

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA



FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA *in vitro* DEL EXTRACTO
ACUOSO LIOFILIZADO DE LAS HOJAS DE *Clibadium
surinamense* L. (HUACA)**

TESIS PARA OPTAR EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO

Presentado Por las Bachilleres:

Claudia Cecilia Rodríguez Andrade
Maribeth del Carmen Ríos Soto

Asesores:

Q.F. Luis Alberto Vilchez Alcalá.
Ing. Reyna Gladys Cárdenas de Reátegui. .

Co Asesor:

Q.F. Ernesto Anselmo Nina Chora.
Q.F. Robert Dávila del Castillo.

IQUITOS – PERÚ

2013

Evaluación Antimicótica *in vitro* del Extracto Acuoso Liofilizado de *Clibadium surinamense* L. (Huaca).

Bach. Claudia Cecilia Rodríguez Andrade & Maribeth del Carmen Ríos Soto

RESUMEN:

El propósito del presente estudio fue evaluar la actividad antimicótica del extracto acuoso liofilizado de las hojas de *Clibadium surinamense* L. (Huaca) mediante el Método de Microdilución para hongos filamentosos¹²⁸. La muestra fue recolectada en la comunidad de “SAN ANDRES”, ubicado en el Distrito de Villa Punchana, Provincia de Maynas del Departamento de Loreto (coordenadas “Universal de Transversal de Mercator”-UTM-, x = 691,155.29, y = 9’591,999.76); El lugar de muestreo se eligió debido a que la comunidad realiza su pesca artesanal con huaca. La muestra se identificó taxonómicamente en el *Herbarium Amazonense* (AMAZ) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP) y fue procesado en el laboratorio de Fitoquímica del Instituto de Medicina Tradicional (IMET). La muestra fue secada por 72±2 horas en una cámara provista con deshumidificador a 40±2°C; Luego de la molienda se procedió a la cocción a 60°C por 3 horas y a su posterior liofilización. Luego se procedió a la determinación de las características farmacognósticas y del Screening fitoquímico de la muestra liofilizada. El tamizaje fitoquímico del extracto acuoso liofilizado de hojas de *Clibadium surinamense* L. (Huaca) evidenció presencia de alcaloides, triterpenos-esteroides, flavonoides y saponinas, reportándose en pequeñas proporciones principios amargos - astringentes y glicósidos; para el estudio de la actividad antifúngica se utilizó cepas de *Trichophyton rubrum* ATCC 28188 y *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 24953. El extracto acuoso liofilizado de las hojas de *Clibadium surinamense* L. “huaca” presentó actividad antimicótica *in vitro* sobre *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum*.

Palabras claves: *Clibadium surinamense* L.; Método de Microdilución para hongos filamentosos; *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**Actividad Antimicótica *in vitro* del Extracto Acuoso Liofilizado de Hojas de
Clibadium Surinamense L. (Huaca)**

PAGINA DE APROBACIÓN

Q.F. Jose Daniel Torres Tejada.

PRESIDENTE

Q.F. Brenda Soraya Urday Ruiz.

MIEMBRO

Q.F. Henry Vladimir Delgado Wong.

MIEMBRO

*Memoria presentada por las
Bachilleres Claudia Cecilia
Rodríguez Andrade y Maribeth
del Carmen Ríos Soto para
optar el grado de Químico
Farmacéutico por la
Universidad Nacional de la
Amazonia Peruana - 2013.*

Q.F. Luis Alberto Vilchez Alcalá.

ASESOR

Ing. Reyna Gladys Cárdenas de Reátegui

ASESOR

DEDICATORIA

ESTE PROYECTO ESTA DEDICADO A:

A mis padres, ERNESTO y MARINA, por sus enseñanzas y los valores que me inculcaron desde niña para ser una persona de bien.

A mi abuelita NELLY, por ser mi segunda madre, y me crió con mucho amor.

A mi esposo ADAN, por el constante sacrificio que asume cada día en sacar adelante nuestro hogar.

A mi hermoso bebé, ADAN ALEXANDER, que es mi luz y razón de ser, y que por él me supero por ser mejor para darle lo mejor.

A mis hermanos ALBERTH, ELIAS, ALONSO, y ANGELITO que está en el cielo, para ellos todo mi aprecio y mi cariño.

Claudia Cecilia Rodríguez Andrade

A mis padres, CARLOS y PAULINA por concederme la vida.

A mi esposo, JULIO VO por el constante apoyo en todo el trayecto de mi profesión.

A mis hijos, BLANCA, JULIO CESAR y MARIANA porque son el motor y motivo que me impulsa a seguir superándome cada día de mi vida

A mis hermanos, CARLOS, MARJORIE y GULLERMO por el apoyo moral para culminar mi profesión.

Maribeth del Carmen Ríos Soto

RECONOCIMIENTO

Durante estos seis años hemos aprendido muchas cosas que nos han ayudado a crecer como persona y como profesional. Este apartado está dedicado a todas aquellas personas que han compartido con nosotros todo este tiempo y que han sido partícipes de esta tesis.

- Al Q.F. Ernesto Nina Chora por todas las facilidades y apoyos brindados para la realización de la parte fitoquímica del presente trabajo.
- A la Q.F. Robert Dávila del Castillo, por sus valiosos consejos y por su constante interés mostrado durante todo el trabajo de la tesis.

A nuestros asesores por su incondicional ayuda y apoyo durante todo este tiempo.

Muy especialmente, quisiéramos agradecer a nuestra amiga la Sra. Chachita, por su apoyo incondicional durante todo este tiempo, muchas gracias por tu paciencia.

Nuestro trabajo ha tenido el apoyo de muchas personas cuyos consejos y ánimos fueron decisivos a lo largo de estos meses de revisión y con todas ellas estamos en deuda. A nuestros amigos Jesús Paolo, Laizamón y Augusto Soplín por sus amistades, apoyo y compañerismo durante la actividad laboral; al Q.F. Gustavo Guerrero por las facilidades brindadas para los trámites pertinentes de nuestra tesis.

A todas aquellas personas que de una y otra forma colaboraron en la realización de la presente tesis.

Muchas gracias

ÍNDICE DE CONTENIDO

CAPITULO I	13
I.- INTRODUCCIÓN	14
II.- PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	15
2.2.- Formulación del Problema	15
2.1.- Descripción del Problema	16
III.- OBJETIVOS	17
3.1.- General	17
3.2.- Específicos	17
CAPITULO II	18
I.- MARCO TEÓRICO	19
1.1.- <i>Clibadium surinamense</i> L. (HUACA)	21
1.1.1.- Antecedentes	21
1.1.2.- Clasificación Taxonómica	22
1.1.3.- Descripción Botánica	22
1.1.4.- Composición Fitoquímica	23
1.1.5.- Estudios Toxicológicos	24
1.1.6.- Usos en la Medicina Tradicional	26
1.1.7.- Distribución Geográfica	26

1.2.- Productos Naturales con Actividad Antimicótica	27
1.2.1.- De Plantas	27
1.2.2.- Organismo Marino	28
1.2.3.- Insectos	29
1.2.4.- Microorganismos	29
1.2.5.- Hongos	30
1.3.- Dermatofitos	31
1.3.1.- Clasificación	31
1.3.2.- Etiología	33
1.3.3.- Identificación Mediante su Morfología	35
1.3.3.1.- Características Macroscópicas	35
1.3.3.2.- Características Microscópicas	36
1.3.4.- Identificación Mediante Técnicas Adicionales	37
1.3.4.1.- Tipo de Infección del Pelo <i>in vivo</i>	37
1.3.4.2.- Ensayo de Perforación del Pelo <i>in vitro</i>	37
1.3.4.3.- Prueba de la Ureasa	38
1.3.4.4.- Medio de Arroz	38
1.3.4.5.- Medio de Agar Glucosado de Papa (PDA)	39
1.3.4.6.- Otras Técnicas Fisiológicas	39
1.3.4.7.- Ensayos Nutricionales	39
1.4.- Método de Macrodilución para Hongos Filamentosos	40
1.4.1.- Introducción	40
1.4.2.- Principios del Método	40
1.4.3.- Características de las Cepas en Estudio	41
1.4.3.1.- Fenotipo de la Cepa <i>Trichophyton Rubrum</i>	41
1.4.3.2.- Fenotipo de la Cepa <i>Trichophyton Mentagrophytes</i>	41

II.- HIPOTESIS	42
III.- DEFINICIONES OPERACIONALES	43
3.1.- Variables	43
3.1.1.- Independiente (X)	43
3.1.2.- Dependientes (Y)	43
3.2.- Indicadores	43
3.2.1.- Independiente (X)	43
3.2.2.- Dependientes (Y)	43
3.3.- Operacionalización de las Variables	44
CAPITULO III.....	46
I.- METODOLOGÍA	46
1.1.- Tipo de Investigación	47
1.2.- Diseño de la Investigación	47
1.3.- Procedimiento Experimental	48
1.3.1.- Identificación Taxonómica de la Muestra Vegetal	49
1.3.2.- Secado y Molienda de la Muestra Vegetal	49
1.3.3.- Obtención del Extracto Acuoso	49
1.3.4.- Determinación del Rendimiento	50
1.3.5.- Tamizaje Fitoquímico	50
1.3.6.- Estudio Farmacognósticas	51
1.3.7.- Obtención del Extracto Acuoso Liofilizado	51
1.3.8.- Evaluación de la Actividad Antifúngica Mediante el Método de Macrodilución para Hongos Filamentosos	52

1.3.8.1.- Preparación de los Antifúngicos	53
1.3.8.2.- Controles Positivos y Negativos	53
1.3.8.3. – Cepas Empleadas	54
1.3.8.4. – Medio de Cultivo	54
1.3.8.5. – Preparación del Inoculo	54
1.3.8.6. – Interpretación de los Resultados	54
II.- POBLACION Y MUESTRA	55
2.1.- Población Vegetal y Muestra Botánica	55
2.2.- Lugar de Muestreo	55
2.3.- Criterios de Inclusión de la Muestra Vegetal	55
2.4.- Población y Muestra Microbiológica	55
III.- INSTRUMENTOS	56
3.1.- Medios de Cultivo	56
3.2.- Materiales de Vidrio	56
3.3.- Materiales De Metal	56
3.4.- Otros Materiales	57
3.5.- Equipos	57
3.6.- Reactivos	58
3.7.- Material de Bioseguridad	58
IV.- PROCEDIMIENTO DE RECOLECCION DE DATOS	59
V.- ANÁLISIS DE DATOS	59

CAPITULO IV	60
I.- RESULTADOS	
1.1.- Determinación de las Características Organolépticas	61
1.2.- Marcha de Solubilidades	62
1.3.- Screening Fitoquímicos de la Droga	63
1.4.- Resultados de la Actividad Antifúngica <i>In Vitro</i>	64
II.- DISCUSIÓN	74
III.- CONCLUSIONES	77
IV.- RECOMENDACIONES	78
V.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	79
ANEXOS	94

ÍNDICE DE CUADROS, TABLAS Y/O GRÁFICOS

INDICE DE TABLAS

TABLA N°1.....	52
TABLA N°2.....	53
TABLA N°3.....	61
TABLA N°4.....	62
TABLA N°5.....	63
TABLA N°6.....	64
TABLA N°7.....	65
TABLA N°8.....	66
TABLA N°9.....	67
TABLA N°10.....	68
TABLA N°11.....	69
TABLA N°12.....	70
TABLA N°13.....	71
TABLA N°14.....	72
TABLA N°15.....	73

INDICE DE FIGURA

FIGURA N° 1.....	23
FIGURA N° 2.....	24
FIGURA N° 3.....	24
FIGURA N° 4.....	35
FIGURA N° 5.....	35
FIGURA N° 6.....	36
FIGURA N° 7.....	37
FIGURA N° 8.....	37
FIGURA N° 9.....	38

INDICE DE GRAFICOS

GRAFICO N° 1.....	64
GRAFICO N° 2.....	65
GRAFICO N° 3.....	66
GRAFICO N° 4.....	67
GRAFICO N° 5.....	68
GRAFICO N° 6.....	69

INDICE DE ESQUEMAS

ESQUEMA N° 1.....	48
ESQUEMA N° 2.....	50
ESQUEMA N° 3.....	51

CAPITULO – I

I.- INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales proporcionan estructuras complejas novedosas con actividad biológica de gran interés terapéutico; constituyéndose en una fuente importante de medicamentos, las cuales han formado la base de los sistemas tradicionales de medicina, y por ende han existido por cientos de años. Esta práctica milenaria mantiene su vigencia e interés del mundo científico¹, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que aproximadamente, el 80 % de los habitantes a nivel mundial han utilizado la medicina tradicional en sus cuidados de salud².

El Perú, es uno de los tres países más importantes por su alta diversidad de especies³. La Amazonía peruana representa las 3/4 partes del territorio nacional, poblada por diferentes etnias poseedoras de grandes conocimientos y experiencias empíricas en la utilización de plantas para uso medicinal y/o biocidas⁴. Esta abundante y variada floresta tropical de la Amazonía Peruana, contiene una gran biodiversidad, una cultura ancestral y milenaria, muy rica y variada; sin embargo cuenta con poca información etnobotánica y fitoquímica, la cual no supera el 5%, de las 60 a 90 mil especies que se estima que existen en ella⁵. Más incierta, aún es la situación de la flora de nuestra región LORETO, con una insipiente información científica de las especies vegetales de uso medicinal tradicional, carece de validación científica⁶.

Actualmente, en la Amazonía peruana se han reportado, por lo menos, 3140 especies útiles de la cuales aproximadamente 1044 especies tienen uso medicinal⁷. Rodolfo Vásquez⁸ (1989) describió 997 especies de plantas útiles en la Amazonía Peruana, identificando 104 especies de uso medicinal en la ciudad de Iquitos, Siendo la huaca (*Clibadium surinamense* L.) una de las pocas especies usada tradicionalmente como biocida^{7, 9, 10, 11}.

Diversos estudios han mostrado su efecto ictiotóxicas^{9, 10, 11}. Sin embargo, poco se ha explorado sobre su efecto antimicótico frente a hongos dermatofitos. Este es el propósito de este proyecto; se pretende contribuir al conocimiento y uso de la "HUACA", como una alternativa de información que enriquezca y conlleve al uso racional de este recurso existente en nuestra Amazonía peruana.

II.- PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

2.1.- DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

La Amazonía Peruana, con un elevado porcentaje de humedad y altas temperaturas, condicionan hábitos en los lugareños a una prevalencia a infecciones cutáneas producidas por dermatofitos (epidermofitos, tricofitos, microsporosis) entre otras dermatomicosis (levaduras)¹², sobre todo en poblaciones de alto riesgo debido al grado de hacinamiento, contaminación ambiental, contacto con los animales domésticos (zoonosis); constituyendo una de las 10 causas importantes de consultas en Hospitales y Centros de salud en toda la región¹³.

Las dermatofitosis son micosis superficiales causadas por hongos que tienen la capacidad de invadir tejido queratinizado como la piel, el pelo y las uñas del hombre y algunos animales¹⁴. Esta enfermedad provoca a escala mundial entre 300 a 500 millones de casos clínicos, se registran cada año. Esto se debe a que la mayoría de la población mundial, está distribuida en zonas altamente endémicas, que corresponden a zonas subtropicales y tropicales¹⁵.

Trichophyton rubrum es el agente causal más frecuente en tiñas del cuerpo, de la ingle, de los pies, así como de onicomycosis¹⁶.

En Estados Unidos (1999 – 2002), el *Trichophyton rubrum* fue el hongo patógeno más prevalente entre su población. La incidencia de este patógeno ha aumentado en los últimos años como causa de tiña de las uñas, tiña del cuerpo, tiña de la ingle, tiña de la mano y tiña del pie¹⁷.

En Europa, la infección por hongos del cuero cabelludo se ha descrito con una incidencia menor al 1%. Generalmente se asocian a esta patología otros dermatofitos, como *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton tonsurans*¹⁸. Este último dermatofito es el más prevalente en las tiñas de la cabeza en Estados Unidos¹⁷.

En el Perú, los microorganismos aislados con mayor frecuencia son *Trichophyton tonsurans*, de 54 a 78%, y *Microsporum canis*, de 7 a 26%¹². Sin embargo, Cárdenas *et al* (2001) en un estudio realizado en la ciudad de Trujillo, Perú, encontraron mayor frecuencia de *Microsporum canis* (84,7%) que de *Trichophyton mentagrophytes* (9,1%) y *Trichophyton rubrum* (3,1%).

En nuestra región Loreto (2007), de las muestras procesadas en nuestro Laboratorio de Salud Pública – DIRESA Loreto, el 44% (26 muestras) fueron positivas al examen directo con KOH. Estas muestras sometidas a cultivo, 08 fueron positivas: 04 al género *Tricophytum*, 03 a *Aspergillus* y 01 a *Ptiriasis*²⁰.

El aumento de las infecciones por hongos, unido a la resistencia que han empezado a tener estos agentes a los antimicóticos, han llevado a una constante búsqueda de alternativas terapéuticas eficaces que puedan brindar más y mejores opciones en las farmacopeas actuales^{21, 22, 23}. En el mundo se ha venido explorando y valorando el uso de los productos naturales como fuente de nuevos y variados agentes antimicóticos²⁴.

Por toda esta problemática, es importante encontrar nuevos metabolitos activos que puedan servir como modelos para la elaboración de nuevas drogas. Por todo ello presumimos que el extracto acuoso liofilizado de las hojas del *Clibadium surinamense* L. (huaca), posee metabolitos secundarios capaces de generar una actividad antifúngica *in vitro* en los hongos dermatofitos

2.2.- FORMULACION DEL PROBLEMA

¿Presenta el extracto acuoso liofilizado de las hojas de “*Clibadium surinamense* L.” (Huaca) actividad antimicótica *in vitro* frente a hongos dermatofitos?

III.- OBJETIVOS

3.1.- GENERAL:

- Determinar la actividad antifúngica *in vitro* del extracto acuoso liofilizado de las hojas de *Clibadium surinamense L.* (huaca) utilizando pruebas de sensibilidad antifúngica por método de macrodilución en hongos dermatofitos

3.2.- ESPECÍFICO:

- Obtener el extracto acuoso liofilizado de las hojas de *Clibadium surinamense L.* (huaca).
- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto acuoso liofilizado de las hojas de *Clibadium surinamense L.* (huaca), utilizando pruebas de macrodilución antifúngica *in vitro* frente a *Trichophyton rubrum* frente a hongos dermatofitos.
- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto acuoso liofilizado de las hojas de *Clibadium surinamense L.* (huaca), utilizando pruebas de macrodilución antifúngica *in vitro* frente a *Trichophyton mentagrophytes* frente a hongos dermatofitos.

CAPITULO II

I.- MARCO TEÓRICO

El hombre amazónico, a través de toda su historia, ha logrado identificar y manejar una buena cantidad de especies vegetales, llegando a conocer y usar unas dos a tres mil plantas medicinales. Pocos estudios químicos y farmacológicos sobre las propiedades medicinales y tóxicas de estas plantas han sido realizados. De las 1516 especies (distribuidas en 145 familias y 594 géneros), un 50% tienen alguna investigación y la mayoría han sido examinadas por su utilidad como maderas, para la confección de pulpa de papel, o por sus aplicaciones en la alimentación humana o la industria⁹.

La importancia de los conocimientos etnobotánicos y de la medicina tradicional se confirman cuando se ha encontrado que de los 119 fármacos derivados de plantas en uso actual, hay 88 (74%) que fueron descubiertos como resultado de estudios químicos para el aislamiento de las sustancias activas que motivaron el empleo de las plantas de origen en la medicina tradicional².

Brako (1993), reporta para el Perú un total de 17 mil 144 especies conocidas, de las 150 000 que se conocen en el neotrópico y las 450 000 que se han identificado en el mundo, agrupadas en 2 mil 458 géneros y 224 familias, con 5 mil 354 especies endémicas¹¹. Sin embargo *Brack* (1995), estima el número total de especies vegetales en el Perú en 25 000 especies³⁸.

Vásquez et al., (1992) a través de estudios etnobotánicos realizados en la ciudad de Iquitos, describió 997 especies de plantas útiles en la Amazonía Peruana, identificando 105 especies de plantas medicinales que los habitantes de la ciudad y de sus alrededores usan corrientemente en el tratamiento de sus enfermedades⁸. Actualmente, en la Amazonía peruana se han reportado, por lo menos, 3140 especies útiles de las cuales aproximadamente 1044 especies tienen uso medicinal⁷.

Para *Pittier* (1978) tradicionalmente las plantas son clasificadas como útiles o económicas y las dañinas³⁹. Si enfocamos el criterio de las plantas “dañinas”, nos encontramos que la presencia de alcaloides y otras sustancias tóxicas no son sino medios de defensa dirigidos contra los depredadores en general, lo que constituye un medio muy eficaz para la sobre vivencia⁴⁰.

