



SEP

TECNM

DITD

INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR DE ATLIXCO

Organismo Público Descentralizado del Gobierno del Estado de Puebla

**Evaluación de la actividad anti fúngica del extracto de la
planta cornezuelo (*Acacia cornígera*) sobre los hongos
Aspergillus flavus, *Aspergillus niger*, *Aspergillus
fumigatus* y *Candida albicans*.**

OPCIÓN

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO BIOQUÍMICO

PRESENTA:

ANA LAURA ROJAS MORANCHEL

ASESORA INTERNA:

M.T.A GUADALUPE GABRIELA BÁRCENA VICUÑA

ASESORA EXTERNA:

ING. LEONOR NAVA MONTIEL

ATLIXCO, PUE. OCTUBRE 2020

“En la naturaleza está todo, se trata solo de encontrarlo, de combinarlo de manera adecuada, de conservarlo, aplicando todo el conocimiento del pasado y presente, para un nuevo equilibrio entre hombre y naturaleza, ventajosos para ambos”

Exmo Valentino Mercati

“La medicina natural y tradicional no es una solución de la pobreza, sino una opción de la riqueza”

Raúl Castro Ruz

AGRADECIMIENTOS

En este proyecto de tesis participaron diferentes personas, directa e indirectamente apoyando, enseñando, corrigiendo, capacitando y teniendo gran paciencia en cada una de las actividades realizadas por esto considero importante su mención en este apartado.

Como primera mención quiero agradecer al Instituto Tecnológico Superior de Atlixco (ITSA) y al Instituto Tecnológico Superior de Venustiano Carranza (ITSVC) por el trabajo colaboración asignado para esta tesis.

Por consiguiente, a las personas que fueron los pilares importantes para el desarrollo de este proyecto, que gracias a sus enseñanzas y continua capacitación se logró realizar exitosamente:

MTA. Gabriela Bárcena Vicuña docente y asesora en este trabajo de tesis, por sus enseñanzas y conocimiento aportado para que todo esto se llevara a cabo.

Ing. Leonor Nava Montiel le agradezco la oportunidad de participación en esta investigación y por la confianza brindada.

Dra. Johana Ramírez Hernández mi docente y tutora durante los años de carrera, le agradezco la paciencia que me tuvo a lo largo de la carrera, también por todas las oportunidades y enseñanzas que me dio.

A mis compañeros de clase porque siempre fue un grupo constante y unido, además que siempre hubo apoyo por parte de todos los compañeros.

Mtra. Teresa Rojas Torres por ser la guía principal para superarme profesionalmente.

Ing. Alejandro Rojas Torres por los consejos ante problemas de la vida profesional

Mtro. José Alfonso Pérez Méndez por la motivación y apoyo en el transcurso de la carrera.

Finalmente, al cimiento más importante en mi vida mi familia:

A mis padres por su apoyo incondicional en todas mis decisiones, la confianza, el cariño y el amor que logran que todo lo que me proponga lo cumpla.

A mis hermanos por el apoyo brindado, les agradezco la comprensión y el cariño.

A mis abuelas por el cariño que siempre me han dado.

Índice

Introducción.....	7
Justificación.....	8
Objetivos.....	9
Objetivo General.....	9
Objetivos específicos.....	9
Hipótesis.....	10
Marco teórico.....	11
1. Cornezuelo (<i>Acacia cornígera</i>).....	11
1.1 Familia Fabaceae.....	12
1.2 Sub-familia Mimosoideae.....	13
1.3 Fitoquímica y acción farmacológica de las Acacias.....	14
2. Hongos.....	15
2.1 Clasificación del reino fungi.....	16
2.2 Hongos patógenos.....	18
2.2.1 Taxonomía.....	19
2.3 Aspergillus.....	20
2.3.1 <i>Aspergillus fumigatus</i>	23
2.3.2 <i>Aspergillus flavus</i>	25
2.3.3 <i>Aspergillus niger</i>	26
2.4 <i>Cándida albicans</i>	28
3. Materiales y métodos.....	30
3.1 Material biológico.....	30
3.2 Reactivos.....	30
3.3 Equipo.....	31

