



Antifúngicos de la flora nativa uruguaya

Trabajo que presenta Ana Bertucci
para aspirar al Título de
Doctor en Química

Dra. María Laura Tereschuk

Dra. Laura Domínguez

Dr. Gustavo Seoane

Dr. David González Berrutti
Orientador

Dr. Patrick Moyna
Orientador

Universidad de la República (UdelaR), Facultad de Química,
Departamento de Química Orgánica

Montevideo, 12 de Setiembre de 2013

Orientadores

Dr David González Berrutti y Dr Patrick Moyna (2011-2013)

Dr Alvaro Vázquez- MSc María Pía Cerdeiras (2006-2011)

Expte. 101400-003579-11

La preparación de colecta y extractos vegetales y los ensayos fitoquímicos fueron realizados en el Laboratorio de Farmacognosia y Productos Naturales, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de la República (UdelaR), Uruguay, con la dirección del Dr Alvaro Vázquez.

Los ensayos microbiológicos de actividad antifúngica fueron realizados en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química, Universidad de la República (UdelaR), Uruguay, bajo la dirección de MSc María Pía Cerdeiras, y en el Laboratorio de Farmacognosia, Facultad de Bioquímica, Universidad Nacional de Rosario (UNR), Argentina, con la dirección de la Dra Susana Zacchino.

Los ensayos de citotoxicidad de los extractos vegetales fueron realizados en el Laboratório de Patologia e Citologia Clínica, Departamento de Toxicología da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil, con la dirección de la Dra Silvy Stucchi María-Engler.

Los ensayos analíticos fueron realizados en el Laboratório de Síntese de Moléculas Bioativas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil, con la dirección del Dr Hélio Stefani.

Finalmente, el presente trabajo fue terminado en el Laboratorio de Biocatálisis y Biotransformación (LBB), Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de la República (UdelaR), con la dirección de los Dres David González Berrutti y Patrick Moyna.

Integraron el Tribunal de Defensa Intermedia:

Dra Laura Domínguez, Dra Ana Fernández, Dr Fernando Ferreira.

Integran el Tribunal de Defensa de Tesis doctoral:

Dra María Laura Tereschuk, Dra Laura Domínguez, Dr Gustavo Seoane.

¡ A todos ellos agradezco infinitamente su colaboración !

En especial a David y al jefe Moyna por su disposición, paciencia y afecto (que es correspondido).

Agradezco también:

A mi familia y amigos que *acompañaron* la decisión de estudiar durante tanto tiempo - compañero en el concepto del escritor Mario Benedetti- y que disculparon mis ausencias. Un recuerdo muy especial para mi primera fuerza, mi padre Juan Carlos Bertucci, mi padrino Mario Bertucci y mi amiga desde el primer día del colegio Gloria Amido, *in memoriam*.

A mis colegas y amigos en Facultad, por estar en el día a día del laboratorio con la mejor disposición y excelencia en el trabajo pero también con música y risas: IQ Wilson Sierra, Dra Paula Rodríguez, Lic Claudia Díaz, QF Patricia Rodríguez, Dra Laura Fariña, MSc Daniel Lorenzo, Bach Gabriel González, Lic Ivana Núñez, QF Carlos Volonterio, QF Cristina Olivaro y Qca Stephanie Barneche; Dra Paola Panizza y todos los chicos del Laboratorio de Biocatálisis y Biotransformaciones.

A mis superiores en la Facultad de Química, que guiaron mis pasos en momentos difíciles: Dr Eduardo Manta y Dr Gustavo Seoane.

A los Dres Pilar Menéndez, María Laura Tereschuk, Hélio Stefani y Eduardo Dellacassa por las oportunidades que me ofrecieron para crecer.

A los colegas del Departamento de Química Orgánica que confían en mi trabajo, me incluyen en sus proyectos y me dan sus bienamadas muestras para ensayar actividad antifúngica: Dr David González, Dra Ana Bellomo, Dr Gabriel Sagrera, Dr Gustavo Seoane, Lic Victoria de la Sovera, Lic Gonzalo Carrau, Dra Laura Scarone. Asimismo al Dr Hélio Stefani y sus alumnos MSc Daiana Martins Leal y QF Húgo Canduzini.

Por sus interesantes comentarios y aportes a mi trabajo, agradezco a: Dra Silvana Vero, Dra Patricia Esperón, Dra. Graciela Borthagaray, Dr Andrés González, Dra Carmen Rossini, Dra Sonia Rodríguez, Dra Alejandra Rodríguez.

A los Profesores y compañeros de tarea de los laboratorios que visité:

- por su hospitalidad agradezco “a la torcida brasileira” de la USP: Dra Ana María Campa, Dra Silvy Stucchi María-Engler, Dr Hélio Stefani, Dra Sandra Poliselli Farsky, Dr Sandro Rogério de Almeida, Dra Silvia Berlanga de Moraes Barros, y también a los Dres Eduardo Cassel (PUC-Porto Alegre) y Pedro de Almeida (UFRGS),

- por su colaboración en las técnicas de esta investigación, agradezco a: Bact Marcela Raimondi de la UNR, Dra Carla Brohem, Lic Camila Marinho y Lic Fábio Seseyoshi de la USP-São Paulo, Dr Marcos Aurélio Almeida de la PUC-Porto Alegre.

A la Lic Corina Moreira de la Biblioteca de Facultad de Química que obtuvo una copia del artículo de Joseph McFarland en *Journal of American Medical Association* de 1907.

A quienes apoyaron económicamente esta investigación: ANII, PEDECIBA QUIMICA, CSIC, INIA, FUNDAQUIM, Programa CAPES-UdelaR, Facultad de Química (UdelaR).

“Una de las noches yo andaba por un camino de tierra y pisaba las manchas que hacían las sombras de los árboles. De un lado me seguía la luna, en el lado opuesto se arrastraba mi sombra; ella, al mismo tiempo que subía y bajaba los terrones, iba tapando las huellas.”

La mujer parecida a mí, Felisberto Hernández.

CONTENIDOS

Agradecimientos	pág. 2
Índices	pág. 5
Abreviaturas	pág. 15

CAPÍTULO 1 – MICOSIS EN EL URUGUAY DEL SIGLO XXI

1.1. Enfermedades micóticas humanas, énfasis en sus agentes etiológicos.	pág. 20
1.2. Agentes etiológicos causantes de Micosis en Uruguay en la primera década del Siglo XXI. Revisión de publicaciones.	pág. 35

CAPÍTULO 2 – ANTIFÚNGICOS

2.1. Principales grupos de compuestos antifúngicos	pág. 45
2.1.1. Macrólidos poliénicos	pág. 45
2.1.2. Azoles	pág. 47
2.1.3. Alilaminas	pág. 51
2.1.4. Equinocandinas	pág. 52
2.1.5. Nikomicinas y Polioxinas	pág. 54
2.1.6. Pirimidinas	pág. 55
2.1.7. Benzofuranos	pág. 56
2.1.8. Sordarinas	pág. 56
2.1.9. Pradimicinas	pág. 57
2.1.10. Otros antimicóticos	pág. 58
Otros antimicóticos de uso local	pág. 58
Algunos fármacos en desarrollo	pág. 59

2.2. Fármacos indicados en la literatura científica internacional y en Uruguay	pág. 60
Disponibilidad de antimicóticos en Uruguay	pág. 65

CAPÍTULO 3 - LA BÚSQUEDA DE NUEVOS ANTIFÚNGICOS:

ESTRATEGIAS Y OBJETIVOS

3.1. Justificación de la búsqueda de nuevos antifúngicos	pág. 69
3.2. La búsqueda en Productos Naturales	pág. 69
3.2.1. Selección de especies vegetales	pág. 71
3.2.2. Elección de la zona de estudio	pág. 72
3.3. Metodología para el cribaje de los extractos vegetales	pág. 73
3.3.1. Ensayos a nivel de modelos celulares	pág. 73
3.3.2. Posibles métodos de búsqueda de antifúngicos a nivel celular	pág. 75
Bioautografía en capa de agar (Agar overlay)	pág. 75
Microdilución	pág. 76
Difusión en agar	pág. 77
3.4. Objetivos	pág. 79
3.4.1. Objetivo general del presente trabajo	pág. 79
3.4.2. Objetivos específicos	pág. 79

CAPÍTULO 4 - MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales	pág. 81
4.1.1. Material vegetal	pág. 81
Áreas de estudio y fechas de colectas	pág. 81

Selección de especies vegetales	pág. 82
Acondicionamiento y preparación de extractos vegetales	pág. 82
4.1.2. Material de ensayos microbiológicos	pág. 83
Cepas fúngicas y Líneas Celulares	pág. 83
Antifúngicos	pág. 83
Medios de cultivo	pág. 83
Colorantes, solventes, complementos	pág. 84
Microscopios y Lector de Placas	pág. 84
4.1.3. Material de ensayos fitoquímicos	pág. 84
4.2. Ensayos microbiológicos	pág. 86
4.2.1. Bioautografía en capa de agar (Agar overlay)	pág. 86
Determinación de la actividad antifúngica por Bioautografía en Capa de Agar de <i>Candida albicans</i>	pág. 86
Determinación de la actividad antifúngica por Bioautografía en Capa de Agar de hongos filamentosos	pág. 87
Desarrollo de un método para la determinación rápida de la concentración de suspensiones de esporas de <i>Aspergillus niger</i> : Mc Farland revisitado.	pág. 87
4.2.2. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) por Microdilución	pág. 89
Preparación	pág. 89
Procedimiento	pág. 89
4.2.3. Determinación de la Concentración Fungicida Mínima (CFM)	pág. 92
4.2.4. Determinación del modo de acción	pág. 93
Ensayos que revelan antifúngicos que afectan la pared celular	pág. 93
Ensayo de <i>Neurospora crassa</i>	pág. 93
Ensayo del sorbitol	pág. 94

Ensayos que revelan antifúngicos que afectan la membrana celular	pág. 95
Ensayo de unión a ergosterol	pág. 95
Procedimiento	pág. 96
4.2.5. Ensayos de citotoxicidad	pág. 98
Preparación	pág. 98
Ensayo de citotoxicidad de extractos vegetales en fibroblastos FF287	pág.100
Ensayo de citotoxicidad de extractos vegetales en queratinocitos KP#9	pág.102
4.2.6. Sinergismo y Antagonismo	pág.104
Preparación	pág.104
Procedimiento	pág.105
4.3. Ensayos fitoquímicos	pág.107
4.3.1. Ensayos de reconocimiento de grupos de compuestos fitoquímicos	pág.107
4.3.2. Ensayos analíticos	pág.108

CAPÍTULO 5 - RESULTADOS, DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

5.1. Relevamiento de especies vegetales	pág.110
5.2. Plantas colectadas y tamizaje por Bioautografía en capa de agar	pág.114
Resultados de actividad antifúngica de los extractos vegetales	pág.121
5.3. Desarrollo de un método para la determinación rápida de la concentración de suspensiones de esporas de <i>Aspergillus niger</i>	pág.127
5.4. Evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales de las plantas colectadas	pág.129
Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) contra un panel ampliado de cepas	pág.129
Concentración Fungicida Mínima (CFM)	pág.129
Resultados de ensayos que revelan el modo de acción	pág.131

Sinergismo y Antagonismo	pág.132
5.5. Ensayos fitoquímicos sobre extractos vegetales de <i>Eugenia</i> spp.	pág.134
Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)	pág.135
5.6. Evaluación de la citotoxicidad de extractos vegetales de <i>Eugenia masoni</i> O. Berg en líneas celulares de piel	pág.138
Citotoxicidad de extractos de <i>Eugenia masoni</i> O. Berg frente a fibroblastos y queratinocitos normales de piel en distintos períodos	pág.141
5.7. CONCLUSIONES	pág.144
Publicaciones y presentaciones a congresos	pág.146
REFERENCIAS	pág.148

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Provincias fitogeográficas de América del Sur meridional según Cabrera & Willinks, 1973. Uruguay recibe influencias florísticas de las provincias vecinas y presenta un nivel importante de biodiversidad en relación al área. pág. 72
- Figura 2.** Bioautografía de fracciones de extracto vegetal de *Eugenia repanda* O. Berg con medio de cultivo PDA inoculado con *Candida albicans* ATCC 10231; tinción con INT. pág. 75
- Figura 3.** Ensayo de citotoxicidad por Microdilución y tinción con MTT, para fibroblastos normales de piel FF287. Cada fila de la microplaca tiene un extracto vegetal distinto, en gradiente de concentración. pág. 76
- Figura 4.** Difusión en agar Sabouraud de antifúngicos comerciales y agua destilada estéril, utilizando cilindros; crecimiento de esporas de *Aspergillus niger* ATCC 2601. pág. 77
- Figura 5.** Sitios de colecta en Paysandú (ROU). Área 1 en el punto A y Área 2 entre puntos B y C. pág. 81
- Figura 6.** Determinación de la CIM por Microdilución. pág. 91
- Figura 7.** Modificación del ensayo de Microdilución para comparar valores de CIM con y sin agregado de sorbitol. pág. 95
- Figura 8.** Modificación del ensayo de CIM por Microdilución con agregado de ergosterol. pág. 98
- Figura 9.** Preparación de microplaca para el ensayo de Citotoxicidad con MTT para fibroblastos FF287. pág.101
- Figura 10.** Preparación de microplacas para el ensayo de Citotoxicidad con MTT para queratinocitos KP#9. pág.103
- Figura 11.** Preparación de microplaca para Microdilución Bidimensional. pág.105
- Figura 12.** Interpretación de Microplaca Bidimensional. pág.105
- Figura 13.** Chebataroff (1942) ya se refirió a las diferencias Este/Oeste de la vegetación uruguaya; Grela (2004) planteó núcleos disjuntos de flora occidental y oriental basado en estudios taxonómico-genéticos. pág.112

- Figura 14.** *Gleditsia amorphoides* (Griseb.) Taub. o “Espina corona” (Cristina Olivaro). pág.117
- Figura 15.** Bosque ribereño del río Queguay (Juan Bertucci) pág.114
- Figura 16.** Bioautografía en capa de agar de *Aspergillus niger* ATCC 2601. Durante la colecta y en las placas de Petri, se codificó las plantas con números. Especie 10 corresponde a *Eugenia masoni* O. Berg. pág.122
- Figura 17.** Bioautografía en capa de agar de *Candida albicans* ATCC 10231, tinción con INT. Las especies cuya numeración aparece en la fotografía corresponden a: *Paullinia elegans* Cambess (1), *Luehea divaricata* Mart. (2), *Sebastiania commersoniana* (Baill.) L.B. Sm. & Downs (3), *Hexachlamys edulis* (O Berg) Kausel & D.Legrand (4), *Psychotria carthagenensis* Jacq. (6), *Terminalia australis* Cambess. (9), *Eugenia masoni* O. Berg (10), *Phyllanthus sellowianus* (Klotzsch) Müll. Arg. (14), *Scutia buxifolia* Reissek (17), *Combretum fruticosum* (Loefl.) Stuntz (21), *Petunia* sp. (23), *Myrcianthes cisplatensis* (Cambess.) O. Berg (25). pág.122
- Figura 18.** El número de aciertos en la búsqueda de extractos vegetales antifúngicos fue 20% mayor cuando se tuvo en cuenta información etnobotánica para la colecta de plantas (b) que en el caso de no poseer dicha información (a). pág.125
- Figura 19.** Gráfica de concentración de suspensión de esporas de *Aspergillus niger* vs Transmitancia a 550 nm. pág.127
- Figura 20.** Cromatograma visible con indicaciones de revelado UV-360 nm de 17 fracciones del extracto acetónico de *Eugenia masoni* O Berg. Placa de silica gel, fase móvil CH₂Cl₂-CH₃OH 95:5. pág.133
- Figura 21.** Bioautografía en capa de agar de 10 fracciones del extracto acetónico de *Eugenia masoni* O Berg con *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9972 en agar Sabouraud. Se observa inhibición en Fracciones 4-6-8-9-10. pág.133
- Figura 22.** Perfil cromatográfico del extracto diclorometánico de hojas de *Eugenia masoni* O Berg que muestra un pico mayoritario a t = 7 min. El recurso 3D-plot del software mostró el máximo del espectro UV a 265-266 nm. pág.136

- Figura 23.** Fibroblastos FF289 viables luego de 24 h de incubación con distintas concentraciones de extractos vegetales de *Eugenia* spp. pág.139
- Figura 24.** Citotoxicidad de extractos vegetales de *Eugenia masoni* O Berg frente a fibroblastos FF289 luego de 24, 48 y 72 h de incubación. pág.141
- Figura 25.** Citotoxicidad de extractos vegetales de *Eugenia masoni* O Bergh frente a queratinocitos KP#9 luego de 24, 48 y 72 h de incubación. pág.142
- Figura 26.** Observación microscópica de fibroblastos FF287 (x40): a) fibroblastos en ausencia de extracto vegetal, b) fibroblastos con extracto diclorometánico de hojas de *Eugenia masoni* O Berg en concentración 250 µg/mL 48 h de incubación, se observa el característico abalonamiento celular, c) fibroblastos con DMSO 10%. pág.153

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. ANFOTERICINA B Se describe un modelo dinámico de 8 pares Anfotericina B-Ergosterol (1:1) en la formación del poro (Dynarowicz-Łątkaa P 2005; Cohen 2010; Hirano M 2011; Umegawa Y 2012; Wasko P 2012). Su vida media es dos órdenes mayor que el complejo formado con colesterol (Vertut-Croquin A 1983; Diezi T 2012).	pág. 45
Esquema 2. Nistanina.	pág. 47
Esquema 3. Pared celular y membrana celular fúngicas (Juan Bertucci).	pág. 48
Esquema 4. Dos generaciones de triazoles. Los nuevos triazoles son específicos de la enzima target fúngica y mejoran aspectos farmacocinéticos, en particular metabolización hepática y prolongación de vida media en sangre (Bellmann 2007).	pág. 49
Esquema 5. Existen numerosos antifúngicos imidazólicos. Se destacan Clotrimazol de uso tópico, Ketoconazol y Miconazol de uso tópico y sistémico.	pág. 50
Esquema 6. Naftifina y Terbinafina.	pág. 52
Esquema 7. Equinocandinas	pág. 53
Esquema 8. Nikomicina Z y Polioxina B.	pág. 54
Esquema 9. 5-Fluorocitosina.	pág. 55
Esquema 10. Griseofulvina.	pág. 56
Esquema 11. Sordarina.	pág. 57
Esquema 12. Pradimicina A.	pág. 57
Esquema 13. Ejemplos de antimicóticos de uso local.	pág. 58

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Micosis sistémicas.	pág. 22
Tabla 2. Micosis profundas.	pág. 25
Tabla 3. Micosis subcutáneas.	pág. 27
Tabla 4. Micosis cutáneas.	pág. 31
Tabla 5. Micosis superficiales.	pág. 34
Tabla 6. Formas farmacéuticas de Anfotericina B. En Uruguay, a la fecha se comercializa FUNGIZONE ^R (URUFARMA SA) y AMBISOME ^R (GADOR SA)	pág. 46
Tabla 7. Ejemplos de fármacos en desarrollo y su mecanismo de acción.	pág. 59
Tabla 8. Agentes etiológicos de enfermedades micóticas y fármacos prescritos.	pág. 60
Tabla 9. Principios activos y medicamentos antimicóticos disponibles en Uruguay. Revisión 2013.	pág. 65
Tabla 10. Preparación de la escala <i>Black</i> McFarland.	pág. 90
Tabla 11. Resultados del relevamiento de especies vegetales sobre la costa del río Uruguay frente al extremo norte de la isla Guaviyú, Departamento de Paysandú, abril 2006.	pág.110
Tabla 12. Listado de especies cuyas plantas fueron colectadas y su información etnobotánica y etnofarmacológica.	pág.115
Tabla 13. Lista de especies cuyos extractos vegetales produjeron inhibición de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 y <i>Aspergillus niger</i> ATCC 2601 por Bioautografía en capa de agar. Parte de planta utilizada: H hojas, PA partes aéreas, F frutos, C corteza. Solventes de extracción: 1) CH ₃ CH ₂ OH - H ₂ O 70:30, 2) CH ₃ COCH ₃ , 3) CH ₂ Cl ₂ .	pág.123
Tabla 14. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de extractos vegetales frente a cepas de hongos patógenos.	pág.130
Tabla 15. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de extractos de hojas de <i>Eugenia masoni</i> O. Berg.	pág.131
Tabla 16. Screening fitoquímico sobre extractos vegetales de <i>Eugenia</i> spp.	pág.134

LISTA DE ABREVIATURAS

ác gál	Ácido gálico
ADN	Ácido desoxiribonucleico
Afl	<i>Aspergillus flavus</i>
Afu	<i>Aspergillus fumigatus</i>
Alc	Alcaloides
An	<i>Aspergillus niger</i>
ANCAP	Administración Nacional de Combustibles Alcohol y Portland
ANF B	Anfotericina B
ANVISA	<i>Agência Nacional de Vigilância Sanitária</i>
ARN	Ácido ribonucleico
ARN_m	ARN mensajero
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BR	Brasil
C	Corteza
°C	Grados Celsius
C+	Control positivo
C-	Control negativo
Ca	<i>Candida albicans</i>
Car	Cardenólidos
CAS	Caspofungina
C_{Anf B}	Control de Anfotericina B
C_{cel}	Control celular
C_{est}	Control de esterilidad
C_{Ext}	Control de extracto
C_{fúng}	Control de crecimiento fúngico
C_{Ket}	Control de Ketoconazol
Cn	<i>Cryptococcus neoformans</i>
C_{solv}	Control de solvente
Ct	<i>Candida tropicalis</i>
C_{Terb}	Control de Terbinafina
CCD	Cromatografía en Capa Delgada
CDR1	Transportador de la familia ABC-Transporters

CDR2	Transportador de la familia ABC- <i>Transporters</i>
cél	Células
CFM	Concentración Fungicida Mínima
CIM	Concentración Inhibitoria Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CNIO	Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas
csp	Cantidad suficiente para
Dic	Diciembre
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
ADN	Ácido desoxiribonucleico
E o erg	Ergosterol
EMEA	<i>European Medicines Evaluation Agency</i>
esp	esporas
Est	Esteroides
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
F	Frutos
Φ	Diámetro
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Feb	Febrero
Fks1	Subunidad de la enzima β-1,3-D-glucansintasa
Fla	Flavonoides
FTN	Formulario Terapéutico Nacional
FUNDAQUIM	Fundación para el Progreso de la Química
g	Gramo
Gli	Glicósidos
GTPasa	Enzima
h	Hora
H	Hoja
HIV	Virus de Inmunodeficiencia Humana
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IC	Índice de Citotoxicidad
IGP	Intertrigo de Grandes Pliegues

INE	Instituto Nacional de Estadística
INT	Cloruro de p-iodonitrotetrazolium
KET	Ketoconazol
KGM	Medio de crecimiento de queratinocitos
Mar	Marzo
MDR1	Transportador de la familia MF
MF	Superfamilia <i>Major Family Transporters</i> de bombas de eflujo
mg	Miligramo
Mg	<i>Microsporium gypseum</i>
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µm	Micrómetro
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MPLC	Cromatografía Líquida de Media Presión
MSP	Ministerio de Salud Pública
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolium
MVJB	Museo y Vivero del Jardín Botánico
N°	Número
nm	Nanometro
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de Salud
PA	Partes aéreas
PBS	Buffer fosfato salino
P450	Complejo enzimático
PDA	<i>Potatoe Dextrose Agar</i>
ppa	Puro para análisis
^R	Marca Registrada
ROU	República Oriental del Uruguay
rpm	revoluciones por minuto
SA	Sociedad Anónima
Sap	Saponinas
Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

SDS	Dodecilsulfato sódico
SFB	Suero Fetal Bovino
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SNAP	Sistema Nacional de Áreas Protegidas
SNC	Sistema Nervioso Central
SNVH	Sistema Nacional de Vigilancia de Infecciones Intra Hospitalarias
sorb	Sorbitol
sp.	Especie
spp.	Especies
subsp	Subespecie
Tan	Taninos
téc.	Calidad técnica
Ter	Terpenos
Tm	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
Tr	<i>Trichophyton rubrum</i>
Tri	Triterpenos
TTZ	Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolium
UdelaR	Universidad de la República
ufc/mL	Unidades formadoras de colonias por mililitro
UICN	<i>International Union for Conservation of Nature</i>
UNICEF	<i>United Nations Children's Fund</i>
U/mL	Unidades Internacionales por mililitro
UNR	Universidad Nacional de Rosario
USP	<i>Universidade de São Paulo</i>
V	Volumen
var.	Variedad
v/v	Volumen/volumen
WHO	<i>World Health Organization</i>
XTT	2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolium-5-carboxanilida

CAPÍTULO 1

MICOSIS EN EL URUGUAY DEL SIGLO XXI

1.1. ENFERMEDADES MICÓTICAS HUMANAS, ÉNFASIS EN SUS AGENTES ETIOLÓGICOS.

Los hongos potencialmente patógenos para el ser humano constituyen un pequeño grupo de pocos centenares entre los cientos de miles de especies del Reino Fungi. Son capaces de producir infecciones denominadas micosis, aunque en menor grado se dan también procesos alérgicos o intoxicaciones por ingestión. Los principales hongos patógenos están distribuidos en casi la totalidad de los phyla de su Reino, diversificando estrategias de patogenicidad y virulencia (James 2006). A este factor se agrega el gran número de individuos en las poblaciones microbianas, con ciclos de vida cortos comparados con otros eucariotas y de rápida evolución (Heitman 2011), adaptables a condiciones ambientales adversas o diferentes huéspedes.

De acuerdo al habitat se clasifican en hongos antropofílicos, zoofílicos o geofílicos. Algunas especies pueden hallarse en más de hábitat, por ejemplo: *Microsporum canis*, responsable de tiña capitis en niños, aparece en la piel sana de gatos callejeros y mascotas en relación 1:3, siendo ésta la principal fuente de contagio (Martínez 2005). Siendo quimioheterótrofos, deben adaptarse a diferentes condiciones de sustrato, temperatura, pH, por tanto hay hongos patógenos dimórficos o bien hay variedades de una especie presentes en hábitats distintos. Ejemplo del último caso es *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*, hongo neurotrópico cuya puerta de ingreso al hombre es la vía respiratoria, y *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* que habita en montes de eucalipto y puede producir infección en el trabajador rural (Guirado 2009), entre otros.

La comprensión de mecanismos fúngicos de adhesión a los tejidos del hospedero, penetración de tejidos, multiplicación dentro del huésped, interacción de células fúngicas con el sistema inmune celular y humoral, se encuentra en estudio permanente (Odds 2001; Merz 2005; Deacon 2006; Murray 2008; Flemming 2010; Steinberg 2011; Taylor 2011). Asimismo, los fenómenos de resistencia microbiana y resistencia clínica constituyen un área de investigación pluridisciplinaria (Espinel-Ingroff 2008; Pemán 2009).

Según su etiología, las infecciones fúngicas se pueden agrupar en infecciones producidas por patógenos primarios e infecciones oportunistas debidas a una gran variedad de hongos saprófitos endógenos o exógenos. Hongos considerados previamente no patógenos son responsables del aumento en número, sucesión y concomitancia de infecciones a nivel mundial en las últimas décadas (Richardson 1991) (Chakrabarti 2005); mostrando un comportamiento más agresivo en este papel (Gezuele 2001). Hay acuerdo en adjudicar el incremento de infecciones oportunistas a diversos factores

relacionados con el hospedero: el aumento en número de pacientes inmunocomprometidos debido a enfermedades predisponentes como el VIH, la utilización de procedimientos médicos invasivos como trasplantes y tratamientos farmacológicos prolongados con citostáticos, corticosteroides y quimioterápicos.

Las medidas de prevención e higiene atravesadas por condiciones socioeconómicas desiguales en la población (Gezuele 2001; Seebacher 2008; Havlickova 2009), la organización y administración de los centros de atención -sobre todo unidades de cuidado intensivo (Tumbarello 2012; Zaragoza 2012)- y el aumento en la movilidad de las personas, condicionan culturalmente la casuística epidemiológica.

La expresión clínica de una infección fúngica también varía con el tejido infectado. En las Tablas 1 a 5 se describen las infecciones fúngicas conocidas, sus agentes etiológicos y grupos de riesgo. Algunas de las micosis presentadas no se conocen en Uruguay o habiéndose registrado en el pasado ya no se reportan casos.

Tabla 1. Micosis sistémicas

MICOSIS SISTÉMICAS	ASPECTOS CLÍNICOS	AGENTE ETIOLÓGICO	CONDICIONES PARTICULARES DE LAS PERSONAS AFECTADAS
Candidiasis invasiva	Sintomatología infecciosa localizada que evoluciona a sistémica.	<i>Candida albicans</i> <i>Candida parapsilosis</i> <i>Candida tropicalis</i> <u>Menos frecuente:</u> <i>Candida krusei</i> <i>Candida glabrata</i> <i>Candida kefyr</i>	Bebés prematuros, cateterizados. Pacientes con anemia, leucocitosis, linfocitosis, insuficiencia respiratoria, peritonitis, intoxicados de drogas de abuso.
Criptococosis	El desarrollo de infección criptococósica depende del estado inmune. Se caracteriza por síntomas iniciales similares a gripe, la infección pulmonar una vez diseminada produce meningitis y encefalitis.	<i>Criptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> <i>Criptococcus neoformans</i> var. <i>gattii</i> <u>Poco frecuente:</u> <i>Criptococcus albidus</i> <i>Criptococcus curvatus</i> <i>Criptococcus laurentii</i>	Pacientes inmunodeprimidos. Contacto con heces de aves.
Aspergilosis	Infección pulmonar que puede diseminarse. En pacientes con dolencia pulmonar previa pueden formarse aspergilomas y procesos alérgicos. Otras manifestaciones clínicas dependen del órgano comprometido: sinusitis, oftalmitis, otomicosis, oftalmitis,	<i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus niger</i> <u>Menos frecuentes:</u> <i>Aspergillus glaucus</i> , <i>Aspergillus nidulans</i> , <i>Aspergillus terreus</i> .	Pacientes con tuberculosis, asma o neoplasia pulmonar. Inmunocomprometidos: neutropénicos, trasplantados, tratados con corticosteroides.

	meningoencefalitis, endocarditis, infección gastrointestinal, cutánea u ósea. En pacientes inmunodeficientes puede ser invasiva.		
Zigomicosis sistémica	Infección pulmonar seguida de diseminación. Poco frecuente infección gastrointestinal. En inmunocompetentes la inhalación de esporas puede producir sinusitis o micetoma.	Mucorales (Entomofetomicosis diseminada es rara).	Pacientes con leucemia, linfomas o neutropenia adquieren infección pulmonar. La infección gastrointestinal, rara, puede darse en pacientes con desnutrición, fiebre tifoidea, pelagra, leucemia, diabetes mellitus, trasplantados.
Feohifomicosis diseminada	Infección pulmonar, cerebral, con lesiones solitarias o inflamación generalizada.	<i>Cladophialophora hantiana</i> (altamente neurotrópico) <i>Wangiella dermatitidis</i> <i>Ramichloridium mackenziei</i> <i>Dactylaria constricta</i> <i>Fonsecaea pedrosoi</i> <i>Curvularia</i> spp.	Pacientes con diabetes mellitus, trasplante de órganos, leucemia, asma.
Hialohifomicosis profunda	Neumonía, endocarditis, meningitis, endoftalmitis, lesiones osteoarticulares, gastritis, necrosis de tejido, onicomicosis, infecciones diseminadas.	<i>Acremonium falciforme</i> , <i>Acremonium strictum</i> , <i>Acremonium kiliense</i> , <i>Acremonium alabamensis</i> , <i>Acremonium</i>	Dependiente del estado inmune del paciente. Factores predisponentes: diabetes, leucemia, neutropenia, SIDA, terapia de antibióticos y corticosteroides, uso abusivo de drogas,

		<i>roseogriseum</i> <i>Paecilomyces lilacinus,</i> <i>Paecilomyces variotii</i> <i>Scopulariopsis brevicaulis,</i> <i>Scopulariopsis brumptii,</i> <i>Scopulariopsis fusca,</i> <i>Scopulariopsis acremonium,</i> <i>Scopulariopsis koningii</i> <i>Scytalidium byalinum</i> <i>Fusarium solani,</i> <i>Fusarium oxysporum,</i> <i>Fusarium moniliforme</i> <i>Beauveria bassiana</i> <i>Penicillium marneffeii</i>	trasplante de órganos.
Pneumocistis pneumonia	Disnea, tos invalidante, edema pulmonar, fiebre en adultos; tos y cianosis sin fiebre en niños.	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	Pacientes inmunodeficientes, de rápido progreso en casos HIV. Malnutridos. Rara en personas inmunocompetentes.

Tabla 2. Micosis profundas

MICOSIS PROFUNDAS	ASPECTOS CLÍNICOS	AGENTE ETIOLÓGICO	CONDICIONES PARTICULARES DE LAS PERSONAS AFECTADAS
Paracoccidioidomicosis	Infección pulmonar que puede ser regresiva o progresiva y diseminarse por vía linfática o hematológica. La infección juvenil aguda es de rápida evolución, comprometiendo médula ósea, aparato digestivo, inmunodepresión. La infección crónica puede ser sólo pulmonar o multifocal: lesiones de piel, mucosas, suprarrenal, SNC.	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Más afectados: hombres entre 30 y 60 años de zonas rurales.
Histoplasmosis	Infección pulmonar que se confunde con gripe, con evolución inmuno dependiente. La forma diseminada afecta también piel y mucosas, hígado y médula ósea.	<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i> <i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>duboisii</i>	Contacto con heces de aves o murciélagos. Pacientes con HIV o tratamientos de radio/quimioterapia podrán presentar histoplasmosis diseminada.
Blastomicosis	Infección primaria pulmonar con síntomas similares a gripe que progresa y se prolonga meses. Blastomicosis cutánea es accidental o consecuencia de la	<i>Blastomyces dermatitidis</i>	

	<p>infección sistémica.</p> <p>Puede producirse infección de casi cualquier órgano.</p>		
Coccidioidomicosis	<p>Infección primaria pulmonar que afecta nódulos linfáticos y extremidades inferiores. En alto porcentaje asintomática. Síntomas similares a gripe, fiebre aguda, dolor torácico, sudor nocturno, pérdida de peso. Diseminada puede afectar piel, huesos y meninges.</p>	<p><i>Coccidioides immitis</i></p> <p><i>Coccidioides posadasii</i></p>	<p>Endémica en zonas áridas.</p>
Penicilliosis	<p>En general la infección primaria es pulmonar pero puede ser cutánea, onicomycosis, queratitis, endocarditis, peritonitis, infección esofágica o cerebral.</p>	<p><i>Penicillium marneffeii</i></p>	<p>Pacientes con HIV.</p>

Tabla 3. Micosis subcutáneas

MICOSIS SUBCUTÁNEAS	ASPECTOS CLÍNICOS	AGENTE ETIOLÓGICO	CONDICIONES PARTICULARES DE LAS PERSONAS AFECTADAS
Sporotricosis	<p><u>Cutánea</u>: Lesiones fijas al sitio de inoculación, verrugosas, acneiformes, eritematosas, crostosas, maculares; en rostro, cuello, tronco o miembros.</p> <p><u>Linfocutánea</u>: Lesión inicial con desarrollo de nódulo subcutáneo ulceroso afectando ganglios. Aparecen lesiones no ulcerosas, enrojecidas, brillantes, lisas o rugosas.</p> <p><u>Extracutánea</u>: La diseminación puede afectar distintos órganos, y producir meningitis, sinusitis, laringitis, queratitis, lesiones pulmonares y osteoarticulares, fungemia.</p>	<i>Sporothrix schenkkii</i>	Las infecciones cutáneas se dan entre personas que trabajan en contacto con el suelo, como trabajadores rurales, jardineros, mineros, cazadores de mulitas, pescadores. Factores predisponentes pueden derivar en sporotricosis profundas: se asocia a diabetes mellitus, cáncer, inmunosupresión por trasplante o Sida y alcoholismo.
Cromoblasto micosis	Lesiones lisas y eritematosas que aumentan su tamaño y son descamativas con el tiempo, cuya evolución debe ser observada. Aparecen en miembros inferiores más que en superiores, con poca frecuencia son nasales o	Hongos de la familia Damatiaceae: <i>Fonsecaea pedrosoi</i> <i>Fonsecaea compacta</i> <i>Cladophialophora carionii</i> <i>Rhinochadiella</i>	Personas que trabajan en contacto con el suelo, como trabajadores rurales o jardineros, principalmente de sexo masculino.

	auriculares.	<i>aquaspersa</i> <i>Phialophora verrucosa</i>	
Micetoma eumicótico	Granos redondeados negros o blancos que salen de fístulas, en general en pies. Las lesiones tienden a ser esclerosantes y secreción serosanguinolenta, pueden ser óseas.	<i>Madurella</i> spp. <i>Allescheria</i> spp. <i>Cephalosporium</i> spp. <i>Acremonium</i> spp. <i>Exophiala jeanselmei</i>	Trabajadores rurales y criadores de aves, principalmente de sexo masculino.
Feohifomicosis subcutánea	Abcesos en el sitio traumatizado con secreción serosanguinolenta y seropurulenta, con el tiempo el abceso forma una cápsula fibrosa que drena espontáneamente.	<i>Alternaria alternata</i> <i>Exophiala</i> spp. <i>Curvularia</i> spp. <i>Cladophialophora hantiana</i> <i>Bipolaris</i> spp. <i>Exserohilum</i> spp. <i>Wangiella dermatitidis</i>	Adquiridas por traumatismo o inhalación de esporas, puede diseminarse según inmunocompetencia del paciente.
Hialohifomicosis subcutánea	Lesiones de córnea y nariz de aspecto variado, queratitis, infección de quemaduras, heridas o úlceras por Fusariosis.	<i>Penicillium</i> spp. <i>Acremonium</i> spp. <i>Paecilomyces lilacinus</i> , <i>Paecilomyces variotti</i> <i>Scopulariopsis</i> spp. <i>Scytalidium byalinum</i> <i>Fusarium solani</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Fusarium moniliforme</i> <i>Beauveria bassiana</i>	Adquiridas por traumatismo o inhalación de esporas, puede diseminarse según inmunocompetencia del paciente.

Zigomicosis subcutánea	Lesiones inespecíficas en la piel progresan a lesiones necrosantes.	<u>Mucormicosis:</u> <i>Rhizopus oryzae</i> <i>Rhizopus Microsporus</i> <i>Absidia corymbifera</i> <i>Mucor spp.</i> <i>Rhizomucor spp.</i> <i>Cunninghamella bertholetiae</i> <i>Syncephalastrum racemosum</i> <i>Mortierella wolfii</i> <i>Saksenaea vasiformes</i> <i>Apophysomyces elegans</i> <i>Cokeromyces recurvatus</i> <u>Entomoftromicosis:</u> <i>Basidiobolus ranarum</i> <i>Conidiobolus coronatus</i> <i>Conidiobolus incongruus</i>	Personas con lesiones traumáticas en piel y posterior contaminación.
Pitiosis	Infección en heridas de piel con formación de lesión granulomatosa simil coral, de eosinófilos e hifas del hongo. Progresa con oclusión arterial, profundización en la región corporal y posible gangrena.	<i>Pythium insidiosum</i>	Personas con lesiones traumáticas en piel y posterior contaminación.

Lobomicosis	Lesiones de forma y tamaño variable, verrugosas o ulcerativas si hubo trauma previo, hipo o hiperpigmentadas, sin supuración, en extremidades u orejas	<i>Glenosporella loboï*</i>	Mayoría hombres, 40 a 70 años.
Rinosporidiosis	Pólipos granulomatosos nasales, oculares y en vías respiratorias.	<i>Rhinosporidium seeberi</i>	Trabajadores que mueven tierra o arena de cauces de agua contaminados, agricultores con heridas traumáticas por madera o que se contaminan en suelo o depósitos de agua.

* Otros nombres propuestos para el mismo agente etiológico: *Glenosporopsis amazonica*, *Paracoccidioides loboï*, *Blastomyces loboï*, *Loboa loboï*, *Lacazia loboï*.