Una clasificación más reciente de las plantas dañinas, entre las cuales se incluyen los Barbascos, es la que presenta la FAO (1992), al incluirlas como plantas medicinales con toxinas, que por tener estas sustancias son utilizadas en los venenos para aturdir a los peces y pueden ser considerados como posibles productos farmacéuticos. Los Barbascos son un conjunto de plantas, bien arbustos, árboles, hierbas, lianas o bejucos; de varias familias botánicas de cuyo zumo de raíz, corteza, hojas, tallos, etc., tienen la propiedad de entumecer a los peces y hacerlos subir a la superficie, donde son recogidos sin dificultad.

La composición química de los Barbascos es heterogénea. *Pérez* (1947), menciona la presencia de saponinas, otros alcaloides, glucósidos, etc.⁴¹. Que según su especie y contenido fitoquímico pueden servir a la industria farmacéutica por su actividad antimicótico, por ejemplo el *Clibadium surinamense* L.

1.1.- *Clibadium surinamense* L. “HUACA”

1.1.1.- ANTECEDENTES

Siendo una de las pocas especies usada tradicionalmente como ictiotóxico para la pesca artesanal por parte de la población pesquera que vive a expensa de esta actividad⁴⁰, la huaca fue reportada por muchos excursionista investigadores que vieron en nuestros pobladores nativos el uso que le daban a esta especie

Vásquez (2000) indica que la familia Asteraceae está considerada dentro de las 10 familias con el mayor número de géneros y especies en la flora total y amazónica del Perú, comprende 65 géneros Amazónicos, 124 especies amazónicas, 222 géneros para el Perú, 1432 especies para el Perú y 20 especies endémicas amazónicas⁴².

Pammel (1911), en describe al género *Clibadium* como plantas venenosas²⁵.

Heizer (1949), clasifica a 6 especies del genero *Clibadium* dentro de ellas al *Clibadium surinamense* L., con propiedades ictiotóxicas²⁶.

Ander (2001), incluyo al *Clibadium surinamense* L., con posibles efecto biocida e ictiotóxico²⁷.

1.1.2.- CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Según el sistema de clasificación de Adolf Engler, modificado por Hans Melchior⁴⁴ en 1964, su clasificación taxonómica es la siguiente:

REINO	:	Plantae
SUB REINO	:	Tracheobionta
SUPER DIVISION	:	Spermatophyta
DIVISIÓN	:	Magnoliophyta
CLASE	:	Magnoliopsida
ORDEN	:	Asterales
FAMILIA	:	Asteraceae (alt. Compositae)
GÉNERO	:	Clibadium Linnaeus
ESPECIE	:	<i>Clibadium surinamense</i> Linnaeus ⁴⁴⁻⁴⁶
NOMBRE VULGAR	:	Huaca ⁸ , Barbasco ^{7,9-11} , (Perú), Cunambi (Brasil) ^{47,48}

1.1.3.- DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Arbustos o árboles pequeños de 1-3 m de alto, rara vez hierbas, usualmente con el indumento escabroso.

Hojas opuestas, márgenes aserrados, ásperas por el haz, suave por el envés. Capítulos heterógamos, inconspicuamente radiados, dispuestos en panículas racemosas o corimbosas; involucros ovoides o subglobosos; filarios biseriados, los exteriores herbáceos a cartáceos, separados, imbricados, con los márgenes herbáceos y enteros, los interiores membranáceos o cartáceos; receptáculos ligeramente convexos, paleáceos cerca de los márgenes, a veces desnudos en sus centros; radios fértiles, con las corolas inconspicuas, tubulares, blancas, con 2-4 lóbulos; flósculos perfectos, pero los ovarios estériles, las corolas con la garganta cilíndrica, blancas; anteras negras; estilo sin ramificaciones.

Cipselas obovoides, a veces comprimidas, la superficie exterior convexa, a veces carinada la interior, negras cuando maduras; vilano ausente^{40, 47-50} (ver anexo N° 02 y 03)

1.1.4.- COMPOSICION FITOQUÍMICA

El género *Clibadium* presenta flavonoides^{30, 51}, sesquiterpenoides, acetilenos y benzofuranos; según *Schultes* (1990), confiere a los benzofuranos su actividad ictiotóxica^{30, 51, 52}. En estudios fitoquímicos realizados en las hojas de *Clibadium surinamense* L.; se encontró la presencia de cumarinas, triterpenoides, saponinas, taninos, fenoles, azúcares reductores^{9, 53}. *Czerson et al*, (1979) aisló un nuevo germacrólido de *C. surinamense*, *trans*- β -bergamoteno⁵⁴

Bohm y Stuessy (1981-1983) aisló 3 tipos de flavonoides derivados del kaempferol, quercetina y quercetagetina^{29, 30, 55}. Mismo resultados obtenidos por Según *Correa & Bernal* (1990)⁵⁶.

Pérez-Amador et al, (1994) caracterizó aceites esenciales de las hojas, raíz e inflorescencia del *Clibadium surinamense* L. como β -pineno, camfeno, limoneno, eucaliptol, citronelal y en pequeñas proporciones mentol, linalol, geraniol, dodecanol⁵⁷. También se aisló y caracterizo químicamente compuestos poliacetilénicos de naturaleza isoprénica: Cunaniol (ver figura N° 1), de las hojas de *Clibadium surinamenses* L.^{46, 58}.

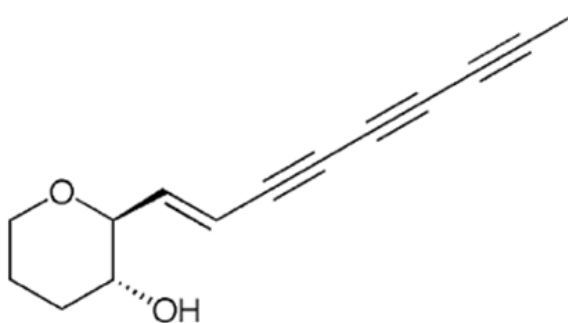


Figure N° 1. Acetato de cunaniol

Mora (1998), aisló un nuevo alcaloide de naturaleza esteroideal de la especie *Clibadium surinamense* L.³² Ese mismo año se deslucida la Acetil-Germacranolida³³. Además se aislaron más alcaloides esteroidales y sesquiterpenoides como el “Epoxilibandiol”, un Nuevo Eudesmano-Sesquiterpeno del *Clibadium surinamense* L.^{34-36, 59}.

Pérez-Amador (2006) identificó mediante espectroscopia por ^1H , ^{13}C -NMR, IR, MS y UV, el éster cáprico de ictiotereol, (ver figura N° 2) y el 7'-en-mirístico éster de tetrahydroictiotereol (ver figura N° 3), componentes aislados de la inflorescencia del *Clibadium surinamense* L.⁶⁰

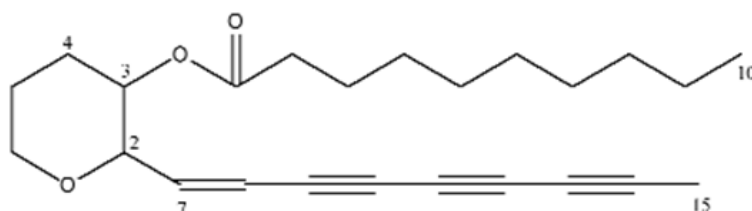


Figura N° 2. Éster cáprico de Ictiotereol

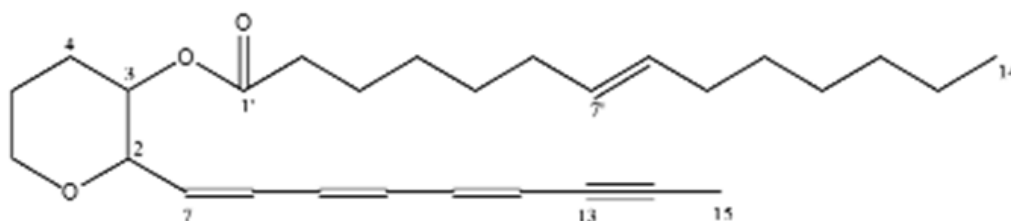


Figura N° 3. Éster 7'-en-mirístico tetrahydroictiotereol

1.1.5.- ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS

El Cunaniol (ver figura N° 1), es un potente convulsivante⁶¹, que actúa como un antagonista GABA_A receptor⁶².

Costa et al., (1998) realizó la extracción hexánica de las hojas y tallos de *Clibadium surinamense* L. y evaluó la actividad convulsivante en ratas pre tratados con diazepam y lamotrigina, los resultados presentaron un aumento en la actividad GABAérgica con el diazepam, protegiendo la acción convulsivante del extracto hexánico pero una reducción de la liberación de aminoácidos excitatorios producida por la lamotrigina, no inhibió el efecto del mismo, sugiriendo un probable efecto post-sináptico de la huaca⁴⁶.

Moisés (2002) realizó un estudio con las hojas de *Clibadium sylvestre* para caracterizar sus efectos convulsivantes utilizando ratas *wistar*, la cual fueron adm. por vía *i.p.* con dosis de 125 y 500 mg/kg P.C., la dosis efectiva y dosis letal respectivamente. La actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa en el hipocampo, "Status epilepticus", presentó una disminución en todas las fases, recuperando su actividad 24 horas después de la crisis convulsiva. Los resultados indican que el *C. sylvestre* contiene principios activos que inducen crisis epileptiformes dependiente de la dosis, presentando un potente modelo para estudios de epilepsia experimental⁶³.

Costa et al., (2006). Demostraron que la administración por *v.o* en ratones del extracto hexánico (EH) de las hojas de *Clibadium surinamense L.*, induce convulsiones agudas seguido de muerte a los 30 minutos. Los resultados indicaron que el *acetato de Cunaniol* inhibe la transmisión GABAérgica, afectando el sistema nervioso y siendo el responsable del efecto convulsivante del *C. surinamense L* en ratones⁴⁶.

Incháustegui et al., (2002). En estudios toxicológicos realizados en el IMET-EsSalud mediante el método alternativo toxicológico CTA, luego de administrar vía oral el extracto liofilizado de *Clibadium surinamense* en ratas albinas cepa *holtzman* se obtuvo una DL_{50} de 762.98 mg/kg, y por el método a dosis límite en ratones albinos cepa Balb-53 por vía intraperitoneal se obtuvo una DL_{50} de 446.08 mg/kg⁶⁴.

Dávila & Pereyra (2009). Realizaron la evaluación mutagénica del extracto acuoso liofilizado (EAL) de *Clibadium surinamense L.* mediante el test de Ames, utilizaron cepas auxótrofas para histidina de *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535 y TA1537. El EAL de las hojas de *C. surimanense* dio positivo (mutagénico) a la cepa TA100 +S9 a dosis de 500 y 5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$.⁶⁵

1.1.6.- USOS TRADICIONAL

Conocida vulgarmente como “huaca”, perteneciente a la familia ASTERACEAE es una planta herbácea, a la cual la medicina tradicional le atribuye propiedades ictiotóxicas^{9-11, 47, 66, 67}. El cunabim es usado como tónico y amargo, siendo recomendado para combatir la anemia. Se tiene información de que sus hojas son usadas para curar erisipela y cualquier herida⁴⁷. *Correa & Bernal* (1990) describen que, en Colombia esta especie es empleada como sudorífico y en las enfermedades de los pies y piernas⁵⁶.

Los indígenas Shuar y Achuar del sur-este del Ecuador lo emplean comúnmente bajo el nombre de "barbasco", como ictiotóxico, introduciendo la raíz machacada ó la planta entera en el río; también cogen las hojas e inflorescencias, machacan hasta que libere su pulpa húmeda y lo introducen en el agua agitándolos para una máxima distribución. Los peces al ingerir el sebo se desorienta al cabo de unos minutos pescándoles fácilmente para su consumo³¹.

Los indígenas de la selva peruana han utilizado la planta por muchos siglos como ictiotóxico, triturando las hojas, para luego ser depositadas a los ríos y ejercer su acción toxica sobre los peces, que se manifiesta mediante una desorientación observada a los pocos minutos⁹. La ingestión de hojas de *Clibadium surinamensis* L. parece ser tóxico que puede llevar a las personas a la muerte⁶⁸. Según *Corrêa* (1984)⁴⁷ y *Duke & Vásquez* (1994) mencionan que no es toxico para humanos⁶⁹.

1.1.7.- DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

El género *Clibadium* (Asteraceae) comprende 29 especies en América Latina, desde México hasta Perú, con 8 números de especies en Costa Rica, Colombia, y Ecuador⁷⁰. *Clibadium surinamense* es la especie más común de este género⁷¹, se distribuye de México a Colombia, Ecuador, Perú y Las Antillas⁶⁷, desde América Central hasta Guyana^{56, 67}.

En nuestro país, se encuentran en los departamentos de Loreto, Madre de Dios, San Martín y Pasco⁷².

1.2.- PRODUCTOS NATURALES CON ACTIVIDAD ANTIMICOTICA

1.2.1.- DE PLANTAS:

Las plantas medicinales proporcionan estructuras complejas novedosas con actividad biológica de gran interés terapéutico; constituyéndose en una fuente importante de medicamentos¹.

De la destilación de las hojas de la planta australiana *Melaleuca alternifolia* se obtiene el aceite esencial del árbol del té, un fitofármaco que ha mostrado actividad antimicótica por la acción directa de los componentes activos, *terpinen-4-ol* y *1,8-cineol*, a una concentración que varía del 29% al 45% y del 4,5% al 16,5%, respectivamente, contra las estructuras de las membranas celulares, no sólo en hongos sino también en bacterias. El aceite se utiliza para el tratamiento de infecciones en la piel por hongos de los géneros *Candida* y *Malassezia*, y en las onicomycosis causadas por dermatófitos⁷³⁻⁸⁰.

Con la aplicación tópica del aceite no se han descrito reacciones adversas; sin embargo, la administración oral accidental produjo toxicidad sistémica^{73, 80}.

En los extractos alcohólicos, los aceites esenciales y los compuestos de naturaleza sulfúrica aislados de los bulbos del ajo (*Allium sativum*) se ha demostrado un importante efecto antimicótico, atribuido a los componentes activos alicina y ajoeno, sobre especies de los géneros *Candida*, *Malassezia*, *Cryptococcus* y *Aspergillus*, así como contra especies de dermatófitos y el hongo *Paracoccidioides brasiliensis*⁸¹⁻⁸⁶. La alicina, aunque es efectiva, ve limitado su uso por su inestabilidad; en contraste, el ajoeno, producto de la degradación de la alicina, es un compuesto más estable y la formulación tópica para el tratamiento de *tinea pedis*, *cruris* y *corporis* ha mostrado resultados considerables^{81, 86}. Así mismo, de la planta *Eucalyptus globulus* se obtienen aceites esenciales, extractos e infusiones con actividad antimicótica, a concentraciones entre el 54% y el 95% del componente activo 1,8-cineol. El uso tópico del extracto crudo y el aceite esencial producen irritación dérmica y dermatitis de contacto⁸⁷.

Las plantas *Thymus vulgaris* y *Thymus zygis* son fuente de las moléculas *timol* y *carvacrol*, ambas con reconocido efecto desinfectante en heridas y componentes de enjuagues bucales. Asimismo, es reconocida su actividad principalmente contra *Cryptococcus neoformans* y especies de *Candida*, *Aspergillus*, *Saprolegnia* y *Zygorhynchus*⁸⁸.

Otras moléculas producidas por las plantas son las fitodefensinas, de naturaleza peptídica y ricas en cisteína, con capacidad de inhibir el crecimiento de los hongos al producir en ellos cambios morfológicos y daño en algunas de sus estructuras celulares⁸⁹⁻⁹². En las semillas de la planta *Zea mays* se encuentra la proteína zeamatina, que tiene como función proteger a la planta de hongos patógenos por la capacidad de producir lisis osmótica. En el patógeno humano *Candida albicans*, la molécula impide el crecimiento a una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 0,5 mg/l^{89, 91-93}.

1.2.2.- ORGANISMOS MARINOS:

La biodiversidad de los mares se comenzó a valorar a principios del siglo XX y se estima que el número de especies que la componen oscila entre 1,5 y 4,5 millones, muchas de ellas aún no descritas, lo que sugiere un gran potencial del mar como fuente de metabolitos bioactivos⁹⁴⁻⁹⁶. Si bien han sido numerosos los organismos marinos de los cuales se han aislado compuestos biológicamente activos, las esponjas son la principal fuente de productos naturales bioactivos⁹⁷. Estos animales producen metabolitos secundarios, algunos de ellos químicamente clasificados como terpenoides y esteroides, que les sirven para competir por el espacio, como mecanismo de defensa química y para controlar la epibiota, principalmente en aguas tropicales, donde la cantidad de depredadores es mayor^{98, 99}.

Algunos de los metabolitos secundarios aislados de esponjas han mostrado efecto citotóxico y anticancerígeno⁹⁴⁻⁹⁷. A partir de esponjas del género *Oceanapia* se obtuvo el compuesto *oceanapisida*^{100, 101}, que mostró actividad antifúngica contra *Candida glabrata*¹⁰¹. Asimismo, sulfatos de acantosterol obtenidos de la esponja marina *Acanthodendrilla* presentaron bioactividad contra cuatro cepas de *Saccharomyces cerevisiae*^{100, 102}.

Otra molécula con importante actividad contra hongos de los géneros *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* y *Rhizopus* es la *espongistatina-1* extraída de la esponja *Hyrtios erecta*^{100, 103, 104}.

1.2.3.- INSECTOS:

De algunos insectos se han obtenido péptidos, que utilizan como mecanismo de defensa, y en ellos se ha comprobado actividad antimicótica. En la polilla gigante de la seda *Hyalopora cecropia* se identificaron los péptidos cecropina A y B, con actividad fungicida contra especies de *Candida*, *Fusarium* y *Aspergillus* a CMI de 0,6, 12 y 9,5 mg/l, respectivamente. Ambas *cecropinas* son activas a pH ácido, pero a pH neutro sólo la *cecropina A* es fungicida, debido a las diferencias de carga de las dos proteínas^{89, 91, 105, 106}. La *drosomicina* y la *tanatina* son péptidos ricos en cisteína obtenidos de *Drosophila melanogaster* y *Podisus maculiveris*, respectivamente; la primera es activa contra aislamientos de *Fusarium oxysporum* y la segunda contra especies de *Fusarium* y *Aspergillus*^{89, 91, 92, 107}.

1.2.4.- MICROORGANISMOS:

Después del descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming, la industria farmacéutica se dio a la tarea de buscar antimicrobianos provenientes de microorganismos. De este trabajo inicial surgieron los antibióticos poliénicos *nistatina* y *anfotericina B*, producidos en su orden por *Streptomyces noursei* y *Streptomyces nodosus*. Estos fármacos tienen la capacidad de unirse al ergosterol de las membranas plasmáticas, dando origen a poros que llevarán a la lisis osmótica. El uso de la *anfotericina B* se ve restringido por su nefrototoxicidad; sin embargo, con las nuevas formulaciones liposomales ésta ha disminuido¹⁰⁸⁻¹¹⁰.

El hongo *Penicillium griseofulvum* es la fuente de la griseofulvina, un fármaco con reconocida acción contra hongos del grupo de los dermatófitos. El mecanismo de acción es la alteración de la correcta polimerización del citoesqueleto¹¹⁰. A pesar de la efectividad que han demostrado estos medicamentos, la toxicidad de ambos es una limitación que ha llevado a la búsqueda de nuevos fármacos.

Las bacterias son microorganismos de gran interés biotecnológico por la producción de múltiples metabolitos, entre ellos los que tienen actividad antimicótica; tal es el caso de *Streptomyces cacaoi* y *Streptomyces tendae*, con la producción de polioxinas y nikomicinas, respectivamente.

El mecanismo de acción de estas moléculas está relacionado con la biosíntesis de quitina, polímero importante en el mantenimiento de la estabilidad estructural de la pared de los hongos^{89, 91, 111}. Ambos compuestos han mostrado actividad importante contra *C. albicans* y *Coccidioides immitis*, pero su principal uso se ha hecho como fungicida en agricultura^{89, 91, 93, 111, 112}. Tanto las polioxinas como las *nikomicinas* presentan sinergia cuando se administran en asociación con los azoles y con inhibidores de β -glucanos^{93, 112}.

1.2.5.- HONGOS:

En el reino de los hongos se dispone de una fuente importante de metabolitos secundarios con actividad biológica^{89, 91, 113}. Un ejemplo de ello son los péptidos *mucidina* y *aureobasidina A*; el primero, obtenido de *Oudemansiella mucida*, actúa inhibiendo la cadena respiratoria mitocondrial y se ha observado su efectividad como antimicótico en levaduras y en el tratamiento tópico de las dermatomicosis¹¹³; el segundo, obtenido de *Aureobasidium pullulans*, actúa impidiendo el correcto ensamblado de la molécula de actina e interfiere con la integridad de la pared celular y su actividad, en modelos de *candidiasis murina*, es superior a *amfotericina B*, las equinocandinas y el fluconazol^{89, 91}.

