

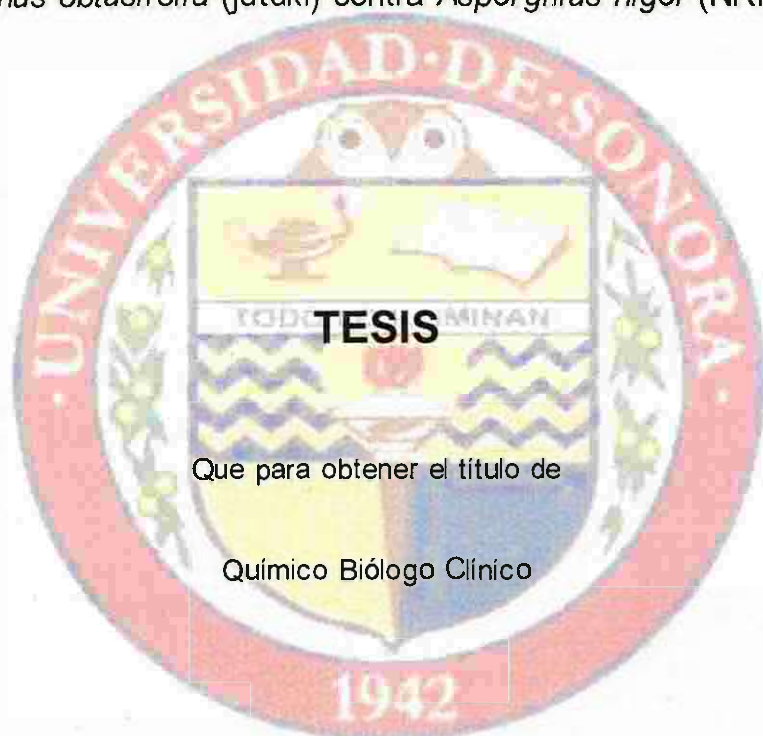
UNIVERSIDAD DE SONORA

Unidad Regional Sur

DIVISIÓN DE CIENCIAS E INGENIERIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

Actividad antifúngica de fracciones del extracto metanólico de
Zizyphus obtusifolia (jutuki) contra *Aspergillus niger* (NRRL3).



Presenta:

Paulina Sayas Galindo

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**




Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN


Los miembros del jurado calificador designado para revisar el Trabajo de Tesis Profesional de **Paulina Sayas Galindo**, lo han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptado como requisito para obtener el Título de Químico Biólogo Clínico.



M.C. Luis Alberto Zamora Alvarez
Director



Dr. Edgar F. Morán Palacio
Secretario



Dr. José Guadalupe Soñanez Organis
Vocal

M.C. Greda Acela Yañez Farias
Suplente

AGRADECIMIENTOS

A la Vicerrectoría de la Unidad Regional Sur y a la Dirección de Investigación y Posgrado por el apoyo al Proyecto: Evaluación de los compuestos bioactivos de extractos metanólicos de plantas silvestres del sur de Sonora. Ref. URS 13-PI04 dentro del cual se realizó este trabajo de tesis.

A la división de ciencias e Ingeniería, y al departamento de ciencias químico biológicas y agropecuarias

Al Programa de Fortalecimiento de la Calidad en Instituciones Educativas (PIFI), por el apoyo recibido para el desarrollo de la tesis.

Al laboratorio de bioquímica y toxicología a cargo del Dr. Edgar F. Morán Palacio.

Al M.C. Luis Zamora por su asesorar la presente tesis.

Al Dr. Edgar F. Morán Palacio por su apoyo académico para el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. José G. Soñanez Organís por su compromiso académico y la asesoría brindada.

A la Dra. Ema Carina Rosas Burgos por apoyarnos en el apartado metodológico al habernos proporcionada la cepa fúngica.

DEDICATORIAS

A mis padres el Sr. Manuel Sayas Blanco y a la Sra. María de los Ángeles Galindo Ortiz por su apoyo incondicional en cualquier momento y por siempre creer en mí, sin su amor y paciencia no lo hubiera logrado.

A mi hermana Alejandra por su apoyo y amistad, por todos sus consejos para siempre ser mejor.

A mi hermano Manuel por hacer más felices mis días.

A mi maestro preferido Luis Zamora, por su amistad, por animarme a salir siempre adelante y por su paciencia.

A mis amigos Damaris, Cesar, Elsa, Berenice, Ely y Rosalina por su amistad sin límites.

A mi mamachuy, mis abuelos Carmen y Pancho, por demostrarme su amor incondicional.

CONTENIDO

	Página
LISTA DE TABLAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMEN.....	ix
JUSTIFICACIÓN.....	x
OBJETIVOS.....	xi
HIPÓTESIS.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	3
Infecciones micóticas.....	3
Epidemiología de las infecciones micóticas.....	4
Aspergilosis de importancia clínica.....	5
<i>Aspergillus niger</i>	6
Tratamiento de las aspergilosis.....	8
Resistencia antifúngica.....	11
Propiedades farmacológicas de las plantas de uso medicinal.....	12
Terpenos.....	14
Flavonoides, taninos y fenoles.....	14
Alcaloides.....	15
<i>Zizyphus obtusifolia</i>	16
MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
Obtención de la muestra.....	18
Obtención del extracto metanólico.....	18
Fraccionamiento del extracto metanólico.....	18
Cultivo de microorganismos.....	19
Determinación de la actividad antifúngica.....	19

Análisis estadístico.....	20
RESULTADOS.....	21
Fraccionamiento del extracto metanólico de <i>Zizyphus obtusifolia</i> contra <i>A. niger</i> (NRRL3).....	21
Actividad antifúngica del extracto metanólico de <i>Zizyphus</i> <i>obtusifolia</i> contra <i>A. niger</i> (NRRL3).....	21
Actividad antifúngica de la fracción de hexano, acetato de etilo, etanol y residual del extracto metanólico de <i>Zizyphus</i> <i>obtusifolia</i> contra <i>A. niger</i> (NRRL3).....	23
DISCUSION.....	30
CONCLUSIONES.....	33
BIBLIOGRAFIA.....	34

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Fármacos prescritos aislados de plantas de uso medicinal.....	13

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Morfología microscópica de <i>A. niger</i> (conidióforo) bajo microscopia óptica y tinción de azul de lactofenol (40X).....	7
2	Principales antifúngicos utilizados para el tratamiento de aspergilosis. a) anfotericina B, b) itraconazol y c) caspofungina.....	9
3	Mecanismo de acción de los principales antifúngicos utilizados para el tratamiento de aspergilosis.....	10
4	<i>Zizyphus obtusifolia</i> ("jutuki").....	17
5	Actividad antifúngica del extracto metanólico a 7, 5, 1 mg/mL contra <i>A. niger</i> (NRRL3).....	22
6	Actividad antifúngica del extracto metanólico a 0.75, 0.50, 0.25 mg/mL contra <i>A. niger</i> (NRRL3).....	24
7	Actividad antifúngica de la fracción de hexano del extracto metanólico a 0.50, 0.25, 0.125 mg/mL contra <i>A. niger</i> (NRRL3).....	25
8	Actividad antifúngica de la fracción de acetato de etilo del extracto metanólico a 0.50, 0.25, 0.125 mg/mL contra <i>A. niger</i> (NRRL3).....	26
9	Actividad antifúngica de la fracción de etanol del extracto metanólico a 0.50, 0.25, 0.125 mg/mL contra <i>A. niger</i> (NRRL3).....	28
10	Actividad antifúngica de la fracción residual del extracto metanólico a 0.50, 0.25, 0.125 mg/mL contra <i>A. niger</i> (NRRL3).....	29

RESUMEN

La presencia de especies del género *Aspergillus* en las regiones agrícolas del estado de Sonora, representa un riesgo latente para el desarrollo de enfermedades micóticas. En los últimos años, la disminución de la efectividad de las terapias antifúngicas ha dado lugar a la búsqueda de nuevas fuentes de antibióticos. Ante esta problemática, las plantas de uso medicinal representan una alternativa para ello. Por lo tanto, la finalidad del presente trabajo fue evaluar la actividad antifúngica de cuatro fracciones del extracto metanólico de la corteza de la raíz *Zizyphus obtusifolia* ("Jutuki") contra *A. niger*, como un paso determinante en el proceso de aislamiento del compuesto responsable de la actividad antifúngica. El fraccionamiento se realizó mediante un proceso de partición y la actividad se evaluó mediante el método de dilución en agar. Los resultados demuestran que el extracto metanólico de la corteza de la raíz posee una actividad antifúngica en contra de *A. niger* catorce veces mayor que la reportada por Almada en 2010. A una concentración de 0.50 mg/mL, la fracción residual presentó 1.4 veces más actividad que el extracto metanólico al séptimo día de evaluación. Así mismo, fue 2.18 veces más activa que la fracción de etanol, y 14.75 veces más activa que la fracción la de hexano. Debido a que el efecto inhibitorio del extracto metanólico y de las fracciones activas se redujo a través del tiempo, los resultados sugieren que los compuestos presentes en la corteza de la raíz tienen propiedades fungistáticas.

JUSTIFICACIÓN

Ante la disminución de la efectividad de las terapias antibióticas en contra de las infecciones micóticas, las plantas de uso medicinal representan una alternativa para la búsqueda de nuevos antifúngicos. En los últimos años, numerosas investigaciones han aislado compuestos a partir de plantas, y han demostrado que poseen propiedades farmacológicas importantes. En la mayoría de estos trabajos, el fraccionamiento consecutivo de los extractos vegetales ha sido fundamental para su éxito. En la región sur del estado de Sonora, los resultados obtenidos por Almada en 2010 demuestran que el extracto metanólico de *Zizyphus obtusifolia* posee actividad antifúngica en contra de *Aspergillus niger* y sugieren que representa una fuente potencial para la obtención de nuevos antifúngicos. Ante ello, el fraccionamiento del extracto metanólico de *Z. obtusifolia* representa un paso esencial en el proceso de aislamiento del compuesto responsable de la actividad.

OBJETIVOS

General

Evaluar la actividad antifúngica de la fracción de hexano, acetato de etilo, etanol y residual del extracto metanólico de *Zizyphus obtusifolia* contra *Aspergillus niger* (NRRL3).

Específicos

- Obtener el extracto metanólico de *Zizyphus obtusifolia*
- Fraccionar el extracto metanólico de *Zizyphus obtusifolia* mediante partición sólido-líquido
- Evaluar el efecto antifúngico del extracto y de sus fracciones sobre el crecimiento de *Aspergillus niger* (NRRL3)

HIPOTESIS

La principal actividad antifúngica del extracto metanólico de *Zizyphus obtusifolia* en contra de *A. niger* (NRRL3) será retenida en una sola fracción

INTRODUCCION

Los hongos son organismos eucariotas de distribución ubicua, y aunque la mayoría se consideran saprófitos, existen algunas especies capaces de causar daño a tejidos de organismos superiores como plantas y animales mediante mecanismos bioquímicos adaptados (Guarro, 2012). En las últimas décadas, de manera conjunta con el incremento en la incidencia de enfermedades crónico-degenerativas, inmunodeprimidas e inmunodeficientes, se ha observado un aumento en la micosis oportunistas (Arenas, 2008). Entre los principales géneros involucrados se encuentra *Aspergillus*, *Cándida*, *Criptococcus* y *zygomycetes* (Sánchez, 2001; Murray y col., 2006). Sin embargo, a pesar de la existencia de antifúngicos efectivos, en las últimas décadas se ha visto una disminución en el éxito de las terapias con antibióticos debido a su uso indiscriminado, la aparición de mecanismos de resistencia y su toxicidad crónica (Diomedi, 2004; Cuenca, 2010; Mellado y col., 2002). La presencia de especies del género *Aspergillus* (*A. niger*, *A. flavus* y *A. ochraceus*) en las regiones agrícolas del estado de Sonora representa un riesgo latente para su población (Cortez-Rocha y col. 2003).

Se ha demostrado que las plantas utilizadas con fines medicinales poseen propiedades farmacológicas importantes, lo que las ha catalogado como fuentes potenciales para la obtención de nuevos medicamentos (Vivanco y col., 2005; Joy y col., 1998). Varios trabajos demuestran el aislamiento de compuestos con actividad antifúngica a partir de extractos de plantas mediante un esquema de aislamiento biodirigido (Salgueiro y col. 2004; Lago y col. 2004; Ahumed y col. 2005; Yenesew y col. 2005; Dabur y col. 2005). En la mayoría de ellos, el fraccionamiento previo de los constituyentes químicos de los extractos vegetales representa un paso fundamental para identificar el compuesto responsable de la actividad. En la región sur del estado de Sonora, Almada en el 2010 demostró que el extracto metanólico de *Zizyphus obtusifolia* presentó actividad antifúngica sobre *A. niger*. Los resultados de Almada 2010 sugieren que *Z. obtusifolia* representa una fuente potencial para la obtención de nuevos antifúngicos. Dado que el

fraccionamiento del extracto metanólico es fundamental para el éxito del aislamiento biodirigido, el objetivo del presente trabajo fue fraccionar el extracto metanólico de *Z. obtusifolia* y evaluar la actividad antifúngica de cada fracción en contra *A. niger*.