Tabla 4. Micosis cutáneas

MICOSIS CUTÁNEAS	ASPECTOS CLÍNICOS	AGENTE ETIOLÓGICO	CONDICIONES PARTICULARES DE LAS PERSONAS AFECTADAS
Tinea barbae	Lesiones cutáneas superficiales o profundas en piel y pelo de barba.	<i>Trichophyton verrucosum</i> <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	
Tinea capitis	Lesiones en cuero cabelludo: leve o con eritema, inflamación, alopecia.	<i>Microsporum</i> spp. <i>Trichophyton</i> spp.	
Tinea favosa	Lesiones graves en cuero cabelludo, con formación de placas.	<i>Trichophyton schoenleinii</i>	
Tinea corporis	Lesiones circulares eritematosas, descamativas, con vesículas. En rostro, hombros o tronco.	Todos los géneros de dermatofitos	
Tinea cruris	Lesiones eritematosas, húmedas, con prurito, en ingle.	<i>Hongos antropofílicos</i>	Adultos.
Tinea imbricata	Lesiones concéntricas en piel.	<i>Trichophyton concentricum</i>	
Tinea manum	Lesiones eritematosas, con fisuras, interdigital o en palma de manos.	<i>Trichophyton rubrum</i>	Personas cuyas manos están en contacto frecuente con agua y jabón.
Tinea pedis	Lesiones eritematosas, húmedas, descamativas, con fisuras, interdigitales o	<i>Trichophyton rubrum</i> <i>Trichophyton mentagrophytes</i> var.	Deportistas.

	en planta de pies.	<i>Interdigitale</i> <i>Epidermophyton floccosum</i>	
Tinea unguium	Lesiones en lámina ungueal que las tornan amarillas y quebradizas; inflamación adyacente.	Subungueal distal en pie asociada a <i>Trichophyton rubrum</i> . Blanca superficial asociada a <i>Trichophyton mentagrophytes</i> o <i>Epidermophyton floccosum</i> . Blanca proximal asociada a <i>Trichophyton rubrum</i> , <i>Microsporum canis</i> o <i>Trichophyton megnini</i> .	Deportistas.
Candidiasis cutánea	Intertrigo de grandes pliegues (IGP). Candidiasis del pañal. Foliculitis. Onicomycosis candidásica periungueal con inflamación, enrojecimiento y supuración. Lesiones cutáneas como expresión metastásica de candidiasis diseminada.	<i>Candida albicans</i> , <i>Candida parapsilosis</i> , menos frecuente otras especies del género (<i>Candida tropicalis</i> , <i>Candida guilliermondii</i> , <i>Candida krusei</i>).	IGP en obesos, diabéticos y alcohólicos. Foliculitis en pacientes sidóticos.
Candidiasis en mucosas	Oral o muguet: manchas blanquecinas en cavidad bucal, lengua, comisuras labiales. Lesiones crónicas de aspecto granulomatoso. Esofagitis. Candidiasis gastrointestinal no esofágica. Vulvovaginitis.	Oral asociada a <i>Candida albicans</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>Candida Krusei</i> , <i>Candida dubliniensis</i> . Esofagitis consecuencia de candidiasis bucal. De tracto urinario	Oral en pacientes sidóticos. Candidiasis gástrica reportada como efecto secundario de Cimetidina. Vulvovaginitis en pacientes diabéticas, gestantes y con

	Balanitis.	asociada a <i>Candida glabrata</i> . Vulvovaginitis asociada a <i>Candida albicans</i> y <i>Candida glabrata</i> . Balanitis asociada a <i>Candida albicans</i> .	terapia antibiótica.
--	------------	--	----------------------

Tabla 5. Micosis superficiales

MICOSIS SUPERFICIALES	ASPECTOS CLÍNICOS	AGENTE ETIOLÓGICO	CONDICIONES PARTICULARES DE LAS PERSONAS AFECTADAS
Ptiriasis versicolor	Pequeñas manchas de color variable, que oscurecen con exposición solar, lisas o levemente descamadas. En cuello, tronco o abdomen.	<i>Malassezia sympodialis</i> <i>Malassezia globosa</i> <i>Malassezia furfur</i> <i>Malassezia obtusa</i> <i>Malassezia slooffiae</i>	Pacientes cateterizados, bebés prematuros, pacientes inmunocomprometidos, transplantados renales. Individuos sanos con factores predisponentes hereditarios, piel gruesa, excesiva transpiración.
Piedra Blanca	Nódulos blancos o castaños, blandos, adheridos a pelo de cualquier parte del cuerpo.	<i>Trichosporon cutaneum</i> <i>Trichosporon asahii</i> <i>Trichosporon asteroides</i> <i>Trichosporon inkin</i> <i>Trichosporon mulodes</i> <i>Trichosporon ovoides</i>	Adultos jóvenes de cualquier sexo.
Piedra Negra	Nódulos castaños o negros, duros, muy adheridos a pelo; sólo en cabello.	<i>Piedraia hortae</i>	Predominancia de sexo masculino.
Tinea negra	Manchas castañas o marrones, circulares, lisas. En general en palma de manos y planta de pies.	<i>Hortae werneckii</i> <i>Exophiala werneckii</i>	Residentes en costas marítimas (<i>Hortae werneckii</i> es halofílico).

Oculomicosis	Infecciones oftálmicas.	<i>Fusarium</i> spp. especialmente <i>Fusarium solani</i> <i>Aspergillus</i> spp. especialmente <i>Aspergillus flavus</i> <i>Candida albicans</i> Han sido aislados hongos de varias decenas de géneros distintos.	Pacientes con antecedentes de utilización de lentes de contacto o material biomédico, heridas traumáticas o intervenciones quirúrgicas en ojo, preexistencia de enfermedad ocular, VIH.
--------------	-------------------------	--	---

Existen infecciones fúngicas inusuales pero graves que no se describen aquí:

-causadas en pulmón por hongos dimórficos del género *Emmonsia* (Adiaspiromicosis), y
-fungemia con o sin invasión de órganos causada por hongos de los géneros *Blastoschizomyces*, *Hansenula*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Sporobolomyces*, *Trichosporon* y *Ustilago*.

Fuentes:

Textos clásicos de Micología Clínica (Díaz Sánchez 2004; Sherris 2004; Merz 2005; Koneman 2006; Forbes 2007; Almeida 2008; Murray 2008; Álvez 2010; Porter, R 2011).

1.2. AGENTES ETIOLÓGICOS CAUSANTES DE MICOSIS EN URUGUAY EN LA PRIMERA DÉCADA DEL SIGLO XXI. REVISIÓN DE PUBLICACIONES.

En las infecciones fúngicas reportadas a comienzos del siglo XXI entre los uruguayos participan principalmente los siguientes agentes etiológicos (Mansilla 1996; Fernández 1999; Ballesté 2000; Ballesté 2000; Conti Díaz, I 2001; Gezuele 2001; Ramos 2001; Ballesté 2003; Calegari 2004; Zuño Burstein 2004; Ballesté 2005; Gezuele 2005; Muñoz 2005; Conti Díaz, I 2006; OMS 2007; Conti Díaz, I 2008; Conti Díaz, I 2008; Melendres 2008; SNVIH 2008; Conti Díaz, I 2009; Conti Díaz, I 2010; Hincapié García 2010; Conti Díaz, I 2011).

Pneumocystis jiroveci

Candida albicans

Candida no albicans

Histoplasma capsulatum

Criptococcus neoformans

Aspergillus fumigatus

Aspergillus flavus

Aspergillus niger

Paracoccidioides brasiliensis

Sporothrix schenkii

Phialophora verrucosa/ Fonsecaea pedrosoi (Cromomicosis)

Exophiala dermatitidis/ Exserohilum rostratum (Feohifomicosis)

Zigomicetes

Eumicetomas

Malassezia spp

Microsporum canis

Microsporum gypseum

Tricophyton mentagrophytes

Tricophyton rubrum

Epidermophyton floccosum

En el año 2004 se publica el informe “Enfermedades parasitarias y micóticas del Uruguay” redactado por Calegari, Salvatella et al. del Departamento de Parasitología y Micología del Instituto de Higiene “Prof. A. Berta” de Facultad de Medicina (UdelaR), en colaboración con el Ministerio de Salud Pública (MSP) y la Organización Panamericana de la Salud (OPS) oficina regional de la Organización Mundial de la Salud (OMS)(Calegari 2004). Si bien no presenta datos definitivos de prevalencia e incidencia, reporta la presencia de las siguientes infecciones fúngicas en Uruguay y brinda información de casos y tendencias disponibles hasta esa fecha:

- Neumocistosis (*Pneumocystis jiroveci*), alta incidencia en pacientes VIH+/SIDA, en aparente disminución.
- Histoplasmosis (*Histoplasma capsulatum*), dos o tres casos por año.
- Paracoccidioidomicosis (*Paracoccidioides brasiliensis*), un caso cada dos años, en clara disminución.
- Criptococosis (*Cryptococcus neoformans*), diez casos por año, tendencia a disminución.
- Malasseziosis, alta incidencia según la consulta dermatológica de Pityriasis versicolor y foliculitis por *Malassezia* spp. También tres casos de infección respiratoria por alimentación parenteral. Tendencia estable.
- Esporotricosis (*Sporothrix schenckii*), más de treinta casos anuales.
- Candidiasis superficiales y profundas (*Candida* spp), tendencia en aumento de acuerdo a la consulta dermatológica, médica, general y pediátrica.
- Aspergilosis (*Aspergillus* spp).
- Cromomicosis (*Phialophora verrucosa/ Fonsecaea pedrosoi*), menos de diez casos registrados en el país.
- Feohifomicosis (*Exophiala dermatitidis/ Exserohilum rostratum*), cuatro casos registrados en los últimos diez años.
- Zigomicosis (diferentes especies de Zigomicetes), cuatro casos en los últimos veinte años.
- Dermatofitosis (*Trichophyton* spp., *Microsporum* spp., *Epidermophyton* spp.), muy alta incidencia de acuerdo a la consulta dermatológica.

Teniendo en cuenta que las infecciones oportunistas no son de notificación obligatoria y que no se realizan estudios micológicos de confirmación del agente en forma rutinaria, puede suponerse subregistro de casos. El informe brinda un panorama de geografía médica para micosis en Uruguay, otros estudios aportan más datos epidemiológicos en los últimos años del siglo XX y primera década de este siglo.

Según datos de la Cátedra de Enfermedades Infecciosas de Facultad de Medicina (UdelaR), desde 1988 hasta 1999 se diagnosticaron mediante estudio micológico doscientas micosis profundas oportunistas en pacientes de SIDA, correspondiendo

ciento catorce a pneumocistosis, cincuenta y cuatro a criptococosis, veintinueve a histoplasmosis y tres a aspergilosis (Fernández 1999). El Boletín Epidemiológico del Ministerio de Salud Pública del Uruguay (MSP) de 2011 indica para el período siguiente una estabilización de mortalidad por SIDA entre 2003-2006 en descenso hasta la fecha del informe gubernamental, siendo las principales cinco causas: pneumocitosis, candidiasis orofaríngea, tuberculosis, neumonías bacterianas y toxoplasmosis (MSP 2011).

La neumonía por *Pneumocystis jiroveci* ocupa el primer lugar dentro de las infecciones respiratorias por agentes micóticos en pacientes HIV-SIDA en el mundo (OPS/OMS 2003). El informe del Instituto Nacional de Estadística (INE) del año 2002 en su Capítulo "Salud" señala que la mayoría de las patologías asociadas al SIDA son las enfermedades oportunistas con predominancia de aquellas pulmonares (INE 2002). Se realizó un estudio retrospectivo de ciento veintinueve lavados bronquioloalveolares obtenidos de pacientes HIV-SIDA con enfermedad respiratoria, con el objetivo de determinar la frecuencia relativa de pneumocistosis en la población estudiada en Uruguay y detectar la presencia de otras micosis oportunistas. Según los autores del trabajo, Fernández et al., cuarenta y tres muestras fueron positivas para hongos: en veinticuatro se identificó *Pneumocystis jiroveci*, en tres *Aspergillus fumigatus*, en dos *Cryptococcus neoformans* y en diez hubo levaduras del género *Candida* no observadas en el examen micológico directo y descartadas por los autores por contaminantes (Fernández 2000). Pacientes con transplante de órgano sólido o médula ósea y prematuros también se encuentran en riesgo de pneumocistosis (Departamento de Parasitología y Micología, Facultad de Medicina, UdelaR).

No se dispone de datos precisos de incidencia y prevalencia, aunque se observa un número creciente de casos de candidiasis profundas en pacientes con VIH+/SIDA, neutropénicos o internados en unidades de cuidados intensivos, quienes presentan candidiasis orofaríngea y esofágica y lesiones más intensas y progresivas (Fernández 1999). Se registra aumento de frecuencia de especies no *albicans* y creciente resistencia a los antifúngicos utilizados habitualmente, situación generalizada (Pfaller 2002; Calegari 2004; Nucci 2010; Córdoba 2011). En Latinoamérica, cinco especies del género son aisladas con mayor frecuencia: *Candida albicans*, *Candida tropicalis* en segundo lugar, *Candida parapsilosis* en aumento, *Candida glabrata* con menor frecuencia respecto a otras regiones y *Candida Krusei*; *Candida guilliermondii* y *Candida rugosa* no son comunes pero aquí son más frecuentes (San Blas 2011).

En Uruguay, de un estudio de treinta cepas de *Candida* en pacientes HIV+ recibiendo tratamiento profiláctico imidazólico, se aislaron veintisiete cepas de *Candida albicans*,

dos de *Candida parapsilosis* y una de *Candida Krusei*. Se observó diferentes patrones de resistencia al fluconazol, mientras que en cepas aisladas de pacientes no HIV el 95% de las cepas no presentaron resistencia a los imidazoles (Fernández 1999), implicando presión de selección de cepas por el uso de imidazoles.

Las levaduras del género *Candida* también pueden ser agentes de micosis superficiales. Son los hongos que infectan con mayor frecuencia a pacientes con diabetes, con insuficiencia renal o hepática crónica o neutropenia o malnutrición grave. La candidiasis vulvovaginal es un problema universal que afecta a millones de mujeres, siendo la segunda causa de flujo vaginal en el Uruguay; el aumento significativo en la frecuencia de especies no *albicans* y la aparición de cepas resistentes ha llevado a una mayor tasa de recurrencias de los episodios de vulvovaginitis (MSP 2005).

El empleo de determinadas técnicas médico quirúrgicas -catéteres, prótesis sobre los que estas levaduras pueden formar biofilms- predisponen al aumento de infecciones por microorganismos oportunistas y resistencia clínica (Tumbarello 2012). Un estudio sobre doscientos setenta y nueve pacientes con lesiones bucales realizado en la Facultad de Odontología (UdelaR) entre 2007-2008 confirmó candidosis oral en cincuenta y un pacientes; sus agentes etiológicos fueron 85,3% *Candida albicans*, la asociación *Candida albicans/Candida glabrata* en un 11,8% de casos, 5,9% *Candida glabrata* y 2,9% *Candida tropicalis* (Casnati 2011).

También son factores predisponentes a infecciones oportunistas el tratamiento con glucocorticoides, citostáticos o radioterapia en pacientes cancerosos (INE 2002).

En neutropenias profundas y prolongadas se producen infecciones sistémicas debidas a los géneros *Candida*, *Aspergillus* y *Mucor* (Fernández 1999). En general los defectos de inmunidad celular predisponen a infecciones recurrentes, diseminadas y graves por microorganismos de crecimiento intracelular, por ejemplo *Histoplasma capsulatum* (Fernández 1999).

La histoplasmosis, de primoinfección pulmonar que deriva en diferentes manifestaciones crónicas, afecta a pacientes en cualquier estado inmune. En Uruguay se ha observado un franco aumento de casos vinculados a pacientes VIH+/SIDA y trasplantados (Calegari 2004); en los pacientes mencionados en primer lugar es de diagnóstico corriente (Torres, V 2012).

Como en las otras situaciones clínicas, el transplante de órganos sólidos predispone a infecciones fúngicas sobre todo por administración previa de esteroides y antibióticos de amplio espectro que modifican la flora normal. En esta situación es frecuente que una infección localizada se transforme en sistémica, o que pueda reactivarse una infección controlada: por ejemplo histoplasmosis. Aún en los meses posteriores al transplante pueden presentarse infecciones por hongos de los géneros *Candida*, *Aspergillus* y

Cryptococcus o algunos otros, tomando como referencia información de países desarrollados (Holzheimer 2002; Neofytos 2010). La infección fúngica en estos pacientes tiene alta mortalidad.

Una primoinfección respiratoria de *Cryptococcus neoformans*, se disemina por vía linfohemática siendo la meningoencefalitis su manifestación clínica más frecuente ya que el agente es neurotrópico. Criptococosis es frecuente en pacientes VIH+/SIDA y receptores de trasplantes (Calegari 2004). Se ha aislado *Cryptococcus gattii* en trabajador rural de montes de eucaliptus (Guirado 2009).

No hay datos epidemiológicos precisos en Uruguay sobre la frecuencia de aspergilosis, de importante prevalencia en pacientes inmunocomprometidos en el hemisferio norte (Calegari 2004; Pfaller 2010), donde no alcanza la prevalencia de infecciones por *Candida* spp. pero es causante de infecciones de particular importancia en pacientes quemados, transplantados de órgano sólido y hematopoyéticos y pacientes con leucemia (García 2008; Neofytos 2010) por su morbilidad y mortalidad. La neutropenia profunda y prolongada y la terapia inmunosupresora por ejemplo en transplantados, son factores predisponentes a aspergilosis invasiva, diseminada y letal. Pero estos hongos también pueden producir reacciones alérgicas, infección localizada en senos paranasales o en cavidades pulmonares -con o sin formación de aspergilomas- en individuos inmunocompetentes por inhalación de esporas. Tienen también otras vías de ingreso, como el oído o heridas traumáticas. Presentan episodios de infecciones nosocomiales.

Los agentes etiológicos de aspergilosis siempre citados en informes epidemiológicos del mundo son: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus terreus*. En Uruguay se confirma *Aspergillus fumigatus* en primer lugar (Fernández 2000).

Durante el proceso asistencial hospitalario, se originan infecciones conocidas como infecciones nosocomiales o intrahospitalarias. Datos del Sistema Nacional de Vigilancia de Infecciones Intra Hospitalarias (SNVIIH) relativos a tres años de estudios (2005-2008) en todo el Sistema Integrado de Salud indican una tasa de 2,7% de infecciones registradas durante o después de la internación, debidas principalmente a agentes etiológicos bacterianos (SNVIIH 2008; Ríos 2010).

La distribución de agentes causales varía -entre otros factores- con las unidades consideradas: la tasa aumenta por ejemplo en unidades de cuidado intensivo o cirugía. Durante enero del 2004 se realizó una investigación en unidades de cuidado intensivo de todo el país, con participación del 85,5% de todas las unidades, nosocomios públicos y privados, involucrando casi tres mil pacientes diarios; registrándose ciento treinta

infecciones nosocomiales y aislándose *Candida* spp en un 5,2% de casos (SNVIIIH 2008; Alborno 2009). Otro agente causal puede ser *Aspergillus* spp. Según SNVIIIH, en particular en nursery de alto riesgo, las infecciones fúngicas se ubican en el 6% del total de casos de infecciones intrahospitalarias (SNVIIIH 2008).

La paracoccidioidomicosis es una micosis sistémica con manifestaciones clínicas predominantemente pulmonares, endémica en Latinoamérica. En Uruguay, los casos registrados de paracoccidioidomicosis han sido en su mayoría en pacientes de sexo masculino cuyo trabajo rural se desenvuelve en bosques autóctonos de costas fluviales; el tabaquismo es un factor de riesgo (Conti Díaz, I 2010). Su frecuencia ha descendido en los últimos años (Calegari 2004). Trabajos publicados y comunicaciones personales proporcionan la información de 1 a 2 casos diagnosticados al año, posiblemente se halle subdiagnosticada (Torres, V 2012).

La esporotricosis es la micosis profunda más frecuente en inmunocompetentes en Uruguay (Calegari 2004), en la mayoría de los casos asociada a cacería de edentados y por ello conocida como “mal de la mulita” (Gezuele 2005), representando una característica epidemiológica única del país (Conti Díaz, IA 1987). *Sporothrix schenckii* es el único agente etiológico de la enfermedad (Conti Díaz, I 2011).

Cromomicosis es una infección dermohipodérmica producidas por hongos dematiáceos. En Uruguay se han detectado los agentes causales *Phialophora verrucosa* y *Fonsecaea pedrosoi* (Calegari 2004).

Feohifomicosis es una micosis profunda con manifestaciones dérmicas, producidas por hongos dematiáceos. De los cuatro casos reportados en los últimos diez años se han observado dos en transplantados renales, uno en transplante de válvula aórtica y otro en una persona aparentemente inmunocompetente (Calegari 2004).

Las cigomicosis por Zygomycetes (géneros *Mucor*, *Absydia*, *Rhizopus* y otros) se registran esporádicamente en nuestro país (Calegari 2004). Es más frecuente en pacientes diabéticos con cetoacidosis (Fernández 1999).

Eumicetomas pueden ser producidos por hongos blancos o negros de los géneros *Acremonium*, *Fusarium*, *Scedosporium*, *Madurella* y otros menos frecuentes en la región (Negroni 2006). En Uruguay la frecuencia de micetomas es rara (Pereyra 1983) y debe considerarse la etiología bacteriana por actinomicetes como más frecuente (Díez

Fernández 1997). *Scedosporium apiospermum* y *Rubromadurella langeroni* fueron aislados en Uruguay en la década del 80 (Conti Díaz, IA 1980).

Entre las múltiples micosis superficiales se destacan por su elevada frecuencia en la consulta médica: dermatofitosis, candidiasis y la malasseziosis denominada pitiriasis versicolor (Conti Díaz, I 2006).

Las levaduras del género *Malassezia* son oportunistas lipofílicas que colonizan la piel con predominancia de distintas especies según la región corporal (Torres, E 2008), principalmente: *Malassezia globosa*, *Malassezia sympodialis* y *Malassezia furfur*. Siendo cosmopolita, su epidemiología varía con el clima y con las características de edad, sexo y raza en los pacientes, debido probablemente a la secreción sebácea en cada caso. Representa el 20% de las micosis superficiales (Ballesté 2000). Un estudio en Uruguay sitúa la colonización por levaduras del género *Malassezia* en 50% a 70 % de las personas con piel clínicamente sana (Calegari 2004). Estas levaduras afectan también enfermos diabéticos y aquellos con alimentación parenteral lipídica, por ejemplo niños prematuros, en los que pueden producir afecciones respiratorias e incluso sistémicas (Ballesté 2000).

Estudios parciales de poblaciones que consultan por lesiones de piel y anexos, indican hongos dermatofíticos con una frecuencia entre 28 y 35% (Calegari 2004) considerando sólo pacientes que se dirigen a la consulta, hecho relevante en una micosis de gran morbilidad universal. Dermatofitosis es el parasitismo de piel y anexos por un grupo de hongos capaces de degradar queratina, denominados dermatofitos. Pertenecen a tres género: *Microsporum*, *Trichophyton* y *Epidermophyton*.

Un estudio realizado por Ballesté et al. entre 1990 y 1997 con doscientos veinte pacientes con dermatofitosis mostró una distribución de los agentes etiológicos de 43,2% *Microsporum canis*, 23,9% *Trichophyton mentagrophytes* seguida por 22,6% *Trichophyton rubrum*, 5,8% de *Epidermophyton floccosum*, 2,6% *Microsporum gypseum* y 1,9% *Trichophyton verrucosum* (Ballesté 2000). Una publicación anterior mostró similar distribución (Caracha 1992).

En un trabajo más reciente del mismo grupo de investigación, se analizan datos epidemiológicos para el género *Trichophyton* solamente. Para las dos variedades de *Trichophyton mentagrophytes* (var. *Interdigitalis*/var. *Mentagrophytes*) o bien considerando la reclasificación de la primera variedad como *Trichophyton interdigitalis*, la relación respecto a *Trichophyton rubrum* es de 86/14 en cien casos del Hospital de Clínicas Dr. Manuel Quintela (Ballesté 2006). Los autores mencionan la utilización de

nuevas pruebas en la identificación, por tanto no se concluye sobre la posibilidad de un verdadero cambio epidemiológico.

Estos datos generales varían mucho en forma relativa si se considera la localización de las lesiones, el sexo o la franja etárea de los pacientes. A modo de ejemplo: El género *Trichophyton* afecta piel lisa, pelo y uñas; *Epydermophyton* sólo piel lisa y raramente uñas; *Microsporum canis* produce casi el 100% de las tiñas ectotrix de cuero cabelludo en el Uruguay acompañado por *Trichophyton verrucosum* y *Trichophyton mentagrophytes* var. *granulosus* (Conti Díaz, I 2006).

La onicomicosis es causada principalmente por dermatofitos y ocasionalmente por mohos no dermatofitos y levaduras. Los agentes *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum* aparecen en primer lugar. *Candida albicans* -aunque también otras especies del género- entre los agentes levaduriformes. También se conocen otras etiologías, por ejemplo *Scopulariopsis* spp. (Basmadján 2002; Conti Díaz, I 2006) o *Fusarium* spp. (Conti Díaz, I 2006) o *Malassezia ovalis* (Conti Díaz, I 2009) o *Penicillium* spp. o *Sporothrix schenkii* (Ballesté 2003).

Entre los patógenos emergentes nuevos para Uruguay se han reportado *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii* restringido sólo a África; *Rhizopus rhizodimorfis*, *Rhizopus microsporus*, *Exserohilum rostratum*, *Aureobasidium pullulans*, *Exophiala dermatitidis*, *Actinomadura madurae* y *Prototeca* spp. (Gezuele 2001).

CAPÍTULO 2

ANTIFÚNGICOS

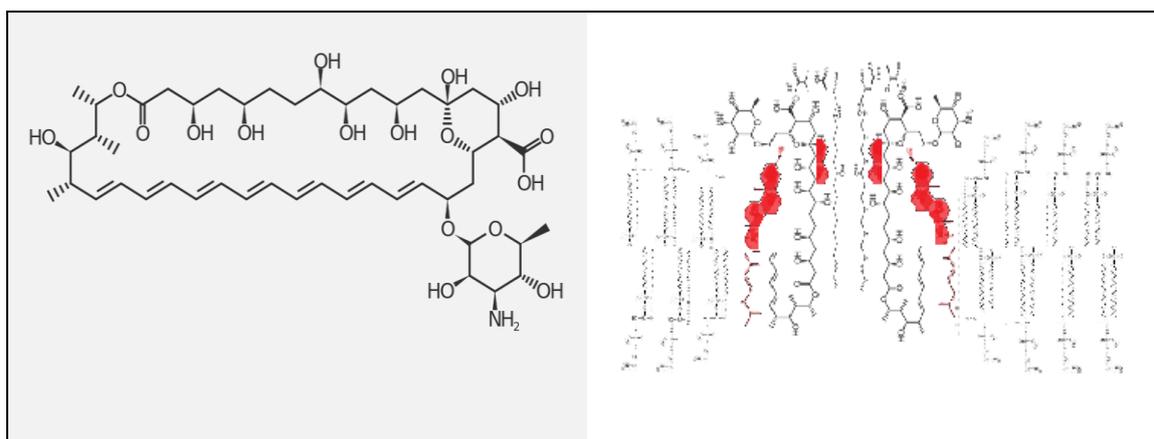
2.1. PRINCIPALES GRUPOS DE COMPUESTOS ANTIFÚNGICOS

Los antifúngicos más relevantes en los que se apoya actualmente la quimioterapia pueden agruparse en función de su modo de acción en la célula fúngica.

2.1.1. MACRÓLIDOS POLIÉNICOS

Anfotericina B, Nistatina

Su mecanismo de acción es la unión a esterol, con mayor afinidad por ergosterol de la membrana plasmática fúngica (Vertut-Croquin 1983), formando poros por los que fugan componentes celulares (Esquema 1). La alteración de la permeabilidad de membrana tiene acción fungicida. La célula fúngica puede adecuarse a una membrana con menos ergosterol para evitar la formación de canales o puede sustituir ergosterol con precursores de su biosíntesis para mantener su integridad; así, algunas cepas de *Candida lusitanae* son relativamente resistentes a Anfotericina B (Brunton 2006). La administración de Anfotericina B en forma posterior a Voriconazol -inhibidor de biosíntesis de ergosterol- reduce la capacidad fungicida del polieno, no así cuando son coadministrados (Lignell 2011), interferencia consistente con el mecanismo propuesto.



Esquema 1. ANFOTERICINA B Se describe un modelo dinámico de 8 pares Anfotericina B-Ergosterol (1:1) en la formación del poro (Dynarowicz-Łątkaa 2005; Cohen 2010; Hirano 2011; Umegawa 2012; Wasko 2012). Su vida media es dos órdenes mayor que el complejo formado con colesterol (Vertut-Croquin 1983; Diezi 2012).

Anfotericina B ha sido llamada *gold standard* porque la resistencia al antifúngico no es habitual; algunas especies resistentes son: *Trichosporon beigeli*, *Aspergillus terreus*, *Pseudallescheria boydii*, *Malassezia furfur*, *Fusarium* spp. y el ya mencionado de *Candida*

lusitaniae (Ellis 2002). Ha mostrado utilidad clínica contra *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii*, *Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Penicillium marneffeii*, *Mucor* spp.

Presenta serios efectos adversos relativos a su administración intravenosa aún en formulaciones oleosas, y toxicidad renal y hepática muy importantes. También puede producir hipotensión, arritmia, anemia y dificultades respiratorias (Ellis 2002; Brunton 2006; Nosanchuk 2006).

Otras limitaciones de Anfotericina B se refieren a aspectos técnicos y farmacocinéticos. Se dispone únicamente de formulaciones para administración intravenosa. Siendo insoluble en agua, existen distintas formulaciones farmacéuticas que forman coloides en medio acuoso, y de acuerdo al diámetro y forma de las dispersiones coloidales se eliminan cantidades variables del fármaco en los filtros de equipos de venoclisis. En su distribución, poca Anfotericina B penetra en el líquido cefaloraquídeo, en humor vítreo y líquido amniótico (Brunton 2006).

Se comercializan cuatro formulaciones a base de Anfotericina B (Tabla 6), con una diferencia de costos de 30-60 veces entre Anfotericina B desoxicolato y las restantes menos nefrotóxicas (Brunton 2006; Nosanchuk 2006), aunque escalofríos y fiebre se dan en el complejo lipídico más que en Anfotericina B desoxicolato y la acumulación de Anfotericina B en hígado y bazo es mayor en Anfotericina B liposomal que en Anfotericina B desoxicolato (Brunton 2006). Anfotericina B liposomal produciría el mínimo de reacciones adversas por perfusión.

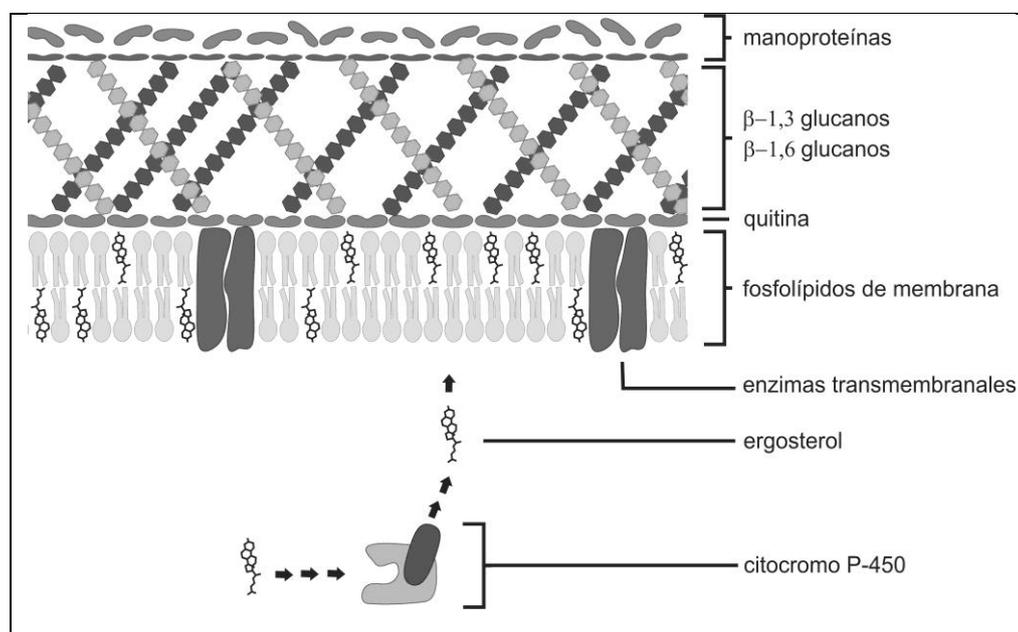
Tabla 6. Formas farmacéuticas de Anfotericina B. En Uruguay, a la fecha se comercializa FUNGIZONE^R de URUFARMA SA y AMBISOME^R de GADOR SA

Anfotericina B desoxicolato (FUNGIZONE ^R)	Anfotericina B y una sal biliar + fosfato sódico
Anfotericina B Complejo Lipídico (ABELCET ^R)	Anfotericina B y dimiristoilfosfatidilcolina + dimiristoilfosfatidilglicerol 7:3
Anfotericina B Dispersión Coloidal (AMPHOTEC ^R , AMPHOCIL ^R)	Anfotericina B y sulfato de colesterilo
Anfotericina B Liposomal (AMBISOME ^R)	Anfotericina B y lecitina de soja deshidrogenada + colesterol + diestearoilfosfatidilglicerol 10:5:4

Existen formulaciones de Anfotericina B al 3% de uso tópico. (Brunton 2006)

biosíntesis de esteroides, en particular aquellas que impiden la formación de zimosterol y obtusifoliol (Casadevall 1998).

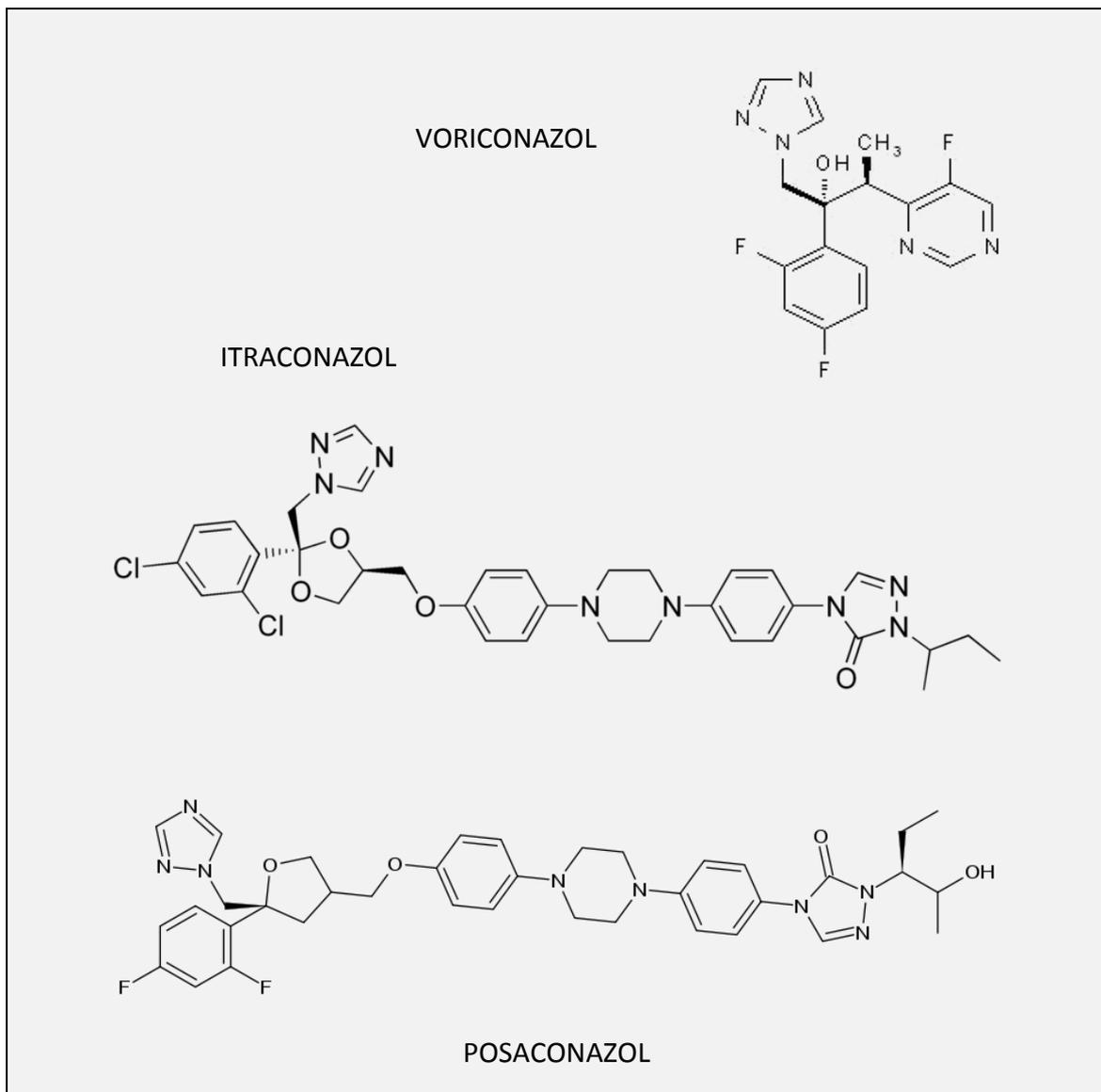
En el género *Candida*, estudiado en profundidad, el mecanismo primario de resistencia a los azoles es la sobreexpresión de la enzima *target* o sitio blanco, el menos significativo, y mutaciones que minimizan la afinidad de la enzima por la droga (Morio F 2010). La resistencia deviene también por la disminución de concentración intracelular de antifúngico por efecto de bombas de eflujo. El aumento en número de distintos transportadores de membrana que expulsan los fármacos permite explicar el fenómeno de resistencia cruzada entre azoles (Pfaller 2012): MDR1 de la superfamilia *Major Family Transporters* (MF) expulsa Fluconazol, CDR1 y CDR2 de *ATP-Binding Cassette* (ABC-transporters) a todos los azoles. Fundamentalmente también la mayor frecuencia de resistencia vista al fluconazol en relación a otros azoles (Odds F 2003). *Candida krusei* es intrínsecamente resistente al fluconazol (Pfaller MA 2002; Sanglard D 2002; Odds F 2003; Lignell A 2011) y *Candida glabrata* se estudia especialmente porque puede presentar sensibilidad, sensibilidad dosis-dependiente o resistencia según está informado (Sanglard D 2002; Sanguinetti M 2005). La célula fúngica también utiliza alternativas de obtención de ergosterol (Sanglard D 2003) y otros esteroides (Casalnuovo 2004) para mantener su proceso de crecimiento. La formación de biofilms es una barrera física para la penetración de antifúngicos, bien documentada en *Candida albicans*, *Candida glabrata* y *Candida dubliniensis* (Sanglard D 2002).



Esquema 3. Pared celular y membrana celular fúngicas

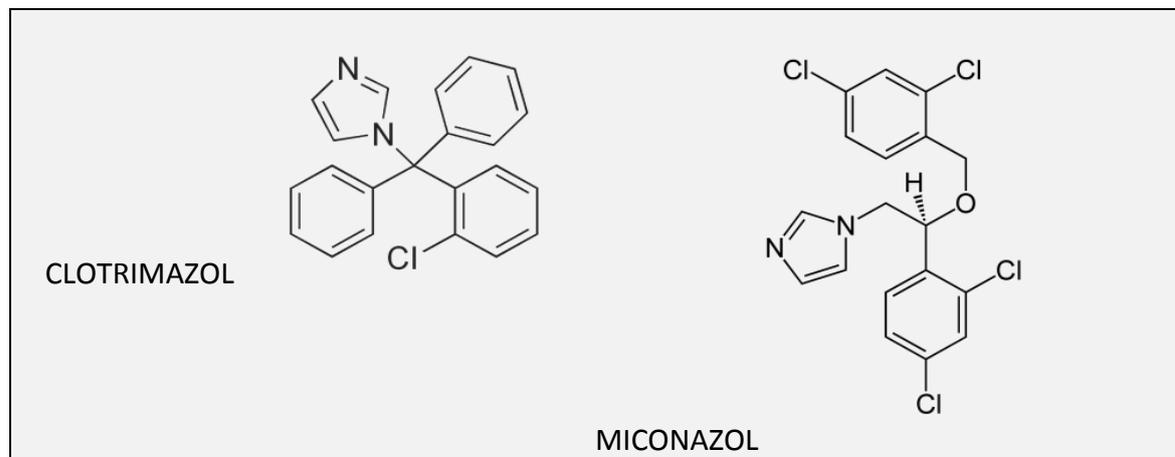
Estos son sólo algunos mecanismos celulares generales de resistencia a los antifúngicos azólicos. Los mecanismos pueden combinarse (White 1997; Sanglard D 2002). También

puede producirse resistencia clínica, es decir que cepas susceptibles *in vitro* a un antifúngico pueden prolongar la infección en el paciente a pesar de la administración habitual del medicamento; un ejemplo es la recidiva de candidiasis cuando el paciente está cateterizado y no se retira o cambia el catéter (Sanglard D 2002). Existe coincidencia en la literatura respecto a la importancia del estado general del paciente y en particular el estado inmunitario en la evolución clínica; ambos interfieren en la correlación de resultados *in vitro* e *in vivo*. Se discute si sería la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) el valor *in vitro* más adecuado para establecer puntos de corte (Pemán J 2003).



Esquema 4. Dos generaciones de triazoles. Los nuevos triazoles, ej. Itraconazol y Posaconazol, son específicos de la enzima *target* fúngica y mejoran aspectos farmacocinéticos, en particular metabolización hepática y prolongación de vida media en sangre (Bellmann 2007).

