del Instituto de Investigaciones, bajo la línea de investigación de actividad biológica y estudio fitoquímico de plantas medicinales. Es por ello que se evaluó la actividad antifúngica *in vitro* de extractos crudos de la especie *Hura crepitans* L.

Por su parte la especie *Hura crepitans* L., perteneciente a la familia Euphorbiaceae descrita por Carlos Linneo es conocido como jabillo, un árbol de gran tamaño con tronco espinoso y un látex venenoso, usado como árbol ornamental y de sombra. Su madera de es buena calidad, pero es poco utilizada en el área de carpintería o construcción ya que al tener contacto con la piel puede producir irritaciones o ulceraciones debido a la gran toxicidad que presenta el látex (Hoyo, 1979). Se han realizado diversos estudios fitoquímicos de *Hura crepitans* L., (David, Ojo, Olumekun y Famurewa, 2014; Nasiru, Adekunle y Olufemi, 2013; Nwanorh, 2000) que demuestran el potencial de esta planta y mediante esta investigación se pretende contribuir a un mayor conocimiento y uso de los extractos crudos de dicha especie, evaluando su actividad antifúngica mediante el método de difusión en agar con discos, ya que el látex que se encuentra presente en la planta es toxígeno para organismos vivos.

Con respecto a los hongos u organismos fúngicos, son característicos por presentar cualidades diferentes a cualquier otro organismo en el mundo. Estos por ser inmóviles y por tener una pared celular, anteriormente se

encontraban en el reino *Plantae*, hoy en día están dentro de la clasificación *Fungi*. A nivel mundial se pueden encontrar diferentes especies de hongos, bien sea comestibles, tóxicos o patógenos, teniendo mayor relevancia en los estudios experimentales aquellos hongos capaces de causar patologías en los seres humanos (Curtis y Schnek, 2008). Uno de los hongos patógenos más común en el mundo es la *Candida* sp., organismo con estructura levaduriforme que se divide por gemación. Dentro del género *Candida* se encuentran diferentes especies como la *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* entre otras (Net y Quintana, 1997).

Dentro de este marco, la *Candida albicans* es el patógeno oportunista aislado con mayor frecuencia en sector hospitalario, se considera un patógeno oportunista ya que forma parte de la flora habitual de los individuos, representando un 60% de las candidiasis. Este microorganismo puede afectar a individuos sanos con diagnósticos alentadores y a individuos inmunosuprimidos que si no se tratan a tiempo puede causar patologías letales (Net y Quintana, 1997).

Debido a lo anteriormente descrito, en la presente investigación se planteó estudiar la actividad antifúngica *in vitro* de extractos crudos de las hojas de *Hura crepitans* L. (Euphorbiaceae) sobre cepas de *Candida albicans* en Mérida-Venezuela.

## CAPITULO I

### EL PROBLEMA

#### Planteamiento del Problema

La investigación realizada por Taborda, Acevedo, Patiño, Forero y López (2007) titulada: Actividad antiviral *in vitro* de extractos de *Hura crepitans* y *Codiaeum variegatum* en la replicación del Herpes Virus Bovino Tipo-1 (BHV-1B) y Virus de Estomatitis Vesicular (VSV), para la revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, cuyo objetivo fue determinar la actividad biológica (actividad citotóxica (AC) y antiviral (AAV)) de las hojas de *Hura crepitans* y *Codiaeum variagatum*, usando cuatro extractos de estas (hexánico, en acetato de etilo, metanólico y acuoso), observándose que los cuatro extractos utilizados presentaron actividad antiviral contra el VSV, pero los extractos hexánico, en acetato de etilo y metanólico de *H. crepitans* confirieron resistencia a la infección por BHV-1B. Lo que quiere decir que pueden existir compuestos en el extracto hexánico de *H. crepitans* con una actividad antiviral positiva.

Por otra parte, Gómez (2010) realizó una revisión sobre la resistencia de las levaduras del género *Candida* al fluconazol, publicada en la Revista INFECTIO, esta investigación se realizó en la Unidad de Infectología del Hospital Universitario San Ignacio, Bogotá-Colombia, la cual tuvo como objetivo describir los mecanismos de resistencia que presenta *Candida sp.*, al fluconazol, el factor de riesgo y el reto terapéutico que representa dicha resistencia. Específicamente la resistencia de *Candida albicans* al fluconazol

representa el 3 % con variaciones regionales y locales importantes, siendo el continente africano con mayor índice de infección por *Candida albicans*. En esta investigación se tomaron 56 pacientes con candidiasis oral pseudomembranosa con infección por VIH/Sida, y se encontró resistencia al fluconazol en un 20,8 % para *Candida sp.*, y 6,3 % con patrón Sensible Dosis Dependiente (SDD), lo que significa que la resistencia que presenta este tipo de levadura no es prevalente, de acuerdo con la bibliografía mundial los mecanismos de resistencia de *Candida* va a depender de qué tipo de patología presenta la persona, siendo las más afectadas aquellas que tengan inmunosupresión o enfermedades neoplásicas.

Asimismo, Silva, Díaz y Febre (2002), publicaron en la revista Chilena de Infectología un artículo titulado: Vigilancia de la resistencia de las levaduras a antifúngicos, el cual tuvo como objetivo conocer a profundidad que especie del género *Candida sp.*, presentaba mayor resistencia antifúngica en pacientes internados en Unidad de Cuidados Intensivo, observándose que *Candida albicans* es la especie más relevante de este género en cuanto a resistencia se refiere. En esta investigación se estudió la presencia de *Candida* en las manos de personas que trabajan en el área de la salud, arrojando como resultados que en los médicos la presencia de esta levadura se encuentra en un 20 % y el otro 80 % está presente en las manos del personal de enfermería.

Posteriormente, la investigación realizada por Pardo, Arenas, Gómez, Lora y Gómez J. (2011) titulada: Determinación de la actividad antifúngica de extractos de *Lantana camara* frente a *Candida spp.*, reportaron que a pesar de que la sensibilidad a los antifúngicos, especialmente al fluconazol es alta para la *C. albicans*, otras especies presentan baja sensibilidad a los antifúngicos utilizados tradicionalmente, por ello es de vital importancia

encontrar nuevos antifúngicos. Una de las estrategias para identificar estos nuevos compuestos con propiedades antifúngicas es a través del estudio de los metabolitos secundario de las plantas, los cuales son fuente de principios activos de medicamentos y de otros valiosos productos químicos. La investigación demostró la presencia de flavonoides en el tallo y las hojas de *Lantana cámara* con actividad antifúngica contra *C. albicans*, *C. dublinensis*, *C. guillermondii* y *C. krusei*

Finalmente, el trabajo realizado por Mathey y Van Dijck (2013), publicado en la revista Curr Genetic, una investigación de revisión titulada: Conocimientos recientes en *Candida albicans* biofilm y sus mecanismos de resistencia, el cual tuvo como objetivo observar cómo se comportaba este hongo en ambientes bióticos y abióticos, y conocer si por medio del biofilm la *Candida albicans* presenta resistencia antifúngica, demostrándose que este tipo de levadura son menos sensibles a la destrucción por componentes de del sistema inmune.

En busca de indagar en lo anteriormente descrito, en la presente investigación se estudió la actividad antifúngica *in vitro* de extractos vegetales de las hojas de la especie *Hura crepitans* L., (Euphorbiaceae) en Mérida – Venezuela, contra cepas de *Candida albicans* y debido a ello se formuló la siguiente interrogante:

- ¿Qué actividad antifúngica *in vitro* presentará los extractos crudos (hexano, acetona y etanol) de las hojas de la especie *Hura crepitans* L., en cepas de *Candida albicans*, a través del método de difusión en agar con discos?

## **Objetivos de la Investigación**

### **Objetivo General**

Estudiar la actividad antifúngica *in vitro* de extractos vegetales de las hojas de *Hura crepitans* L., (Euphorbiaceae) sobre cepas de *Candida albicans* en Mérida – Venezuela.

### **Objetivos Específicos**

- Recolectar las hojas de *Hura crepitans* L., en el Jardín Botánico de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes en el Estado Mérida.
- Obtener los extractos crudos hexánico, acetónico y etanólico de las hojas de *Hura crepitans* L.
- Estudiar la actividad antifúngica *in vitro* de los extractos vegetales obtenidos de *Hura crepitans* L., a través del método de difusión en agar con discos frente a cepas de *Candida albicans*.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto crudo con actividad antifúngica sobre cepas de *Candida albicans*.
- Determinar la presencia o ausencia de los principales grupos de metabolitos de la especie estudiada a través del tamizaje fitoquímico preliminar.
- Correlacionar la composición fitoquímica de las hojas de *Hura crepitans* L., y su actividad antifúngica.

## **Justificación de la Investigación**

Diversas razones justifican el estudio farmacológico y fitoquímico de las plantas medicinales. El Grupo de Productos Naturales de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, ha venido desarrollando una línea de investigación que pretende estudiar la flora de la región andina desde un punto de vista fitoquímico y biológico, debido a la gran diversidad de plantas que esta región posee. Se busca encontrar datos farmacológicos que validen su uso en la medicina tradicional, y dar a conocer los efectos adversos que pudieran producir algunas plantas de uso común.

A través del estudio biológico de las plantas, se podría determinar cuál es el principio activo que produce la acción, o si existe un sinergismo entre sus compuestos, cuál es su margen de seguridad, así como el de las sustancias que le acompañan. A pesar de la amplia disponibilidad de antifúngicos para diversos tratamientos de enfermedades causadas por hongos, en ocasiones la sintomatología no desaparece, produciéndose la denominada resistencia.

La intención de la actual investigación es determinar la actividad antifúngica *in vitro* de una especie de los Andes Venezolanos como es *Hura crepitans* L., ya que especies de su misma familia han sido estudiadas preliminarmente por tener principios activos de importancia médica. Con la finalidad de conseguir una opción terapéutica ante alguna afección posiblemente causada por agentes micóticos.

Por lo tanto, está investigación se planteó ya que en la literatura consultada se ha señalado que la composición química de las hojas de *Hura*

*crepitans* L., puede actuar como agente tóxico en diferentes organismos y microorganismos, lo que hace interesante el análisis de dicha especie arbórea para comprobar si posee actividad antifúngica sobre uno de los hongos oportunistas más común en el planeta, como lo es *Candida albicans*.

Siendo un gran aporte para la industria farmacéutica al momento de desarrollar posibles tratamientos antifúngicos, utilizando como principio activo los diferentes grupos de compuestos encontrados en la especie y así contribuir con nuevos avances científicos y farmacológicos que permitan contrarrestar diagnósticos micológicos eficazmente.

www.bdigital.ula.ve

## CAPITULO II

### MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

#### Antecedentes de Trabajos Previos

Adewuyi, Göpfert, Wolff, Rao y Prasad (2012), publicaron en la revista ISRN Organic Chemistry una investigación titulada: Síntesis de Azidohydrin de *Hura crepitans*. Aceite de Semilla: Un recurso renovable para la Industria Oleoquímica y Desarrollo Sostenible, el cual tuvo como objetivo evaluar si el aceite de semilla de *Hura crepitans* podía ser utilizado como recurso renovable en la industria oleoquímica, debido a la gran demanda de productos a base de esta materia prima, tomando en cuenta que el aceite extraído de la semilla de *Hura crepitans* se caracteriza por un índice de yodo de  $120,10 \pm 0,70$  g de yodo/100 y un índice de saponificación de  $210,10 \pm 0,40$  mg KOH/g con el ácido graso predominante siendo C18: 2 ( $52,8 \pm 0,10$  %). Los ésteres metílicos de ácidos grasos epoxidados preparados a partir del aceite se utilizaron para sintetizar el azidohydrin con un rendimiento de 91,20 %, mostrándose así la efectividad que tiene el aceite de semilla de *Hura crepitans* para fabricar productos industriales y domésticos valiosos.

Por su parte, David *et al.*, (2014) en la revista British Journal of Applied Science & Technology publican una investigación titulada: Actividades antimicrobiana de los aceites esenciales de las semillas de *Hura crepitans* (L.), *Monodora myristica* (Gaerth Dunal) y *Xilopia aethiopica* (Dunal A. Rich), cuyo objetivo principal fue investigar las propiedades fisicoquímicas

presentes en las semillas de las especies arbóreas antes mencionadas, utilizando una metodología estandarizada para la determinación de las propiedades fisicoquímicas de dichos aceites, mientras que para evaluar las propiedades antibacteriana y antifúngica se utilizó el método de difusión en agar realizando los ensayos con alimentos envenenados. Consiguiendo unos resultados positivos en cuanto a la actividad antimicrobiana que poseen los aceites esenciales del *Xilopia aethiopica*, mientras que los aceites obtenidos de *Hura crepitans* no fueron tan eficientes, pero aun así presentan propiedades antifúngica y una incidencia menor frente a las propiedades antibacterianas, teniendo una relación directa con la problemática planteada ya que los resultados obtenidos por los científicos pueden servir de guía al momento de evaluar el comportamiento de las cepas fúngicas a ensayar.

Por otra parte, el *Hura crepitans* L., es un árbol considerado como venenoso para las personas debido a la toxicidad de sus semillas y su látex, ambos empleados para combatir afecciones cutáneas, como antileishmanial y antihelmíntico. La actividad antimalárica del látex fue investigada pero esta resultó negativa. La moderada toxicidad mostrada por un extracto de hojas de esta especie en el ensayo de *Artemia salina*, estimuló a evaluar su acción antiplasmodial. El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Hura crepitans* L., mostró muy buena actividad antiplasmodial *in vitro* frente a *P. falciparum* y excelente selectividad. Se ha reportado que en el tamizaje fitoquímico fue consistente con la detección de alcaloides, lactonas, triterpenoides o esteroides (o ambos), fenoles, quinonas, flavonoides, antocianidinas, saponinas y aminoácidos (Fernández *et al.*, 2011). Por otra parte se ha reportado que el aceite esencial aislado de *Hura crepitans* L., posee actividad insecticida (Adedire y Ajayi, 2003).

Los estudios anteriores tienen relación con el problema de esta

---

investigación ya que queda demostrado que el *Hura crepitans* L., tiene componentes biológicos importantes para la realización de diferentes productos, desde el campo clínico hasta el industrial.

Más general, la investigación realizada por Yoc, Soto, Gutiérrez y Arriola (2012), se obtuvieron extractos etanólicos de tres plantas de la familia Euphorbiaceae de consumo humano, como son: *Euphorbia lancifolia*, *Cnidoscolus aconitifolius* var., *mansa* y *Cnidoscolus aconitifolius* var., *estrella*. Se ensayó la actividad antilevadura por el método de dilución en placa, lo cual demostró que ningún extracto inhibe el crecimiento de hongos levaduriformes a concentración de 1 mg/mL. Pero se ha reportado la inhibición de levaduras (*C. albicans* y *C. neoformans*) por el extracto etanólico de *E. lancifolia* en dosis entre 1–10 mg/mL. Con respecto al ensayo antifúngico se realizó para hongos filamentosos, donde el *E. lancifolia* presentó actividad significativa contra el hongo *T. mentagrophytes* y la bacteria *B. subtilis* a una CMI de 1 mg/mL.

Recientemente, en el 2015 la investigación realizada por Fabri, *et al.*, sobre la especie botánica *Manihot multifida* (L.) Crantz (Euphorbiaceae), la cual es ampliamente utilizada en la medicina popular para el tratamiento heridas infectadas. Este estudio evaluó el potencial antimicrobiano de esta especie frente a cepas de bacterias Gram positivas y Gram negativas y hongos, que se sabe causan infecciones en los seres humanos. Los extractos mostraron concentración mínima inhibitoria que varía desde 39 hasta 2.500 g/mL para la actividad antimicrobiana. El extracto metanólico de frutas, extractos acuosos y hexano de hojas mostraron una muy fuerte actividad contra *Candida albicans* (ATCC 18804) con el CMI de 39 mg/mL. Por otra parte, estos resultados corroboran el uso popular de esta especie en el tratamiento de infecciones por hongos ya que demuestra una actividad significativa frente a *C. albicans*.

Finalmente, la investigación realizada por Oloyede y Olatinwo (2014) titulada: Investigación fitoquímica, toxicidad y selección antimicrobiana de aceite esencial y extractos de hojas y corteza de tallo de *Hura crepitans* (Euphorbiaceae) en la revista Academia Arena, señala que el aceite esencial de las hojas fue obtenido por hidrodestilación y el análisis por Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas, donde lograron mostrar la presencia de siete compuestos con el propionato de etilo (39,6 %) y el alcohol isopentil (10,6 %) como componente mayoritarios. El LC<sub>50</sub> obtenido de la prueba de mortalidad de camarón de salmuera indicó que todos los extractos eran tóxicos en grados variados. Con respecto a la actividad antimicrobiana, el extracto de acetato de etilo de la corteza de tallo fue el más activo en la selección antimicrobiana, ya que inhibió el *Aspergillus niger* y *Candida albicans* en todas las concentraciones ensayadas, mostrando una actividad antifungal selectiva en comparación con el tioconazol.

Los estudio anterior, destacan la base bioquímica para el empleo posible de *Hura crepitans* L., en la ethnomedicina, así mismo permite sustentar la metodología seguida en la presente investigación e inferir en los grupos de compuestos químicos encontrados en las hojas de la especie.

## **Antecedentes Históricos Epistemológicos**

La medicina natural o medicina naturista se usa desde la prehistoria, el ser humano que habitaba el mundo en esa época tenía mucho contacto con la naturaleza, y sus costumbres eran adquiridas de otros animales, por ende el tratamiento de las posibles enfermedades que podían padecer lo realizaban con la ingesta accidental o provocada de ciertas especies naturales. Dentro de las comunidades primitivas existían chamanes o sanadores, los cuales eran personas que usaban frutos, flores, plantas medicinales y sustancias orgánicas e inorgánicas para tratar diferentes males o para la realización de ritos curativos (Fonnegra y Jiménez, 2007).