En los últimos años se han descubierto antimicóticos obtenidos de hongos cuyo blanco de acción es la pared celular, estructura que protege a estos microorganismos de la lisis osmótica y de la acción de enzimas líticas^{21-23, 114}. Ejemplo de estos fármacos son las *equinocandinas*, moléculas de naturaleza lipídica producidas por los hongos *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus sydowi* y *Zalerion arboricola*^{89, 91}, con capacidad para inhibir la síntesis de componentes estructurales de la pared fúngica como los (1,3)-glucanos^{21-23, 114-118}.

Los fármacos *caspofungina*, *anidulafungina* y *micafungina* son derivados de las *equinocandinas*, y los tres tienen acción fungicida *in vitro* e *in vivo* contra especies de *Candida* y *Aspergillus*. Son los únicos fármacos activos contra el hongo *Pneumocystis carinii* (ahora *P. jiroveci*). Son de administración intravenosa, y por eso su mayor efecto adverso es la flebitis^{21-23, 114-118}.

1.3.- DERMATOFITOS

Las dermatofitosis, dermatoficias o epidermoficias comúnmente llamadas tiñas o *tineas*, son un conjunto de micosis superficiales que afectan a la piel, específicamente a la epidermis, y sus anexos (uñas y pelos). Son causadas por un grupo de hongos parásitos de la queratina llamados dermatofitos¹¹⁹. Las más habituales son las que afectan a las uñas, ingles, planta y espacios interdigitales de pies (pie de atleta), cuero cabelludo y cualquier zona de piel lampiña en cualquier localización anatómica. Producen cuadros clínicos muy variados, desde síntomas leves hasta lesiones inflamatorias intensas.

1.3.1.- CLASIFICACION

Los sistemas para clasificar dermatofitos, según *Weirzman* (1995)¹²⁰ son:

- Dermatofitos **zoofilicos**: se encuentran principalmente en animales pero pueden transmitirse a humanos.
- Dermatofitos **antropofilicos**: se encuentran principalmente en humanos y, muy rara vez, se transmiten a animales.
- Dermatofitos **geofilicos**: se encuentran principalmente en el suelo, donde se asocian con pelo, plumas y pezuñas en descomposición, así como otras fuentes de queratina. Infechan tanto a humanos como a animales.

Actualmente se sabe que prácticamente todos los dermatofitos constituyen reservorios en el suelo; no obstante, Clínicamente las infecciones por tiña se clasifican de acuerdo con la profundidad y la región del cuerpo afectada¹²¹.

▪ **Tineas superficiales:**

- *Tinea capitis* o tiña de la cabeza es la infección del cuero cabelludo, cejas y pestañas (*T. tonsurans*, *M. canis*, *T. violaceum*, *M. audouinii*)
- *Tinea corporis* o tiña del cuerpo es la infección de la piel lampiña del tronco, cuello, brazos, piernas y dorso de las manos y los pies (*T. rubrum*, *E. floccosum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *T. verrucosum*).
- *Tinea cruris*, tiña crural o tiña de la ingle es la afección en la ingle, perineo y región perianal (*T. rubrum*, *E. floccosum*, *T. mentagrophytes*)
- *Tinea manuum* o tiña de la mano es la infección de las palmas y región interdigital (*T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *E. floccosum*)
- *Tinea pedis*, tiña del pie o "pie de atleta" afecta principalmente a los pies en las plantas de los mismos y las zonas interdigitales (*T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *E. floccosum*)
- *Tinea barbae* o tiña de la barbilla es la infección de la barba, bigote y del área del cuello (*T. mentagrophytes*, *T. violaceum*, *T. verrucosum*, *T. rubrum*)
- *Tinea faciale* o tiña de la cara es la infección de la cara (*T. rubrum*, *T. mentagrophytes*.)
- *Tinea unguium*, tiña ungueal o tiña de la uña (una forma de onicomicosis) es la infección de la uñas (*T. rubrum*, *E. floccosum*, *T. mentagrophytes*).

▪ **Tineas profundas:**

- Querión de Celso
- Granuloma tricofítico
- Micetoma
- Enfermedad dermatofítica o de Hadida
- Tiña fávica o favus, cuero cabelludo y piel glabra. Delimitada geográficamente fundamentalmente a Europa, Asia y África. (*T. schoenleinii*, *T. mentagrophytes* var. *quinckeanum*).

▪ **Otras Tineas**

- *Tiña imbrincada* ó Tokelau, (Tokelau, circinada tropical) Delimitada geográficamente a determinadas islas del Pacífico en Oceanía, Sudeste asiático y determinadas zonas de México, América Central y Sudamérica (*T. concentricum*.)

Si la tinea es en las uñas o en la piel, lo más probable es que se trate de un hongo queratofílico; en cambio, si se encuentra en el pelo, es probable que sea un hongo melaninofílico¹²².

1.3.2- ETIOLOGIA

En la actualidad, aproximadamente unas 40 especies se encuentran incluidas en estos géneros. El número de especies se reduce a unas 30 cuando se considera únicamente a las productoras de dermatofitosis (verdaderos dermatofitos). Estas especies no se suelen aislar con la misma frecuencia en todos los laboratorios, ya que existe una clara variabilidad climática, geográfica, socioeconómica etc., que origina cambios en los patrones de distribución de los agentes etiológicos de las dermatofitosis. Algunas especies son de distribución geográfica limitada: *T. concentricum* se encuentra fundamentalmente en Oceanía o *T. soudanense* en África. No obstante, los flujos de emigración pueden hacer ocasionalmente frecuentes los aislamientos de algunas especies en países en los que no se aíslan habitualmente¹²³.

Los dermatofitos causantes de la mayoría de las dermatofitosis aislados más frecuentemente del hombre son los siguientes:

- *Epidermophyton* - *Epidermophyton floccosum*

- *Microsporum* - *Microsporum canis*
- *Microsporum gypseum*
- *Microsporum audouinii*

- *Trichophyton* - *Trichophyton rubrum*
- *Trichophyton mentagrophytes*
- *Trichophyton tonsurans*
- *Trichophyton verrucosum*
- *Trichophyton violaceum*
- *Trichophyton schoenleinii*

Otras especies se distribuyen de forma más o menos regular por todo el mundo. En efecto, tan sólo 10 especies se aíslan con una frecuencia elevada en la mayoría de los laboratorios de Micología clínica humana, representando el 99% de los cultivos positivos. De estas, únicamente seis especies: *E. floccosum*, *M. canis*, *M. gypseum*, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* y *T. tonsurans*, pueden llegar a ser las responsables de más del 90% de los casos.

Algunos de estos dermatofitos (ej. *T. mentagrophytes*, *M. gypseum*) son en realidad complejos de especies que incluyen distintas variedades o incluso grupos de especies.

1.3.3- IDENTIFICACIÓN MEDIANTE SU MORFOLOGÍA

1.3.3.1.- CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS

A partir de los cultivos realizados en medios selectivos para el aislamiento de dermatofitos (medios tipo SDA+ antibiótico+ cicloheximida, o DTM) se pueden identificar las especies más frecuentes. Los dermatofitos son hongos hialinos que forman colonias que presentan en general colores claros, con gamas de color restringidas a tonos blanquecinos, amarillentos y marronáceos (figura N° 4).



Figura N° 4. Primocultivo de una muestra de dermatofitosis. Se observan colonias de *T. mentagrophytes* en cultivo puro desarrollándose sobre los pelos inoculados.

En pocas ocasiones se observan colonias con colores oscuros u otras tonalidades (azules, verdosas, negras, etc.) (ver figura N° 5).

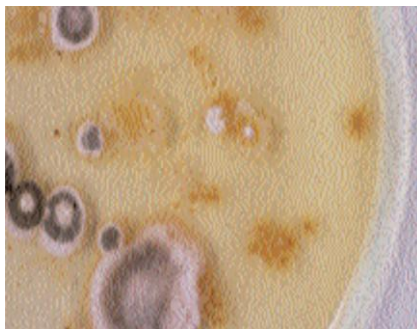


Figura N° 5. Primocultivo de una muestra de dermatofitosis. Se observan colonias amarillentas (dermatofitos) y otras de diversos colores más oscuros (hongos contaminantes).

Si bien la coloración de las colonias y su textura pueden ayudar a identificar estas especies, las características microscópicas son las que determinan su identificación en la mayoría de los casos.

1.3.3.2.- CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS

Existen diferentes estructuras microscópicas a tener en cuenta para la identificación de estos hongos (clamidosporas, distintos tipos de hifas, etc.). No obstante, la forma y distribución de macroconidios y microconidios es fundamental a la hora de definir los géneros y especies (ver Figura N° 6).

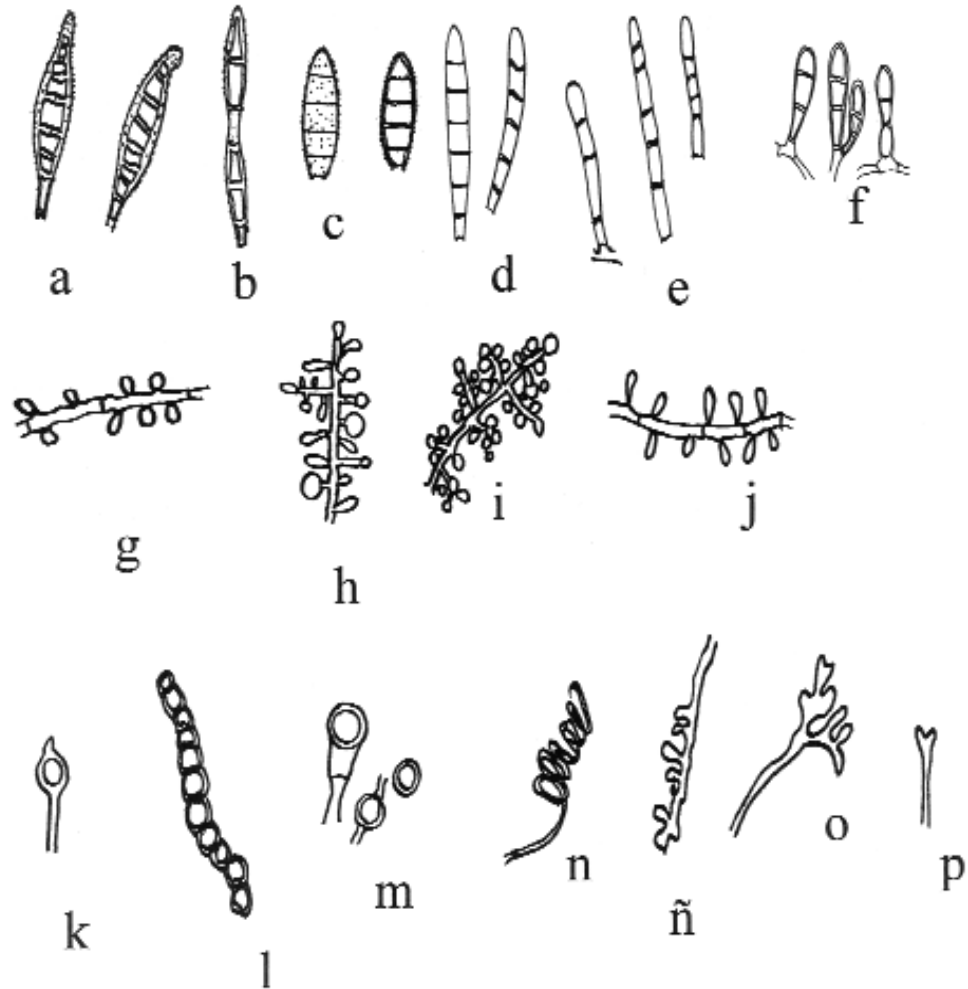


Figura N° 6. Diferentes tipos de macroconidios (a-f), microconidios (g-j), clamidosporas (k-m) e hifas (n-p).

1.3.4- IDENTIFICACIÓN MEDIANTE TÉCNICAS ADICIONALES

Cuando existen dificultades en la identificación de estos hongos utilizando sus características morfológicas, ya sea por semejanza entre las especies o por falta de estructuras útiles para su identificación, se suelen utilizar otros caracteres distintos a los morfológicos, haciendo uso de técnicas que incluyen pruebas bioquímicas, fisiológicas, ensayos nutricionales, ensayo de perforación del pelo *in vitro*, etc., como las que se describen a continuación:

1.3.4.1.- TIPO DE INFECCIÓN DEL PELO *in vivo*

La observación microscópica directa de la muestra (pelos, escamas, uñas), además de confirmar en pocos minutos un caso de dermatofitosis, según el tipo de infección que produzca el hongo, puede ayudar a identificar la especie causante.

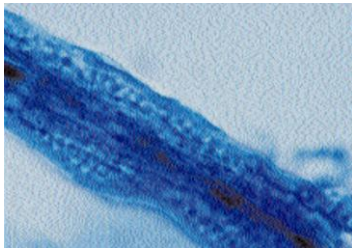


Figura N° 7. Observación microscópica de un pelo con una infección del pelo *in vivo*

1.3.4.2.- ENSAYO DE PERFORACIÓN DEL PELO *in vitro*

La técnica de referencia es la descrita por *Ajello y Georg (1957)*¹²⁴. Es una técnica muy interesante para diferenciar *T. mentagrophytes* y *M. canis* (perforación positiva) de *T. rubrum* y *M. audouinii* (perforación negativa).



Figura N° 8. Ensayo de perforación del pelo *in vitro*. Dermatofito desarrollándose sobre pelos según la técnica descrita por *Ajello y Georg (1957)*¹²⁴.

Consiste en hacer crecer la cepa del dermatofito a identificar en fragmentos de pelo previamente esterilizados y, posteriormente, observar al microscopio el efecto que ha producido el hongo en dicho sustrato. Los dermatofitos se dividen en dos grupos (perforación positiva o negativa) en función de si producen un tipo característico de perforaciones o no. Este resultado varía según la técnica que se utilice.

1.3.4.3.- PRUEBA DE LA UREASA

La principal aplicación de esta prueba es la diferenciación entre *T. mentagrophytes* (ureasa positiva) y *T. rubrum* (ureasa negativa). Uno de los medios de cultivo más utilizados para realizar esta prueba es el medio Agar-urea según *Christensen*. Es especialmente útil por incorporar un indicador de pH en el medio de cultivo y facilitar la detección de posibles contaminaciones.

Las cepas ureasa positivas hacen virar en pocos días el indicador de pH, adquiriendo el medio de cultivo un color rojizo (ver Figura N° 9).

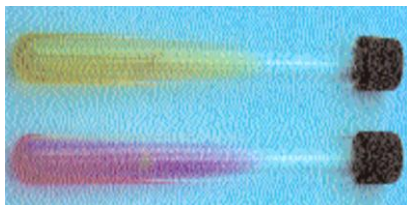


Figura N° 9. Prueba de la ureasa de Christensen. Tubo color amarillento: prueba negativa. Tuvo color rojizo: prueba positiva.

1.3.4.4.- MEDIO DE ARROZ

Es muy útil para la diferenciación entre *M. canis* y *M. audouinii*. *M. audouinii* crece de forma escasa sobre los granos produciendo un pigmento marronáceo. *M. canis* crece abundantemente y suele secretar un pigmento amarillento^{125, 126}.

1.3.4.5.- MEDIO DE AGAR GLUCOSADO DE PAPA (PDA)

Es un medio que estimula la producción del pigmento rojizo característico de *T. rubrum*, siendo muy útil para diferenciarlo de *T. mentagrophytes*. Este medio es altamente recomendado por favorecer la esporulación de todos los dermatofitos.

1.3.4.6.- OTRAS TÉCNICAS FISIOLÓGICAS

Se ha descrito la utilización de otros medios como el Agar glucosa-sólidos lácteos-púrpura de bromocresol (BCP-milk solids-glucose agar-BCPMSG) y algunas variaciones con extracto de levadura (BCP-milk solids-yeast extract agar) entre otros medios, en lo que se denomina el sistema de identificación de Kane/Fisher¹²⁵. La utilización del BCPMSG es especialmente útil para la diferenciación de *T. mentagrophytes* (crecimiento abundante y alcalinización del medio: color púrpura) y *T. rubrum* (crecimiento limitado sin reacción alcalina)¹²⁵.

1.3.4.7.- ENSAYOS NUTRICIONALES

Estas técnicas se basan en la diferenciación de las especies de dermatofitos según los requerimientos específicos que tienen algunas de ellas por ciertas vitaminas y otros factores de crecimiento¹²⁷.

1.4.- MÉTODO DE MACRODILUCIÓN PARA HONGOS FILAMENTOSOS

1.4.1.- INTRODUCCIÓN

En 1998 el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) publicó el Método de microdilución para hongos filamentosos¹²⁸ donde se describe un método provisional para la realización de pruebas de sensibilidad antifúngica a los hongos filamentosos formadores de conidias.

A pesar de todo, las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos no están tan desarrolladas como las de los antibacterianos. Los puntos de corte y los criterios de sensibilidad y resistencia de las levaduras para los antifúngicos *fluconazol*, *itraconazol* y *5-fluorocitosina* sólo están determinados para las micosis orofaríngeas de enfermos con SIDA.

Por lo tanto, estos datos pueden variar en el futuro y hay que prestar atención a las nuevas normas que vayan publicando los comités de estandarización de ensayos *in vitro*, tanto europeos (EUCAST) como americanos (NCCLS)^{129, 130}.

1.4.2.- PRINCIPIOS DEL MÉTODO

Básicamente, consisten en cuantificar la inhibición de crecimiento producida por el antifúngico comparada con el crecimiento del moho en el mismo medio pero sin antifúngico (control). Teniendo en cuenta que el medio de cultivo, pH, tampón, inóculo, tiempo y temperatura de incubación deben ajustarse estrictamente a lo recomendado en dichos documentos puesto que cualquier variación en estos parámetros puede afectar los resultados¹²⁸.

1.4.3.- CARACTERÍSTICAS DE LAS CEPAS EN ESTUDIO

1.4.3.1.- FENOTIPO DE LA CEPA *Trichophyton Rubrum*

El *Trichophyton Rubrum* es un hongo dermatofito moniliaceo, hialino, con estructuras de fructificación que infecta a tejidos queratinizados como uñas, pelo y estrato corneo de la piel¹³¹⁻¹³⁵.

Macroscópicamente, las colonias son de color blanco algodonoso y de consistencia dura^{133, 135}. La cepa granular se caracteriza por colonias planas que carecen de micelio aéreo, y semejan polvo de azúcar. La cepa aterciopelada (downy) es la más común, con micelio aéreo algodonoso, blanco o beige, como “colas de conejo”. El reverso de la colonia suele tener un color rosado-rojo, pero en ocasiones puede ser amarillo-marrón, rojo-vino o violeta e, incluso, pueden carecer de pigmento.

Si se realiza un examen del cultivo se observan hifas largas, delgadas, abundantes microconidias de piriformes a redondeadas de 3,0-5,5 x 2,0-3,5 µm, rara vez hay macroconidias, en forma de puro o cigarrillo, de tamaño variable de pared delgada y multiseptadas^{136, 137}.

1.4.3.1.- FENOTIPO DE LA CEPA *Trichophyton Mentagrophytes*

El *Trichophyton Mentagrophytes* presenta microscópicamente en el reverso de la colonia pigmentaciones pardas rojizas o rojo vino que son semejantes a las que se observa en *T. Rubrum*; las cepas vellosas de *T. Mentagrophytes* var. *Interdigitale* microscópicamente presentan conidias en forma de lagrimas muy parecidas a *T. Rubrum*. La diferenciación de ellos se realiza mediante pruebas morfológicas y fisiológicas, como la penetración del pelo in vitro, reducción de la urea, asimilación de aminoácidos y producción de pigmentos. Una alternativa de identificación precoz del *T. Rubrum* es el empleo de cultivos cuya composición incluye extractos de papa donde *T. Rubrum* produce pigmento rojo vinoso y *T. Mentagrophytes* no lo produce¹³³⁻¹³⁵.

II.- HIPOTESIS

El extracto acuoso liofilizado obtenido de las hojas *Clibadium surinamense* L “huaca”, poseen actividad antimicótica en hongos dermatofitos *in vitro*.

III.- DEFINICIONES OPERACIONALES

3.1.- VARIABLES

3.1.1.- Independiente (X)

- Extracto acuoso liofilizado obtenido de las hojas de *Clibadium surinamense* L. (huaca).

3.1.2.- Dependientes (Y)

- Actividad Antifúngica

3.2.- INDICADORES

3.2.1.- Independiente (X): Concentración del Extracto Acuoso Liofilizado de las hojas de *Clibadium surinamense* L. (huaca).