Triazoles e imidazoles comparten el mismo amplio espectro de acción y mecanismo (Brunton 2006; Gubbins 2009). Esquemas 4 y 5.



Esquema 5. Existen numerosos antifúngicos imidazólicos. Se destacan Clotrimazol de uso tópico y Miconazol de uso tópico y sistémico

El espectro de actividad del Fluconazol incluye *Candida* spp. (excepto *C. krusei*), *Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon* spp., *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis* y *Sporothrix schenckii*. Itraconazole es activo también contra *Aspergillus* spp., y una nueva formulación oral (Hyphanox^R) incluirá candidiasis vaginal, tinea pedis y onicomicosis (Van Minnebruggen 2010). El Voriconazol extiende su actividad a *Fusarium* spp. y *Scedosporium Apiospermum* (Brunton 2006; Van Minnebruggen 2010). Posaconazol ha sido aprobado para profilaxis de aspergilosis y candidiasis en pacientes de alto riesgo, demostró mayor actividad contra Zigomicetes que están fuera del espectro de actividad de los azoles (Van Minnebruggen 2010). Ravuconazol, aún en fase III de investigación, sería útil contra *Candida no albicans* y dermatofitos (Van Minnebruggen 2010). Albaconazol es un potente triazol de amplio espectro destacado por baja toxicidad y excelente farmacocinética (Van Minnebruggen 2010). Pramiconazol, en Fase II, sería útil en infecciones superficiales (Van Minnebruggen 2010). Luliconazol es activo contra levaduras y dermatofitos (Van Minnebruggen 2010). Se investigan Isavuconazol y su prodroga. La lista de nuevos azoles en fases de desarrollo continúa.

Los azoles son más efectivos que los polienos en micosis invasivas como aspergilosis, más potentes y menos tóxicos. Sin embargo, debido a que los azoles afectan enzimas del complejo P450 presentan múltiples interacciones con fármacos que también actúan sobre el complejo, siendo una de sus principales limitaciones (Nosanchuk 2006). Coadministrados con Ketoconazol, Itraconazol o Fluconazol, aumenta la toxicidad de fenitoína, nefrotoxicidad de ciclosporina y sedación por benzodiazepinas, por citar sólo algunos ejemplos (Dismukes 2000). En la coadministración, puede disminuir la

concentración de los azoles debajo de su nivel terapéutico porque disminuye su absorción, por ejemplo con antiácidos o antihistamínicos; también puede darse un aumento de su metabolismo, como en el caso de coadministración con algunos antiepilépticos (Dismukes 2000).

En ausencia de otros medicamentos, los azoles pueden presentar efectos adversos relacionados en general con tratamientos prolongados o de altas dosis: molestias gastrointestinales, hipopotasemia, hipertrigliceridemia, eritema, edema de extremidades inferiores, hipertensión o insuficiencia suprarrenal. Se vincula Fluconazol y Voriconazol a episodios de malformaciones teratogénicas por tanto debe evitarse durante embarazo (Brunton 2006).

Las formulaciones de azoles de uso tópico son eficaces en tratamientos de tiñas corporales, pies, ingule, versicolor y candidiasis cutánea. No tiene uso ocular, bucal o vaginal (Brunton 2006). Sus principios activos son: Clotrimazol, Econazol, Miconazol, Terconazol, Butoconazol, Tioconazol, Oxiconazol, Sulconazol, Sertaconazol.

En la literatura se menciona un segundo modo de acción oxidativo de polienos y azoles, pero los autores no siempre coinciden en este punto (Akins 2005; Carrillo-Muñoz 2006; Catalán 2006).

2.1.3 ALILAMINAS

Terbinafina, Naftifina, Butenafina

Las Alilaminas inhiben la biosíntesis del ergosterol a nivel de la enzima escualenoepoxidasa, con acumulación de escualeno. Altos niveles de escualeno aumentan la permeabilidad de la membrana dando lugar a desorganización celular. Estos compuestos presentan acción fungicida (Akins 2005; Carrillo-Muñoz 2006).

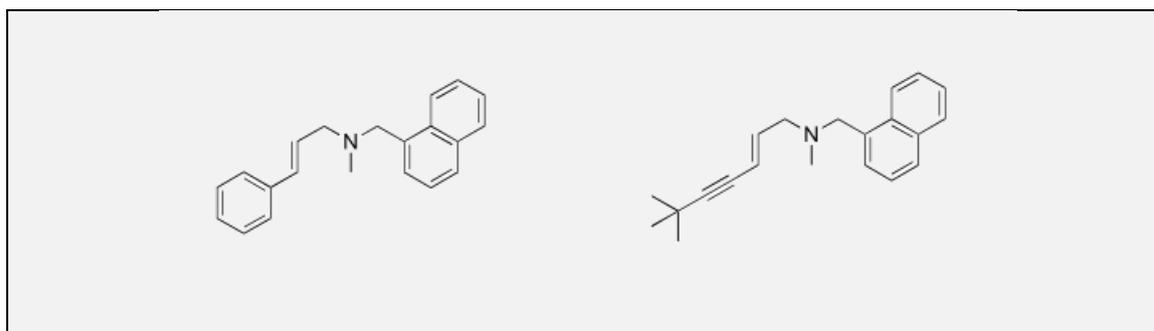
Terbinafina y Naftifina (Esquema 6) son drogas son útiles contra dermatofitos y *Candida albicans*, no sobre la mayoría de especies del género *Candida* (Nowosielski 2011). Actúan también contra *Malassezia* spp., *Cryptococcus neoformans* y hongos productores de micetomas (Brunton 2006). Se ha registrado resistencia por sobre expresión de la enzima en *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* y *Saccharomyces cerevisiae* (Carrillo-Muñoz 2006).

Terbinafina se absorbe bien por vía oral y tópica. Se acumula en piel, uñas y tejido adiposo, persistiendo semanas después de tratamientos prolongados (Brunton 2006). Estas características y su espectro antidermatofítico favorecen su utilización en diversas

tiñas, y es el antimicótico más utilizado en veinte países europeos según datos del año 2007 (Adriaenssens 2010).

Se tolera bien, con baja incidencia de molestias gastrointestinales o cefalea. Está contraindicado en el embarazo. En pacientes con hiperazoemia o insuficiencia hepática no se recomienda. Presenta interacciones medicamentosas: Rifampina disminuye las concentraciones plasmáticas de Terbinafina, y Cimetidina las aumenta (Brunton 2006).

El clorhidrato de Butenafina es de uso tópico. Su actividad antimicótica es similar.



Esquema 6. Naftifina y Terbinafina

2.1.4. EQUINOCANDINAS

Caspofungina, Micafungina, Anidulafungina

Las equinocandinas son lipopéptidos de estructura diversa (Esquema 7) que actúan sobre la enzima β -1,3-D-glucanosintasa inhibiendo la biosíntesis de glucanos de pared celular; la célula resulta vulnerable a lisis osmótica. El grado de polimerización de glucanos en la pared celular y la expresión de la enzima en el microorganismo definen en gran medida el espectro de acción de estos compuestos. Tienen actividad fungicida frente a especies del género *Candida* y fungistática contra *Aspergillus* spp., actividad *in vitro* contra la forma cística de *Pneumocystis jiroveci*, actividad intermedia contra *Cryptococcus neoformans* probablemente debida a su alto porcentaje de glucanos (Nosanchuk 2006), *Fusarium* spp. y *Scedosporium* spp., y contra *Histoplasma capsulatum* en caso de Caspofungina (Denning 2003; Walker 2010). La resistencia es relativamente rara pero mutaciones en “puntos calientes” en la enzima, subunidad Fks1, han sido relacionadas con fallo terapéutico (Van Minnebruggen 2010; Walker 2010). Caspofungina y Micafungina reducen o controlan biofilms intermedios (12 horas) y maduros (5 días) de *Candida albicans* (Espinell-Ingroff 2009).

La agencia americana *Food and Drug Administration* (FDA) ha recomendado el uso de Caspofungina frente a neutropenia, candidiasis y aspergilosis refractarias o por intolerancia a Anfotericina B; Micafungina como profilaxis en candidiasis en trasplantados; Anidulafungina para el tratamiento de candidemia en enfermos no neutropénicos, abscesos intra abdominales y peritonitis candidiásica, y la agencia europea *European Medicines Evaluation Agency* (EMA) aprobó su utilización en candidiasis esofágica (Del Palacio 2008).

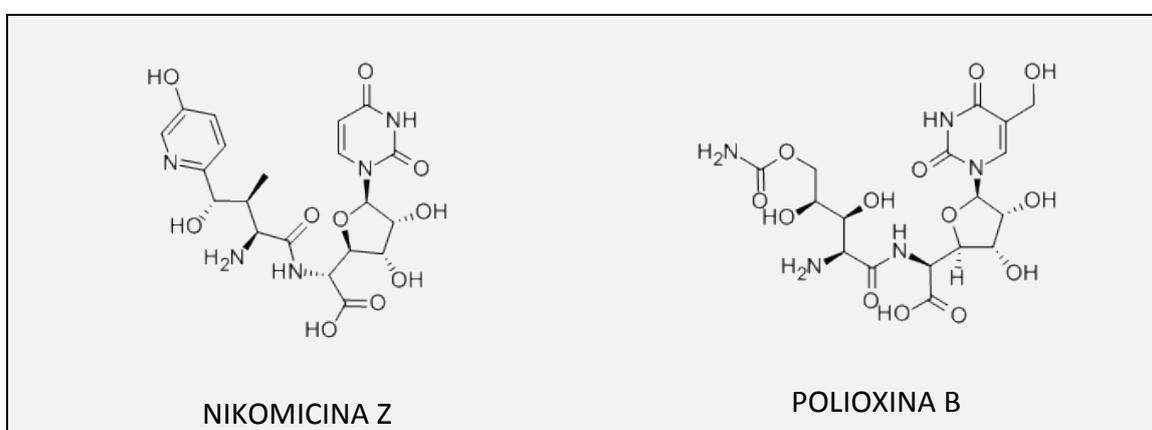
La administración repetida es bien tolerada. Pueden presentar efectos adversos como flebitis y fiebre (Nosanchuk 2006). La única interacción medicamentosa reportada se relaciona con Ciclosporina (Brunton 2006).

Abafungina es una droga promisoría de amplio espectro. Su crema al 1% sería aplicable a candidiasis intertrigo, tineas y pitiriasis versicolor (Van Minnebruggen 2010).

2.1.5. NIKOMICINAS Y POLIOXINAS

Nikomicina Z, Polioxina D

Péptidos como nikomicinas y polioxinas inhiben la enzima quitinsintasa, son análogos a su sustrato y se unen al sitio catalítico, impidiendo la formación de quitina de pared celular. Su acción es fungistática. Nikomicina X y Z son activas contra hongos dimórficos aunque poco activas contra levaduras y hongos filamentosos. Polioxinas muy activas in vitro contra quitinsintasa, muestran una respuesta variable a nivel celular. En particular se ha probado que Polioxina D impide la unión de *Candida albicans* a células epiteliales bucales (De Lucca, A 2000) (Esquema 8). Los compuestos acilureicos también inhiben la enzima pero el mecanismo aún es desconocido (Verwer 2012).



Esquema 8. Nikomicina Z y Polioxina B

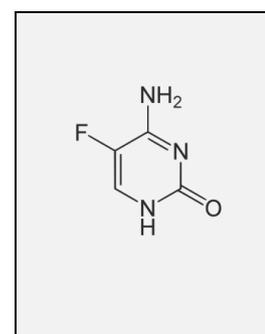
Se ha postulado que la inhibición de la síntesis de un solo componente de la pared celular, quitina o glucano, resulta en un incremento compensatorio del otro componente (Masuoka 2004). La administración de Micafungina y Nikomicina Z es sinérgica, y la muerte celular puede deberse a la inhabilidad del hongo para mantener ambas biosíntesis en manera congruente con cambios diferenciales de radio celular (Verwer 2012). Una prueba de esta propiedad de la combinación es el aumento de supervivencia de ratones con aspergilosis sistémica en el experimento de Luque et al. (Luque 2003).

2.1.6. PIRIMIDINAS

5-Fluorocitosina

5-Fluorocitosina es transportada al interior de la célula fúngica donde es desaminada. El antimetabolito 5-Fluorouracilo inicia una serie de transformaciones para incorporarse al ARN y para producir un inhibidor potente de la enzima sintetasa de timidilato; interfiere mediante estos mecanismos en la síntesis proteica y del ADN. La acción de la 5-Fluorocitosina es selectiva debido a que la desaminación no es posible en células de mamíferos por ausencia o menor concentración de la desaminasa. Un mecanismo de resistencia es la pérdida de la permeasa necesaria para el transporte de la citosina, también la disminución de actividad de otras enzimas asociadas a las rutas mencionadas. Se ha probado resistencia en *Candida albicans* por sustitución de una base en el gen que codifica a la enzima uPRTasa que interviene en la fosforilación del 5-Fluorouracilo para que inicie sus rutas de transformación (Dodgson 2004). Su acción es fungistática (Quindós 2002).

La Flucitosina es activa contra especies de *Candida* y *Aspergillus*, *Cryptococcus neoformans*, hongos dematiáceos de género *Phialophora*, *Cladosporium* (REX 2005) y *Fonsecaea* (Zacchino 2007). Criptococosis es el único caso en que se recomienda de rutina combinado con Anfotericina B (Nosanchuk 2006) o en infecciones por *Candida* spp. difíciles de tratar (peritonitis, meningitis) por su efecto sinérgico (Antoniadoua 2003).



Esquema 9.
5-Fluorocitosina

La monoterapia de 5-fluorocitosina no se aconseja, produce resistencia rápidamente (Nosanchuk 2006). La droga presenta algunos problemas de toxicidad hepática y medular (Nosanchuk 2006).

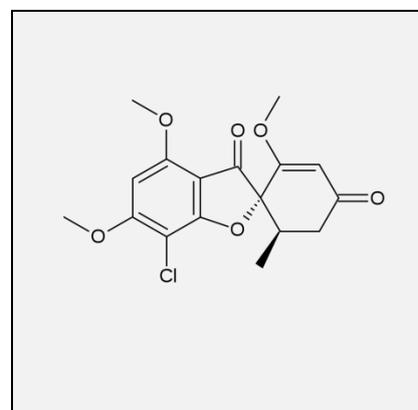
2.1.7. BENZOFURANOS

Griseofulvina

La Griseofulvina actúa desorganizando el huso mitótico e impidiendo la división nuclear (Brunton 2006). Su modo de acción no está del todo establecido: inhibe la polimerización de tubulinas necesaria para la formación de microtúbulos celulares porque se une a estas proteínas; pero esta acción es GTPasa dependiente (David-Pfeuty 1979) a diferencia de compuestos que actúan en forma similar sin esa dependencia, como los alcaloides de la Vinca. También inhibe la síntesis de ácidos nucleicos (Van Minnebruggen 2010).

La Griseofulvina es fungistática contra dermatofitos, ineficaz para tratar micosis subcutáneas (Brunton 2006).

Aplica especialmente en tinea capitis producida por *Microsporum canis* y es bien tolerada por niños; si el agente etiológico fuera *Tricophyton tonsurans* puede utilizarse Terbinafina con eficacia similar (Elewski 2008).



Esquema 10. Griseofulvina

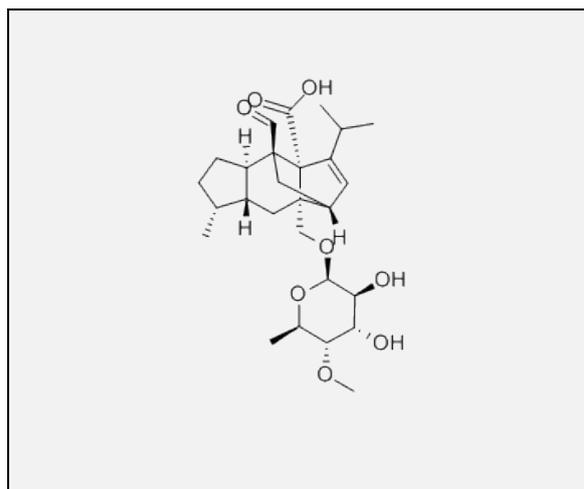
Produce efectos adversos menores como cefaleas, visión borrosa o molestias gastrointestinales, aunque hay casos de efectos hematológicos y hepatotoxicidad (Brunton 2006). Las dosis muy altas del fármaco son carcinógenas y teratógenas en animales de laboratorio (Brunton 2006).

En cuanto a sus interacciones medicamentosas: acelera el metabolismo de la warfarina y puede moderar la eficacia de anticonceptivos orales (Brunton 2006). También se ha reportado interacción con fenobarbital (Develoux 2001).

2.1.8. SORDARINAS

Las sordarinas actúan inhibiendo la síntesis proteica a nivel ribosomal. Estabilizan el complejo formado entre la subunidad ribosomal 80 S y el Factor de Elongación 2 fúngico, enzima que catalisa su translocación sobre el ARNm, impidiendo la elongación del péptido emergente (Soe 2007).

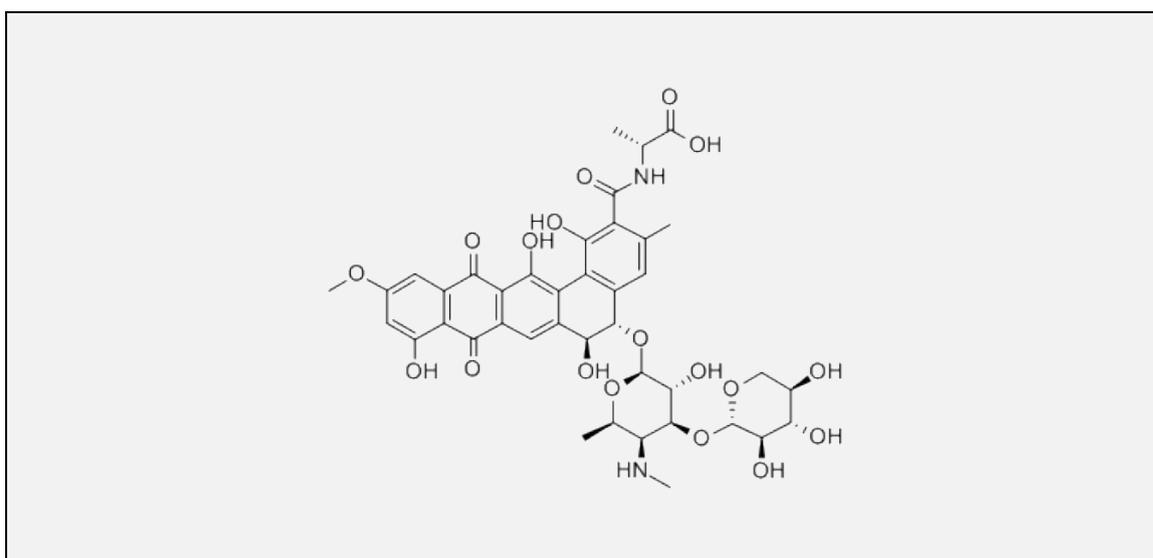
Su espectro de acción incluye excelentes resultados contra levaduras: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Cryptococcus neoformans* (Liang 2008) y otros hongos patógenos *in vitro*. No son activas contra *Aspergillus* spp.



Esquema 11. Sordarina

2.1.9. PRADIMICINAS

Pradimicinas forman parte de un grupo diverso de compuestos cuya bioactividad se explica por unión a azúcares (CBAs: *Carbohydrate-binding Agents*). Reconocen D-manopiranosidos (Nakagawa 2012) de la pared celular fúngica y forman un complejo ternario que incluye al catión calcio y conduce a la pérdida de integridad. Su acción es fungicida *in vitro* (Lackner 2007). Su espectro de actividad incluye *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* y algunas especies del género *Aspergillus*; también es antiviral (HIV) (Balzarini 2007). Pradimicina A (Esquema 12) y Pradimicina S se encuentran en estudio (Wardle 1996; Nakagawa 2012).



Esquema 12. Pradimicina A

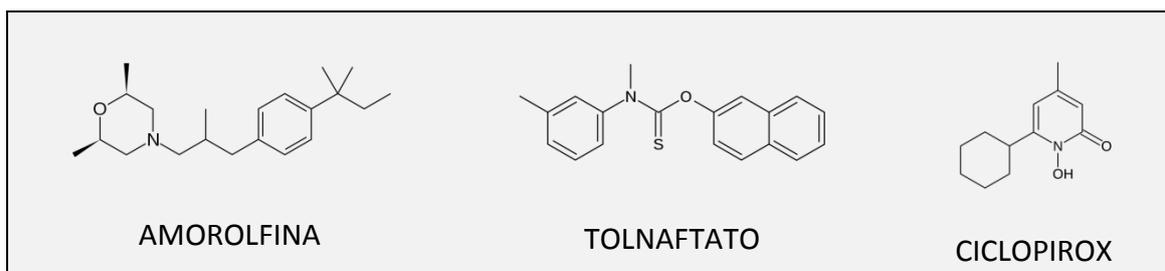
2.1.10. OTROS ANTIMICÓTICOS

Otros antimicóticos de uso local

Los compuestos derivados de la Morfolina, como Amorolfina (Esquema 13), presentan actividad fungistática o fungicida dependiendo de la concentración utilizada. Amorolfina inhibe la biosíntesis del ergosterol a nivel de $\Delta 14$ -reductasa y $\Delta 7$ - $\Delta 8$ -isomerasa, acumulando ignosterol (Polak 2008). El efecto sinérgico natural de inhibición de dos enzimas de la misma vía disminuye la posibilidad de resistencia.

El Tolnaftato (Esquema 13) es un tiocarbamato eficaz en el tratamiento de dermatoficosis y malasseziosis por aplicación local. No hay registros de reacciones tóxicas o alérgicas (Brunton 2006). Es inhibidor de biosíntesis de ergosterol a nivel de escualeno epoxidasa.

Ciclopirox (Esquema 13) presenta gran afinidad por cationes trivalentes, se postula que actúa como quelante frente al férrico intracelular inhibiendo enzimas metalodependientes que son responsables de degradación de peróxidos (Subissi 2010). Es fungicida contra *Candida albicans*, *Epydermophyton floccosum*, *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* y fungistático contra *Malassezia furfur*. Loción y crema se utilizan en candidiosis cutánea y tiñas, su esmalte en onicomycosis, su champú y gel en dermatitis seborreica. Puede producir hipersensibilidad.



Esquema 13. Ejemplos de antimicóticos de uso local

El ácido undecilénico es fungistático o fungicida, dependiendo de la concentración alcanzada, contra algunos hongos dermatofíticos. En particular se aplica en Tinea pedis, pero su eficacia es relativa.

La pomada de Whitfield, compuesta por ácido benzoico y ácido salicílico 2:1, se utiliza en Tinea pedis. Produce irritación.

Algunos fármacos en desarrollo

La Tabla 7 muestra algunos fármacos en desarrollo con mecanismos de acción distintos a los ya citados en todas las drogas antifúngicas mencionadas.

Tabla 7. Ejemplos de fármacos en desarrollo y su mecanismo de acción

Arylamidina T-2307	Diana mitocondrial, mecanismo desconocido.
Análogo de AMBRUTICINA	Osmoregulación. Investigación discontinuada.
Beta aminoácido Icofungipen OXABOROL AN2690	Diana aminoacil-ARNt-sintetasas, bloqueo de síntesis proteica.
PIRIDOBENZIMIDAZOL 75-4590	Diana β -1,6-glucan sintasa.
Anticuerpo monoclonal EFUNGUMAB*	Diana proteína HSP90.

* Casadevall considera que la terapia sérica inicia la tercera era antimicrobiana (Casadevall 2006).

2.2. FÁRMACOS INDICADOS EN LA LITERATURA CIENTÍFICA INTERNACIONAL Y EN EL URUGUAY

La Tabla 8 presenta los fármacos indicados en la literatura científica internacional y en el Uruguay, ordenados por los agentes etiológicos que combaten.

Tabla 8. Agentes etiológicos de enfermedades micóticas y fármacos prescritos

HONGO PATÓGENO	ENFERMEDAD	FÁRMACOS INDICADOS EN LA LITERATURA CIENTÍFICA INTERNACIONAL	¿SE CONFIRMA INDICACIÓN DEL FÁRMACO EN URUGUAY?
<i>Pneumocystis jiroveci</i>	Pneumocitosis	Clotrimazol, Pentamidina, Clindamicina, Atovaquona. Trimetoprim + Sulfametoxazol (Fariñas 2012).	Trimetoprim + Sulfametoxazol o dapsona o pentamidina en caso de intolerancia a sulfas (Cosme 2000).
<i>Candida</i> spp.	Candidiasis invasora o esofágica	Anfotericina B, Fluconazol, Caspofungina (Brunton 2006) (Martínez 2006; Fortún 2011) (Porter, R 2012). En tratamiento de rescate Anfotericina B (Brunton 2006), Anfotericina B complejo lipídico o liposomal (Fortún 2011). Terapia combinada: Anfotericina B o Fluconazol + 5-Fluorocitosina (Martínez 2006). Anfotericina B liposomal, Fluconazol, Caspofungina, Micafungina en pacientes pediátricos (Allen 2010; Groll 2010; UNICEF/WHO 2010), Fluconazol profilaxis en neonatos (Allen 2010).	Anfotericina B , Fluconazol, Itraconazol, Caspofungina (MSP 2012), Voriconazol.

	Candidiasis bucofaríngea	Fluconazol, Itraconazol (Brunton 2006). Nistatina, Clotrimazol (Brunton 2006; Porter, R 2012).	En <i>muguet</i> Bicarbonato de sodio+Nistatina (Conti Díaz 2006).
	Candidiasis vulvovaginal	Nistatina (Brunton 2006)/Clotrimazol , Butoconazol , Miconazol , Fluconazol, Terconazol, Tioconazol (Brunton 2006; Porter, R 2012).	Óvulos de Nistatina o imidazol + Ketoconazol o Itraconazol v/o (Conti Díaz, I 2006). Óvulos y/o cremas azólicas: clotrimazol, miconazol, ketoconazol e isoconazol ; Nistatina en embarazadas ; casos severos Fluconazol o ketoconazol v/o (Muñoz 2005).
	Candidiasis cutánea	Anfotericina B, Ciclopirox (Brunton 2006). Nistatina, Clotrimazol, Econazol , Ketoconazol, Miconazol (Brunton 2006; Porter, R 2012), Naftifina (Porter, R 2012).	Econazol, Ketoconazol (MSP 2012), Borato de sodio 1-2% + azol (Conti Díaz, I 2006).
<i>Histoplasma capsulatum</i>	Histoplasmosis Pulmonar Crónica	Itraconazol (Brunton 2006; Martínez 2006).	Itraconazol (Fernández 1999; Braselli, A. 2000) Ketoconazol (Braselli, A. 2000).
	Histoplasmosis Diseminada	En rápido avance o del SNC: Anfotericina B. Fuera del SNC o mantenimiento en el SIDA: Itraconazol (Brunton 2006). Itraconazol en niños	Anfotericina B, Itraconazol (MSP, DGdS 2012), Ketoconazol

		(Allen 2010).	(Braselli, A. 2000).
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Criptococosis	Sin SIDA o al comienzo: Anfotericina B, Flucitosina (Brunton 2006) (Fortún 2011), Fluconazol (Martínez 2006). Mantenimiento en el SIDA: Fluconazol (Brunton 2006; Fortún 2011), itraconazol (Fortún 2011), Anfotericina B (Martínez 2006). Terapia combinada: Anfotericina B + 5-Fluorocitosina o Fluconazol + 5-Fluorocitosina (Martínez 2006) también en niños (Allen 2010).	Anfotericina B, Fluconazol, Itraconazol (MSP 2012).
<i>Aspergillus</i> spp.	Aspergilosis	Tratamiento inicial Voriconazol, Anfotericina B liposomal (Fortún 2011), Itraconazol (Martínez 2006). En ausencia de problema inmunitario también Itraconazol (Brunton 2006). Tratamiento de rescate: incluir Anfotericina B formulaciones lipídicas, posaconazol, caspofungina, micafungina (Fortún 2011). Terapia combinada: Anfotericina B o Fluconazol + 5-Fluorocitosina (Martínez 2006). Voriconazol, Anfotericina B liposomal en pacientes pediátricos (Groll 2010; UNICEF/WHO 2010). Itraconazol, Caspofungina en niños (Allen 2010).	Anfotericina B, Fluconazol, Itraconazol (Braselli, A. 2000; Dutra 2000; MSP 2012), Voriconazol (Cátedra de Enfermedades Infecciosas 2012). En córnea Natamicina 5% (Conti Díaz, I 2006)

<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Paracoccidioidomycosis	Itraconazol (Martínez 2006; Porter, R 2012), Ketoconazol, Voriconazol (Martínez 2006), Anfotericina B (Porter, R 2012).	Anfotericina B, Itraconazol, Ketoconazol (MSP 2012).
<i>Sporothrix schenckii</i>	Sporotricosis	Cutánea: Itraconazol. Extracutánea: Itraconazol, Anfotericina B (Brunton 2006; Martínez 2006).	Itraconazol, Anfotericina B (MSP 2012).
<i>Phialophora verrucosa</i> o <i>Fonsecaea pedrosoi</i>	Cromomycosis	Fluocitosina (Brunton 2006).	
<i>Exophiala dermatitidis</i> o <i>Exserohilum rostratum</i>	Feohifomicosis	Voriconazol (Martínez 2006; Fariñas 2012), Itraconazol+Terbinafina (Fariñas 2012). Anfotericina B (Martínez 2006).	Itraconazol, Terbinafina, Anfotericina B (MSP 2012).
Zygomycetes: géneros <i>Mucor</i> , <i>Absydia</i> , <i>Rhizopus</i> y otros	Mucormycosis	Anfotericina B (Brunton 2006; Martínez 2006) en formulaciones lipídicas en forma precoz (Fariñas 2012), Posaconazol (Fortún 2011). En tratamiento de rescate Anfotericina B + Caspofungina o Posaconazol (Fariñas 2012). Anfotericina B liposomal para pacientes pediátricos (Groll 2010; UNICEF/WHO 2010).	Anfotericina B, Caspofungina (MSP 2012).
Géneros <i>Madurella</i> , <i>Acremonion</i> , <i>Fusarium</i> y <i>Scedosporium apiospermum</i> - <i>Pseudoallescheria boydii</i> y otros	Eumicetomas Pseudallescheriasis	Anfotericina B y/o Voriconazol o dosis alta de Anfotericina B formulaciones lipídicas en caso de Fusariosis invasiva (Martínez 2006; Fortún 2011; Fariñas 2012). Voriconazol, Posaconazol	Anfotericina B (MSP 2012). En córnea Natamicina 5% (Conti Díaz, I 2006).

		estudios positivos para pacientes pediátricos (Allen 2010; Groll 2010). Voriconazol (Martínez 2006; Fortún 2011), Itraconazol (Brunton 2006), Posaconazol (Fortún 2011; Fariñas 2012). Voriconazol, Posaconazol estudios positivos para pacientes pediátricos (Allen 2010; Groll 2010).	
<i>Malassezia</i> spp.	Malasseziosis	Ketoconazol, Clotrimazol, Terbinafina, Bifonazol, Sulfuro de selenio, Fluconazol, Econazol, Oxiconazol, Sulconazol (Porter, R 2012).	Ketoconazol, Terbinafina, Fluconazol, Econazol (MSP 2012). Fluconazol o Itraconazol + loción imidazólica y ácido bórico (Conti Díaz, I 2006)
Géneros <i>Microsporum</i> , <i>Trichophyton</i> y <i>Epidermophyton</i>	Dermatofitosis	Ciclopirox, Clotrimazol, Butenafina, Terbinafina, Miconazol, Econazol, Ketoconazol, Oxiconazol, Sulconazol, Sertaconazol Tolnaftato (Dermatofitosis), Haloproquina, Naftifina, Terbinafina, Undecilenato, Amorolfina (Tinea unguium), Ciclopirox (Onicomiosis), Violeta de Genciana (Tinea pedis) / Griseofulvina, Itraconazol, Terbinafina (Brunton 2006; Porter, R 2012; WHO 2012).	Griseofulvina, Terbinafina, Ketoconazol, Itraconazol, Econazol, ácido undecilénico y sus sales (MSP 2012). También Clotrimazol, Miconazol, Isoconazol (Conti Díaz, I 2006).

		En principio, excepto tiñas del cuero cabelludo y ungueales, el tratamiento es tópico; salvo tiñas extensas, agudas inflamatorias o crónica de pies (Ferrándiza 2006). En todo otro caso se aconseja administración tópica/oral. Especial consideración merecen los casos de compromiso inmune.	
--	--	---	--

DISPONIBILIDAD DE ANTIMICÓTICOS EN URUGUAY

En la consulta médica y en farmacias comunitarias, se estila orientarse con algunos textos y documentos en línea. La siguiente lista de fármacos antimicóticos y medicamentos que las contienen -solos o en asociaciones- es la sugerida en: Farmanuario 2013, Formulario Terapéutico Nacional (FTN), documentos del Ministerio de Salud Pública (MSP), página del país en documentos internacionales (OPS/OMS) (Tabla 9).

Tabla 9. Principios activos y medicamentos antimicóticos disponibles en Uruguay. Revisión 2013

Ácido undecilénico y sus sales de sodio y zinc	PIECIDEX ^R (LABORATORIOS ANDRÓMACO)
Anfotericina B convencional y liposomal	FUNGIZONE ^R (URUFARMA SA), AMBIZOME ^R (GADOR SA)
Bifonazol	EFA-MYCOL ^R (Antia Moll & Cía. SA)
Caspofungina	CANCIDAS ^R (Compañía Cibeles SA)
Ciclopirox o cliclopiroxolamina	BATRAFEN ^R (Sanofi Aventis), MICOPIROX ^R (Promotora Farmacéutica SRL)
Clotrimazol	CANESTEN ^R (Bayer SA),

	<p>CLOTRIMAZOL CREMA^R (Ivax Uruguay SA),</p> <p>CLOTRIMAZOL PHS^R (Pharmaservice),</p> <p>MICOSEP DEO^R (Promotora Farmacéutica SRL),</p> <p>DIMATEL^R (Brandt Laboratorio del Uruguay SA),</p> <p>QUADRIDERM NF^R (Schering Plough),</p> <p>SADETAB FORTE^R (Gramón-Bagó del Uruguay SA)</p>
Econazol	<p>ECODERMAC^R, NEO RB^R y UÑALITIC^R (Laboratorio Dérmico Farmacéutico),</p> <p>MICOLIS^R (Roemmers SA)</p>
Fluconazol	<p>FLUCONAL^R (URUFARMA SA),</p> <p>FLUCONAZOL ICU^R (Laboratorios Icu-Vita SA),</p> <p>FLUCONAZOL REGUEIRO^R (Laboratorio Regueiro Ltda.),</p> <p>MUTUM^R (Ivax Uruguay SA),</p> <p>SISTEMIC^R (Pharmos)</p>
Griseofulvina	GRISOVIN FP 500 ^R (Antia Moll & Cía. SA)
Isoconazol	ICADEN ^R y SCHERIDERM ^R (Bayer SA)
Itraconazol	ITRAC 100 ^R (Promotora Farmacéutica SRL)
Ketoconazol	<p>ALVIN^R (Sociedad Anónima Fides)</p> <p>ETRUX^R y VIOSOL^R (Laboratorio Celsius SA)</p> <p>FITONAL^R (Laboratorios Andrómaco)</p> <p>KETOCONAZOL^R (Ivax Uruguay SA)</p> <p>KETOCONAZOL LAZAR^R (Lazar SA)</p> <p>KETOLEF^R (Higia SRL)</p>

	<p>MICORALEX^R, TRICOMAX^R, KETOXEL^R, MICROSONAC^R (Promotora Farmacéutica SRL)</p> <p>NIZORAL^R, TRIATOP UD^R (Johnson & Johnson)</p> <p>CLINFOL DUO^R (Laboratorio Nolver SA)</p> <p>EFADERM K y KG^R (Antia Moll & Cía SA)</p>
Miconazol	<p>DAKTARIN^R (Johnson & Johnson),</p> <p>GINPLUS^R (Brandt Laboratorio del Uruguay SA),</p> <p>MACRIL^R (Laboratorios Andrómaco)</p>
Nistatina	<p>MICOSTATIN^R (Urufarma-Bristol Myers Squibb),</p> <p>FLAGYSTATIN^R (Sanofi Aventis),</p> <p>KENACOMB^R (Urufarma-Bristol Myers Squibb),</p> <p>TIAXAL^R (Gramón-Bagó del Uruguay SA)</p>
Terbinafina	<p>LAMISIL^R (Novartis uruguaya/Gramón-Bagó del Uruguay SA),</p> <p>TERBIMAX^R (Sociedad Anónima Fides),</p> <p>TERFENAM^R (Ivax Uruguay SA),</p> <p>TERFIN^R (URUFARMA SA),</p> <p>TERFIREN^R (Farmamedis/EBROMAR),</p> <p>UÑEX^R (Antia Moll y Cía. SA)</p>

CAPÍTULO 3

LA BÚSQUEDA DE NUEVOS ANTIFÚNGICOS: ESTRATEGIAS Y OBJETIVOS

3.1. JUSTIFICACIÓN DE LA BÚSQUEDA DE NUEVOS ANTIFÚNGICOS

Las limitaciones de la quimioterapia antifúngica conocida, el desarrollo de resistencia y la predominancia de diferentes agentes etiológicos en el panorama actual de las infecciones fúngicas, justifican la búsqueda de nuevos antifúngicos (Pauw 2000; Gupta A 2003; Rai M 2003; Spainhour 2005; Kauffman 2006; Sangamwar A 2008; Carlson 2010; Denning 2012).

Estrategias de búsqueda que se argumentan a continuación:

- En la elección de muestras

Palabras clave: *Plantae, Etnobotánica, Biodiversidad*

- En la metodología

Palabras clave: *Búsqueda sistemática*

3.2. LA BÚSQUEDA EN PRODUCTOS NATURALES

Plantas, organismos terrestres y marinos y microorganismos producen metabolitos secundarios bioactivos por razones de defensa, comunicación, competencia o stress; sus variadas estructuras o sus análogos de síntesis o semisíntesis dieron lugar a antifúngicos de gran importancia terapéutica, entre ellos por ejemplo polienos y equinocandinas (Dewick 2002; Wilson R 2006; Newman D 2007; Wetzell S 2010; Vengurlekar S 2012).

En la búsqueda de nuevos antifúngicos, la investigación en productos naturales posee dos fortalezas:

- en el caso particular de los fármacos antimicrobianos (antifúngicos, antibacterianos, antivirales, antiparasitarios) ha constituido su origen principal (Tietze L 2003; Newman D 2007). La revisión de Newman y Cragg correspondiente a 230 drogas antiinfecciosas para el período enero 1981- junio 2006 muestra 29 antifúngicos distribuidos en 22 drogas sintéticas -19 de las cuales están relacionadas (azoles)- y el resto son productos naturales o sus derivados o drogas miméticas de estructuras muy diversas. A este importante aporte químico estructural cabe agregar el conocimiento de la biología fúngica, el relacionamiento de los distintos sistemas biológicos por utilización de organismos genéticamente modificados y la química combinatoria, que constituyen avances en otras direcciones.

- el universo de muestras de origen natural se encuentra apenas explorado dada la gran diversidad de organismos y compuestos (FAO 2008). En el caso particular de las especies vegetales, se presume que menos del 20% poseen información química o biológica registrada en bases de datos científicas (Sati S 2011).

Esta aproximación para la investigación involucra metabolitos secundarios de plantas que se aíslan en cantidades muy pequeñas que además varían con la ubicación geográfica, suelo, factores climáticos, momento de colecta, sanidad vegetal y parte de planta utilizada (Dewick 2002; Rai M 2003; WHO 2007; Alonso Paz E 2009; Barroso 2009; Derita M 2009; Wetzels S 2010). La pérdida acelerada de biodiversidad debido a prácticas agrícolas intensivas e introducción de especies invasivas constituye un problema, se reduce rápidamente el área de bosques naturales aunque existen loables esfuerzos de conservación como la protección de áreas y la formación de consorcios y organizaciones internacionales para la preservación (SNAP 2012; UICN 2012). Se ha demostrado que las plantas poseen varios grupos de compuestos con capacidad antifúngica que pueden ser útiles para el desarrollo de nuevos fármacos, por lo que la pérdida de biodiversidad es la pérdida de oportunidades de investigación farmacéutica. También los extractos vegetales o aceites esenciales pueden utilizarse como materia prima en la fabricación de fitoterápicos, con menor costo y menor tiempo de desarrollo para su colocación en mercado (Bidlack W 2000; Sharapin 2000; Rai M 2003; Comisión Social Consultiva 2004; Mesa A 2004; FUNDAQUIM 2005; Gurib-Fakim 2006; Aladesanmi 2007; Hussain K 2009; ANVISA 2012). Puede resultar difícil el abordaje industrial de la síntesis total de un compuesto de origen natural en caso de estructuras complejas (Avenidaño 2001). Todos estos argumentos hacen necesario todo esfuerzo insitucional y comunitario a favor de la preservación.