4. Metodología	31
4.1 Método de micro dilución para hongos	32
4.2. Medio de cultivo	32
4.3 Activación de hongos	32
4.4. Preparación del inóculo	33
4.5 Preparación de las placas	33
4.6 Proceso de las soluciones antifúngicas	33
4.7. Preparación de los sensidiscos	34
4.8. Colocación de sensidiscos con antifúngico	34
4.9 Halos de inhibición	35
5 Resultados	36
5.1 Comparación de resultados	36
5.2 Discusión de resultados	55
Conclusión	57
Referencias bibliográficas	58

Introducción

En el transcurso de los años la humanidad ha ido evolucionado, con ello su estilo de vida se va adecuando a las nuevas necesidades desarrollando ciencias y tecnologías favorables para lo que ahora se vive, con el crecimiento de este entorno los microorganismos patógenos encontrados en el ambiente se han adaptado y hecho más resistentes a los fármacos que los controlaban y/o eliminaban.

El reino Fungí representa una de los más grandes acervos de la biodiversidad a nivel mundial pero un aproximando del 50% son hongos patógenos, los cuales provocan enfermedades y hasta la muerte a los seres vivos (plantas, animales, seres humanos); Entre los más comunes se encuentra dos familias de hongos con diversas especies causantes de daños severos para el ser humano: El primero grupo es la familia de los *Aspergillus* que cuenta con alrededor de seiscientos subfilos, dentro de estos encontramos tres con un alto nivel nocivo para la salud *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus fumigatus*, son considerados patógenos oportunistas que causan infecciones locales y superficiales como la micosis y el aspergiloma; En el segundo grupo se nombra a *Candida* una familia con diversas especies de hongos reputados por enfermedades severas para el ser humano, una normalmente señalada es *Candida albicans* causante de enfermedades como candidiasis o moniliasis la infección puede hacerse sistémica (candidemia), y puede llegar a ser mortal.

El crecimiento y evolución de estos agentes patógenos ha tomado un porcentaje alto dentro de la diversidad del reino fungi, con ello todas estas enfermedades que han atacado al ser humano con una resistencia activa a los antimicóticos que normalmente conocemos.

Justificación

Actualmente la inhibición de crecimiento fúngico es controlada por medio de químicos los cuales en consumo rutinario podrían ser dañinos, además el uso irracional ha ocasionado la generación de poblaciones resistentes a la acción de este nuevo grupo de hongos, estos son considerados agentes patógenos que propician enfermedades mortales al ser humano, la estrategia más utilizada para su control consiste en la aplicación de fármacos antimicóticos a base de químicos en la zona afectada por el hongo, cabe de mencionar estas soluciones antimicóticas son de un precio mayor, por lo tanto, se buscan alternativas naturales con efectos anti fúngicos y económicos.

México es un país reconocido por su etnobotánica; Cornezuelo (*Acacia cornígera*) es una planta originaria de Veracruz que tiene propiedades medicinales con funcionamiento antidiarreico, sus características espinas (cuernos) poseen propiedades desintoxicantes y anti fúngicas.

Objetivos

Objetivo General

Determinar la eficacia del efecto anti fúngico que contiene el extracto de la planta Cornezuelo (*Acacia cornígera*) en los hongos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans*.

Objetivos específicos

Determinar la concentración mínima inhibitoria del extracto de la planta Cornezuelo (*Acacia cornígera*) en los hongos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans*.

Obtener un comparativo entre el extracto de la planta *Acacia cornígera* y el voriconazol, un anti fúngico comercial.

Hipótesis

El extracto etanólico de la planta *Acacia cornígera* posee propiedades anti fungicas, para inhibir el crecimiento de hongos patógenos como *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans*.

Marco teórico

1. Cornezuelo (*Acacia cornígera*)



Figura 1. *Cornezuelo (Acacia cornígera)*

Fuente: Anónimo "*Acacia cornígera*" 5 de abril 2007.

Árbol o arbusto comúnmente conocida como cornezuelo o cuerno de toro es un arbusto que llega a medir de 2 a 8 metros, con hojas compuestas de alternas, bipinnadas, pecíolo con una glándula con forma de canoa, frecuentemente con glándulas entre cada par de folíolos, estípulas espiniformes, negras o café oscuras que sirven como refugio para las hormigas, esta especie se encuentra en mayor abundancia en el estado de Veracruz ya que está adaptada a climas cálidos por lo regular la ocupan como planta medicinal para antidiarreico (Ibarra & Colín, 2018).