ANTECEDENTES

Infecciones micóticas

Los hongos son organismos eucariotas, heterótrofos, quimilitrofos, e inmóviles agrupados dentro del reino fungi con distribución ubicua. Se clasifican en levaduras y mohos atendiendo a la forma de desarrollo uni o pluricelular en su medio, y su principal característica es la presencia de una pared celular rígida compuesta por carbohidratos modificados como la quitina (Pontón, 2008). Esta estructura distintiva les confiere la incapacidad de fagocitar material extracelular para la obtención de energía, por lo que la absorción de nutrientes se realiza mediante la degradación enzimática de los componentes orgánicos contenidos en el medio colonizado. La forma de reproducción de los hongos puede ser sexual y asexual, presentándose con mayor frecuencia la asexual mediante la esporulación con estrategias reproductivas facilitando su diseminación. La esporulación se puede ver favorecida por circunstancias medioambientales adversas como falta de disponibilidad de nutrientes, luz o puede ser parte del ciclo de vida normal durante la reproducción (Guarro., 2012).

Algunos hongos han desarrollado la capacidad de invadir a los organismos superiores como las plantas, animales y humanos mediante mecanismos bioquímicos adaptados. La presencia de estas especies "patógenas" conllevan al desarrollo de afecciones en los hospederos, debido a que la funcionalidad de sus estructuras celulares se ven comprometidas a consecuencia de la degradación causada por el hongo colonizante ("*Infección micótica*" o "*micosis*") (Pemán y Salavert, 2012., Nucci y col, 2010). Algunos hongos considerados no patógenos ("*saprófitos*") pueden colonizar los epitelios y las mucosas, e infectar al huésped cuando se presenten condiciones que favorezcan el desarrollo fúngico ("*patógeno oportunista*") como el inmunocompromiso del huésped, inmunodepresión, aspiración de esporas o traumatismo epitelial. Las micosis clínicamente relevantes se

clasifican en superficiales, subcutáneas y sistémicas dependiendo del grado de invasión al huésped (Sánchez y col, 2010).

Las micosis superficiales están dadas por aquellas infecciones que afectan exclusivamente la capa cornea de la piel o los cabellos sin que se acompañe de reacción inflamatoria en los tejidos (Richardson y Lass-flörl, 2008). Las infecciones micóticas subcutáneas aparecen por implantación directa de las esporas o fragmentos de micelios en las heridas de la piel y en las erosiones por picaduras, caracterizándose por la formación de abscesos y granulomas subcutáneos. Las invasiones fúngicas sistémicas son las más graves y son producidas principalmente por la inhalación de esporas las cuales germinan en los pulmones comprometiendo su función, dando por resultado lesiones purulentas y granulomatosas, acidosis metabólica, hipoxia y difusión por el torrente sanguíneo invadiendo otros órganos (Sánchez, 2001).

Epidemiología

La incidencia de infecciones micóticas varían en todo el mundo y presentan diferentes características epidemiológicas dependiendo de la región geográfica, siendo notorio las infecciones que se contagian desde el medio ambiente (Patterson, 2011). La incidencia de infecciones micóticas invasivas ha aumentado en los últimos 20 años. En los Estados Unidos, las infecciones del sistema sanguíneo constituye la cuarta infección más común, y existe una tendencia similar reportada alrededor del mundo. Las infecciones micóticas invasivas pueden asociarse con una mortalidad mayor de 40% si son causadas por *Candida albicans*, y es mayor de 50% en caso de aspergilosis (Denning y col, 2011). Las infecciones micóticas oportunistas se presentan principalmente en personas inmunocomprometidas con anomalías en su sistema inmunológico (Warnock, 2007., Grau y col, 2012).

Las micosis oportunistas provocadas principalmente por el género *Aspergillus*, *Cándida*, *Criptococcus neoformans* y los perteneciente a los

zygomycetes han aumentado considerablemente (Sanchez., 2001). Los principales factores que facilitan la invasión fúngica son: defecto de la inmunidad, sea celular (síndrome de inmunodeficiencia adquirida SIDA) o humoral (leucemia, mieloma); por alteraciones en la fagocitosis (lupus y diabetes); granulocitopenia (medicamentos citotóxicos y radioterapia) o inmunodepresión consecutiva a uso de quimioterapia principalmente en pacientes con trasplante (Arenas., 2008). Así mismo, el empleo de antineoplásicos, agentes inmunosupresores, el uso indiscriminado de antimicrobianos y antifúngicos profilácticos de amplio espectro han facilitado la entrada de hongos oportunistas en pacientes susceptibles. Otros factores como la dificultad para realizar el diagnóstico de las micosis profundas y la resistencia a los antifúngicos contribuyen a empeorar el pronóstico de las infecciones micóticas invasivas (Guango., 2008).

Las micosis oportunistas sugieren un desafío diagnóstico y terapéutico, y el aislamiento e identificación de microorganismos patógenos es fundamental para lograr el control adecuado de las infecciones producidas por las especies más frecuentes de hongos oportunistas (Murray y col., 2006). Algunos de estos microorganismos presentan resistencia al tratamiento convencional utilizado, como lo es la administración de derivados azólicos o polienos (Fico, 2004 A., Fico, 2004 B., Da Silva y col, 2004). El aumento de las dosis prescritas a los pacientes infectados con este tipo de cepas puede resultar tóxico, por lo que en los últimos años, se ha optado por la búsqueda de nuevos medicamentos.

Aspergilosis de importancia clínica

El género *Aspergillus spp* posee alrededor de 900 especies clasificados en 18 grupos y está conformado por hongos filamentosos hialinos ubicuos caracterizados por la producción de hifas especializadas, denominadas conidióforos, donde se ubican las células conidiógenas que generan a la esporas asexuales o conidios (Alcalá y col, 2012). De todas las especies conocidas, solo 12 han sido relacionadas con infecciones en humanos, entre

las cuales se encuentran *A. fumigatus* (85%), *A. flavus* (5-10%), *A. niger* (2-3%), *A. terreus* (2-3%), *A. versicolor*, *A. nidulans*, *A. glaucus*, *A. clavatus*, *A. cervinus*, *A. candidus*, *A. flavipes* y *A. ustus* (Abarca, 2000; Koneman., 2008). La principal vía de contagio es la inhalación de esporas, las cuales se encuentran diseminadas en el medio ambiente. Debido a esto, el tracto respiratorio se ve directamente comprometido, pues las esporas germinan y el hongo invade el tejido. Estas infecciones pueden diseminarse a otros órganos y producir patologías graves (Carrillo, 2011). El término aspergilosis incluye enfermedades de diferente patogenia como son la aspergilosis broncopulmonar alérgica, las formas pulmonares crónicas, no invasivas o semi-invasivas, las formas invasivas de la vía aérea, las formas cutáneas y las formas extrapulmonares y/o diseminadas (Severo y col, 2010). Sin embargo, la invasión tisular es poco frecuente y ocurre en pacientes neutropénicos o sometidos a algún grado de inmunosupresión celular. La mortalidad de las formas invasivas depende de la forma clínica y el tipo de huésped, pero suele ser superior al 50% (Fortún., 2012).

Aspergillus niger

Es un hongo filamentosos distribuido ampliamente en la naturaleza caracterizada por su estructura reproductora denominada conidias. En agar papa dextrosa (APD) forma colonias miceliales lanosas blancas o amarillentas y conforme desarrolla la superficie del micelio se cubre de puntos negros conidióforos cargados de conidiosporas. Su morfología microscópica se describe con conidióforos lisos, de tamaño variable, cabezas conidiales biseriadas, metulas y fialides cubriendo a la vesícula, además, los conidias tienen la pared áspera (figura 1) (Abarca, 2000). Generalmente, se pueden encontrar invadiendo granos de cereal y tejidos de algodón, y aunque posee una patogenicidad relativamente insignificante, la inhalación de sus esporas conduce al desarrollo de cuadros clínicos severos (*aspergilosis*) (Perfect, 2011).

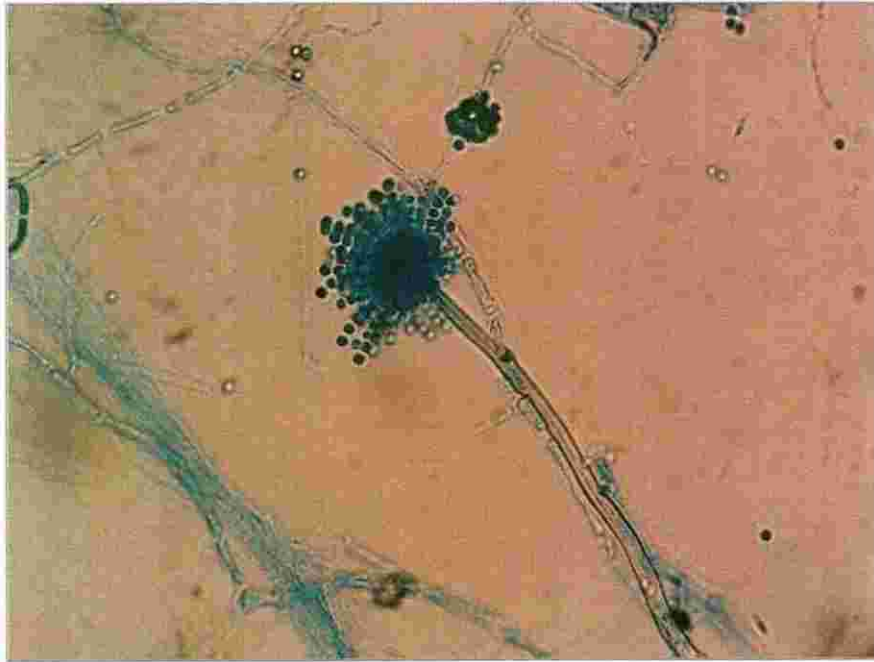


Figura 1. Morfología microscópica de *A. niger* (Conidióforo) bajo microscopía óptica y tinción de azul de lactofenol (40X)

En horticultores, se ha demostrado que existe una incidencia más frecuente de *aspergilosis* debido a su exposición a las esporas (Guevara y col., 2010). En México, los datos epidemiológicos sobre este tipo de micosis son escasos y se limitan al reporte de casos clínicos aislados (Arza-Fernandez y col, 2006). Esta carencia de información se debe principalmente a que tales infecciones no se consideran de reporte obligatorio (Méndez-Tovar y col, 2007). Las infecciones micóticas en México están asociadas hasta con un 40% de defunciones por sepsis (Harvey y Myers, 1987, Vázquez y col, 2002, y Hernández-Hernández y col, 2003), y con una mortalidad del 30 al 60% en el 94% de pacientes trasplantados (Frias-de León y col, 2013). En las regiones agrícolas del estado de Sonora, *A. niger*, *A. flavus* y *A. ochraceus* representan un riesgo latente para su población (Cortez-Rocha y col. 2003).

Tratamiento de las aspergilosis

El tratamiento de las infecciones micóticas en humanos ha evolucionado de manera lenta debido a tres factores principales: la existencia de un número limitado de antifúngicos, su baja distribución en los líquidos corporales, y su elevada toxicidad (Cuenca-Estrella 2010). La mayoría de ellos son de uso local, y los más efectivos se administran por vía intravenosa (Catalan y Montejó 2006), y aunque existen diferentes familias de antifúngicos (azoles, polienos, equinocandinas, alilaminas, nicomicinas, y análogos nucleosidos), la mayoría de ellas solo cuenta con pocos miembros (Arenas 2008). Los antifúngicos más eficaces tienen como objetivo inhibir la síntesis del ergosterol, la síntesis de los componentes de la pared, o modificar la permeabilidad de la membrana. Los principales antimicóticos utilizados para el tratamiento de la aspergilosis son: la anfotericina B, la caspofungina y el itraconazol (figura 2) (Allevato y col, 2007).