Así mismo Fonnegra y Jiménez (2007), hace referencia a la medicina tradicional china y asiática, como la medicina que usa la flora medicinal desde hace unos 10.000 años. Dentro de esta medicina naturista se han catalogado unas 7.000 especies diferentes y se ha desarrollado un peculiar sistema de tratamiento que se basa más bien en el gusto, el olor y la temperatura de la planta, que en los estudios farmacológicos.

También se puede encontrar la medicina de los griegos y los romanos, donde los personajes más importantes fueron Pitágoras en los años 600 a.C., quien fue el que dejó las primeras indicaciones de la salud, por otra parte encontramos a Hipócrates de Cos en los años 400 a.C., fue quien postuló la teoría de la “Physis” o “Naturaleza Universal”, la cual expone:

Según esta teoría las naturalezas de un hombre, un animal o una planta son únicamente diversificaciones de una Physis universal y cada parte del cuerpo humano es únicamente la diversificación de la Physis del hombre, una estructura de la realidad compuesta de cuatro “elementos primarios”: el aire, el agua, la tierra y el fuego; a los que se añaden cuatro “potencias

fundamentales”: lo caliente, lo frío, lo húmedo y lo seco; y cuatro “elementos secundarios”: la sangre, la pituita o flema, la bilis amarilla y la bilis negra (Fonnegra y Jiménez, 2007: p. 9).

Siendo estos los orígenes de la medicina naturista, posteriormente se mantuvieron estas teorías y salieron a la luz nuevos postulados por parte de diferentes personajes de la historia. Roldán (1999), hizo referencia a la teoría de las signaturas, la cual nace en una época antigua y explica las relaciones que podían tener las formas y color propio de la enfermedad con la posible planta curativa de la misma, ya que se decía que si se encontraba una planta con la misma forma o un color parecido esta podía curar dicha enfermedad. Creencia que muchas veces fallaba, pero esto dio inicio a nuevos avances y conocimientos científicos que superaron la época del empirismo.

Desde la prehistoria hasta la actualidad, se han usado todos los beneficios que brinda la naturaleza para tratar diferentes patologías, ya que este tipo de medicina reduce en un gran porcentaje el riesgo a padecer efectos secundarios cuando se utiliza. Fue entonces a principios de los años noventa, cuando la organización Mundial de la Salud, identifico que el 80 % de la población mundial recurre a la medicina tradicional para asistir problemas de salud, usando principalmente las plantas medicinales (Lorenzo *et al.*, 2008).

## **Bases Teóricas**

### **Familia Euphorbiaceae**

Las especies pertenecientes a la familia Euphorbiaceae han sido de gran interés en la medicina tradicional, ya que es una de las familias de angiospermas más diversas en hábito, hábitat y morfología, las hay para todos los gustos, dado que son tantas y se han adaptado a las más diversas condiciones de vida (Babillo y Schnee, 1965). Presenta cinco subfamilias, 49 tribus, 317 géneros y cerca de 8100 especies distribuidas en todo el mundo, con excepción de las zonas polares, estando mejor representadas en las regiones tropicales y subtropicales (Martínez *et al.*, 2002). En todo el mundo son conocidas como lechetreznas, por la facilidad con que sueltan un líquido lechoso cuando se les corta o lastima (Jones, 1988).

La familia Euphorbiaceae está representada en la farmacopea indígena de América del Sur (Macrae, Hudson y Towers, 1988). Su uso tiene un rango muy amplio; incluyendo el tratamiento de heridas, infecciones de la piel, inflamaciones, como tónico o afrodisíaco y para el tratamiento contra el cáncer (Hartwell, 1969). En esta familia se encuentran diterpenos tóxicos en 14 de los 300 géneros, entre estos: *Aleurites*, *Croton*, *Excoecaria*, *Euphorbia*, *Hippomane*, *Hura*, *Jatropha*, *Sapium*, entre otras. Los compuestos tóxicos generalmente se encuentran en bajas concentraciones (0,05 – 0,1 %), todos son irritantes de la piel y mucosas y su toxicidad por vía oral es importante, tanto en animales como en el hombre (Bruneton, 2001).

Por otro lado, la familia Euphorbiaceae se encuentra subdividida en cinco subfamilias: Acalyphoideae, Crotonoideae, Euphorbioideae, Oldfieldioideae y Phyllanthoideae. La subfamilia Euphorbioideae incluye

cinco tribus: Stomatocalyceae, Hippomaneae, Pachystromateae, Hureae y Euphorbieae (Martínez *et al.*, 2002).

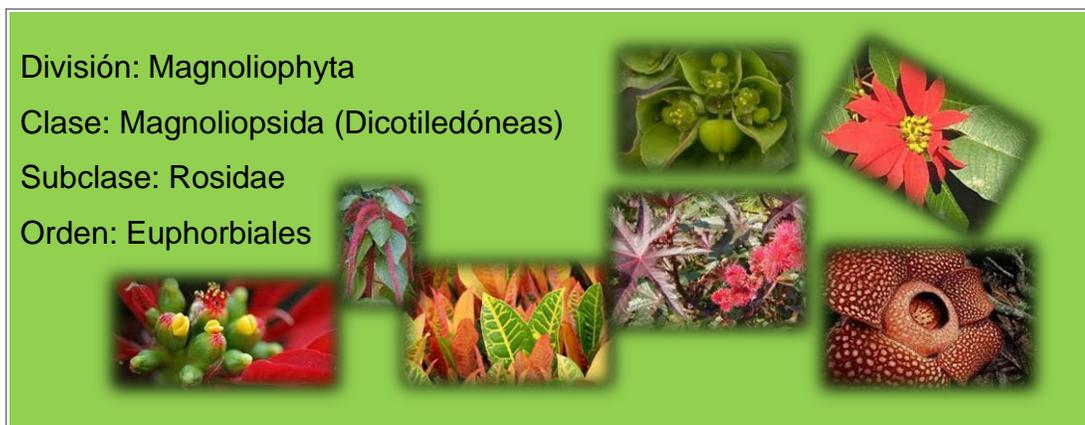
### **Características Botánicas y Distribución Geográfica de la Familia Euphorbiaceae**

Los miembros de esta familia se caracterizan por ser árboles, arbustos, hierbas o trepadoras, a menudo con savia lechosa; plantas monoicas o dioicas. Hojas alternas, a veces opuestas o raramente verticiladas, simples o palmatilobadas a palmaticompuestas, enteras o dentadas, a veces glandulares en el pecíolo o en los márgenes; estípulas persistentes caducas o ausentes. Inflorescencias cimosas, racemosas o espigadas, perianto biseriado, uniseriado o ausente; sépalos mayormente 4 ó 5; pétalos generalmente 4 ó 5, frecuentemente reducidos o ausentes; disco floral a veces ausente; estambres 1 hasta numerosos, libres o unidos, anteras mayormente 2-loculares, con dehiscencia longitudinal; ovario supero generalmente trilocular, placentación axial, óvulos 1 ó 2 por lóculo, estilos libres o unidos, frecuentemente bífidos o multífidos. Frutos generalmente capsulares que se descomponen en tres partes o a veces drupáceos; semillas generalmente con abundante albumen, embrión grande recto o ligeramente curvo. La clasificación taxonómica se resume en el esquema 1 (Webster, 2001; Babillo y Schnee, 1965).

La familia Euphorbiaceae se encuentra distribuida a nivel mundial en regiones tropicales, solo está ausente en regiones del ártico, en Venezuela muy frecuente en la tierra caliente y en la faja inferior de la tierra templada (Schnee, Leal y Benítez, 2010).

### Esquema 1. Clasificación Taxonómica de la Familia Euphorbiaceae.

Según la clasificación del Dr. Arthur Cronquist (Jones, 1988).



### Usos Medicinales de la Familia Euphorbiaceae

Se ha reportado que distintos géneros de la familia botánica Euphorbiaceae se han usado en la medicina tradicional para el tratamiento de procesos infecciosos del sistema digestivo, respiratorio, genitourinario y parasitosis (Cáceres, 1996). Entre algunos ejemplos se tiene los descritos a continuación: *Acalypha indica* Vell., es aplicada por vía tópica para el tratamiento de enfermedades de la piel, la *Euphorbia antiquorum* Wall., es ingerido en dosis bajas de látex seco que ayuda al libre movimiento de las extremidades. Las hojas frescas de *Phyllanthus amarus* Schumach., y *Phyllanthus emblica* L., se muelen y mezclan con leche de vaca o cabra para curar la ictericia y tos respectivamente (Chellaiah, Muniappan, Nagappan y Savarimuthu, 2006).

Cabe considerar, que para aumentar la secreción láctea en mujeres se ingiere la infusión de *Euphorbia lancifolia* Schltld., y la savia de *Ricinus communis* L. (Chellaiah et al., 2006), el *Croton socotranus* Balf., y *Euphorbia socotrana* Balf., son utilizadas para el tratamiento de enfermedades y heridas de la piel (Mothana, Lindequist, Gruenert y Bednarski, 2009). Algunas

especies han sido descritas en estudios por presentar actividad antibacteriana: *Croton lechleri* Müll.Arg., contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, *Hura crepitans* L., y *Jatropha macrantha* Müll.Arg., contra *S. aureus* (Bussmanna *et al.*, 2010).

Dentro de la familia Euphorbiaceae también hay muchas especies agrícolas económicamente importantes como el aceite de ricino (*R. communis*) que es una materia prima para muchos productos industriales, tales como lubricantes y pinturas, el árbol del caucho (*Hevea brasiliensis*) el cual es el recurso más importante de caucho natural para los neumáticos y otros productos y las semillas de piñón (*Jatropha curcas*) tienen alto contenido de aceite y pueden ser fácilmente transformados en biodiésel (Changying, Wenquan, Yun, Xin y Weiping, 2009). En la Tabla 1, se resume los usos más frecuentes de algunas especies pertenecientes a la familia Euphorbiaceae.

### **Composición Química de las Euphorbiaceae**

En las plantas de la familia Euphorbiaceae se ha demostrado la presencia de triterpenoides seguidos por los flavonoides y alcaloides como las principales clases de sustancias de interés para los fitoquímicos. Sin embargo, también se ha reportado la presencia de otras sustancias como cumarinas, taninos y lignanos (Yoc *et al.*, 2012).

Asimismo, Quituisaca (2015) señala que de la familia Euphorbiaceae se han aislado compuestos con actividad biológica como: terpenoides, flavonoides, taninos, compuestos polifenólicos, cumarinas, lectinas y péptidos. Del látex de las plantas se han reportado 55 terpenos. Los terpenos que son biosintéticamente derivados de unidades de isopreno, son utilizados por las plantas para protección contra herbívoros y patógenos.

**Tabla 1. Usos Medicinales de Especies de la Familia Euphorbiaceae.**

USOS	ESPECIES
Afrodisiaco	<i>Mallotus spp.</i> , <i>Phyllanthus spp.</i>
Antiabortiva	<i>Alchornea cordifolia</i> , <i>Bridelia micantha</i> .
Antiasmática	<i>Croton spp.</i> , <i>Euphorbia spp.</i> , <i>Jatropha gossypifolia</i> , <i>Ricinus communis</i> .
Antibiótico (generalmente antibacterial)	<i>Acalypha wilkesiana</i> , <i>Croton sellowii</i> , <i>Euphorbia spp.</i> , <i>Flueggea virosa</i> , <i>Sauropus rostratus</i> .
Anticancer	<i>Croton spp.</i> , <i>Euphorbia spp.</i>
Anticonceptivo	<i>Mallotus philippinensis</i> .
Antihelmíntica (vermífugo)	<i>Alcalypha indica</i> , <i>Alchornea coridifolia</i> , <i>Croton macrostachys</i> , <i>Euphorbia spp.</i> , <i>Jatropha curcas</i> , <i>Mallotus spp.</i>
Antihistamínico	<i>Euphorbia hirta</i> .
Antipirético (antifebril)	<i>Euphorbia nerifolia</i> .
Bronquitis	<i>Euphorbia spp.</i>
Colérico y Conjuntivitis	<i>Euphorbia spp.</i> , <i>Croton tiglium</i> .
Dermatitis	<i>Croton cortesianus</i> .
Diabetes	<i>Bridelia feruginea</i> , <i>Croton spp.</i> , <i>Euphorbia hirta</i> , <i>Phyllanthus spp.</i>
Diarrea	<i>Acalypha aistralis</i> , <i>Alchorrea cordifolia</i> , <i>Euphorbia spp.</i> , <i>Jatropha spp.</i> , <i>Phyllanthus spp.</i> , <i>Ricinus communis</i> .
Disentería	<i>Acalypha australis</i> , <i>Alchornea cordifolia</i> , <i>Breynia spp.</i> , <i>Mallotus appositifolius</i> .
Diurético	<i>Acalupha evrardii</i> , <i>Bridelia ferruginea</i> , <i>Euphorbia spp.</i> , <i>Homonoia riparia</i> , <i>Jatropha curcas</i> , <i>Manihot esculenta</i> , <i>Phyllanthus spp.</i> , <i>Sapium sebiferum</i> .
Dolor Abdominal	<i>Antidesma venosum</i> , <i>Bridelia sleroneuroides</i> .
Dolor de pecho	<i>Croton flavens</i> , <i>Euphorbia spp.</i> , <i>Erythrococca rigidifolia</i> , <i>Flueggea virosa</i> , <i>Phyllanthus muellerians</i> .
Elefantiasis	<i>Glochidion puberum</i> , <b><i>Hura crepitans</i></b> .

(Yoc et al., 2012; Salamanca s.f.).

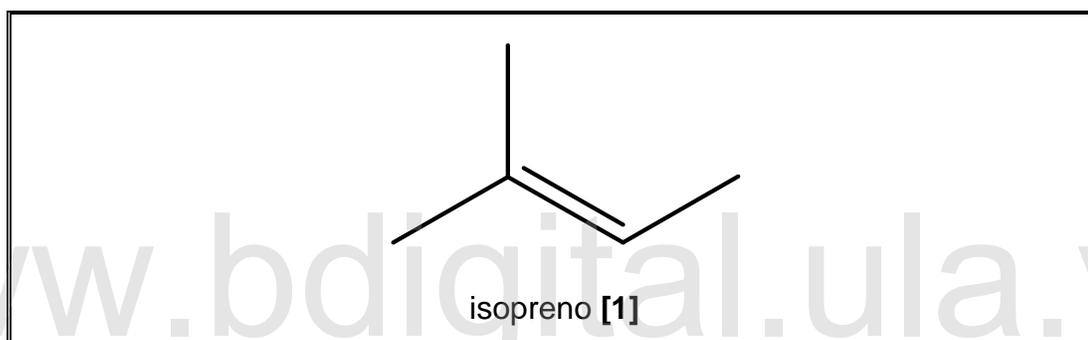
**Tabla 1. Usos Medicinales de Especies de la Familia Euphorbiaceae (Continuación).**

USOS	ESPECIES
Emético	<i>Acalypha indica</i> , <i>Alchornea cordifolia</i> , <i>Euphorbia</i> spp., <b><i>Hura crepitans</i></b> , <i>Jatropha curcas</i> , <i>Mareya micrantha</i> , <i>Pedilanthus thisthymaloides</i> .
Enema	<i>Jatropha curcas</i> , <i>Mallotus oppositifolius</i> , <i>Phyllanthus muellerianus</i> .
Hepatitis	<i>Euphorbia splendens</i> , <i>Mallotus apelta</i> , <i>Phyllanthus urinaria</i> .
Expectorante	<i>Acalypha indica</i> .
Fiebre	<i>Acalypha australis</i> , <i>Alchorrea cordifolia</i> , <i>Breynia</i> spp., <i>Bridelia ferruginea</i> , <i>Croton linearis</i> , <i>Euphorbia</i> spp., <i>Jatropha</i> spp., <i>Phyllanthus</i> spp., <i>Sauropus rostratus</i> , <i>Saussurea lappa</i> .
Hemorragia	<i>Acalypha australis</i> , <i>Alchorrea cordifolia</i> , <i>Breynia</i> spp.
Hipotensivo	<i>Aleurites fordii</i> , <i>Euphorbia maddenii</i> .
Ictericia	<i>Euphorbia kumifusa</i> , <i>Jatropha curcas</i> , <i>Ricinus communis</i> .
Induce menstruación	<i>Ricinus communis</i> .
Influenza	<i>Clutia abyssinica</i> .
Insecticida	<i>Croton</i> spp., <b><i>Hura crepitans</i></b> , <i>Mallotus Rapandus</i> .
Lactogogo	<i>Euphorbia thymifolia</i> , <i>Jatropha curcas</i> .
Lepra	<b><i>Hura crepitans</i></b> , <i>Mereya micrantha</i> , <i>Ricinus communis</i> .
Malaria	<i>Alchornea cordifolia</i> , <i>Croton</i> spp., <i>Glochidion puberum</i> .
Neuralgia	<i>Euphorbia tirucalli</i> .
Purgante (catártico, laxativo)	<i>Acalypha</i> spp., <i>Bridelia</i> spp., <i>Clusia abyssinica</i> , <i>Croton</i> spp., <i>Elaeophorbia drupifera</i> , <i>Hippomane mancinella</i> , <i>Homona riparia</i> , <b><i>Hura crepitans</i></b> , <i>Jatropha</i> spp., <i>Mallotus phillipinensis</i> .

(Yoc et al., 2012; Salamanca s.f.).