Especies	Acacia cornígera
Género	<i>Acacia</i>
Nombres comunes	Cuerno toro, Cornezuelo, Cuernitos.
Sinonimia botánica	<i>Acacia rossiana</i> Schrenk, <i>Acacia</i> <i>spadicigera</i> Cham, & Schlechtendal, <i>Acacia</i> <i>veracruzansis</i> Schrenk.
Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Rosidae
Orden	Fabales
Familia	Fabaceae
Subfamilia	Mimosaideae
Tribu	Acacieae

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Acacia cornígera*

Fuente: USDA, 2013.

1.1 Familia Fabaceae

Porte: herbáceas, anuales o perennes. Matas, arbustos, bejucos y árboles. Se utilizan como alimento y forraje de animales. Son medicinales, industriales, ornamentales. Son benéficas ya que viven en simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno.

Hojas: generalmente son pinnaticompuestas, raros simples. Tienen estípulas. Se disponen alternadamente.

Flores: solitarias, racimos, capítulos. La flor es hermafrodita, tetrámera y pentámera, son irregulares o zigomorfas, otras son regulares o actinomorfas.

Perianto: diferenciado, el cáliz de 4 a 5 sépalos lobulados, la corola de 4 a 5 pétalos, regulares e irregulares.

Androceo: presentan 8, 9 o 10 o muchos estambres como la mimosa. Están libres o agrupados en monodelfos.

Gineceo: pistilo simple por un solo carpelo, con un solo lóculo, de ovario supero o medio con 1, 2 o numerosos óvulos.

Fruto: generalmente legumbre, en otros es lomento (fruto indehiscente), en otros es un folículo (Castillo, 2017).

1.2 Sub-familia Mimosoideae

Porte: árboles y arbustos, los tallos contiene espinas, sus hojas son pinnaticompuestas (paripinnadas o imparipinnadas). Sus semillas son usadas como alimento, otras plantas producen gomas o taninos (Tara).

Flor: pequeña y regular. Generalmente de color amarillo, otros de color rojo. El perianto es diferenciado, tiene sépalos soldados y corola con pétalos regulares.

Androceo: presenta 5, 10 o numerosos estambres soldados.

Gineceo: pistilo unicarpelar, unilocular con varios ovulo y ovario supero.

Fruto: legumbre o lomento (Castillo, 2017).

1.3 Fitoquímica y acción farmacológica de las Acacias

Las especies del género *Acacia* presenta los siguientes grupos de metabolitos: aceites esenciales, agliconas flavonoides, alcaloides, antocianinas, antraquinonas, carotenoides, chalconas, compuestos reductores, cumarinas, flavonoides mucílagos, principios amargos, saponinas, taninos catéquicos (Villaseñor & Espinosa, 1998).

Las dos familias de metabolitos secundarios que se encontraron con mayor fuerza en las pruebas químicas fueron los carotenoides y los mucílagos. (Bernal, Grether, & Amaro, 2018) En las hojas se han detectado los esteroides colesterol, estigmasterol y beta- 21 sitosterol, el alcaloide isoquinolínico tiramina y el flavonoide camferol. De las flores se han aislado los componentes fenólicos anizaldehído, alcohol y aldehído benzoico, para-cresol, el éster metílico del ácido salicílico y el eugenol. En el fruto se han encontrado los flavonoides glucósido y galoil-glucósido de camferol; en la semilla, los aminoácidos raros ácido djenkílico, sus acetilglutamil y acetilsulfóxido, ácido pipercolico y su derivado 4-hidroxilado (Villaseñor & Espinosa, 1998).

Alcaloides: Los alcaloides encontrados son dimetiltriptamina, 5-metoxidimetiltriptamina y N-metiltriptamina. En la mitología egipcia está asociado el árbol de la *Acacia* por sus características al árbol de la vida (Villaseñor & Espinosa, 1998).