- Concentración baja: 3.91mg/ml*
- Concentración media: 62.5mg/ml*
- Concentración alta: 2000 mg/ml *

3.2.2.- Dependientes (Y): Grado de turbidez que presenta los medios de cultivos inoculados con *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum* que fueron expuestas al extracto acuoso liofilizado.

- 4 (no inhibición),
- 3 (ligera inhibición, inhibición del 25%),
- 2 (inhibición aparente del crecimiento, inhibición del 50%),
- 1 (ligera turbidez del medio, inhibición del 75%)
- 0 (inhibición del 100%).

*Concentraciones antifúngica consideradas según el método de diluciones sucesivas. (ver Anexo N° 08)

3.3.- OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

VARIABLE INDEPENDIENTE (X)	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	INDICADOR	ÍNDICE	DEFINICIÓN OPERACIONAL	ESCALA DE MEDICIÓN
Extracto acuoso liofilizado de las hojas de <i>Clibadium surinamense L.</i> “huaca”.	Material vegetal, que mediante un proceso de extracción sólido-líquido y posterior liofilización, sufre una deshidratación completa, sin hacer variar su composición química.	Las hojas de <i>Clibadium surinamense L.</i> (huaca). Colectada a las primeras horas de la mañana, entre las 8 a 10 am, con una cantidad de 2 kg.	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Especie recolectada ▪ Cantidad usada ▪ Hora de la colecta ▪ Parte utilizada ▪ Solvente utilizado ▪ Temperatura de liofilización 	La especie vegetal pulverizada y pesada, puesto en contacto con agua a una temperatura de 60° C por 3 horas luego será congelado para su liofilización.	<p>Escala nominal</p> <p>Tipo de variable cualitativa y/o cuantitativa</p>

VARIABLE DEPENDIENTE (Y)	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	INDICADOR	ÍNDICE	DEFINICIÓN OPERACIONAL	ESCALA DE MEDICIÓN
Actividad antifúngica	Es la observación y medición de la Actividad antifúngica que presentan los extractos frente a los hongos dermatofitos <i>Trichophyton mentagrophytes</i> y <i>Trichophyton rubrum</i>	Grado de turbidez que presenta los medios de cultivos inoculados con <i>Trichophyton mentagrophytes</i> y <i>Trichophyton rubrum</i> que serán expuestas al extracto acuoso liofilizado.	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 4 (no inhibición), ▪ 3 (ligera inhibición, inhibición al 25%), ▪ 2(inhibición aparente del crecimiento, inhibición al 50%), ▪ 1 (ligera turbidez del medio, inhibición al 75%) y ▪ 0 (inhibición del 100%). 	Consisten en cuantificar la inhibición del crecimiento micótico producido por el extracto en estudio comparada con el crecimiento del hongo en el mismo medio pero sin el extracto.	Escala nominal. Tipo de variable cualitativa y/o cuantitativa

CAPITULO III

I.- METODOLOGÍA

1.1.- TIPO DE INVESTIGACIÓN

Se empleó el *Diseño experimental, descriptivo, prospectivo y Longitudinal*.

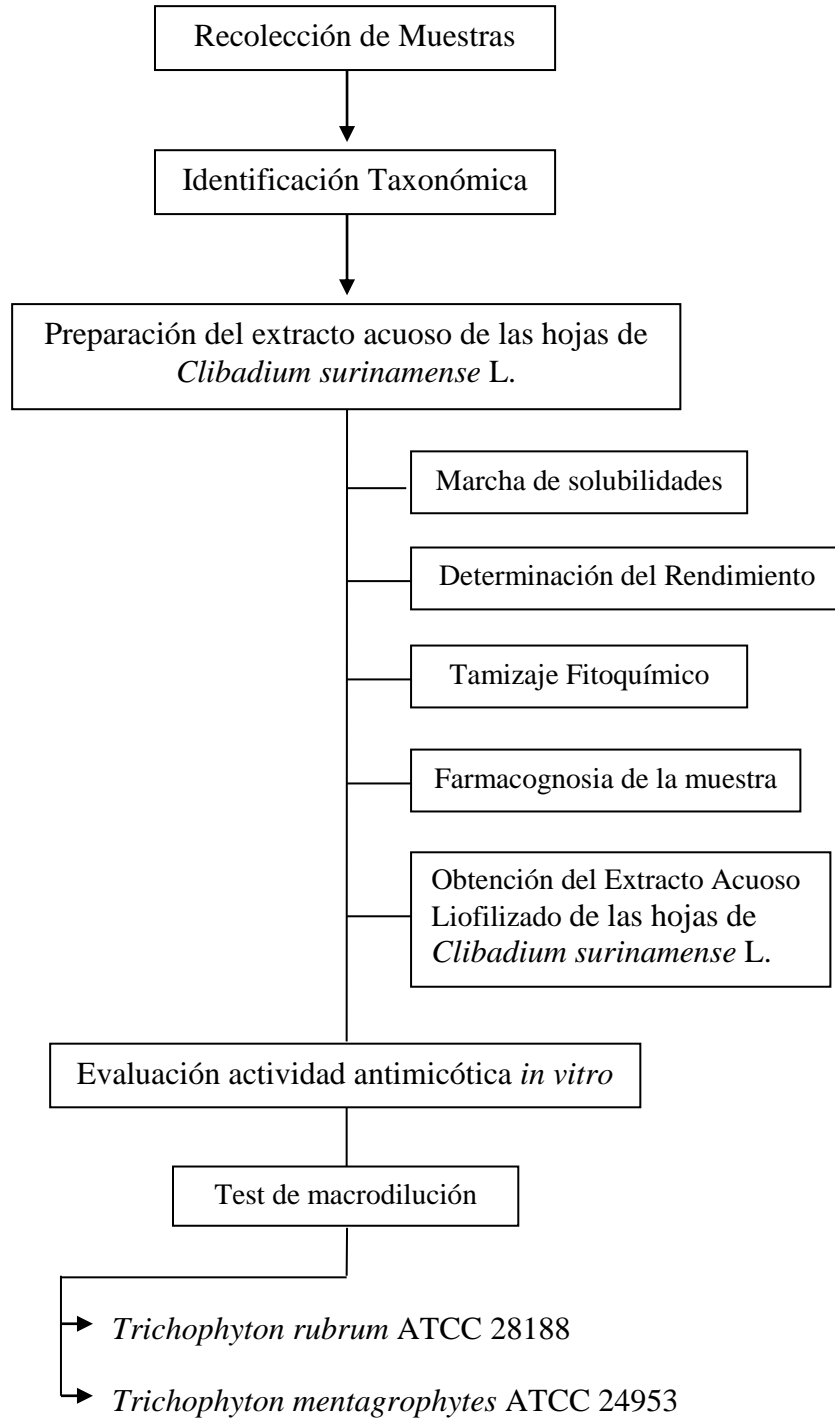
- ❖ *Experimental*, porque se evalúa un fenómeno dado introduciendo elementos que modifica el comportamiento de las variables en estudio, las mismas que fueron medidos en determinados momentos.
- ❖ *Descriptivo*: porque el estudio describirá e interpretará en forma clara y detallada los hechos obtenidos en la investigación.
- ❖ *Prospectivo*, porque se desarrolla hacia delante del tiempo.
- ❖ *Longitudinal*, porque permite realizar la recolección sistemática de las variables involucradas en función del tiempo.

1.2.- DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

Se agregó 2 g del extracto acuoso liofilizado de *Clibadium surinamense* L. (huaca) en 10 ml de Dimetilsulfóxido (DMSO) y en 10 ml de Tween-80, para obtener una concentración de 2000 mg/ml. Posteriormente se procedió a realizar el método de las diluciones dobles seriadas aditivas, para obtener diferentes concentraciones del mismo. (ver Anexo N° 15)

1.3.- PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Se realizara el procedimiento experimental siguiendo el flujograma de investigación



Esquema N° 1: flujograma de investigación..

1.3.1.- IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LA MUESTRA VEGETAL:

Las muestras botánicas de *Clibadium surinamense* L. fue colectada, prensada y sometida al proceso de secado a temperatura de 40° C, en el laboratorio de Fitoquímica del Instituto de Medicina Tradicional del Seguro Social (IMET-EsSalud); luego fueron montado y etiquetado sobre cartulina consignando datos como nombre del colector, N° de muestra, nombre vulgar, etc. (ver Anexo N° 1)

Parte de la muestra botánica fue llevada al *Herbarium Amazonense* (AMAZ) de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana (UNAP) para su identificación taxonómica. (ver Anexo N° 2)

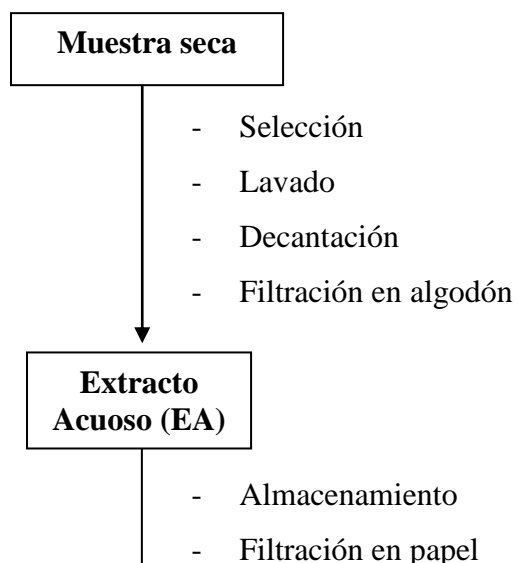
1.3.2.- SECADO Y MOLIENDA DE LA MUESTRA VEGETAL:

El tiempo requerido para el secado de la muestra fue de 72 ± 2 horas, la cual fue secado en una cámara de 40 ± 2 °C provista con deshumidificador; bajo estas condiciones la muestra fue desmenuzado (molido) a mano lo suficientemente pequeño para su posterior estudio (ver Anexo N° 4), luego envasado en recipientes adecuados, y conservados en lugares secos y frescos, constituyendo la muestra a emplear para las distintas experiencias.

1.3.3.- OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO

Luego de la molienda procedimos a la cocción de la muestra seca a una proporción 1:5 p/v; a temperatura entre 65 ± 5 °C durante 3 horas, lo dejamos enfriar para su respectiva filtración con algodón y lo dejamos reposar en un envase de vidrio color ámbar por 4 días bajo refrigeración.

Posteriormente filtro nuevamente con papel filtro dando un volumen final aprox. de 1900 mL (ver Anexo N° 5)



Esquema N° 2: Obtención del EA de las hojas de *Clibadium surinamense L.*

Luego, para una mejor discusión técnica y científica se procedió a la determinación de las características farmacognósticas del extracto acuoso de la droga y del Screening fitoquímico de la muestra liofilizada.

1.3.4.- DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO:

Para el cálculo de los porcentajes de rendimientos se utilizará la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{Peso del extracto}}{\text{Peso de la muestra total}} \times 100$$

1.3.5.- TAMIZAJE FITOQUÍMICO:

El tamizaje fitoquímico se realizó en el laboratorio de Fitoquímica del IMET-EsSalud, siguiendo la Guía para el Tamizaje Fitoquímico de *Rodríguez (2005)*¹³⁸. (ver Anexo N° 7)

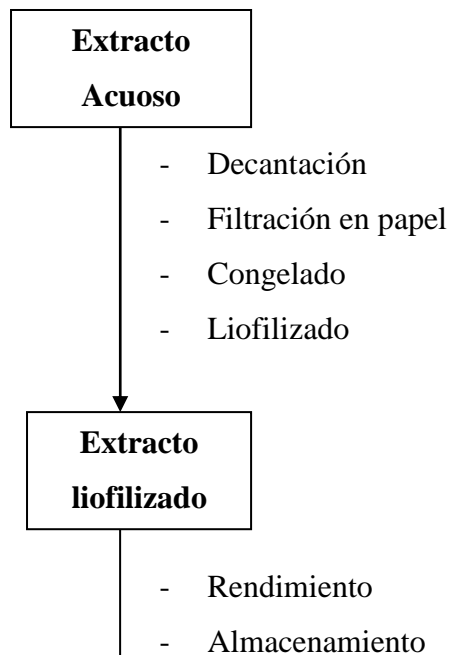
1.3.6.- ESTUDIO FARMACOGNOSTICO:

El estudio farmacognósticas se realizó en el laboratorio de Fitoquímica del IMET-EsSalud, según *Kuklinski* (2000)¹⁰. (ver Anexo N° 8)

1.3.7.- OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO LIOFILIZADO

Se utilizó un liofilizador de 4.5 L el proceso consistió en deshidratar el extracto acuoso por 90 ± 2 horas, congelado a temperatura de -40°C y bajo presión de vapor de 1.33×10^{-3} MBARR mediante sublimación.

El extracto acuoso liofilizado fue almacenado en ambiente alejado de la luz a temperatura menor de 25°C , en frasco con cierre hermético, debidamente rotulado (ver Anexo N° 8).



Esquema N° 3: Obtención del EAL de las hojas de *Clibadium surinamense* L.

1.3.8.- EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA MEDIANTE EL MÉTODO DE MACRODILUCIÓN PARA HONGOS FILAMENTOSOS.

Esta técnica fue utilizada para determinar la sensibilidad antifúngica del extracto acuoso liofilizado obtenido de las hojas de *Clibadium surinamense* L. (huaca) frente a *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*,

El método ensayado fue realizado según los procedimientos establecidos en el Protocolo M38-P, elaborado por la *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) ^{129,130} y modificado por Espinoza *et al* (2005)¹³⁹. En el ensayo se utilizó como control negativo Dimetilsulfóxido (DMSO), así como el Tween-80 y como control positivo se utilizó el Clotrimazol.

Tabla N° 1. Condiciones de ensayo del Método de Referencia NCCLS

Características	Hongos filamentosos
Documento	M38-A
Método	Microdilución y Macrodilución
Antifúngicos	Amfotericina B, Fluconazol, Itraconazol, 5-fluorocitosina, ketoconazol, posaconazol, ravuconazol, voriconazol.
Medios de Cultivos	RPMI
Inóculo Final (célula/mL)	$0.4 \times 10^4 - 5 \times 10^4$
Temperatura	Microdilución y Macrodilución 21 – 74 horas
Punto de Lectura	Microdilución y Macrodilución <i>MIC-0</i> : Amfotericina B, Itraconazol, voriconazol, posaconazol, ravuconazol y 5-fluorocitosina. <i>MIC-2</i> : Ketoconazol, fluconazol y 5-fluorocitosina.

CMI-0: 100%, *CMI-1*: 75 A 80% y *CMI-2*: 50% de inhibición de crecimiento, respectivamente comparado con el control de crecimiento (ver anexo n°15)

1.3.8.1.- PREPARACION DE LOS ANTIFÚNGICOS:

Extracto Acuoso Liofilizado: El EAL fue disuelto en DMSO. Se emplearon diez concentraciones analizables de la sustancia de ensayo

Extracto Acuoso Liofilizado: El extracto fue disuelto en Tween-80. Se emplearon diez concentraciones analizables de la sustancia de ensayo

Se procedió a colocar 2 g del EAL en 10 ml del solvente correspondiente para cada fracción, para lograr una concentración de 2000 mg/ml. Posteriormente se procedió a realizar el método de las diluciones dobles seriadas aditivas, para obtener diferentes concentraciones, siendo 20 mg/ml la mas alta hasta 0.03 mg/ml la mas baja.

Posteriormente se procedió a repartir en alícuotas de 0.1 ml en tubos de 11 x 70 y se diluyeron en una proporción de 1:10 añadiendo a cada tubo 0.9 ml de caldo sabouraud inoculado. (ver Anexo N° 11)

1.3.8.2.- CONTROLES POSITIVOS Y NEGATIVOS:

Tabla N° 2. Solvente con su cepa *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* y control respetivo según referencia NCCLS

Fracciones	Control positivo	Control negativo
TR 28188*	Clotrimazol	Dimetilsulfóxido (DMSO)
TM 24953**	Clotrimazol	Dimetilsulfóxido (DMSO)
TR 28188*	Clotrimazol	Tween 80
TM 24953**	Clotrimazol	Tween 80

Leyenda:

* *Trichophyton rubrum* ATCC 28188: TR 28188

** *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 24953: TM 24953

Pueden emplearse otras sustancias adecuadas para los controles positivos. Deberá considerarse la utilización en dichos controles de sustancias de clases químicas afines, cuando sea posible.

1.3.8.3. – CEPAS EMPLEADAS:

Se emplearon *Trichophyton rubrum* ATCC 28188 y *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 24953, las cuales fueron proporcionadas por el Laboratorio de Salud pública del Instituto Nacional del Perú. Se realizó el control de calidad de los cultivos madre y se comprobó de igual manera otras características fenotípicas de las cepas.

1.3.8.4. – MEDIO DE CULTIVO:

Se dejó crecer las cepas, respectivamente identificadas en medio Agar Papa Dextrosa durante 15 días, a una temperatura de incubación de $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Posteriormente se colocó un bloque del hongo crecido en Agar Papa en un matraz con caldo Sabouraud dejando incubar durante 7 días a una temperatura de $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ para lograr la producción de conidias.

1.3.8.5. – PREPARACION DEL INOCULO:

A partir de la solución Madre de conidias se tomó una alícuota de 1 ml y se depositó en un tubo conteniendo 9 ml de solución salina estéril al 0.85% de esta suspensión ajustada a la escala 0,5 de MacFarland, se diluye 1/100 en caldo Sabouraud (concentración $0,4-5 \times 10^4$ ufc/ml).

1.3.8.6. – INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS:

La lectura se hizo visualmente a las 72 y 168 h de incubación comparando la turbidez de los tubos con la del control. El NCCLS utiliza una puntuación de 0 a 4 para medir la inhibición del crecimiento:

- | | |
|---|---|
| ▪ No inhibición | 4 |
| ▪ Ligera inhibición 25% | 3 |
| ▪ Inhibición aparente del crecimiento 50% | 2 |
| ▪ Ligera turbidez del medio, 75% inhibición | 1 |
| ▪ Inhibición del 100% | 0 |

II.- POBLACION Y MUESTRA

2.1.- POBLACION VEGETAL Y MUESTRA BOTÁNICA

La población vegetal en estudio lo constituye las unidades de la especie vegetales de *Clibadium surinamense* L. (huaca)

La muestra botánica está constituida por las hojas sanas de *C. surinamense* L. (huaca).

2.2.- LUGAR DE MUESTREO:

Las muestras botánicas de *Clibadium surinamense* L. “huaca” se obtendrán del comunidad de “SAN ANDRES”, ubicado en las coordenadas geográficas de latitud sur 3° 41' 2'', longitud 73° 16' 43'', y una altura de 92 m.s.n.m. (coordenadas Universal de Transversal de Mercator -UTM-, x = 691,155.29, y = 9'591,999.76); La cual abarca una superficie de 10 ha, con una temperatura media mensual que oscila entre 20°C y 33°C; del Distrito de villa Punchana, Provincia de Maynas del Departamento de Loreto.

El lugar de muestreo se eligió debido a que la comunidad realiza su pesca artesanal con huaca y cuenta con *Clibadium surinamense* L. de diferentes tamaños.

2.3.- CRITERIOS DE INCLUSIÓN DE LA MUESTRA VEGETAL:

- Arbustos jóvenes de tamaño mediano del *Clibadium surinamense* L. (huaca).
- Hojas sanas de *Clibadium surinamense* L. (huaca).
- Colectados durante las primeras horas de la mañana (8 a 10 a.m.)

2.4.- POBLACIÓN Y MUESTRA MICROBIOLÓGICA:

La población microbiológica lo constituyen los hongos dermatofitos del genero *Trichophyton*. Las muestras microbiológicas constituyen los hongos:

- *Trichophyton rubrum* ATCC 28188
- *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 24953

III.- INSTRUMENTOS

3.1.- MEDIOS DE CULTIVO

- Agar Sabouraud.
- Agar Papa Dextrosa
- Caldo Sabouraud.

3.2.- MATERIALES DE VIDRIO:

- Embudos.
- Erlenmeyer de 250 y 500 ml.
- Frasco ámbar con tapa de rosca.
- Matraz 1000 ml.
- Micropipeta Pasteur.
- Pipetas de 1, 2, 5 y 10 ml.
- Probetas de 10, 100, 250 y 1000 ml.
- Tubos con tapa rosca (75 x 120 mm.)
- Tubos de ensayo de 5 y 7 ml.
- Tubos Refrigerantes.
- Vasos precipitados de 5, 10, 20, 50 y 100 ml.
- Bagueta.

3.3.- MATERIALES DE METAL:

- Asa de siembra bacteriológica.
- Cuchillo mediano.
- Escobillas para tubos.
- Espátulas medianas.
- Gradilla metálica.
- Pinza estéril.