La anfotericina B es el principal polieno utilizado en el tratamiento de las infecciones fúngicas invasoras debido a su amplio espectro de actividad. Las dosis de administración están limitadas por su elevada toxicidad contra el huésped (Cuenca 2010). Su efecto antifúngico se debe a su capacidad de

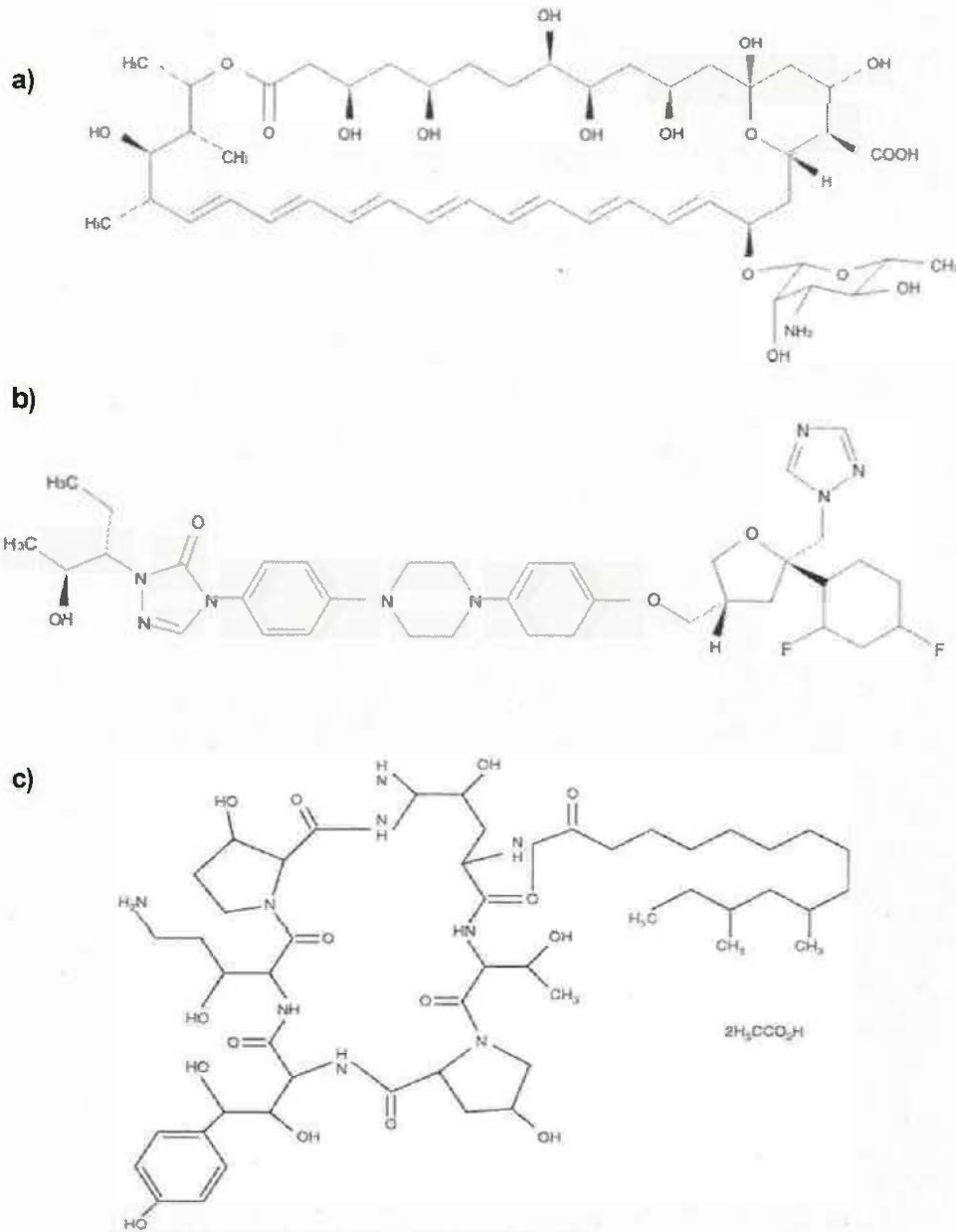


Figura 2. Principales antifúngicos utilizados para el tratamiento de aspergilosis. a) Anfotericina B, b) Itraconazol y c) Caspofungina.

Fuente: tomado de Diomedi 2004; Gregori 2005

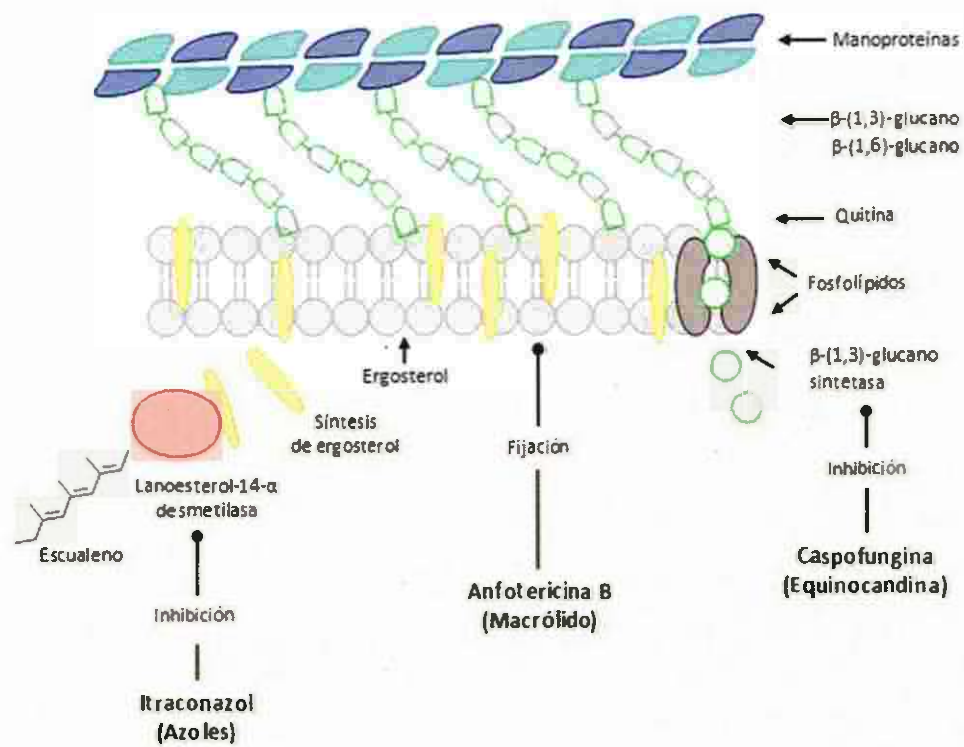


Figura 3. Mecanismo de acción de los principales antifúngicos utilizados para el tratamiento de aspergilosis.

Fuente: Elaborado en base a Cuenca 2010

unirse al ergosterol, lo cual provoca la desestabilización de la membrana celular y aumenta su permeabilidad. La formación de poros por acción de los complejos anfotericina B-ergosterol facilita la pérdida de iones y moléculas carbonatadas (figura 3) (Mellado y col, 2002). Al igual que la anfotericina B, el itraconazol tiene la capacidad de desestabilizar la membrana (figura 2) (Saballs, 2010). Forma parte de la familia de los azoles, los cuales inhiben el crecimiento fúngico por su acción sobre la 14- α lanosterol demetilasa. La unión a esta enzima bloquea la síntesis de ergosterol, provoca una desestabilización de la membrana y una acumulación de esteroides metilados tóxicos para la célula fúngica. (figura 3) Aunque, este bloqueo de la síntesis del ergosterol inhibe el crecimiento de la célula pero no la mata (Mellado y col., 2002; Cuenca., 2010). La caspofungina pertenece a la familia de las equinocandinas y actúa sobre la 1,3-beta-glucano sintetasa, enzima necesaria para la formación de polímeros de 1,3-beta-glucano que forman parte de la pared fúngica (figura 2) (Odió, 2010). Esta inhibición enzima reduce la síntesis del glucano, causa inestabilidad osmótica y la lisis celular (figura 3) (Diomedí., 2004).

Resistencia antifúngica

El aumento en la utilización de fármacos antifúngicos y su uso indiscriminado, ha dado lugar a la aparición de cepas capaces de contrarrestar sus efectos ("*cepas resistentes*"). Los principales mecanismos mediante los cuales las cepas fúngicas pueden generar esta resistencia farmacológica son: (i) incapacidad del antifúngico para alcanzar su blanco dentro de la célula, mediado por un aumento en la permeabilidad de membranas, y/o a sistemas de bombeo activo del compuesto al exterior; (ii) variabilidad en la interacción fármaco-blanco (incremento en el número de copias de los blancos o cambios debido a mutaciones); (iii) alteración en las enzimas de las vías metabólicas; y (iv) modificaciones en el procesamiento intracelular del fármaco (Espinel, 2008).

En las últimas décadas, se han descrito los mecanismos de resistencia de algunas cepas del género *aspergillus*. Se ha observado que la resistencia a la anfotericina B por un descenso en la concentración de ergosterol, y/o a un aumento en la concentración de fosfolípidos (Deray 2002; Da Silva y col, 2004; Espinel 2008). Por otra parte, las mutaciones discretas en los genes que codifican la síntesis de ciertas enzimas han dado lugar a la generación de resistencia al itraconazol y a la caspofungina. En el caso del itraconazol, existen modificaciones puntuales en la secuencia de aminoácidos de la 14- α lanosterol demetilasa, lo cual reduce su afinidad a los azoles (Méndez y col, 2007; Manzano y col, 2007). De igual manera, la resistencia a caspofungina está dada por la modificación de la secuencia de aminoácidos en la enzima glucano sintetasa (Diomedi 2004). La aparición de estos mecanismos de resistencia representa un problema de salud a nivel mundial, e implican un nuevo reto para tratamiento de las micosis por *aspergillus* (Peman y Salavert 2012).

Propiedades farmacológicas de las plantas de uso medicinal

Recientemente, diversas investigaciones han demostrado que las plantas de uso medicinal poseen propiedades farmacológicas importantes, y representan una alternativa para la búsqueda de nuevos fármacos (Suárez y col, 2013., Gahlaut y col, 2013., Thembo y col, 2010). Las plantas de uso medicinal han sido fuente de compuestos efectivos, los cuales actualmente se prescriben para el tratamiento de diversas enfermedades (tabla I) (Joy y col., 1998). Las propiedades farmacológicas de las plantas están dadas por compuestos químicos de bajo peso molecular denominados metabolitos secundarios, los cuales representan un mecanismo de defensa contra factores ambientales, como el exceso de radiación solar, o la invasión y/o de microorganismos patógenos (hongos, virus, parásitos y bacterias) (Sepúlveda y col., 2003; Vivanco y col., 2005; García y col., 2006). Algunos metabolitos secundarios presentan funciones específicas como atrayentes o repelentes de animales

Tabla I. Fármacos prescritos aislados de plantas de uso medicinal

Fármaco	Planta	Uso
Quinina	<i>Cinchona sp.</i>	Antimalárico, disentería amebica
Ajmalacina	<i>Catharanthus roseus</i>	Anticancerígeno, hipotensivo
Vinblastina	<i>Catharanthus roseus</i>	Anticancerígeno
Artemisina	<i>Artemesia annua</i>	Antimalárico
Berberina	<i>Berberis</i>	Contra leishmaniasis
Pristimerina	<i>Celastrus paniculata</i>	Antimalárico
Quassinoides	<i>Ailanthus</i>	Contra protozoarios
Plumbagina	<i>Plumbago indica</i>	Antibacterial, Antifúngico
Allicina	<i>Allium sativum</i>	Antifúngico, amebiasis
Emetina	<i>Cephaelis pecacuanha</i>	Amebiasis
Rescinamina	<i>Rauwolfia serpentina</i>	Tranquilizante
Reserpina	<i>Rauwolfia serpentina</i>	Tranquilizante
Pilocarpina	<i>Pilocarpus jaborandi</i>	Antiglaucoma
Cocaína	<i>Erythroxylum coca</i>	Analgésico tópico
Morfina	<i>Papaver somniferum</i>	Analgésico
Codeína	<i>Papaver somniferum</i>	Contra tos
Atropina	<i>Atropa belladonna</i>	Espasmolítico, resfriado
Atropina	<i>Hyoscyamus niger</i>	Espasmolítico, resfriado
Glucósidos cardiacos	<i>Digitalis sp.</i>	Para la insuficiencia cardiaca congestiva
Taxol	<i>Taxus baccata</i>	Cáncer de mama y ovario
	<i>Taxus Brevifolia</i>	Antitumoral
Forskolina	<i>Coleus forskohlii</i>	Hipotensivo, cardiotónico
Magnolol	<i>Magnolia bark</i>	Contra ulcera péptica
Soforadina	<i>Sophora subprostrata</i>	Antiulcérico
Catequina	<i>Acacia catechu</i>	Antiulcérico
Nimbidina	<i>Azadirachta indica</i>	Antiulcérico
Glycyrrhizina	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Antiulcérico
Gossypol	<i>Gossypium sp.</i>	Antiespermatogénico

Fuente: tomada de Joy y col., 1998

contribuyendo a la polinización y a la difusión de semillas. Otros compuestos tienen función protectora en forma de repelentes frente a depredadores, dándole a la planta sabores desagradables, haciéndolas repugnantes o venenosas e interviniendo en mecanismo de defensa frente a diferentes patógenos. Las principales familias de metabolitos secundarios son: los terpenos, los alcaloides, los glucósidos, los taninos y los flavonoides (Domingo y López-Brea 2003).

Terpenos

Constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios, incluye pigmentos carotenoides, estéroles y derivados (función protectora contra insectos), hormonas y aceites esenciales (actúan como repelentes de insectos o insecticidas). Se han encontrado terpenos con propiedades anticarcinogénicas, antiulcerosas, antimalariales y antimicrobiana (Avalos y col., 2009). Ahmed y colaboradores en 2005 demostró que los terpenos presentes en el extracto de raíz de *Daucus carota L. spp Carola* inhibía el crecimiento de *Aspergillus niger*. Así mismo, Salgueiro y colaboradores 2004 demostró actividad de los aceites esenciales (monoterpenos) de *Thymbra capitata* en contra de especies de *Candida*, *Aspergillus* y los dermatofitos.

Flavonoides, taninos y fenoles

Son compuestos que se caracterizan por tener en su estructura un anillo aromático con uno o mas grupos hidroxilo, los cuales estan directamente relacionados con propiedades toxicas frente a microorganismos (Domingo y col., 2003). Los flavonoides son compuestos fenólicos que tienen en su estructura un grupo carbonilo, representan el grupo de fenoles naturales más amplio. Su mecanismo de acción frente a microorganismos se debe a la formación de complejos con proteínas solubles y extracelulares y con las células de la pared bacteriana (Sepúlveda y col, 2003). Ragasa y col., 2005 aisló a partir del extracto vegetal de *Blumea balsamifera* (L.) (D.C.) dos

compuestos con actividad en contra de *Aspergillus niger*. Así mismo, Yenesew y colaboradores 2005 encontraron que el principal flavonoides de la raíz de *Aquilegia vulgaris* L (4'-metoxi-5,7-dihydroxiflavona 6-C-glucósido) posee actividad inhibitoria del crecimiento de *Aspergillus niger*. Los taninos constituyen un grupo de sustancias fenólicas poliméricas, clasificados en hidrolizables o condensados dependiendo de su conformación estructural. Existen reportes de taninos con capacidad antibacteriana y antifúngica (Avalos y col., 2009; Domingo y col., 2003). Dabur y colaboradores en 2005, aislaron de *Datura metel* L. el tanino ((2-(3,4-dimetil-2,5-dihidro-1H-pirrol-2-yl)-1-metiletil pentanoato)) con actividad antifúngica en contra de *A. fumigatus*, *A. flavus* y *A. niger*.