Glucósidos cianogénicos: Diecinueve especies de *Acacia* en las Américas contienen glucósidos cianogénicos, que al ser expuestos a una enzima que escinde específicamente glucósidos, pueden liberar cianuro de hidrógeno en las hojas de la planta, lo que puede causar toxicidad si es consumido por el ganado (Herrera & Barreras, 2005).

La actividad farmacológica de la planta se ha evaluado in vitro mostrando actividad fúngica contra *Candida albicans*. El extracto obtenido de las vainas presentó actividad antiinflamatoria en edema de la pata en roedores, inducida por la

carragenina e histamina, otros efectos evaluados son la actividad vasodilatadora en perros, por vía intravenosa. El aceite esencial obtenido de los frutos y evaluado en intestino de conejos mostró una actividad relajante del músculo liso, y por vía intraperitoneal en ratas, mostró actividad potenciadora de barbitúricos. Este mismo aceite esencial, así como una mezcla de glucósidos extraída de la planta, mostró actividad cardiotónica, ejerciendo efecto inotrópico y cronotrópico positivo. El extracto acuoso de las semillas presentó actividad inhibidora de la tripsina (Villaseñor & Espinosa, 1998).

2. Hongos

En el siglo XIX los hongos estaban clasificados dentro del reino de las plantas (Plantae) por ser organismos inmóviles y poseer estructuras anatómicamente similares a éstas. Si bien las plantas poseen raíces, tallo y estructuras aéreas en donde forman semillas, los hongos por su parte se conforman por hifas y micelios fijados al suelo, un talo aéreo que sobresale y estructuras aéreas complejas en donde forman esporas. Es el caso de los hongos silvestres.

Con los avances del microscopio y con el inicio de los análisis moleculares se demostró que los hongos son más cercanos al reino animal (Animalia) que al reino de las plantas. Los hongos no contienen clorofila ni cloroplastos (componentes vegetales que permiten la obtención de energía mediante la luz solar). Es decir, no obtienen sus nutrientes por medio de la fotosíntesis, sino por absorción. Asimismo, los hongos poseen un estilo de vida similar al de los animales, los cuales no son capaces de producir su propio alimento y se nutren de componentes elaborados por otros organismos. Adicionalmente y de forma similar al esqueleto externo de los insectos, los hongos presentan quitina (carbohidrato que proporciona rigidez) en su pared celular (Moreno, 2016).

Los hongos son organismos eucariotas, que producen esporas, no tienen clorofila, con nutrición por absorción, generalmente con reproducción sexual y asexual. Constituyen uno de los grupos de organismos más importantes para la vida del hombre, ya que son los responsables de gran parte de la descomposición de la materia orgánica aumentando su disponibilidad en el suelo; pueden ser comestibles, venenosos o psicotrópicos; muchos son patógenos; otros, producen ciertas sustancias beneficiosas o intervienen en procesos de elaboración de algunos comestibles (Raisam & Gonzales, 2007).

2.1 Clasificación del reino fungi

El reino fungi representa una de los más grandes acervos de biodiversidad con actividades ecológicas cruciales en todos los ecosistemas y con una gran variabilidad en morfología y ciclos de vida. Los organismos incluidos en la categoría de hongos son tan diversos que es difícil dar una diagnosis diferencial concisa, pero pueden ser descritos como organismos, en su mayoría, filamentosos con crecimiento apical, eucarióticos, aclorófilos, heterótrofos por absorción, con reproducción asexual y sexual por medio de esporas, y con pared celular principalmente constituida por quitina o celulosa. Agrupa a un inmenso número de individuos distribuidos en una gran diversidad de especies, muchas de ellas desconocidas, sobre todo las microscópicas (levaduras y mohos, que incluyen varios miles o millones de hongos), aunque también en la actualidad se siguen describiendo muchas especies nuevas de hongos macroscópicos. Los hongos saprobios tienen distribución cosmopolita, pero hay especies y formas de distribución restringida o endémica, en particular las simbióticas y parásitas, todas ellas ligadas a un determinado hábitat (Elvira, 2014).



Figura 2. Especies representativas de hongos en México. 1. Zygomycota. 2. Ascomycota. 3. Basidiomycota. 4. Basidiomycota.

Fuente: M. Ulloa; R. Valenzuela "Especies representativas de hongos en México" 2012.