En la literatura científica hay revisiones que organizan información de compuestos de origen vegetal con actividad antifúngica, generalmente por grupos de compuestos fitoquímicos. En particular el artículo de Boulogne y colaboradores (Boulogne 2012) analiza resultados de investigación en 1064 plantas de todo el mundo desde 1923 a 2010, resultando 284 compuestos antifúngicos distribuidos en 11 grupos de los que resultan citados habitualmente: compuestos fenólicos (47%), terpenoides (29%) y alcaloides (11%); cabe aclarar que existió cierta preferencia de la comunidad científica respecto al estudio de las familias Fabaceae y Lamiaceae y por la hidrodestilación como método de extracción, potenciando algunos grupos de compuestos sobre otros en el estudio y sesgando la distribución.

Los compuestos fenólicos o polifenólicos pueden interaccionar con sulfhidrilos o formar enlaces de hidrógeno inactivando enzimas de varias vías, poseen otros mecanismos de acción inespecíficos -reacciones radicalarias y formación de complejos- por ello presentan un amplio espectro de propiedades bioactivas; se informó en gran número de

artículos acerca de la actividad antifúngica de ácidos fenólicos, catequinas, flavonoides, cumarinas, quinonas y taninos (Zacchino 1999; López 2006; Lozhkin 2006; Kurdelas 2010). También se informó actividad antifúngica de carbazoles, lignanos y neolignanos, ácidos grasos insaturados, terpenos y terpenoides, saponinas, proteínas y alcaloides (Rai 2003; sunthitikawinsakul 2003; Newman 2007; Saleem 2010; Sortino 2012; Svetaz, L. 2013).

En Facultad de Química (UdelaR) la línea de investigación de actividad antifúngica en plantas que fuera iniciada en la década del '70, con énfasis en alcaloides y glicósidos, aún continúa (Moyna 1975; Salvador 1989; Davyt 1991; González, A 1993; Pasqual 1993; Serafini 1994; Alonso Paz 1995; García 1996; Olano 1996; Soubes 1997; Vázquez 2007; Barneche 2010).

3.2.1. SELECCIÓN DE ESPECIES VEGETALES

La selección de especies vegetales a ser colectada para preparar una biblioteca de extractos vegetales con mayor probabilidad de aciertos en la propiedad buscada, puede realizarse por relaciones taxonómicas, zoofarmacognosia, información etnobotánica, etnofarmacológica o ecológica o puede colectarse al azar. El criterio de selección etnobotánico ha sido el más eficaz según numerosos antecedentes bibliográficos (Verpoorte 2006; Heinrich 2009; Mc Clatcheya 2009; Shelley 2009; Svetaz 2010). Existe profusa literatura regional (Argentina, Brasil, Paraguay, Bolivia) para elaborar una base de datos de especies útiles en la medicina popular, de aplicación particular en casos de infecciones, quemaduras, heridas, picaduras o mordeduras, picazón, manchas o lavados, para hacer más eficiente el hallazgo de antimicrobianos. La curación por plantas forma parte del *modus vivendi* de pueblos de todas las culturas, del nivel primario de salud de los sistemas nacionales y para algunas personas o comunidades es la única solución frente al problema sanitario (WHO 2002; Gurib-Fakim 2006; La Torre-Cuadros 2006; FAO 2008); por ello es tan importante realizar una devolución de resultados de investigaciones científicas que confirme o descarte su utilización (WHO 2000; Calixto 2005; Kartal 2007; Hussain K 2009; Chifa 2011).

3.2.2. ELECCIÓN DE LA ZONA DE ESTUDIO

La elección de la zona de estudio se relaciona con la base de datos anterior y estudios de biodiversidad. El monte nativo posee el 4% de la cobertura vegetal de la República Oriental del Uruguay (Nebel 2004). Los vínculos florísticos sudamericanos y la ubicación confluyente del país, tema de revisión por reconocidos autores, proponen una gran diversidad florística en relación al área territorial y en relación al resto de la Provincia Pampeana (González M 1937; Chebataroff 1960; Lombardo 1964; Legrand 1968; Lombardo 1969; Cabrera A 1973; Grela I 2007; Cracco, Tagliani et al. 2007). Figura 1.

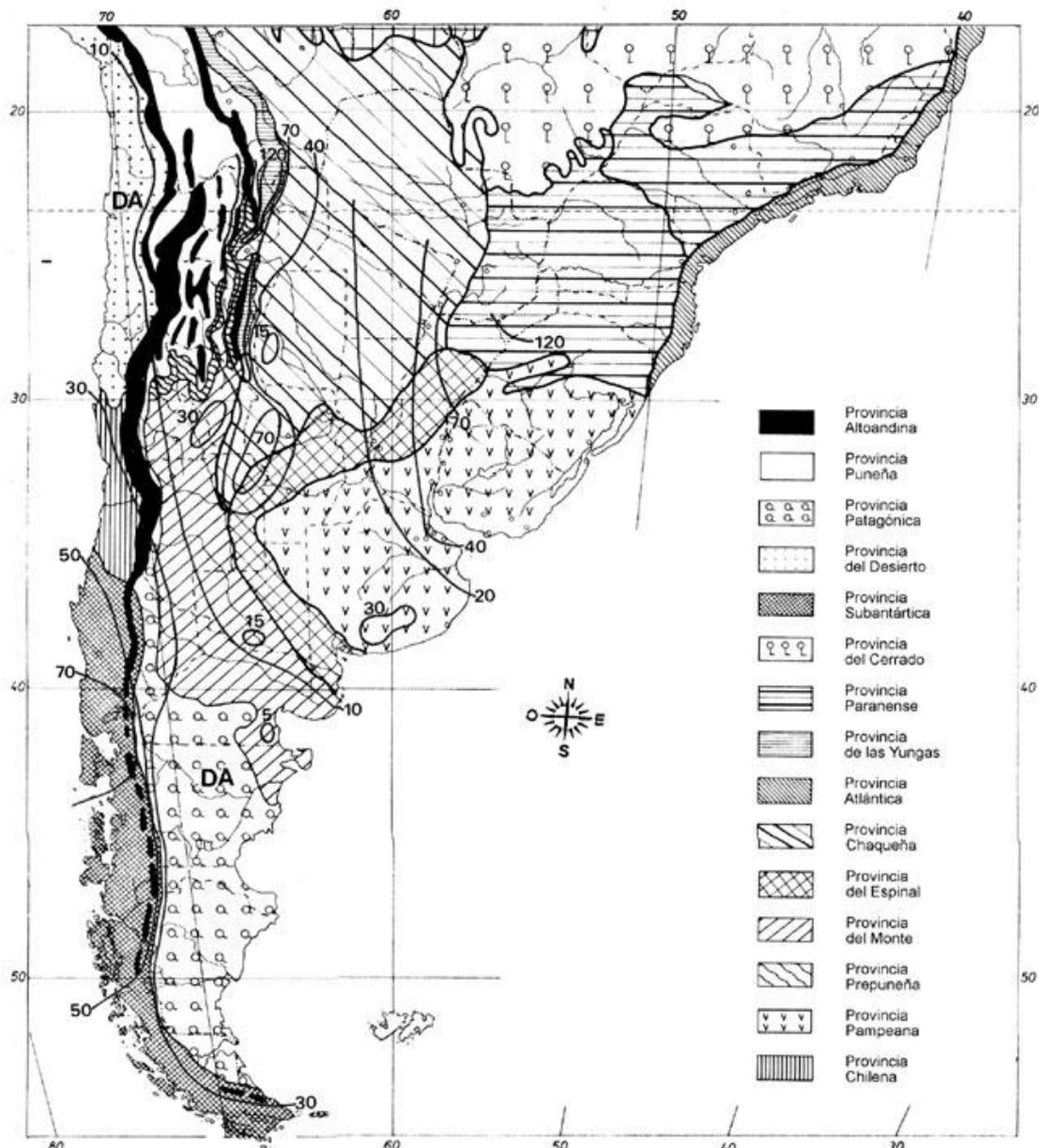


Figura 1. Provincias fitogeográficas de América del Sur meridional según Cabrera & Willinks, 1973. Uruguay recibe influencias florísticas de las provincias vecinas y presenta un nivel importante de biodiversidad en relación al área.

En Uruguay, las especies arbóreas y arbustivas se distribuyen en diferentes formaciones boscosas ligadas a la topografía: bosques asociados a cursos de agua (bosques de galería y bosques ralos del Litoral), bosques asociados a serranías (bosques de cerros, sierras y asperezas, bosques de quebrada y bosques de mares de piedra), bosques asociados a arenales y dunas costeras del Litoral Sur (bosques psamófilos y matorrales espinosos psamófilos)(Carrere 1990; Alonso Paz 2002).

La vegetación que acompaña los cursos de agua se estructura según el gradiente hídrico, con estrato herbáceo conformado por gramíneas, hierbas, helechos, pequeños arbustos y plántulas, estrato alto integrado por árboles con individuos de hasta 20 m, enredaderas y epífitas (Grela I 2007). El bosque ribereño e isleño del río Uruguay y sus afluentes presenta 70 especies arbóreas y 57 especies arbustivas, constituyendo el 50% del total de estas especies en el territorio nacional, y 78 especies de enredaderas que constituyen el 80% del total de especies de enredaderas (Grela 2004).

De acuerdo a las estrategias mencionadas, para el universo de nuestras se opta por una biblioteca de extractos vegetales obtenidos a partir de especies nativas de bosque galería sobre el río Uruguay y sus afluentes, con reportes etnobotánicos asociados a su posible utilización contra infecciones.

3.3. METODOLOGÍA PARA EL CRIBAJE DE LOS EXTRACTOS VEGETALES

3.3.1. ENSAYOS A NIVEL DE MODELOS CELULARES

Acerca de la metodología a emplear para el cribaje de los extractos vegetales por su bioactividad, existe consenso entre los autores respecto a las características generales deseables para su realización: alto rendimiento, que requiera pequeñas cantidades de muestras, técnicamente sencillo, económico, sin ambigüedades en sus resultados, lo suficientemente sensible para no perder potenciales positivos (Albuquerque 2006; Sangamwar 2008). Independientemente de estas características deseables, coexisten dos aproximaciones para la búsqueda de nuevas drogas a partir de plantas: el enfoque reduccionista –un compuesto para un *target*- y el enfoque holístico en el que una medicina tradicional se estudia en un sistema *in vivo*. En este último caso puede darse, por ejemplo, que varios compuestos de un extracto vegetal presenten efectos aditivos o sinérgicos, que el extracto vegetal presente prodrogas, o también que se afecte la solubilidad por interacción entre los compuestos en el metaboloma (Verpoorte 2006), constituyendo ventajas respecto al enfoque reduccionista.

En particular para ensayar la capacidad antifúngica en el sistema biológico fúngico, no existe el mismo nivel de confort respecto a ensayos antibacterianos largamente probados, hay mayor dificultad para estandarizar métodos de investigación en el caso de hongos; así lo prueban las fechas más recientes de sus documentos internacionales: la investigación en hongos está retrasada. Por ejemplo, los protocolos para hongos levaduriformes no aplican para hongos filamentosos, incluso los ensayos para *Candida albicans* pueden no ser apropiados para *Cryptococcus neoformans* siendo ambos levaduras (Ernst 2005). Aún así, es posible elegir ensayos a nivel de modelos celulares (agentes etiológicos) o subcelulares (enzimas, receptores, transportadores, canales iónicos, etc.) para planificar la investigación. En ciertos casos el *target* o diana subcelular no se conoce; en otros se ha resuelto el mecanismo a partir del trabajo a nivel celular, conocimiento igualmente útil pero ya en la etapa posterior de optimización (Terstappen 2007).

La elección por ensayos a nivel de modelos celulares con el propósito de hallar antifúngicos, presenta las siguientes ventajas y desventajas (Albuquerque 2006; Scatton 2009).

Por una parte:

- La investigación en modelos celulares sigue el sentido en que avanza el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos, es decir hacia sistemas de mayor complejidad.
- Se da la posibilidad de que exista multiplicidad y convergencia de modos de acción.
- Las técnicas se amplían: los estudios pueden ser bioquímicos, fisiológicos, morfológicos u otros; brindando comodidad a los investigadores.
- Cuando se trata de muestras complejas como las originadas en productos naturales, es más difícil alcanzar el status de validación para ensayos subcelulares; autores descartan con este argumento la opción de ensayos enzimáticos como orientadores de una bioprospección (Albuquerque 2006).

Por otra parte:

- Cuando se trabaja con modelos celulares existen barreras biológicas que pueden dificultar o impedir el arribo al sitio de acción.
- No adelanta información de mecanismos de acción.
- Se pierden compuestos débilmente activos en el *pool* de compuestos del extracto vegetal.
- Es difícil de automatizar.

La metodología debe atender ciertos requisitos indispensables:

- utilizar cepas fúngicas perfectamente identificadas y sensibles, si es posible de colecciones internacionales,
- utilizar un panel de hongos para investigar selectividad,
- utilizar ensayos estandarizados logrando mayor eficacia y haciendo reproducible la adquisición de datos,
- preparar las muestras en forma adecuada es indispensable por la misma razón anterior,
- incluir controles positivos y negativos.

3.3.2. POSIBLES MÉTODOS DE BÚSQUEDA DE ANTIFÚNGICOS A NIVEL CELULAR

La metodología que habitualmente se utiliza en la investigación de antimicrobianos a nivel de modelos celulares puede agruparse en: ensayos bioautográficos, ensayos de dilución o microdilución y ensayos de difusión en agar. Se trata el tema en forma exhaustiva en textos de microbiología, a continuación un breve resumen comparativo a modo de presentación. Existen métodos que requieren equipo especial - espectrofotométricos y de citometría de flujo- y dispositivos comerciales de fácil utilización -E-test y test colorimétrico, por ejemplo- que no serán considerados por sus costos.

Bioautografía en capa de agar

Base del método: Sobre el cromatograma de una o varias muestras se deposita medio de cultivo inoculado, se incuba en las condiciones y tiempo requeridos por el microorganismo y se observan halos de inhibición directamente o por tinción. Figura 2.

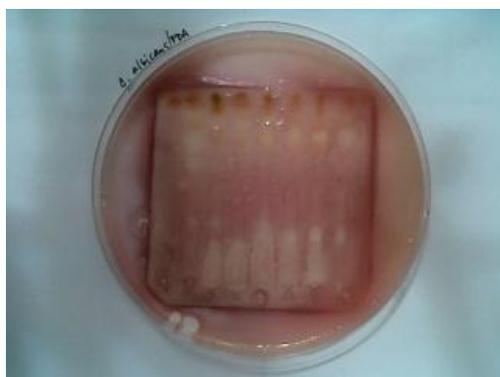


Figura 2. Bioautografía de fracciones de extracto vegetal de *Eugenia repanda* O. Berg con medio de cultivo PDA inoculado con *Candida albicans* ATCC 10231; tinción con INT

Características: Limitado a microorganismos que pueden crecer fácilmente sobre placas cromatográficas. Es importante la remoción de residuos de solventes que pueden impedir el crecimiento microbiano. El material necesario es mínimo. Gran sensibilidad (Rahalison 1994). No es cuantitativo.

Microdilución

Base del método: Gradiente de concentración de una o varias muestras se diluye en caldo de cultivo inoculado en placa estéril de 96 pocillos, se incuba en las condiciones y

tiempo requeridos por el microorganismo. Se detecta crecimiento e inhibición y ambos se relacionan con las respectivas concentraciones. Figura 3.

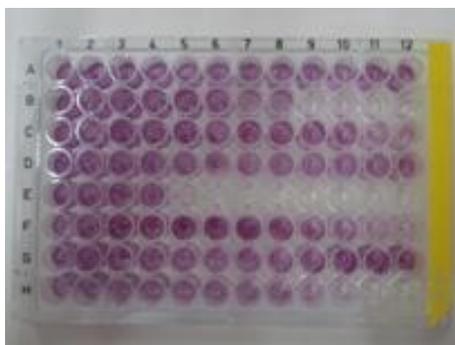


Figura 3. Ensayo de citotoxicidad por Microdilución y tinción con MTT, para fibroblastos normales de piel FF287. Cada fila de la microplaca tiene un extracto vegetal distinto, en gradiente de concentración

Características: Problemas de solubilidad pueden interferir en la lectura. El tamaño del inóculo debe ser medido cuidadosamente para que el método sea reproducible, una pequeña diferencia produce lecturas muy distintas. La detección puede ser visual y existen varios indicadores posibles (Hadacek 2000); si se dispone de equipo adecuado puede relacionarse la concentración de muestra y el porcentaje de inhibición en cada pocillo. La interpretación debe ser cuidadosa considerando que en el caso de hongos se admiten como positivos porcentajes menores al 100% de inhibición (Ghannoum 2004). Con un sencillo paso más en la técnica puede conocerse si la actividad fue biostática o biocida (Cos P 2006). Se ha limitado su utilización a hongos no dimórficos (Ernst 2005). Cuantitativo. Se encuentra estandarizado para la mayoría de los hongos levaduriformes y filamentosos (CLSI 2008; CLSI 2008; EUCAST 2008; EUCAST 2008).

Difusión en agar

Base del método: Reservorios conteniendo muestras en concentración conocida se ponen en contacto con el medio de cultivo inoculado dispuesto en una placa de Petri, se incuban en las condiciones y tiempo requeridos por el microorganismo, se mide el diámetro del halo de inhibición. Figura 4.



Figura 4. Difusión en agar Sabouraud de antifúngicos comerciales y DMSO 1% como control negativo, utilizando cilindros; crecimiento de esporas de *Aspergillus niger* ATCC 2601

Características: Existen diferentes reservorios posibles: discos, cilindros o pozos en el agar. Es crítico el problema de difusión que puede presentar cada sistema. Es el método menos conveniente en caso de muestras no polares (Hadacek 2000). Requiere pequeñas cantidades y puede compararse varias muestras en una misma placa (Cos P 2006). El crecimiento en agar tiene la ventaja de mantener el hongo aislado de sus propios metabolitos, a veces tóxicos, que enrarecen el caldo de cultivo en el método de dilución (Hadacek 2000). Cuantitativo. Se encuentra estandarizado para levaduras y hongos filamentosos no dermatofíticos (CLSI 2009; CLSI 2010).

El rol del ensayo -pre *screening*, *screening*, monitoreo, test secundario- incide en su elección (Vlietinck 2001). Para realizar una selección de ensayos de actividad antifúngica de extractos vegetales que posibilite el cribaje planteado, se tiene en cuenta que: un primer ensayo debería descartar rápidamente aquellas muestras que no poseen actividad antifúngica, un segundo ensayo debería confirmar la eficacia de las muestras que han superado la etapa anterior proveyendo resultados cuantitativos, a posteriori otros ensayos deberían brindar información acerca de modos de acción y mecanismos. La elección de cierta batería de ensayos entre otras, incidirá en el resultado del tamizaje de extractos vegetales y como consecuencia en los candidatos que resulten prometedores (Keserü 2009).

La actividad antifúngica que presenten las muestras debe discriminarse de una actividad citotóxica no específica. Se aconseja la inclusión de una evaluación de citotoxicidad en líneas celulares del huésped, es un criterio importante para determinar selectividad. Si no fuera posible, por lo menos debe ensayarse bioactividad en microorganismos no relacionados -bacterias, parásitos o virus- en forma paralela (Maes 2004; Albuquerque 2006).

3.4. OBJETIVOS

De acuerdo a las estrategias generales mencionadas, se establecen los siguientes objetivos para el presente trabajo de investigación:

3.4.1. OBJETIVO GENERAL DEL PRESENTE TRABAJO

Búsqueda de extractos vegetales de especies del monte nativo uruguayo con actividad antifúngica contra hongos patógenos humanos que afectan a la población en la actualidad.

3.4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Contribuir al conocimiento científico de la biodiversidad y posibilidades de aprovechamiento farmacéutico del monte ribereño del río Uruguay y sus afluentes.
- Colectar plantas e identificarlas.
- Acondicionarlas y preparar sus extractos vegetales para realizar un estudio bioprospectivo.
- Aplicar un set de ensayos sencillos, rápidos y de bajo costo que permitan el cribaje de los extractos vegetales con capacidad antifúngica.
- Completar la información de los extractos vegetales de interés mediante la realización de ensayos de citotoxicidad.
- Completar la información de los extractos vegetales de interés mediante la realización de ensayos fitoquímicos.

CAPÍTULO 4

MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación se describe Materiales y Métodos empleados para el tamizaje de extractos vegetales de plantas colectadas en el bosque galería sobre el río Uruguay y sus afluentes, los ensayos microbiológicos, citotóxicológicos y fitoquímicos realizados.

4. 1. MATERIALES

4.1.1. MATERIAL VEGETAL

Áreas de estudio y fechas de colectas

La colecta de plantas fue realizada en dos zonas del Departamento de Paysandú (ROU):

ÁREA 1 - Diferentes locaciones en áreas linderas al Río Uruguay entre la desembocadura del arroyo Chapicuy y el río Guaviyú y zona de canteras alledañas. Referencia: Estancia “Los Olivos”, Paraje Las Barrancas. Fechas: 6-8 de Abril y 1-2 de Diciembre de 2006.

ÁREA 2 – Entre la confluencia de los ríos Queguay Grande y Queguay Chico y la desembocadura del río Queguay en el río Uruguay. Referencia: Paso de ganado “Andrés Pérez”. Fechas: 29-30 de Marzo de 2008 y 13-15 de Febrero de 2009.

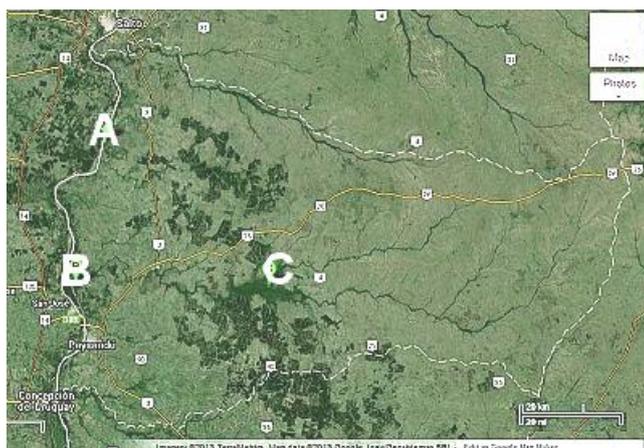


Figura 5. Sitios de colecta en el Departamento de Paysandú (ROU)
Área 1 en el punto A y Área 2 entre puntos B y C

Selección de especies vegetales

Las plantas colectadas fueron seleccionadas de acuerdo a información etnobotánica que relacionara sus especies con el tratamiento de infecciones, heridas o quemaduras (Goyeneche 1906; Copetti 1918; Lombardo 1928; Lombardo 1937; Arrillaga de Maffei 1969; Cabrera 1978; Ratera 1980; Toursarkissian 1980; Jozami 1983; Gupta 1995; Arrillaga de Maffei 1997; Lahitte 1998; Piastri 1998; Alonso 2005; Alonso Paz 2009; Chifa 2011).

En algunos casos se colectaron plantas de especies relacionadas taxonómicamente entre sí o abundantes en el área. Con este fin, se trazaron transectas perpendiculares al cauce principal del río Uruguay, que abarcaron toda la profundidad del monte ribereño hasta la zona de transición y herbácea posterior. Se tomaron puntos cada 20 m sobre las transectas y fueron relevados todos los individuos en un radio de 4 m. Los ejemplares fueron identificados y su circunferencia fue medida a una altura de 1,20 m del suelo.

Todas las plantas fueron identificadas por el Lic. Federico Haretche y un *voucher specimen* de cada ejemplar fue depositado en el *Herbarium* del Museo y Jardín Botánico “Prof. Atilio Lombardo” (MVJB) de la ciudad de Montevideo.

Acondicionamiento y preparación de extractos vegetales

Hojas o partes aéreas de cada planta, en algunos casos corteza (C) o frutos (F) si se especifica, fueron secados en oscuridad a temperatura ambiente sin ventilación. Se realizó una molienda gruesa del material vegetal con molino de martillos.

Cada extracto vegetal se obtuvo a partir de 10 g de material vegetal molido y 100 mL de solvente mediante maceración en frío 48 horas, filtración y reposición del solvente, unificación de extracciones y concentración a vacío en rotoevaporador (IKA HB 05.06 CN) a temperatura menor a 40°C. Concentración final aproximada: 1mg/mL. Los solventes utilizados con el fin de extraer compuestos de distinta polaridad fueron: disolvente 1 diclorometano (HPLC, JTBaker), disolvente 2 acetona (ppa, Dorwil) y disolvente 3 etanol/agua 70:30 a partir de etanol 95° (ANCAP) bidestilado.

4.1.2. MATERIAL DE ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS

Cepas fúngicas y Líneas Celulares

Los ensayos de capacidad antifúngica fueron realizados con las siguientes cepas fúngicas:

Ca : *Candida albicans* ATCC 10231, **Ct**: *Candida tropicalis* C131, **Sc**: *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, **Cn**: *Cryptococcus neoformans* ATCC 32264, **Afu** : *Aspergillus fumigatus* ATCC 26934, **Afl**: *Aspergillus flavus* ATCC 9170, **An**: *Aspergillus niger* ATCC 2601 y ATCC 9029, **Tr**: *Trichophyton rubrum* C 113 y ATCC 28188, **Tm**: *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9972, **Mg**: *Microsporum gypseum* C 115, **Nc** : *Neurospora crassa* ATCC 9279.

Los ensayos de citotoxicidad fueron realizados con cultivos primarios de líneas celulares normales aisladas de tejido humano: fibroblastos de piel FF287 donados por el Departamento de Biología Molecular del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), Madrid, España, y queratinocitos KP#9 de prepucio de paciente del *Hospital Universitário de São Paulo*, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil. Ambas líneas celulares fueron mantenidas en el Banco de Células del Laboratório de Patología, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil.

Antifúngicos

Los antifúngicos utilizados en los ensayos microbiológicos fueron: Anfotericina B, Ketoconazol, Terbinafina (hidrocloruro) y Griseofulvina (Sigma-Aldrich), Caspofungina (acetato) (Merck).

Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados fueron: Potatoe Dextrose Agar (PDA) (Difco), Agar Sabouraud (Difco), Caldo Sabouraud (Difco), Peptona (Difco), Extracto de levadura (Merck), Sacarosa (Merck), Agar (Merck), Medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM)

con 50 U/mL de penicilina y 50 µg/mL de estreptomina (Gibco), Medio de crecimiento de queratinocitos (KGM) (Clonetics).

Colorantes, solventes, complementos

Los colorantes utilizados cuando la tinción resultó necesaria fueron: cloruro de p-iodonitrotetrazolium (INT Violet) (Fluka), cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolium (TTZ) (Sigma-Aldrich), bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) (Sigma-Aldrich).

También fueron utilizados: Dimetilsulfóxido (DMSO) (ppa, JTBaker), alcohol isopropílico (ppa, JTBaker), Tween 80 (DIU), Tripsina 0,1% en PBS-1mM EDTA (ICN Pharmaceuticals Inc), Buffer Fosfato Salino (PBS) (Gibco), Suero Fetal Bovino (SFB) (Gibco), penicilina-estreptomina (Gibco), carbón de 2-12 µm de tamaño de partícula (Sigma-Aldrich).

Otros: Placas cromatográficas de sílica gel 60 (Merck). Microplacas de 96 pocillos (Corning/Costar). Cámara de Neubauer MARIENFELD 06 101. Pipetas automáticas. Material de uso general en laboratorio microbiológico.

Microscopios y Lector de Placas

Microscopios: OLIMPUS CX22 y CELESTRON 44340. Lector de Placas BIOTEK Synergy HT/software Gen5.

4.1.3. MATERIAL DE ENSAYOS FITOQUÍMICOS

Fueron utilizados los siguientes solventes y productos químicos:

- acetona (ppa, Dorwil), metanol (HPLC, JTBaker), acetato de etilo (HPLC, JTBaker), diclorometano (HPLC, JTBaker),
- ácido acético glacial 98% (ppa, Synth), ácido clorhídrico 98% (ppa, Synth), ácido fórmico 85% (ppa, REAGEN), ácido ortofosfórico 85% (ppa, Synth), ácido sulfúrico 98% (ppa, Sicarelli), ácido 3,5-dinitrobenzoico (Sigma-Aldrich), ácido tartárico (Sigma-Aldrich), hidróxido de amonio (téc, BIOPACK), hidróxido de sodio (DIU),

- cloruro de sodio (DIU), cloruro férrico (VETEC), ioduro de potasio (DIU), nitrato de bismuto (Merck), sulfato cúprico (Droguería Paysandú), anilina (Synth), difenilamina (Merck), Fast Blue salt B (Fluka), gelatina (Fleischmann), vainillina (Merck).

Se preparó reactivos reveladores cromatográficos: sulfato cúprico en medio fosfórico, vainillina en medio sulfúrico, Revelador Dragendorff de Munier, Revelador Fast Blue, Revelador de Kedde, Revelador de azúcares reductores (Merck 1976; Wagner 1984).

La Cromatografía en Capa Delgada (CCD) fue realizada en placas de silicagel 60 F₂₅₄ (Merck).

4.2. ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS

Los ensayos microbiológicos utilizados para estudiar actividad antifúngica y citotoxicidad de los extractos vegetales, se aplicaron sobre los extractos vegetales preparados según la descripción de la Sección 4.1.1.

4.2.1. BIOAUTOGRAFÍA EN CAPA DE AGAR (AGAR OVERLAY)

Determinación de la actividad antifúngica por Bioautografía en Capa de Agar de *Candida albicans*

- Las muestras de extractos vegetales fueron sembradas en banda en placa de silica gel en disposición circular, dejando el centro para sembrar los controles: solventes de las muestras (C-) y Ketoconazol (C+). Se dejó ventilar 24 h fuera del laboratorio para eliminar residuos de solventes.

Al día siguiente:

- Se preparó un inóculo de *Candida albicans* ATCC 10231 a partir de cultivo fresco (24 h) y tween 80 0,05%. La concentración se ajustó al tubo N°3 de la escala McFarland, correspondiente a 10^8 ufc/mL de acuerdo al tamaño promedio de la levadura (Sutton 2006).

- Se inoculó Agar Sabouraud 1:100 v/v. En placa de Petri el agar inoculado se depositó sobre la placa de silica gel conteniendo las muestras, de manera que formó una capa delgada (1 mm) al solidificar. Se incubó en cámara húmeda en estufa a 28°C durante 24 h. Se tiñó con INT 0,2% (Saxena 1995), se colocó en estufa 30 minutos para su revelado.

Toda la placa se coloreó en tono rosa-violeta salvo C+ y los extractos vegetales que inhiben el crecimiento del hongo.

Interpretación de resultados: El ensayo se consideró positivo si se observó halo claro.

Determinación de la actividad antifúngica por Bioautografía en Capa de Agar de hongos filamentosos

La Bioautografía en Capa de Agar de hongos filamentosos se realizó en forma similar a la Bioautografía en capa de agar de *Candida albicans*, con las siguientes modificaciones:

- Las placas circulares para sembrar muestras fueron esterilizadas por radiación UV 30 min para evitar contaminación ambiental.
- Se preparó un inóculo de *Aspergillus niger* ATCC 2601 a partir de cultivo fresco con tween 80 0,05%. La concentración de la suspensión fúngica fue 10^6 esp/mL.
- Se incubó 48 h en cámara húmeda a a 28°C.
- No se realizó tinción.

Interpretación de resultados: El ensayo se consideró positivo si se produjo halo de inhibición visible.

Desarrollo de un método para la determinación rápida de la concentración de suspensiones de esporas de *Aspergillus niger*: McFarland revisitado.

El conteo de esporas en cámara de Neubauer resulta lento y tedioso. Con el propósito de hacer rápida y sencilla la determinación de la concentración de suspensiones de *Aspergillus niger* en bioautografías, se diseñó una extensión de la escala McFarland.

Con tal fin se preparó una escala de suspensiones seriadas de carbón -tamaño de partícula correspondiente al tamaño de esporas de *Aspergillus niger* en máxima actividad de agua (10 μ m)- en una solución de tensoactivo no iónico para evitar conglomerados (Sutton 2006). La escala confeccionada con 10 tubos de rosca fue esterilizada y utilizada por simple observación contra luz, en forma similar a la escala de suspensiones de sulfato de bario propuesta por Joseph McFarland en Philadelphia en 1907 para suspensiones bacterianas (McFarland 1907).

- 1) Esporas de *Aspergillus niger* fueron suspendidas en tween 80 0,05%, contadas en cámara de Neubauer y su transmitancia fue medida en Espectrofotómetro 50A-CECIL a una longitud de onda de 590 nm. De igual forma se procedió con masas

crecientes de carbón de 2-12 μm de diámetro de partícula. Los recuentos se realizaron por triplicado. Los resultados fueron correlacionados.

- 2) Para la construcción de la escala *Black* McFarland fueron necesarios 68 g de carbón de 2-12 μm y 100 mL de tween 80 0,05%. Se preparó 50,0 mL de una suspensión stock de concentración 1,360 mg/mL y se practicaron las siguientes diluciones (Tabla 10):

Tabla 10. Preparación de la escala *Black* Mc Farland

ENTRADA	SUSPENSIÓN	V _{suspensión} (ML)	V _{tween} (ML)	V _{total} (ML)	RÓTULO TUBO N°
1	Stock	10,0	0	10,0	20
2	Stock	9,0	1,0	10,0	18
3	Stock	14,0	4,0	18,0	15
4	Stock	6,0	4,0	10,0	12
5	Stock	10,0	10,0	20,0	10
6	Tubo 15	5,0	5,0	10,0	8
7	Tubo 10	10,0	10,0	20,0	5
8	Tubo 5	3,0	6,0	9,0	2
9	Tubo 5	1,0	9,0	10,0	1
10	Tubo 1	1,0	9,0	10,0	0,5

- 3) Tubos con suspensiones problema de *Aspergillus niger* en tween 80 0,05% de concentración 3×10^6 esp/mL, 2×10^6 esp/mL y 4×10^6 esp/mL, fueron comparados con los tubos de la escala de carbón en tween 80 0,05% por 10 observadores.

4.2.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) POR MICRODILUCIÓN

Preparación

- El caldo Sabouraud se preparó al doble de concentración (2xSabouraud).
- Los extractos vegetales se prepararon en soluciones stock de 50 mg/mL en DMSO 1%, se filtraron (0,22 μ m) y se llevaron a 2 mg/mL con caldo 2xSabouraud para los pocillos de primera fila de microplacas.
- De igual forma se procedió con los antifúngicos utilizados como controles, Anfotericina B y ketoconazol. Sus soluciones stock (12,5 mg/mL) en DMSO 1% (Zacchino 2007) se diluyeron a 0,5 mg/mL con caldo 2xSabouraud para los pocillos de primera fila de microplacas.
- A partir de cultivos frescos se preparó una suspensión de cada hongo en tween 80 0,05% :

Para levaduras:

A partir de cultivos frescos se preparó una suspensión inicial de cada levadura en tween 80 0,05% de concentración $1-5 \times 10^6$ ufc/mL por aproximación a Tubo 5 de la escala McFarland y recuento posterior en cámara de Neubauer. Se preparó una suspensión de 5×10^4 ufc/mL para el trabajo en microplacas.

Para hongos filamentosos:

La solución de tween se volcó en cada placa en que crecía la cepa a utilizar y se movió en forma circular suavemente, de modo de desprender esporas y evitar desprendimientos de micelio. Se preparó suspensiones de $1-5 \times 10^6$ esp/mL por turbidez equivalente al Tubo 2 de la escala *Black* McFarland con recuento posterior en cámara de Neubauer. Se preparó una suspensión de 5×10^4 esp/mL para el trabajo en microplacas.

Procedimiento

Se utilizó una microplaca para cada cepa fúngica.

Se reservó la última fila de la microplaca para los siguientes controles:

C_{fúng} - control de crecimiento fúngico, que consistió en caldo 2xSabouraud inoculado y agua destilada estéril, para verificar crecimiento fúngico en ausencia de inhibidores.

C_{ext} - control de cada extracto vegetal, que consistió en soluciones de los extractos vegetales (2 mg/mL) con caldo 2xSabouraud no inoculado, en los que no debería observarse crecimiento por microorganismos endo y/o perifíticos.

C_{est} - control de esterilidad del caldo de cultivo, que consistió en caldo 2xSabouraud y agua destilada estéril, en el que no debería observarse crecimiento.

Todas las soluciones y suspensiones indicadas se distribuyeron en cada microplaca en etapas, siempre en volumen de 100 µL en cada agregado, como se indica en la Figura 5.

Se procedió a incubar todas las placas en cámara húmeda en estufa a 28°C, 24 h para *Candida* spp. y *Saccharomyces cerevisiae*, 48 h para *Aspergillus* spp., 72 h para *Cryptococcus neoformans* y una semana para dermatofitos.

En primer lugar se constató crecimiento en el control C_{fúng} y no crecimiento en los controles C_{ext} y C_{est}; en segundo lugar, para cada serie de concentraciones de un antifúngico o un extracto problema se observó cuál fue el pocillo de menor concentración en el que se visualizó 100% de inhibición fúngica.

Interpretación de resultados: La Concentración Inhibitoria Mínima (CIM₁₀₀) de un extracto vegetal frente a la cepa ensayada se tomó como mínima concentración del mismo que produjo completa inhibición de crecimiento fúngico. NOTA: En el caso de ensayos fúngicos podría trabajarse con CIM₅₀ y CIM₈₀.

(CLSI 2008; CLSI 2008)

PRIMERA ETAPA: soluciones de antifúngicos, extractos vegetales y agua destilada estéril.

AnfB	AnfB	Ket	Ket	Ext A	Ext A	Ext B	Ext B	Ext C	Ext C	Ext D	Ext D
agua	agua	agua	agua	Ext A	Ext A	Ext B	Ext B	Ext C	Ext C	Ext D	Ext D

SEGUNDA ETAPA: caldo 2xSabouraud no inoculado

AnfB	AnfB	Ket	Ket	Ext A	Ext A	Ext B	Ext B	Ext C	Ext C	Ext D	Ext D
agua	agua	C _{est}	C _{est}	C _{Ext A}	C _{Ext A}	C _{Ext B}	C _{Ext B}	C _{Ext C}	C _{Ext C}	C _{Ext D}	C _{Ext D}

TERCERA ETAPA: Caldo 2xSabouraud inoculado en los pocillos restantes

AnfB	AnfB	Ket	Ket	Ext A	Ext A	Ext B	Ext B	Ext C	Ext C	Ext D	Ext D
C _{fúng}	C _{fúng}	C _{est}	C _{est}	C _{Ext A}	C _{Ext A}	C _{Ext B}	C _{Ext B}	C _{Ext C}	C _{Ext C}	C _{Ext D}	C _{Ext D}

CUARTA ETAPA: Dilución al medio, 1ª a 7ª fila.

MICROPLACA FINAL Suspensión fúngica $2,5 \times 10^4$ esp/mL. Concentración ($\mu\text{g/mL}$):

AnfB		Ket		Ext A		Ext B		Ext C		Ext D	
250	250	250	250	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
125	125	125	125	500	500	500	500	500	500	500	500
62	62	62	62	250	250	250	250	250	250	250	250
31	31	31	31	125	125	125	125	125	125	125	125
16	16	16	16	62	62	62	62	62	62	62	62
8	8	8	8	31	31	31	31	31	31	31	31
4	4	4	4	16	16	16	16	16	16	16	16
0	0	0	0	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

Figura 6. Determinación de la CIM por Microdilución

4.2.3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)

Este ensayo se realizó inmediatamente a continuación de la lectura de resultados de cada microplaca de la Sección 4.2.2.

De cada microplaca se retiró 10 μ L del contenido de cada pocillo sin crecimiento fúngico en los pocillos correspondientes a extractos vegetales, y se sembró esa alícuota en tubo inclinado de agar Sabouraud. Como cada serie de diluciones se encuentra duplicada en la placa, este ensayo tuvo también duplicado técnico. Se incubó en cámara húmeda en estufa en las condiciones de temperatura y tiempo requeridas por cada hongo.

Interpretación de los resultados: Se consideró “actividad fungistática” del extracto vegetal si se observó crecimiento fúngico y “actividad fungicida” si no se observó crecimiento fúngico, en cada tubo inclinado al finalizar el tiempo de incubación. Para determinar la Concentración Fungicida Mínima (CFM) del extracto vegetal, se correlacionó estos resultados con las concentraciones de los pocillos de referencia en la microplaca. La mínima concentración de un extracto vegetal que provocó 100% de mortandad celular indicó su CFM para la cepa considerada.

4.2.4. DETERMINACIÓN DEL MODO DE ACCIÓN DE ANTIFÚNGICOS

Los ensayos de segundo orden brindan información acerca del modo de acción del antifúngico. En este trabajo se han considerado dianas específicas de la célula fúngica, que permiten distinguirla de otra célula eucariota. Las principales diferencias radican en la presencia de una pared celular fúngica, el ergosterol como esteroide integrante de membrana celular en la célula fúngica -por ende su ruta biosintética- y un *pool* de enzimas específicas. Teniendo en cuenta además cuáles son los mecanismos de acción de las principales drogas antifúngicas de la actualidad, que se encuentran bien estudiados, se opta por algunos de estos blancos. Esta elección facilita el cribaje de muestras, hay muchas técnicas útiles completamente resueltas, pero deja escapar la posibilidad de encontrar nuevas dianas fúngicas.