Alcaloides

Son metabolitos secundarios que son solubles en agua, contienen al menos un átomo de nitrógeno en la molécula y exhiben actividad biológica (Ávalos y col, 2009). La mayoría son heterocíclicos aunque algunos son compuestos nitrogenados alifáticos (no cíclicos). Sus efectos inhibitorios están determinados por su capacidad de intercalarse con el ADN, de detener la síntesis de proteínas, inducir la apoptosis e inhibir las enzimas del metabolismo de carbohidratos. (Domingo y col., 2003; Avalos y col., 2009).

Varios trabajos demuestran el aislamiento de compuestos con actividad antifúngica a partir de extractos de plantas mediante un esquema de aislamiento biodirigido (Salgueiro y col. 2004; Lago y col. 2004; Ahmed y col. 2005; Yenesew y col. 2005 y Dabur y col. 2005). En la mayoría de ellos, la separación previa de los constituyentes químicos de los extractos vegetales representa un paso fundamental. El fraccionamiento por partición mediante el uso de solventes de creciente polaridad presenta las siguientes ventajas: 1) reduce la probabilidad de que diferentes fracciones compartan los mismos constituyentes; 2) permite concentrar los compuestos responsables de la actividad; y 3) brinda información útil para elaboración de protocolos de

purificación cromatografía. En el estado de Sonora existe una amplia cantidad de plantas silvestres utilizadas para la elaboración de medicamentos destinados al tratamiento de enfermedades, y en los últimos años, numerosos trabajos han demostrado sus propiedades farmacológicas (Moreno-Salazar y col 2008; Rosas-Burgos y col 2009; Ruiz-Bustos 2009; Robles-Zepeda y col 2011; Alday-Provencio y col 2015). En algunas de ellas, el fraccionamiento por partición representó un paso fundamental para el aislamiento y caracterización de los compuestos responsables (Zamora 2014; Rascón y col 2015; Rascón-Valenzuela y col 2015).

Zizyphus obtusifolia

Zizyphus obtusifolia (jutuki) es un arbusto nativo perteneciente a la familia *Rhamnaceae*, generalmente erecto, a menudo espinoso, intrincadamente ramificado y de 1-3 m de alto. Posee una corteza blanco-grisácea con hojas estrechamente elípticas a oblongas, de 5-7 mm de ancho por 8-15 mm de largo; delgadas, presentan nervaduras laterales anchas, evidentes y a veces reticuladas. Presenta flores y fruto, las flores son fasciculadas, pedicelos de 2-6 mm de largo y pétalos blancos de 1.5 mm de largo. El fruto es anchamente elipsoide u obovoide de 6-8 mm de largo y negro con un apruina azulosa cuando está maduro (figura 4). Esta especie es utilizada para el tratamiento de padecimientos como dolor de pies, riñones, nervios, enfermedades del pecho, diabetes, llagas e infección en los ojos. Las partes utilizadas para la preparación de medicamentos son la corteza de la raíz, el fruto y las ramas. (Johnson y col., 1996). En 2010 Almada evaluó la actividad antifúngica del extracto metanólico de la raíz de *Z. obtusifolia*, de las hojas de *Lycium berlandieri*, *Vallesia glabra*, *Forchammeria watsonii* y de la corteza de *Rhizophora mangle* en contra *A. flavus* y *A. niger*. Almada encontró que solo el extracto de *Z. obtusifolia* presentó un efecto inhibitorio significativo sobre el crecimiento de *A. niger* (41.6%) , y sugirió que *Z. obtusifolia* representa una fuente potencial para la obtención de nuevos antifúngicos.



Figura 4. *Zizyphus obtusifolia*

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de la muestra

La muestra vegetal de *Z. obtusifolia* fue colectada en las orillas del río Mayo en el municipio de Navojoa, Sonora, en las coordenadas: 27°06'13.61"; 109°26'22.06" y transportadas al Laboratorio de Bioquímica y Toxicología del Departamento de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad de Sonora, Unidad Regional Sur. Posteriormente, fue secada a una temperatura aproximada de 25 °C para separar la corteza de la raíz, triturlarla finamente mediante un molino mecánico y almacenarla en bolsas de polietileno a temperatura ambiente hasta la preparación del extracto.

Obtención del extracto metanólico

El polvo obtenido de la muestra vegetal seca se le agregó metanol bajo una proporción 1:10 p/v. La suspensión se dejó en agitación por 3 días a temperatura ambiente en una placa de agitación. Posteriormente, la solución fue filtrada al vacío utilizando papel Whatman No. 1 y el sobrenadante fue evaporado mediante un evaporador rotatorio marca Yamato RE300 a presión reducida a una temperatura de 40 °C. Al producto obtenido se le denominó "extracto metanólico", y fue colocado en un lugar seco para la eliminación del metanol residual y protegido de la luz para posteriormente ser almacenado en refrigeración a una temperatura de 4 °C hasta su utilización.

Fraccionamiento del extracto metanólico

La obtención de las fracciones a partir del extracto metanólico se realizó mediante un proceso de partición con solventes de polaridad siguiendo lo propuesto por Rondina y col. en 1985 y por Ramírez y Díaz en 2007. El procedimiento se basa en realizar lavados exhaustivos con cada uno de los solventes (hexano, acetato de etilo, etanol) de manera consecutiva en orden

creciente de polaridad, iniciando con el hexano. Para cada caso, el sobrenadante obtenido fue filtrado al vacío con papel Whatman No. 1 y concentrado en un evaporador rotatorio marca Yamato RE300. Mediante la anterior metodología se obtuvieron la fracción de hexano, acetato de etilo, etanol y residual.

Cultivo de microorganismos

La cepa de *A. niger* utilizada fue la NRRL 3 y fue proporcionada por el Laboratorio de Microbiología y Micotoxinas del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos de la Universidad de Sonora. Las conidias obtenidas de la cepa de referencia se mantuvieron congeladas a -80 °C en una suspensión de solución salina 0.85% con un 15% de glicerol. Para la preparación del inóculo de trabajo, se inoculó agar papa dextrosa con las conidias de la cepa de referencia y se incubó a 26 °C durante 7 días. Posteriormente, se tomó parte del micelio aéreo con un asa microbiológica en aro, suspendiéndose en 2 mL de solución salina (0.85%) con 0.1% de detergente Tween 80. Posteriormente se ajustó a una concentración de 1×10^6 conidias/mL por medio de conteo en cámara de Neubauer (Tequida-Meneses y col., 2002; Rosas-Burgos y col., 2009).

Determinación de la actividad antifúngica

La evaluación de la actividad antifúngica se realizó mediante el método de dilución agar. Para el extracto metanólico de *Z. obtusifolia* se evaluaron concentraciones de 7, 5, 1, 0.75, 0.50, 0.25 mg/mL, mientras que para las fracciones obtenidas se evaluaron concentraciones de 0.50, 0.25 y 0.125 mg/mL. En cada caso, se prepararon soluciones stock en Dimetilsulfoxido (DMSO), se mezclaron con APD a una temperatura aproximada de 40 °C y se vaciaron en placas Petri. La concentración final de DMSO en cada placa de prueba fue del 3%. Después de la solidificación del medio de cultivo, en el centro de cada agar, se hizo un pequeño orificio con ayuda de un sacabocado

estéril. Posteriormente, cada placa fue inoculada centralmente con 100 μ L del inóculo ajustado (1×10^6 conidias/mL) e incubada a 26 °C por 7 días. Como control de prueba se inocularon placas con medio APD, las cuales contenían DMSO a una concentración del 3%. Para ver el efecto del solvente utilizado sobre el crecimiento fúngico, se inocularon placas con APD (control de crecimiento normal). El diámetro de las colonias fue medido cada 24 horas durante 7 días con la ayuda de un Vernier (Rosas-Burgos y col., 2009). El porcentaje de inhibición del crecimiento de *A. niger* por efecto del extracto y de sus fracciones fue calculado usando la siguiente fórmula: % Inhibición = 100 - % crecimiento. El porcentaje de crecimiento se determinó: dividiendo el crecimiento radial del hongo (cm) entre el crecimiento radial del control de prueba y multiplicado por 100. Todas las mediciones se realizaron por triplicado en tres ensayos diferentes.

Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados mediante el paquete estadístico SPSS versión 18, se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía acompañado de la prueba de Tukey para comparación de medias. Valores de $P \geq 0.05$ fueron considerados significativos. Se compararon los porcentajes de inhibición obtenidos bajo el efecto de las concentraciones evaluadas contra el control de prueba. Así mismo, se compararon los porcentajes de inhibición entre fracciones.

RESULTADOS

Fraccionamiento del extracto metanólico de *Z. obtusifolia*

A partir de 200 g de muestra vegetal seca se obtuvieron 77 g de extracto metanólico, lo cual representa el 38.5 % del peso total. El fraccionamiento del extracto metanólico dio como resultado 1.30 g de fracción de hexano, 4.96 g de la fracción de acetato de etilo, 48.36 g de la fracción de etanol y 19.34 g de la fracción residual. Estos valores de rendimiento representan el 1.683 %, 6.44 %, 62.81 % y 25.1253 % del peso total del extracto metanólico respectivamente.

Actividad antifúngica del extracto metanólico de *Z. obtusifolia* contra *A. niger* (NRRL3)

Los promedios del crecimiento radial de *A. niger* bajo el efecto del extracto metanólico de *Z. obtusifolia* se muestran en la figura 5a. Con respecto al control de crecimiento normal (APD), la presencia de DMSO en el medio disminuyó el desarrollo fúngico a partir del primer día de incubación, e indujo cambios en la morfología del micelo. Bajo los efectos del DMSO, *A. niger* desarrollo una cinética de crecimiento con un patrón similar al control APD, pero con una reducción promedio del crecimiento del 13 ± 5 %. El extracto metanólico mostro una reducción del crecimiento de *A. niger* bajo todas las concentraciones probadas. La concentración de 7 mg/mL del extracto metanólico presento los valores de inhibición más altos con 100%, 100%, 94% y 92% a los días 1, 3, 5 y 7 de incubación, respectivamente, comparado a las otras fracciones (figura 5b). A una concentración de 5 mg/mL, se presentaron porcentajes de inhibición del 100%, 100%, 91% y 90% al 1, 3, 5 y 7 día de incubación respectivamente. La evaluación de 1 mg/mL de extracto mostro porcentajes de inhibición del 100%, 90%, 78% y 74% a los 1, 3, 5 y 7 días

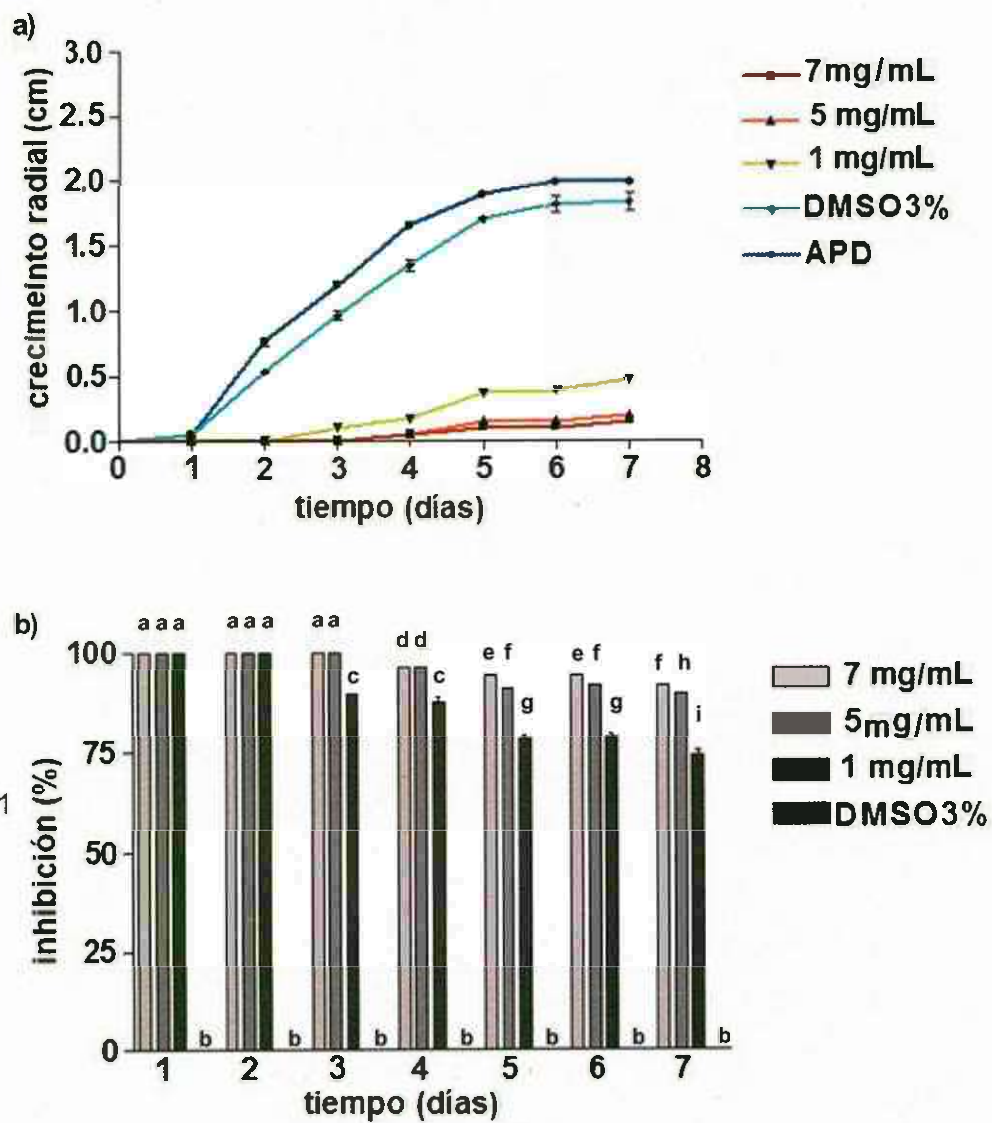


Figura 5. Actividad antifúngica del extracto metanólico de *Z. obtusifolia* a concentraciones de 7, 5, 1 mg/mL contra *A. niger*(NRRL3). **a)** *crecimiento radial (cm) y **b)** *porcentaje de inhibición.