**Terpenoides:** son conocidos como isoprenoides, ya que son un grupo de productos naturales que incluyen todas aquellas sustancias químicas que derivan biosintéticamente del ácido mevalónico (AMV) y que original el isopentenil pirofosfato. La unidad estructural básica de los terpenos es el isopreno [1], constituido por cinco átomos de carbono (Figura 1). Su unión sucesiva da lugar a los distintos tipos de terpenos (Albornoz, 1980). Del látex de muchas Euphorbiaceae, contiene hasta un 30% de terpenos, hidrocarburos de cadena larga (C<sub>30</sub> triterpenoides) (Yoc *et al.*, 2012).

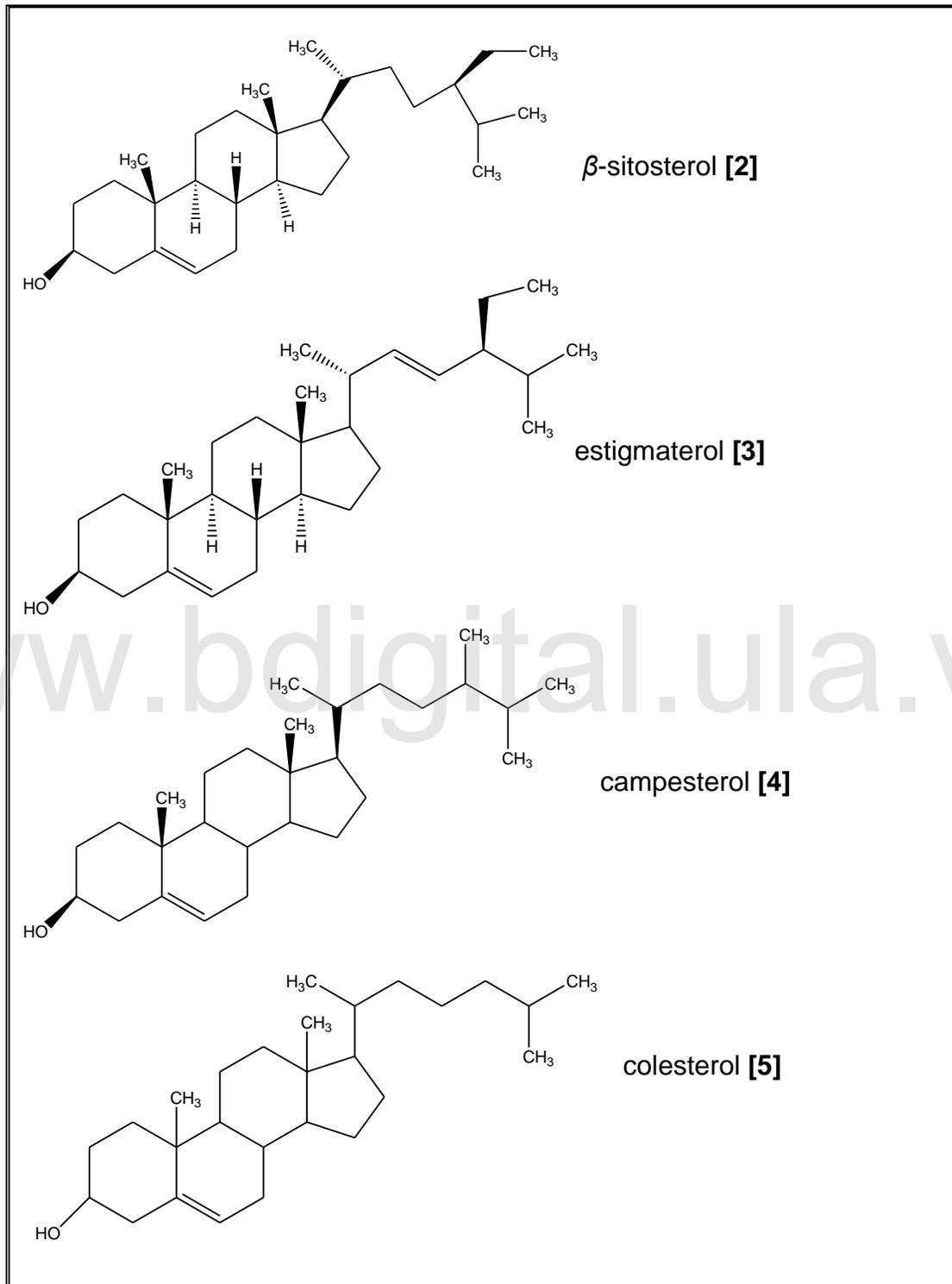
**Figura 1. Molécula de Isopreno.**



**Esteroles:** Son aquellas sustancias que poseen el núcleo del ciclopentano-perhidrofenantreno, que puede o no presentar cadena lateral en C<sub>17</sub>, así como los metilos angulares en C<sub>10</sub> y C<sub>13</sub> (Marcano y Hasegawa, 2002). Se ha reportado que este grupo de compuestos reduce el colesterol sérico, inhibe el crecimiento de células cancerígenas, son antiinflamatorias y tiene efecto de liberación de la insulina (Hung *et al.*, 2008).

Con respecto a especies de la familia Euphorbiaceae, se ha identificado el  $\beta$ -sitosterol [2]. También se presentan otros esteroles pero en cantidades relativamente pequeñas, como el estigmaterol [3], campesterol [4] y el colesterol [5] (Figura 2) (Yoc *et al.*, 2012).

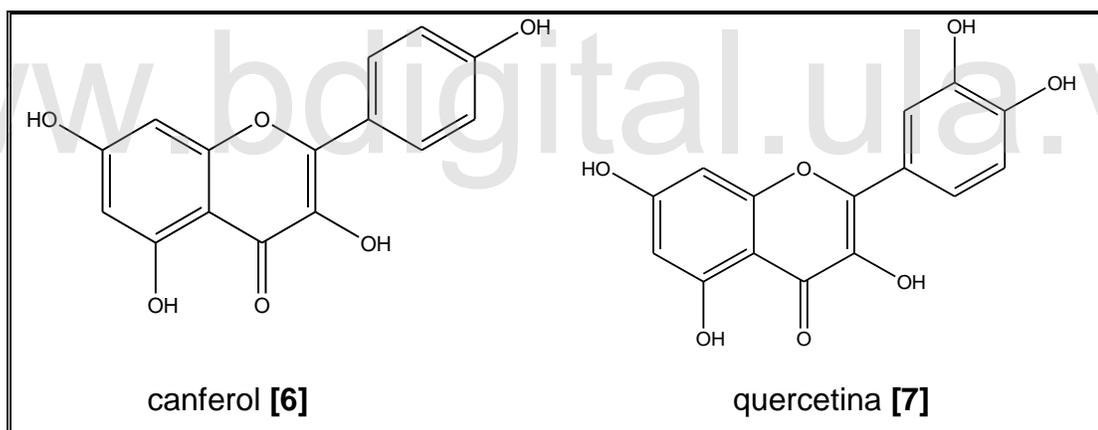
Figura 2. Esteroles en Especie de Euphorbiaceae.



**Flavonoides:** Estos compuestos son antioxidantes, otros son inhibidores enzimáticos, pero en su mayoría son pigmentos responsables de la coloración de numerosas flores y algunos frutos, atraen y guían a los polinizadores, favoreciendo así la reproducción de la especie (Harbone, Mabry T., y Mabry H., 1975).

Por su parte, la familia Euphorbiaceae es rica en flavonoides, particularmente flavonas y flavonoles, que se han identificado en varios géneros. Los flavonoides se detectaron en diferentes partes de las plantas, a excepción de las raíces. Los dos flavonoles comunes, canferol [6] y quercetina [7] son los más ampliamente distribuidos en los diferentes géneros de la familia (Figura 3) (Yoc *et al.*, 2012).

**Figura 3. Flavonoles en Géneros de la Familia Euphorbiaceae.**

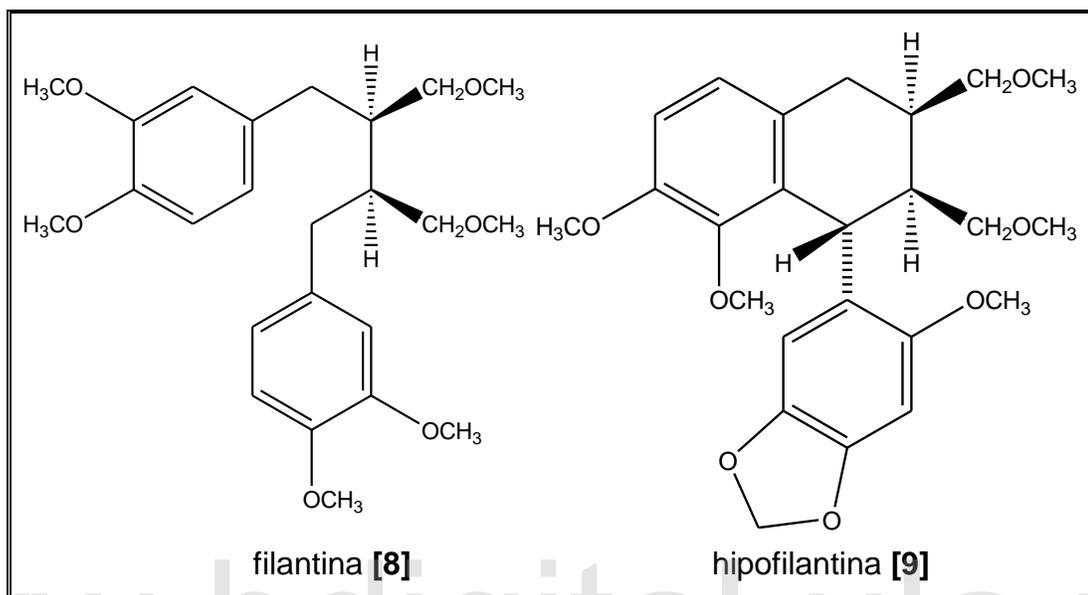


**Lignan:** Los lignanos actúan como inductores de la resistencia de las plantas hacia los agentes patógenos y a los animales herbívoros. Entre las acciones farmacológicas, se han citado como: sedantes, citotóxicos, fungicidas, cercaricidas, psicotrópicos, insecticidas, y el más reconocido es la antineoplásica (Marcano y Hasegawa, 2002).

Los lignanos han sido, hasta ahora, identificados en sólo dos géneros de la familia: *Jatropha* y *Phyllanthus*. Las hojas de *Phyllanthus miruri* Linneo,

contienen filantina [8] e hipofilantina [9] (Figura 4) (Anjaneyulu, Rao y Row, 1973).

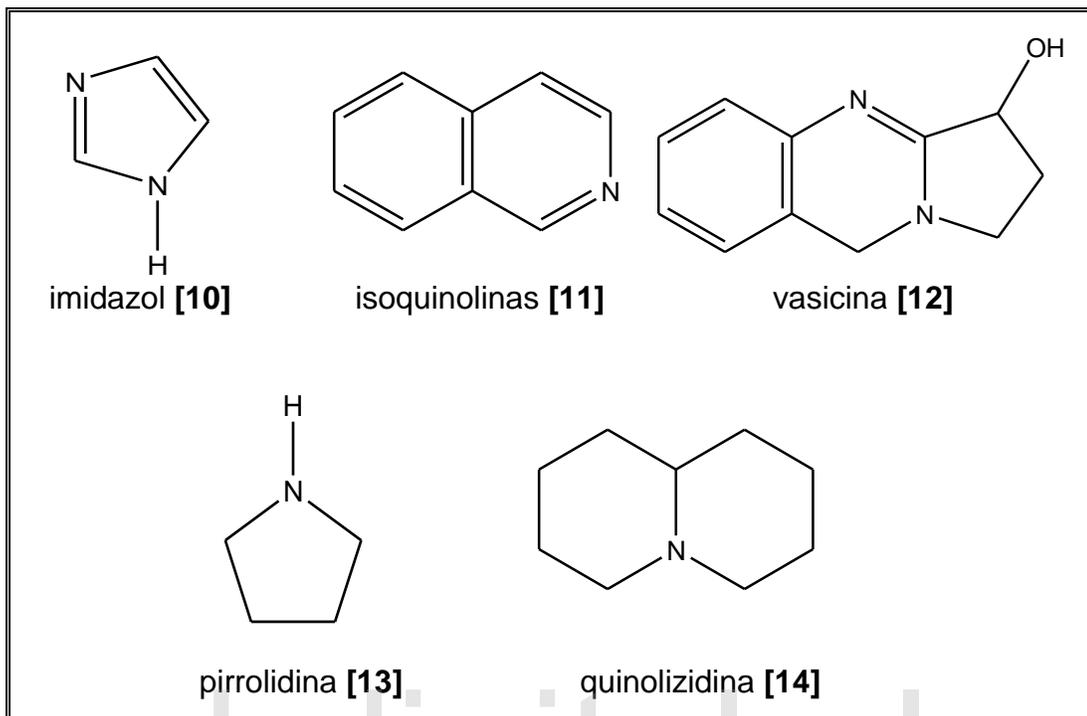
**Figura 4. Lignanos en Géneros de la Familia Euphorbiaceae.**



**Alcaloides:** Son compuestos nitrogenados heterocíclicos, poseen marcada acción fisiológica tanto en el hombre como en los animales, ya que tienen actividad farmacológica como anestésicos, analgésicos, antipiréticos entre otros (Bruneton, 2001).

Varias clases de alcaloides se presentan en ciertos géneros de la familia Euphorbiaceae y en particular en especies de los géneros *Croton*, *Phyllanthus* y *Securinega*. Del esqueleto de imidazol [10] sólo se han detectado en el género *Glochidion*. Las especies de *Croton* contienen varios tipos de alcaloides, isoquinolinas [11], quinolinas como vasicina [12] y pirrolidina [13]. Varios alcaloides de quinolizidina [14] se identificaron en la familia (ver Figura 5), pero principalmente en especies de *Phyllanthus* y *Securinega* (Souza, 2012).

Figura 5. Alcaloides en Géneros de la Familia Euphorbiaceae.



#### GÉNERO *Hura* L.

##### Características Botánicas del Género *Hura* L.

Son grandes árboles con el tronco cubierto de acúleos duros, puntiagudos y cónicos, látex copioso, lechoso o translúcido; plantas monoicas. Hojas alternas, simples, ampliamente ovadas, 7–18 cm de largo y 6–16 cm de ancho. Flores estaminadas en espigas densas, terminales, pedúnculo 2–12 cm de largo, cada flor envuelta por una bráctea membranácea que se abre longitudinalmente en la madurez, cáliz cupular y denticulado, pétalos y disco ausentes, estambres numerosos, filamentos fusionados en una columna, anteras en 2–numerosos verticilos; flores pistiladas solitarias en las axilas de las hojas superiores, pétalos y disco ausentes. Fruto una cápsula grande, 3–5 cm de largo y 5–8 cm de diámetro, leñosa, algo deprimida, con dehiscencia explosiva; semillas grandes de 1,5–

2 cm de diámetro. La clasificación taxonómica del género se muestra en el esquema 2 (Martínez *et al.*, 2002).

El género *Hura* es exclusivamente Neotropical con dos representantes: *Hura crepitans* L., de amplia distribución en la América Tropical y en la mayoría de las islas del Caribe y *Hura polyandra* Bayllon, restringida a la América Central, desde Costa Rica hasta México. Si bien los caracteres de diferenciación dendrológica entre ambas especies son escasos, no existen problemas en la correcta identificación, pues éstas poseen rangos de distribución distintos y sólo convergen en Costa Rica (Justiniano y Fredericksen, 2000). Este género fue descrito por Carolus Linnaeus y publicado en (1753) en *Species Plantarum*, 2: 1008 (Hokche, Berry y Huber, 2008).

#### **Esquema 2. Clasificación Taxonómica del Género *Hura* L.**

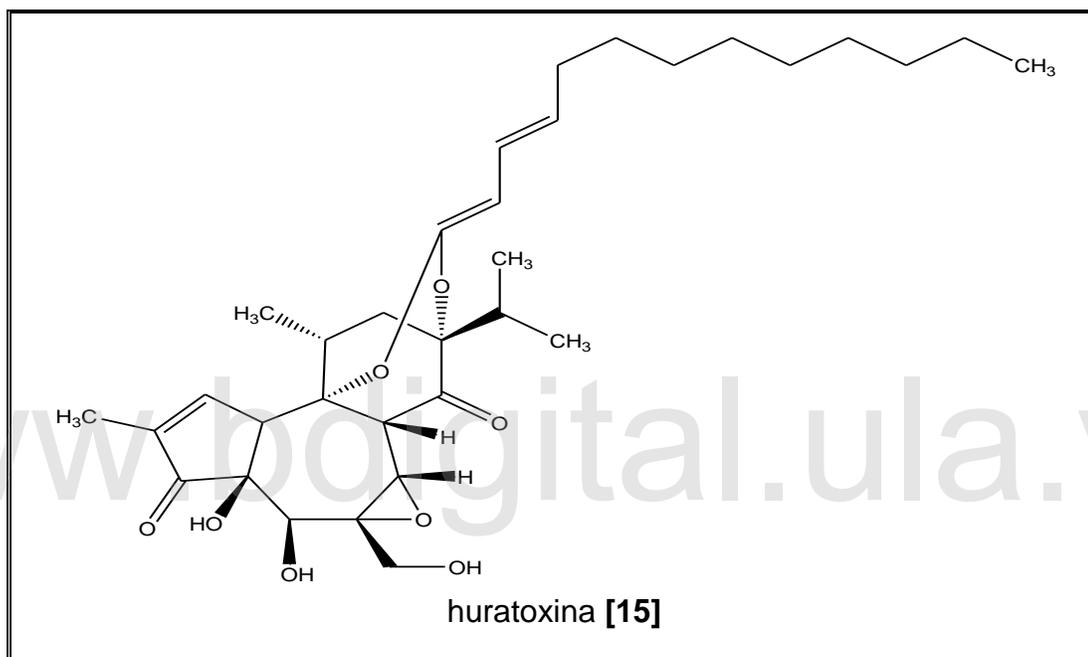


#### **Fitoquímica y Usos Tradicionales del Género *Hura* L.**

Las especies pertenecientes al género *Hura* se han caracterizado por ser usadas comercialmente, ya que la madera puede ser sometida a uso en obras de carpintería, encofrados, chapas, carrocerías, obras interiores, partes internas de puertas entamboradas (León y Chavarri, 2006). De la especie *Hura Polyandra* Baill., se ha reportado que es una especie muy tóxica, al ingerir la semilla con cáscara produce vómito violento, cefalea,

sensación de quemadura en garganta, evacuaciones diarreicas numerosas y dolor abdominal a los pocos minutos de haber sido ingeridas, incluso se ha señalado que la toxicidad de *Hura polyandra* es semejante a la *Hura crepitans*, Jaffé en 1943 aisló una enzima proteolítica, un diterpeno carcinógeno denominada Huraín o huratoxina [15] (Figura 6) (López, 2002).