En cada ensayo secundario se utilizó por lo menos un antifúngico que además de afectar la cepa considerada actuara por el mecanismo de acción considerado, como control positivo del ensayo.

Ensayos que revelan antifúngicos que afectan la Pared Celular

Ensayo de *Neurospora crassa*

- Se preparó y esterilizó el siguiente medio de cultivo: 0,5% peptona, 0,5% de extracto de levadura, 4% de sacarosa, 1,5% de agar.
- Sobre un cultivo de *Neurospora crassa* ATCC 9279 se agregó 25mL de agua destilada estéril y se rastrilló suavemente para suspender esporas. Se centrifugó 15 min a 3000 rpm y se descartó el sobrenadante. Se preparó una suspensión acuosa del orden de 10^7 esp/mL.
- Se incorporó 25 μ L de la suspensión fúngica a 25 mL de su medio de cultivo fundido (40°C) en placa de Petri de Φ 9 cm.
- Discos de papel de filtro estériles (Φ 5 mm) fueron colocados sobre el agar sólido y en cada uno de ellos fueron vertidos aprox. 100 μ g de extracto vegetal (5-10 μ L de sus soluciones de concentración 12,5 mg/mL en DMSO 1%).

- Se utilizó un disco de papel impregnado con una solución acuosa de Ketoconazol 2% como Control positivo, aunque este antifúngico no actúa por este mecanismo de acción, porque no se disponía del control adecuado.

- Se incubó 24 h, a temperatura ambiente, en presencia de luz.

Interpretación de resultados: Halo moteado por esporas rosa acompañado de cambios morfológicos verificados por observación microscópica sugirió actividad antifúngica por alteración de pared celular, en el resto de la placa el hongo presentó su típico crecimiento aéreo blanco para el medio de cultivo utilizado.

(Kirsch 1986)

Ensayo del sorbitol

- Se dispuso la mitad de una microplaca tal cual se describe para la determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de un extracto vegetal y de ácido gálico, incluyendo controles. El control positivo del mecanismo de acción fue Caspofungina (CAS). En forma similar, el resto de la microplaca se completó con caldo de cultivo conteniendo sorbitol. Por tanto, se debió preparar dos veces las soluciones de trabajo indicadas en la Sección 4.2.2.: “con” y “sin” sorbitol.

- El caldo de cultivo 2xSabouraud con sorbitol se preparó de la siguiente forma:

- a) caldo de cultivo en doble concentración según catálogo, autoclavado,
- b) 29,1 g de sorbitol fueron necesarios por cada 100 mL de caldo 2xSabouraud. Siendo muy soluble en agua, el sorbitol se disolvió en el mínimo volumen de agua destilada estéril, se esterilizó por filtración (0,22 μm) y se agregó al caldo 2xSabouraud homogeneizando con vortex. Se obtuvo caldo 2xSabouraud 1,6 M en sorbitol, ambos al doble de la concentración final en pocillos.

- En microplaca se dispuso el extracto vegetal de interés y ácido gálico (1 mg/mL) ya que presenta reportes de actividad antifúngica por este mecanismo de acción contra levaduras (Silva Junior 2010), Figura 7. Los cuatro pocillos finales fueron controles de esterilidad de las soluciones de sorbitol y ácido gálico: contuvieron 200 μL de caldo de cultivo con sorbitol y 200 μL de la solución de ácido gálico y caldo de cultivo sin sorbitol 1:1; ambos sin inocular.

- Se ensayó una microplaca para *Candida albicans* ATCC 10231, incubando 24 h en cámara húmeda a 37°C. Se realizó tinción con XTT.

- Finalizado el tiempo de incubación y tinción, en primer lugar se revisó controles del ensayo en la última fila de la microplaca: crecimiento fúngico en las dos primeras columnas, sin crecimiento en todas las restantes. En segundo lugar se obtuvo CIM del extracto vegetal para la cepa considerada, con y sin sorbitol, y los valores fueron comparados.

ANF B		CAS		Ext A		ác gálico		Ext A/sorb		ác gál/sorb	
250	250	250	250	1000	1000	500	500	1000	1000	500	500
125	125	125	125	500	500	250	250	500	500	250	250
63	63	63	63	250	250	125	125	250	250	125	125
31	31	31	31	125	125	63	63	125	125	63	63
16	16	16	16	63	63	31	31	63	63	31	31
8	8	8	8	31	31	16	16	31	31	16	16
4	4	4	4	16	16	8	8	16	16	8	8
C _{fúng}	C _{fúng}	C _{est}	C _{est}	C _{ext A}	C _{ext A}			C _{sorb}	C _{sorb}	C _{ác gál}	C _{ác gál}

Figura 7. Modificación del ensayo de Microdilución para comparar valores de CIM con y sin agregado de sorbitol

Interpretación de resultados: El sorbitol 0,8 M actuó como soporte osmótico, permitiendo la supervivencia de un porcentaje mayor de células fúngicas. Por tanto se consideró positivo el ensayo si CIM con sorbitol > CIM, como en el control de ácido gálico. Es un ensayo descrito sólo para levaduras.

(Silva Junior 2010)

Ensayos que revelan antifúngicos que afectan la Membrana Celular

Ensayo de unión a Ergosterol

Se utilizó soluciones de extractos vegetales y suspensión fúngica (*Candida albicans* ATCC 10231) preparadas como se indica en Sección 4.2.2. para determinación de CIM por Microdilución. Se utilizó Anfotericina B (100 µg/mL), como control positivo de este ensayo, ya que su mecanismo de acción consiste en la disrupción de membrana por su unión al ergosterol. Se agregó a la microplaca: control de esterilidad, de solvente (DMSO 1%) y de solución stock de ergosterol (0,5 mg/mL) en DMSO 2% que se esterilizó por filtración (0,22 µm) y se diluyó a concentraciones de 50 µg/mL, 100 µg/mL y 200 µg/mL (E₅₀, E₁₀₀, E₂₀₀).

Procedimiento

En la primera fila de una microplaca se procedió a colocar 200 μL de la solución de Anfotericina B en los tres primeros pocillos y solución del extracto vegetal de interés en el resto; también en los tres últimos pocillos de la microplaca. Todas las demás filas recibieron 100 μL de agua destilada estéril. Se procedió a realizar diluciones al medio.

Se agregó 100 μL de caldo 2xSabouraud inoculado en las filas 1 a 7, y caldo 2x Sabouraud sin inocular en la última fila para formar controles. Ésto sobre el gradiente de concentraciones del antifúngico y del extracto vegetal. Figura 8.

Por último se agregó 40 μL de soluciones de ergosterol sobre todos los pocillos de la primera fila a la penúltima, en sus tres concentraciones E_{50} , E_{100} , E_{200} .

Se ensayó una microplaca para *Candida albicans* ATCC 10231, incubando 24 h en cámara húmeda a 37°C. Se realizó tinción con XTT.

Finalizado el tiempo de incubación y tinción, en primer lugar se revisó controles del ensayo en la última fila de la microplaca: crecimiento fúngico en las dos primeras columnas, sin crecimiento en todas las restantes. En segundo lugar se comparó entre si las tres columnas de Anfotericina B que contienen ergosterol exógeno en distinta concentración. Por último, se realizó la misma lectura en las columnas de extracto vegetal.

Interpretación de resultados: El ergosterol integra la membrana plasmática fúngica y algunos antifúngicos se unen a él formando poros por los que la célula pierde sus componentes, es el caso de polienos como Anfotericina B. Si se suplementa ergosterol, parte del antifúngico o del extracto vegetal -si fuese el caso- se unen al ergosterol disponible fácilmente antes que al ergosterol de membrana. Como consecuencia son necesarios mayores niveles del agente para lograr la misma actividad antifúngica, por tanto el ensayo se consideró positivo si el valor de CIM es menor que el valor de CIM en presencia de ergosterol exógeno.

El ensayo de ergosterol exógeno se encuentra descrito sólo para levaduras.

(Zacchino 2007)

PRIMERA Y SEGUNDA ETAPA - Soluciones y diluciones

Anf B			Ext A			Ext A			Ext A		
100	100	100	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
50	50	50	500	500	500	500	500	500	500	500	500
25	25	25	250	250	250	250	250	250	250	250	250
12	12	12	125	125	125	125	125	125	125	125	125
6	6	6	63	63	63	63	63	63	63	63	63
3	3	3	31	31	31	31	31	31	31	31	31
1	1	1	16	16	16	16	16	16	16	16	16
agua	agua	agua	agua	agua	agua	agua	agua	agua	agua	1000	1000

TERCERA ETAPA - Agregado de caldos

Anf B			Ext A			Ext A			Ext A		
50	50	50	500	500	500	500	500	500	500	500	500
25	25	25	250	250	250	250	250	250	250	250	250
12	12	12	125	125	125	125	125	125	125	125	125
6	6	6	63	63	63	63	63	63	63	63	63
3	3	3	31	31	31	31	31	31	31	31	31
1	1	1	16	16	16	16	16	16	16	16	16
<1	<1	<1	8	8	8	8	8	8	8	8	8
C _{fúng}	C _{fúng}	C _{est}	C _{est}	C _{est}	C _{est}	C _{DMSO}	C _{DMSO}	C _{erg}	C _{erg}	C _{ext A}	C _{ext A}

CUARTA ETAPA - Agregado de soluciones de ergosterol

E ₅₀	E ₁₀₀	E ₂₀₀	E ₅₀	E ₁₀₀	E ₂₀₀	E ₅₀	E ₁₀₀	E ₂₀₀	E ₅₀	E ₁₀₀	E ₂₀₀
C _{fúng}	C _{fúng}	C _{est}	C _{est}	C _{est}	C _{est}	C _{DMSO}	C _{DMSO}	C _{erg}	C _{erg}	C _{ext A}	C _{ext A}

Figura 8. Modificación del ensayo de CIM por Microdilución con agregado de ergosterol

4.2.5. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD

El *Ensayo de viabilidad celular por reducción de MTT* es un ensayo *in vitro* apropiado para estudiar citotoxicidad (Denizot 1986). El método se basa en la actividad enzimática de succinatodeshidrogenasa mitocondrial que transforman sales de tetrazolium hidrosolubles -como el MTT, amarillo- en formazán azul-violeta insoluble en medio acuoso pero soluble en DMSO o isopropanol. Esta actividad enzimática implica vitalidad celular (Mosmann 1983; Denizot 1986).

Una serie de concentraciones de extractos vegetales fue presentada a cultivos celulares de fibroblastos y queratinocitos normales de piel, por el método de microdilución. Se coloreó con MTT y se evaluó viabilidad celular con Lector de Placas espectrofotométrico (Hayon 2003; Brohem 2009).

Se consideraron de interés para realizar este ensayo aquellos extractos vegetales y sus respectivas concentraciones con probada actividad antifúngica, de acuerdo a resultados de Secciones 4.2.2. y 4.2.3.

Preparación

Del Banco de Células se recibió criotubos conteniendo fibroblastos FF287 y queratinocitos KP#9. Habían sido mantenidos en sus respectivos medios de cultivo y crioprotectores a -190°C (N₂ líquido). El caldo de cultivo de fibroblastos fue DMEM suplementado con SFB, ampicilina y estreptomina; el caldo de cultivo de queratinocitos fue KGM suplementado con factores de crecimiento; ambos incluían 30% SFB y 8% DMSO.

Se trasladaron a freezer a -80°C, a -20°C y a 4°C, antes de descongelar.

Los cultivos FF287 y de KP#9 descongelados (aprox. 4 mL) se colocaron en placas de Petri estériles Φ 10 cm, se agregó 10 mL de sus respectivos medios de cultivo y fueron colocados en estufa a 37°C y 5% CO₂ hasta alcanzar una confluencia mínima del 70% verificada con microscopio de luz invertida. Se retiró el sobrenadante por aspiración a vacío y se realizó un lavado con 4 mL de PBSA.

Para desprender fibroblastos y queratinocitos de las placas y desagregar grupos de células se utilizó 1 mL de tripsina, rotando suavemente, se trasvasó a tubos Falcon y se centrifugó a 200 rpm 3 min desechando el sobrenadante.

El pellet de fibroblastos FF287 se resuspendió en caldo DMEM-10%SFB, fue vertido en placa de Petri e incubado en estufa a 37°C y 5% CO₂ hasta confluencia entre 50-80% para permitir crecimiento ideal y mantenimiento del perfil celular. Se realizó nuevamente lavado, tripsinización y homogeneización; se retiró 10 µL de suspensión celular para el recuento de células en cámara de Neubauer. Se repitió esta preparación con el pellet de queratinocitos KP#9 con las únicas modificaciones de utilizar medio KGM y esperar confluencia de 90%.

Finalmente, se preparó una suspensión celular de fibroblastos de 10⁴ cél/mL y otra de queratinocitos de 5x10⁴ cél/mL, por ajuste de concentración con sus respectivos caldos de cultivo.

También fue necesario preparar en forma previa a iniciar los procedimientos:

- Soluciones de DMSO al 2%, 10% y 20%. Se ha reportado que el DMSO no afecta el crecimiento celular si su concentración es menor que 2% (Da Violante 2002), por tanto DMSO 1% en pocillo constituyó un control del solvente de preparación de los extractos vegetales (C_{1%}). En cambio, concentraciones de DMSO del 5% y 10% en pocillo constituyeron controles positivos de inhibición (C_{5%} y C_{10%}). El control de crecimiento celular (C_{cel}) se formó en microplaca con medio de cultivo solamente.
- Soluciones stock de los extractos vegetales de interés de concentración 50 mg/mL en DMSO 1%, se filtraron (0,22 µm) y se llevaron a la concentración de 200 µg/mL momentos antes de ser utilizados.
- Caldos de cultivo estériles DMEM y 2xDMEM con SFB 10% para fibroblastos y KGM y 2xKGM para queratinocitos.
- Una solución de MTT en PBSA de 5 µg/mL para tinción.

Se trabajó en serie para preparar 3 microplacas a la vez de cada extracto -para repetir el ensayo con 24, 48 y 72 h de incubación- según las siguientes descripciones y esquemas para cada tipo celular. Los ensayos se realizaron por triplicado biológico.

Ensayo de citotoxicidad de extractos vegetales en fibroblastos FF287

- Se colocó 200 μL de suspensión celular de 10^4 cél/mL en todos los pocillos de la microplaca. Se incubó 24 h en estufa a 37°C y 5% CO_2 , tiempo necesario para lograr adhesión celular en cada pocillo.
- Transcurrido el lapso de incubación, se aspiró a vacío y se desechó la suspensión celular contenida en los pocillos. De inmediato se procedió a reponer 100 μL de caldo 2xDMEM-SFB 10%.
- Las dos primeras columnas de microplaca recibieron 100 μL de agua destilada estéril, constituyendo el control de crecimiento celular (C_{cel}).
- En cada fila se ubicó un extracto vegetal diferente. En las 11ª y 12ª columnas se colocó 100 μL de la solución de cada extracto vegetal en su mayor concentración de ensayo, obteniéndose así concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ por duplicado.
- Una vez completas las columnas 11ª y 12ª, se procedió a homogeneizar su contenido y a realizar diluciones al medio de derecha a izquierda en la microplaca con pipeta multicanal ($V=100$ mL) de columna 12ª a 4ª entre columnas pares. Idem se trabajó en las columnas impares de 11ª a 3ª. Figura 9.

Se procedió a incubar en estufa a 37°C y 5% CO_2 . El tiempo de incubación 24 h, 48 h, 72h se respetó estrictamente.

NOTA: El mismo ensayo también se realizó con mayor variación de concentración de los extractos vegetales y con tiempos de incubación de 24h, 48h y 72h.

Tinción con MTT: Al retirar cada microplaca de la estufa, se aspiró a vacío el contenido de sus pocillos. En cada pocillo se agregó 200 μL de caldo de cultivo y 20 μL de solución de MTT. Se incubó en estufa a 37°C y 5% CO_2 por 4 h. Se aspiró el contenido de los pocillos y se agregó 200 μL de DMSO para solubilizar el formazán. Después de 10 min de agitación suave, con vortex o Lector de Placas con shaker incorporado, se realizó la lectura espectrofotométrica de microplacas a una longitud de onda de 570 nm.

Interpretación de resultados: Se calculó IC_{50} teniendo en cuenta la absorbancia de controles. IC_{50} es la mínima concentración de extracto vegetal que produce inhibición del 50% de la población celular.

PRIMERA ETAPA: 200 μ L de suspensión celular 10^4 cél/mL en cada pocillo

SEGUNDA ETAPA: 100 μ L de caldo 2xDMEM-SFB 10%

caldo											
caldo											
caldo											
caldo											
caldo											
caldo											
caldo											
caldo											

TERCERA ETAPA: 100 μ L de extractos vegetales de 200 μ g/mL, DMSO 10% y agua

agua	agua									Ext A	Ext A
agua	agua									Ext B	Ext B
agua	agua									Ext C	Ext C
agua	agua									Ext D	Ext D
agua	agua									Ext E	Ext E
agua	agua									Ext F	Ext F
agua	agua									Ext G	Ext G
agua	agua									DMSO	DMSO

CUARTA ETAPA: Diluciones al medio a) columnas 12ª a 4ª, b) idem columnas 11ª a 3ª

MICROPLACA FINAL: Concentración de soluciones de extractos vegetales (μ g/mL) y DMSO (%)

C _{cel}	C _{cel}	6	6	12	12	25	25	50	50	100	100
C _{cel}	C _{cel}	6	6	12	12	25	25	50	50	100	100
C _{cel}	C _{cel}	6	6	12	12	25	25	50	50	100	100
C _{cel}	C _{cel}	6	6	12	12	25	25	50	50	100	100
C _{cel}	C _{cel}	6	6	12	12	25	25	50	50	100	100
C _{cel}	C _{cel}	6	6	12	12	25	25	50	50	100	100
C _{cel}	C _{cel}	6	6	12	12	25	25	50	50	100	100
C _{cel}	C _{cel}	6	6	12	12	25	25	50	50	100	100
C _{cel}	C _{cel}	<1%	<1%	1%	1%	2%	2%	5%	5%	10%	10%

Figura 9. Preparación de microplaca para el ensayo de Citotoxicidad con MTT para fibroblastos FF287

Ensayo de citotoxicidad de extractos vegetales en queratinocitos KP#9

- Se colocó 200 μL de agua destilada estéril en los 4 bordes de la microplaca y 200 μL de suspensión celular de 5×10^4 cél/mL en los restantes 6x10 pocillos. Se incubó 24 h en estufa a 37°C y 5% CO₂, tiempo necesario para lograr adhesión celular en cada pocillo.
- Transcurrido el lapso de incubación, se aspiró a vacío y se desechó la suspensión celular contenida en los pocillos centrales de la microplaca. De inmediato se procedió a reponer en ellos 100 μL de caldo de cultivo.
- Las dos primeras columnas de los 6x10 pocillos centrales con células adheridas recibieron 100 μL de cada control del ensayo, por triplicado.
- En la 3ª columna con células adheridas en la microplaca, se colocó 100 μL de la solución del extracto vegetal en su mayor concentración de ensayo, por sextuplicado. Se repitió con un segundo extracto vegetal.
- Con pipeta multicanal se homogeneizó el contenido de los pocillos centrales en la 3ª columna. Se tomó 100 μL de su contenido (Ext A) para verter en la 4ª columna, se homogeneizó. Se procedió de igual forma en las columnas siguientes hasta finalizar en la 7ª columna, retirando 100 μL que fueron descartados. Se tomó 100 μL del contenido de los pocillos de la 8ª columna (Ext B) para verter en la 9ª columna, se homogeneizó. Se procedió de igual forma en las columnas siguientes hasta finalizar en la 11ª columna, retirando 100 μL que fueron descartados. Figura 10.

Se procedió a incubar las microplacas y teñir con MTT de la misma forma que para el caso de fibroblastos. La lectura e interpretación de resultados fue similar.

PRIMERA ETAPA: 200 μ L de suspensión celular 5×10^4 cél/mL en caldo KGM y 200 μ L de agua

agua											
agua	cél	agua									
agua	cél	agua									
agua	cél	agua									
agua	cél	agua									
agua	cél	agua									
agua	cél	agua									
agua											

SEGUNDA ETAPA: 100 μ L de 2xDMEM-SFB 10%

caldo										
caldo										
caldo										
caldo										
caldo										
caldo										

TERCERA ETAPA: 100 μ L de agua y soluciones DMSO 2%, 10% y 20% (Controles)

agua	10%	caldo								
agua	10%	caldo								
agua	10%	caldo								
2%	20%	caldo								
2%	20%	caldo								
2%	20%	caldo								

CUARTA ETAPA: 100 μ L de extracto vegetal en DMSO 1%, mayor concentración a ensayar

C _{cel}	C _{inh}	Ext A	caldo	caldo	caldo	Ext B	caldo	caldo	caldo
C _{cel}	C _{inh}	Ext A	caldo	caldo	caldo	Ext B	caldo	caldo	caldo
C _{cel}	C _{inh}	Ext A	caldo	caldo	caldo	Ext B	caldo	caldo	caldo
C _{sol}	C _{inh}	Ext A	caldo	caldo	caldo	Ext B	caldo	caldo	caldo
C _{sol}	C _{inh}	Ext A	caldo	caldo	caldo	Ext B	caldo	caldo	caldo
C _{sol}	C _{inh}	Ext A	caldo	caldo	caldo	Ext B	caldo	caldo	caldo

QUINTA ETAPA: Diluciones al medio. i) columnas 3ª a 7ª, ii) columnas 8ª a 11ª

MICROPLACA FINAL: Concentración de soluciones de extractos vegetales (μ g/mL) y controles.

Columnas 4-5-6-7 extracto vegetal A, columnas 8-9-10-11 extracto vegetal B

C _{cel}	C _{inh}	250	125	63	31	250	125	63	31
C _{cel}	C _{inh}	250	125	63	31	250	125	63	31
C _{cel}	C _{inh}	250	125	63	31	250	125	63	31
C _{sol}	C _{inh}	250	125	63	31	250	125	63	31
C _{sol}	C _{inh}	250	125	63	31	250	125	63	31
C _{sol}	C _{inh}	250	125	63	31	250	125	63	31

Figura 10. Preparación de microplacas para el ensayo de Citotoxicidad con MTT para queratinocitos KP#9

4.2.6. SINERGISMO Y ANTAGONISMO

El fraccionamiento de extractos vegetales bioactivos puede conducir a la separación de una o más fracciones bioactivas que no siempre mejoran el espectro de acción o potencia respecto al extracto original; interacciones entre compuestos presentes en dichas fracciones pueden producir efectos de adición o sinergia en el extracto vegetal (Albuquerque 2006). En algunos casos varios compuestos de un mismo grupo contribuyen a la actividad, otras veces compuestos diferentes poseen propiedades similares o bien son funcionales en el mismo sentido (Nwodo 2011; Rasoanaivo 2011).

Preparación

El extracto vegetal de interés, de acuerdo a resultados de Secciones anteriores, fue fraccionado por Cromatografía Líquida de Media Presión (MPLC). Se utilizó un equipo BUCHI C-690 acoplado a colector automático de fracciones C-660. La columna incorporada ($\Phi = 2,6$ cm; $l = 23,0$ cm) se rellenó con sílica ($12 \mu\text{m}$) y se colocó 1,2 g de extracto vegetal (relación aprox. 75:1). El método fue isocrático, fase móvil diclorometano/metanol 95:5 a 3 mL/min. Se colectaron fracciones de $V = 12$ mL que se agruparon en 17 fracciones diferentes de acuerdo a cromatogramas (CCD).

Las fracciones se evaporaron a temperatura ambiente y fueron resuspendidas en 1,0 mL de DMSO 1% y filtradas ($0,22 \mu\text{m}$). Fueron testeadas por Bioautografía en capa de agar contra *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9972. Dos fracciones activas, en adelante f_A y f_B , de perfiles cromatográficos distintos (CCD), fueron ensayadas por Microdilución Bidimensional contra la misma cepa.

Se preparó también:

- una serie de disoluciones de las dos fracciones activas a partir de sus soluciones stock en DMSO 1%, a saber: una dilución al 1/5 y diez sucesivas diluciones al medio utilizando caldo Sabouraud. Nótese que se respetó la razón entre las dos fracciones en el extracto vegetal aunque no se conocieron sus porcentajes en el mismo.
- una suspensión fúngica de concentración 2×10^4 esp/mL de *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9972 a partir de un cultivo de una semana.
- caldo Sabouraud inoculado 100:1 v/v.

(Terbinafina) completamente claro. En segundo lugar se observó la forma que tomó el crecimiento fúngico en la microplaca, Figura 12.

La interpretación se basó en las siguientes posibilidades de interacción entre las fracciones:

- dos fracciones que no interaccionan no modifican sus valores de CIM_A y CIM_B y el crecimiento fúngico visible genera la figura de un rectángulo (caso a),
- si las fracciones son antagónicas, crecen ambos valores de CIM y el rectángulo se desborda (caso b),
- si las fracciones son sinérgicas, disminuyen ambos valores de CIM, el rectángulo pierde forma, retrocede (caso c).

(Ernst 2005)

4.3. ENSAYOS FITOQUÍMICOS

Ensayos de reconocimiento de grupos de compuestos fitoquímicos

Se realizó una marcha fitoquímica utilizando Cromatografía en Capa Delgada (CCD) y dos ensayos en tubo.

Para todos los extractos vegetales, el sistema cromatográfico estuvo constituido por una fase fija de silica gel con las fases móviles y reveladores que se detallan a continuación, desarrollando a temperatura ambiente en cámara cromatográfica saturada:

- a) fase móvil diclorometano/metanol 95:5 o 90:10. Se observó con luz ultravioleta de 254 nm y 360 nm para revelar cumarinas y flavonoides. Positivos: a 254 nm: azul (flavonoides), a 360 nm: amarillo-verde-azul (flavonoides), azul-verde (cumarinas).
- b) fase móvil diclorometano/metanol 95:5 o 90:10. Se reveló utilizando reveladores cromatográficos universales: i) sulfato cúprico en medio fosfórico para observar triterpenos y esteroides, y ii) vainillina en medio sulfúrico para observar terpenoides. Positivo: i) azul-rosa ii) rojo-violeta-azul.
- c) fase móvil diclorometano/metanol 95:5 o 90:10. Los extractos hidroalcohólicos se trataron con cloruro férrico al 2 % en ácido clorhídrico 0,5 N para observar fenoles. Positivo: azul-verde (fenoles), rojo (ácidos hidroxámicos).
- d) fase móvil diclorometano/metanol/hidróxido de amonio 2% 70:30:5 (Soulé 2001). Los extractos hidroalcohólicos se trataron con una solución de difenilamina, anilina y ácido ortofosfórico en acetona (4g: 4mL: 20mL:csp 200mL) para observar azúcares. Positivo: gris verdoso para glucosa y galactosa, púrpura para fructosa, violeta para galactosa, azul-verde para manosa, celeste para arabinosa, marrón en general oligosacáridos (Stahl 1965).
- e) fase móvil diclorometano/metanol/hidróxido de amonio 2% 90:10:1. Se utilizó reactivo de Dragendorff de Munier para revelar alcaloides. Positivo: color naranja-rojo.
- f) fase móvil diclorometano/ metanol/ hidróxido de amonio al 2% 70:30:5. Se utilizó reactivo de Kedde para revelar glicósidos cardiotónicos cardenólidos. Positivo: color azul-violeta.

- g) fase móvil diclorometano/metanol 85:15 para extractos clorofórmicos y acetónicos, y fase móvil acetato de etilo/ácido fórmico/ácido acético glacial/agua 100:11:11:27 para extractos hidroalcohólicos. Se utilizó reactivo Fast Blue para revelar flavonoides. Positivo: azul-violeta.

(Merck 1976; Wagner 1984; Wagner 1996)

Se realizaron dos ensayos en tubo a partir del residuo seco del extracto hidroalcohólico y agua:

- a) agitación vigorosa para observar saponinas. Positivo: espuma.
- b) la solución se trató con cloruro de sodio y gelatina disueltos en agua (10:1 en csp 100 mL) para observar taninos, se utilizó tubo testigo. Positivo: precipitación.

Ensayos analíticos

Se desarrolló un método de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) para diferenciar entre sí extractos vegetales diclorometánicos de cuatro especies del género *Eugenia*, a fin de avanzar en su diferenciación quimiotaxonómica.

Se utilizó un equipo Hewlett Packard HP 1100 con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD).

El método en fase reversa fue isocrático e isoterma (23,0°C): columna LiChroCART (Merck) 125 mm x 4 mm, RP-18 5 μ ; fase móvil metanol/agua 55:45, flujo 0,8 mL/min; λ =254nm-280nm-360nm.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS, DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

5.1. RELEVAMIENTO DE ESPECIES VEGETALES

El relevamiento fue efectuado en la costa del río Uruguay alrededor del punto (31°43'30.00''S, 58°01'43.31''O), Estancia Los Olivos, Paraje Las Barrancas, Paysandú (ROU), los días 6 y 7 de abril de 2006. El área de relevamiento a través de transectas (Sección 4.1.1.) comprendió 50 m de costa por 200 m de profundidad hasta la zona de transición y herbácea posterior. Las plantas fueron identificadas por el Lic. Federico Haretche y fue depositado su *voucher specimen* en el Museo y Jardín Botánico "Atilio Lombardo" (MVJB) de Montevideo. Tabla 11.

Tabla 11. Resultados del relevamiento de especies vegetales sobre la costa del río Uruguay frente al extremo norte de la isla Guaviyú, Departamento de Paysandú, abril 2006.

Nombre científico	Nombre vulgar	Familia botánica
<i>Acacia bonariensis</i> Gillies ex Hook. & Arn.	Espinillo, uña de gato	Fabaceae
<i>Acalypha multicaulis</i> Müll.Arg.	---	Euphorbiaceae
<i>Allophylus edulis</i> (A. St.-Hil., Cambess. & A.Juss.) Radlk.	Chal-chal, picazú, rembiu	Sapindaceae
<i>Blepharocalyx salicifolius</i> (Kunth) O. Berg	Arrayán	Myrtaceae
<i>Calyptocarpus biaristatus</i> (DC.) H. Rob.	---	Asteraceae
<i>Cephalanthus glabratus</i> (Spreng.) K. Schum.	Sarandí colorado	Rubiaceae
<i>Combretum fruticosum</i> (Loefl.) Stuntz	Flor de cepillos	Combretaceae
<i>Croton tenuissimus</i> Baill.	---	Euphorbiaceae
<i>Eugenia mansonii</i> O. Berg	Pitanga amarga	Myrtaceae
<i>Eugenia uniflora</i> L.	Pitanga, Ñangapirí	Myrtaceae
<i>Eugenia uruguayensis</i> Cambess.	Guayabo blanco	Myrtaceae
<i>Galianthe brasiliensis</i> (Spreng.) E. L.Cabral & Bacigalupo	Poaia do campo ^{BR}	Rubiaceae
<i>Guettarda uruguayensis</i> Cham. & Schltldl.	Jazmín del Uruguay, Palo cruz	Rubiaceae
<i>Heliotropium elongatum</i> Hoffm. ex Roem. & Schult.	Hierba del gallo, Borraja de campo	Boraginaceae
<i>Heliotropium procumbens</i> Mill.	---	Boraginaceae
<i>Hexachlamys edulis</i> (O Berg) Kausel & D.Legrand	Ubajay	Myrtaceae
<i>Inga vera</i> Willd. Subsp. <i>affinis</i> (DC.) T.D.Penn	Ingá	Fabaceae
<i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E. Br.	Hierba buena	Verbenaceae
<i>Lonchocarpus nitidus</i> (Vogel) Benth.	Lapachillo	Fabaceae
<i>Luehea divaricata</i> Mart.	Francisco Alvarez, azota caballos, caa obeti	Tiliaceae
<i>Maytenus ilicifolia</i> Mart. Ex Reiss.	Congorosa	Celastraceae

<i>Melanthera latifolia</i> (Gardner) Cabrera	---	Asteraceae
<i>Mitracarpus megapotamicus</i> (Spreng.) Kuntze	Peladilla	Rubiaceae
<i>Morus</i> sp.	---	Moraceae
<i>Myrcianthes cisplatensis</i> (Cambess.) O. Berg	Guayabo colorado	Myrtaceae
<i>Myrsine laetevirens</i> (Mez) Arechav.	Canelón	Myrsinaceae
<i>Nectandra angustifolia</i> (Schrad.) Nees & Mart.	Laurel mini	Lauraceae
<i>Paullinia elegans</i> Cambess	Cipó-timbó	Sapindaceae
<i>Pavonia sepium</i> A. St.-Hil.	Malva del bosque	Malvaceae
<i>Petunia</i> sp	Petunia	Solanaceae
<i>Phyllanthus sellowianus</i> (Klotzsch) Müll. Arg.	Sarandí Blanco	Phyllantaceae
<i>Poecilanthe parviflora</i> Benth.	Lapachillo	Fabaceae
<i>Pouteria gardneriana</i> (A. DC.) Radlk.	Mata Ojo colorado, Aguay	Sapotaceae
<i>Pouteria salicifolia</i> (Spreng.) Radlk.	Mata Ojo	Sapotaceae
<i>Psychotria carthagenensis</i> Jacq.	Naranjillo, chal-chal de gallina	Rubiaceae
<i>Ruprechtia laxiflora</i> Meisn.	Viraró cresco	Polygonaceae
<i>Ruprechtia salicifolia</i> (Cham. & Schltl.) C.A. Mey	Viraró	Polygonaceae
<i>Salix humboldtiana</i> Willd.	Sauce criollo	Salicaceae
<i>Sapium haemospermum</i> Müll. Arg.	Curupí, Lecherón	Euphorbiaceae
<i>Scutia buxifolia</i> Reissek	Coronilla	Rhamnaceae
<i>Sebastiania commersoniana</i> (Baill.) L.B. Sm. & Downs	Blanquillo	Euphorbiaceae
<i>Smilax campestris</i> Griseb.	Zarzaparrilla blanca	Smilacaceae
<i>Solanum boerhaviifolium</i> Sendtn	Jazmín	Solanaceae
<i>Terminalia australis</i> Cambess.	Palo amarillo	Combretaceae
<i>Teucrium vesicarium</i> Mill.	---	Lamiaceae
<i>Xylosma</i> sp. N.E. Br.	---	Flacourtiaceae

El listado incluye 43 especies de 22 familias botánicas, un conjunto vegetal de pocos individuos de un gran número de especies si se toma como referencia el total de géneros y especies de la zona (Sección 3.2.2). Con excepción de *Morus* sp. todas las especies son nativas, es decir naturales del territorio; se conocen dos especies americanas del género *Morus* pero fueron descartadas en el proceso de identificación (comunicación personal del Lic. F. Haretche). No hubo representación de géneros considerados endémicos, aquellos cuya área de distribución se encuentra enteramente en Uruguay o por lo menos en el distrito fitogeográfico uruguayense.

De las especies estudiadas, hay algunas de distribución amplia en el Uruguay: *Acacia bonariensis* Gillies ex Hook. & Arn., *Allophylus edulis* (A. St.-Hil., Cambess. & A.Juss.) Radlk., *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg, *Eugenia uruguayensis* Cambess.,

Guettarda uruguensis Cham. & Schldl., *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss., *Myrcianthes cisplatensis* (Cambess.) O. Berg, *Myrsine laetevirens* (Mez) Arechav., *Phyllanthus sellowianus* (Klotzsch) Müll. Arg., *Pouteria salicifolia* (Spreng.) Radlk., *Salix humboldtiana* Willd., *Scutia buxifolia* Reissek, *Sebastiania commersoniana* (Baill.) L.B. Sm. & Downs; incluso una especie de amplia distribución en América del Sur, *Pouteria gardneriana* (A. DC.) Radlk., registrada desde la Caatinga brasileña al Piedemonte andino argentino.



Se relevó especies indicadas en las floras occidental y oriental del país, probablemente originarias de la flora oriental y trasladadas por ríos como el Negro y el Arapey (Figura 13): *Eugenia uniflora* L., *Luehea divaricata* Mart. & Zucc., *Psychotria carthagenensis* Jacq., *Ruprechtia laxiflora* Meisn., *Salix humboldtiana* Willd., *Scutia buxifolia* Reissek, *Sebastiania commersoniana* (Baill.) L.B. Sm. & Downs.

Figura 13. Chebataroff (1942) ya se refirió a las diferencias Este/Oeste de la vegetación uruguaya; Grela (2004) planteó núcleos disjuntos de flora occidental y oriental basado en estudios taxonómico-genéticos.

Un pequeño grupo de especies no pertenecen a las floras occidental u oriental, conecta ambas floras a través de la cuenca del río Cuareim; entre ellas *Gleditsia amorphoides* (Griseb.) Taub. fue colectada *a posteriori* del presente relevamiento (Grela 2004). Figuras 14.



Figura 14. *Gleditsia amorphoides* (Griseb.) Taub. o "Espina corona" (Cristina Olivaro)

Entre las restantes, se relevó cinco especies denominadas exclusivas de la flora occidental: *Combretum fruticosum* (Loefl.) Stuntz, *Hexachlamys edulis* (O. Berg) Kausel & D.Legrand, *Lonchocarpus nitidus* (Vogel) Benth., *Inga vera* Willd. Subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn, *Poecilanthe parviflora* Benth. Por otro lado, la especie *Phyllanthus sellowianus* (Klotzsch) Müll. Arg. está presente en este relevamiento y es considerada rara o poco representada en las colecciones.

El núcleo norteño de la flora occidental comprende los Departamentos de Artigas, Salto y parte de Paysandú, precisamente hasta el río Guaviyú que ha sido el límite norte del área de trabajo de la presente investigación. Especies características del núcleo norte no fueron relevadas en esta oportunidad (en las colectas posteriores se obtuvo sólo *Eugenia repanda* O. Berg.), tampoco especies características del núcleo sur delimitado por el río Negro hasta la playa La Agraciada.

5.2. PLANTAS COLECTADAS Y TAMIZAJE POR BIOAUTOGRAFÍA EN CAPA DE AGAR

Cuatro colectas de plantas del bosque ribereño del río Uruguay y sus afluentes fueron realizadas en el Departamento de Paysandú (ROU). Las dos primeras colectas coinciden con el área de relevamiento anterior, costa del río Uruguay en la Estancia Los Olivos frente al extremo norte de la isla Guaviyú (Área 1). Tercera y cuarta colectas fueron realizadas en el área comprendida entre los ríos Queguay Grande y Queguay Chico -Paso Andrés Pérez- y la desembocadura del Queguay en el río Uruguay (Área 2). Figura 15.



Figura 15. Bosque ribereño del río Queguay (Juan Bertucci)

De las plantas colectadas, sólo una parte poseía información de su posible uso popular, Tabla 12 (Goyeneche 1906; Copetti 1918; Lombardo 1928; Lombardo 1937; Arrillaga de Maffei 1969; Cabrera 1978; Ratera 1980; Toursarkissian 1980; Jozami 1983; De Lucca, D 1992; Gupta 1995; Arrillaga de Maffei 1997; Alonso 1998; Lahitte 1998; Chifa 2001; Alonso 2005; Alonso Paz 2009; Chifa 2011).