*Se presenta la media y la desviación estándar

a, b, c, letras diferentes Indican significancia estadística $P \geq 0.05$

de incubación. A 0.75 mg/mL los porcentajes de inhibición fueron del 100%, 81%, 70% y 59% al 1, 3, 5 y 7 día de incubación. Bajo las concentraciones de 0.50 mg/mL y 0.25 mg/mL se obtuvieron porcentajes de inhibición menores, con valores del 100%, 68%, 57%, y 41%, y del 38%, 31%, 24% y 13% al 1, 3, 5 y 7 día de incubación respectivamente (figura 6).

Actividad antifúngica de la fracción de hexano, acetato de etilo, etanol y residual del extracto metanólico de *Z. obtusifolia* contra *A. niger* (NRRL3)

En la figura 7a se presenta el crecimiento radial de *A. niger* bajo el efecto de la fracción de hexano a concentraciones 0.50 mg/mL, 0.25 mg/mL y 0.125 mg/mL. Aunque durante las primeras 24 horas de evaluación se presentó una inhibición completa, tal efecto se redujo a través del tiempo. Todas las cinéticas de crecimiento describen el mismo patrón de comportamiento de control prueba, pero con valores de crecimiento menores y con una tendencia dosis dependiente. A 0.50 mg/mL se observaron valores de inhibición de 100%, 45%, 18% y 4%, a los días 1, 3, 5 y 7 de incubación respectivamente (figura 7b). A 0.25 mg/mL se observaron valores de inhibición de 100%, 31%, 9% y 5% a los días 1, 3, 5 y 7 de incubación, respectivamente. A 0.125 mg/mL se obtuvieron los valores de inhibición del 100%, 11%, 3% y 1% a los días 1, 3, 5 y 7 de incubación, respectivamente. La fracción de acetato de etilo fue la menos activa y no se presentó un efecto inhibitorio significativo (figura 8). A 0.50 mg/mL solo se mostró inhibición a los días 1, 3, 5 con porcentajes del 40%, 3% y 3%, respectivamente. A 0.25 mg/mL solo se observó un 10% al primer día, mientras que a 0.125 mg/mL no se observó inhibición durante días evaluados.

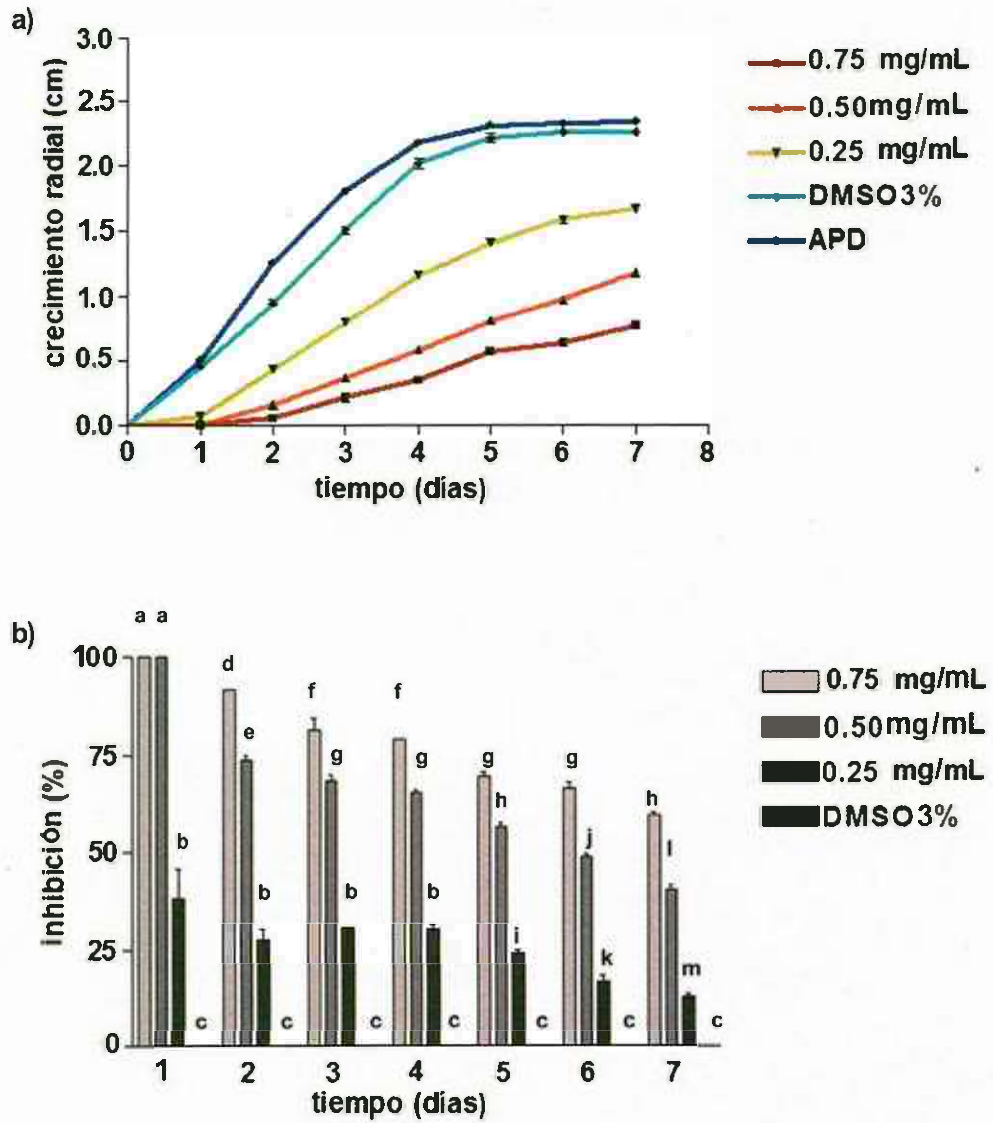


Figura 6. Actividad antifúngica del extracto metanólico de *Z. obtusifolia* a concentraciones de 0.75, 0.50, 0.25 mg/mL contra *A. niger* (NRRL3). **a)** *crecimiento radial (cm) y **b)** *porcentaje de inhibición.

*Se presenta la media y la desviación estándar

a, b, c, letras diferentes indican significancia estadística $P \geq 0.05$

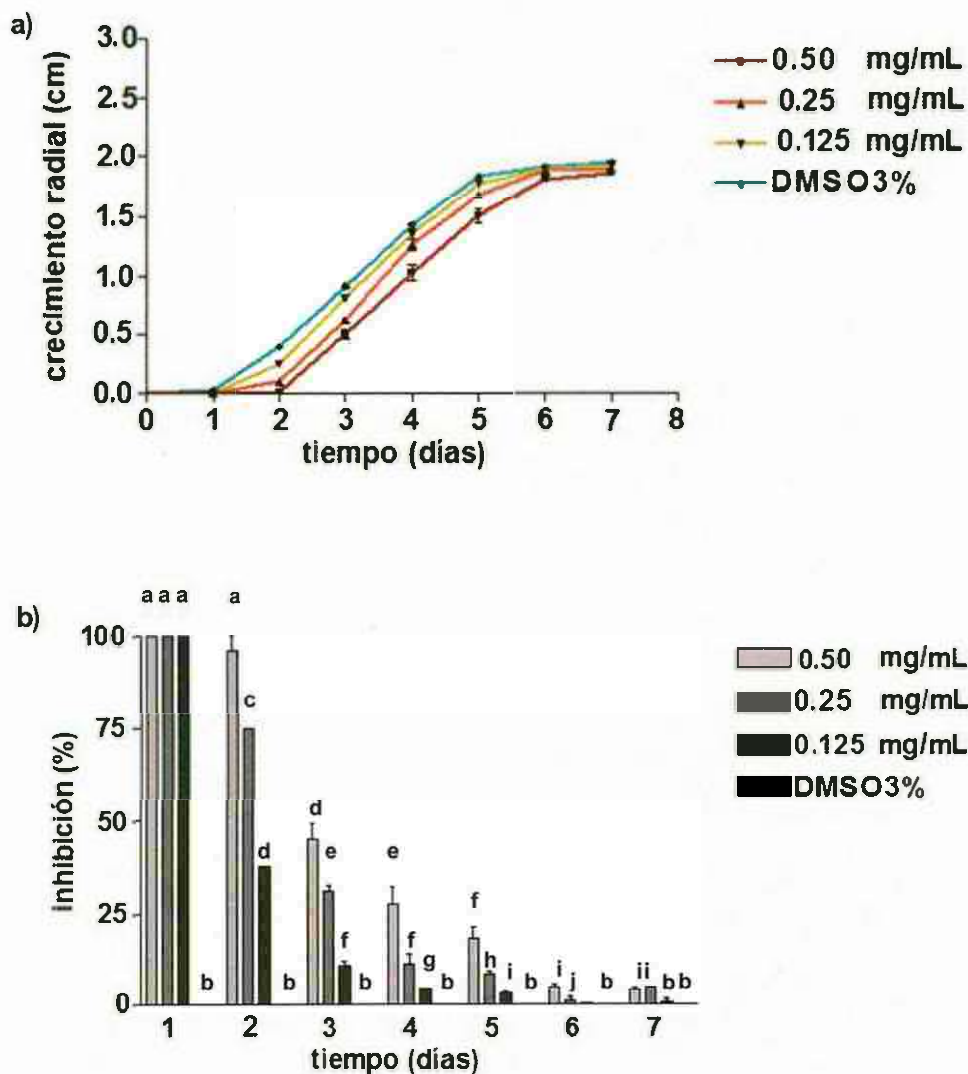


Figura 7. Actividad antifúngica de la fracción de hexano del extracto metanólico de *Z. obtusifolia* a concentraciones de 0.50, 0.25, 0.125 mg/mL contra *A. niger* (NRRL3). **a)** *crecimiento radial (cm) y **b)** *porcentaje de inhibición.

*Se presenta la media y la desviación estándar

a, b, c, letras diferentes indican significancia estadística $P \geq 0.05$

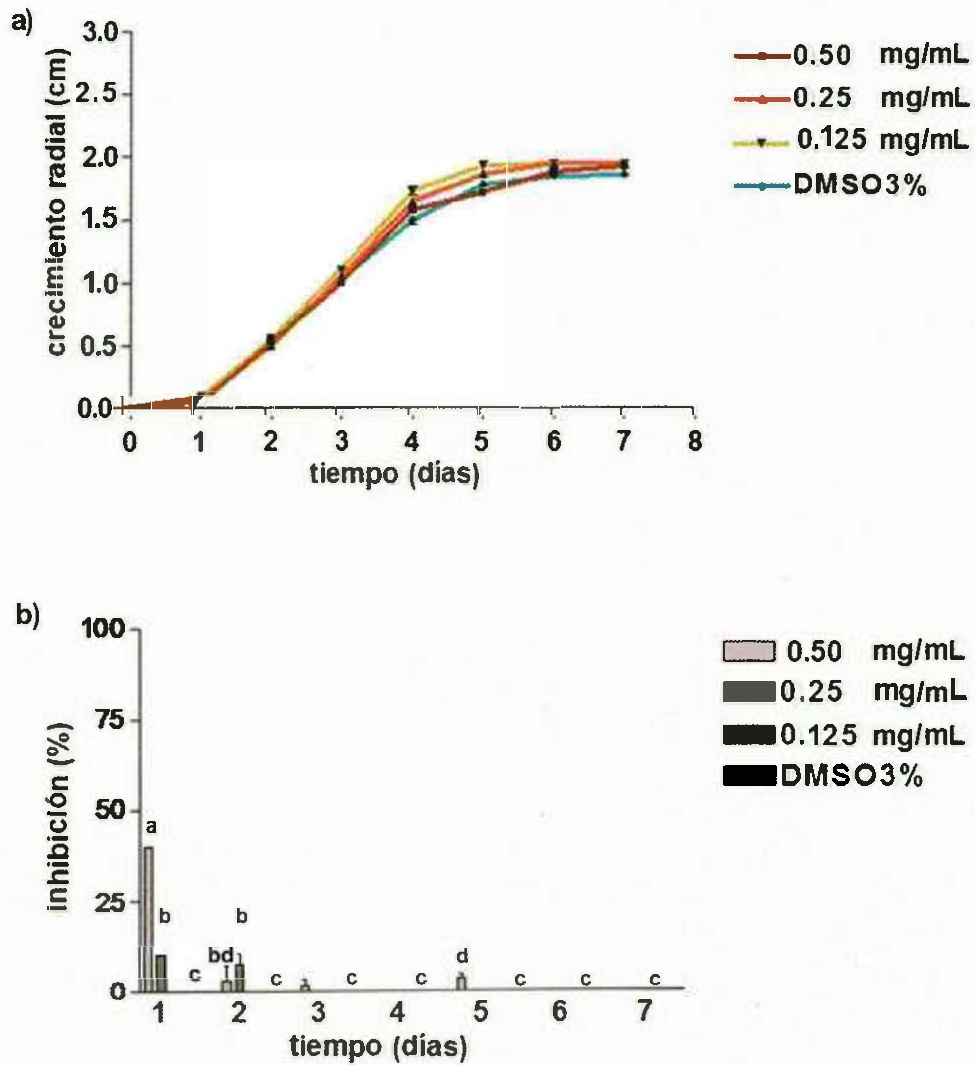


Figura 8. Actividad antifúngica de la fracción de acetato de etilo del extracto metanólico de *Z. obtusifolia* a concentraciones de 0.50, 0.25, 0.125 mg/mL contra *A. niger* (NRRL3). a) *crecimiento radial (cm) y b) *porcentaje de inhibición.