Por razones prácticas, como se hace aún en la bibliografía básica, se siguen considerando a "todos" los grupos tradicionales de "hongos", con su clasificación apenas modificada. También al referirse a los grandes grupos, es común que se continúe utilizando la terminología de Clase (v.gr. Ascomycetes, Basidiomycetes, Zygomycetes) incluyendo lo que ahora corresponde a los distintos Phylum.

Quizá el grupo que más se aleja de los hongos, cuya posición taxonómica es aún muy discutida, es el de los hongos mucilaginosos (Myxomicetes), caracterizados por un ciclo de vida con una fase móvil y amorfa (mixameba). Según las condiciones de hidratación del medio pueden interconvertirse con una fase flagelada (1 ó 2 flagelos) formando células en enjambre. Cuando las condiciones son óptimas pueden reunirse de a dos para formar un cigoto, que puede ser primero flagelado y luego ameboide. Luego este produce un plasmodio plurinucleado. Al llegar a la madurez se convierte en uno o

más esporóforos típicos. El otro grupo grande que también siempre resultó complejo para incluirlo en el grupo, es el de los *Oomycetes*, que tenían como principal diferencia, la presencia de celulosa en sus paredes. Además, en su ciclo (también atípico), aparecían esporas sexuales móviles con un par de flagelos: uno anterior en forma de cepillo y otro posterior en forma de látigo (Popoff, 2007).

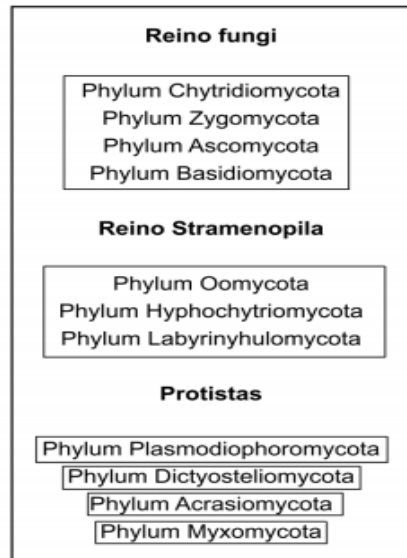


Figura 3. Sistema de clasificación de acuerdo a alexpoulos

2.2 Hongos patógenos

Los hongos no solo emplean su capacidad para degradar materia orgánica favoreciendo el reciclaje de compuestos orgánicos en los ecosistemas, sino que también ocasionan la degradación de alimentos que son ampliamente consumidos por el ser humano. Estos degradadores, conocidos como mohos, causan que los alimentos lleguen rápidamente a su estado de descomposición al utilizarlos como su propia fuente de nutrientes. Este proceso se ve favorecido por las condiciones cálidas y húmedas que les permiten crecer y reproducirse. *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* y *Rhizopus* son algunas de los géneros de mohos que pueden encontrarse en los alimentos. Algunos tienen la capacidad para formar

micotoxinas (hongos venenosos) sustancias dañinas cuya ingesta, inhalación o absorción cutánea causa enfermedades, por ejemplo, el ergotismo (conocida también como fiebre de San Antonio por la sensación abrazadora experimentada por las víctimas), una enfermedad causada por la ingesta de centeno contaminado con micotoxinas del hongo *Claviceps purpurea* que afectó numerosas partes de Europa en el año 1943. En el caso de los animales y de los seres humanos, las enfermedades que causan los hongos microscópicos son conocidas como micosis. La mayoría de estas enfermedades son accidentales y algunas incluso transmisibles de persona a persona (La neumonía causada por el hongo *Pneumocystis jirovecii* y meningitis aguda causada por *Cryptococcus neoformans*). Sin embargo, pocas veces es posible percatarse de la infección por parte del hongo debido al tamaño del mismo. Las micosis más comunes en humanos son; el “Pie de atleta”, infecciones superficiales de piel e infecciones en uñas, estas patologías fúngicas son causadas por dermatofitos (hongos que residen en la piel) como *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton* (Moreno, 2016).