Tabla 12. Listado de especies cuyas plantas fueron colectadas y su información etnobotánica y etnofarmacológica

NOMBRE CIENTÍFICO	FAMÍLIA BOTÁNICA	NOMBRE VULGAR	INFORMACIÓN ETNOBOTÁNICA O ETNOFARMACOLÓGICA	ÁREA Y FECHA DE COLECTA
<i>Acacia bonariensis</i> Gillies ex Hook. & Arn.	Fabaceae	Espinillo, uña de gato	Infusión de hojas como astringente y vulnerario. Infusión de corteza como cicatrizante.	Área 2 Mar 2008
<i>Acalypha gracilis</i> Spreng.	Euphorbiaceae	Flor de espiga chica	No se encontró en las fuentes citadas.	Área 2 Mar 2008
<i>Allophylus edulis</i> (A. St.-Hil., Cambess. & A.Juss.) Radlk.	Sapindaceae	Chal-chal, picazú, rembiu	Decocción de raíz o corteza como febrífugo y diaforético. Infusión de hojas como amargo y astringente. Fermentado de frutos como laxante y depurativo.	Área 2 Mar 2008
<i>Arrabidaea seloi</i> (Spreng.) Sandwith	Bignoniaceae	Cipó-camarão ^{BR}	Ornamental. Decocción de hojas como antiinflamatorio y antiséptico.	Área 2 Mar 2008
<i>Blainvillea biaristata</i> DC.	Asteraceae	Picao	No se encontró en las fuentes citadas.	Área 2 Mar 2008
<i>Chiropetalum tricoccum</i> (Vell.)	Euphorbiaceae	Ventosilla ^{MX}	Infusión como carminativo.	Área 2 Feb 2009
<i>Combretum fruticosum</i> (Loefl.) Stuntz	Combretaceae	Flor de cepillos	Ornamental.	Área 1 Dic 2006
<i>Croton tenuissimus</i> Baill.	Euphorbiaceae	---	El látex de otras especies del género se emplea como cicatrizante, alivio de picaduras de insectos y en casos de aftas y llagas bucales.	Área 1 Dic 2006
<i>Cuphea fruticosa</i> Spreng.	Lythraceae	Siete sangrías	Se emplea como diurético, purgante, hipotensor.	Área 2 Feb 2009

<i>Dolichandra cynanchoides</i> Cham.	Bignoniaceae	Uña de gato	Antiemético, antidiarreico.	Área 2 Mar 2008
<i>Doryopteris concolor</i> (Langsd. & Fisch.) Kuhn	Pteridaceae	---	No se encontró en las fuentes citadas.	Área 2 Mar 2008
<i>Erythrina cristagalli</i> L.	Fabaceae	Ceibo	Decocción de corteza como cicatrizante, infusión de hojas como astringente, brotes y flores como narcótico y calmante.	Área 2 Feb 2009
<i>Eugenia masoni</i> O. Berg	Myrtaceae	Pitanga amarga	Idem <i>E. uniflora</i> L.	Área 1 Abril 2006
<i>Eugenia repanda</i> O. Berg	Myrtaceae	Ñangapirí negro	Idem <i>E. uniflora</i> L.	Área 1 Abril 2006
<i>Eugenia uniflora</i> L.	Myrtaceae	Pitanga, Ñangapirí	La infusión de hojas es empleada como carminativo, antidiarreico, diurético, antifebril, astringente, tónico-estimulante y antirreumático. El licor de caña con frutos es estomacal. El cocimiento de frutos es tónico y digestivo.	Área 1 Abril 2006
<i>Eugenia uruguayensis</i> Cambess.	Myrtaceae	Guayabo blanco	Idem <i>E. uniflora</i> .	Área 2 Feb 2009
<i>Galianthe brasiliensis</i> (Spreng.) E. L.Cabral & Bacigalupo	Rubiaceae	Poaia do campo ^{BR}	Emético.	Área 1 Dic 2006

<i>Gleditsia amorphoides</i> (Griseb.) Taub.	Fabaceae	Espina corona	Detergente vegetal.	Área 2 Mar 2008
<i>Gouania ulmifolia</i> Hook. & Arn.	Rhamnaceae	---	No se encontró en las fuentes citadas.	Área 2 Feb 2009
<i>Guettarda uruguensis</i> Cham. & Schltldl.	Rubiaceae	Jazmín del Uruguay	Madera, ornamental.	Área 1 Abril 2006
<i>Heliotropium elongatum</i> Hoffm. ex Roem. & Schult.	Boraginaceae	Hierba del gallo, Borraja de campo	La infusión de hojas de otras plantas del género se utiliza como sudorífico, diurético y antigotoso.	Área 2 Feb 2009
<i>Hexachlamys edulis</i> (O Berg) Kausel & D.Legrand	Myrtaceae	Ubajay	Se cocina dulce de frutos.	Área 1 Abril 2006
<i>Inga vera</i> Willd. Subsp. <i>affinis</i> (DC.) T.D.Penn	Fabaceae	Ingá	El cocimiento de corteza se emplea como colorante oscuro, también como hemostático. La resina del fruto se aplica como antiodontálgica.	Área 1 Abril 2006
<i>Luehea divaricata</i> Mart.	Tiliaceae	Francisco Alvarez, azota caballo, Ka'a oveti	La infusión de las flores al 1% se utiliza como sedante, la infusión de hojas como antiinflamatorio. La decocción de la corteza se utiliza como antidiarreica y digestiva, y en forma de baños vaginales y hemostático en heridas de piel.	Área 1 Abril 2006
<i>Macfadyena dentata</i> K.Schum	Bignoniaceae	Uña de gato	Melífera.	Área 2 Feb 2009

<i>Manettia cordifolia</i> Mart.	Rubiaceae	Manetia, guiraquiyo	Antidiarreica. Las raíces como emético.	Área 2 Feb 2009
<i>Maytenus ilicifolia</i> Mart. Ex Reiss.	Celastraceae	Congorosa	La infusión o decocción de hojas y tallos se utiliza como antiespasmódico, antiasmático, anticonceptivo; diurético, antiséptico y vulnerario de uso tópico. La planta se considera remedio indígena para tratamiento de tumores (de ahí su nombre en algunas regiones: cancerosa).	Área 2 Feb 2009
<i>Mimosa uruguensis</i> Hook. & Arn.	Fabaceae	Mimosa	No se encontró en las fuentes citadas.	Área 2 Feb 2009
<i>Mitracarpus megapotamicus</i> (Spreng.) Kuntze	Rubiaceae	Peladilla	Antimalárico.	Área 1 Dic 2006
<i>Myrcianthes cisplatensis</i> (Cambess.) O. Berg	Myrtaceae	Guayabo colorado	Antiséptico, vulnerario, enjuague bucal en caso de llagas. Madera.	Área 1 Dic 2006
<i>Myrrhinium atropurpureum</i> Schott in Spreng. var. <i>octandrum</i> Bentham	Myrtaceae	Palo de fierro, Socará	No se encontró en las fuentes citadas.	Área 2 Feb 2009
<i>Myrsine laetevirens</i> (Mez) Arechav.	Myrsinaceae	Canelón	No se encontró en las fuentes citadas.	Área 2 Feb 2009
<i>Myrsine venosa</i> A.DC.	Myrsinaceae	Canelón	No se encontró en las fuentes citadas.	Área 2 Feb 2009

<i>Nectandra angustifolia</i> (Schrad.) Nees & Mart.	Lauraceae	Laurel mini	Tratamiento de reumatismo y artritis, antiinflamatorio.	Área 1 Abril 2006
<i>Nectandra megapotámica</i> (Spreng.) Mez	Lauraceae	---	No se encontró en las fuentes citadas.	Área 2 Mar 2008
<i>Ocimum selloi</i> Benth	Lamiaceae	Albahaca de campo	Infusión como carminativo. Emplasto como antiséptico	Área 2 Mar 2008
<i>Ocotea acutifolia</i> (Nees) Mez	Lauraceae	---	No se encontró en las fuentes citadas.	Área 2 Mar 2008
<i>Paullinia elegans</i> Cambess	Sapindaceae	Cipó-timbó	No se encontró en las fuentes citadas.	Área 1 Abril 2006
<i>Pavonia sepium</i> A. St.-Hil.	Malvaceae	Malva del bosque	Emoliente, expectorante.	Área 1 Abril 2006
<i>Petunia sp</i>	Solanaceae	Petunia	No se encontró en las fuentes citadas.	Área 1 Dic 2006
<i>Phyllanthus sellowianus</i> (Klotzsch) Müll. Arg.	Phyllantaceae	Sarandí Blanco	Infusión o decocción de partes aéreas como hipoglicemiante, purgante, diurético, antiasmático. Uso externo como antiséptico.	Área 1 Abril 2006
<i>Poikilacanthus glandulosus</i> (Nees) Ariza	Acanthaceae	---	No se encontró en las fuentes citadas.	Área 2 Feb 2009
<i>Polygonum punctatum</i> Elliott	Polygonaceae	Yerba del bicho	Antiséptico, antiartrítico.	Área 2 Mar 2008
<i>Pouteria salicifolia</i> (Spreng.) Radlk.	Sapotaceae	Mataojo	Madera. Extracto de hojas se utiliza como vulnerario.	Área 1 Dic 2006
<i>Psychotria carthagenensis</i> Jacq.	Rubiaceae	Naranjillo, chal-chal de la gallina	Alucinógeno.	Área 1 Abril 2006

<i>Ruprechtia laxiflora</i> Meisn.	Polygonaceae	Viraró crespo	Carpintería.	Área 1 Abril 2006
<i>Ruprechtia salicifolia</i> (Cham. & Schltl.) C.A. Mey	Polygonaceae	Viraró	Madera.	Área 1 Abril 2006
<i>Scutia buxifolia</i> Reissek	Rhamnaceae	Coronilla	Diaforético, diurético, útil en el tratamiento del acné. Emenagogo y analgésico.	Área 1 Abril 2006
<i>Sebastiania commersoniana</i> (Baill.) L.B. Sm. & Downs	Euphorbiaceae	Blanquillo	El látex de otras especies del género se emplea para eliminar verrugas y la decocción de la corteza como antiséptico.	Área 1 Abril 2006
<i>Smilax campestris</i> Griseb.	Smilacaceae	Zarzaparrilla blanca	La infusión de raíz se utiliza como antirreumático, diurético, antisifilítico, antipruriginoso.	Área 2 Mar 2008
<i>Solanum boerhaviifolium</i> Sendtn	Solanaceae	Jazmín	No se encontró en las fuentes citadas.	Área 2 Mar 2008
<i>Terminalia australis</i> Cambess.	Combretaceae	Palo amarillo	Madera. La corteza posee propiedades astringentes y las hojas poseen propiedades digestivas y hepáticas.	Área 1 Abril 2006
<i>Teucrium vesicarium</i> Mill.	Lamiaceae	---	No se encontró en las fuentes citadas.	Área 1 Dic 2006
<i>Trixis praestans</i> (Vell.) Cabrera	Asteraceae	---	No se encontró en las fuentes citadas.	Área 2 Feb 2009
<i>Urvillea uniloba</i> Radlk.	Sapindaceae	Cipó-camarão ^{BR}	Las ramas en infusión como calmantes en gastralgias y en afecciones hepáticas y del bazo.	Área 2 Mar 2008

<i>Vernonia scorpioides</i> (Lam.) Pers. var. <i>sororia</i> (DC.) Baker	Asteraceae	Vernonia, Hierba de San Simón	No se encontró en las fuentes citadas.	Área 2 Feb 2009
--	------------	-------------------------------	--	--------------------

Resultados de actividad antifúngica de los extractos vegetales

Se ensayaron 144 extractos vegetales por Bioautografía en capa de agar contra *Candida albicans* ATCC 10231 y *Aspergillus niger* ATCC 2601, Figuras 16 y 17. No se produjo inhibición de las cepas mencionadas utilizando extractos vegetales (1 mg/mL) de las siguientes especies:

- *Arrabidaea selloi* (Spreng.) Sandwith
- *Chiropetalum tricoccum* (Vell.)
- *Cuphea fruticosa* Spreng.
- *Dolichandra cynanchoides* Cham.
- *Doryopteris concolor* (Langsd. & Fisch.) Kuhn
- *Galianthe brasiliensis* (Spreng.) E. L. Cabral & Bacigalupo
- *Gleditsia amorphoides* (Griseb.) Taub. (femenino y masculino por separado)
- *Heliotropium elongatum* Hoffm. ex Roem. & Schult.
- *Macfadyena dentata* K. Schum
- *Manettia cordifolia* Mart.
- *Mitracarpus megapotamicus* (Spreng.) Kuntze
- *Petunia* sp.
- *Poikilacanthus glandulosus* (Nees) Ariza
- *Ruprechtia laxiflora* Meisn.
- *Sebastiania commersoniana* (Baill.) L.B. Sm. & Downs
- *Solanum boerhaviifolium* Sendtn
- *Teucrium vesicarium* Mill.
- *Trixis praestans* (Vell.) Cabrera
- *Vernonia scorpioides* (Lam.) Pers. var. *sororia* (DC.) Baker

Las especies cuyos extractos vegetales produjeron inhibición de las cepas de *Candida albicans* ATCC 10231 y/o *Aspergillus niger* ATCC 2601 por Bioautografía en capa de agar se detallan en Tabla 13.

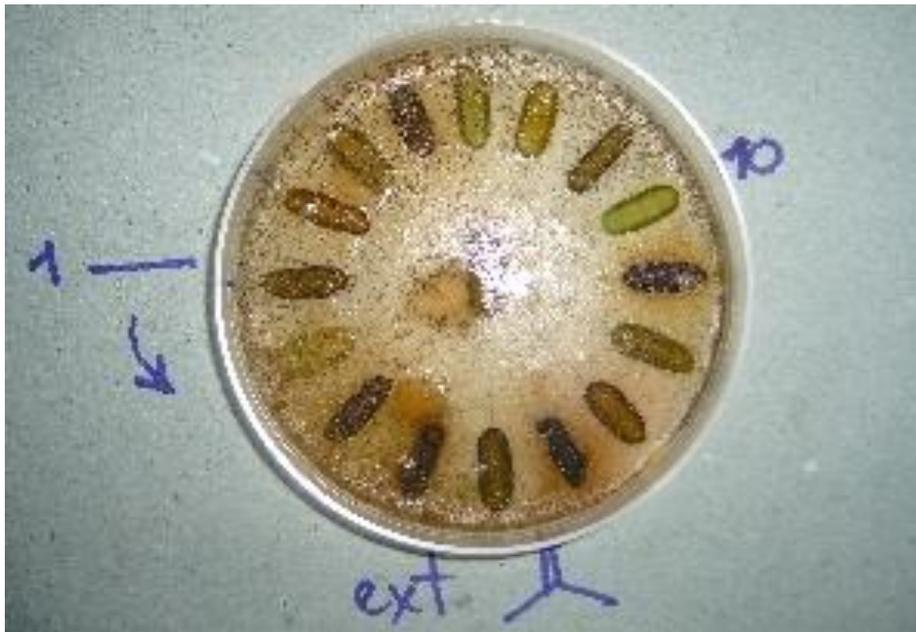


Figura 16. Bioautografía en capa de agar de *Aspergillus niger* ATCC 2601. Durante la colecta y en las placas de Petri, se codificó las plantas con números. Especie 10 corresponde a *Eugenia masoni* O. Berg



Figura 17. Bioautografía en capa de agar de *Candida albicans* ATCC 10231, tinción con INT. Las especies cuya numeración aparece en la fotografía corresponden a: *Paullinia elegans* Cambess (1), *Luehea divaricata* Mart. (2), *Sebastiania commersoniana* (Baill.) L.B. Sm. & Downs (3), *Hexachlamys edulis* (O Berg) Kausel & D.Legrand (4), *Psychotria carthagenensis* Jacq. (6), *Terminalia australis* Cambess. (9), *Eugenia masoni* O. Berg (10), *Phyllanthus sellowianus* (Klotzsch) Müll. Arg. (14), *Scutia buxifolia* Reissek (17), *Combretum fruticosum* (Loefl.) Stuntz (21), *Petunia* sp. (23), *Myrcianthes cisplatensis* (Cambess.) O. Berg (25)

Tabla 13. Lista de especies cuyos extractos vegetales produjeron inhibición de *Candida albicans* ATCC 10231 y *Aspergillus niger* ATCC 2601 por Bioautografía en capa de agar. Parte de planta utilizada: H hojas, PA partes aéreas, F frutos, C corteza. Solventes de extracción: 1) CH₃CH₂OH -H₂O 70:30, 2) CH₃COCH₃, 3) CH₂Cl₂

Nombre científico	Parte de Planta	Inhibición de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Inhibición de <i>Aspergillus niger</i> ATCC 2601
<i>Acacia bonariensis</i> Gillies ex Hook. & Arn.	PA	Extracto 2	---
<i>Acalypha gracilis</i> Spreng.	H	Extracto 2	---
<i>Allophylus edulis</i> (A. St.-Hil., Cambess. & A.Juss.) Radlk.	H,C	Extractos 1 y 3 (H)	Extractos 1 y 2 (C)
<i>Blainvillea biaristata</i> DC.	PA	Extracto 2	Extracto 2
<i>Combretum fruticosum</i> (Loefl.) Stuntz	H	---	Extractos 1 y 2
<i>Croton tenuissimus</i> Baill. (femenino y masculino)	H	Extracto 2 (fem)	---
<i>Erythrina crista-galli</i> L.	C	---	Extracto 3
<i>Eugenia masoni</i> O. Berg	H	Extracto 3	Extractos 2 y 3
<i>Eugenia repanda</i> O. Berg	H	Extracto 3	Extracto 3
<i>Eugenia uniflora</i> L.	H	---	Extractos 1 y 2
<i>Eugenia uruguayensis</i> Cambess.	H	Extracto 2	Extractos 1,2 y 3
<i>Gouania ulmifolia</i> Hook. & Arn.	PA	Extracto 1 y 3	---
<i>Guettarda uruguensis</i> Cham. & Schltld.	H	---	Extracto 3
<i>Hexachlamys edulis</i> (O Berg) Kausel & D.Legrand	H	Extracto 3	---
<i>Inga vera</i> Willd. Subsp. <i>affinis</i> (DC.) T.D.Penn	H	Extracto 1	---
<i>Luehea divaricata</i> Mart.	H	---	Extracto 1
<i>Maytenus ilicifolia</i> Mart. Ex Reiss.	H	Extractos 1,2 y 3	---
<i>Mimosa uruguensis</i> Hook. & Arn.	H, F	Extractos 1 y 2 (H)	---
<i>Myrcianthes cisplatensis</i> (Cambess.) O. Berg	H	Extractos 1,2 y 3	Extractos 1 y 2
<i>Myrrhimum atropurpureum</i> Schott in Spreng. var. <i>octandrum</i> Bentham	H	Extractos 1 y 2	---
<i>Myrsine laetevirens</i> (Mez) Arechav.	H	Extracto 1	Extracto 1

<i>Myrsine venosa</i> A.DC.	H, F	Extracto 2 (H)	---
<i>Nectandra angustifolia</i> (Schrad.) Nees & Mart.	H	Extracto 1 y 3	---
<i>Nectandra megapotámica</i> (Spreng.) Mez	H	Extracto 1	Extracto 3
<i>Ocimum selloi</i> Benth	PA	Extracto 2	Extracto 2
<i>Ocotea acutifolia</i> (Nees) Mez	H	Extracto 2	---
<i>Paullinia elegans</i> Cambess	H, F	---	Extracto 3 (H)
<i>Pavonia sepium</i> A. St.-Hil.	PA	Extracto 2	---
<i>Phyllanthus sellowianus</i> (Klotzsch) Müll. Arg.	H	---	Extracto 1
<i>Polygonum punctatum</i> Elliott	PA	---	Extracto 3
<i>Pouteria salicifolia</i> (Spreng.) Radlk.	H	Extracto 2 y 3	Extracto 1
<i>Psychotria carthagenensis</i> Jacq.	H	---	Extracto 2
<i>Ruprechtia salicifolia</i> (Cham. & Schltdl.) C.A. Mey	H	Extracto 1 y 2	---
<i>Scutia buxifolia</i> Reissek	H	Extracto 3	---
<i>Smilax campestris</i> Griseb.	H	Extracto 3	---
<i>Terminalia australis</i> Cambess.	H	Extracto 3	---
<i>Urvillea uniloba</i> Radlk.	PA	Extracto 1	---

Se estudió la actividad antifúngica de 144 extractos vegetales pertenecientes a 56 especies nativas de 18 familias botánicas, de las que 37 especies resultaron bioactivas por lo menos en uno de sus extractos. Respecto a la información etnobotánica de esas especies y sus resultados, se obtuvo el siguiente relacionamiento:

- Se confirmó el conocimiento popular de su posible utilidad como antiséptico en 11 especies, constituyendo el 79% de los casos de correcto uso específico.
- Se confirmó actividad antifúngica en 14 especies (54%) utilizadas por la población con otros fines que no incluyen propiedades antiinfecciosas o relacionadas.
- Se probó actividad antifúngica en 10 especies no informadas en la biblioteca tradicional revisada (59%). En sólo 3 casos se encontró reportes en bases científicas, no relacionados a esta bioactividad: *Blainvillea biaristata* DC. (Spring 1999), *Myrrhinium atropurpureum* Schott in Spreng. var. *octandrum* Bentham (Rotman 2003), *Nectandra megapotámica* (Spreng.) Mez (Da Silva Filho 2004;

Garcéz 2009). Para las 7 especies restantes se publicó por primera vez información relativa a su utilidad:

Acalypha gracilis Spreng.

Gouania ulmifolia Hook. & Arn.

Mimosa uruguensis Hook. & Arn.

Myrsine laetevirens (Mez) Arechav.

Myrsine venosa A.DC.

Ocotea acutifolia (Nees) Mez

Paullinia elegans Cambess

En relación a resultados negativos del ensayo bioautográfico:

- No se confirmó actividad antifúngica en las cepas estudiadas en extractos de 3 especies (21%), a pesar de ser citadas por concedores tradicionales como apropiadas para tratamientos relacionados a procesos infecciosos, y se valora como el mayor desacierto del saber popular.

Arrabidaea selloi (Spreng.) Sandwith,

Mitracarpus megapotamicus (Spreng.) Kuntze,

Sebastiania commersoniana (Baill.) L.B. Sm. & Downs

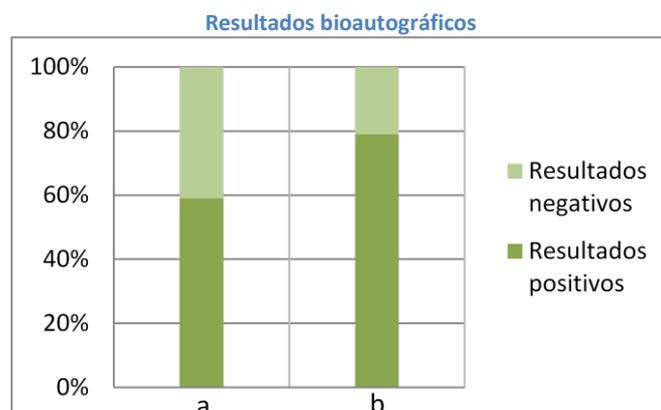


Figura 18. El número de aciertos en la búsqueda de extractos vegetales antifúngicos fue 20% mayor cuando se tuvo en cuenta información etnobotánica para la colecta de plantas (b) que en el caso de no poseer dicha información (a).

Numerosos reportes, como ya se indicó en antecedentes, avalan el criterio etnobotánico o etnofarmacológico para hacer más eficaz la colecta de plantas. En particular, un estudio de siete países latinoamericanos con un universo de 144 plantas colectadas con información de utilidad antiinfecciosa por parte de distintas comunidades y 183 plantas colectadas al azar, cuyos extractos etanólicos fueron ensayados por Microdilución contra 11 cepas fúngicas, demostró que existe una diferencia estadísticamente significativa del orden de 20% a favor del empleo de dicho criterio (Svetaz, L 2010). La tendencia en la presente investigación coincidió con los resultados de dicho estudio (Figura 18).

5.3. DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN RÁPIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE SUSPENSIONES DE ESPORAS DE *Aspergillus niger*

Para facilitar el conteo de esporas de *Aspergillus niger*, paso ineludible para la evaluación de la actividad antifúngica pero que demanda tiempo y puede resultar tedioso, se propuso preparar suspensiones seriadas de carbón con tamaño de partícula similar al de sus esporas en máxima actividad de agua, en una solución de tensoactivo no iónico que evite conglomerados. Se elaboró con ellas una escala de 20 tubos de concentración creciente, que por simple agitación y comparación permitió preparar suspensiones adecuadas de esporas del hongo, de forma similar a la escala Mc Farland. El número de tubo de la escala *Black Mc Farland* (Tabla 10, Sección 4.2.1.) correspondió al coeficiente que, multiplicado por 10^6 , permitió obtener la concentración de la suspensión en esp/mL.

La correspondencia entre concentración de suspensiones de carbón y de esporas de *Aspergillus niger* se estableció por Transmitancia (T) a 550 nm. Para las suspensiones de carbón, la gráfica de Concentración (mg/mL) vs Transmitancia (%) mostró una relación lineal con $R^2=0,996$. Para las suspensiones de esporas, es posible separar la curva de Concentración (mg/mL) vs Transmitancia (%) en dos relaciones lineales independientes, ambas con $R^2=0,998$. Figura 19. Estableciendo relaciones a partir de valores de Transmitancia, las curvas de carbón y esporas son concordantes y el rango de utilización de la escala es óptimo entre 20 y 70% de Transmitancia, correspondiente a 10^5 - 10^7 esp/mL que es el rango de uso habitual.

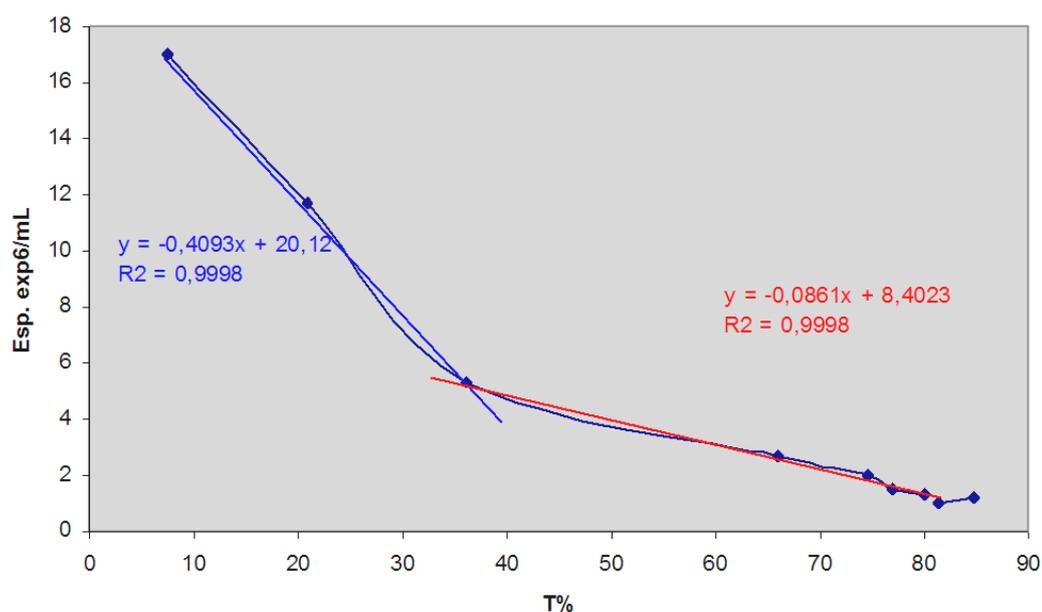


Figura 19. Gráfica de Concentración de suspensión de esporas de *Aspergillus niger* vs Transmitancia a 550 nm

La escala confeccionada fue utilizada por diferentes personas y por triplicado para ubicar el N° de tubo de la escala cuya densidad óptica fuera similar a cada uno de tres tubos con suspensiones problema de *Aspergillus niger*, de esa forma determinar en forma aproximada su concentración. Su ubicación correcta coincidió en el 100% de los casos de suspensiones fúngicas problema de alta concentración, decayendo a 93% en concentraciones bajas; en los casos de error los observadores siempre optaron por el siguiente tubo de la escala. Estos resultados comprobaron que el método es rápido y sencillo y de utilidad para Bioautografía, el fin propuesto.

En Microdilución, determinar la concentración de la suspensión fúngica es crítico y debe realizarse por conteo en cámara o espectrofotometría (Espinel-Ingroff 1991); pero utilizada previamente, la escala *Black Mc Farland* agiliza este paso. Por ejemplo, suspensiones fúngicas preparadas por similitud con el tubo N°10 -del orden de 10^7 esp/mL- presentaron por conteo una diferencia de 5% en su concentración.

5.4. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS VEGETALES DE LAS PLANTAS COLECTADAS

Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) contra un panel ampliado de cepas

Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) por Microdilución (Sección 4.2.2) de extractos vegetales que, habiendo superado el cribaje realizado por Bioautografía en capa de agar, produjeron inhibición de ambas cepas fúngicas, o bien no se poseía información anterior de su actividad antimicrobiana, o resultaba de interés realizar un estudio comparativo por tratarse de varias especies del mismo género (ej. *Eugenia* spp.). Se amplió el panel de cepas de hongos patógenos humanos para estudiar su selectividad.

Los resultados del ensayo para las cepas de **Ca**: *Candida albicans* ATCC 10231, **Ct**: *Candida tropicalis* C131, **Sc**: *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, **Cn**: *Cryptococcus neoformans* ATCC 32264, **Afu**: *Aspergillus fumigatus* ATCC 26934, **Afl**: *Aspergillus flavus* ATCC 9170, **An**: *Aspergillus niger* ATCC 9029, **Tr**: *Trichophyton rubrum* C 113, **Tm**: *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9972, **Mg**: *Microsporium gypseum* C 115, se detallan en Tabla 14 y Tabla 15. La parte de planta utilizada para preparar el extracto vegetal en la mayoría de los casos fue hojas o partes aéreas; por tanto se especifica sólo si se utilizó corteza (**C**) o frutos (**F**). Los solventes de maceración de los extractos vegetales se indican: **(1)** CH₃CH₂OH-H₂O 70:30, **(2)** CH₃COCH₃, **(3)** CH₂Cl₂.

Concentración Fungicida Mínima (CFM)

La Concentración Fungicida Mínima (CFM) de los extractos de hojas de *Eugenia masoni* O. Berg fue la siguiente:

- el Extracto acetónico presentó CFM > 1000 µg/mL para *Candida albicans* ATCC 10231 y CFM = 62,5 µg/mL para *Microsporium gypseum* C 115 y *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9972.
- el Extracto diclorometánico presentó CFM = 250 µg/mL para *Microsporium gypseum* C 115 y CFM = 62,5 µg/mL para *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9972.
- Se realizó pero no fue posible establecer la CFM para *Trichophyton rubrum* C 113 por contaminación. Las colonias de este hongo presentan una pigmentación característica

Tabla 14. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de extractos vegetales frente a cepas de hongos patógenos

Especie vegetal	Extracto ensayado	CIM ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Acacia bonariensis</i> Gillies ex Hook. & Arn.	2	> 1000 para todas las cepas ensayadas
<i>Acalypha gracilis</i> Spreng.	2	> 1000 para todas las cepas ensayadas
<i>Allophylus edulis</i> (A. St.-Hil., Cambess. & A.Juss.) Radlk.	1,2,3 y 1-C	> 1000 para todas las cepas ensayadas
<i>Blainvillea biaristata</i> DC.	2	> 1000 para todas las cepas ensayadas
<i>Combretum fruticosum</i> (Loefl.) Stuntz	2	> 1000 para todas las cepas ensayadas
<i>Eugenia masoni</i> O. Berg	2	< 1000 para algunas cepas
	3	< 1000 para algunas cepas
<i>Eugenia repanda</i> O. Berg	3	> 1000 para todas las cepas ensayadas
<i>Eugenia uniflora</i> L.	2	> 1000 para todas las cepas ensayadas
<i>Eugenia uruguayensis</i> Cambess.	2	> 1000 para todas las cepas ensayadas
<i>Luehea divaricata</i> Mart.	1	> 1000 para todas las cepas ensayadas
<i>Myrcianthes cisplatensis</i> (Cambess.) O. Berg	1,2,3	> 1000 para todas las cepas ensayadas
<i>Nectandra megapotámica</i> (Spreng.) Mez	1,3	> 1000 para todas las cepas ensayadas
<i>Ocotea acutifolia</i> (Nees) Mez	1	> 1000 para todas las cepas ensayadas
<i>Paullinia elegans</i> Cambess	3	> 1000 para todas las cepas ensayadas
<i>Pouteria salicifolia</i> (Spreng.) Radlk.	1,2,3	> 1000 para todas las cepas ensayadas
<i>Smilax campestris</i> Griseb.	2	> 1000 para todas las cepas ensayadas

Tabla 15. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de extractos de hojas de *Eugenia mansoni* O. Berg

Conc. del Extracto (µg/mL)	Hongos levaduriformes				Hongos filamentosos					
	Ca	Ct	Sc	Cn	Afl	Afu	An	Dermatofitos		
								Mg	Tr	Tm
<i>Eugenia mansoni</i> O. Berg (2)	≥1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	62,5	>1000	62,5
<i>Eugenia mansoni</i> O. Berg (3)	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	250	>1000	62,5

en la cara anversa del agar Sabouraud -rojiza- que no presentó el tubo con su subcultivo, sin embargo se descartó su lectura.

El caso de *Candida albicans* ATCC 10231, en que el extracto acetónico de *Eugenia mansoni* O. Berg presentó CFM > CIM, sugiere que el antifúngico varió su actividad -stasis a -cida por aumento de concentración del extracto vegetal. Para el caso de los dermatofitos ensayados los valores de CFM coincidieron con los valores de CIM, por tanto el efecto de los extractos acetónico y diclorometánico de hojas de *Eugenia mansoni* O. Berg fue fungicida para estas cepas.

Resultados de ensayos que revelan el modo de acción

De acuerdo a los mejores resultados anteriores, los ensayos que revelan el modo de acción de los extractos con actividad antifúngica se realizaron sobre extractos de *Eugenia mansoni* O. Berg.

De los ensayo de *Neurospora crassa* y sorbitol se obtuvo resultados negativos para sus extractos en diclorometano y acetona. Ambos ensayos revelan modos de acción en que la diana fúngica es la pared celular.

Existen otros ensayos en este sentido, para descartar totalmente este modo de acción. Algunos ensayos requieren entrenamiento en microscopía porque se refieren a cambios morfológicos celulares, en general mediante tinción habitual (KOH 10%, azul de

metileno, azul de algodón) o blanco de calcofluor (Arellano 1996). Otros ensayos son de fácil realización: la sonicación y el efecto del agregado de un detergente como dodecil sulfato sódico (SDS), por ejemplo, permiten detectar defectos de pared (Zacchino 2007).

Respecto al ensayo por Microdilución que revela un modo de acción que afecta a la membrana celular por unión a ergosterol, el resultado mostró una dilución de diferencia en el crecimiento fúngico con y sin ergosterol exógeno : la CIM $\geq 1000 \mu\text{g/mL}$ modificó a $\text{CIM}_{\text{erg}} > 1000 \mu\text{g/mL}$ contra *Candida albicans* ATCC 10231. No sería un resultado alentador considerando que está dentro del error del método, sin embargo la observación microscópica (KOH 10% y azul de metileno) de una alícuota de cada pocillo - con y sin ergosterol- mostró mayor número de hifas en el primer caso.

Es posible avanzar en este sentido extrayendo lípidos de membrana y analizando la composición de esteroides por GC-MS (Tian 2012). Un ensayo que requiere mínimo equipo consiste en medir la absorbancia del sobrenadante de una suspensión celular fúngica tratada con antifúngico y la de una suspensión no tratada: componentes celulares perdidos por la membrana celular defectuosa -ácidos nucleicos, aminoácidos aromáticos- presentan cromóforos y espectros con máximos cercanos a 260 nm, longitud de onda sugerida para realizar este ensayo comparativo (Lunde 2000).

Sinergismo y antagonismo

Se obtuvo 17 fracciones por separación cromatográfica del extracto acetónico de *Eugenia mansonii* O Berg, sobre las cuales se realizó nuevamente Bioautografía en capa de agar para seleccionar las fracciones activas contra *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9972, cepa para la que se obtuvo los mejores valores de CIM y CFM contra dermatofitos, Figura 20. La inhibición se produjo sobre las fracciones 4-6-8-9-10, Figura 21.

Se realizó el ensayo de Microdilución Bidimensional con dos fracciones bioactivas muy distintas de acuerdo a sus cromatogramas (Fracciones 4 y 9) y se observó comportamiento sinérgico. NOTA: El método no permite diferenciar sinergia de aditividad, se tomó el concepto en sentido amplio.

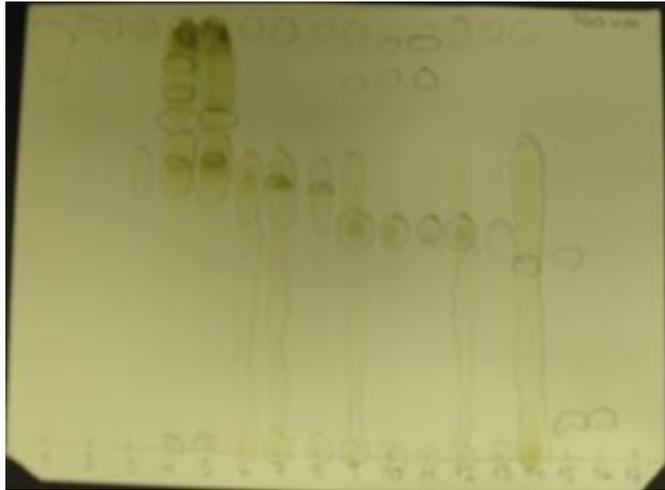


Figura 20. Cromatograma visible con indicaciones de revelado UV-360 nm de 17 fracciones del extracto acetónico de *Eugenia masoni* O Berg. Placa de silica gel, fase móvil CH_2Cl_2 - CH_3OH 95:5.

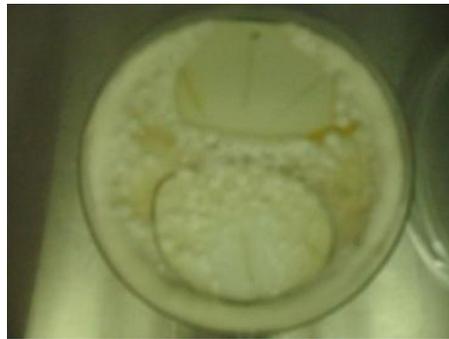


Figura 21. Bioautografía en capa de agar de 10 fracciones del extracto acetónico de *Eugenia masoni* O Berg con *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9972 en agar Sabouraud. Se observa inhibición en Fracciones 4-6-8-9-10

5.5. ENSAYOS FITOQUÍMICOS SOBRE EXTRACTOS VEGETALES DE *Eugenia* spp.

Se utilizó reveladores fitoquímicos sobre cromatogramas de los extractos vegetales de *Eugenia* spp., obteniéndose resultados positivos en los siguientes grupos de compuestos: triterpenos y/o esteroides, terpenos, taninos, saponinas, alcaloides, flavonoides y glicósidos. En todos los casos resultó negativo el ensayo de cardenólidos. Tabla 16.

En particular, el extracto diclorometánico de *Eugenia masoni* O. Berg dió resultado positivo en los ensayos de triterpenos/esteroides, terpenos y alcaloides; *idem* su extracto acetónico también positivo en flavonoides. En búsquedas realizadas en la base de datos NAPRALERT no se encontró reportes de bioactividad o constituyentes de extractos fijos de *Eugenia masoni* O. Berg hasta la fecha. Algunos artículos se refieren a su descripción botánica y a su aceite esencial (Apel 2004).

Tabla 16. *Screening* fitoquímico sobre extractos vegetales de hojas de *Eugenia* spp. de la colección

Especies	Extracto	Tri/Est	Terp	Tan	Sap	Alc	Fla	Gli	Card
<i>Eugenia masoni</i> O. Berg	1	-	+	-	+	-	-	+	-
	2	+	+	-	-	+	+	-	-
	3	+	+	-	-	+	-	-	-
<i>Eugenia repanda</i> O. Berg	1	-	-	+	+	-	+	+	-
	2	+	+	-	-	+	+	-	-
	3	+	+	-	-	+	+	-	-
<i>Eugenia uniflora</i> L.	1	-	-	+	+	-	+	+	-
	2	+	+	-	-	-	+	-	-
	3	+	+	-	-	+	+	-	-
<i>Eugenia uruguayensis</i> Cambess.	1	+	+	-	-	+	+	+	-
	2	+	+	-	-	+	+	-	-
	3	+	+	-	-	+	-	-	-

Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)

La Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) permitió diferenciar los perfiles cromatográficos de los extractos vegetales del género *Eugenia* de la colección, metodología de práctica para determinar la calidad quimiotaxonómica de extractos vegetales. La afirmación proviene de los siguientes resultados:

- Para el extracto diclorometánico de *Eugenia mansoni* O. Berg. con detección a 254 nm y 280 nm: se observó un pico característico con un tiempo de retención 7 min, área 85%, espectro UV con máximo a 265-266 nm, Figura 18.
- En una secuencia se reiteró el análisis del extracto y se incluyó sus fracciones: las fracciones consideradas bioactivas no presentaron el compuesto que eluye a ese tiempo ni su espectro ultravioleta. Por tanto no resultó un marcador de bioactividad.
- Se analizaron los extractos diclorometánicos de *Eugenia* spp. en una secuencia, y el perfil cromatográfico de las tres especies restantes fue siempre de mayor complejidad y no presentó el compuesto principal de *Eugenia mansoni* O. Berg.

Para que un compuesto pueda ser considerado candidato a marcador quimiotaxonómico debe estar ampliamente distribuido y ser consistente con las rutas biosintéticas, no pertenecer a los grupos de compuestos mayoritarios (ej. ácidos nucleicos) por el contrario ser específico por ej. de una especie o género o familia, ser estable y de estructura no demasiado compleja, fácilmente identificable y valorable, no acumulable por factores abióticos. Existen numerosos ejemplos de utilización de compuestos fenólicos en quimiotaxonomía, en estudios clásicos y recientes (Harborne 1984; Maridass 2010); en particular polihidroxicalconoides y chalconas y flavanoles - glicosidados o agliconas- en el género *Eugenia* (Porter, E 2000). Si el compuesto de *Eugenia mansoni* O. Berg que se destaca en su perfil cromatográfico se encontrase en uno de estos grupos fitoquímicos, una vez elucidada su estructura podría utilizarse como marcador quimiotaxonómico ya que cumpliría en general las condiciones mencionadas.