*Se presenta la media y la desviación estándar

a, b, c, letras diferentes indican significancia estadística $P \geq 0.05$

El efecto de la fracción de etanol sobre el crecimiento de *A. niger* se presenta en la figura 9. Fue la segunda fracción más activa, y mantuvo un efecto inhibitorio relativamente uniforme a través del tiempo, decayendo en las fases finales de la evaluación. A 0.50 mg/mL se exhiben los porcentajes de inhibición del 57%, 50%, 45% y 27% a los días 1, 3, 5 y 7 de incubación, respectivamente. A 0.25 mg/mL se presentaron valores 0%, 21%, 20% y 9%, mientras que a 0.125 mg/mL se obtuvieron porcentajes de inhibición del 0%, 11%, 10% y 2% a los 1, 3, 5 y 7 días, respectivamente.

El crecimiento fúngico bajo el efecto de la fracción residual a 0.50 mg/mL, 0.25 mg/mL y 0.125 mg/mL se muestra en la figura 10. A diferencia de las fracciones anteriores, se presentaron altos porcentajes de inhibición en contra el crecimiento de *A. niger*. Así mismo, al igual que las fracciones de hexano y etanol, se presentó un efecto dosis dependiente, pero con un sostenido efecto inhibitorio a través del tiempo. A 0.50 mg/mL los valores de inhibición a los días 1, 3, 5 y 7 de incubación fueron del 100%, 80%, 73% y 59%, respectivamente. A 0.25 mg/mL se obtuvieron valores del 14%, 35%, 29% y 17%, y a una concentración de 0.125 mg/mL valores del 0%, 12%, 13% y 4% respectivamente.

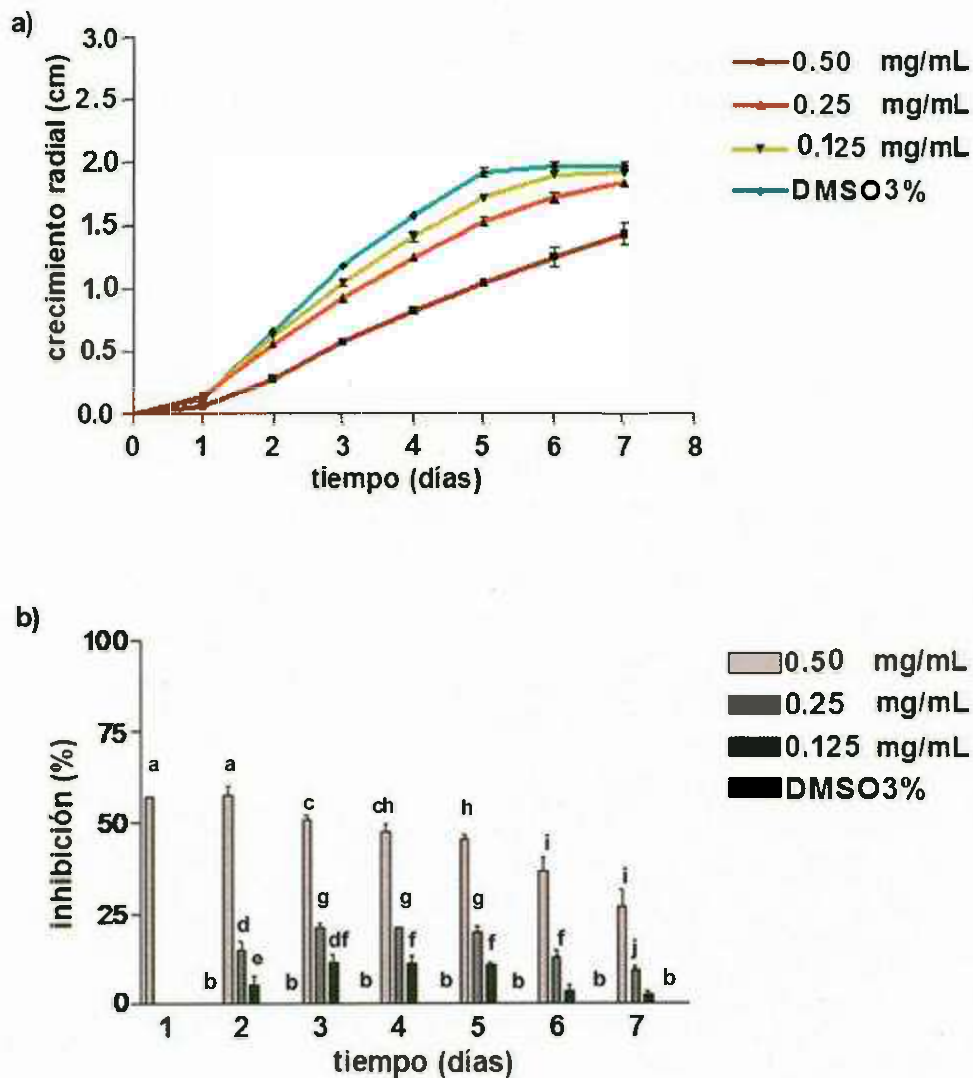


Figura 9. Actividad antifúngica de la fracción de etanol del extracto metanólico de *Z. obtusifolia* a concentraciones de 0.50, 0.25, 0125 mg/mL contra *A. niger* (NRRL3). a) *crecimiento radial (cm) y b) *porcentaje de inhibición.

*Se presenta la media y la desviación estándar

a, b, c, letras diferentes indican significancia estadística $P \geq 0.05$

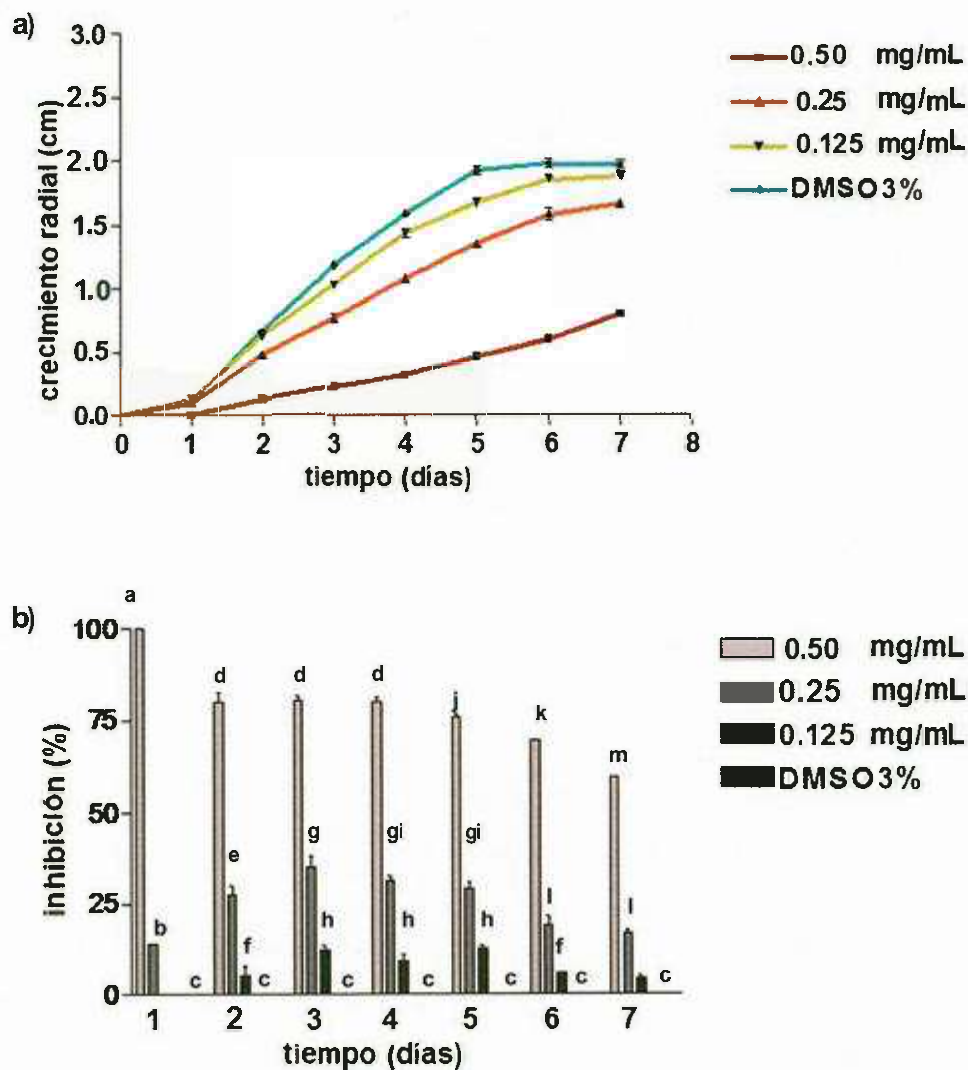


Figura 10. Actividad antifúngica de la fracción residual del extracto metanólico de *Z. obtusifolia* a concentraciones de 0.50, 0.25, 0.125 mg/mL contra *A. niger* (NRRL3). a) *crecimiento radial (cm) y b) *porcentaje de inhibición.

*Se presenta la media y la desviación estándar

a, b, c, letras diferentes indican significancia estadística $P \geq 0.05$

DISCUSIÓN

La solvatación de los extractos es fundamental para la realización de las pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos, entre ellas, el método de dilución agar. En el presente trabajo se encontró que el DMSO utilizado para la solvatación de los extractos (3%) mostró una inhibición significativa sobre el crecimiento de *A. niger*, resultados similares han sido reportados por Akram 2006, Sharma y Sharma 2011, y Hazen 2013. Por lo cual, es importante que en futuras evaluaciones se seleccione el solvente más adecuado, el que permita la solubilización del extracto y ofrezcan el menor efecto inhibitorio sobre el microorganismo evaluado. Comparado con lo reportado por Almada en 2010, los resultados indican que la actividad antifúngica de *Z. obtusifolia* en contra de *A. niger* proviene de la corteza de la raíz. En el presente estudio se encontró que a una concentración catorce veces más baja, el extracto metanólico de la corteza de la raíz de *Z. obtusifolia* mostró porcentajes de inhibición similares a los encontrados por Almada al sexto día de evaluación (alrededor del 49 %).

De todas las fracciones obtenidas, la fracción residual presentó el mayor efecto inhibitorio sobre *A. niger*. A una concentración de 0.50 mg/mL, la fracción residual fue 1.4 veces más activa que el extracto metanólico al séptimo día de evaluación. Así mismo, fue 2.18 veces más activa que la fracción de etanol, y 14.75 veces más activa que la fracción la de hexano. Los resultados indican que el efecto antifúngico del extracto metanólico de *Z. obtusifolia* está dado por la acción de múltiples constituyentes, pues todas las fracciones inhibieron el crecimiento de *A. niger* en menor o mayor grado. Así mismo, sugieren que los compuestos presentes en la corteza de la raíz tienen propiedades fungistáticas, pues el efecto inhibitorio del extracto metanólico y de las fracciones activas se redujo a través del tiempo.