3.4.- OTROS MATERIALES:

- Algodón.
- Detergente.
- Guantes quirúrgicos.
- Hisopos para medios de cultivos.
- Mascarillas.
- Papel aluminio.
- Papel de despacho.
- Papel secante.
- Papel tissue.
- Parafilm 2´x 250´
- Plumón marcador.
- Soportes para tubos

3.5.- EQUIPOS:

- Autoclave
- Balanza analítica
- Baño termostataado
- Cámara de flujo laminar.
- Cámara fotográfica profesional
- Centrifuga
- Cocina eléctrica.
- Equipo de filtración.
- Estufa
- Incubadora.
- Microscopio compuesto
- Potenciómetro - pHmeter
- Refrigeradora
- Rotavapor.

3.6.- REACTIVOS:

- Ácido clorhídrico 0.5 M
- Ácido Sulfúrico 0.2M
- Agua destilada
- Carbonato de sodio
- Dimetil sulfóxido (DMSO)
- Etanol 70°

3.7.- MATERIAL DE BIOSEGURIDAD

- Mandiles
- Mascaras N78
- Guantes quirúrgicos descartables 7 ½
- Lentes

IV.- PROTECCIÓN DE LOS DERECHOS HUMANOS

El área de microbiología, donde se realizará los ensayos experimentales, constituye un medio ambiente de trabajo especial que pueden presentar riesgos de enfermedades infecciosas para las personas que trabajan en el laboratorio o cerca de él. Por ellos se contará con las estrictas medidas de bioseguridad¹⁴⁰.

V.- CUESTIONES ÉTICAS EN LA EXPERIMENTACIÓN

Se realizó bajo los principios de las 3 R (Reducción, Refinamiento, Reemplazo)¹⁴¹, en la cual pudimos Reducir a cero el número de animales; refinamos las pruebas experimentales por un método alternativo de mayor sensibilidad (permite ensayar mayor concentración de muestra, hasta 75% V/V) y reemplazamos por un método alternativo *in vitro*¹⁴².

CAPITULO IV

I.- RESULTADOS

1.1.- DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS

El extracto acuoso liofilizado (EAL) obtenido tiene aspecto de polvo grueso de color pardo moderado, de olor característico (*sui generis*) y poco higroscópico.

TABLA N° 3

Propiedades farmacognósticas del extracto acuoso liofilizado (EAL) de huaca.

Propiedades	Características
Partículas	Gruesas
Color	Moderadamente pardo oscuro.
Olor	Sui generis
Higroscopicidad	Muy poco
Rendimiento	aprox. 7.85 %
Determinación de pH	4.72 ± 1 (25° C)
Densidad relativa	0.9978 – 0.9998 (25° C)
Sólidos totales	2 g/ 100 ml (2%)

1.2.- MARCHA DE SOLUBILIDADES

La solubilidad del EAL de las hojas de *Clibadium surinamense L* frente a los diferentes solventes se presenta en la TABLA N° 4

TABLA N° 4

Solubilidad del EAL de las hojas de *Clibadium surinamense L*. (Huaca) en diferentes solventes orgánicos.

Solvente ^a	Resultados ^b		
	Constante Dieléctricas	Extracto Acuoso	Extracto Acuoso Liofilizado
Agua destilada	80.4	+++	+++
Metanol	32.7	++	++
Etanol	24.3	±	±
Isobutanol	17.7	-	-
Acetato de etilo	6.0	-	-
Diclorometano (CH ₂ Cl ₂)	4.8	-	-
Dimetil sulfóxido (DMSO)	49.8	-	-
n-hexano	80.4	-	-

^a 0.5 ml de solvente que disuelve 5 mg de muestra problema

^b Leyenda: (-) insoluble; (±) escasamente soluble; (+) poco soluble; (++) medianamente soluble; (+++) Soluble; (++++) muy soluble

1.3.- SCREENING FITOQUÍMICOS DE LA DROGA

Los resultados del tamizaje fitoquímico de la droga desecada y del extracto acuoso liofilizado se realizó de acuerdo a los protocolos estandarizados del laboratorio de Fitoquímica del Instituto de Medicina Tradicional (IMET-EsSalud), los resultados se presentan en la tabla N° 2 (ver foto en Anexo N° 11)

TABLA N° 5

Screening fitoquímico de las hojas desecada y del EAL de las hojas de *Clibadium surinamense* L. (huaca)

Pruebas	Resultados (*)		Metabolitos
	Extracto Acuoso	Extracto Acuoso Liofilizado	
Dragendorff	+++	+++	Alcaloides
Liebermann Buchard	+++	+++	Triterpenos esteroides
Bortrager	0	0	Quinonas
Baljet	0	0	Cumarinas
Reactivo de Sudan	0	0	Aceites esenciales y grasas
Reactivo de Fehling	0	0	Azúcares reductores
Prueba de espuma	++	+++	Saponinas
Cloruro Férrico	0	0	Fenoles y taninos
Ninhidrina	0	0	Aminas y aminoácidos
Reactivo Kedde	0	0	Glucósidos cardiotónicos
Reactivo Shinoda	+++	+++	Flavonoides
Tacto	0	0	Mucílagos
Sabor	±	+	Principios amargos y astringente
Molish	++	++	Glucósidos

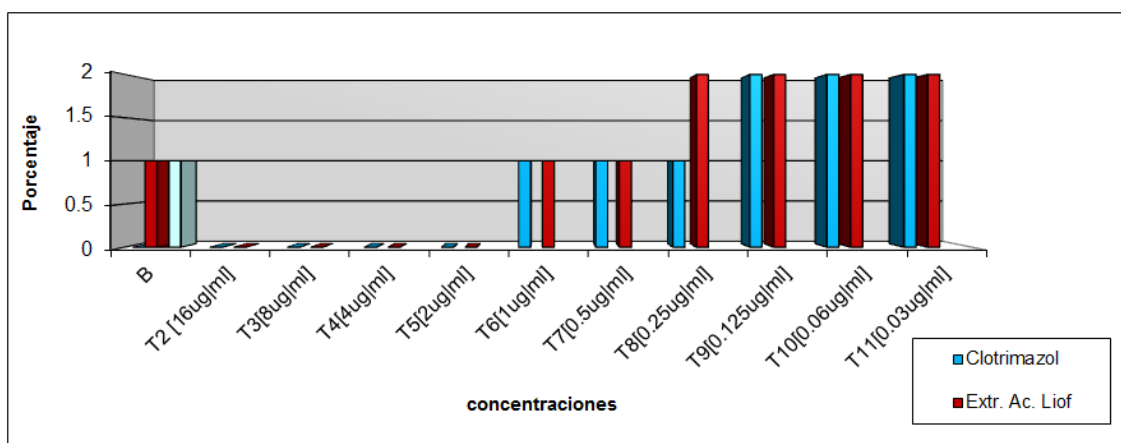
Resultados: (+++) Abundante; (++) moderado; (+) levemente; (±) escasamente; (0) ausente

1.4.- RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA *IN VITRO*

TABLA N° 6. Índice de Grado de Inhibición del EAL de las hojas de *C. surinamense L.* (huaca) frente a *T. mentagrophytes* ATCC 24953 a las 72 horas

Concentración		Clotrimazol	Extr. Ac. Liof
Blanco	0 ug/ml	0	0
T2	16 ug/ml	0	0
T3	8 ug/ml	0	0
T4	4 ug/ml	0	0
T5	2 ug/ml	0	0
T6	1 ug/ml	1	1
T7	0.5 ug/ml	1	1
T8	0.25 ug/ml	1	2
T9	0.125 ug/ml	2	2
T10	0.06 ug/ml	2	2
T11	0.03 ug/ml	2	2

GRAFICO N° 01. Índice de Grado de Inhibición del EAL de las hojas de *C. surinamense L.* (huaca) frente a *T. mentagrophytes* ATCC 24953 a las 72 horas



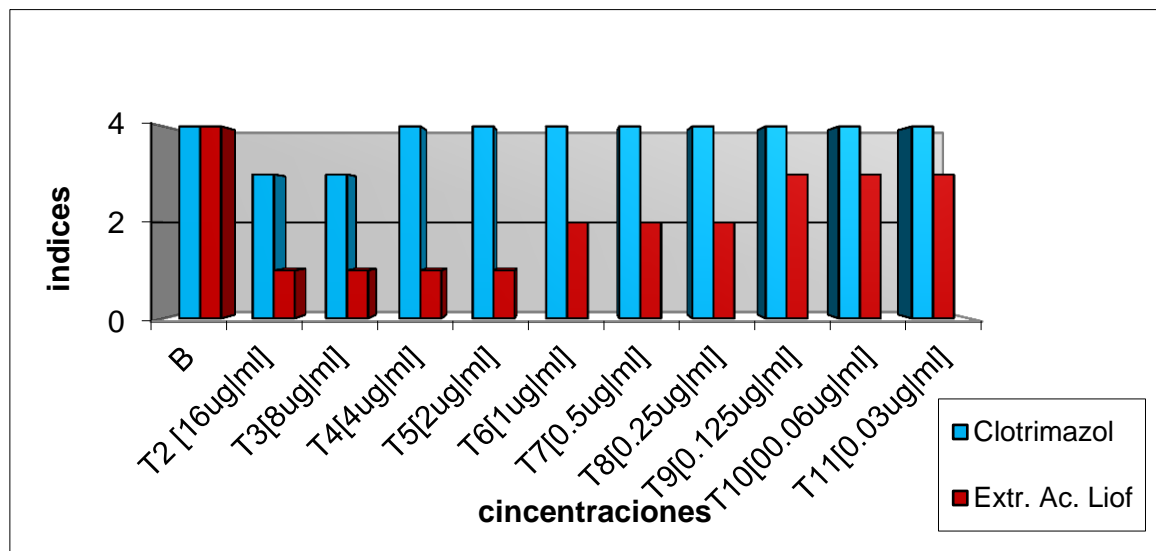
Leyenda

- 4 (no inhibición),
- 3 (ligera inhibición, inhibición del 25%),
- 2 (inhibición aparente del crecimiento, inhibición del 50%),
- 1 (ligera turbidez del medio, inhibición del 75%)
- 0 (inhibición del 100%).

TABLA N° 7. Índice de Grado de Inhibición del EAL de las hojas de *C. surinamense* L. (huaca) frente a *T. mentagrophytes* ATCC 24953 a las 168 horas.

Concentración		Clotrimazol	Extr. Ac. Liof
Blanco	0 ug/ml	4	4
T2	16 ug/ml	3	1
T3	8 ug/ml	3	1
T4	4 ug/ml	4	1
T5	2 ug/ml	4	1
T6	1 ug/ml	4	2
T7	0.5 ug/ml	4	2
T8	0.25 ug/ml	4	2
T9	0.125 ug/ml	4	3
T10	0.06 ug/ml	4	3
T11	0.03 ug/ml	4	3

GRAFICO N° 02. Índice de Inhibición del EAL de las hojas de *C. surinamense* L. (huaca) frente a *T. mentagrophytes* ATCC 24953 a las 168 horas.



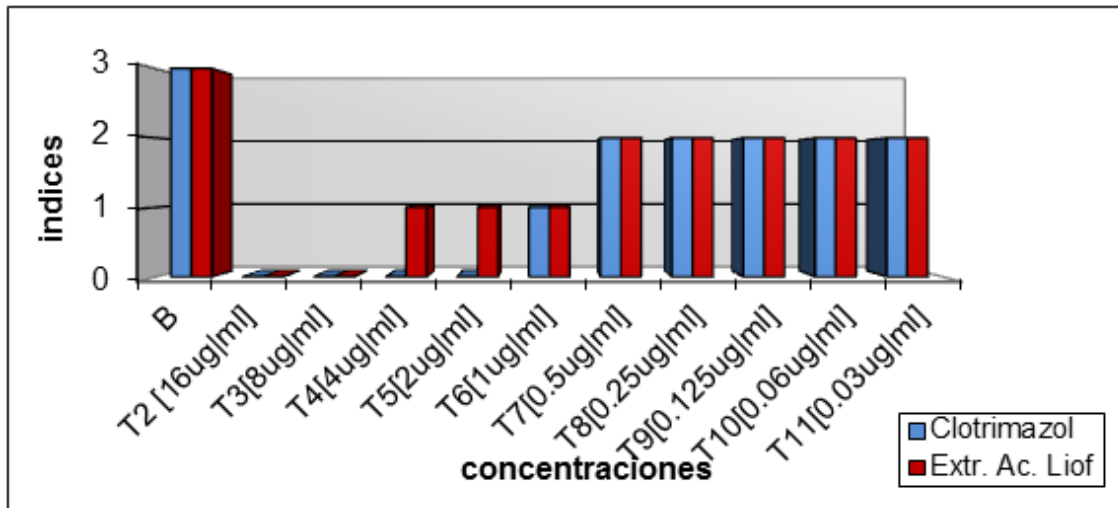
Leyenda

- 4 (no inhibición),
- 3 (ligera inhibición, inhibición del 25%),
- 2 (inhibición aparente del crecimiento, inhibición del 50%),
- 1 (ligera turbidez del medio, inhibición del 75%)
- 0 (inhibición del 100%).

TABLA N° 8. Índice de Grado de Inhibición del EAL de las hojas de *C. surinamense* L. (huaca) frente a *T. rubrum* ATCC 28188 a las 72 horas.

Concentración		Clotrimazol	EAL
Blanco	0 ug/ml	3	3
T2	16 ug/ml	0	0
T3	8 ug/ml	0	0
T4	4 ug/ml	0	1
T5	2 ug/ml	0	1
T6	1 ug/ml	1	1
T7	0.5 ug/ml	2	2
T8	0.25 ug/ml	2	2
T9	0.125 ug/ml	2	2
T10	0.06 ug/ml	2	2
T11	0.03 ug/ml	2	2

GRAFICO N° 03. Índice de Inhibición del EAL de las hojas de *C. surinamense* L. (huaca) frente a *T. rubrum* ATCC 28188 a las 72 horas.



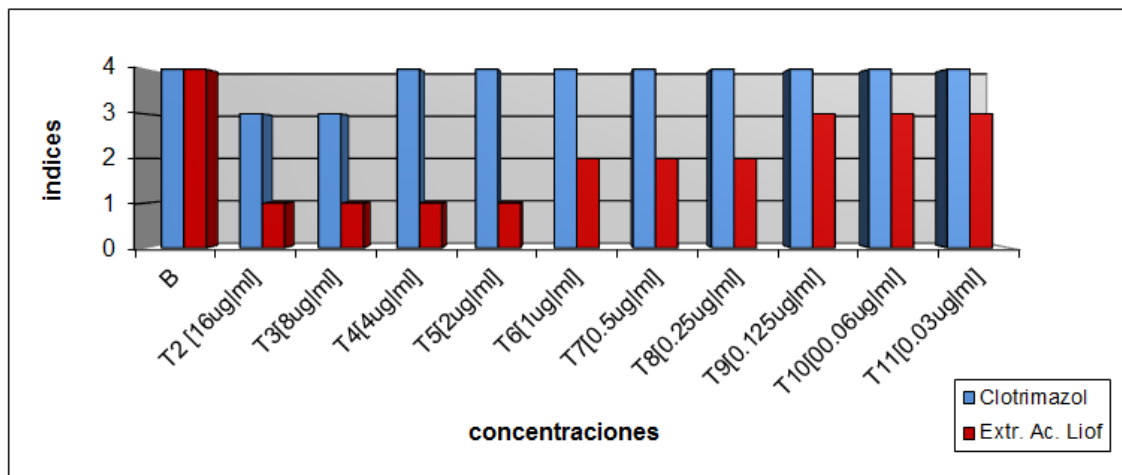
Leyenda

- 4 (no inhibición),
- 3 (ligera inhibición, inhibición del 25%),
- 2 (inhibición aparente del crecimiento, inhibición del 50%),
- 1 (ligera turbidez del medio, inhibición del 75%)
- 0 (inhibición del 100%).

TABLA N° 9. Índice de Grado de Inhibición del EAL de las hojas de *C. surinamense* L. (huaca) frente a *T. rubrum* ATCC 28188 a las 168 horas.

Concentración		Clotrimazol	Extr. Ac. Liof
Blanco	0 ug/ml	4	4
T2	16 ug/ml	3	1
T3	8 ug/ml	3	1
T4	4 ug/ml	4	1
T5	2 ug/ml	4	1
T6	1 ug/ml	4	2
T7	0.5 ug/ml	4	2
T8	0.25 ug/ml	4	2
T9	0.125 ug/ml	4	3
T10	0.06 ug/ml	4	3
T11	0.03 ug/ml	4	3

GRAFICO N° 04. Índice de Inhibición del EAL de las hojas de *C. surinamense* L. (huaca) frente a *T. rubrum* ATCC 28188 a las 168 horas.



Leyenda

- 4 (no inhibición),
- 3 (ligera inhibición, inhibición del 25%),
- 2 (inhibición aparente del crecimiento, inhibición del 50%),
- 1 (ligera turbidez del medio, inhibición del 75%)
- 0 (inhibición del 100%).

TABLA N° 10. Porcentaje de inhibición del EAL de las hojas de *Clibadium surinamense* L. (Huaca) frente a *Trichophyton rubrum* ATCC 28188 y *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 24953 a las 72 horas.

Concentración		T. mentagrophytes	T. rubrum
Blanco	0 ug/ml	25	25
T2	16 ug/ml	100	100
T3	8 ug/ml	100	100
T4	4 ug/ml	100	75
T5	2 ug/ml	100	75
T6	1 ug/ml	75	75
T7	0.5 ug/ml	75	50
T8	0.25 ug/ml	50	50
T9	0.125 ug/ml	50	50
T10	0.06 ug/ml	50	50
T11	0.03 ug/ml	50	50

GRAFICO N° 05. Índice de Inhibición del EAL de las hojas de *C. surinamense* L. (huaca) frente a *Trichophyton rubrum* ATCC 28188 y *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 24953 a las 72 horas.

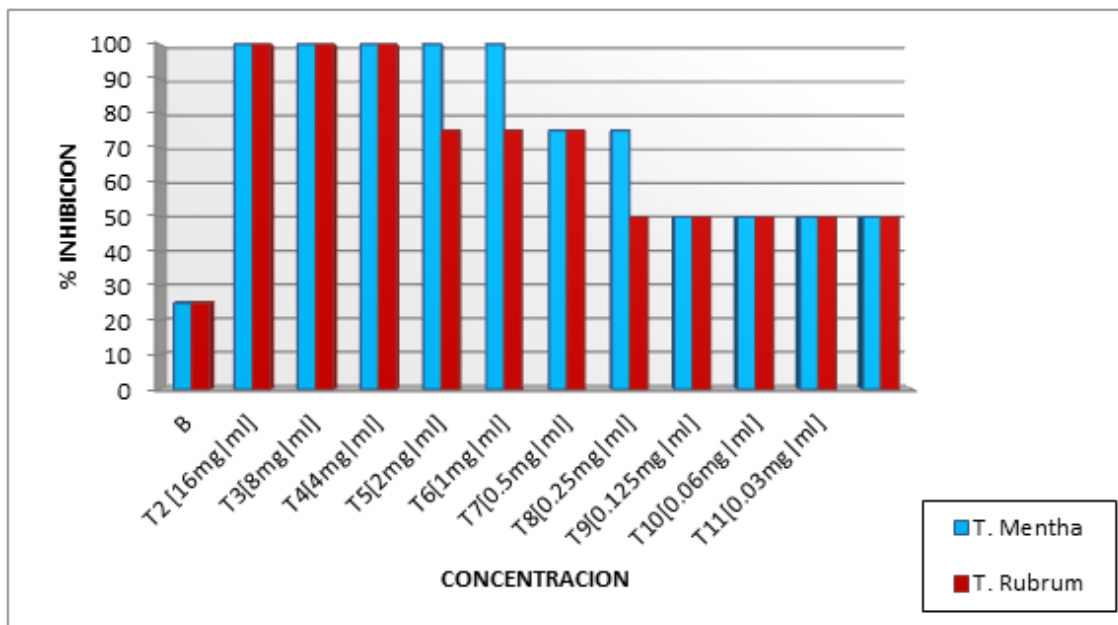
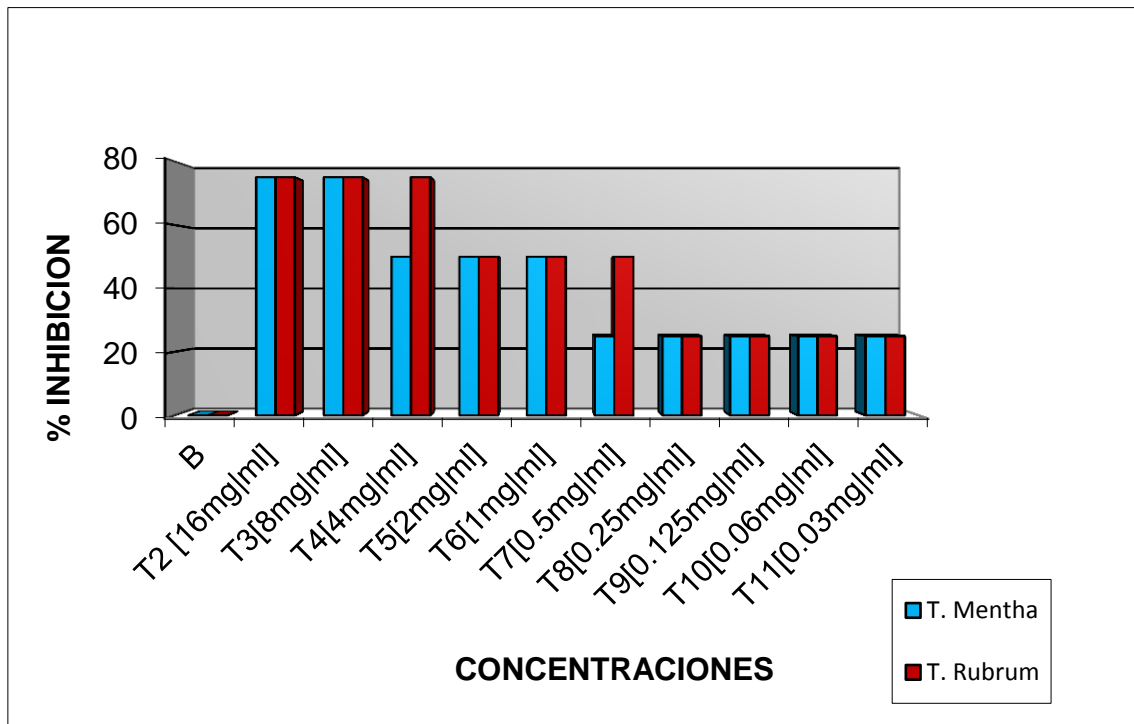


TABLA N° 11. Porcentaje de inhibición del EAL de las hojas de *Clibadium surinamense* L. (Huaca) frente a *T. rubrum* y *T. mentagrophytes* a las 168 horas.