**Figura 6. Diterpeno Aislado de *Hura polyandra* Baill.**



### **Especie *Hura crepitans* L.**

#### **Características Botánicas y Distribución Geográfica de la Especie *Hura crepitans* L.**

El *Hura crepitans* L., es un árbol de 10 a 40 metros de alto, con troncos y ramas espinosos sus hojas más o menos orbiculares, de ápice cuspidado-acuminado y base cordiforme o redondeada, con margen entero o dentado, glabras o muchas veces pilosa a lo largo de los nervios en la cara inferior, además tiene estípulas linear-lanceoladas, pubescentes caedizas y flores unisexuales apétalas, donde las flores masculinas están agrupadas en

espigas cilíndrico oviformes de color rojizo pardo, cáliz irregularmente dentado, filamentos y conectivos unidos en una columna gruesa, anteras agrupadas en 2 a 5 verticilos alrededor de esta columna y las flores femeninas solitarias en las axilas de las hojas superiores o en la base de las espigas masculinas, cáliz con margen entero, ovario con 5 a 20 celdas, estilo unidos en una columna larga y carnosa, estigma más o menos estrellado y de color violáceo rojo (Schnee *et al.*, 2010).

El jabillo como es comúnmente llamada (otros nombres comunes en la Tabla 2), es un árbol de sombra ampliamente conocido en toda Venezuela, su área de distribución abarca toda Centroamérica y el norte de Sudamérica. En Venezuela está ampliamente extendido en los bosques tropofíticos de la tierra caliente, abundando también a lo largo de los ríos quebradas y valles húmedos de la cordillera costanera y cuenca del lago de Maracaibo (Hoyo, 1979).

Su amplia distribución abarca desde América Central (Costa Rica y Panamá), las Indias Occidentales e islas del Caribe, al norte; a las Guyanas y la base de la ladera oriental de la Cordillera de los Andes al oeste, y hasta el Brasil, Perú y Bolivia en la parte meridional. Su límite de distribución termina, al norte, en Costa Rica, donde es remplazada por *H. polyandra*, siendo ésta la única zona en que ambas especies coexisten (Justiniano y Fredericksen, 2000). La clasificación taxonómica de la especie *Hura crepitans* L., se presenta en el esquema 3.

**Tabla 2. Nombres Comunes de *Hura crepitans* L.**

NOMBRES COMUNES	PAÍS
Assacu, Uassacu y Acau	Brasil
Ochoó, Assacú, Jabillo y Ochoho	Bolivia
Arenillero, Arenillo, Milpesos, Tronador, Ceiba lechosa, Amarilla lechosa, Habilla, Salvadera, Jabillo, Castañeto, Ceibo, Ceiba mil pesos, Ceiba de leche, Acuaparo, Aosacin, Rasquiñoso y Acuapá	Colombia
Javillo	Costa Rica
Haba, Habillo, Javillo y Salvadera	Cuba
Habillo, Somorona y Veneno	Ecuador
Hurawood, Sandbox, Hura y Possum Wood	Estados Unidos
Tetereta	Guatemala
Sablier	Guyana
Jabillo, Ovillo, Nune, Tronador, Javillo, Coquillo macho, Nuno y Haba	México
Catahua, Habilla, Catahua amarilla y Castaña	Perú
Molinillo	Puerto Rico
Jabillo, Habillo, Ceiba y Javilla	Venezuela

(Arostegui, 1982).

**Esquema 3. Clasificación Taxonómica de la Especie *Hura crepitans* L.**



### **Usos Tradicionales de la Especie *Hura crepitans* L.**

El látex de esta especie era utilizado, desde la época precolombina, para envenenar o “embarbascar” el agua para la pesca. Desde hace aproximadamente 40 años, esta especie ha sido aprovechada en Centroamérica y el Caribe para la fabricación de cercas, verjas, embalajes, interiores, laminados, moldes, muebles y canoas. Su uso ha sido limitado debido a que su madera; relativamente blanda, es susceptible al ataque de hongos y a la facilidad con que se cimbra o dobla cuando está húmeda, sin embargo, el ataque del hongo llamado “mancha azul” afecta sólo el aspecto de la madera y no así su estructura (Justiniano y Fredericksen, 2000).

En este mismo orden de ideas, se ha reportado que el *Hura crepitans* L., se le ha encontrado diferentes utilidades por sus propiedades biológicas y químicas, dentro de los usos que posee el árbol uno de los más resaltantes es que uno de sus componentes sirve como repelente de zancudos, ya que posee un agente toxico para ellos. Además de esto los frutos pueden consumirse tostados en pequeñas cantidades, pero crudos son muy peligrosos por el látex, con propiedades purgantes como la pichoga (Burger y Huft, 1995). Por otra parte, Hoyo (1979) lo cita como un árbol ornamental y de sombra, siendo apropiado para parques, plazas y jardines.

### **Extractos Vegetales**

Los extractos vegetales se han definido como un concentrado obtenido por tratamientos de productos vegetales con solventes apropiados, tales como agua, etanol, o éter, de elementos solubles, constituidos por una mezcla de principios activos y sustancias inertes que se producen de la totalidad o de partes de una planta fresca o seca (Lizcano y Vergara, 2008).

Asimismo, para la determinación de los extractos también llamados componentes no volátiles, se lleva a cabo una extracción sólido - líquido con disolventes orgánicos, que penetran en la materia vegetal y disuelven las sustancias, que son evaporadas y concentradas a baja temperatura. Después, se elimina el disolvente, obteniendo la fracción deseada (Ruiz y Susunaga, 2000).

### **Consistencia de los Extractos**

Los extractos vegetales se clasifican en cuatro grupos: blandos, firmes, secos y fluidos (Lizcano y Vergara, 2008). A continuación una breve explicación de los mismos.

**Extractos Blandos:** Tiene la característica de tener la consistencia de la miel espesa; algunas veces, debido a la absorción de la humedad atmosférica, presentan una consistencia menos densa.

**Extractos Firmes:** Estos se asemejan con la masa con la cual se fabrican o manufacturan las píldoras; deben tener la característica especial de no adherirse a los dedos.

**Extractos Secos:** Se les conocía con la denominación de “sales esenciales”. Son los extractos en los cuales el disolvente ha sido casi totalmente eliminado, contienen del 5 al 8% de agua. Se reducen fácilmente a polvo y facilitan su manipulación y dosificación.

**Extractos Fluidos:** Son preparados en una forma tal que el peso del extracto corresponde exactamente al peso de la sustancia empleada como medicamento, desecada al aire y pulverizada.

## **Obtención de los Extractos Vegetales**

### **Maceración**

Consiste en una extracción que se realiza a temperatura ambiente, para remojar el material vegetal, debidamente fragmentado en un solvente (agua, hexano, metanol se prefiere los solventes orgánicos puesto que a largos tiempos de extracción el agua puede propiciar la fermentación o la formación de mohos) hasta que éste penetre y disuelva las porciones solubles. Se puede utilizar cualquier recipiente con tapa que no sea atacado con el disolvente; en éste se colocan el material vegetal con el disolvente y tapado se deja en reposo por un período de 2 a 14 días con agitación esporádica. Luego se filtra el líquido, se exprime el residuo, se recupera el solvente en un evaporador rotatorio y se obtiene el extracto (González, 2004).

### **Percolación**

Asimismo González (2004) define la percolación, también conocido como lixiviación, es uno de los procesos más difundidos pues se puede realizar con disolventes orgánicos en frío para preservar los compuestos termolábiles que pudiera contener el material. Consiste en colocar el material fragmentado en un embudo o recipiente cónico y hacer pasar un disolvente adecuado a través del mismo. No es apropiado para resinas o materiales que se hinchen dado que el disolvente no percolará. Se requiere agregar solvente constantemente.

## **Propiedades Antifúngicas de Extractos Vegetales**

Actualmente es de gran interés y preocupación entre la comunidad científica, la industria farmacéutica y las autoridades sanitarias, la creciente resistencia de los hongos patógenos a los agentes antifúngicos comerciales. Debido a ello se ha incrementado la necesidad de encontrar nuevos

compuestos con propiedades antifúngicas, en particular aquellos provenientes de fuentes naturales. Teniendo en cuenta que las plantas son por naturaleza las mejores fábricas de compuestos químicos, la investigación ha conducido hacia la determinación de la actividad biológica de un gran número de especies vegetales (Ospina, 2012).

Los extractos de plantas han demostrado en ensayos *in vitro* e *in vivo* ser una alternativa para el tratamiento de enfermedades causadas por hongos. Por ello, en la Tabla 3 se muestran algunas investigaciones actuales a partir de extractos vegetales y su efectividad ante microorganismos patógenos.

### **Actividad Antifúngica**

Un agente antifúngico o antimicótico, es una sustancia capaz de producir una alteración de la estructura de una células fúngicas consiguiendo inhibir su desarrollo, alterando su viabilidad o capacidad de supervivencia. El mecanismo de acción de los medicamentos que inhiben el crecimiento de hongos, depende del lugar en el que actúen, lo cual está relacionado con la estructura química del antifúngico (Bidart, 2014).

### **Mecanismo de Acción Antifúngica Sobre la Membrana Celular de Hongo**

La membrana celular de los organismos fúngicos al igual que la célula de los mamíferos está compuesta por lípidos en primera instancia, en las células fúngicas el lípido principalmente encontrado es el ergosterol. La diferencia del contenido de esteroides entre una célula y otra ha sido explotada como sitio blanco para los medicamentos antifúngicos (Gregorí, 2005). Dentro de ellos se tiene a los polienos, azoles y alilaminas.

**Tabla 3. Evaluación de la Actividad Antifúngica de Extractos Vegetales.**

ESPECIE/EXTRACTO	HONGO	TAMIZAJE FITOQUÍMICO	REFERENCIA
<i>Pedilanthus tithymaloides</i> L. Ponit (Ultimorrial) Extracto etanólico hojas	<i>Fusarium oxysporum</i> (10 y 13.33 mg/mL)	Terpeno, esteroles, lactonas, flavonoides antocianinas y alcaloides	Márquez <i>et al.</i> , 2007
<i>Manihot multifida</i> (L.) Crantz (Euphorbiaceae) Extracto metanólico, acuoso y hexano de frutos	<i>Candida albicans</i> (ATCC 18804) CIM 39 µg/MI	Fenoles, flavonoides y triterpenoides	Fabri <i>et al.</i> , 2015
<i>Melia azederach</i> L. Extractos totales en etanol a partir de hojas secas	<i>Colletotrichum sp.</i> 50, 75, 100 ppm	Terpenos/esteroles, alcaloides, saponinas, taninos y antocianinas	Pérez <i>et al.</i> , 2011
<i>Acacia Farnesiana</i> Extracto hidroalcohólico y acuoso	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Lycopersici</i>	Flavonoides, taninos, fenoles, alcaloides y saponinas	Rodríguez <i>et al.</i> , 2012
<i>Azadirachta indica</i> A. Juss Extracto de hojas (CMI: 100µg/mL), semillas (CMI: 625µg/mL) y biomasa celular (CMI: 2500µg/mL)	Hongos dermatofitos	Compuestos triterpenoides	Ospina, 2012
Propóleo de la abeja <i>Apis mellifera</i> Extracto etanólico al 15%	<i>Candida albicans</i> (ATCC 14055), <i>Cryptococcus neoformans</i> , y <i>Aspergillus fumigatus</i>	-----	Londoño <i>et al.</i> , 2008

**Polieno:** Son medicamentos que forman poros en la membrana celular del hongo alterando la permeabilidad de la membrana lo que permite una pérdida de proteínas, glúcidos y cationes monovalentes y divalentes, causando la muerte celular (Gregorí, 2005).

**Azoles:** Son antifúngicos de tipo sintéticos; constituyen una alternativa a los polienos, ya que se encuentran disponibles en una gran diversidad de productos; estos se clasifican en dos grupos:

- Imidazoles: Clotrimazol, Miconazol, Ketoconazol.
- Triazoles: Fluconazol, Itraconazol, Voriconazol, Posaconazol, Ravuconazol.

Su mecanismo de acción es fungistático, debido a que actúa inhibiendo al citocromo P450 dependiente de enzimas, dando como resultado la síntesis incompleta del ergosterol y por consiguiente la degeneración de la membrana de la célula fúngica (Gregorí, 2005).

**Alilaminas:** Trabajan de forma similar a los azoles, conceptualmente ellas inhiben la síntesis del ergosterol ya que inhiben a la enzima escualeno epoxidasa, lo que produce una disminución en el crecimiento del hongo (Gregorí, 2005).

### **Mecanismo de Acción Antifúngica Sobre el Núcleo de la Célula Fúngica**

**Antimetabolitos:** Un clásico antimetabolito es la fluorocitosina o 5-fluorocitosina. Este fármaco es transportado por la citosina permeasa en el citoplasma de la célula fúngica, donde se convierte en 5-fluorouracil (5-FU) por la citosina diaminasa. El 5-FU es fosforilado e incorporado dentro del RNA convirtiéndose en el dexosinucleotido, el cual inhibe a la timidilato sintetasa y de esta forma impide la síntesis de proteínas de la célula.

También inhibe la síntesis de la proteína fúngica, reemplazando el uracil con 5-FU en el ARN fúngico (Gregorí, 2005).

**Agentes misceláneos:** En esta clase se encuentra el griseofulvin, el cual inhibe la mitosis, al destruir el huso mitótico, necesario para efectuar la división celular (Gregorí, 2005).

### **Hongos**

Los hongos son organismos eucariotas que se clasifican en mohos, levaduras y setas, los cuales anteriormente se encontraban en el reino *plantae* ya que se consideraban vegetales inferiores por no presentar la propiedad para la formación de tejidos (*Thallophytas*), hoy en día este tipo de organismo vivo pertenece a un reino diferente al de los animales y plantas llamado reino *Fungi* o *Eumycota* (Negroni, 2009).

Sabiendo que la micología es la ciencia encargada del estudio de los hongos, se puede decir que a partir de ella se desglosan diferentes ramas que abarcan estudios en la industria alimenticia (panes, quesos y bebidas alcohólicas), industria farmacéutica, industria química y en el sector clínico, encontrándose aproximadamente unas 300.000 especies de hongos en el mundo, de las cuales un poco más de 200 especies están relacionadas con la micología clínica (Negroni, 2009).

Las micosis superficiales son las infecciones por hongos más comunes en todo el mundo y constituyen un problema de salud pública especialmente en países tropicales. El clima húmedo, la sobrepoblación y las malas condiciones higiénicas han conducido a un aumento de la prevalencia de estos patógenos adquiriendo una gran importancia médica, siendo además una causa de consulta médica frecuente (Álvarez *et al.*, 2005).

Dentro de los agentes etiológicos más comunes de las micosis superficiales se encuentran los hongos pertenecientes al género *Candida*, el

cual está conformado por más de 100 especies descritas a nivel mundial, siendo un pequeño grupo el que se encuentra implicado en infecciones clínicas. *Candida albicans* es la especie aislada con mayor frecuencia a partir de muestras clínicas y generalmente representan entre un 90 % y un 100 % de las cepas aisladas de muestras de mucosas, y entre un 50 % y 70 % de las cepas procedentes de pacientes inmunosuprimidos (Murray, Rosenthal y Pfaller, 2006).

### **Mecanismos de Resistencia de los Hongos**

La pared celular de los hongos es una estructura con gran plasticidad que protege a la célula de diferentes tipos de estrés ambiental, entre los que destacan los cambios osmóticos. Además, la pared celular permite la interacción con el medio externo ya que algunas de sus proteínas son adhesinas y receptores. Algunos de sus componentes tienen una alta capacidad inmunogénica. La pared celular es una estructura característica de los hongos y está compuesta por glucanos, quitina y glicoproteínas (Pontón, 2008).

Al no estar presentes los componentes de la pared celular fúngica en el ser humano, esta estructura es una diana excelente para la terapia antifúngica. La anidulafungina, como el resto de las equinocandinas, actúa sobre la  $\beta$ -1,3-D-glucano sintetasa inhibiendo la formación del  $\beta$ -1,3-D-glucano y produce, según el tipo de hongo, un efecto fungicida o fungistático (Pontón, 2008).

### **Género *Candida***

*Candida* es un género de hongos unicelulares causantes de las micosis superficiales más comunes en el mundo, se encuentra en forma de levadura y abarca más de 150 especies, dentro de las cuales la mayoría no afecta al ser humano (Vitala, 2005). La taxonomía del género se resume en el esquema 4.