Debido a que la fracción con mayor actividad contiene los compuestos más polares del extracto metanólico, y tiende a formar espuma al mezclarse con agua (*datos no mostrados*), las observaciones sugieren que la actividad antifúngica de *Z. obtusifolia* puede deberse a la acción de saponinas. La

fracción residual posee características que concuerdan con dos de las principales propiedades de las saponinas: 1) al ser compuestos heterogéneos conformados por una molécula esteroide y uno o varios carbohidratos, son de elevada polaridad; y 2) al mezclarse con agua tienden a generar soluciones espumosas (Valencia 1995; López-Luengo 2001; Díaz-Puentes 2009). Johnson y col, en 1996, reportaron que la corteza de la raíz de *Z. obtusifolia* se utiliza en la medicina tradicional del estado de Sonora para la elaboración de jabones destinados al tratamiento de enfermedades dermatológicas. Otros trabajos han reportado la existencia de saponinas con actividad antifúngica en la raíz de la planta de avena y en las hojas de la planta de tomate (Osbourn y col 1995; Trojanowska y Threlfall 1999), y han reportado la capacidad de las saponinas de alterar la permeabilidad de la membrana de *Cándida spp.* (Herrera-Arellano y col 2007). Con base en lo anterior, los hallazgos del presente trabajo sugieren que la fracción residual representa un candidato para el aislamiento y obtención de un nuevo antifúngico en contra de *A. niger* (NRRL3).

Finalmente, como se planteó al inicio de este trabajo, el fraccionamiento por partición ha brindado información importante para establecer los protocolos de purificación de los principales compuesto bioactivos del extracto metanólico de *Z. obtusifolia*. Los resultados muestran que la separación cromatografía debe de iniciarse utilizando solventes más polares que el etanol, como lo son el metanol y el agua, o mezclas de ellos. A diferencia de las metodologías propuestas anteriormente (Ahmed y Abdelgaleil 2005; Gómez y col 2007; Barros y col 2011) donde el proceso de aislamiento biodirigido genera una gran cantidad de fracciones cromatográficas, deben plantearse adecuaciones más prácticas (Pieters y Vlietinck 2005). Mediante el uso de cromatografía en capa fina y en placa preparativa, debe de establecerse la fase móvil más adecuada para la separación, extracción y evaluación de la actividad antifúngica de cada una de las bandas presentes en la muestra. La identificación de la banda más activa marcará la pauta para la separación cromatografía por columna, pues

al descartar las bandas inactivas, se reducirá el número de fracciones a evaluar, el tiempo y los recursos. El esquema del aislamiento biodirigido debe de mantenerse, repitiéndose cíclicamente estos procesos hasta la purificación de los compuestos activos.

CONCLUSIONES

La corteza de la raíz de *Z. obtusifolia* posee compuestos antifúngicos en contra de *A. niger* (NRRL3).

La reducción del efecto inhibitorio del extracto metanólico y de las fracciones activas a través del tiempo sugiere que los compuestos presentes en la corteza de la raíz tienen propiedades fungistáticas.

La fracción residual representa una alternativa para el aislamiento y obtención de un antifúngico en contra de *A. niger* (NRRL3).

BIBLIOGRAFÍA

- Abarca, M. L. 2000. Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Iberoam Micol.* 17: 79-84.
- Ahmed, A. A., Bishr, M. M., El-Shanawany M. A., Attia. E. Z., Ross, S. A., Paré, P. W. 2005. Rare trisubstituted sesquiterpenes daucanes from the wild *Daucus carota*. *Phytochemistry* 66: 1680-1684.
- Ahmed, S. y Abdelgaleil, S. 2005. Antifungal activity of extractos and sesquiterpene lactones from *Magnolia grandiflora* L.(Magnoliaceae). *International Journal of Agriculture y Biology.* 7 (4):638-642.
- Akram, M., Mohamad, S. H. 2007. Dimethyl Sulfoxide (DMSO) has an additive effect and alters minimal inhibitory concentrations of antifungal drugs. *Journal of Rawalpindi Medical College.* 11(2): 54-60.
- Akram, R. M. 2006. The effect of dimethyl Sulfoxide (DMSO) on the growth of dermatophytes. *Jpn. J. Med. Mycol.* 47(1): 313-318.
- Alcalá, L., Muñoz, P., Peláez, T., Bouza, E. 2012. Aspergillus y Aspergilosis. *Microbiol Clin.* 4(1): 1-5.
- Alday-Provencio, S., Díaz, G., Rascón, L., Quintero, J., Alday, E., Robles-Zepeda, R., Garibay-Escobar, A., Astiazarán, H., Hernández, J., Velázquez, C. 2015. Sonoran propolis and some of its constituents inhibit *In vitro* growth of *Giardia Lamblia* trophozoites. *Plant Med.* 1.
- Allevato, M. A., Negroni, R., Galimberti, R. 2007. Antifungicos. Ayer, hoy y mañana. *Act Terap Dermatol.* 30(8): 8-19.
- Almada, O. M. E., 2010. Evaluación del efecto antifungico de los extractos metanolicos de las plantas *Zizyphus obtusifolia* (Jutuki), *Lycium berlandieri* (Barchata), *Vallesia glabra* (Citabaro), *Forchammeria watsonii* (Jito) y *Rhizophora mangle* (Mangle rojo) sobre *A. flavus* y *A. niger*. Tesis de licenciatura. Universidad de Sonora.
- Arenas, G. R. 2008. Micología medica ilustrada. 3 ed. Editorial McGraw-Hill Interamericana.
- Arza-Fernández, S., Coria-Lorenzo, J. J., Rosales-Urbe, R. R., Gómez-Barreto, D. 2006. Aspergilosis invasiva en el paciente pediátrico oncológico: revisión del tema a propósito de un caso. *Revista de Enfermedades infecciosas de pediatría.* 19(75): 80-92.
- Avalos, G.A., Perez-Urría, C.E., 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Serie fisiología vegetal.* 2(3): 119-145.
- Banso, A. 2009. Phyt ochemical and antibacterial investigation of bark extracts of *Acacia nilotica*. *J Med plan Res.* 3(2): 82-85.
- Barros I., Souza J., Pereira J., Rezende M., Braz R., Ferreira D. 2011. Phytochemical and antifungal activity of anthraquinones and root and

- leaf extracts of *Coccoloba mollis* on phytopathogens. *Braz Arch Biol Technol.* 54(3):535-541.
- Bylka, W., Szafer-Hajdrych, M., Matlawska I., Goslinska, O. 2004. Antimicrobial activity of isocytoside and extracts of *Aquilegia vulgaris* L. *Letters in applied Microbiology.* 39: 93-97.
- Carrillo, L. 2011. *Aspergillus*. *Los hongos de los alimentos y forrajes* 12(1): 44-60.
- Catalán, M., Montejo, J.C. 2006. Antifúngicos sistémicos. Farmacodinamia y farmacocinética. *Rev Iberoam Micol.* 23: 39-49.
- Cortés Tellés, A., Morales Fuentes J., García Ramírez, R., Juárez Hernández, F. 2008. Aspergiloma pulmonar. Presentación de un caso y revisión de la literatura. *Neumología y Cirugía de Torax.* 67(2): 79-83.
- Cortez-Rocha, M. O., Ramírez-Astudillo, W. R., Sánchez-Mariñez, R. I., Rosas-Burgos, E. C., Wong-Corral, F. J., Borboa-Flores, J., Castellón-Campaña, L. G., Tequida-Meneses, M., 2003. Fumonisin and Fungal Species in Corn from Sonora, Mexico. *Rev Bull Environ contam Toxicol.* 70:668-673.
- Cuenca-Estrella, M. 2010. Antifúngicos en el tratamiento de las infecciones sistémicas: importancia del mecanismo de acción, espectro de actividad y resistencias. *Esp Quimioter.* 23(4):169-176..
- Dabur, R., Chhillar, A. K., Yadav, V., Kamal, P. K., Gupta, J., Sharma, G.L. 2005. In vitro antifungal activity of 2-(3,4-dimethyl-2,5-dihydro-1H-pyrrol-2-yl)-1-methylethyl pentanoate, a dihydropyrrole derivative. *Journal of Medical Microbiology.* 54: 549-552.
- Da Silva, M. E., Capellaro, J.L., Dos Reis, E., Malavazi, I., Perlin, D., Park, S., Anderson, J. B., Colombo, A.I., Arthington-Skaggs, B. A., Goldman, M.E., Goldman, G.H. 2004. In vitro evolution of itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus* involves multiple mechanisms of resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 48(11): 4405-4413.
- Denning, D. W., Park, S., Lass-Flörl, C., Fraczek, M. G., Kirwan, M., Gore, R., Smith, J., Buenid, A., Moore, C. B., Bowyer, P., Perlin, D. S. 2011. High-frequency Triazole resistance found in nonculturable *Aspergillus fumigatus* from lungs of patients with chronic fungal disease. *Clinical Infections Diseases.* 52(9): 1123-1129.
- Deray, G. 2002. Amphotericin B nephrotoxicity. *Journal of antimicrobial Chemotherapy.* 49: 37-41.
- Díaz-Puentes, L. N. 2009. Interacciones moleculares entre plantas y microorganismos: saponinas como defensas químicas de las plantas y su tolerancia a los microorganismos. Una revisión. *Revista de estudios transdisciplinarios.* 1(2): 32-55.

- Desoubeaux, G., Bailly, E., Chandener, J. 2014. Diagnosis of invasive pulmonary Aspergillosis: Updates and recomendations. *Medecine et maladies infectieuses*. 44: 89-101.
- Díaz-Puentes, L. N. 2009. Interacciones moleculares entre plantas y microorganismos: saponinas como defensas químicas de las plantas y su tolerancia a los microorganismos. Una revisión. *Revista de estudios transdisciplinarios*. 1(2): 32-55.
- Diomedi, P.A. 2004. Nuevos antifúngicos: Las equinocandinas. *Rev Chil Infect* 21(2): 89-101.
- Domingo, D., Lopez-Brea, M. 2003. Plantas con acción antimicrobiana. *Española de Quimioterapia*. 16(4): 385-393.
- Duarte, Y. A., Ramírez, M. B. 2006. Acción antifúngica del extracto etanólico y sus fracciones de polaridad creciente del epicarpio de lima (*Citrus aurantifolia* Swingle) aplicada a *Botrytis cinerea* y *Monilia fructicola* causantes de la podredumbre gris en la uva (*Vitis vinifera*), y la podredumbre morena en el durazno (*Prunus serotina Ehrh*). *Nueva Epoca*. 2(1): 56-63.
- Egwaikhide, P. A. R., Gimba, C.E. 2007. Analysis of the phytochemical content and anti-microbial activity of *Plectranthus glandulosus* whole plant. *Middle-East J Scien Res*. 2(2-3): 135-138.
- Espinel, I. A. 2008. Mechanisms of resistance to antifungal agents: Yeast and filamentous fungi. *Rev Iberoam Micol*. 25: 101-106.
- Fica, A., 2004 A. Tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas. III parte: Anfotericina B, aspectos farmacoeconomicos y decisiones terapéuticas. *Rev Chil Infect*. 21(2): 317-326.
- Fica, A., 2004 B. Tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas. Primera parte: fluconazol, itraconazol y voriconazol. *Rev Chil Infect*. 21(1): 26-38.
- Fortún, J., Meije, Y., Fresco, G., Moreno, S., 2012. Aspergilosis. Formas clínicas y tratamiento. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 30(4): 201-209.
- Frías-de León, M. G., Acosta-Altamirano, G., Duarte-Escalante, E., Martínez-Hernández, J. E., Martínez-Rivera, M. A., Reyes-Montes. 2013. Marcadores moleculares: una herramienta importante en el diagnóstico, tratamiento y epidemiología de las Aspergilosis invasora. *Cir Cir*. 82: 109-118.
- Gahlaut, A., Dabur, R., Chhillar, A. K. 2013. Anti-*Aspergillus* activity of selected medicinal plants. *Journal of pharmacy researched*. 6: 419-422.
- García, D.E., Medina M.G. 2006. Composición química, metabolitos secundarios, valor nutritivo y aceptabilidad relativa de diez árboles forrajeros. *Zootecnia Trop*. 24(3): 233-250.
- Gómez Y., González E., Farías L. 2007. Actividad antifúngica de extractos orgánicos del árbol *Fagara monophylla* (Rutaceae) en Venezuela. *Rev Biol Trop*. 55 (3-4):767-775.

- Grau, S., Camara, R., Sabater, F. J., Jarque, Carreras, E., Casado, M.A., Sanz, M.A. 2012. Cost-effectiveness of posaconazole *versus* fluconazoles or itraconazole in the prevention of invasive fungal infections among high-risk neutropenic patients in Spain. *BMC Infectious Diseases*. 12(83): 1-10.
- Gregori-Valdez, B. S. 2005. Estructura y actividad de los Antifúngicos. *Rev Cubana Farm*. 39(2).
- Guango, M. I., Santander Luna, G., Villamarín Salgado, N., 2008. Micosis invasiva. *Medwave*. 8(11): 1-6.
- Guarro, J. 2012. Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 30(1): 33-39.
- Guevara, R. M y col. 2010. Manual de procedimientos y técnicas de laboratorio para la identificación de los principales hongos oportunistas causantes de micosis humanas. Parte 2. Medicina & Laboratorio. 16(9-10): 469-488.
- Harvey, E. L., Myers, J. P. 1987. Nosocomial funginemia in a large community teaching hospital. *Arch Intern Med*. 147: 2117-2120.
- Hazen, K. C. 2013. Influence of DMSO on antifungal activity during susceptibility testing in vitro. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 75: 60-63
- Hernandez-Hernandez, F., Cordoba-Martinez, E., Manzano-Gayosso, P., Lopez-Alvarez, R., Bazan-Mora, E., Lopez-Martinez, R. 2003. Frecuencia de micosis en pacientes inmunosuprimidos de un hospital regional de la ciudad de México. *Salud Pública Mex*. 45: 455-460.
- Herrera-Arellano, A., Martinez-Rivera, M.D., Hernandez-Cruz, M., Lopez-Villegas, E.O., Rodriguez-Tovar, A.V., Alvarez, L., Marquina-Bahena, S., Navarro-Garcia, V.M., Tortoriello, J., 2007. Mycological and electron microscopic study of solanum cdysostrichum saponin SC-2 antifungal activity on candida species of emdical significance. *Planta medica*. 73(15): 1568-1573.
- Johnson, G. D., Moreno, S. S.F., Lopez, E. R., 1996. Compendio fitoquímico de la medicina tradicional herbolaria de Sonora. Editorial Unison. pp. 252.
- Jones, P. W., Kinghorn, D. A. 2006. Extraction of plants secondary metabolites. Ch. 13 methods in biotechnology, vol. 20. Natural products isolation, 2nd ed. 323-351.
- Joy, P. P., Thomas, J., Samuel Mathew, Skaria, B. P. 1998. Medicinal plants. Kerala Agricultural University. *Aromatic and Medicinal Plants Research Station*.
- Koneman, E.N., Allen, S., Janda, W., Schereckenperger, P., Winn, W. 2008. Diagnostico microbiológico. Ed. Editorial Panamericana.
- Lago, J. H., Ramos, C.S. Casanova, D. C., Morandim, A. A., Bergamo, D. C., Cavalheiro A. J., Bolzani V.S., Furlan, M., Guimaraes, E.F., Young, M. C., Kato, M. J. 2004. Comparison of fascaplysin and related alkaloids, a study of structures, cytotoxicities, and sources. *J Nat Prod* 67: 783.