2.2.1 Taxonomía

En los últimos años la taxonomía de los hongos causantes de infecciones en el hombre ha cambiado sustancialmente especialmente debido al rápido desarrollo de las técnicas de secuenciación de ADN que han permitido avanzar en el conocimiento de las relaciones filogenéticas entre estos microorganismos. El número de especies fúngicas potencialmente patógenas ha sufrido un espectacular aumento, siendo muchas de ellas especies crípticas que forman parte de complejos de especies que han sustituido a lo que antes eran consideradas como simples morfoespecies. Ello ha ocurrido en diferentes géneros de mucorales y especialmente de ascomicetes tales como *Aspergillus*, *Fusarium*, *Sporothrix* y *Scedosporium*, entre otros. Es frecuente que dichas especies difieran en virulencia y en su respuesta a los antifúngicos por lo que su correcta

identificación es de especial importancia para el adecuado tratamiento del paciente (Guarro, 2012).



Figura 4. En el sentido de las agujas del reloj: *Amanita muscaria*, un basidiomiceto; *Sarcoscypha coccinea*, un ascomiceto; pan cubierto de moho; un quitridio; un *Aspergillus*

Fuente: BorgQueen; "Fungi Collage" 2009.

2.3 Aspergillus

El género *Aspergillus* fue descrito por primera vez en 1729 por P. A. Micheli, quien comprobó que la cabeza conidial de este hongo se parecía a un "aspergillum" (instrumento utilizado para dispersar agua bendita).

Aspergillus es un hongo filamentoso hialino ubicuo, productor de enfermedades de distribución universal que ocasionalmente pueden aparecer en forma de brotes hospitalarios tras obras de remodelación. Se conocen unas 900 especies de *Aspergillus*, que Rapper y Fennell clasifican en 18 grupos, de los que sólo 12 se relacionan con enfermedad humana: *A. fumigatus* (85%), *A. flavus* (5-10%), *A.*

niger (2-3%), *A. terreus* (2-3%), *A. versicolor*, *A. nidulans*, *A. glaucus*, *A. clavatus*, *A. cervinus*, *A. candidus*, *A. flavipes* y *A. ustus*. Esta clasificación se basa en las siguientes características morfológicas del hongo: tamaño y forma de las cabezas conidiales, morfología de los conidióforos, fiálides y métulas, y en la presencia de células de Hülle y de esclerocios.

Aspergillus es un ejemplo de lo que denominamos "patógeno oportunista", es decir, que suele afectar a pacientes con mecanismos de defensa comprometidos.

Entre los factores de patogenicidad de este hongo se encuentran:

- El pequeño tamaño de sus conidias que permite que sean aspiradas y que pueda causar infección en el pulmón y en los senos paranasales.
- Su capacidad de crecer a 37°C, lo que le hace idóneo para afectar al humano.
- Su capacidad de adherencia a superficies epiteliales y posiblemente endoteliales y su gran tendencia a invadir los vasos sanguíneos.
- La producción de un gran número de productos extracelulares tóxicos para las células de los mamíferos (elastasa, restrictocina, fumigatoxina, etc.) (Lui, 2013).

La transmisión se produce principalmente por medio de las esporas o conidios, que se encuentran presentes en el ambiente de trabajo en forma de bioaerosoles y penetran en el organismo por vía respiratoria. También es posible la transmisión por contaminación de heridas o mucosas. Es responsable de casos de enfermedad nosocomial. No se produce transmisión de persona a persona.

Características morfológicas más importantes de las especies de *Aspergillus* que afectan a la especie humana.