#### Esquema 4. Taxonomía del Género *Candida*.



Los hongos del género *Candida* son levaduras redondas u ovaladas de 3-7  $\mu\text{m}$  de diámetro, que se reproducen por blastoconidias, forman pseudomicelios y tienen capacidades de asimilación y fermentación de carbohidratos, además, forman micelios verdadero y clamidoconidias. *Candida* es el agente etiológico causante de la candidiasis, micosis que se presenta con mayor frecuencia a nivel mundial, afectando diversas partes del cuerpo como: la piel, uñas, tracto genito-urinario, tracto respiratorio superior y tracto gastrointestinal, indiferentemente de la edad, sexo o raza del individuo afectado (López, Méndez, Hernández y Castañón, 2004).

Las especies de este género representan los patógenos fúngicos oportunistas más frecuentes, sin embargo, la gravedad de la Candidiasis está dada en función del grado de inmunodepresión del paciente y del lugar en donde se encuentre en foco de infección causado por *Candida*. En la Candidiasis superficial el pronóstico es bueno, pero en algunos casos de Candidiasis sistémica la evolución es fatal. Dentro de las micosis causadas por *Candida* se encuentran: Onicomycosis, candidiasis oral, candidiasis cutánea, candidiasis sistémica, candidiasis gastroesofágica, candidiasis intestinal, candidiasis pulmonar y candidiasis urinaria (López *et al.*, 2004).

### ***Candida albicans***

*Candida albicans* es un hongo en forma de levadura, saprofito y forma parte de la familia de los Sacaromicetos, es un comensal habitual y un patógeno oportunista de la flora microbiana de las personas, encontrándose normalmente en las mucosas del tracto gastrointestinal y de la vagina (Salcedo y García, 1998). Su taxonomía se resume en el siguiente esquema 5.

#### **Esquema 5. Taxonomía de la Especie *Candida albicans*.**



*C. albicans* por formar parte de la microbiota habitual de la vagina principalmente, al producirse un desequilibrio en el pH vaginal esta prolifera causando Candidiasis vaginal, una de las patologías tratadas con mayor frecuencia en las mujeres. Este tipo de micosis no es transmitida por contacto sexual y puede presentar una variedad de síntomas que pueden ayudar a un diagnóstico clínico definitivo, dentro de los signos o síntomas más específicos encontramos: un flujo vaginal anormal que puede fluctuar de una secreción blanca ligeramente acuosa a un flujo blanco espeso y abundante, ardor y prurito en los labios vaginales, relaciones sexuales dolorosas y micciones dolorosas (Vitala, 2005).

## **Diagnóstico de Laboratorio**

El diagnóstico micológico dentro del laboratorio está conformado por tres etapas; la etapa pre-analítica, etapa analítica y la etapa post-analítica. Correspondiendo a la pre-analítica todas aquellas operaciones que se realizan o se le solicitan al paciente una vez llegue la solicitud médica a manos del analista, hasta el inicio de la etapa analítica. En la etapa analítica el analista procederá a realizar los diferentes métodos o técnicas necesarias para la determinación o identificación del objeto de estudio solicitado por el médico. En el análisis de un agente etiológico fúngico como lo es *Candida* es necesario realizar una serie de técnicas para lograr un diagnóstico final, dentro de las técnicas utilizadas en el laboratorio se encuentran:

**Examen Directo:** Este procedimiento es recomendable para detectar las levaduras, hifas y/o pseudohifas. Se debe proceder según sea el tipo de muestra. Normalmente las muestras se tratan con KOH al 15 %, así mismo se pueden procesar con solución fisiológica. Las células redondas u ovaladas con blastoconidias y en algunas ocasiones con pseudofilamentos o filamentos verdaderos son característicos de *Candida* (López *et al.*, 2004).

El criterio para considerar la presencia de *Candida* con significado patógeno, consiste en encontrarlas en grandes cantidades en áreas donde habita normalmente. En cambio, en todos los productos patológicos provenientes de tejidos y de órganos internos, la presencia de una o más levaduras o estructuras filamentosas en el frotis, o en el examen directo se puede considerar patógeno (López *et al.*, 2004).

**Cultivos:** Una vez realizado el examen directo y observar la presencia de blastoconidias y/o pseudohifas se procede a sembrar en agar bilis y en agar Sabouraud dextrosa, con cicloheximida y cloranfenicol, o sin antibióticos, ya que algunas especies crecen en presencia de ellos. Se incuban a una temperatura de 25-30°C durante cinco días, periodo en que

se desarrollan colonias cremosas blanco-amarillentas, lustrosas, poco elevadas y de bordes bien definidos. Para que el cultivo tenga valor diagnóstico, debido al carácter comensal de *Candida*, se deberá aislar a la levadura en un mínimo de tres muestras consecutivas y en forma abundante cuando el producto biológico proceda de la piel, uñas, mucosas, tracto respiratorio y digestivo; en cambio, cuando procedan de biopsias, sangre, orina tomada por punción suprapúbica y de líquidos y exudados internos, basta la presencia de una colonia para que tenga significación patógena (López *et al.*, 2004).

### **Pruebas Especiales y de Identificación:**

**Producción de Clamidoconidios:** Se realiza sembrando las colonias de *Candida* en un medio de harina de maíz, en harina de arroz o en Clamidospora agar. Al cabo de tres a cinco días se observan con facilidad los clamidoconidios con pseudomicelios y blastoconidias en un examen microscópico, si la cepa estudiada corresponde a *Candida albicans* o a *Candida dubliniensis* (López *et al.*, 2004).

**Auxonograma:** Se puede emplear el auxonograma de nitrógeno o de carbono, este último es el más utilizado. Esta técnica puede realizarse de dos maneras, el auxonograma en placa, en el que se utilizan discos de papel filtro impregnados con los diferentes azúcares, y el auxonograma en tubos, en el que se utilizan soluciones de azúcares. A través del patrón de asimilación de azúcares se identifican las diferentes especies de levaduras como *Candida*, *Cryptococcus*, *Saccharomyces* y *Malassezia* (López *et al.*, 2004).

### **Hipótesis**

Una vez, revisado la situación actual del problema de investigación, así como, los antecedentes previos y las bases teóricas, se formulan la siguiente hipótesis:

Ya que diferentes especies pertenecientes a la familia botánica Euphorbiaceae, han demostrado actividad desde el punto de vista biológico y farmacológico, es posible encontrar actividad antifúngica *in vitro* contra cepas de *Candida albicans*, en los extractos crudos (hexano, acetona y etanol) de las hojas de la especie *Hura crepitans* L., ubicada en la ciudad de Mérida – Venezuela.

www.bdigital.ula.ve

### Operacionalización de las Variables

Las variables se operacionalizan con el fin de investigar la medición. Por ello Palella y Martins (2010) definen que se categorizan, para relacionar el indicador específico. La Operacionalización de las Variables estudiadas se representan en la siguiente tabla (Tabla 4).

**Tabla 4. Operacionalización de las Variables.**

Variable	Tipo	Definición Conceptual	Definición Operacional	Dimensión	Indicador
Actividad antifúngica contra cepas de <i>Candida albicans</i> .	Dependiente	Sustancia capaz de producir una alteración de la estructura de <i>Candida albicans</i> consiguiendo inhibir su desarrollo.	Por medio de mecanismos de acción antifúngico sobre las diferentes estructuras celulares de <i>Candida albicans</i> .	Presencia de actividad antifúngica contra cepas de <i>Candida albicans</i>  Ausencia de actividad antifúngica contra cepas de <i>Candida albicans</i>	Presencia o ausencia de Halos de Inhibición
Composición química de los extractos crudos de las hojas de <i>Hura crepitans</i> .	Independiente	Sustancias con olor característico, obtenido a partir de materia prima desecada de origen vegetal, por maceración o percolación en contacto con un solvente orgánico, seguida de la eliminación de dicho solvente por un procedimiento físico.	Identificación de los principales metabolitos secundarios a través del tamizaje fitoquímico en los extractos con actividad biológica.	Moléculas activas en el ámbito medicinal: - Terpenoides - Esteroles - Flavonoides - Lignanos - Alcaloides - Saponinas - Taninos - Cumarinas	Presencia o ausencia de las moléculas

## **CAPITULO III**

### **MARCO METODOLÓGICO**

#### **Enfoque de la Investigación**

La presente investigación se planteó un enfoque mixto, en el que se presentan los resultados tanto cualitativos como cuantitativos, siempre buscando la consistencia entre ellos para evitar contradicciones o paradojas, ya que ambos enfoques se entremezclan y complementan durante todo el proceso de investigación (Gómez, 2006). Estas investigaciones (cualitativas– cuantitativas) se combinan para ofrecer una imagen general, y muy eficiente sobre las características del sujeto sometido a estudio y sobre la relación entre las variables.

#### **Tipo de Investigación**

Según Hurtado (2008), los tipos de investigación están relacionados con el logro esperado durante el proceso de investigación. Específicamente, puede ser exploratoria, descriptiva, analítica, comparativa, explicativa, predictiva, proyectiva, interactiva, confirmatoria y evaluativa. En este caso la investigación fue definida bajo un tipo de investigación explicativa, ya que se basó en estudiar la composición química y actividad antifúngica de las hojas de *Hura crepitans* L., sobre cepas de *Candida albicans*.

## **Diseño de la Investigación**

El diseño de la investigación se refiere a las diferentes estrategias que utiliza el investigador para responder la pregunta de investigación (Palella y Martins, 2010). Adicionalmente, Hurtado (2008) refirió que el diseño tiene relación con el dónde y el cuándo se recopilará la información necesaria, y la amplitud de la misma, con el fin de responder a la interrogante planteada. Al respecto, esta investigación se desarrolló bajo un diseño de laboratorio o experimental y transversal.

El diseño de la investigación es de tipo experimental, porque la especie vegetal fue sometida a determinadas condiciones, estímulos o tratamiento, para observar los efectos o reacciones en la variable dependiente. Dicho diseño es netamente explicativo, por cuanto su propósito es demostrar que los cambios en la variable dependiente fueron causados por la variable independiente. Es decir, se estableció una relación causa-efecto. Este estudio se realizó en un lapso de tiempo determinado, por lo tanto también es un tipo de diseño de investigación transversal, según Hernández, Fernández y Baptista (2010), porque los datos se recolectaron en un solo momento, en un tiempo único.

## **Población y Muestra**

En el caso objeto de estudio de la presente investigación, la población fue constituida por la especie vegetal *Hura crepitans* L., (Euphorbiaceae) recolectada en el Jardín de Plantas Medicinales de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis “Dr. Luis Ruiz Terán”, Universidad de Los Andes, Mérida – Venezuela.

De la población señalada se tomó una muestra no probabilística, la cual según Hernández *et al.*, (2010) corresponde al “tipo de muestra cuya selección no depende de que todos tengan la misma probabilidad de ser elegidos, sino la decisión de un investigador” (p. 176). Esta muestra estuvo integrada por la recolección de un (1) kilo de hojas de la especie vegetal. La determinación botánica se realizó en el herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, con la ayuda de un taxónomo especialista, el Ing. Juan Carmona. Un voucher de la muestra se depositó bajo el número 01. M. Azuaje, para la preparación de los extractos y el ensayo *in vitro* de la actividad antifúngica (ver Figura 7).

**Figura 7. Ejemplar de la Especie *Hura crepitans* L. (Euphorbiaceae).**



Foto: Azuaje M. (2016). Edo. Mérida.

## **Procedimientos de la Investigación**

### **Obtención de los Extractos a Partir de Hojas de *Hura crepitans* L.**

Las hojas (1000 g) se separaron del resto del material vegetal y se secaron a temperatura ambiente en la sombra durante una semana. Una vez deshidratado el material vegetal, se procedió a triturarlo con un molino eléctrico. Posteriormente, se procedió a macerar con solventes de polaridad creciente: hexano, etanol y acetona, en periodos de tiempo diferentes, de forma continúa para obtener el mayor número de metabolitos secundarios de acuerdo con la solubilidad en los solventes empleados.

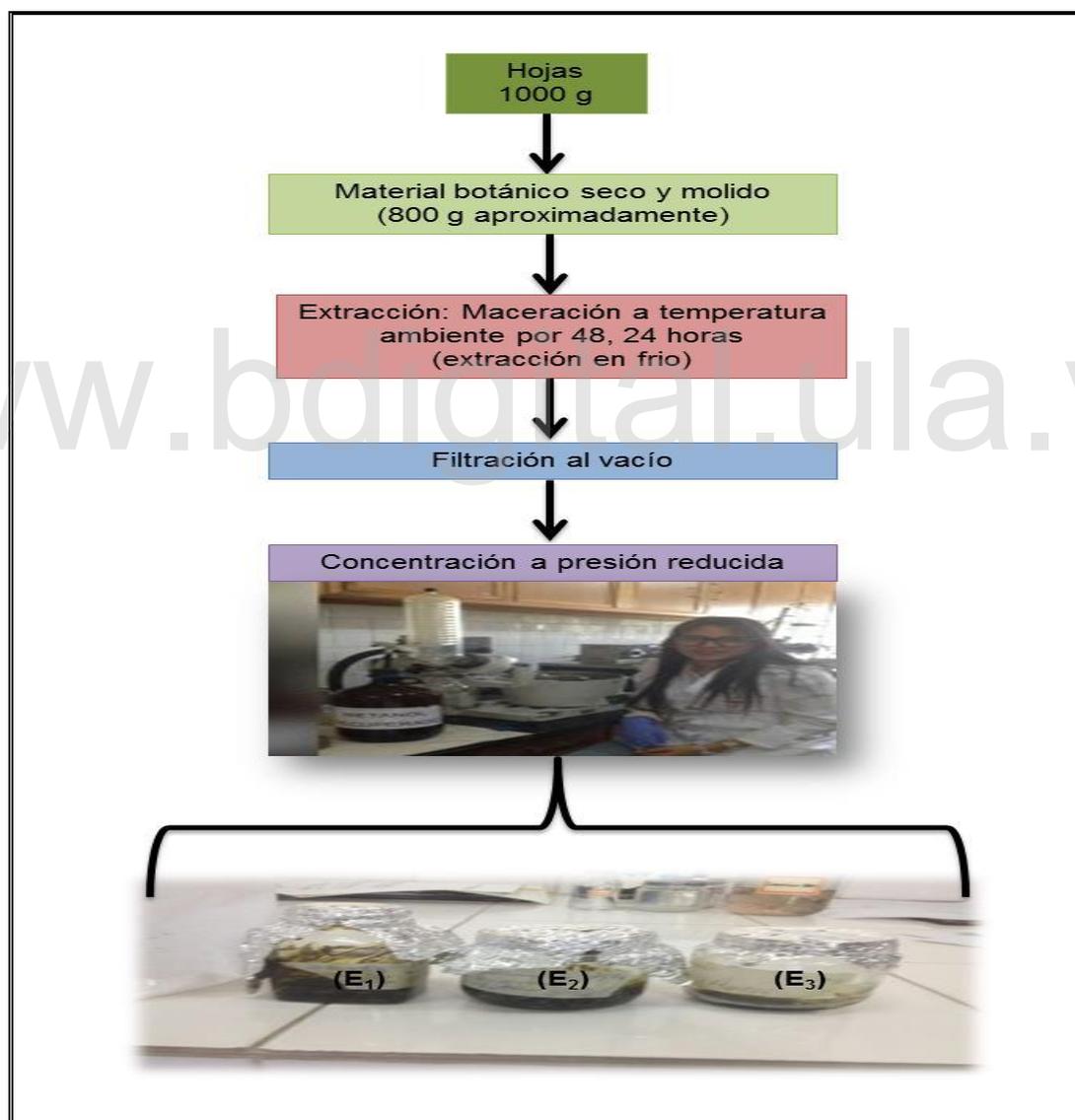
**Extracto Hexanoico:** La muestra se dejó en maceración a temperatura ambiente con hexano 90% durante 48 horas, transcurrido este tiempo se filtró para extraer la fracción líquida. Luego al residuo se le agregó nuevamente el mismo solvente y se macero por 24 horas adicionales para una segunda filtración. Ambos filtrados se mezclaron y se concentraron a presión reducida en un rotavapor, a una temperatura no mayor de 50 °C hasta secar completamente.

**Extracto Etanólico:** La muestra remanente de la filtración con hexano fue macerada a temperatura ambiente con etanol 90% durante 48 horas y una segunda maceración por 24 horas, se transvasaron las fracciones y se llevaron al rotavapor para su concentración.

**Extracto Acetónico:** Finalmente para este extracto se utilizó el sólido remanente del filtrado con etanol, el cual se macero con acetona al 90%, siguiendo el mismo protocolo de extracción.

Las concentraciones de los extractos fueron colocados en frascos estériles y se llevaron a la estufa hasta su completa secado. Obteniéndose 3 muestras: E<sub>1</sub>: Hexano, E<sub>2</sub>: Etanol y E<sub>3</sub>: Acetona, con un peso de 1,547; 0,529 y 0,826 g respectivamente. Las muestras fueron almacenadas hasta el momento de utilizarlas para el ensayo. En el esquema 6 se resumen los pasos para la preparación de los extractos crudos.