Como parte de futuros trabajos deberá colectarse otras especies del género *Eugenia* reportadas en las regiones vecinas Mesopotamia argentina y extremo sur de Brasil -o por lo menos las especies del territorio nacional*- para ser incluidas en la diferenciación taxonómica botánica y química: *Eugenia hiemalis** Camb., *Eugenia pyriformis** Camb.,

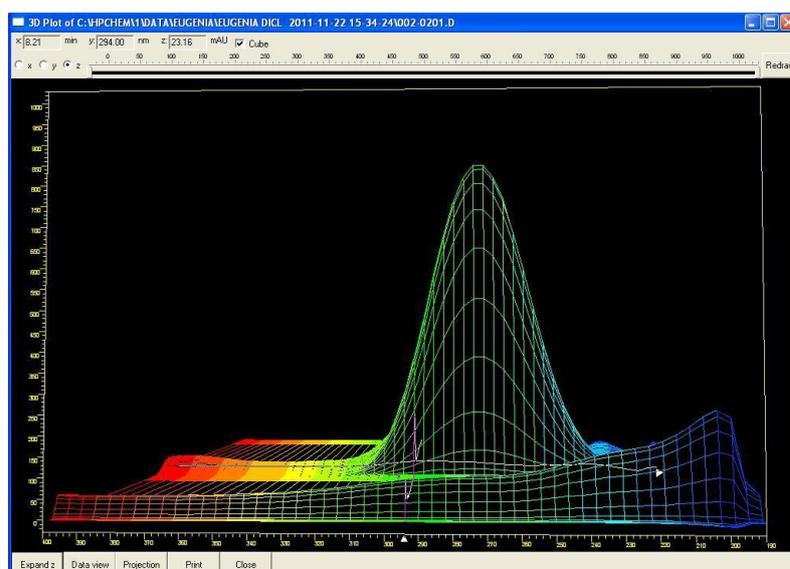
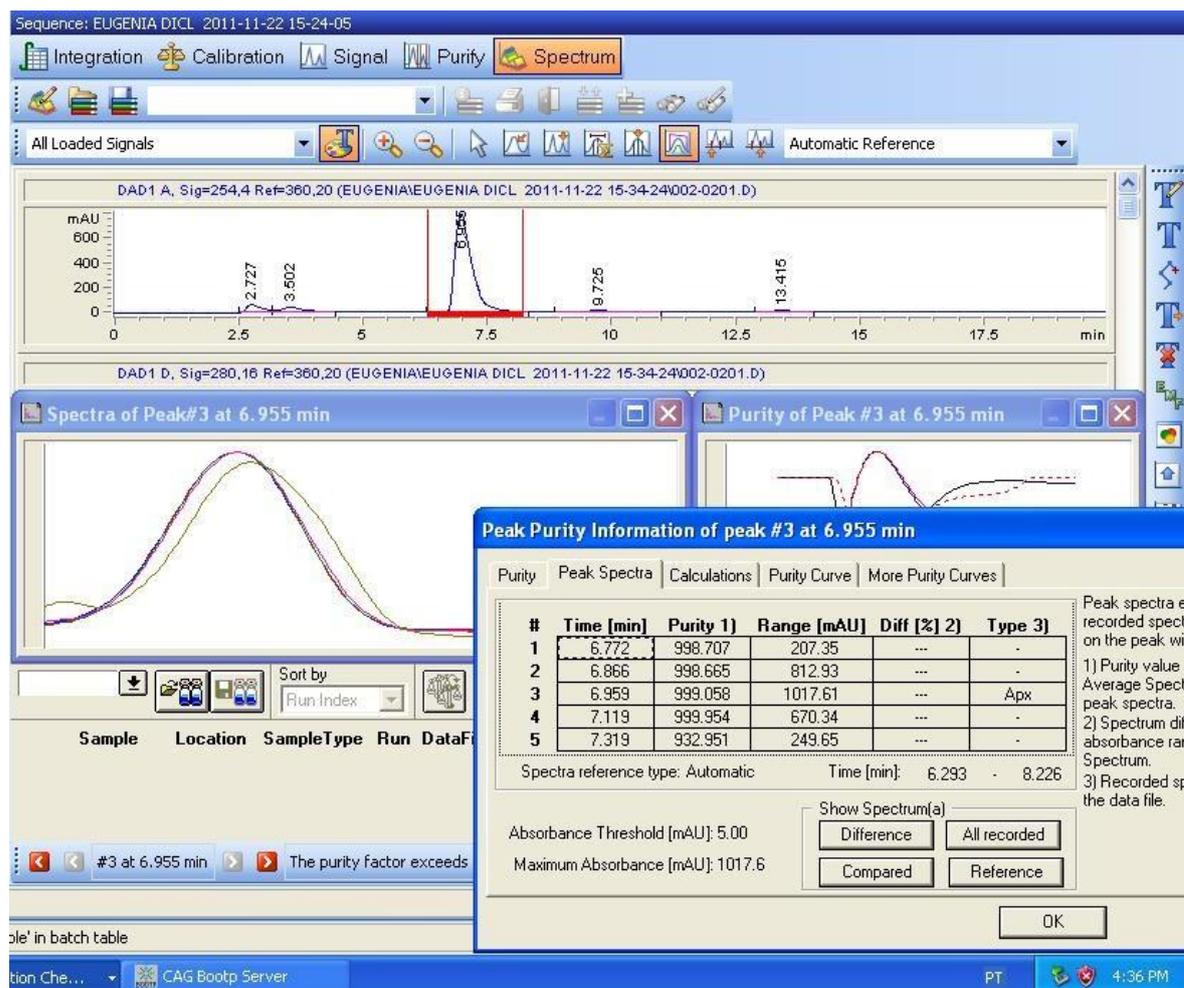


Figura 22. Perfil cromatográfico del extracto diclorometánico de hojas de *Eugenia mansoni* O Berg que muestra un pico mayoritario a $t = 7$ min. El recurso 3D-plot del software mostró el máximo del espectro UV a 265-266 nm.

*Eugenia speciosa** Camb., *Eugenia involucrata** DC., *Eugenia glaucescens* Camb., *Eugenia emarginata* Glaziov, *Eugenia schuchiana* Berg, *Eugenia brasiliensis* Lam., *Eugenia jambos* L., *Eugenia aurata* O. Berg, *Eugenia bimarginata* DC., *Eugenia springiana* O. Berg y *Eugenia umbelliflora* Berg (Leites 1987; Romagnolo 2006; Alves 2007; González, C 2011).

5.6. EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE EXTRACTOS VEGETALES DE *Eugenia masoni* O. Berg EN LÍNEAS CELULARES DE PIEL

El ensayo cuantitativo *in vitro* de reducción de MTT para estimar proliferación y supervivencia celular es considerado en la literatura como apropiado para evaluar la citotoxicidad de una muestra problema (Schweikl 1996). Si bien algunos autores sugieren realizar una batería de ensayos (Melo e Silva 2009), es razonable utilizar un ensayo basado en un marcador metabólico como la actividad deshidrogenasa mitocondrial para evaluar viabilidad celular frente a agentes químicos a nivel de *screening*. El decaimiento de viabilidad celular -métodos del Rojo Neutro y del Azul de Tripán- o la inhibición de proliferación celular por contenido de DNA o proteico, por ejemplo, no serían necesarios a este nivel aunque la muerte celular es un evento complejo y toda información aportada en relación a necrosis/apoptosis, cinética de muerte o mecanismo de acción, adelanta información relevante y necesaria para el posterior análisis de toxicidad (Eisenbrand 2002).

Los fibroblastos son probablemente las células más utilizadas en estudios de citotoxicidad pero además -en este caso particular de extractos con capacidad antifúngica contra dermatofitos- su utilización en este trabajo constituye un acierto por cuanto se encuentran en el tejido afectado y en un estrato más profundo en la piel. Los fibroblastos son las células en mayor número en la Dermis, así como los queratinocitos en Epidermis.

Se incluyó extractos vegetales de las cuatro especies del género *Eugenia* de la colección en el ensayo de citotoxicidad por MTT. La citotoxicidad de los extractos vegetales de las distintas especies del género *Eugenia* contra fibroblastos FF287 se muestra en gráficas comparativas de viabilidad celular en función de la concentración de extracto vegetal, Figura 19. El comportamiento de extractos acetónicos de *Eugenia masoni* O Berg implica inocuidad hasta por lo menos 100 µg/mL de concentración; en ensayos posteriores se trabajó a mayor concentración de sus extractos para conocer ampliamente su desempeño.

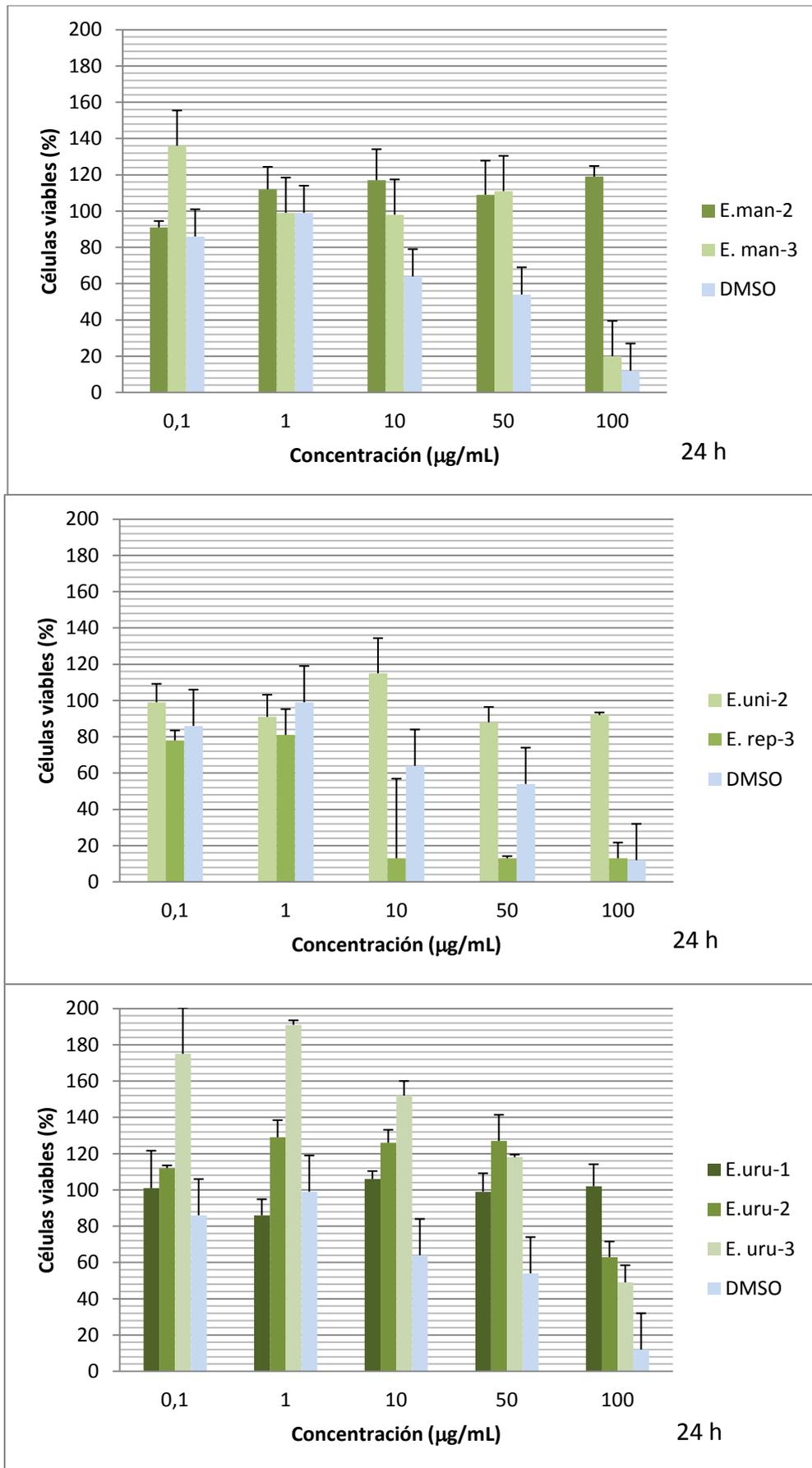


Figura 23. Fibroblastos FF287 viables luego de 24 h de incubación con distintas concentraciones de extractos vegetales de *Eugenia* spp.

A las 24 h de incubación, los extractos vegetales de *Eugenia* spp. presentaron los siguientes valores de Concentración Inhibitoria (IC) para fibroblastos FF287:

- *Eugenia masoni* O Berg, extracto acetónico $IC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$, extracto diclorometánico $IC_{50} = 80 \mu\text{g/mL}$

- *Eugenia uniflora* L., extracto acetónico $IC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$

- *Eugenia repanda* O Berg, extracto diclorometánico $IC_{50} = 6 \mu\text{g/mL}$

- *Eugenia uruguayensis* Cambess., extractos hidroalcohólico y acetónico $IC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$. Para el extracto diclorometánico $IC_{50} = 100 \mu\text{g/mL}$; indujo proliferación celular en forma muy marcada a concentraciones subinhibitorias, explicable por el fenómeno de hormesis. Este fenómeno es frecuente y explica la proliferación celular como respuesta adaptativa a un factor moderado de *stress* -químico en este caso- previa a la manifestación de efectos citotóxicos (Mattson 2008; Zhang 2008).

Citotoxicidad de extractos de *Eugenia mansoni* O Berg frente a fibroblastos y queratinocitos normales de piel en distintos períodos

La citotoxicidad de extractos vegetales de *Eugenia mansoni* O. Berg frente a líneas celulares normales fibroblastos FF287 y queratinocitos KP#9 luego de 24, 48 y 72 h de incubación, se observa en las Figuras 20 y 21.

Para ambas líneas celulares se observó leve pero consistente inducción de proliferación celular por extractos vegetales acetónico y diclorometánico de *Eugenia mansoni* O Berg de concentración menor a 100 µg/mL para los tres períodos de incubación.

Fibroblastos FF287: Para el extracto acetónico $IC_{80} = 250$ µg/mL en 24 h, porcentaje que descendió y se estabilizó en 60% de supervivencia celular para esa concentración al segundo y tercer día de incubación. El extracto diclorometánico presentó un comportamiento similar, considerando mínimas desviaciones del método.

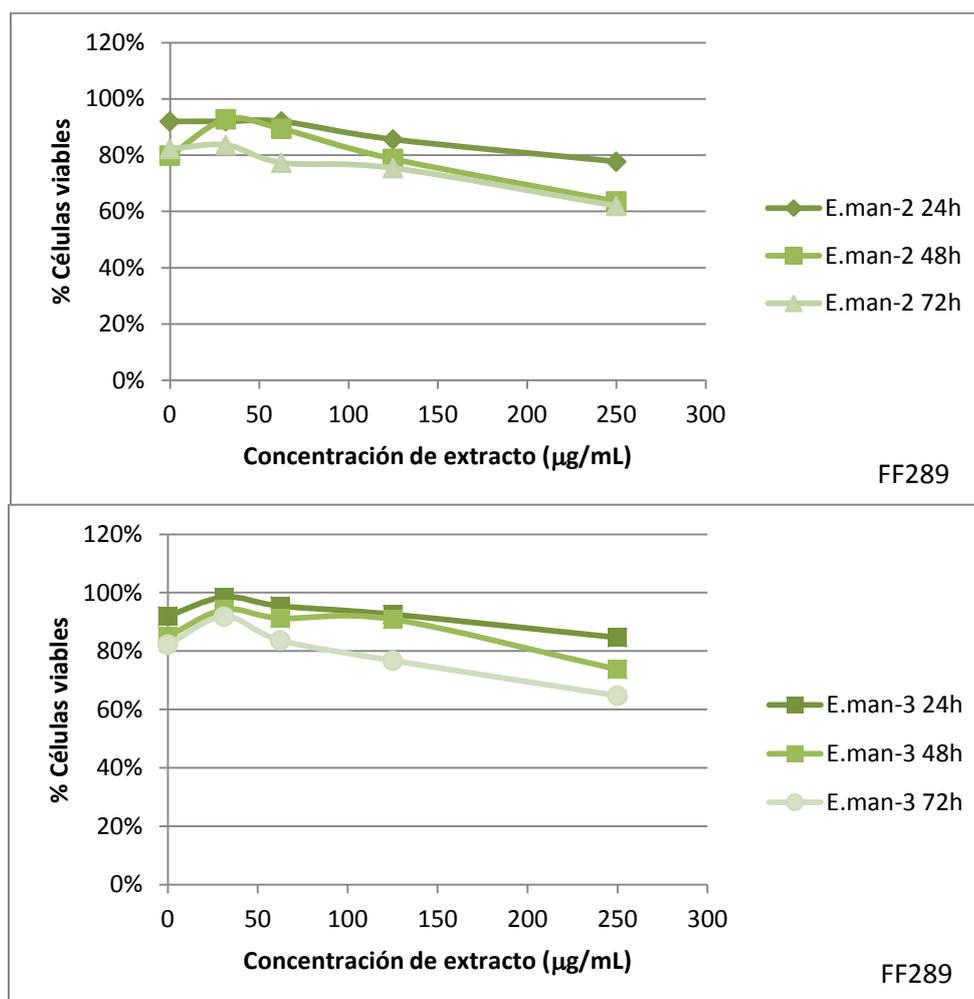


Figura 24. Citotoxicidad de extractos vegetales de *Eugenia mansoni* O Berg frente a fibroblastos FF287 luego de 24, 48 y 72 h de incubación.

Queratinocitos KP#9: El extracto acetónico presentó $IC_{50} = 250 \mu\text{g/mL}$ mientras que la supervivencia de queratinocitos en el extracto diclorometánico es menor en un 5% aproximadamente en los tres períodos.

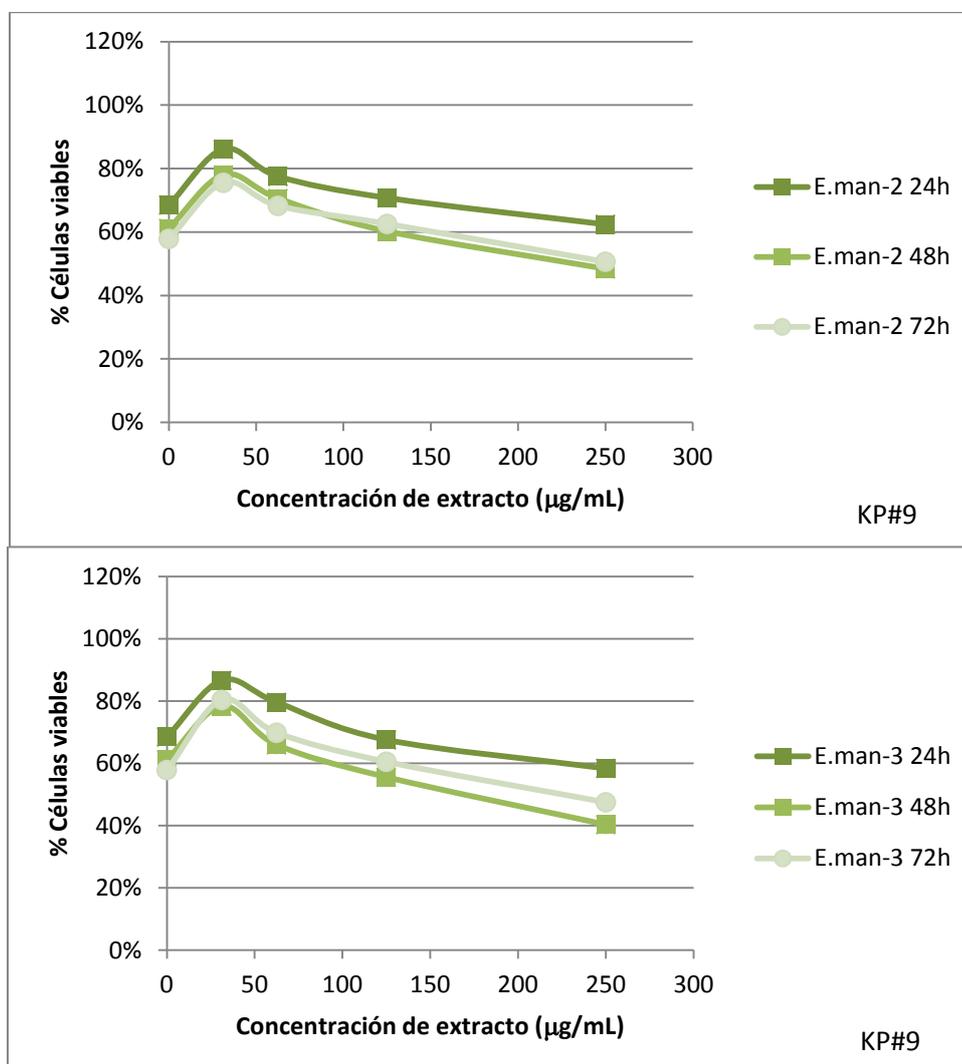
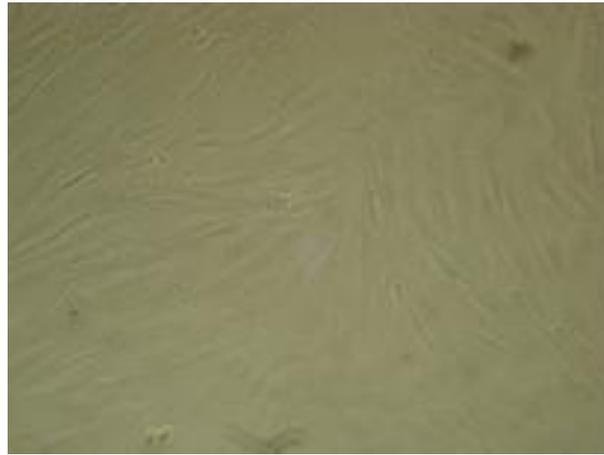


Figura 25. Citotoxicidad de extractos vegetales de *Eugenia mansoni* O Bergh frente a queratinocitos KP#9 luego de 24, 48 y 72 h de incubación.

La observación de fibroblastos FF287 al microscopio durante el proceso al que se someten las células en el ensayo reveló células de aspecto fusiforme con algunas prolongaciones citoplasmáticas o formas estrelladas; la morfología se modificó a concentraciones altas de extractos vegetales y por efecto del DMSO, siendo la forma predominante redondeada o picnótica correspondiente a fibroblastos muertos o inviables, Figura 23. Los queratinocitos KP#9 son células de lento crecimiento y no se observó cambios morfológicos sutiles a medida que transcurría el tiempo máximo de incubación (72 h), aunque se observó el cambio muy pronunciado entre células viables típicas -redondeadas o poligonales- y células no viables no adheridas.



a)



b)



c)

Figura 26. Observación microscópica de fibroblastos FF287 (x40): a) fibroblastos en ausencia de extracto vegetal, b) fibroblastos con extracto diclorometánico de hojas de *Eugenia mansoni* O. Berg en concentración 250 µg/mL 48 h de incubación, se observa el característico ablonamiento celular, c) fibroblastos con DMSO 10%

5.7. CONCLUSIONES

La presente investigación contribuyó al conocimiento de la biodiversidad de la flora nativa uruguaya en la zona norte del río Uruguay y río Queguay, Departamento de Paysandú, a través de los siguientes trabajos:

Relevamiento de especies en el bosque galería sobre el río Uruguay.

Colecta de plantas de 56 especies pertenecientes a 18 familias botánicas, identificadas por el Botánico F. Haretche y un *voucher specimen* depositado en el *Herbarium* del Museo y Jardín Botánico "Atilio Lombardo" (MVJB) de Montevideo.

Las plantas fueron acondicionadas y se prepararon extractos vegetales representativos con el fin de realizar un estudio bioprospectivo por su actividad antifúngica.

Se seleccionó una batería de ensayos cuali-cuantitativos, sencillos, rápidos y de bajo costo para el tamizaje de los extractos vegetales.

Las técnicas fueron puestas a punto para extractos vegetales y compuestos puros, y comprendieron aspectos relativos a la selectividad de su capacidad antifúngica, caracterización de su bioactividad y su modo de acción.

La colección de cepas fúngicas expresa la preocupación particular de los investigadores acerca de los agentes etiológicos presentes en la población uruguaya. El panel de cepas de colección internacional y aislados clínicos de hongos patógenos humanos utilizados en los ensayos fue representativo, incluyendo hongos levaduriformes, filamentosos y dermatofitos de gran importancia médica por su mortalidad o morbilidad.

Se desarrolló un método de ajuste de suspensiones de esporas de *Aspergillus niger* para facilitar los ensayos, construyendo una escala de suspensiones de partículas de carbón en tween, a 100 años de la construcción de la escala McFarland de uso habitual en los laboratorios del mundo.

Como resultado de la bioprospección:

Se obtuvo información relativa a la metodología de colecta ya que las especies cuyas plantas fueron colectadas poseían en general información etnobotánica o etnofarmacológica que ameritaba comprobar su *status* medicinal. En ese sentido

se descartó en tres casos el conocimiento popular de su utilización y a la vez aumentó en un 20% la eficacia en la búsqueda de plantas con actividad antifúngica. Sin duda la presente información contribuye a dar razones farmacéuticas para el aprovechamiento sustentable del monte nativo.

La selección natural de los extractos vegetales de acuerdo a resultados de los ensayos condujo al estudio particular de cuatro especies del género *Eugenia*. Los extractos acetónico y diclorometánico de *Eugenia masoni* O. Berg resultaron activos contra cepas de *Candida albicans* y dermatofitos, con valores de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) por debajo del límite considerado de práctica por la comunidad científica (Zacchino 2007); sumado a su acción fungicida hacen muy interesante la continuación del trabajo.

En relación a *Eugenia masoni* O. Berg, el fraccionamiento de sus extractos y la verificación de efecto sinérgico de sus fracciones sugiere la posibilidad de optimizar el extracto en vez de realizar un trabajo de Farmacognosia clásico, por lo menos en este punto de la investigación. Fue necesario conocer su desempeño frente a células *ad hoc* del tejido afectado (piel), y se procedió a realizar ensayos de citotoxicidad variando células, concentración de los extractos vegetales y tiempo de incubación; resultando extractos vegetales muy adecuados por cuanto inocuos, por lo menos a la máxima concentración ensayada. Si se considera actividad antifúngica y citotoxicidad, ya permite apreciar una ventana terapéutica.

Las Mirtáceas sudamericanas ofrecen ciertas dificultades de reconocimiento e identificación. Un problema resuelto en parte, es la ubicación de un marcador quimiotaxonómico mediante un ensayo (HPLC) recomendado por farmacopeas.

La especie *Eugenia masoni* O. Berg no es dudosa pero es poco frecuente en el Uruguay. La producción de extracto vegetal que permita continuar los estudios plantea un nuevo desafío.

Publicaciones

Relativas a las plantas

Vázquez, A., Olivaro C., Bertucci A., Haretche F. (2007) Prospección Química del bosque de galería del río Uruguay. *BLACPMA* **6**(5), 264-265.

Vázquez, A., Olivaro C., Bertucci A., Haretche F. (2007) Actividad antimicrobiana de plantas del bosque de galería del río Uruguay. *BLACPMA* **6**(6), 317-318.

Ana Bertucci, Federico Haretche, Cristina Olivaro, Alvaro Vázquez (2008) Triagem fitoquímica de plantas nativas do rio Uruguai. *Rev Bras Farmacogn* **18**(1), 21-25.

Ana Bertucci, Cristina Olivaro, Pedro Almeida da Silva, Daniela Ramos, Maria Pia Cerdeiras, Alvaro Vázquez (2009) Initial antimicrobial activity studies of plants of the riverside forests of the southern Uruguay River. *Rev Bras Farmacogn* **19**(1A), 20-25.

Stephanie Barneche, Ana Bertucci, Federico Haretche, Cristina Olivaro, María Pía Cerdeiras, Alvaro Vázquez (2010) Prospección química y microbiológica del bosque de galería del río Uruguay. *Rev Bras Farmacogn* **20**(6), 878-885.

Relativas a La Metodología

Gabriel Sagrera, Ana Bertucci, Alvaro Vázquez, Gustavo Seoane (2011) Synthesis and antifungal activities of natural and synthetic biflavonoids. *Bioorgan Med Chem* **19**, 3060-3073.

Gonzalo Carrau, Carine C. Drewes, Ana Lúcia B. Shimada, Ana Bertucci, Sandra H.P. Farsky, Helio A. Stefani, David González (2013) Synthesis and preliminary biological evaluation of a compound library of triazolylcyclitols. *Bioorgan Med Chem* **21**, 4225-4232.

Ana Bellomo, Ana Bertucci, Victoria de la Sovera, Gonzalo Carrau, Marcela Raimondi, Susana Zacchino, Hélio Stefani and David González (2013) Antifungal activity of a Library of ciclitols and related compounds. *Lett Drug Des Discov* **10**, on press.

Presentaciones en Congresos

Bertucci, A. Vázquez, A. (2008) Mc Farland revisitado: un método sencillo de ajuste de concentración de esporas de *Aspergillus niger*. POSTER, Encuentro Nacional de la Sociedad Uruguaya de Microbiología (SUM), Montevideo, Uruguay.

Barneche, S.; Bertucci, A.; Haretche, F.; Olivaro, C.; Vázquez, A. (2010) Bioprospección como herramienta de conservación, POSTER V Congreso Nacional de Áreas Naturales Protegidas, Montevideo, Uruguay.

Cursos

Curso de Posgrado teórico-práctico “Método bioautográficos” (40 h)
Responsable de curso.

- PUC-Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil. 2009.
- Universidad Nacional de Tucumán (UNT), San Miguel de Tucumán, Argentina. 2011.

REFERENCIAS

- Adriaenssens, N ; Coenen, S ; Muller, A ; Vankerckhoven, V ; Goossens, H; Esac, P (2010). "European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC): outpatient systemic antimycotic and antifungal use in Europe." *J Antimicrob Chemother* **65**: 769-774.
- Akins, R (2005). "An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*." *Med Mycol* **42**: 285-318.
- Albornoz, H ; Medina, J ; Nadales, P ; Limogi, G; Correa, H (2009). Infecciones Nosocomiales en Cuidados Intensivos en Uruguay: INBARCI 2004. 1er Congreso uruguayo de Infectología. Montevideo, Facultad de Medicina (UdelaR).
- Albuquerque, U; Hanazaki, N (2006). "As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas." *Rev Bras Farmacogn* **16**(Supl.): 678-689.
- Almeida, S, Ed. (2008). *Micologia*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S.A.
- Alonso, J, Ed. (1998). *Tratado de fitomedicina : Bases clínicas y farmacológicas*. Buenos Aires, ISIS.
- Alonso, J; Desmarchelier, C, Eds. (2005). *Plantas autóctonas medicinales de la Argentina*. Buenos Aires, LOLA.
- Alonso Paz, E; Bassagoda, M (2002). "Aspectos fitogeográficos y diversidad biológica de las formaciones boscosas del Uruguay." *Ciencia & Ambiente* **24**: 35-50.
- Alonso Paz, E ; Bassagoda, M; Ferreira, F, Eds. (2009). *Yuyos. Uso racional de las plantas medicinales*. Montevideo, Fin de Siglo.
- Alonso Paz, E ; Cerdeiras, M ; Fernández, J ; Ferreira, F ; Moyna, P ; Soubes, M ; Vázquez, A ; Vero, S; Zunino, L (1995). "Screening of uruguayan medicinal plants for antimicrobial activity. Part I." *J Ethnopharmacol* **45**(1): 67-70.
- Alves, J ; Martins, F; Valente, G (2007). "Composição florística e espectro biológico na estação ecológica de Santa Bárbara, Estado de São Paulo, Brasil." *Rev Árv* **31**(5): 907-922.
- Álvez, A ; Figueras, C; Roselló, E (2010). "Infecciones fúngicas invasivas emergentes." *An. Pediatr (Barc.)* **73**(1): 52.e51-52.e56.
- Allen, U (2010). "Antifungal agents for the treatment of systemic fungal infections in children." *Paediatr Child Health* **15**(9): 603-608.
- Antoniadou, A; Kontoyiannis, D (2003). "Status of combination therapy for refractory mycoses." *Curr Opin Infect Dis* **16**: 539-545.
- Apel, M ; Sobral, M ; Schapoval, E ; Henriques, A ; Menut, C; Bessiere, J (2004). "Essential oil composition of *Eugenia florida* and *Eugenia mansoi*." *Journal of Essential Oil Research* **16**(4): 321-322.

- Arellano, M ; Durán, A; Pérez, P (1996). "Rhol GTPase activates the (1-3)-D-glucan synthase and is involved in *Schizosaccharomyces pombe* morphogenesis." The EMBO Journal **15**: 4584-4592.
- Arrillaga De Maffei, B (1969). Plantas medicinales. Nuestra Tierra. Montevideo, Publicaciones del Uruguay: 60.
- Arrillaga De Maffei, B, Ed. (1997). Plantas usadas en medicina natural. Montevideo, Hemisferio Sur.
- Avendaño, M, Ed. (2001). Introducción a la Química Farmacéutica. Madrid, McGraw-Hill, Interamericana de España S.A.
- Balzarini, J ; Van Laethem, K ; Daelemans, D ; Hatse, S ; Bugatti, A ; Rusnati, M ; Igarashi, Y ; Oki, T; Schols, D (2007). "Pradimicin A, a carbohydrate-binding nonpeptidic lead compound for treatment of infections with viruses with highly glycosylated envelopes, such as human immunodeficiency virus." J Virol **81**(1): 362-373.
- Ballesté, R ; Arteta, Z ; Fernández, N ; Mier, C ; Mousqués, N ; Xavier, B ; Cabrera, M ; Acosta, G ; Combol, A; Gezuele, E (2005). "Evaluación del medio cromógeno CHROM agar *Candida*TM para la identificación de levaduras de interés médico." Rev Med Uru **21**: 186-193.
- Ballesté, R ; Barloco, A ; Petruchelli, S ; Perelló, G ; Mier, C ; Combol, A; Gezuele, E (2006). "Frecuencia de especies de *Trichophyton* en dermatofitosis diagnosticadas en el Hospital de Clínicas Dr. Manuel Quintela." Rev Urug de Patol Clin **40**: 10-24.
- Ballesté, R ; Fernández, N ; Calegari, L; Gezuele, E (2000). "Pitiriasis versicolor en lactantes." Rev Med Uru(16): 257-260.
- Ballesté, R ; Fernández, N ; Mousqués, N ; Xavier, B ; Arteta, Z ; Mernes, M; Gezuele, E (2000). "Dermatofitosis en población asistida en el Instituto de Higiene." Rev Med Uru **16**(232-242).
- Ballesté, R ; Mousqués, N; Gezuele, E (2003). "Onicomiosis. Revisión del tema." Rev Med Uru **19**: 93-106.
- Barneche, S ; Olivaro, C ; Bertucci, A ; Haretche, F ; Cerdeiras, M; Vázquez, A (2010). "Prospección química y microbiológica del bosque de galería del río Uruguay." Rev Bras Farmacogn **20**(6): 878-885.
- Basmadján, Y ; Acuña, A ; De Mello, A ; Mañana, R; Sanabria, D (2002). Onicomiosis por mohos del género *Scopulariopsis*. Una patología no tan infrecuente. Clínica., Icdp. Montevideo, Médica Uruguaya. **35**: 32.
- Bellmann, R (2007). "Clinical pharmacokinetics of systemically administered antimycotics." Curr Clin Pharmacol **2**: 37-58.
- Boulogne, I ; Petit, P ; Ozier, H ; Desfontaines, L; Loranger, G (2012) "Insecticidal and antifungal chemicals produced by plants: a review." Environ Chem Lett DOI: 10.1007/s10311-012-0359-1.

- Braselli, A (2000). Aspergilosis. Revisión de Temas. Médica, Montevideo, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina.
- Braselli, A (2000). Histoplasmosis. Revisión de temas Médica, Montevideo, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina.
- Brohem, C ; Sawada, T ; Massaro, R ; Almeida, R ; Rivelli, D ; Ropke, C ; Da Silva, V ; De Lima, T ; Curi, R ; Barros, S; María-Engler, S (2009). "Apoptosis induction by 4-nerolidylcatechol in melanoma cell lines." *Toxicol in Vitro* **23**: 111-119.
- Brunton, L ; Lazo, J; Parker, K, Eds. (2006). Goodman & Gilman's The pharmacological bases of the therapeutics. Colombia, The McGraw-Hill companies, Inc.
- Cabrera, A, Ed. (1978). Manual De La Flora De Los Alrededores De Buenos Aires. 1er. Ed. 1953. 2da. Ed. 1978, ACME.
- Cabrera, A; Zardini, E, Eds. (1978). Manual de la flora de los alrededores de Buenos Aires. Buenos Aires, ACME.
- Calegari, L ; Salvatella, R ; Gezuele, E ; Zanetta, E ; Acuña, A ; Ballesté, R ; Basmadján, Y ; Rosa, R ; Puime, A ; Arteta, Z ; Russi, C ; Xavier, B ; Risso, M ; Cabrera, M ; González Arias, M ; Combol, A ; Acosta, G ; Da Rosa, W ; González Curbelo, M; Liporace, Y (2004). Enfermedades parasitarias y micóticas en Uruguay. MSP/Udelar. Montevideo: 1-22.
- Caracha, O ; Calentano, C ; Sommaruga, L ; Carmona, C ; Gezuele, E; Mautone, G (1992). Un aporte al conocimiento de la prevalencia de las micosis del pie en deportistas. Material de divulgación médica. Roemmers, Montevideo: 1-23.
- Carrere, R (1990). Desarrollo forestal y medio ambiente en Uruguay. 2. El bosque natural uruguayo: caracterización general y estudios de caso. Centro Interdisciplinario De Estudios Sobre El Desarrollo, Montevideo, Ministerio de Educación y Cultura. **72**: 1-105.
- Carrillo-Muñoz, A ; Giusiano, G ; Ezkurra, P; Quindós, G (2006). "Antifungal agents: mode of action in yeast cells." *Rev Esp Quimioter* **19**(2): 130-139.
- Casadevall, A (2006). "The third age of antimicrobial therapy" *Clin Infect Dis* **42**: 1414-1416.
- Casadevall, A; Perfect, J (1998). *Cryptococcus neoformans*. Washington, USA, American Society of Microbiology: 98.
- Casalinuovo, I ; Di Francesco, P; Garaci, E (2004). "Fluconazole resistance in *Candida albicans*: a review of mechanisms." *Eur Rev Med Pharm Sc* **8**: 69-77.
- Casnati, B ; Papone, V ; Cuestas, M ; Lorenzo, S ; Alvarez, R; Massa, F (2011). "Valoración del tratamiento local de la candidosis oral. Correlación etiológica." *Odontoestomat* **XIII**(18): 66-75.
- Catalán, M; Montejo, J (2006). "Antifúngicos sistémicos. Farmacodinamia y farmacocinética." *Rev Iberoam Micol* **23**: 39-49.

- Cátedra De Enfermedades Infecciosas (2012). Blog del Instituto de Higiene. Instituto De Higiene, Facultad de Medicina. Montevideo, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina. **2011**: Hongos oportunistas, Micosis profundas.
- CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute (2008). M27-A3. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of Yeasts, approved standard. Wayne, Pennsylvania.
- CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute (2008). M38-A2. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi, approved standard. Wayne, Pennsylvania.
- CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute (2009). M44-A2. Methods for antifungal disk diffusion susceptibility testing of Yeasts, approved guideline. Wayne, Pennsylvania.
- CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute (2010). M51-A. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of nondermatophyte filamentous fungi, approved guideline. Wayne, Pennsylvania. Wayne, Pennsylvania.
- Cohen, B (2010). "Amphotericin B Membrane Action: Role for Two Types of Ion Channels in Eliciting Cell Survival and Lethal Effects." *J Membrane Biol* **238**: 1-20.
- Díaz Arnesto, L. Coord., Mesa del Sector Farmacéutico, Comisión Social Consultiva (2004) Escenarios posibles de desarrollo del Sector Farmacéutico de producción nacional. Reporte de Facultad de Química (UdelaR), Montevideo. http://www.funcex.org.br/material/REDEMERCOSUL_BIBLIOGRAFIA/biblioteca/ESTUDOS_URUGUAY/URY_14.pdf
- Conti Díaz, I (2001). "Enfermedades emergentes y reemergentes en Uruguay." *Rev Med Urug* **17**: 180-199.
- Conti Díaz, I (2006). "Micosis superficiales." *Biomed* **1**(2): 15-34.
- Conti Díaz, I (2008). "La vía inhalatoria de infección en el ratón y su relevancia en la dilucidación de la patogenia de algunas micosis profundas. Análisis de estudios pioneros realizados en Uruguay." *Rev Med Urug* **24**: 56-61.
- Conti Díaz, I (2009). "Nuevas formas clínicas o etiopatogénicas de afecciones cutáneas descritas recientemente en Uruguay. Evolución de su conocimiento luego de las publicaciones originales." *Rev Med Urug* **25**: 131-132.
- Conti Díaz, I (2010). "A propósito del centenario del descubrimiento de la paracoccidiodomicosis. Principales hitos de la evolución de su conocimiento con especial énfasis en las contribuciones científicas nacionales." *Rev Med Urug* **26**: 45-50.
- Conti Díaz, I (2011). "La termoterapia local como tratamiento de la esporotricosis cutánea. Actualización de la experiencia acumulada a nivel internacional." *Rev Med Urug* **27**: 50-55.
- Conti Díaz, I, Mañé, F (2008). "Historia del favus (tiña fávica) en Uruguay y de la demostración de su naturaleza microbiológica." *Rev Med Urug* **24**: 278-282.