Concentración		<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. rubrum</i>
Blanco	0 ug/ml	0	0
T2	16 ug/ml	75	75
T3	8 ug/ml	75	75
T4	4 ug/ml	50	75
T5	2 ug/ml	50	50
T6	1 ug/ml	50	50
T7	0.5 ug/ml	25	50
T8	0.25 ug/ml	25	25
T9	0.125 ug/ml	25	25
T10	0.06 ug/ml	25	25
T11	0.03 ug/ml	25	25

GRAFICO N° 06. Índice de Inhibición del EAL de las hojas de *C. surinamense* L. (huaca) frente a *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes* a las 168 horas.



1.5.- RESULTADOS DEL ANALISIS ESTADISTICO

TABLA N° 12

Screening fitoquímico del Extracto Acuoso Liofilizado obtenida a partir de las hojas de *Clibadium surinamense L.* (huaca)

	MAIN EFFECTOS	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A	TIEMPO	35.6402	1	35.6402	9409	0
B	TIPO SOLV	373.83	3	124.61	32897	0
C	CONCENTRACION	83.1061	10	8.31061	2194	0

	INTERACCIONES	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
	AB	21.284100	3	7.094700	1873.00	0
	AC	1.151520	10	0.115152	30.40	0
	BC	57.045500	30	1.901520	502.00	0
	ABC	12.090900	30	0.403030	106.40	0
	RESIDUAL	0.666667	176	0.003788	0	0
	TOTAL	584.814000	263	0.000000	0	0

TABLA N° 13

Test de Múltiple Rango para Inhibición por TIEMPO

Método: 95.0 percent Tukey HSD				
Tiempo	Count	LS mean	LS sigma	Grupos Homogéneos
1	132	2.24242	0.00535687	x
2	132	2.97727	0.00535687	x

Contraste	Diferencia	+/- Limites
1 - 2	*-0.734848	0.014951

* denote a diferencia estadísticamente significativo

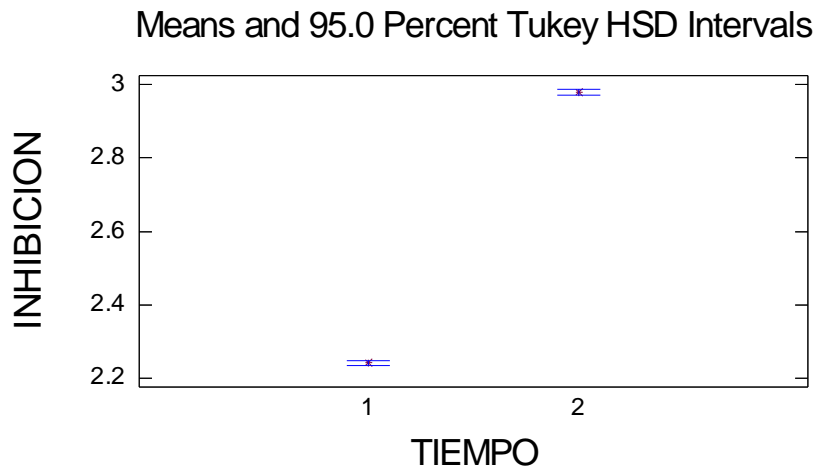


TABLA N° 14

Test de Múltiple Rango para Inhibición por SOLVENTE

Metodo: 95.0 percent Tukey HSD				
TIPO SOLVENTE	Count	LS mean	LS sigma	Homogeneous Groups
V	66	1.22727	0.00757576	x
E	66	1.63636	0.00757576	x
C	66	3.66667	0.00757576	x
D	66	3.90909	0.00757576	x

Contrast	Difference	+/- Limits
C - D	*-0.242424	0.0278525
C - E	*-2.0303	0.0278525
C - V	*-2.43939	0.0278525
D - E	*-2.27273	0.0278525
D - V	*-2.68182	0.0278525
E - V	*-0.409091	0.0278525

Means and 95.0 Percent Tukey HSD Intervals

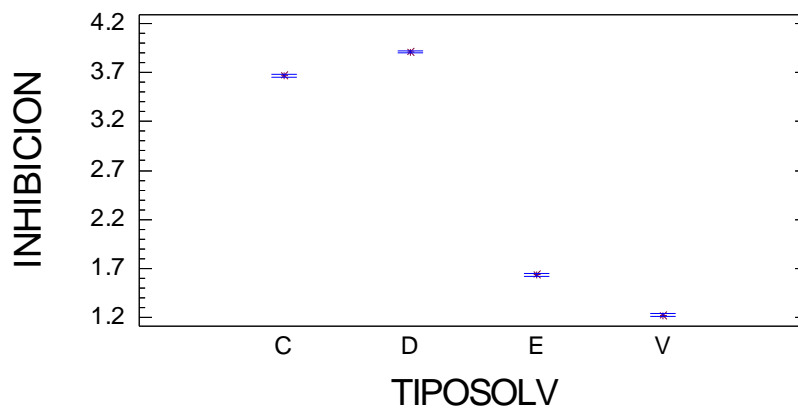
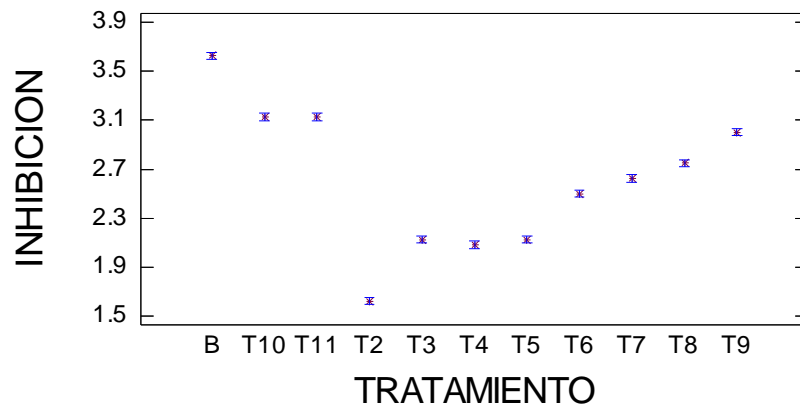


TABLA N° 15

Test de Múltiple Rango para Inhibición por TRATAMIENTO

Metodo: 95.0 percent Tukey HSD				
TRATAMIENTO	Count	LS mean	LS sigma	Homogeneous Groups
T2	24	1.625	0.012563	x
T3	24	2.08333	0.012563	
T4	24	2.125	0.012563	
T5	24	2.125	0.012563	
T6	24	2.5	0.012563	
T7	24	2.625	0.012563	
T8	24	2.75	0.012563	
T9	24	3	0.012563	
T10	24	3.125	0.012563	x
T11	24	3.125	0.012563	x
BLANCO	24	3.625	0.012563	x

Means and 95.0 Percent Tukey HSD Intervals



II. - DISCUSIÓN

Las plantas medicinales amazónicas son usadas para combatir enfermedades infecciosas que constituye el principal problema de salud de la población.

En la actualidad se vienen realizando estudios de investigación para determinar las propiedades de las plantas con actividad antimicótica entre otras utilizando diversas técnicas *in vitro*, con un sinnúmero de agentes patógenos.

En la presente investigación, se estudio las características farmacognósticas del extracto acuoso de la droga¹¹ y del Screening fitoquímico de la muestra liofilizada de las hojas de *Clibadium surinamense* L. (huaca) se realizó mediante protocolos estandarizados del laboratorio de Fitoquímica IMET-EsSalud.^{87, 88}

El exceso de agua en drogas vegetales es el responsable del crecimiento de bacterias y hongos, y también de la hidrólisis de sus constituyentes. En algunas farmacopeas, las monografías allí publicadas limitan el contenido de agua, especialmente en las drogas que tienen la facilidad de absorberla, o en las drogas en las cuales el exceso de agua causa su deterioro. Con pocas excepciones el contenido de agua en las drogas vegetales debe variar entre 8 y 14%,^{11, 65} para el caso del *Clibadium surimanense* L. (huaca) el tiempo requerido para el secado de las hojas fue de 48 ± 1 horas, debido al contenido de agua de las hojas frescas (aproximadamente 78.54%) el mismo que se encuentra dentro de los valores normales⁸⁸ lo que nos permite almacenarlas sin ningún problema.

El contenido de sólidos totales de la droga fue de 2 g/ 100 ml (2%) la cual están dentro de los valores que se consideran aceptables para drogas como esta; un contenido de sólidos totales superior al permitido indica generalmente un procedimiento de recolección y almacenamiento inadecuado.^{10, 64, 65, 87, 88} Dentro de lo concerniente a las propiedades fisicoquímicas de los extractos, el pH mantiene una ligera acidez (pH 4.73 ± 1 a 25° C) debido a la moderada presencia de hidrogeniones; podemos señalar además una densidad relativa dentro de lo normal (0.9978 – 0.9998 a 25° C) en relación al agua destilada. En forma general se analizaron las propiedades organolépticas del extracto acuoso, presentando un color pardo moderadamente oscuro, debido a la descomposición de la clorofila en feofitina.^{7, 64, 65}

El bajo rendimiento del extracto acuoso liofilizado (EAL) de las hojas de *Clibadium surimanense* (huaca) (aproximadamente 7.85 %), Según *Dávila et al* 2009,⁶⁵ se atribuye a las previas operaciones de precipitación y centrifugación que se realizan con la finalidad de depurar al extracto de sustancias lastres.

El examen preliminar o tamizaje fitoquímico del extracto acuoso liofilizado de las hojas de *Clibadium surimanense* L. dio como resultado la presencia de alcaloides, triterpenos-esteroides, flavonoides²⁷ y saponinas, evidenciado por *Richard Evans* (1992)¹⁰ y *Dávila* (2009)⁶⁵, Además hemos encontrado principios amargos - astringentes y glicósidos (ver Tabla N° 5).

Por otro lado el extracto acuoso de las hojas de la *Clibadium surimanense* L. presenta la misma proporción de alcaloides, triterpenos-esteroides, flavonoides y saponinas que el extracto acuoso liofilizado evidenciado por *Dávila et al.* (2009)⁶⁵; además de aceites esenciales-grasas, azúcares reductores, fenoles y taninos, flavonoides, aminas y aminoácidos y glicósidos cardiotónicos en pocas concentraciones evidenciándose que el extracto acuoso al pasar por el proceso de liofilizado pierde una cierta cantidad de metabolitos durante su proceso.^{64, 65}

Se ha demostrado que ciertos factores como la concentración y el tiempo de incubación, influyen en la sensibilidad de los hongos filamentosos a los antifúngicos (ver tabla 12, 13, 14, 15).^{96, 99}

Las actividades antifúngicas mostradas frente a *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes* en los Gráficos N° 05 y 06 a las 72 h y 168 h, a diferentes concentraciones con el respectivo blanco, en ella podemos apreciar que la mayor actividad a mayores concentraciones a 20 y 10 mg/l y pequeñas actividad a concentraciones de 0,07 y 0,03 mg/l mostrando claramente la tendencia de que a mayor concentración del extracto acuoso liofilizado mayor es la actividad antifúngica. La eficiencia a las 168 h es aproximadamente de un 80%.

Para el EAL, con respecto a la variable tiempo, se pudo evidenciar claramente que la mayor efectividad tanto en *T. rubrum* y *T. mentagrophytes* se presentó a las 72 h. En cuanto a la concentración, la mayor efectividad se presentó en las concentraciones T2 (20mg/l) y T3 (10 mg/l), tanto en a *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*. (Gráfico N° 01).

La CMI de la fracción insoluble a las 72 h, para a *T. rubrum* estuvo representada por una concentración de 0.25 mg/ml (Grafico N°5), concentración considerada como de eficiente grado de inhibición según de De Campos *et al* (2005). Así mismo, la CMI a las 168 h, para a *T. rubrum*, estuvo representada por una concentración de 2 mg/ml y 0.5 mg/ml (Gráfico N°6), mientras que para *T. mentagrophytes*, la CMI fue de 0.5 mg/ml (Gráfico N°6), lo cual determino que el factor tiempo es determinante en cuanto a la efectividad del antifúngica.

El extracto acuoso liofilizado provoco un porcentaje de inhibición mayor del 50% frente a *T. rubrum* como en *T. mentagrophytes* (Gráfico N° 05 y 06). De todo esto y de acuerdo a los resultados obtenidos podemos inferir que la actividad antifúngica presentada por el extracto acuoso liofilizado de las hojas de *Clibadium surinamense* L., puede estar determinada su actividad antifúngica.

II. - CONCLUSION

Según los resultados recogidos en este trabajo se puede concluir que:

- ❖ El tamizaje fitoquímico de la droga como el extracto acuoso liofilizado de las hojas de *Clibadium surinamense* L. evidencio abundante presencia de alcaloides, triterpenos-esteroides, flavonoides y saponinas, reportándose en pequeñas proporciones principios amargos - astringentes y glicósidos.
- ❖ El contenido de humedad y cenizas se encuentran dentro de los valores considerados como aceptables para esta parte estructural de la planta.
- ❖ Se ha demostrado que ciertos factores como la concentración y el tiempo de incubación, influyen en la sensibilidad de los hongos filamentosos (*Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum*) a los antifúngicos.
- ❖ El extracto acuoso liofilizado de las hojas de *Clibadium surinamense* L. “huaca” presentó actividad antifúngica *in vitro* sobre *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum*.

IV.- RECOMENDACIONES

- ❖ Se recomienda realizar fraccionamiento, aislamiento y purificación de los componentes más abundantes que se encuentre en la especie botánica de *Clibadium surinamense L.* (huaca) como alcaloides, flavonoides y triterpenos-esteroides para probar cuál de las fracciones tiene el efecto antifúngicos ò determinar un sinergismo entre sus componentes ya mencionados
- ❖ Se recomienda realizar diseños de ensayos antifúngica con diferentes controles positivos y cepas de hongos a esta especie vegetal con el objetivo de profundizar su estudio.
- ❖ Controlar adecuadamente los factores como temperatura y tiempo de incubación durante el desarrollo de la evaluación de sensibilidad antifúngica para evitar la contaminación de otros hongos ambientales que puedan interferir en el ensayo.
- ❖ Desarrollar otros ensayos para corroborar la sensibilidad antifúngica de esta especie y así validar los resultados obtenidos en este estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. CYTED. Métodos Farmacológicos para Validación de Plantas Medicinales. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo. s/a pp 30-31
2. Fransworth, N.R., Akerele, O., Bingel, A.S., Soejarto, D.D., Guo, Z., (1985). Medicinal plants in therapy. Bull World Health Org. 63: 965-981.
3. Salaverry O. La complejidad de lo simple: plantas medicinales y sociedad moderna. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2005; 22(4): 245-46.
4. Rengifo, E., (1995). Plantas Medicinales de Uso Popular en la Amazonía Peruana 1ra Edición. Lima – Perú. Pág. 249.
5. Pinedo, PM, Rengifo SE, Cerrutti ST. 1997. Plantas Medicinales de la Amazonia Peruana; Estudio de Uso y Cultivo. PNUD. FIDA. TCA. IIAP. Iquitos, Perú.
6. Lock, De Ugaz O., (1994). Investigación Fitoquímica. 2da.ed. Lima-Perú: Fondo editorial Pontificia Universidad Católica del Perú. pp.: 3-7, 114-117, 120, 182-184, 188, 211-213, 275-279.
7. Brack E A., (2000). Diccionario Enciclopédico de Plantas Útiles del Perú. Programa de las Naciones Unidas para el desarrollo. Centro de Estudios Regionales Andinos Bartolomé de Las Casas. Cuzco, Perú.
8. Vasquez. Rodolfo, Smith. Richard, Saavedra. Jhonny, Zumaeta. Rafael, (1989). Community-based Natural Resource Management as a non-linear Process: a case study in the Peruvian Amazon Varzea. Eighth IASCP Conferenc.
9. Richard Evans Schultes and Robert F. Raffauf., (1992). The Healing Forest. Medicinal and Toxic Plants of the Northwest Amazonia, Vol.2. Ed. Dioscorides Press. Portland Oregon.

10. Kuklinski, C., (2000). Farmacognosia. Estudio de Drogas y Sustancias Medicamentosas de Origen Natural. Barcelona, España.
11. Brako L, Zarucchi J., (1993). Catalogue of the Flowering Plants and Gymnosperms of Perú. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden. Vol. 45.
12. Rodríguez J. Dermatofitosis: Algunos aspectos epidemiológicos del Hospital Regional Docente de Trujillo de 1994 a 1998. Trujillo, 2000. Tesis para obtener el grado de Bachiller en Medicina. Escuela de Medicina, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Libertad.
13. Henríquez, C, Guillen, C, Bustamante, B, Tello, R. (2008) Micosis superficial en poblaciones selváticas Prevalencia en cuatro comunidades rurales: Santa Rosa de Tiocayu, Pamashto, Bello Horizonte y Sachavacayoc. Revista electrónica de Dermatología Peruana. 2000, v. 11 n°1.
14. Méndez Tovar LJ, López Martínez R, Hernández Hernández F. Parte III. Micosis superficiales. Dermatofitos. En: Actualidades en Micología Médica (2ª ed.). México, Facultad de Medicina UNAM, 2004: 109-142
15. Rippon, Jw. Dermatophytosis and dermatomycosis. In: RIPPON, JW. (ed). W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1988. Pp: 169-275.
16. Rinaldi MG. Dermatophytosis: Epidemiological and microbiological update. J Am Acad Dermatol 2000; 43(Suppl 5): S120-S124.
17. Wade Foster K, Ghannoum MA, Elewski BE. Epidemiologic surveillance of cutaneous fungal infection in the United States from 1999 to 2002. J Am Acad Dermatol 2004; 50: 748-752.
18. Schwinn A, Ebert J, Bröcker EB. Frequency of *Trichophyton rubrum* in tinea capitis. Mycoses 1995; 38: 1-7.

19. Cárdenas A, Tincopa L, Fernández W, Valverde J, Agip H. Tiña capitis: Frecuencia de agentes etiológicos. *Dermatol Peru*. 2001; 1:15-18.
20. Dirección Ejecutiva del Centro de Prevención y Control de Enfermedades. Análisis de la Situación de Salud de Loreto – 2007. Dirección de Epidemiología. Iquitos, Loreto.
21. Carrillo-Muñoz, A., Brió, S., Quindós, G. Una nueva generación de fármacos antifúngicos. *Rev Iberoam Micol* 2001; 18: 2-5.
22. Groll, A.H., Walsh, T.J. Antifungal chemotherapy: Advances and perspectives. *Swiss Med Wkly* 2002; 132: 303-311.
23. Odds, F.C., Brown, A.J., Gow, N.A. Antifungal agents: Mechanisms of action. *Trends Microbiol* 2003; 11: 272-279.
24. Zacchino, S., Yunes, R., Filho, V., Enriz, D., Kouznetsov, V., Ribas, J. The need for new antifungal drugs: Screening for antifungal compounds with a selective mode of action with emphasis on the inhibitors of the fungal cell wall. En: Rai, M., Mares, D. (Eds.). *Plant-Derived Antimycotics Current Trends and Future Prospects*. Haworth Press, New York 2003; 1-34.
25. Pammel, L. H. "A manual of poisonous plants." Torch Press. Cedar Rapids, Iowa. 1911.
26. Heizer, R. F. "Fish Poisons." Steward JH (Ed) *Handbook of South American Indians*. Smithsonian Inst Bur Am Ethnology Bull #143, 5, 277-281. 1949.
27. Ander T van. The diverse uses of fish-poison plants in northwest Guyana. *Econ. Bot.* 54. (4): 500-512.2001.
28. Burbano, G.A. y P.C. Zapata. (2006), *Clibadium Surinamense L.* como aporte Proteico para Conejos Nueva Zelanda en la Etapa de Levante y Ceba. *Archivos De Zootecnia* Vol. 56, Núm. 213, P. 74.