**Esquema 6: Preparación de los Extractos Crudos de *Hura crepitans* L.**



## **Evaluación de la Actividad Antifúngica del *Hura crepitans* L.**

### **Cepas**

Para la estimación de la actividad antifúngica del *H. crepitans*, se usó una especie de *Candida albicans* CDC 385 del cepario del Laboratorio de Micología “Dr. Corrado Capretti” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

### **Materiales Utilizados:**

- Extractos E<sub>1</sub>: Hexano, E<sub>2</sub>: Etanol, E<sub>3</sub>: Acetona
- Discos de papel filtro (6 mm)
- Disco de Fluconazol (25 mg) (control positivo)
- Solventes: (hexano, etanol, acetona) (control negativo)
- Medio de cultivo: Caldo agar Múeller-Hinton modificado
- Patrón McFarland de 1

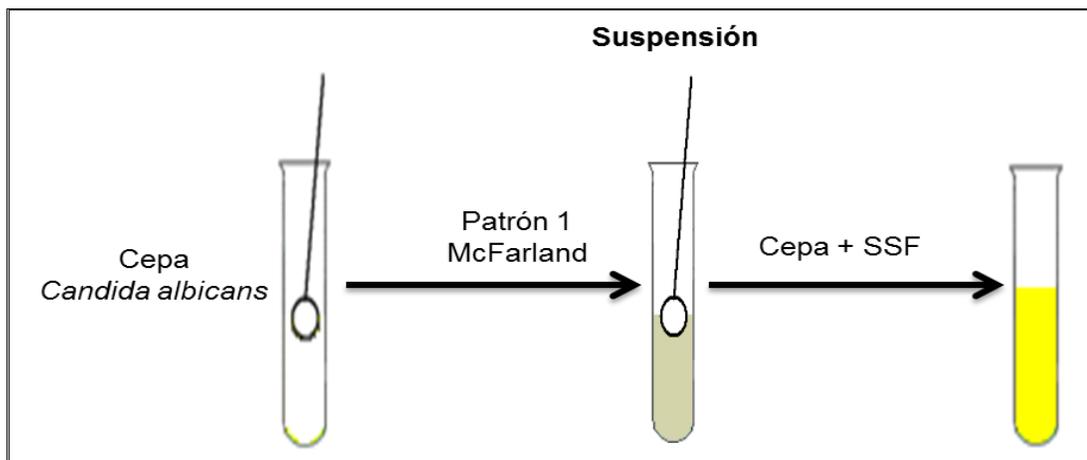
### **Impregnación de los Discos:**

Se utilizó discos de papel de filtro de 2 mm de grosor por 6 mm diámetro, los cuales se organizaron en una placa de Petri y se esterilizaron con luz ultravioleta (LUV), durante toda la noche. Previo a la preparación del inóculo, se impregnaron los discos de papel de filtro con 20 µL de cada muestra, así mismo el disco de Fluconazol y los discos con los solventes utilizados. Este paso se realizó 24 horas antes del ensayo antifúngico.

### **Preparación del Inoculo Fúngico:**

A partir de la cepa fresca y purificada, se preparó una suspensión ajustada al patrón 1 McFarland ( $1 \times 10^{6-8}$  UFC/mL), para ello se tomó una asada de la cepa que luego se agregó en Solución Salina Fisiológica (SSF) (ver Esquema 7).

### Esquema 7. Preparación del Inoculo Fúngico.



#### Preparación de las Placas e Inoculación:

Se prepararon las placas con 20 mL de agar Müller-Hinton modificado (HIMEDIA®), suplementado con 2% p/v de glucosa y azul de metileno (0,05 µg/mL) (NCLS, 2004). Se mezcló el inóculo preparado con el medio de cultivo, y se agregó a la placa. Se dejó solidificar el medio para luego colocar los discos impregnados con las muestras, los solventes (controles negativos) y el disco de fluconazol como control positivo.

#### Pre-incubación e Incubación:

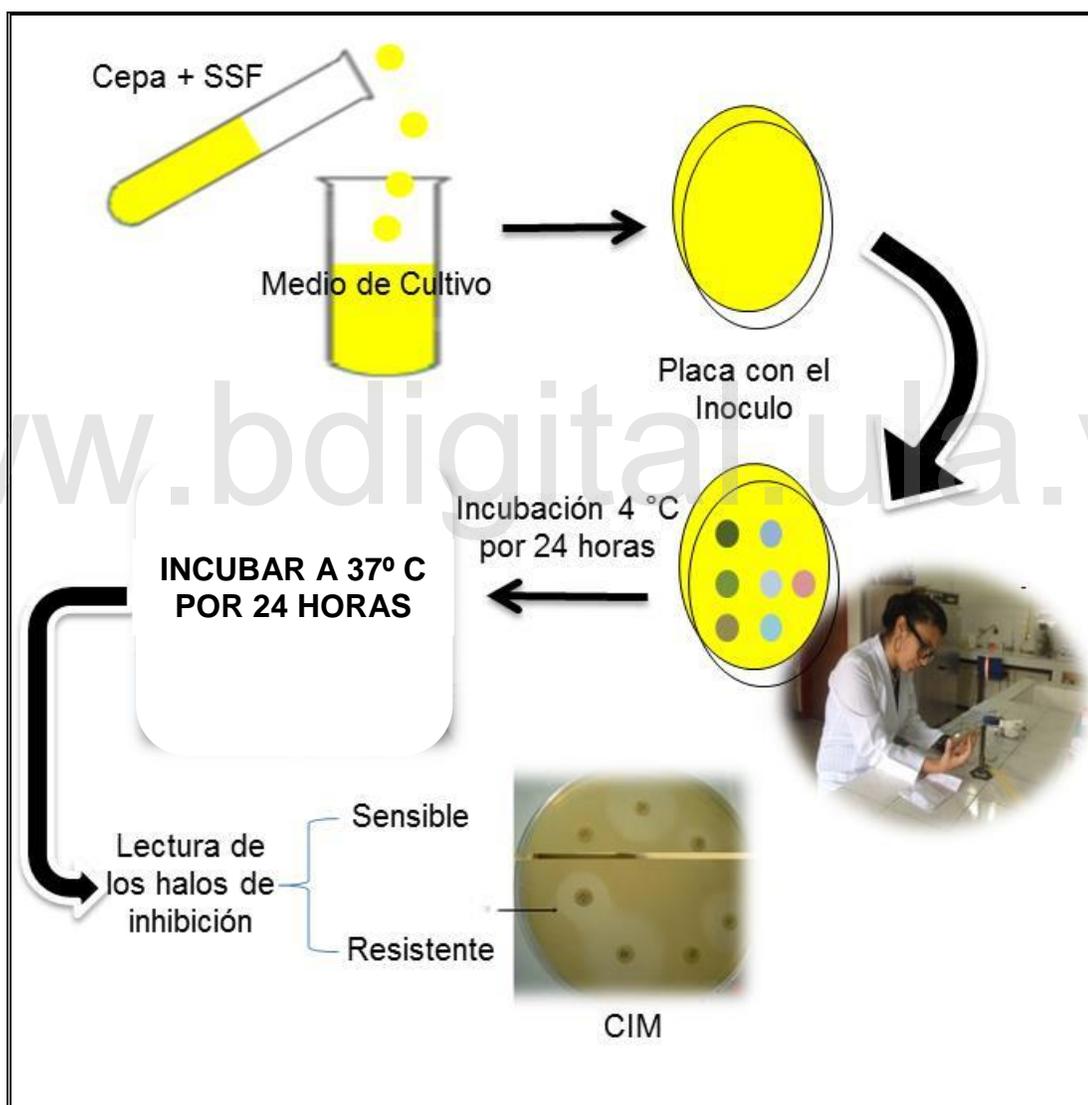
Después de ser colocados los discos en la placa de agar Müller-Hinton se dejaron a temperatura ambiente durante 20 minutos y se incubó a 4°C por 24 horas, para permitir la difusión de los extractos. Luego a 37°C por 24 horas más, en una estufa con temperatura regulable para permitir el crecimiento fúngico.

#### Lectura del Ensayo:

Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a examinar la placa, de acuerdo a la sensibilidad o resistencia de la cepa. Se consideró como resultado positivo (Actividad Antifúngica) cuando un halo de inhibición de

crecimiento fúngico se observó alrededor del disco. En el caso contrario, la ausencia de halo se interpreta como resultado negativo o resistente (sin Actividad Antifúngica). El diámetro de la zona de inhibición, producto de la actividad antifúngica de las muestras se expresó en milímetros (mm) (ver Esquema 8).

### Esquema 8. Análisis Antifúngico y Lectura de los Halos de Inhibición.



- E<sub>1</sub>: Extracto Hexanoico, ● E<sub>2</sub>: Extracto Etanólico, ● E<sub>3</sub>: Extracto Acetónico,
- C<sub>1</sub>: Hexano, ● C<sub>2</sub>: Etanol, ● C<sub>3</sub>: Acetona, ● Disco de Fluconazol (25 mg)

### **Concentración Inhibitoria Mínima (CIM):**

Es la concentración más baja capaz de inhibir el crecimiento del microorganismo visible (CLSI, 2014). La CIM se realizó solo al extracto que presentó actividad antifúngica, enfrentando a la cepa de referencia con diferentes concentraciones de la muestra, para así establecer la CIM, la cual se realizó por el método de difusión en agar con discos. El ensayo se realizó por duplicado. Esta prueba se realizó bajo la asesoría de los profesores Díaz Clara y Salazar Oduar, en el Laboratorio de Micología “Dr. Corrado Capretti” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

### **Screening Fitoquímico del Extracto con Actividad Antifúngica**

Se realizó mediante pruebas fitoquímicas de caracterización siguiendo las técnicas de Hinojosa *et al.*, (2013). Entre los metabolitos secundarios buscados se tiene: Alcaloides, triterpenos, esteroides, flavonoides y saponinas. Para la realización del screening fitoquímico cualitativo se realizó una cromatografía de capa fina (TLC), para la fase móvil: se agregó a la cámara hexano: Acotet (7:3), se tapó la cámara para evitar la evaporación, posteriormente, se sembró de 5 a 10 veces el extracto secándose a la vez. Al secarse se agregó la vainilla revelador universal mostrando múltiples manchas (ver Figura 8).

Se procedió a realizar la siguiente extracción: Se pesaron 10 g de hojas pulverizada y se agregaron 20 mL de la mezcla agua-etanol (1:10) y 20 mL de éter de petróleo en un matraz tapado y aislado de la luz. Luego, fue colocado en un agitador a 150 rpm durante 1 h. Transcurrido ese tiempo, el sobrenadante se colocó en un embudo de separación para obtener dos fases: etanol-agua y oleosa (etérea), para la identificación de: a) flavonoides, b) saponinas, c) alcaloides, d) triterpenos y esteroides.

**Figura 8.** Corrida de los Compuestos Presentes en el Extracto Etanólico de las Hojas de *Hura crepitans* L.



**a) Determinación de Flavonoides:** Se realizó por TLC. Usando como fase móvil una mezcla de BuOH: ácido acético: H<sub>2</sub>O (3:1:1). Posteriormente usando la misma fase móvil se procedió a identificar la presencia de los flavonoides quercetina y rutina usando como patrones: Quercetina 2mg/mL MeOH y Rutina 2mg/mL MeOH, mediante el revelador NEU (2-aminoetil-difenilborato) (Wollenweber, Valant-Vetschera, Ivancheva and Kuzmanov, 1987).

**b) Identificación de Saponinas:** Se utilizó el ensayo de espuma. Se diluyó el extracto 9:1 tomando 1 mL del extracto etanol-agua, más 9 mL de H<sub>2</sub>O destilada, colocándolo en un tubo de ensayo de vidrio con tapa (13 x 100 mm). Se agitó vigorosamente durante 30 s, con la mano. Se dejó reposar 15 min. Si la altura de espuma es <5 mm: (-), se considera negativa, no contiene saponinas; alrededor de 5–10 mm: (+) argumenta un contenido

moderado; una altura >15 mm: (+++), se le atribuye a un alto contenido de saponinas.

**c) Ensayo para Alcaloides (Prueba de Dragendorff):** Se tomaron 3 mL de la solución de etanol-agua, adicionándole 4 gotas de amoníaco. Después de llevarlo a sequedad se adicionaron 3 gotas de ácido acético y una gota de agua destilada, concentrando la solución en una plancha eléctrica. Se colocaron gotas de esta solución en un papel de filtro y se cubrió con gotas del reactivo de Dragendorff. Un cambio de naranja a rojo o rosado sugiere la presencia de alcaloides.

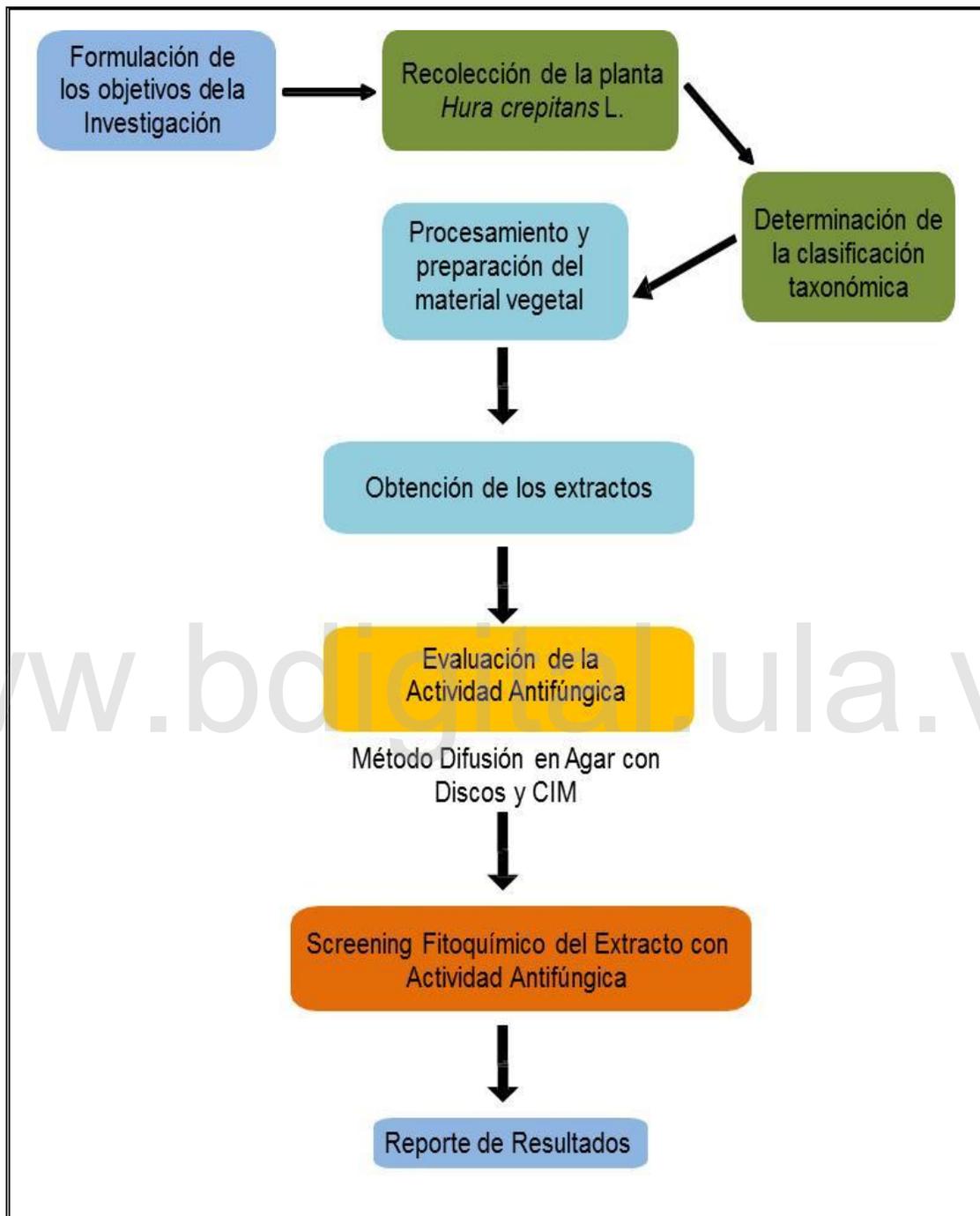
**d) Identificación de Triterpenos y Esteroides:** Se utilizó la prueba de Lieberman-Buchard. Para este ensayo se partió del extracto oleoso (etéreo), se tomó 1 mL y se colocó en un crisol. Posterior a su volatilización en campana se adicionaron 4-5 gotas de cloroformo al crisol, se mezclaron bien y se repartieron mediante goteo a 4 tubos de vidrio con tapa. Luego, se agregaron 2 gotas de anhídrido acético a cada tubo, estando todos los tubos tapados para evitar la evaporación de los solventes y bajo campana.

Finalmente, se les agregó una gota de ácido sulfúrico con pipeta Pasteur a solo 3 de los tubos para que uno de ellos sirva como control negativo. Una coloración azul o verde = esteroides; rojo, rosado o violeta = triterpenos; amarillo pálido = triterpenos saturados.

### **Organización de la Información**

En tablas mediante números. La metodología desarrollada en el presente trabajo de investigación se resume en el esquema 9.

**Esquema 9. Camino Metodológico.**



## CAPITULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### **Evaluación de la Actividad Antifúngica de *Hura crepitans* L.**

En la tabla 5 se expresa las concentraciones ensayadas de los extractos vegetales para la valoración de la actividad antifúngica de las hojas de *Hura crepitans* L., contra cepas CDC 385 de *Candida albicans*. Dicha actividad fue estudiada por el método de difusión en agar con discos, así como la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM). En tal sentido, sólo el extracto etanólico inhibió el desarrollo de la cepa a una concentración de 529 mg/μL y un halo de inhibición de  $\geq 14$  mm de diámetro, que es interpretado como actividad significativa contra *Candida albicans*, con una CIM de un rango de concentración de 400-20 mg/μL. En la tabla 6, figuras 9 y 10, se expresan los resultados obtenidos en la actividad antifúngica y CIM de la especie *Hura crepitans* L., (Euphorbiaceae).

Los resultados obtenidos en esta investigación se correlacionan con estudios anteriores realizados a extractos de hexano, butanol y acetato de etilo de la corteza del tronco de *Hura crepitans* L., los cuales han mostrado actividad contra *Candida albicans*. Siendo la fracción de acetato de etilo la más activa, ya que inhibe *Aspergillus niger* y *Candida albicans* en 6,25 a 200 mg/μL. Se ha observado que dichos extractos son más eficaces como agentes antimicrobianos que las hojas, esto puede deberse a la presencia de flavonoides en la corteza ya que en las hojas están ausentes (Oloyede y Olatinwo, 2014).