- Conti Díaz, I (1980). "Micetomas y procesos premicetomatosos en el Uruguay." *Mycopath* **72**(1): 59-64.
- Conti Díaz, I (1987). "Esporotricosis." *Rev Med Urug* **3**: 135-147.
- Copetti, V, Ed. (1918). *Tratado teórico práctico de Farmacognosia, con una relación circunstanciada de las plantas medicinales comunes del Uruguay*. Montevideo, Monteverde.
- Córdoba, S ; Vivot, W ; Bosco-Borge, M ; Taverna, C ; Szusz, W ; Murisengo, O ; Isla, G ; Davel, G. Red Nacional De Laboratorios De Micología (2011). "Species distribution and susceptibility profile of yeasts isolated from blood cultures: results of a multicenter active laboratory-based surveillance study in Argentina." *Rev Arg Microbiol* **43**(176-185).
- Cosme, V ; Breijo, M; Laca, H. (2000). "Neumocistosis pulmonar en enfermos con SIDA." *Revisión de Temas* 10/12/2012, http://www.infecto.edu.uy/Espanol/revisiontemas/indice_tema.htm.
- Chakrabarti, A; Shivaprakash, M (2005). "Microbiology of systemic fungal infections." *J Postgrad Med* **51**: 16-20.
- Chifa, C; Ricciardi, A, Eds. (2001). *Planta de uso en medicina vernácula del centro del Chaco argentino*. Tucumán, Fundación Miguel Lillo.
- Chifa, C; Ricciardi, A, Eds. (2011). *Plantas medicinales usadas por las comunidades aborígenes del Chaco argentino*. Tucumán, Ediciones Elemento.
- Da Silva Filho, A ; Albuquerque, S ; Silva, M ; Eberlin, M ; Tomazela, D; Bastos, J (2004). "Tetrahydrofuran lignans from *Nectandra megapotamica* with trypanocidal activity. ." *J Nat Prod* **67**: 42-45.
- Da Violante, G ; Zerrouk, N ; Richard, I ; Provot, G ; Chaumeil, J; Arnaud, P (2002). "Evaluation of the Cytotoxicity Effect of Dimethyl Sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 Colon Tumor Cell Cultures." *Biol Pharm Bull* **25**(12): 1600-1603.
- David-Pfeuty, T ; Simon, C; Pantaloni, D (1979). "Effect of antimetabolic drugs on Tubulin GTPase activity and selfassembly." *J Biol Chem* **254**(22): 11696-11702.
- Davyt, D ; Dellacassa, E ; Ferreira, F ; Menéndez, P ; Moyna, P; Vázquez, A (1991). "Phytochemical screening of uruguayan medicinal plants." *Fitoter* **LXII**(6): 519-521.
- De Lucca, A; Walsh, T (2000). "Antifungal peptides: Origin, activity, and therapeutic potential." *Rev Iberoam Micol* **17**: 116-120.
- De Lucca, D; Zalles, A, Eds. (1992). *Flora medicinal Boliviana*. La Paz, Los amigos del libro.
- Deacon, J, Ed. (2006). *Fungal biology*. Malden (USA), Oxford (UK), Blackwell Publishing Ltd.
- Del Palacio, A (2008). "Anidulafungina: nueva equinocandina para el tratamiento de micosis." *Rev Iberoam Micol* **25**: 74-77.

- Denizot, F; Lang, R (1986). "Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modification to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability." *J Immunol Meth* **89**: 271-277.
- Denning, D (2003). "Echinocandin antifungal drugs." *Lancet* **362**(9390): 1142-1151.
- Develoux, M (2001). "Griseofulvine." *Ann Dermatol Venérol* **128**(12): 1317-1325.
- Díaz Sánchez, CLópez Viña, A (2004). "Aspergillus y pulmón." *Arch Bronconeumol*. **40**(3): 114-122.
- Díez Fernández, J (1997). "Micetoma (pie de Madura o maduromicosis). Perlas diagnósticas en los diferentes granos que producen micetomas." *Patol* **35**(2): 153-157.
- Diezi, T; Kwon, G (2012). "Amphotericin B/Sterol Co-loaded PEG-Phospholipid Micelles: Effects of Sterols on Aggregation State and Hemolytic Activity of Amphotericin B." *Pharm Res* **29**: 1737-1744.
- Dismukes, W (2000). "Introduction to Antifungal Drugs." *Clin Infect Dis* **30**: 653-657.
- Dodgson, A ; Dodgson, K ; Pujol, C ; Pfaller, M; Soll, D (2004). "Clade specific flucytosine resistance is due to a single nucleotide change in the *FUR1* gene of *Candida albicans*." *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 2223-2227.
- Dutra, A ; Mansilla, M ; Ballesté, R ; Gezuele, E; Braselli, A. (2000). "Aspergilosis en pacientes con SIDA." *Revisión de Temas*, http://www.infecto.edu.uy/espanol/revisiontemas/indice_tema.htm.
- Dynarowicz-Łątka, P ; Miñones, J ; Conde, O ; Casas, M; Iribarnegaray, E (2005). "BAM studies on the penetration of amphotericin B into lipid mixed monolayers of cellular membranes." *Appl Surf Sci* **246**(4): 334-341.
- Eisenbrand, G ; Pool-Zobel, B ; Baker, V ; Balls, M ; Blaauboer, B ; Boobis, A ; Carere, A ; Kevekordes, S ; Lhuguenot, J ; Pieters, R; Kleiner, J (2002). "Methods of *in vitro* toxicology." *Food Chem Toxicol* **40**: 193-236.
- Elewski, B ; Cáceres, H ; DeLeon, L ; El Shimy, S ; Hunter, J ; Korotkiy, N ; Rachesky, I ; Sanchez-Bal, V ; Todd, G ; Wraith, L ; Cai, B ; Tavakkol, A ; Bakshi, R ; Nyirady, J; Friedlander, S (2008). "Terbinafine hydrochloride oral granules versus oral griseofulvin suspension in children with tinea capitis: results of two randomized, investigator-blinded, multicenter, international, controlled trials." *J Am Acad Dermatol* **59**(1): 41-54.
- Ellis, D (2002). "Amphotericin B: spectrum and resistance." *J Antimicrob Chemother* **49**(Suppl 1): 7-10.
- Ernst, E; Rogers, P, Eds. (2005). *Antifungal agents. Methods and Protocols. Methods in Molecular Medicine*. Totowa, Humana Press Inc.
- Espinell-Ingroff, A (2008). "Mechanisms of resistance to antifungal agents: yeasts and filamentous fungi." *Micol* **25**(2): 101-106.

- Espinel-Ingroff, A (2009). "Novel antifungal agents, targets or therapeutic strategies for the treatment of invasive fungal diseases: a review of the literature (2005-2009)." *Rev Iberoam Micol* **26**(1): 15-22.
- Espinel-Ingroff, A; Kerkering, T (1991). "Spectrophotometric method of inoculum preparation for the *in vitro* susceptibility testing of filamentous fungi." *J Clin Microbiol* **33**: 1302-1307.
- EUCAST European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2008). EUCAST Definitive Document E Def 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts.
- EUCAST European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2008). EUCAST Definitive Document E.DEF 9.1: Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds.
- FAO Food and Agriculture Organization, Economic and Social Development Department (2008). Trade in Medicinal plants. Corporate Document Repository: <http://www.fao.org/docrep/008/af285e/af285e00.HTM>.
- Fariñas, M ; Fernández-Sampedro, M; Armiñanzas, C (2012). "Formas clínicas y tratamiento de las infecciones causadas por otros hongos filamentosos." *Enferm Infecc Microbiol Clin* **30**(7): 414-419.
- Fernández, N ; Ballesté, R ; Xavier, B ; Mousqués, N ; Arteta, Z ; Mernes, M; Gezuele, E (1999). Micosis oportunistas. Patología de renovado costo económico y social. Seminario: Enfermedades parasitarias en Uruguay, sus fundamentos y consecuencias sociales y económicas, OPS/OMS. Ed. Facultad de Medicina (UdelaR): 37-46.
- Fernández, N ; Ballesté, R ; Xavier, B ; Sabaño, S ; Mousqués, N; Gezuele, E (1999). "Diagnóstico de pneumocistosis en pacientes infectados con el virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) a partir de lavados bronquioloalveolares." *Rev Med Uru* **15**: 209-213.
- Fernández, N ; Ballesté, R ; Xavier, B ; Sabaño, S ; Mousques, N; Gezuele, E (2000). 2º Premio Revista Médica-Roemmers. Uruguay, CASMU & ROEMMERS: 19.
- Ferrándiza, C ; Bielsaa, I; Ferrandiz, L (2006). "Micosis cutáneas en la edad pediátrica." *Med Clín* **126**(Supl.1): 37-42.
- Flemming, H; Wingender, J (2010). "The biofilm matrix." *Nat Rev Microbiol* **8**: 623-633.
- Forbes, B ; Sahm, D; Weissfeld, A, Eds. (2007). *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. Richmond, Mosby.
- FUNDAQUIM, RED PROPYMES, URU TEC, FUNDASOL, GTZ (2005) Aportes para el desarrollo del Sector de Plantas Medicinales y Aromáticas en el Uruguay. Artes Gráficas SA, Montevideo, 134 p.
- Fortún, J (2011). "Actualización en terapia antifúngica: nuevos fármacos e indicaciones." *Enferm Infecc Microbiol Clin* **29**(Supl. 5): 38-44.

- Garcéz, F ; Garcéz, W ; Hamerski, L; Miguita, C (2009). "Phenylpropanoids and other bioactive constituents from *Nectandra megapotamica*." Quim Nova **32**: 407-411.
- García, C ; Upton, A ; Kirby, K; Marr, K (2008). "Epidemiology of invasive mold infections in allogeneic stem cell transplant recipients: biological risk factors for infection according to time after transplantation." Clin Infect Dis **47**: 1041-1050.
- García, S ; García, C ; Heinzen, H; Moyna, P (1996). The chemical basis of the resistance of cereal sedes to pathogenic fungi. Proceeding of the IFS Workshop in "Techniques in plant-insects interactions and biopesticides". Stockolm, IFS.
- Gezuele, E (2001). Las Enfermedades Transmisibles en el Uruguay. Enfoque actual en Salud Humana de las Enfermedades Micóticas en el Uruguay. MSP/UdelaR, Instituto de Higiene. **1**: 38-43.
- Gezuele, E; Da Rosa, D (2005). "Relevancia del cuerpo asteroide esporotricósico en el diagnóstico rápido de la esporotricosis." Rev Iberoam Micol **22**: 147-150.
- Ghannoum, M ; Chaturvedi, V ; Espinel-Ingroff, A ; Pfaller, M ; Rinaldi, M ; Lee-Yang, W; Warnock, D (2004). "Intra- and interlaboratory study of a method for testing the antifungal susceptibilities of dermatophytes." J Clin Microbiol **42**(7): 2977-2979.
- Ghannoum, M ; Spellberg, B ; Ibrahim, A ; Ritchie, J ; Currie, B ; Spitzer, E ; Edwards, J; Casadevall, A (1994). "Sterol composition of *Cryptococcus neoformans* in the presence and absence of Fluconazole." Antimicrob Agents Chem: 2029-2033.
- González, A ; Ferreira, F ; Vázquez, A ; Moyna, P; Alonso Paz, E (1993). "Biological screening of uruguayan medicinal plants." J Ethnopharmacol **39**: 217-220.
- González, C (2011). "Arquitectura foliar de las especies de Myrtaceae nativas de la flora argentina III: grupo *Eugenia*. ." Bol Soc Argent Bot **46**(1-2): 85-104.
- Goyeneche, B, Ed. (1906). Diccionario de medicina rural o sea, propiedades medicinales de las plantas del país. Paysandú, Vázquez-Gómez.
- Grela, I (2004). Geografía florística de las especies arbóreas del Uruguay: propuesta para la delimitación de dendrofloras. . Facultad de Agronomía. Montevideo, Universidad de la República. Maestría en Ciencias Biológicas, opción Botánica: 97.
- Groll, A; Tragiannidis, A (2010). "Update on antifungal agents for paediatric patients." Clin Microbiol Inf **16**(9): 1343-1353.
- Gubbins, P; Anaissie, E (2009). Antifungal Therapy. Clin Mycol. Anaissie, M, Pfaller, Elsevier Inc.: 161-195.
- Guirado, M ; Quijano, A ; Arteta, Z; Ballesté, R (2009). Criptococosis por *Cryptococcus gattii* en un paciente inmunocompetente. Primer aislamiento en Uruguay., Departamento Clínico de Medicina, Departamento de Laboratorio Clínico, Hospital de Clínicas (UdelaR).
- Gupta, M, Ed. (1995). 270 Plantas medicinales iberoamericanas. Bogotá, CYTED.

- Gurib-Fakim, A (2006). "Medicinal plants: Traditions of yesterday and dugs for tomorrow." *Molec Aspects Med* **27**: 1-93.
- Hadacek, F; Greger, H (2000). "Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choise." *Phytochem Anal* **11**: 137-147.
- Harborne, J; Turner, B, Eds. (1984). *Plant Chemosystematics*. Michigan, Academic Press.
- Havlickova, B ; Czaika, V; Friedrich, M (2009). "Epidemiological trends in skin mycoses worldwide." *Mycoses* **52**(1): 95-108.
- Hayon, T ; Dvilansky, A ; Shpilberg, O; Nathan, I (2003). "Appraisal of the MTT-based assay as a useful tool for predicting drug chemosensitivity in leukemia." *Leuk Lymphoma* **44**(11): 1957-1962.
- Heinrich, M ; Edwards, S ; Moerman, D; Leonti, M (2009). "Ethnopharmacological field studies: a critical assessment of their conceptual basis and methods." *J Ethnopharmacol* **124**: 1-17.
- Heitman, J (2011). "Microbial pathogens in the fungal kingdom." *Fungal Biol Rev* **25**(48-60).
- Hincapié García, J (2010). "Farmacoeconomía en la antibióticoterapia." *Biomed* **V**(1): 13-22.
- Hirano, M ; Takeuchi, Y ; Matsumori, N ; Murata, M; Ide, T (2011). "Channels formed by Amphotericin B covalent dimers exhibit rectification. ." *J Membrane Biol* **240**: 159-164.
- Holzheimer, R; Dralle, H (2002). "Management of mycoses in surgical patients. Review of the literature." *Eur J Med Res* **31**(7 (5)): 200-226.
- INE Instituto Nacional de Estadística (2002). *Variables estadísticas relevantes durante el Siglo XX: Salud*. Montevideo, INE.
- James, T (2006). "Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny." *Nat* **443**: 818-822.
- Jozami, J; Muñoz, J, Eds. (1983). *Árboles y arbustos indígenas de Entre Ríos*. Santa Fe, CONICET.
- Keserü, G; Makara, G (2009). "The influence of lead discovery strategies on the properties of drug candidates." *Nat Rev/Drug Disc* **8**: 203-212.
- Kirsch, D; Lai, M (1986). "A modified screen for the detection of cell wall-acting antifungal compounds." *J Antib* **XXXIX**(11): 1620-1622.
- Koneman, E, Ed. (2006). *Koneman: Texto y Atlas en color*. Buenos Aires, Editorial Médica Panamericana.
- Kurdelas, R ; Lima, B ; Tapia, A ; Feresin, G ; Sierra, M ; Rodríguez, M ; Zacchino, S ; Enriz, R; Freile, M (2010). "Antifungal activity of extracts and prenylated coumarins isolated from *Baccharis darwinii* Hook & Arn. (Asteraceae)." *Molecules* **15**: 4898-4907.

- La Torre-Cuadros, M; Albán, J (2006). Etnobotánica en los Andes del Perú. Botánica Económica de los Andes Centrales. Moraes, O, Kvist, Borchsenius, Balslev. La Paz, Universidad Mayor de San Andrés: 239-245.
- Lackner, G ; Schenk, A ; Xu, Z ; Reinhardt, K ; Yunt, Z ; Piel, J; Hertweck, C (2007). "Biosynthesis of pentangular polyphenols: deductions from the benastatin and griseorhodin pathways." J Am Chem Soc **129**: 9306-9312.
- Lahitte, H ; Hurrel, J ; Belgrano, M ; Jankowski, L ; Haloua, P; Mehlreter, K, Eds. (1998). Plantas medicinales rioplatenses : Plantas nativas y naturalizadas utilizadas en medicina popular en la región del Delta del Paraná, Isla Martín García y ribera platense. Buenos Aires, LOLA.
- Leites, O ; Menna, M ; Abruzzi, M ; Dutra, R; Strehl, T (1987). "Florística em áreas da margen direita do baixo Jacuí, RS, Brasil." Acta Bot Bras **1**(2): 101-121.
- Liang, H (2008). "Sordarin, an antifungal agent with a unique mode of action." Beilstein J Org Chem **4**(31): 1-14.
- Lignell, A ; Lowdin, E ; Cars, O ; Sanglard, D; Sjolín, J (2011). "Voriconazole-induced inhibition of the fungicidal activity of Amphotericin B in *Candida* strains with reduced susceptibility to Voriconazole: an effect not predicted by the MIC value alone." Antimicrob Agents Chem **55**(4): 1629-1637.
- Lombardo, A ; Copetti, V ; González, M; Vallarino, A, Eds. (1937). Plantas de la medicina popular del Uruguay. Montevideo, Talleres gráficos Cerrito.
- Lombardo, A ; González, M; Copetti, V, Eds. (1928). *Plantae Diaphoricae : florum uruguayensis*. Montevideo.
- López, S ; González Sierra, M ; Gattuso, M ; Furlán, R; Zacchino, S (2006). "An unusual homoisoflavanone and a structurally-related dihydrochalcone from *Polygonum ferrugineum*. ." Phytochem **67**: 2152-2157.
- Lozhkin, A; Sakanyan, E (2006). "Structure of chemical compounds, methods of analysis and process control. Natural coumarins: methods of isolation and analysis." Pharm Chem J **40**(6): 337-346.
- Lunde, C; Kubo, I (2000). "Effect of polygodial on the mitochondrial ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*." Antimicrob Agents Chemother **44**(7): 1943-1953.
- Luque, J ; Clemons, K; Stevens, D (2003). "Efficacy of micafungin alone or in combination against systemic murine aspergillosis." Antimicrob Agents Chemother **47**: 1452-1455.
- Maes, L ; Van den Berghe, D ; Germonprez, N ; Quirijnen, L ; Cos, P ; De Kimpe, N; Van Puyvelde, L (2004). "In vitro and in vivo activities of a triterpenoid saponin extract (PX-6518) from the plant *Maesa balansae* against visceral *Leishmania* species." Antimicrob Agents Chemother **48**: 130-136.
- Mansilla, M ; Purtscher, H ; Mirazo, I ; Lima, E ; Cardozo, A; Bruselli, A (1996). "Evolución de ciento setenta y dos pacientes VIH (+) fallecidos en Uruguay." Rev Med Uru **12**: 123-134.

- Maridass, M; Ramesh, U (2010). "Chemosystematics evaluation of *Eugenia* species based on molecular marker tools of flavonoids constituents. ." *Int J Biol Tech* **1**(1): 107-110.
- Martínez, R (2005). "Ecología de los hongos patógenos para el hombre." *Rev Mex Micol* **21**(85-92).
- Martínez, R (2006). "An update on the use of antifungal agents." *J Bras Pneumol* **32**(5): 449-460.
- Masuoka, J (2004). "Surface glycans of *Candida albicans* and other pathogenic fungi: physiological roles, clinical uses, and experimental challenges." *Clin Microbiol Rev* **17**: 281-310.
- Mattson, M (2008). "Hormesis defined." *Ageing Res Rev* **7**(1): 1-7.
- Mc Clatcheya, W ; Mahadyb, G ; Bennetct, B ; Shielsa, L; Savod, V (2009). "Ethnobotany as a pharmacological research tool and recent developments in CNS-active natural products from ethnobotanical sources." *Pharmacol Ther* **123**(2): 239-254.
- McFarland, J (1907). "Nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines." *JAMA* **14**: 1176-1178.
- Melendres, M; Damonte, A (2008). *Morbilidad. Enfermedades inmunoprevenibles, infecto-contagiosas y parasitarias.*, Instituto Nacional de Estadística, INE: 1-32.
- Melo E Silva, F ; Elias De Paula, J; Salmen, L (2009). "Evaluation of the antifungal potential of brazilian Cerrado medicinal plants." *Mycoses* **52**: 511-517.
- Merck, E, Ed. (1976). *Dyeing reagents for TLC and paper chromatography.* Darmstadt, Merck, E.
- Merz, W; Hay , R, Eds. (2005). *Topley & Wilson's Microbiology & Microbial infections.* New York, Edward Arnold Publishers Ltd. .
- Mosmann, T (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and citotoxicity assay." *J Immunol Meth* **65**: 55-63.
- Moyna, P; Borthagaray, M (1975). "*Screening* de alcaloides." *Trib Farm* **XLIII**(1-2): 2-8.
- MSP Ministerio de Salud Pública (2011). Informe de la situación nacional de VIH/SIDA, MSP: 15. <http://www.msp.gub.uy/andocasociado.aspx?7184,24157>
- MSP Ministerio de Salud Pública (2012). *Formulario Terapéutico de Medicamentos.*, Ministerio de Salud Pública MSP: 8-42.
- Muñoz, M ; Basso, J ; Etchebarne, L ; Caruso, A; Osimani, M. MSP Ministerio de Salud Pública (2005). *Infecciones de transmisión sexual. Enfermedades micóticas.*, MSP: 46-48.
- Murray, P ; Rosenthal, K; Pfaller, M (2008). *Manual of Clinical Microbiology.* Washington, ASM Press.

- Nakagawa, Y ; Doi, T ; Takegoshi, K ; Igarashi, Ylto (2012). "Solid-state NMR analysis of calcium and d-mannose binding of BMY-28864, a water-soluble analogue of pradimicin A." *Bioorg Med Chem Lett* **22**(2): 1040-1043.
- Negróni, R ; López, G ; Arechavala, A ; Bianchi, M; Robles, A (2006). "Clinical and microbiological study of mycetomas at the Muñiz hospital of Buenos Aires between 1989 and 2004." *Rev Argent Microbiol* **38**(1): 13-18.
- Neofytos, D ; Fishman, J ; Horn, D ; Anaissie, C ; Chang, C ; Olyaei, A ; Pfaller, M ; Steinbach, W ; Webster, K; Marr, K (2010). "Epidemiology and outcome of invasive fungal infections in solid organ transplant recipients." *Transpl Infect Dis* **12**: 220-229.
- Newman, D; Cragg, G (2007). "Natural products as sources of new drugs over the last 25 years." *J Nat Prod* **70**: 461-477.
- Nosanchuk, J (2006). "Current status and future of antifungal therapy for systemic mycoses." *Recent Patents on anti-infective drug discovery* **1**: 75-84.
- Nowosielski, M ; Hoffmann, M ; Wyrwicz, L ; Stepniak, P ; Plewczynski, D ; Lazniewski, M ; Ginalski, K; Rychlewski, L (2011). "Detailed mechanism of squalene epoxidase inhibition by Terbinafine." *J Chem Inf Model* **51**: 455-462.
- Nucci, M ; Queiroz-Telles, F ; Tobón, A ; Restrepo, A; Colombo, A (2010). "Epidemiology of opportunistic fungal Infections in Latin America." *Clinical Infectious Diseases* **51**(5): 561-570.
- Nwodo, U ; Iroegbu, C ; Ngene, A ; Chigor, V; Okoh, A (2011). "Effects of fractionation and combinatorial evaluation of *Tamarindus indica* fractions of antibacterial activity." *Molecules* **16**: 4818-4827.
- Odds, F ; Gow, N; Brown, A (2001). "Fungal virulence studies come of age." *Gen Biol* **2**(3): 1-4.
- Olano, I ; Bassagoda, M ; Alonso Paz, E ; Cerdeiras, M ; Fernández, J ; Ferreira, F ; Moyna, P ; Soubes, M ; Vázquez, A; Vero, S (1996). "Screening of uruguayan medicinal plants for antimicrobial activity. Part II." *J Ethnopharmacol* **53**: 111-115.
- OMS Organización Mundial de la Salud (2007). "Estrategia de Cooperación." Página Web de país de la OMS. <http://www.who.int/countries/ury/es>.
- OPS/OMS Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud (2003). Pautas para la prevención de infecciones oportunistas en personas con VIH o SIDA en América Latina y el Caribe. Washington, USA, OPS: 1-87.
- Pasqual, M ; Lauer, C ; Moyna, P; Henriquez, J (1993). "Genotoxicity of the isoquinoline alkaloid berberine in the prokaryotic and eukaryotic organisms." *Mutat Res* **286**: 243-252.
- Pemán, J ; Cantón, E; Espinel-Ingroff, A (2009). "Antifungal drug resistance mechanisms." *Exp Rev Anti-infect Ther* **7**(4): 453-460.
- Pereyra, P ; Pereyra, E; Anda, G (1983). "Micotoma de origen laboral." *Rev Argent Dermatol* **64**(3): 290-295.

- Pfaller, M; Diekema, D (2002). "Role of sentinel surveillance of candidemia: trends in species distribution and antifungal susceptibility." *J Clin Microbiol* **40**(10): 3551-3557.
- Pfaller, MDiekema, D (2010). "Epidemiology of invasive mycoses in North America." *Critic Rev Microbiol* **36**(1): 1-53.
- Piastri, M ; Pardías, P; Orfila, L. (2008). "Tesoro de plantas medicinales" <http://mail.fq.edu.uy/tematres>.
- Polak, A (2008). Antifungal Drugs. *Encyclopedia of Molecular Pharmacology*. Rosenthal, O. New York, Springer-Verlag. **1**: 130-134.
- Porter, E ; Nic, E; Simmonds, M (2000). "Taxonomic significance of polyhydroxyalkaloids in the Myrtaceae. ." *Kew Bull* **55**(3): 615-632.
- Porter, R, Ed. (2011). *The Merck Manual of Diagnosis and Therapy*. New Jersey, MERCK & Co. Inc.
- Porter, R; Kaplan, J. (2012). "The MERCK manual online." <http://www.merckmanuals.com/>.
- Quindós, G (2002). "Las micosis en el amanecer del siglo XXI." *Rev Iberoam Micol* **19**: 1-4.
- Rahalison, L ; Hamburger, M ; Monod, M ; Frenk, E; Hostettmann, K (1994). "Antifungal tests in phytochemical investigations: comparison of bioautographic methods using phytopathogenic and human pathogenic fungi." *Planta Medica* **60**: 41-44.
- Rai, M; Mares, D, Eds. (2003). *Plant-derived antimycotics: current trends and future prospects*. New York, Food Products Press.
- Ramos, S ; Méndez, E ; Labat, A ; Peyré, A ; De Anda, G ; Puig, R ; Mandressi, L; López, J (2001). "Úlceras de pierna: causas infrecuentes." *Rev Med Uru* **17**: 33-41.
- Rasoanaivo, P ; Wright, C ; Willcox, M; Gilbert, B (2011). "Whole plant extracts versus single compounds for the treatment of malaria: synergy and positive interactions." *Malarian J* **10**(Suppl.1): S4.
- Ratera, E; Ratera, M, Eds. (1980). *Plantas de la flora argentina empleadas en medicina popular*. Buenos Aires, Hemisferio Sur.
- Razonable, R ; Henault, M ; Watson, H; Paya, C (2005). "Nystatin induces secretion of interleukin (IL)-1, IL-8 and tumor Necrosis Factor alpha by a Toll-Like receptor-dependent mechanism." *Antimicrob Agents Chemother* **49**(8): 3546-3549.
- Rex, J; Stevens, D, Eds. (2005). *Systemic antifungal agents. Principles and practice of infectious diseases*. Philadelphia, Elsevier.
- Richardson, M (1991). "Opportunistic and pathogenic fungi." *J Antimicrob Chemother* **28**(Suppl A): 1-11.
- Ríos, G (2010). *MSP: informe a nivel nacional. Crearán protocolo para bajar tasas de infecciones intra-hospitalarias*. Montevideo, MSP.

- Romagnolo, M; De Souza, M (2006). "O gênero *Eugenia* L. (Myrtaceae) na planície de alagável do Alto Rio Paraná, Estados de Mato Grosso do Sul e Paraná, Brasil." *Acta Bot Bras* **20**(3): 529-548.
- Rotman, A ; Ahumada, O ; Demo, M ; De Las Oliva, M ; Turina, A ; López, M; Zygadlo, J (2003). "Aromatic plants from Yungas. Part III. Composition and antimicrobial activity of *Myrrhinium atropurpureum* Schott in Spreng. var. *octandrum* Bentham essential oil." *Flavour Frag J* **18**: 211-214.
- Saleem, M ; Nazir, M ; Shaiq, M ; Hussain, H ; Sup, Y ; Riaza, N; Jabbara, A (2010). "Antimicrobial Natural Products: an update on future antibiotic drug candidates." *Nat Prod Rep* **27**: 238-254.
- Salvador, M ; Carrau, J; Moyna, P (1989). "Estudios sobre inhibición de levaduras de uso enológico por alcaloides." *Rev Arg Microbiol* **20**(4): 466-469.
- San Blas, G; Burger, E (2011). "Experimental medical mycological research in Latin America. A 2000-2009 overview." *Rev Iberoam Micol* **28**(1): 1-25.
- Sangamwar, A ; Deshpande, U; Pekamwar, S (2008). "Antifungals: need to search for a new molecular target." *Indian J Pharm Sci* **70**(4): 423-430.
- Saxena, G ; Farmer, S ; Towers, G; Hancock, R (1995). "Use of specific dyes in the detection of antimicrobial compounds from crude plant extracts using a thin layer chromatography agar overlay technique." *Phytochem Anal* **6**: 125-129.
- Scatton, B (2009). "Le processus de découverte du médicament dans l'industrie pharmaceutique." *J Soc Bio* **203**(3): 249-269.
- Schweikl, H; Schmalz, G (1996). "Toxicity parameters for cytotoxicity testing of dental materials in two different mammalian cell lines." *Eur J Oral Sci* **104**(3): 292-299.
- Seebacher, C ; Bouchara, J; Mignon, B (2008). "Updates on the epidemiology of dermatophyte infections." *Mycopath* **166**(5-6): 335-352.
- Serafini, L ; Dillon, A ; Pistoriello, I; Moyna, P (1994). "Effect of quinine sulphate on *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains. Preliminary note." *Acta Farm Bonaerense* **13**(1): 61-64.
- Shelley, B (2009). "Ethnobotany & the process of drug discovery: A laboratory exercise." *Drug Discov* **71**(9): 541-547.
- Sherris, J, Ed. (2004). *Microbiología médica*. México, McGraw-Hill Interamericana Ed.
- Silva Junior, I ; Raimondi, M ; Zacchino, S ; Cechinel Filho, V ; Noldin, V ; Rao, V ; Lima, J; Martins, D (2010). "Evaluation of antifungal activity and mode of action of *Lafoesia pacari* A. St-Hil., Lytraceae, stem-bark extracts, fractions and ellagic acid." *Rev Bras Farmacogn* **20**(3): 422-428.

- SNVH, Sistema Nacional de Vigilancia de Infecciones Intra Hospitalarias (2008). Infecciones hospitalarias en Uruguay: datos de los primeros 18 meses de vigilancia nacional. 1/I/2007 a 30/VI/2008. MSP.
- Soe, R ; Mosley, R ; Justice, M ; Nielsen-Kahn, J ; Shastry, M ; Merrill, A; Andersen, G (2007). "Sordarin derivatives induce a novel conformation of the yeast ribosome translocation factor eEF2." *J Biol Chem* **282**(1): 657-666.
- Sortino, M ; Derita, M ; Svetaz, L ; Raimondi, M ; Di Liberto, M ; Petenatti, E ; Gupta, M; Zacchino, S (2012). The role of natural products in discovery of new anti-infective agents with emphasis on antifungal compounds. *Plant Bioactives and Drug Discovery*. Cechinel Filho, V. New Jersey, John Wiley & Sons, Inc.
- Soubes, M ; Cerdeiras, M ; Fernández, S ; Vero, S ; Ferreira, F ; Olano, I; Vázquez, A (1997). Antimicrobial activity of uruguayan medicinal plants. 97th General Meeting of the American Society of Microbiology., Miami, ASM.
- Soulé, S (2001). Química y biología de glicoconjugados. Estructuras y actividad biológica de los glicósidos esteroidales del género *Solanum*. Química Orgánica. Montevideo, Universidad de la República, Facultad de Química: 185.
- Spring, O ; Zipper, R ; Vogler, B ; Lopes, J ; Vichnewski, W ; Díaz, D; Cunha, W (1999). "Sesquiterpen lactones in *Blainvillea rhomboidea*. ." *Phytochem* **52**: 79-85.
- Stahl, E; Kaltenbach, U, Eds. (1965). Sugars and derivatives. Thin Layer Chromatography. New York, Academic Press.
- Steinberg, G; Schuter, M (2011). "The dynamic fungal cell." *Fungal Biol Rev* **25**: 14-37.
- Subissi, A ; Monti, D ; Togni, G; Mailland, F (2010). "Ciclopirox: recent nonclinical and clinical data relevant to its use as a topical antimycotic agent." *Drugs* **70**(16): 2133-2152.
- Sunthitikawinsakul, A ; Kongkathip, N ; Kongkathip, B ; Phonnakhu, S ; Daly, J ; Spande, T ; Nimit, Y; Rochanaruangrai, S (2003). "Coumarins and carbazoles from *Clausena excavata* exhibited antimycobacterial and antifungal activities." *Planta Medica* **69**(2): 155-157.
- Sutton, S (2006). "Measurement of cell concentration in suspension by optical density." *PMF News* **12**(8): 3-7.
- Svetaz, L ; Derita, M ; Rodríguez, M ; Postigo, A ; Butassi, E ; Castelli, M ; Sortino, M ; Petenatti, E; Zacchino, S (2013). Antifungal compounds from Latin American plants. Antifungal metabolites from plants. Rai, R. New York, Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 1-25.
- Svetaz, L ; Zuljan, F ; Derita, M ; Petenatti, E ; Tamayo, G ; Cáceres, A ; Cechinel Filho, V ; Giménez, A ; Pinzón, R ; Zacchino, S; Gupta, M (2010). "Value of the ethnomedical information for the discovery of plants with antifungal properties. A survey among seven Latin American countries." *J Ethnopharmacol* **127**: 137-158.
- Taylor, J (2011). "The poetry of mycological accomplishment and challenge." *Fungal Biol Rev* **25**: 3-13.

- Terstappen, G ; Schlupen, C ; Raggiaschi, R; Gaviraghi, G (2007). "Target deconvolution strategies in drug discovery." *Nat Rev* **6**: 891-903.
- Tian, J ; Ban, X ; Zeng, H ; He, J ; Cheng, Y; Wang, Y (2012). "The mechanism of antifungal action of essential oils from Dill (*Anethum graveolens* L.) on *Aspergillus flavus*." *PLoS ONE* **7**(1): e30147.
- Torres, E ; Arenas, R; Atoche-Diéguez, C (2008). "Infecciones causadas por el género *Malassezia*." *Med Cutan Iber Lat Am* **36**(6): 265-284.
- Torres, V ; Arteta, Z ; Torres, G ; Vaucher, A ; Gezuele, E; Ballesté, R (2012). "Un caso excepcional de paracoccidioidomicosis e histoplasmosis pulmonares de presentación concomitante." *Bras J Pulmol* **38**(2): 264-268.
- Toursarkissian, M, Ed. (1980). *Plantas medicinales de la Argentina: Sus nombres botánicos, vulgares, usos y distribución geográfica*. Buenos Aires, Hemisferio Sur.
- Tumbarello, M ; Fiori, B ; Trecarichi, E ; Posteraro, P; Losito, A (2012). "Risk factors and outcomes of candidemia caused by biofilm-forming isolates in a Tertiary Care Hospital." *PLoS ONE* **7**(3): e33705.
- Umegawa, Y ; Nakagawa, Y ; Tahara, K ; Tsuchikawa, H ; Matsumori, N ; Oishi, T; Murata, M (2012). "Head-to-Tail Interaction between Amphotericin B and ergosterol occurs in hydrated phospholipid membrane." *Biochem* **51**: 83-89.
- UNICEF/WHO United Nations Children's Fund, World Health Organization (2010). Sources and prices of selected medicines for children. Copenhagen, UNICEF: 27-70. www.who.int/medicines/.../essentialmedicines/Sources_Prices2010.pdf
- Van Minnebruggen, G ; François, I ; Cammue, B ; Thevissen, K ; Vroome, V ; Borgers, M; Shroot, B (2010). "A general overview on past, present and future antimycotics." *Open Mycol J* **4**: 22-32.
- Vázquez, A ; Olivaro, C ; Bertucci, A; Haretche, F (2007). "Actividad antimicrobiana de plantas del bosque de galería del río Uruguay." *BLACPMA* **6**(6): 317-318.
- Verpoorte, R ; Kim, H; Choi, H (2006). *Plants as source of medicines. New perspective. Medicinal and aromatic plants*. Bogers, C, Lange, Springer.
- Vertut-Croquin, A ; Bolard, J ; Chabbert, M; Gary-Bobo, C (1983). "Differences in the interaction of the polyene antibiotic amphotericin B with cholesterol- or ergosterol-containing phospholipid vesicles. A circular dichroism and permeability study." *Biochem* **22**(12): 2939-2944.
- Verwer, P ; Van Duijn, M ; Tavakol, M ; Bakker-Woudenberg, I; Van De Sande, W (2012). "Reshuffling of *Aspergillus fumigatus* cell wall components chitin and beta-glucan under the influence of Caspofungin or Nikkomycin Z alone or in combination." *Antimicrob Agents Chemother* **56**(3): 1595-1598.

- Vlietinck, A; Apers, S, Eds. (2001). Biological screening methods in the search for pharmacologically active natural products. . Bioactive compounds from natural sources. London, New York, Taylor & Francis.
- Wagner, H; Bladt, S, Eds. (1996). Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas. Berlin, Springer-Verlag.
- Wagner, H ; Bladt, S; Zgainski, E, Eds. (1984). Plant drug analysis. Berlin, Springer-Verlag.
- Walker, L ; Gow, N; Munro, C (2010). "Fungal echinocandin resistance." Fungal Genet Biol **47**(2): 117-126.
- Wardle, H ; Law, D; Denning, D (1996). "*In Vitro* activity of BMS-181184 compared with those of Fluconazole and Amphotericin B against various *Candida* spp." Antimicrob Agents Chemother **40**(9): 2229-2231.
- Wasko, P ; Luchowski, R ; Tutaj, K ; Grudzinski, W ; Adamkiewicz, P; Gruszecki, W (2012). "Toward understanding of toxic side effects of a polyene antibiotic amphotericin B: fluorescence spectroscopy reveals widespread formation of the specific supramolecular structures of the drug." Mol Pharm **9**(5): 1511-1520.
- WHO World Health Organization (2012). Guidelines for ATC classification and DDD assignment 2012. Oslo, Norway, Norwegian Institute of Public Health: 125-180. www.whocc.no/atc_ddd_index
- WHO World Health Organization (2002). WHO Traditional Medicine Strategy 2002–2005. WHO/EDM/TRM/2002.1. Geneva, World Health Organization: 61. whqlibdoc.who.int/hq/2002/who_edm_trm_2002.1.pdf
- Zacchino, S; Gupta, M, Eds. (2007). Manual de técnicas in vitro para la detección de compuestos antifúngicos. Rosario, Argentina, Ed. Corpus.
- Zacchino, S ; López, S ; Pezzenati, G ; Furlán, R ; Santecchia, C ; Muñoz, L ; Giannini, F ; Rodríguez, A; Enriz, R (1999). "In vitro evaluation of antifungal properties of phenylpropanoids." J Nat Prod **62**: 1353-1357.
- Zaragoza, R; Pemán, J (2012). "Antifungal treatment options in the critically ill patient." Rev Iberoam Micol **29**(2): 108-113.
- Zhang, Q ; Pi, J ; Woods, C ; Jarabek, A ; Clewell, H; Andersen, M (2008). "Hormesis and adaptative cellular control systems." Dose-Resp **6**: 196-208.
- Zuño Burstein, A (2004). "Cromomycosis: clínica y tratamiento. Situación epidemiológica en Latinoamérica. ." Rev Peru Med Exp **21**(3): 167-175.