29. Bohm B. A.; Berlow S.; Stuessy T. F. (1983), Flavonoid variation in *Clibadium trianae* and *C. surinamense*. University British Columbia, dep. Botany, INCONNU. Phytochemistry ISSN 0031-9422. 1983, vol. 22, n°12, pp. 2743-2744.
30. Bohm BA, Stuessy TF. (1981) Flavonol derivatives of the genus *Clibadium* (Compositae). *Phytochemistry*, 20. n°5, p.1053 - 1055.
31. Evans, D. K. y D. W. Chaffin. Ethnobotany and secretory reservoir anatomy in leaves and bracts of Amazonian *Clibadium surinamense* L. (Asteraceae) Herbarium MUHW, Marshall University, Huntington, West Virginia, USA and Herbarium QCA, Catholic University, Quito, Ecuador.
32. Mora L., Bahsas A. y Amaro-Luis J. M. “Un Nuevo Alcaloide Esteroidal del *Clibadium surinamense* L.” V Jornadas Científicas de la Facultad de Farmacia. Universidad de Los Andes. Mérida. Octubre 1998.
33. Mora L., Bahsas A. y Amaro-Luis J. M. “Una Acetil-Germacranolida del *Clibadium surinamense* L.”. XLVIII Convención Anual de AsoVAC. Maracaibo. Noviembre 1998.
34. Mora L. Alcaloides y Terpenoides del *Clibadium surinamense* L. Postgrado Interdisciplinario en Química Aplicada, PIQA. Diciembre 1999.
35. Amaro-Luis J. M., Mora Mora L. y Bahsas A. “Epoxiclibandiol, un Nuevo Eudesmano-Sesquiterpeno del *Clibadium surinamense*”. VII Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas. Mérida. Abril 2000.
36. Amaro-Luis J. M., Mora Mora L. Y Bahsas Bahsas A. “Aplicación de la RMN en la Determinación de la Estructura y Estereoquímica del Epoxiclibandiol, un Nuevo Sesquiterpeno del *Clibadium surinamense* L”. II Jornadas Iberoamericanas de Resonancia Magnética Nuclear. Antigua (GUATEMALA). Junio 2001.

37. Estes, A., Morrioso, R., Meadows, L. & Price, W. D. (1999). The isolation, identification, and analysis of an analgesic from *Clibadium arboreum*. Poster session presented at the 47th ASMS conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Dallas, TX.
38. Brack, A., (1995). El Oro Verde del Perú - Plantas nativas y Desarrollo 246p
39. Pittier, H., (1978). Manual de las *Plantas Usuales de Venezuela*. Caracas (Venezuela): Fundación Eugenio Mendoza. 620 p.
40. Rondón, J., (2002). Guía descriptiva de los barbasco de Venezuela. *Universidad de Los Andes. Mérida – Venezuela*. Revista de la Facultad de Farmacia Vol. 43.
41. Pérez A., (1947). Plantas Útiles de Colombia. Bogotá (Colombia): Contraloría General de la República.
42. Vásquez M.R., Rojas G.R. (2000) Plantas vasculares del amazonas peruano; clave de identificación botánica de las fanerógamas amazónicas. Jardín Botánicos de Missouri, USA.
43. Sistema de clasificación de Englen & Prantl, modificado por Melchor en 1964.
44. Nomenclatural and Specimen Database of the Missouri Botanical Garden.
45. Electronic Plant Information Centre of Royal Botanic Gardens, Kew.
46. Costa E. A. et al. (2006) Behavioral effect of a neurotoxic compound isolated from *Clibadium surinamenses* L. (Asteraceae). *Neurotoxicology and Teratology*. v. 28, p. 349-353
47. Corrêa, M.P. Dicionário das plantas úteis do Brasil. Colaboração de Leonan de Azeredo Penna. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984.v.1. p.355.

48. José González, (2006). Flora digital de la selva. Organización para estudios tropicales.
49. Guánchez, F., (1999). *Plantas Amazónicas de Uso Medicinal y Mágico*. (Venezuela): Fundación Polar. SADA-Amazonas. 155 p.
50. Missouri Botanical Garden – MBG. Mobot. W3 Tropicos (2003). Specimen database. *Clibadium surinamense* L. St. Louis.
51. Arriagada, J.E. Notas sobre las relaciones genéricas de *Clibadium* L (Compositae, Heliantheae). Rev. Acad. Colomb. Cienc. 18 (71): 465-468. 1993. ISSN 0370-3908.
52. Schultes RE, Raffauf RF. The healing forest. USA; 1990.
53. R. M. Murillo, V. Castro y I. Merfort, “Poliacetilenos y otros productos naturales de *Clibadium schulzii* (Asteraceae)”. Revista de Biología Tropical, en revisión.
54. Horst Czerson, Ferdinand Bohlmann, Tod F. Stuessy, N.H. Fischer. Sesquiterpenoides y constituyentes acetilénicos de siete especies de *Clibadium*. Fitoquímica. v. 18, Issue 2, 1979, Pag. 257–260.
55. Bohm. Bruce, Stuessy. A. Tod, (1985). Further studies of flavonols of *Clibadium* (compositae) Fitoquímica. v 24, Issue 9, Pag. 2134–2136.
56. Correa, J.E.; Bernal, H.Y.; (1990). Especies vegetales promisorias de los países del Convenio Andrés Bello. Bogotá: SECAB/Guadalupe, 569p. Tomo V.
57. Pérez-Amador MC, F García-Jiménez, J Herrera, LP González, LC Márquez-Alonso, (1994). Essential oils, anthocyanins and phototoxic compounds in two species of *Tagetes* (Asteraceae). Revista Internacional de Botánica Experimental Phytion 56, 143.

58. Clark, J. B. (1969). Effect of a polyacetylenic fish poison on the oxidative phosphorylation of rat liver. *Biochem. Pharmacol.* 18, 73–83.
59. Amaro-Luis J. M., Bahsas A. and Mora L. “Novel Steroidal Alkaloids from *Clibadium surinamense* (Compositae)”. International Symposium of the Phytochemical Society of Europa: “Lead Compounds from Higher Plants”. Lausanne (SUIZA). Septiembre 2001.
60. Pérez-Amador MC, V Muñoz, A Noyola, F García-Jiménez. (2006). Aceites esenciales y compuestos fototóxicos en *Clibadium surinamense* L. y *Montanoa grandiflora* D.C. (Asteraceae). *Revista Internacional de Botanica Experimental* 75: 145-150.
61. Quilliam, J. P., and Stables, R. (1969). Convulsant effects of cunaniol, a polyacetylenic alcohol isolated from the plant *Clibadium sylvestre*, on frogs and mice. *Pharmacol. Res. Comm.* 1, 7–14.
62. Curtis, D. R., and Johnston, G. A. R. (1974). Convulsant alkaloids. *Neuropoisons* 2, 207–248.
63. Hamoy, Moisés. Convulsões induzidas pelo extrato bruto de *Clibadium sylvestre*: um modelo experimental de epilepsia generalizada. 2002. 66 f. Dissertação (Maestria) - Curso de Pós-Grado en Ciencias Biológicas, Centro de Ciencias Biológicas, Universidad Federal de Pará, Belém.
64. Incháustegui R., Cerrutti T., Nina E., Ríos F. Estudio clínico de Fase I del *Clibadium surinamense* (Asteraceae). IMET – EsSalud. Iquitos 2007.
65. Dávila, Robert., Pereyra, Yoli. (2009), Evaluación mutagénica del extracto acuoso liofilizado (EAL) de *Clibadium surinamense* L. (Huaca), mediante el test de Ames. Tesis de Pre-grado. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana.
66. Moretti, C.; Grenand, P. Lês Nivrés ou Plantes Ichtyotoxiques de la Guyane Française. *Journal of Ethnopharmacology*, v.6, p.139-160, 1981.

67. Schnee, L. Plantas Comunes de Venezuela. 3.ed. Caracas: Universidad Central de Venezuela, 1984. 806p. p.470
68. Lima, R.M.S.; Santos, A.M.N. dos; Jardim, M.A.G. (1995) Levantamento de plantas tóxicas em duas comunidades caboclas do estuário amazônico. Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, v.11, n.2.
69. Duke, J.A.; Vasquez, R. Amazonian Ethnobotanical Dictionary. London: Boca Raton/Ann Arbor/CRC, 1994. 215 p. il.
70. Arriagada, J. E. 2003. Revision of the genus *Clibadium* (Asteraceae, Heliantheae). *Brittonia* 55: 277-280.
71. Yen-Hsueh Tseng, Chiu-Mei Wang and Ching-I Peng (2008). *Clibadium surinamense* L. (Asteraceae): A Newly Naturalized Plant in Taiwan. *Taiwania*, 53(1): 103-106.
72. Rengifo E. (2001) Programa de Aprovechamiento Sostenible de la Biodiversidad. Proyecto Aprovechamiento Sostenible de la Biodiversidad. IIAP, Iquitos-Perú.
73. World Health Organization. Aetheroleum Melaleucae Alternifoliae. WHO monographs on selected medicinal plants. WHO Graphics, Geneva 2002; 172-179.
74. Hammer, K.A., Carson, C.F., Riley, T.V. *In-vitro* activity of essential oils, in particular *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and tea tree oil products, against *Candida* spp. *J Antimicrob Chemother* 1998; 42: 591-595.
75. Hammer, K.A., Carson, C.F., Riley, T.V. *in vitro* activities of ketoconazole, econazole, miconazole, and *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against *Malassezia* species. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 467-469.
76. Hammer, K.A., Carson, C.F., Riley, T.V. *in vitro* activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against dermatophytes and other filamentous fungi. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50: 195-199.

77. Vasquez, J., Arganoza, M., Boikov, D., Vaishampayan, J., Akins, R. *in vitro* susceptibilities of Candida and Aspergillus species to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. Rev Iberoam Micol 2000; 17: 60-63.
78. Syed, T.A., Qureshi, Z.A., Ali, S.M., Ahmad, S., Ahmad, S.A. Treatment of toenail onychomycosis with 2% butenafine and 5% *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil in cream. Trop Med Int Health 1999; 4: 284-287.
79. Cox, S., Mann, C., Markham, J., Gustafson, J., Warmington, J., Wyllie, G. Determining the antimicrobial actions of tea tree oil. Molecules 2001; 6: 87-91.
80. Carson, C.F., Riley, T.V. Safety, efficacy and provenance of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil. Contact Dermatitis 2001; 45: 65-67.
81. World Health Organization. *Bulbus Allii Sativi*. WHO monographs on selected medicinal plants. WHO Graphics, Geneva 1999; 16-32.
82. Ankri, S., Mirelman, D. Antimicrobial properties of allicin from garlic. Microbes Infect 1999; 1: 125-129.
83. De González, M., Mendoza, M., De Albornoz, M., Apitz-Castro, R. Efectos del ajoeno sobre dermatofitos, *Candida albicans* y *Malassezia furfur*. Rev Iberoam Micol 1998; 15: 277-281.
84. San-Blas, G., Urbina, J.A., Marchan, E., Contreras, L.M., Sorais, F., San-Blas, F. Inhibition of *Paracoccidioides brasiliensis* by ajoene is associated with blockade of phosphatidylcholine biosynthesis. Microbiology 1997; 143: 1583-1586.
85. Naganawa, R., Iwata, N., Ishikawa, K., Fukuda, H., Fujino, T., Suzuki, A. Inhibition of microbial growth by ajoene, a sulfur-containing compound derived from garlic. Appl Environ Microbiol 1996; 62: 4238-4242.
86. Ledezma, E., Marcano, K., Jorquera, A. y cols. Efficacy of ajoene in the treatment of tinea pedis: A double-blind and comparative study with terbinafine. J Am Acad Dermatol 2000; 43: 829-832.

87. World Health Organization. *Folium Eucalypti*. WHO monographs on selected medicinal plants. WHO Graphics, Geneva 2002; 106-113.
88. World Health Organization. *Herba Thymi*. WHO monographs on selected medicinal plants. WHO Graphics, Geneva 1999; 259-266.
89. De Lucca, A.J., Walsh, T.J. Antifungal peptides: Novel therapeutic compounds against emerging pathogens. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1-11.
90. Hancock, R.E., Chapple, D.S. Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1317-1323.
91. De Lucca, A., Walsh, T. Antifungal peptides: Origin, activity, and therapeutic potential. *Rev Iberoam Micol* 2000; 17: 116-120.
92. Selitrennikoff, C.P. Antifungal proteins. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 2883-2894.
93. Stevens, D.A., Calderon, L., Martínez, M., Clemons, K.V., Wilson, S.J., Selitrennikoff, C.P. Zeamatin, clotrimazole and nikkomycin Z in therapy of a *Candida vaginitis* model. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50: 361-364.
94. Guyot, M. Intricate aspects of sponge chemistry. *Zoosystema* 2000; 22: 419-431.
95. Faulkner, D.J. Marine pharmacology. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2000; 77: 135-145.
96. Proksch, P., Edrada, R.A., Ebel, R. Drugs from the seas Current status and microbiological implications. *Appl Microbiol Biotechnol* 2002; 59: 125-134.
97. Blunt J.W., Copp, B.R., Munro, M.H., Northcote, P.T., Prinsep, M.R. Marine natural products. *Nat Prod Rep* 2003; 20: 1-48.

98. Bakus, G., Green, G. Toxicity in sponges and holothurians: A geographic pattern. *Science* 1974; 185: 951-953.
99. Tsoukatou, M., Hellio, C., Vagias, C., Harvala, C., Roussis, V. Chemical defense and antifouling activity of three Mediterranean sponges of the genus *Ircinia*. *Z Naturforsch* 2002; 57: 161-171.
100. Mayer, A.M., Hamann, M.T. Marine pharmacology in 1999: Compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, antihelmintic, anti-inflammatory, antiplatelet, antiprotozoal and antiviral activities affecting the cardiovascular, endocrine, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2002; 132: 315-339.
101. Nicholas, G.M., Hong, T.W., Molinski, T.F., Lerch, M.L., Cancilla, M.T., Lebrilla, C.B. Oceanapiside, an antifungal bis-alpha, omega-amino alcohol glycoside from the marine sponge *Oceanapia phillipensis*. *J Nat Prod* 1999; 62: 1678-1681.
102. Tsukamoto, S., Matsunaga, S., Fusetani, N., Van Soest, R.W. Acanthosterol sulfates A-J: Ten new antifungal steroidal sulfates from a marine sponge *Acanthodendrilla* spp. *J Nat Prod* 1998; 61: 1374-1378.
103. Pettit, R.K., McAllister, S.C., Pettit, G.R., Herald, C.L., Johnson, J.M., Cichacz, Z.A. A broad-spectrum antifungal from the marine sponge *Hyrtios erecta*. *Int J Antimicrob Agents* 1997; 9: 147-152.
104. Ovechkina, Y.Y., Pettit, R.K., Cichacz, Z.A., Pettit, G.R., Oakley, B.R. Unusual antimicrotubule activity of the antifungal agent spongistatin 1. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1993-1999.
105. Andra, J., Berninghausen, O., Leippe, M. Cecropins, antibacterial peptides from insects and mammals, are potently fungicidal against *Candida albicans*. *Med Microbiol Immunol* 2001; 189:169-173.

106. De Lucca, A., Bland, J., Jacks, T., Grimm, C., Cleveland, T., Walsh, T. Fungicidal activity of cecropin A. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 481-483.
107. Michaut, L., Fehlbaum, P., Moniatte, M., Van Dorsselaer, A., Reichhart, J.M., Bulet, P. Determination of the disulfide array of the first inducible antifungal peptide from insects: Drosomycin from *Drosophila melanogaster*. *FEBS Lett* 1996; 395: 6-10.
108. Ghannoum, M.A., Rice, L.B. Antifungal agents: Mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 501-517.
109. Groll, A.H., Walsh, T.J. Antifungal chemotherapy: Advances and perspectives. *Swiss Med Wkly* 2002; 132: 303-311.
110. Odds, F.C., Brown, A.J., Gow, N.A. Antifungal agents: Mechanisms of action. *Trends Microbiol* 2003; 11: 272-279.
111. Vicente, M.F., Basilio, A., Cabello, A., Pelaez, F. Microbial natural products as a source of antifungals. *Clin Microbiol Infect* 2003; 9: 15-32.
112. Li, R.K., Rinaldi, M.G. *In vitro* antifungal activity of nikkomycin Z in combination with fluconazole or itraconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1401-1405.
113. Brizuela, M., García, L., Pérez, L., Mansur, M. Basidiomicetos: Nueva fuente de metabolitos secundarios. *Rev Iberoam Micol* 1998; 15: 69-74.
114. Andriole, V.T. The 1998 Garrod lecture. Current and future antifungal therapy: New targets for antifungal agents. *J Antimicrob Chemother* 1999; 44: 151-162.
115. Debono, M., Gordee, R.S. Antibiotics that inhibit fungal cell wall development. *Annu Rev Microbiol* 1994; 48: 471-497.

116. Barrett, D. From natural products to clinically useful antifungals. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1587: 224-233.
117. Roling, E.E., Klepser, M.E., Wasson, A., Lewis, R.E., Ernst, E.J., Pfaller, M.A. Antifungal activities of fluconazole, caspofungin (MK0991), and anidulafungin (LY 303366) alone and in combination against *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* via time-kill methods. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; 43: 13-17.
118. Denning, D.W. Echinocandin antifungal drugs. *Lancet* 2003; 362: 1142-1151.
119. Bonifaz, Alexandro (2000). «Capítulo 3: Dermatofitosis». *Micología Médica Básica*. México: Méndez-editores. pp. 35-95. ISBN 965-6596-85-2.
120. Weirzman I, Summerbell RC. The dermatophytes. *Clin Microbiol Rev.* 1995; 8:240-259.
121. Víctor M. Tarango Martínez (2011). Dermatofitos: Epidemiología y cuadros clínicos. En Méndez-Tovar; López-Martínez; Hernández-Hernández. *Actualidades en micología médica*. Editorial FacMed-UNAM. 5a edición. pp. 115-117. México.
122. Ferrándiz Foraster C. Micosis cutaneomucosas superficiales. En: Ferrándiz C, ed. *Dermatología Clínica*. 3ª edición. Barcelona: Elsevier, 2009; p. 67-77.
123. Kwon-Chung KJ, Bennett JE. *Medical mycology*. Philadelphia, Lea &Febiger, 1992.
124. Ajello L, Georg LK. In vitro hair cultures for differentiating between atypical isolates of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*. *Mycopath Mycol Appl* 1957; 8: 3-17.

125. Kane J, Summerbell R, Sigler L, Kraiden S, Land G. Laboratory handbook of dermatophytes: a clinical guide and laboratory handbook of dermatophytes and other filamentous fungi from skin, hair, and nails. Belmont, Star Publishing Co., 1997.
126. Rebell G, Taplin D. Dermatophytes, their recognition and identification. Coral Gables, University of Miami Press, 1979.
127. Georg LK, Camp LB. Routine nutritional tests for the identification of dermatophytes. *J. Bacteriol* 1957; 74: 113-121.
128. Emilia Cantón Lacasa, Estrella Martín Mazuelos, Ana Espinel-Ingroff. *Revista Iberoamericana de Micología - ISBN: 84-607-3050-6; Pruebas estandarizadas para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos*, 2001.
129. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A. Villanova, National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1997.
130. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi. Proposed standard M38-P. Villanova, National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1998.
131. Arango M, Castañeda E. *Micosis humanas: procedimiento diagnóstico*. Santa fe de Bogotá: corporación para investigaciones biológicas / Instituto Nacional de Salud, 1995 p. 45-7.
132. Deacon, JW. *Introducción a la micología moderna*. Buenos aires. Ed. LIMUSA; 1990 p. 126
133. Lopez R. Mendez L, Hernandez F, Castañón R. *Micología médica: procedimiento para el diagnóstico de laboratorio*. Mexico; Ed. Trillas. 1995. P. 36.