**Tabla 5. Concentraciones de los Extractos Vegetales de *Hura crepitans*.**

Muestras	Peso del Extracto (g)	μL del Solvente	Concentración mg/μL
E <sub>1</sub>	0,527	1000	527
E <sub>2</sub>	0,529	1000	529
E <sub>3</sub>	0,526	1000	526

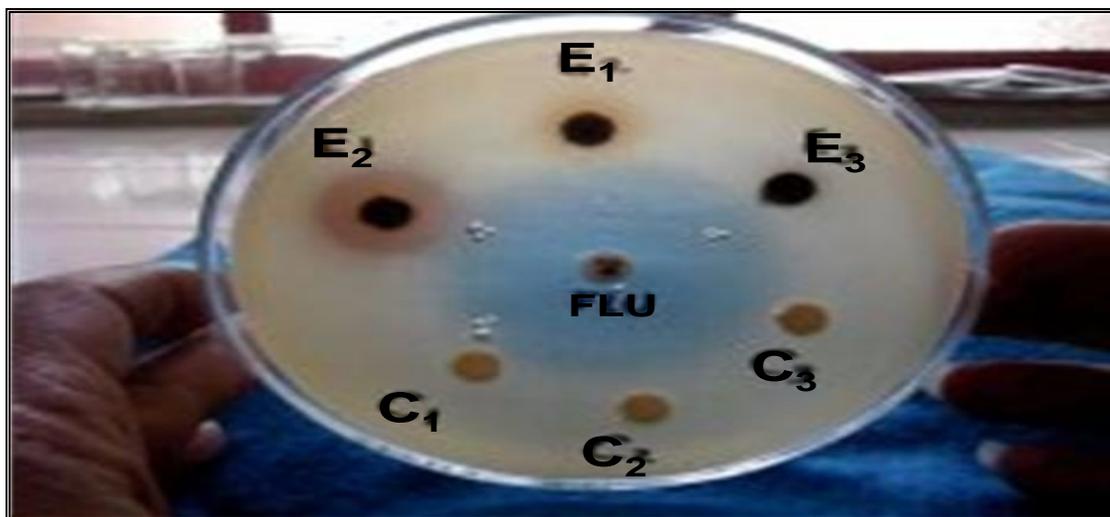
E<sub>1</sub>: Extracto Hexanoico, E<sub>2</sub>: Extracto Etanólico, E<sub>3</sub>: Extracto Acetónico.

**Tabla 6. Actividad Antifúngica de los Extractos Vegetales de *Hura crepitans* L., (Euphorbiaceae).**

Microorganismo	Muestras	Zona de Inhibición (mm)*	CIM
<i>Candida albicans</i> CDC 385	FLU	38*	---
	E <sub>1</sub>	NA	---
	E <sub>2</sub>	14*	< 20 mg/μL
	E <sub>3</sub>	NA	---
	C <sub>1</sub>	NA	---
	C <sub>2</sub>	NA	---
	C <sub>3</sub>	NA	---

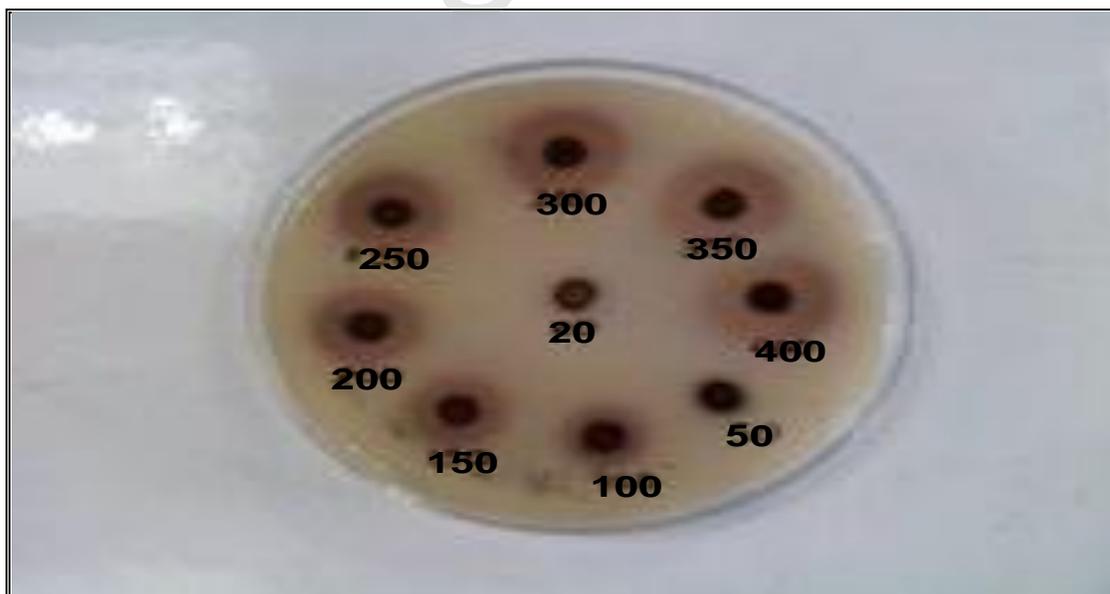
E<sub>1</sub>: Extracto Hexanoico, E<sub>2</sub>: Extracto Etanólico, E<sub>3</sub>: Extracto Acetónico. FLU: Fluconazol® (25 mg), control positivo. C<sub>1</sub>: Hexano, C<sub>2</sub>: Etanol, C<sub>3</sub>: Acetona, solventes, controles negativos. NA: No activo. \*Zona de inhibición en mm, diámetro del disco 6 mm, media tomada de dos ensayos consecutivos. CIM: Concentración Inhibitoria Mínima, rango de concentración 400-20 mg/μL.

**Figura 9. Determinación de la Actividad Antifúngica contra *Candida albicans* CDC 385 por el Método de Difusión en Agar con Discos.**



E<sub>1</sub>: Extracto Hexanoico, E<sub>2</sub>: Extracto Etanólico, E<sub>3</sub>: Extracto Acetónico. FLU: Fluconazol®. C<sub>1</sub>: Hexano, C<sub>2</sub>: Etanol, C<sub>3</sub>: Acetona.

**Figura 10. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) del Extracto Etanólico de *Hura crepitans* L., (Euphorbiaceae) por el Método de Difusión en Agar con Discos contra *Candida albicans*.**



Asimismo, se muestra que los extractos hexanoico y acetónico de las hojas de la especie estudiada no presentaron actividad antimicrobiana frente a la levadura de *Candida albicans*. Según, Rojas *et al.*, (2003), la polaridad de los disolventes pueden desempeñar un papel significativo en la eficacia de los extractos de plantas como agentes antimicrobianos. Es importante destacar que este es el primer estudio *in vitro* de la actividad antifúngica de extractos vegetales de las hojas de *Hura crepitans* L.

Por otra parte, especies pertenecientes a la familia botánica Euphorbiaceae han presentado la inhibición de cepas de *C. albicans* y *Cryptococcus neoformans*, como es el caso del extracto etanólico de *Euphorbia lancifolia* en dosis entre 1–10 mg/μL (Gupta, 2008). La especie *Cnidioscolus aconitifolius* ha demostrado la presencia de taninos, saponinas, alcaloides y flavonoides, metabolitos relacionados con actividad antimicrobiana (Yoc *et al.*, 2012).

Dentro de los hongos, *Candida* es uno de los patógenos oportunistas más comunes y en especial por la presentación de cuadros invasivos en pacientes inmunocomprometidos (Murray *et al.*, 2006). Al respecto, *Candida albicans* es la especie más patógena y su virulencia se debe a un conjunto de atributos relacionados con su habilidad para evadir a los mecanismos de defensa del hospedador, de resistir al tratamiento antifúngico, o de lesionar las células y tejidos que invade (Álvarez *et al.*, 1995). Como resultado, la terapia antifúngica está jugando un papel muy importante en el cuidado de la salud y el tamizaje de plantas tradicionales en busca de nuevos antifúngicos es ahora más frecuente (Yoc *et al.*, 2012).

Al igual que los antibacterianos, la búsqueda de nuevos agentes antifúngicos se basa en gran parte, de la información la etnobotánica y

etnofarmacológica. Actualmente existen varios métodos *in vitro* disponibles para detectar actividad antimicrobiana de los productos naturales, como es el caso del método difusión en agar, el cual se conoce como método cualitativo; puesto que sólo demuestra la presencia o ausencia de sustancias con actividad antimicrobiana. Por otro lado, los métodos de dilución son considerados ensayos cuantitativos, ya que determinan la Concentración Inhibitoria Mínima (Valgas, Machado, Smania and Smania, 2007).

### **Screening Fitoquímico del Extracto Etanólico con Actividad Antifúngica de *Hura crepitans* L., (Euphorbiaceae)**

Los ensayos de caracterización cualitativa realizados al extracto etanólico de las hojas de *Hura crepitans* L., indican la presencia, de saponinas y esteroides (Tabla 7), los cuales se encuentran reportados dentro de la fitoquímica de la especie (Fernández *et al.*, 2011).

**Tabla 7. Tamizaje Fitoquímico del Extracto Etanólico de las Hojas de *Hura crepitans* L., (Euphorbiaceae).**

<b>Fitocompuesto</b>	<b>Ensayo</b>	<b>Muestra Extracto Etanólico</b>
Alcaloides	Dragendor	(-)
	Wagner	(-)
	Mayer	(-)
Saponinas	Ensayo de Espuma	(+)
Flavonoides	Shinoda	(-)
Triterpenos	Lieberman-Buchard	(-)
Esteroides	Lieberman-Buchard	(+)

(-): Ausente, (+): presente.

Según, Oloyede y Olatinwo (2014), entre los metabolitos secundarios presentes en extractos metanólicos de las hojas y corteza del tronco de *H. crepitans*, se encuentran: alcaloides, esteroides y compuestos fenólicos. Los flavonoides, glucósidos cardíacos y taninos aunque presentes en la corteza eran sin embargo ausente en las hojas, pero saponinas y carbohidratos si fueron detectados. Por su parte, Ruiz (2013) señala, que la distribución de los compuestos antifúngicos puede ser definida ya sea en base a su distribución taxonómica o su clase química. Los antifúngicos naturales pertenecen a todas las clases mayores de metabolitos secundarios como compuestos fenólicos, alcaloides, terpenoides, saponinas, flavonoides, proteínas, y péptidos, etc.

Finalmente, se ha reportado otros usos a la especie *Hura crepitans* L., como planta para combatir insectos en áreas tropicales (insecticida de origen natural). Los insecticidas vegetales han vuelto a ser considerados como una opción válida para el combate de insectos por ser muchas las ventajas que ofrecen, especialmente desde el punto de vista ecológico (Cázares, 2006). Asimismo, el extracto hexanoico posee actividad antiviral contra BHV-1 (Taborda *et al.*, 2007) y actividad antibacteriana contra *S. aureus* (Yoc *et al.*, 2012). La actividad antifúngica exhibida por el extracto etanólico de las hojas contra *C. albicans*, apoya a futuras investigaciones orientadas a aislar y caracterizar el o los componentes responsable(s) de dicha actividad.

## CAPITULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### Conclusiones

- El extracto crudo etanólico de las hojas de *Hura crepitans* L., mostró actividad contra cepas CDC 385 de *Candida albicans*, a una concentración de 529 mg/μL y un halo de inhibición de  $\geq 14$  mm de diámetro, que es interpretado como actividad significativa.
- Todas las diluciones ensayadas del extracto etanólico, mostraron actividad contra cepas CDC 385 de *Candida albicans*, obteniéndose una CIM de  $< 20$  mg/μL.
- Los extractos hexanoico y acetónico de las hojas de *Hura crepitans* L., no presentaron actividad antifúngica contra cepas CDC 385 de *Candida albicans*, a las concentraciones de 527 y 526 mg/μL respectivamente.
- En el screening fitoquímico del extracto etanólico con actividad antifúngica de las hojas de *Hura crepitans* L., se evidenció la presencia de los metabolitos secundarios como: Saponinas y esteroides. En el caso de la determinación de alcaloides, flavonoides y triterpenos, resultaron ausentes dichos metabolitos.
- En la presente investigación se reveló el potencial antifúngico de las hojas de *Hura crepitans* L., siendo este el primer reporte sobre el estudio

de la actividad antifúngica de las hojas de esta especie vegetal.

### **Recomendaciones**

- Realizar el estudio fitoquímico del extracto etanólico de las hojas de la especie *Hura crepitans* L., para lograr separar e identificar los metabolitos secundarios presentes en dicha planta.
- Ensayar el extracto etanólico de la corteza del tallo de *Hura crepitans* L., para evaluar su posible actividad antifúngica.
- Estudiar otras actividades antimicrobianas de las hojas de la especie *Hura crepitans* L., ya que se ha reportado actividad antibacteriana y antiviral en la corteza del tallo.

www.bdigital.ula.ve

## APÉNDICE

### Glosario de Términos Botánicos

(Tomado de López, 2001; Acosta 2008).

**Acúleo:** Aguijón.

**Agujón:** Estructura punzante de origen superficial (epidémico).

**Albumen:** Tejido nutricio que acompaña al embrión en la semilla. Se emplea el término sin importar el origen del tejido nutricio tanto para las semillas endospermadas, como para las perispermadas y las protaladas.

**Angiospermas:** Son las plantas con semilla cuyas flores tienen verticilos o espirales ordenados de sépalos, pétalos, estambres y carpelos, y los carpelos encierran a los óvulos y reciben el polen en su superficie estigmática en lugar de recibirlo directamente en el óvulo como las gimnospermas.

**Antera:** Que es la “bolsita” superior donde están encerrados los granos de polen.

**Bráctea:** Hoja reducida de las inflorescencias, diferente de las hojas normales, como la que suele haber junto al punto de inserción del pedúnculo de cada flor. Cada bráctea lleva en la axila una flor, una inflorescencia o una rama de la inflorescencia.

**Cáliz:** Es la parte verde de la flor. Tiene una consistencia más fuerte que la

corola y a sus piezas se les llama sépalos. Verticilo externo de las flores que tienen dos envueltas (cáliz y corola).

**Dehiscencia:** Que se abre cuando está maduro.

**Dicotiledóneas:** Son una clase de plantas fanerógamas angiospermas, cuyos embriones de las semillas presentan dos cotiledones u hojitas iniciales, opuestos por lo común.

**Disco:** Excrecencia que forma el receptáculo con forma de anillo o disco generalmente glandular (nectarífero). Receptáculo común en el capítulo de las compuestas, sinónimo de Clinanto.

**Drupáceos:** Fruto carnoso que tiene un hueso duro en su interior. Ej., la aceituna y la ciruela.

**Espiga:** Inflorescencia racemosa simple, con flores sésiles.

**Estambre:** Órgano masculino de la flor. Cada uno de los órganos que forman la parte masculina de la flor; son los que llevan los sacos polínicos y en su interior los granos de polen. Generalmente constan de un filamento y una antera (donde se aloja el polen).

**Estaminadas:** Se refiere a la flor que solo presenta estambres como ciclo reproductor, o sea es masculina.

**Estilos:** Parte superior del gineceo, en forma de estilete, intermediaria entre el estigma y el ovario.

**Estípulas:** Cada uno de los apéndices que en muchas plantas nace a cada lado de la base del pedúnculo o pecíolo de la hoja; suelen ser dos. A veces son grandes y parecidas a las hojas (foliáceas).

**Glabras:** Sin pelos.

**Hojas alternas:** Son hojas pecioladas que nacen de una en una a lo largo del tallo.

**Látex:** Jugo lechoso por lo general blanquecino o amarillento propio de algunas plantas, es por lo general una emulsión de resinas y caucho en agua.

**Monocotiledónea:** Son un grupo de angiospermas que posee un solo cotiledón en su embrión en lugar del número ancestral de 2 como fue retenido en las dicotiledóneas.

**Palmaticompuesta:** La hoja compuesta cuando sus folíolos surgen todos del ápice del pecíolo común; éstos pueden ser tres, y el caso particular de la hoja trifoliolada, cinco, seis, etc.

**Palmatilobada:** Órgano foliáceo de nervadura palmeada dividido hasta la mitad como máximo en gajos o lóbulos muy marcados y más o menos redondeados.

**Pecíolo:** Pezón o rabillo que une la lámina de la hoja a la base foliar a al tallo.

**Perianto:** Envuelta floral, formada en muchos casos por el cáliz y la corola.

**Planta Dioica:** Que tiene las flores de cada sexo en pie de planta distintos.

**Planta Monoica:** Que tiene separadas las flores de cada sexo, pero en un mismo pie.

**Sépalo:** Conjunto de hojas que componen el cáliz.

www.bdigital.ula.ve

## REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS

Acosta, P. (2008). **Botánica general**. Guía didáctica. Editorial Universidad Técnica Particular de Loja. Escuela de Ciencias de la Educación. Ecuador. Disponible: <http://www.utpl.edu.ec/eva/descargas/material/143/g247051.pdf> [Consulta: 2016 Agosto, 18].

Adedire, C. O., and Ajayi, O. E. (2003). Potential of sandbox, *Hura crepitans* L. seed oil for protection of cowpea seeds from *Callosobruchus maculatus* Fabricius (Coleoptera: *Bruchidae*) infestation. **Journal of Plant Diseases and Protection**, **110**, (6): 602–610.

Adewuyi, A., Göpfert, A., Wolff, T., Rao, B., y Prasad, R. (2012). Síntesis de Azidohydrin de *Hura crepitans*. Aceite de Semilla: Un recurso renovable para Oleochemical Industria y Desarrollo Sostenible. **Revista ISRN Organic Chemistry**, **046**: 873.