- Lopez-Luengo, M. T. 2001. Saponósidos. *Fitoterapia*. 1: 124-128.
- Lumbreras, C., Gavalda, Joan. 2003. Aspergilosis invasora: manifestaciones clínicas y tratamiento. *Rev Iberoam Micol*. 20: 79-89.
- Manzano-Gayosso, P., Méndez-Tovar, L. J., Hernandez-Hernandez, F., Lopez-Martinez, R., 2007. La resistencia a los Antifúngicos: un problema emergente en México. *Gac Med Mex*. 144(1): 23-26.
- Mellado E., Cuenca-Estrella, M y Rodríguez-Tudela, J. L. 2002. Importancia clínica de los mecanismos de resistencia de los hongos filamentosos a los antifúngicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 20(10):523-30.
- Méndez-Tovar, L. J., Manzano-Gayosso, P., Velazquez-Hernandez, V., Millan-Chiu, B., Hernandez-Hernandez, F., Mondragon-Gonzalez, R., Lopez-Martinez, R. 2007. Resistencia a compuestos azólicos de aislamientos clínicos de *Trichophyton spp*. *Rev Iberoam mic*. 24(4): 320-322.
- Méndez-Tovar, L. J., Ramos-Hernández, J. M., Manzano-Gayosso, P., Garcia-Gonzalez, América, Hernandez-Hernandez, F., Bazan-Mora, E., Lopez-Martinez, R. 2007. Micosis sistémicas: experiencia de once años en el Hospital de especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS, Mexico. *Revista Mexicana de Micología*. 25: 15-19.
- Moreno-Limón, S., González-Solís, L.N, Salcedo-Martínez, S.M., Cárdenas-Avila M.L. y Perales-Ramírez, A. 2011. Efecto antifúngico de extractos de gobernadora (*Larrea tridentata* L.) sobre la inhibición *in vitro* de *Aspergillus flavus* y *penicillium sp*. *Polibotanica*. 32(1): 193-205.
- Moreno-Salazar, S. F., Robles-Zepeda, R. E., Johnson, D. E. 2008. Plante folk mediciones for gastrointestinal disorders among the main tribes of Sonora, México. *Fitoterapia*. 79: 132-141.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., Pfaller, M. A. 2006. Microbiología medica. 5ta edición. Elsevier.
- Nucci, M., Queiroz-Tellez, F., Tobón, A.M., Restrepo, A., Colombo, A. L. 2010. Epidemiology of Opportunistic Fungal Infections in Latin America. *Clinical infectious Diseases*. 51(5): 561-570.
- Odio, C. M., 2010. Terapia antifungica para neonatos, niños y adolescentes con micosis invasiva sospechada o documentada. *Drugs of today*. 46: 33-46.
- Osbourn, A., Bowyer, P., Lunness, P., Clarke, B. and Daniels, M. 1995. Fungal pathogens of oat roots and tomato leaves employ closely related enzymes to detoxify different host plant saponins. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 8(6): 971-978.
- Patterson, T. F., 2011. Clinical utility and development of biomarkers in invasive aspergillosis. *Transactions of the american clinical and climatological*. 122: 1-10.

- Pemán, J., Salavert, M. 2012. Epidemiología general de la enfermedad fúngica invasora. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 30(2): 90-98.
- Perfect, J. R., Cox, G. M., Lee, J. Y., Kauffman, C. A., Repentigny, L., Chapman, S. W., Morrison, V. A., Pappas, P., Hiemenz, J.W., Stevens, D.A., The mycoses Study Group. 2011. The impact of cultura isolation of *Aspergillus* species: A hospital-based survey of Aspergillosis. *Clinical Infectious Diseases.* 33: 1924-33.
- Pieters L., y Vlietinck A. 2005. Bioguided isolation of pharmacologically active plante components, still a valuable strategy for the finding of new lead compounds?. *Journal of ethnopharmacology.* 100:57-60.
- Pontón, J., 2008. La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Rev Iberoam Micol.* 25: 79-82.
- Ragasa, C. Y., Co, A. L. K. C., Rideout, J. A. 2005. Antifungal metabolites from *Blumea balsamifera*. *Natural Product Research.* 19(3): 231-237.
- Ramirez, L.S., Diaz, H.E. 2007. Actividad antibacteriana de extractos y fracciones del Riubarbo (*Rumex Conglomeratus*). *Scientia Et Technica.* 13 (33): 397-400.
- Rascón-Valenzuela, L., Velázquez, C., Garibay-Escobar, A., Medina-Juárez, L. A., Villegas, W., Robles-Zepeda, R. E. 2015. Antriproliferative activista of cardenolide glycosides from *Asclepias subulata*. *Journal of Ethnopharmacology.* 171: 280-286.
- Richardson, M., Lass-Flörl, C. 2008. Changing epidemiology of systemic fungal infections. *Clin Microbiol Infect.* 14(4): 5-24.
- Robles-Zepeda, R. E., Velázquez-Contreras, C. A., Garibay-Escobar, A., Gálvez-Ruiz, J. C., Ruiz-Bustos, E. 2011. Antimicrobial activity of Northwestern mexican plants against *Helicobacter pylori*. *Journal of Medicinal Food.* 14(10): 1280-1283.
- Rondina, R., Palacios, P., Vaccaro, M., Filip, R., Coussio, J. 1985. Metodología para la preparación y fraccionamiento sistematico de extractos vegetales con miras a su ensayo farmacológico y eventual estudio químico. *Acta farmacéutica Bonaerense.* 4(1): 3-14.
- Rosas-Burgos, E. C., Cortez-Rocha, M.O., Cinco- Moroyoqui, F. J., Robles-Zepeda, R. E., Lopez-Cervantes, J., Sanchez-Machado, D. I., Lares-Villa, F. 2009. Antifungal activity in vitro of *Baccharis glutinosa* and *Ambrosia confertiflora* extracts on *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* and *Fusarium verticillioides*. *World J Microbiol Biotechnol.* 25: 2257-226.
- Saballs. P., López, J. L., Cobos, J. G., Knobel, H. 2010. Tratamiento de la Aspergilosis invasiva. *Rev Iberoam Micol.* 17: S93-S96.
- Salgueiro, L. R., Pinto, E., Goncalves, M. J., Pina-Vaz, C., Rodríguez, A. G., Palmeira, A., Tavares, C., Costa-de-Oliveira, S., Martinez-de-Oliveira, J. 2004. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Thymbra capitata*. *Planta Médica.* 70(6): 572-575.

- Sánchez, P.J.A., 2001. *Micología: Diagnostico por Laboratorio*. Editorial Unison.
- Sánchez-Saldaña, L., Galarza, C., Matos-Sánchez, R. 2010. Infecciones micóticas sistémicas o profundas: paracoccidioomicosis. *Dermatol Perú*. 20(1): 1-16.
- Sanabria, F. S. 2009. Aspergilosis pulmonar. Revisión bibliográfica. *Rev Médica de Costa Rica y Centroamérica*. 66(587): 67-71.
- Sharma, A., Sharma, K. 2011. Should solubility and zone of inhibition be theory criteria for selection of solvent in antimicrobial assay. *Advances in Biological Research*. 5(5): 241-247.
- Sepúlveda Jimenez, G., Porta Ducoing, H., Rocha Sosa, M., 2003. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Rev Mexicana de fitopatología*. 21(003): 355-363.
- Severo, L. C., Resin, G., Da Silva, N., Bernardes, M., Londero, A. 2010. Pulmonary *Aspergillus niger* intraca-vitary colonization. Report of 23 cases and a review of the literature. *Rev Iberoam Micol*. 14: 104-110.
- Steinbach, W. J., Marr, K. A., Anaissie, E. J., Azier, N., Quan, S. P., Meier-Kriesche, H. U., Apewokin, S., Horn, D. L. 2012. Clinical epidemiology of 960 patients with invasive aspergillosis from the PATH Alliance registry. *Journal of Infection*. 65: 453-464.
- Suárez-Quiroz, M. L., Alonso-Campos, A., Valerio-Alfaro, G., Gonzalez-Rios, O., Villeneuve, P., Figueroa-Espinoza, M.C. 2013. Anti-*Aspergillus* activity of green coffee 5-O-caffeoyl quinic acid and its alkyl esters. *Microbial pathogenesis*. 61-62: 61-5.
- Quesada Hernández, A., 2008. Las plantas medicinales. *Biocenosis* 21(1-2): 20-23.
- Tequida-Meneses, M., Cortez-Rocha, M., Rosas-Burgos, E. C., Lopez-Sandoval, S., Corrales-Maldonado, C. 2002. Efecto de extractos alcoholicos de plantas silvestres sobre la inhibición de crecimiento de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium poae*. *Rev Iberoam Micol*. 28(2): 84-88.
- Thembo, K. M., Vismer, H.F., Nyazema, N.Z., Gerderblom, W.C.A., Katerere, D. R. 2010. Antifungal activity of four weedy plant extracts against selected mycotoxigenic fungi. *Journal of Applied Microbiology*. 109: 1479-1486.
- Trojanowska, M. R. and Threlfall, D. R. 1999. Regulation of saponin biosynthesis in primary roots of oat. *Acta Botanica Gallica*, 146(1), 101-104.
- Valencia, C. 1995. *Fundamentos de Fitoquímica*. Editorial Trillas. México

- Valle, J. M., Gonzalez-Barcala, F. J., Alvarez-Dobaño, J. M., Valdez C, L. 2010. La Aspergilosis pulmonar invasiva en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. *Rev Med Chile*. 138: 612-620.
- Vázquez, J. A., Arellano-Galindo, J., Hidalgo, M. A., Cabrera, d. I., Ontiveros, P., Moreno, M. 2002. Detección de candidiasis invasiva por medio de la PCR en muestras de tejido incluido en parafina. *Revista de Hematología*. 3: 4-7.
- Verastegui Montemayor, M. A. 1995. Análisis del efecto antifúngico de 20 extractos de plantas. Tesis maestría en ciencias. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Vivanco, J.M., Cosio E., Loyola-Vargas, V.M., y Flores, H.E. 2005. Mecanismos químicos de defensa en la plantas. *Investigación y ciencia* :68-75.
- Walsh, T. J., Anaissie, E. J., Denning, D.W., Hertbrecht, R., Kontoyiannis, D. P., Marr, K. A., Morriso, V. A., Segal, B. H., Steinbach, W. J., Stevens, D. A., Burik, J. V., Wingard, J. R., Patterson, T. F., 2008. Tratamiento de la Aspergilosis: Guías para la práctica clínica de la sociedad de enfermedades infecciosas de los Estados Unidos de America (IDSA). *Clinical Infectious Diseases* 46: T1-T36.
- Warnock, D. W. 2007. Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. *Jpn. J. Med. Mycol.* 48: 1-12.
- Xu, X. Y., Sun, H. M., Zhao, B. L., Shi, Y. 2013. Diagnosis of airway-invasive pulmonary aspergillosis by tree-in-bud sign in an immunocompetent patient: Case report and literatura review. *Journal de Mycologie Medicale*. 23: 64-69.
- Yenesew, A., Derese, S., Midiwo, J. O., Bii, C.C., Heydenreich, M., Peter, M. G. 2005. Antimicrobial flavonoids from the stem bark of *Erythrina burttii*. *Fitoterapia*. 76: 469-472.
- Zamora, A. L. A., 2011. Actividad Antibacteriana de la fracción de Hexano, Acetato de Etilo, Etanol y Residual del Extracto Metanólico de *Rhizophora mangle* L. (Mangle rojo) Contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P) y *Escherichia coli* (ATCC 25922). Tesis especialidad. Universidad de Sonora.
- Zamora, A. L. 2014. Aislamiento y caracterización del compuesto responsable de la actividad antibacteriana de la fracción de acetato de etilo del extracto metanólico de *Rhizophora mangle* L. en contra de *Staphylococcus aureus*. Tesis de Maestría. Universidad de Sonora.