134. Rippon J, Micología medica 3^{ra} ed. Madrid. Ed. Interamericana Mac Graw-Hill, p. 186-260.
135. Koneman EW, Allen SD, Dowell VR, Janda WM, Sommers HM et al. Diagnóstico Microbiológico 3^{ra} ed. Buenos aires. Ed. Medica Panamericana. 1993. p. 692-5.
136. Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. *Trichophyton rubrum*. En: Atlas of Clinical Fungi. (2nd ed.) Utrech-Reus, Centralbureau voor Schimmelcultures- Universitat Rovira y Virgili, 2000: 973-976.
137. Méndez Tovar LJ, López Martínez R, Hernández Hernández F. Parte III. Micosis superficiales. Dermatofitos. En: Actualidades en Micología Médica (2^{da} ed.). México, Facultad de Medicina UNAM, 2004: 109-142.
138. Rodríguez, Suley (2005). La Guía para el Tamizaje Fitoquímico.
139. Espinoza Manchego, Miriam Luisa, Herrera Lengua, Luis Felipe. (2005). Evaluación Fitoquímica del Extracto de Hojas de *Genipa Americana L.* “Huito” y su Actividad Antifúngica *in vitro* frente a los dermatofitos de importancia médica. Instituto Nacional De Salud. Perú.
140. Blga. Gisely Hajar Guerra. Bioseguridad en el Laboratorio. BIOSEGURIDAD. MINISTERIO DE SALUD DEL PERU, INSTITUTO NACIONAL DE SALUD-INS. Organismo Público Descentralizado del Sector Salud.
141. Betancourt Badell. J. (1999). Cuestiones éticas en la experimentación animal. DOC.
142. Evaluación Fitoquímica Del Extracto De Hojas De *Genipa Americana L.* “Huito” Y Su Actividad Antifúngica *In Vitro* Frente A Los Dermatofitos De Importancia Médica. Espinoza Manchego, Miriam Luisa, Herrera Lengua, Luis Felipe. Instituto Nacional De Salud. 2005. Perú

ANEXOS

ANEXO Nº 1

DATOS DE PASAPORTE DE COLECCIÓN DE ESPECIES DE LAS PLANTAS MEDICINALES EN ESTUDIO

Nº de Ficha:

FICHA DE CAMPO

DATOS GENERALES:

Lugar de colección:.....Distrito:.....Provincia:.....
Fecha:.....Tipo de Bosque:.....
Coordenadas UTM: (X).....(Y).....
Tipo de Suelo:.....Otras características:.....
Nombre del Colector:.....Nº Colección:.....

TAXONOMÍA:

Familia Vegetal:.....Nombre Científico:.....
Nombre Vulgar:.....

CARACTERÍSTICAS VEGETALES:

Habitad:.....Estadio Productivo.....
Posición de Hojas:.....Presencia de Órganos Accesorios en Hojas:.....
Forma del Tallo:.....Órganos Accesorios en Tallo:.....
Características de la Corteza:.....Látex:.....Color de Látex:.....
Tipo de Inflorescencia:.....Posición de Inflorescencia:.....
Tipo de Flor por Sexo:.....Nº de Pétalos:.....Unión de Sépalos:.....
N de Estambres:.....Posición de Estambres:.....
Posición de Ovarios:.....Nº de Carpelos:.....
Tipo de Fruto:.....Consistencia:.....Dehiscencia:.....

DATOS ETNOFARMACOLÓGICOS:

Uso Medicinal 1:.....Parte Usada:.....
Cantidad Usada 1:.....Forma de Preparación:.....
Uso Medicinal 2:.....Parte Usada:.....
Cantidad Usada 2:.....Forma de Preparación:.....
Uso Medicinal 3:.....Parte Usada:.....
Cantidad Usada 3:.....Forma de Preparación:.....

COLECTA DE MATERIAL BIOLÓGICO:

Peso:.....
Parte Colectada:.....
Observaciones:.....
.....
.....

ANEXO Nº 2
MUESTRA BOTÁNICA



FIGURA Nº 1: Escapita de una muestra botánica de *Brosimum rubescens* Taubert.

ANEXO Nº 3
MUESTRA BOTÁNICA



FIGURA Nº 2: *Clibadium surinamense* L. 1: Habit. 2: hojas. 3: cabeza. 4: Male flower. 5: Male floret, corolla opened to show androecium. 6: Antenas. 7: Female floret. 8: Corolla opened to show style branches. 9: Infructescencia.

ANEXO Nº 4

DISEÑOS DE INVESTIGACIÓN

Ext. Liof. (mg/ ml)		Porcentaje de inhibición (%)									
		<i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188				<i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 24953				Blanco	Control Positivo (Clotrimazol)
		72 h de incubación		168 h de incubación		72 h de incubación		168 h de incubación			
		con DMSO	con Tween-80	con DMSO	con Tween-80	con DMSO	con Tween-80	con DMSO	con Tween-80		
16	d1										
	d2										
	d3										
8	d1										
	d2										
	d3										
4	d1										
	d2										
	d3										
2	d1										
	d2										
	d3										
1	d1										
	d2										
	d3										
0.5	d1										
	d2										
	d3										
0.3	d1										
	d2										
	d3										
0.15	d1										
	d2										
	d3										
0.07	d1										
	d2										
	d3										
0.03	d1										
	d2										
	d3										

ANEXO N° 5



FOTO N° 01-03: fotografía *in situ* de la muestra botánica *Clibadium surinamense* L. “huaca” de la comunidad de “SAN ANDRES”, (coordenadas UTM-, x = 691,155.29, y = 9’591,999.76);

ANEXO Nº 6
SECADO Y MOLIENDA DE LA MUESTRA VEGETAL

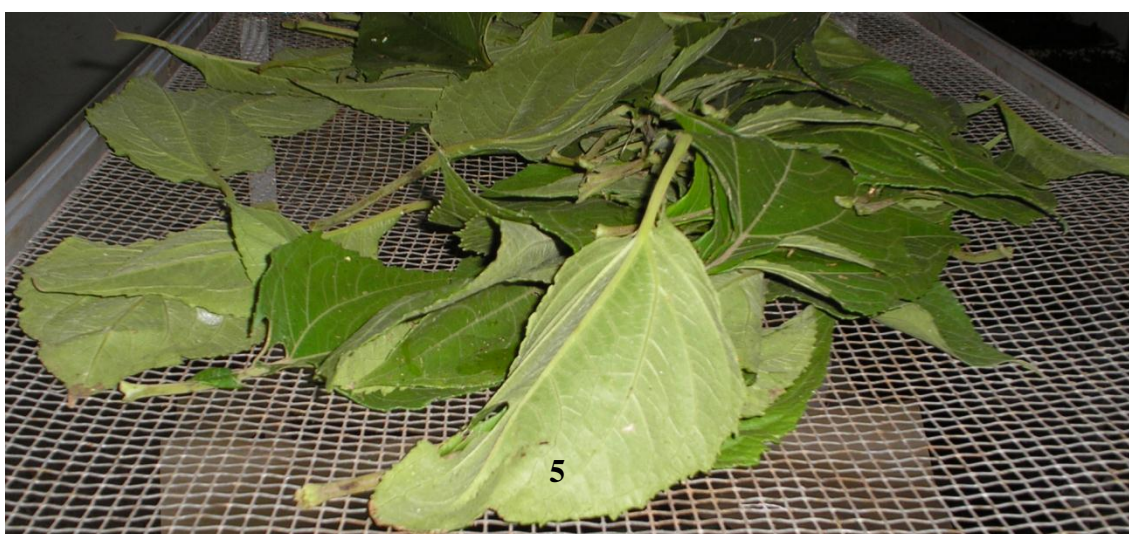


FOTO Nº 04-07: secado y molienda de las hojas frescas de *Clibadium surinamense* L. “huaca” realizados en el laboratorio de Fitoquímica del Instituto de Medicina Tradicional (IMET-EsSalud)

ANEXO Nº 7

OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO



FOTO Nº : FOTO Nº 08-10: Proceso de filtrado y obtención del extracto acuoso de la hojas de *Clibadium surinamense L.* (huaca) realizados en el laboratorio de Fitoquímica del IMET-EsSalud.

ANEXO Nº 8

OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO LIOFILIZADO



FOTO Nº 11: Proceso de liofilización del extracto acuoso de las hojas de *Clibadium surinamense L.* (huaca) realizados en un liofilizados *Freezer Dry sistem 4,5 L* LABCONCO del laboratorio de Fitoquímica del IMET-EsSalud.

ANEXO Nº 9

DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS



FOTO Nº 12: Proceso en la cual se esta determinado los sólidos totales de las hojas de *Clibadium surinamense L.* (huaca) realizados en el laboratorio de Fitoquímica del IMET-EsSalud.

ANEXO Nº 10

EXTRACCION EN SOLVENTES ORGANICOS DE LA DROGA



FOTO Nº 13-15: Tamizaje fitoquímico del extracto acuoso liofilizado de las hojas de *Clibadium surinamense* L. (huaca) realizados en el laboratorio de Fitoquímica del IMET-EsSalud.

ANEXO Nº 11

SCREENING FITOQUÍMICOS DE LA DROGA



FOTO Nº 16-24: Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto acuoso liofilizado de las hojas de *Clibadium surinamense* L. (huaca) realizados en el laboratorio de Fitoquímica del IMET-EsSalud.

ANEXO Nº 12

FARMACOGNOSIA DE LA DROGA

1.- DETERMINACIÓN DE SUSTANCIAS SOLUBLES

De la muestra de laboratorio previamente pulverizada y tamizada, se pesan 5 g y se transfiere a un frasco cónico con tapa de 250 mL.; se añade 100 mL de agua o alcohol al por ciento establecido en la monografía.

Se agita durante 6 horas y se deja en reposo hasta el día siguiente; se agita 30 min , se deja reposar alrededor de 30 min y se filtra por papel. Se toma una alícuota de 20 mL, se evapora sobre baño de agua, se deseca a 105°C en una estufa durante 3 horas, se enfría en una desecadora y luego se pesa.

2.- DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD

De la muestra de ensayo, con el grado de trituración que determine la norma específica se pesan 2.0 g. con un error de 0.5 mg, luego se transfiere a una placa petri previamente tarada y se deseca a 105°C durante 3 h

La placa petri conteniendo la muestra desecada, se pasa a una desecadora donde se deja enfriar a la temperatura ambiente y se pesa colocándose nuevamente en la estufa durante 1 h; se repite esta operación hasta obtener una masa constante.³

3.- DETERMINACIÓN DE CENIZAS TOTALES

En un crisol de porcelana o platino, previamente tarado, pesar con un error máximo de 0.5 mg la muestra de ensayo pulverizada y tamizada.

Se calienta suavemente la muestra de ensayo con un mechero bunsen hasta carbonización (aprox. 450°C) y posteriormente se incinera en un horno mufla a una temperatura entre 700 a 750°C durante 2 h, si no se señala otra temperatura en la norma específica. Se enfría el crisol en una desecadora y se pesa.

Se repite el proceso a partir de la incineración, hasta obtener masa constante, es decir, hasta que no difieran en más de 0.5 mg/g dos pesadas consecutivas.

Para obtener la masa constante, el tiempo de calentamiento y pesada se hace en intervalos de 30 minutos. Si el residuo presenta trazas de carbón, se le añaden unas gotas de solución de ácido nítrico y se calienta hasta evaporar la solución. Al enfriar el crisol, el residuo es de color blanco o casi blanco.

4.- DETERMINACIÓN DE CENIZAS SOLUBLES EN AGUA

A las cenizas obtenidas en 3.3.1.4., se añaden de 15 a 20 ml. De agua el crisol se tapa y se hierve suavemente a la llama del mechero durante 5 min. La solución se filtra a través de papel de filtro libre de cenizas, con cenizas determinadas o declaradas. El filtro con el residuo se transfiere al crisol inicial, se carboniza en un mechero y luego se incinera en un horno mufla de 700 a 750°C. Durante 2 horas (si no se señala otra temperatura en la norma específica). Posteriormente se coloca en una desecadora y cuando alcance la temperatura ambiente se pesa. Se repite el procedimiento hasta alcanzar masa constante.

5.- DETERMINACIÓN DE CENIZAS INSOLUBLES EN HCl

A las cenizas obtenidas en 3.3.1.5., se le añaden 15 a 20 ml de HCl al 10% .El crisol se tapa y se hierve suavemente durante 5 min. La solución se filtra a través de un papel de filtro libre de cenizas con cenizas determinadas o declaradas, se lava el residuo con agua caliente hasta que al añadirle al filtrado acidulado con ácido nítrico, 1 ó 2 gotas de solución de AgNO_3 0.1 mol/ L, no muestre presencia de cloruros. El filtro con el residuo, se transfieren al crisol inicial se carboniza en la mechero y luego se incinera en nuevo horno mufla a una temperatura de 700 a 750°C. (Si no se señala otra temperatura en la norma específica) durante 2 horas. Posteriormente se coloca en una desecadora y cuando alcance la temperatura ambiente se pesa. Se repite el procedimiento hasta alcanzar masa constante.

ANEXO Nº 13

MÉTODOS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES

1.- DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES ORGANOLÉPTICAS

Las muestras que presenten sedimentos se filtran antes de efectuar las determinaciones.

2.- DETERMINACIÓN DEL OLOR

Se toma una tira de papel secante de aproximadamente 1 cm. de anchura por 10 cm. de longitud y se introduce un extremo en la muestra de ensayo. Se huele y se determina si corresponde con las características del producto.

3.- DETERMINACIÓN DEL COLOR Y ASPECTO

Se toma un tubo de ensayo bien limpio y seco, se llena hasta las tres cuartas partes con la muestra de ensayo y se observa el color, la transparencia, la presencia de partículas y la separación de capas. Se informa el resultado.

4.- DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD RELATIVA

De la muestra de ensayo se toma la cantidad necesaria de acuerdo con la capacidad del picnómetro y se enfría a 25°C.

Se pesa el picnómetro limpio, vacío y seco con un error máximo permisible de ± 0.5 mg. Y se llena con la muestra de ensayo de modo que no queden burbujas de aire, si es preciso se emplea una tira de papel de filtro para extraer el exceso de muestra.

Se sumerge en un baño de agua a $(25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C})$ durante 30 minutos al cabo de los cuales se tapan, se seca exteriormente cuidando de no frotar excesivamente o de transmitir el calor de la mano y se pesa. Se vacía el picnómetro, se lava con alcohol etílico y posteriormente con agua, repitiéndose el ensayo con agua enfriada a 25°C.

5.- DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS TOTALES

De la muestra de ensayo previamente homogenizada se transfiere 5 ml. A una cápsula de porcelana limpia, seca y previamente tarada, la cápsula se coloca en un baño de agua (40-50°C) y se evapora hasta que el residuo este aparentemente seco; posteriormente se pasa a una estufa, a una temperatura de $105 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 3 horas.

Se retira la cápsula de estufa, se coloca en una secadora hasta que alcance la temperatura ambiente y se pesa. Se repite el proceso anterior, pero empleando solo 60 minutos de secado, las veces necesarias, hasta obtener masa constante.

6.- DETERMINACIÓN DE ANÁLISIS CAPILAR

Se vierten 20 ml. de la muestra de ensayo en un vaso para precipitado de 100 ml. aproximadamente de 5 cm. de diámetro y 7 cm. de altura y se introduce a la cámara protectora.

Se coloca una banda de papel filtro (Whatman N°1) de 4 cm. de ancho por 15 cm. de longitud verticalmente de manera que su borde superior este fijado a una varilla metálica que permita la suspensión de la tira de papel y su extremo inferior este sumergido dentro de la muestra de ensayo pero sin tocar el fondo ni las paredes del recipiente.

Se cierra la cámara y se dejan transcurrir 2 horas garantizando una temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante la corrida; finalizada ésta se retira el papel y se deja secar. Una vez seco se procede a su inspección visual y caracterización.

7.- EXAMEN E INTERPRETACIÓN DE LA IMAGEN

Para el análisis e interpretación de la imagen se tienen en cuenta los aspectos siguientes: color, altura, descripción de las diferentes partes, cambios de coloración con vapores de amoníaco, exámen bajo la luz ultravioleta.

7.1.- *Color:*

En dependencia de la tonalidad que predomine, el color de la imagen en conjunto se define como:

- Vivamente coloreada.
- Poco coloreada.
- Muy poco coloreada.

7.2.- *Altura:*

La altura de una imagen capilar se determina midiendo con una regla graduada en cm. del borde inferior del papel hasta la franja clasificándose en:

- Alta..... de 8 cm. en adelante.
- Normal.... entre 5 y 8 cm.
- Baja..... menos de 5 cm.

7.3.- *Descripción de las diferentes partes:*

Se describen e informan la forma que tiene la franja y las características de la subfranja, banda y sub-banda.

7.4.- *Cambios de coloración con vapores de amoníaco:*

Se expone la imagen capilar a los vapores de amoníaco y se observan e informan los cambios de color. El efecto de la coloración debe desaparecer al alejar la tira de papel de los vapores amoniacales.

7.5.- *Exámen bajo la luz ultravioleta:*

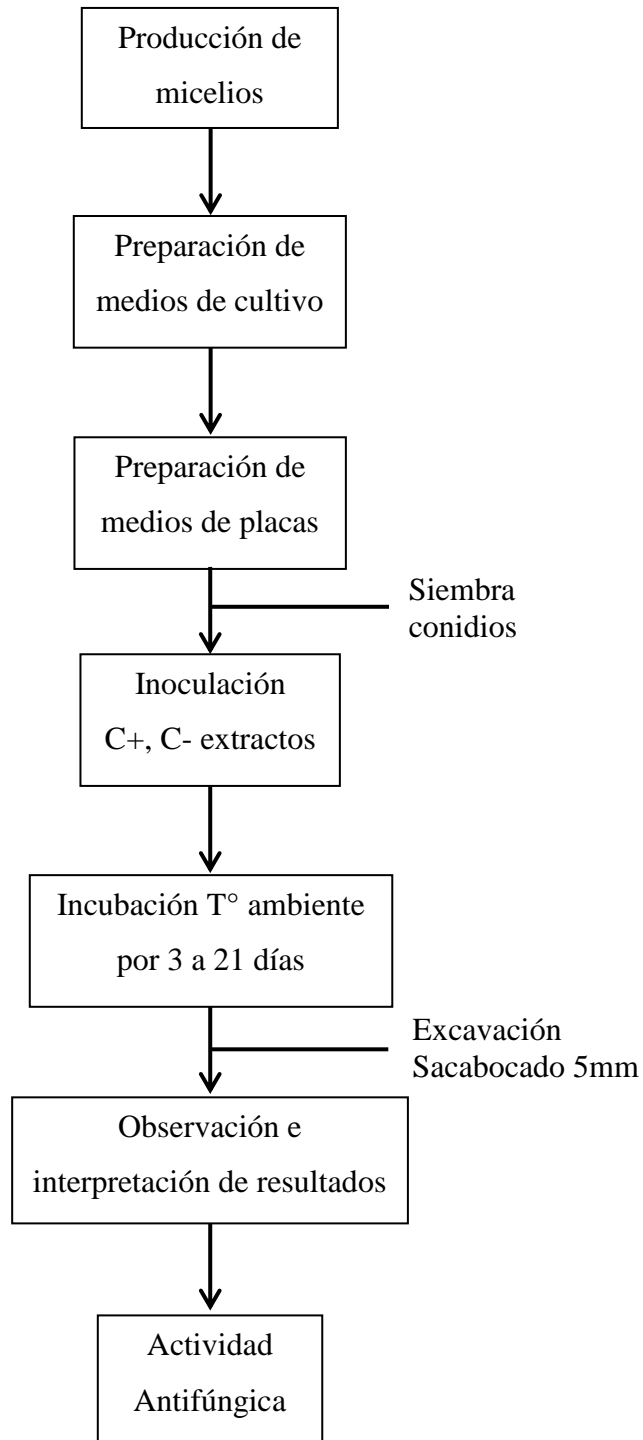
Después de la corrida la tira de papel bien seca se expone a la luz ultravioleta a 365 nm. Se observa e informa la fluorescencia de las diferentes zonas de la imagen.

8.- DETERMINACIÓN DEL PH

- Comprobar que el electrodo contenga suficiente solución de KCl (3mol/l), hasta por debajo de la abertura de llenado.
- Durante la medición la abertura lateral del electrodo debe permanecer abierta.
- Sumergir el electrodo, hasta cubrir el diafragma en la solución problema (2 cm. aproximadamente).
- Conectar y prender el equipo.
- Pulsar la tecla hasta que aparezca en la pantalla el símbolo de pH.
- Realizar la lectura cuando el triángulo de la pantalla haya desaparecido.
- Retirar el electrodo de la solución y enjuagarlo con agua destilada y secar el electrodo con papel filtro.
- Continuar midiendo o conservar el electrodo en una solución de KCl (3mol/l) con la abertura lateral de llenado cerrada.

ANEXO Nº 14

ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIFUNGICA



ANEXO Nº 15

DISOLUCIONES 1/50