Albornoz, A. (1980). **Productos naturales. Sustancias y drogas extraídas de las plantas**. Publicaciones de la UCV. Caracas. Venezuela.

Álvarez V., y col. (1995). **Manual de técnicas de Microbiología**. Madrid-España.

Álvarez, M., Isaza, G., y col. (2005). Actividad antimicótica de *Phenax rugosus* pers y *Baccharis trinervis* wedd. **Revista Ciencias Básicas. Biosalud**. [Sede Web]. Colombia [Acceso 15 de junio de 2015]. Disponible en: <http://biosalud.ucaldas.edu.com/>.

Anjaneyulu, A., Rao, K., and Row, L. (1973). Isolation and structural elucidation of three new lignans from the leaves of *Phyllanthus niruri* Linn. **Tetrahedron**, **29**, 1291-1298.

Arostegui, V. A. (1982). **Recopilación y análisis de estudios tecnológicos de maderas peruanas**. Documento de trabajo N° 2. Lima Perú. Pp. 57.

Babillo, V. M., y Schnee, L. (1965). Clave de las Familias de Plantas Superiores de Venezuela. **Revista de la Facultad de Agronomía**, **144**. Universidad Central de Venezuela.

Bidart, T. (2014). Lo antiguo y lo nuevo en antifungicos y antivirales. **Revista Chilena**, **22**: 40-5.

Bruneton, J. (2001). **Farmacognosia Fitoquímica Plantas Medicinales**. Editorial Acribia. Zaragoza, España.

Burger, W. C., and Huft, M. J. (1995). Family Euphorbiaceae. **Bot. Field Museum of Natural History, Chicago**, **36**: 1–169.

Bussmanna, R., Malca-García, G., Glenn, A., Sharon, D., Chait, G., Díaz, D., *et al.* (2010). Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, **132**, 101-108.

Cáceres, A. (1996). **Plantas de Uso Medicinal en Guatemala**. Guatemala: Editorial Universitaria.

Cázares, H. J. (2006). **Actividad en *Drosophila melanogaster* y *Sitophilus zeamais* de aceites esenciales de plantas usadas para combatir insectos en**

**Hidalgo.** [Tesis] Licenciatura en Biología. Universidad Autónoma del estado de Hidalgo.

Changying, Z., Wenquan, W., Yun, Z., Xin, C., and Weiping, B. (2009). Conservation and divergence of microRNAs and their functions in Euphorbiaceous plants. ***Nucleic Acids Research*, 38**, 981-995.

Chellaiah, M., Muniappan, A., Nagappan, R., and Savarimuthu, I. (2006). Medicinal plants used by traditional healers in Kancheepuram District of Tamil Nadu, India. ***Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 2**, 1-10.

CLSI. (2014). ***Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement***. CLSI Document M02-A11, M07-A9, and M11-A8. [ISBN 1-56238 653-0]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.

Curtis, H., y Schnek, A. (2008). ***Biología***. Séptima Edición. Editorial Médica Panamericana. España. Pp. 530.

David, O. M., Ojo, O. O., Olumekun, V. O., and Famurewa, O. (2014). Antimicrobial activities of essential oils from *Hura crepitans* (L.), *Monodora myristica* (Gaertn Dunal) and *Xylopiya aethiopica* (Dunal A. Rich) seeds. ***British Journal of Applied Science & Technology*, 4**, (23): 3332-3341.

Fabri, R. I., De Sá, D., Pereira, A. P., Scio, E., Pimenta, D. S., and Chedier, L. M. (2015). Antimicrobial, antioxidant and cytotoxicity potential of *Manihot multifida* (L.) Crantz (Euphorbiaceae). ***Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 87**, (1): 303-311.

Fachín-Espinar, M., López-Del Águila, P., Arzubialdes, K., Gutiérrez, W., y Alva, A. (2012). Actividad antifúngica del extracto de *Brosimum rubescens* (palisangre). **Ciencia Amazónica (Iquitos)**, 2, (2): 100-107.

Fernández, C. A., Valdés, J., Mendiola, M., Acuña, R. D., Caballero, L. Y., Scull, L. R., y Gutiérrez, G. Y. (2011). Actividad antimalárica y citotoxicidad de extractos hidroalcohólicos de seis especies de plantas usadas en la medicina tradicional cubana. **Rev. Cubana Med. Trop.**, 63, (1):52-57.

Fonnegra, R., y Jiménez, S. (2007). **Plantas medicinales aprobadas en Colombia**. Editorial Universidad de Antioquia. 1-4.

Gómez C. (2010). Resistencia de levaduras del género *Candida* al fluconazol. **Revista INFECTIO**, 14, (2): 172-180.

Gómez, M. (2006). **Introducción a la metodología de la investigación científica**. Córdoba Argentina. Editorial Brujas.

González, A. (2004). **Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas del Amazonas**. Tesis de Grado no publicada, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá – Colombia.

Gordon, E., y Pardo, M. (2012). Riqueza y composición de especies promisorias de un sector de los llanos orientales, Venezuela. **Acta biol. Venez.**, 32, (2): 99-180.

Gregorí, B. (2005). Estructura y actividad de los antifúngicos. **Revista Cubana Farm. Cuba**. [Acceso el 12 de junio de 2015]. Disponible en <http://bvs.sld.cu/>.

Gupta, M. (2008). **Plantas Medicinales Iberoamericanas. Colombia**. Programa

Iberoamericano de Ciencia y Tecnología CYTED.

Harbone, J. B., Mabry, T. J., and Mabry, H. (1975). **The flavonoids**. Parte II. Academic Press. New Your, San Francisco.

Hartwell, J.L. (1969). Plants used against cancer: a survey. **Lloydia**, **32**, 157-76.

Hernández, R., Fernández, C., y Baptista P. (2010). **Metodología de la Investigación**. Quinta edición. Editorial McGrawHill. México.

Hinojosa, D. J., Gutiérrez, L. M., Siller, L. F., Rodríguez, S. A., Morales, J., Guerrero, M. P., y Del Toro S. C. (2013). Screening fitoquímico y capacidad antiinflamatoria de hojas de *Tithonia tubaeformis*. **Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud. Biotecnia**, **XV**, (2): 53-60.

Hokche, O., Berry, P., y Huber, O. (2008). **Nuevo catálogo de la flora vascular de Venezuela**. Caracas Venezuela. Fundación instituto Botánico de Venezuela Doctor Tobías Lasser. 203- 206.

Hoyos, J. (1979). **Los Arboles de Caracas**. Caracas, Venezuela: Sociedad de Ciencias Naturales La Salle. Pp. 174.

Hung, B., Falero, A., Pérez, C., Tirado, S., Balcinde, Y., y Pineda, M. (2008). Fitosteroles. Parte II: Fuentes de obtención, formas de uso y posición actual en el mercado. CENIC. **Ciencias Biológicas**, **39**, (2): 93-104.

Hurtado, J. (2008). **El proyecto de la investigación. Comprensión holística de la metodología y la investigación**. Sexta edición. Editorial Quirón. Caracas-Venezuela.

Jones, S. B. (1988). **Sistemática Vegetal**. 390-92. Editorial MCGRAW-HILL de México.

Justiniano, J., y Fredericksen, T. (2000). **Ecología y silvicultura de especies menos conocidas Ochoó Hura crepitans L. Euphorbiaceae**. Proyecto de Manejo Forestal Sostenible (BOLFOS). Santa Cruz, Bolivia.

Kala, C., Dhyani, P., and Sajwan, B. (2006). Developing the medicinal plants sector in northern India: Challenges and opportunities. **J. Ethnobiol. Ethnomedicine**, **32**, 1-15.

León, W., y Chavarri B. (2006). Anatomía xilemática del tallo de 8 especies de la subfamilia Euphorbioideae (Euphorbiaceae) en Venezuela. **Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata**, **106**, (1): 1-12.

Lizcano, A., y Vergara, J. (2008). **Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales Valeriana pilosa, Hesperomeles ferruginea, Myrcianthes rhopaloides y Passiflora manicatta frente a microorganismos patógenos y fitopatógenos**. Trabajo de Grado no publicada, Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Carrera de Microbiología Industrial. Colombia.

Londoño, O. A., Penieres, C. J., García, T. C., Carrillo, M. L., Quintero, M. M., García, V. S., Mendoza, S. M., y Cruz, S. T. (2008). Estudio de la actividad antifúngica de un extracto de propóleo de la abeja *Apis mellifera* proveniente del estado de México. **Tecnología en Marcha**, **21**, (1): 49-55.

López G. g. (1993). **Los árboles y arbustos de la Península Ibérica e Islas Baleares**. Ediciones Mundi-Prensa, 2001; "Diccionario de Botánica", P.Font Quer,

Ed.Labor.

López, B. T. (2002). Envenenamiento con semillas de *Hura polyandra* (Haba de San Ignacio). **Revista Mexicana de Medicina de Urgencias**, 1, (2): 61 – 64

López, R., Méndez, L., Hernández, F., y Castañón, R. (2004). **Micología Médica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio**. 2<sup>da</sup> Edición. Trillas. Pp. 99-107.

Lorenzo, P. *et al.*, (2008). **Farmacología básica y clínica**. Madrid España. Editorial Médica panamericana C.A. 1-7.

Macrae, W. D., Hudson, J. B., and Towers, G. H. N. (1988). Studies on the pharmacological activity of Amazonian Euphorbiaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, 22, 143-72.

Marcano, D., y Hasegawa, M. (2002). **Fitoquímica Orgánica**. Universidad Central de Venezuela. Editorial Torino.

Márquez, V. R., Torres, C., y Mercado, P. A. (2007). Actividad antifúngica del extracto total en etanol de las hojas frescas de *Pedilanthus tithymaloides* L. Poit. (Ultimorrial). **Scientia et Technica. Año XIII**, (33): 155-159.

Martínez, G. m., Jiménez, R. J., Cruz, D. R., Juárez, A. E., García, R., Cervantes, A., Mejía, H. R. (2002). Los géneros de la familia Euphorbiaceae en México. Anales del Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. **Serie Botánica**, 73, (2): 155-281.

Mathey, L., y VanDijck, P. (2013). Conocimientos recientes en *Candida albicans* biofilm mecanismo de resistencia. **Revista Curr Genet**, 59, (4): 251-64.

Mothana, R., Lindequist, U., Gruenert, R., and Bednarski, P. (2009). Studies of the *in vitro* anticancer, antimicrobial and antioxidant potentials of selected Yemeni medicinal plants from the island Soqatra. ***BMC Complementary and Alternative Medicine***, **9**, 1-11.

Murray, P., Rosenthal, K., y Pfaller, M. (2006). ***Microbiología Médica***. 5<sup>ta</sup> edición. Elsevier. Madrid.

Muthu, C., Ayyanar, M., Raja, N., and Ignacimuthu, S. (2006). Medicinal plants used by traditional healers in Kancheepuram District of Tamil Nadu, India. ***J. Ethnobiol. Ethnomedicine***, **2**, 43.

Nasiru, A. M., Adekunle, A. I., and Olufemi, A. A. (2013). Chemical composition of *Hura crepitans* seeds and antimicrobial activities of its oil. ***International Journal of Science and Research (IJSR)***, **2**, (3): 440-445.

NCCLS. (2004). ***Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods; approved guideline***. NCCLS document EP5-A2. 2<sup>nd</sup> ed. Wayne, Pennsylvania.

Negroni, R. (2009). ***Microbiología estomatológica, fundamentos y guía práctica***. 2<sup>da</sup> edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina. Pp. 77.

Net, A., y Quintana, E. (1997) Infecciones en el paciente crítico. Editorial Epringer-Verlag Iberica. España. Pp. 106-107.

Nwanorh, K. O. (2000). Extraction and characterization of oil from *Hura crepitans* (sand box tree). ***International research journal of education and innovation (IRJEI)***, **1**, (5): 1-8.

Oloyede, G. K., and Olatinwo, M. B. (2014). Phytochemical investigation, toxicity and antimicrobial screening of essential oil and extracts from leaves and stem bark of *Hura crepitans* (Euphorbiaceae). **Academia Arena**, 6, (5): 7-15. Disponible en: <http://www.sciencepub.net/academia>

Oryema, C., Bukenya-Ziraba, R., Omagor, N., and Opio, A. (2010). Medicinal plants of Erute country, Lira district, Uganda with particular reference to their conservation. **African Journal of Ecology**, 48, 285-298.

Ospina, S. D. (2012). **Actividad antifúngica del extracto crudo de Azadirachta indica. Juss., de suspensión de células sobre hongos dermatofitos causantes de enfermedades patógenas al hombre**. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agrarias [Tesis Postgrado]. Medellín, Colombia.

Palella, S., y Martins, F. (2010). **Metodología de la investigación cuantitativa**. 2<sup>da</sup> Ed. Caracas: FEDUPEL.

Pardo, A. K., Arenas, J. J., Gómez, M., Lora, F. M., y Gómez, J. E. (2011) Determinación de la actividad antifúngica de extractos de *Lantana camara* frente a *Candida* spp. **Infectio.**, 15, (4): 235-242.

Pérez, C. A., Rojas, S. J., Chamorro, A. L., y Pérez, P. K. (2011). Evaluación de la actividad antifúngica de *Melia azederach* sobre aislados de *Colletotrichum* spp. **Rev. Colombiana Cienc. Anim.**, 3, (2): 309-320.

Pontón, J. (2008). La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. **Rev. Iberoam. Micol.** [Sede Web]. España [Acceso 22 de mayo 2015]. Disponible en: <http://www.reviberoammicol.com/>.

Quituisaca, C. A. (2015). **Extracción, aislamiento, caracterización y actividad antimicrobiana de metabolitos secundarios de Croton abutiloides de la familia Euphorbiaceae en la provincia de Loja.** Universidad Técnica Particular de Loja. Tesis de Pregrado: Bioquímico – Farmacéutico. Loja- Ecuador.

Rodríguez, P. A., Ramírez, A. M., Bautista, B. S., Cruz, T. A., y Rivero, D. (2012). Actividad antifúngica de extractos de *Acacia farnesiana* sobre el crecimiento *in vitro* de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. **Revista Científica UDO Agrícola**, 12, (1): 91-96.

Rojas, R., Bustamante, B., Bauer, J., Fernández, I., Alban, J., and Lock, O. (2003). Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, 88: 199-204.

Roldán, A. (1999). **Los grandes Remedios Naturales.** Madrid España. Editorial EDAF, S.A. 10, 12, 70- 75.

Ruiz, G. M., y Susunaga, C. M. (2000). **Actividad antimicrobiana presente en partes aéreas de las especies Bursera simaoruba y Bursera graveolens (Burseraceas) frente a microorganismos como Agrobacterium tumefaciens, Erwinia carotovora, Fusarium oxysporum.** Carrera Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología. Pontificia Universidad Javeriana. Trabajo de Pregrado. Bogota DC. 40.

Ruiz, J. (2013). **Actividad antifúngica in vitro y concentración mínima inhibitoria mediante microdilución de ocho plantas medicinales.** Facultad de Farmacia y Bioquímica. [Tesis] Magíster en Microbiología. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima – Perú.

Salamanca, G. (s.f.). **La familia Euforbiaceae como condición promisoriosa para la obtención de metabolitos secundarios.** Facultad de ciencias. Departamento de Química. Universidad del Tolima. Colombia. Disponible en: [http://webdelprofesor.ula.ve/ciencias/chataing/Cursos/productos\\_naturales/euforbiaceae.pdf](http://webdelprofesor.ula.ve/ciencias/chataing/Cursos/productos_naturales/euforbiaceae.pdf)

Salcedo, A., y García, M. (1998). **Fibrosis quística.** Ediciones Díaz de Santos. Pp. 71.

Schnee, L., Leal, F., y Benítez, C. (2010). **El Manual de Plantas Comunes de Venezuela de Ludwig Schnee.** Colección Botánica. Maracay, Venezuela. Pp. 401.

Silva, V., Díaz, C., y Febre, N. (2002). Vigilancia de la resistencia de levaduras a antifúngicos. **Revista Chilena de Infectología, 19**, (2). 149-156.

Souza-Da Silva, F. (2012). **Contribuição ao estudo fitoquímico do gênero Croton: C. rhamnifolius (Euphorbiaceae).** Universidad Federal Do Ceará. Centro de Ciências. (Tesis Doctoral). Fortaleza.

Taborda, N., Acevedo, L., Patiño, C., Forero, J., y López, A. (2007). Actividad antiviral *in vitro* de extractos de *Hura crepitans* y *Codiaeum variegatum* en la replicación de herpes virus bovino tipo-1 y virus de estomatitis vesicular. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, 20**: 241-49.

Valgas, V., Machado de Souza, S., Smania, E., and Smania, A. (2007). Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Brazilian Journal of Microbiology, 38**: 369-380.

Vilata, J. (2005). **Micosis Cutáneas.** Editorial Médica Panamericana. Argentina. 97.

Webster, G. L. (2001). **Flora de Nicaragua. Introducción Gimnospermas y Angiospermas. 85.** Missouri Botanical Garden Press.

Wollenweber, E., Valant-Vetschera, K. M., Ivancheva, S., and Kuzmanov, B. (1987). Flavonoid aglycones from the leaf surfaces of some *Achillea* species. **Phytochemistry, 26**, (1), 181-182.

Yoc, C. A., Soto, L. E., Gutiérrez, M. J., y Arriola, N. M. (2012). **Estudios de actividad biocida, citotóxica y genotóxica de tres plantas medicinales de la familia Euphorbiaceae: Euphorbia lancifolia, Cnidoscolus aconitifolius var. mansa y Cnidoscolus aconitifolius var. estrella.** Seminario de Investigación para optar al título de Químicos Biólogos. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. Noviembre, Guatemala.

www.bdigital.ula.ve