Especie	Aspecto macroscópico		Aspecto microscópico	
	Micelio	Reverso	Conidióforo	Fiálides
<i>A. fumigatus</i>	Aterciopelado o aspecto de polvo. Color blanquecino que cambia a verde oscuro o gris.	Blanco a marrón-rojizo	Cortos (<300µm) y lisos	Uniseriadas sobre el tercio superior de la vesícula, paralelos al eje del conidióforo
<i>A. flavus</i>	Aterciopelado. Color amarillo verdoso o marrón.	Dorado a marrón-rojizo	Longitudes variables y rugosas	Uniseriadas o biseriadas que cubren completamente la vesícula
<i>A. niger</i>	Lanoso, Color blanco-amarillento que cambia a negro.	Blanco amarillento	Largos y lisos	Biseriadas que cubren completamente la vesícula
<i>A. terreus</i>	Aterciopelado. Color canela.	Blanco a marrón	Cortos (<250µm) y lisos	Biseriadas agrupándose en forma tubular
<i>A. versicolor</i>	Aterciopelado	Color blanco que cambia a amarillo naranja, marrón-rojizo, verde o rosa	Largos y lisos	Biseriadas y vagamente radiadas cubriendo la mayoría de las vesículas
<i>A. nidulans</i>	Aterciopelado. Color verde. Cuando presenta cleistotecios color similar al del ante.	Púrpura oscuro	Cortos (<250µm), lisos y marrones	Biseriadas
<i>A. glaucus</i>	Aspecto similar al fieltro. Color verde con zonas amarillentas.	Amarillo a marrón	Longitudes variables y rugosas	Uniseriadas que cubren toda la vesícula
<i>A. clavatus</i>	Aspecto similar al fieltro. Color verde-azulado.	Blanco que suele cambiar a marrón	Largos y lisos	Uniseriadas

Tabla 2. Características morfológicas más importantes de las especies de *Aspergillus* que afectan a la especie humana.

Fuente. Control Calidad SEIMC

2.3.1 *Aspergillus fumigatus*

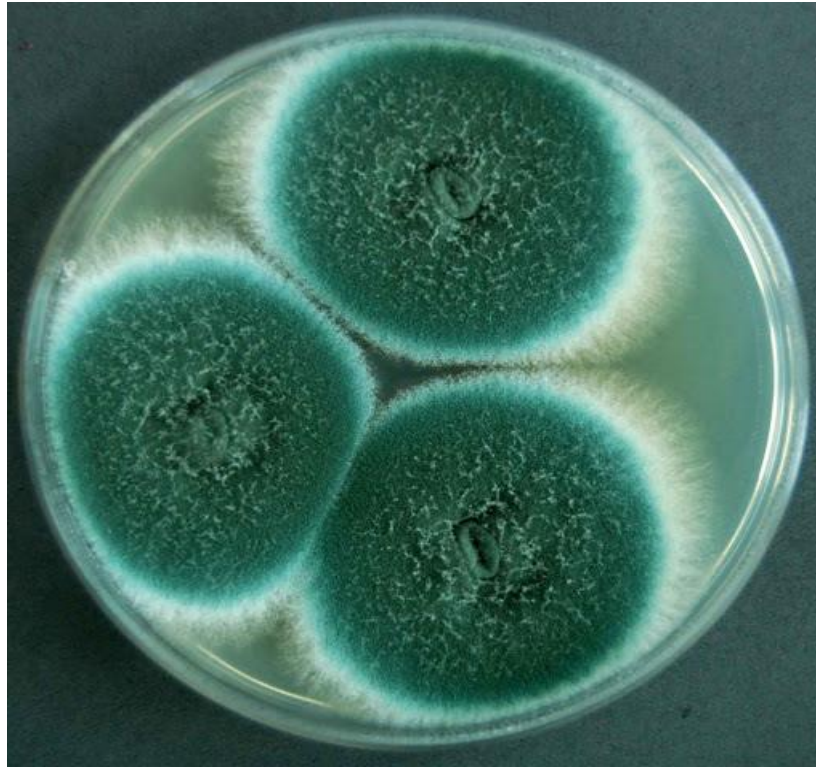


Figura 5. *Aspergillus fumigatus*, colony on CYA.

Fuente: Paul; "My specie" 2009.

Aspergillus fumigatus es un hongo filamentoso hialino, saprofito, perteneciente al filo Ascomycota. Se encuentra formado por hifas hialinas tabicadas y puede tener reproducción sexual (con formación de ascosporas en el interior de ascas) y asexual (con formación de conidios).

Las colonias crecen rápidamente a 37 °C, son planas, compactas y tienen un aspecto aterciopelado y un color blanquecino que cambia a verde azulado o verde grisáceo (INSST, 2012).

Este microorganismo es la causa más frecuente de aspergilosis en humanos y animales. En individuos sin inmunocompromiso puede actuar como un potente alérgeno o causar infecciones localizadas de los pulmones, senos paranasales. En paciente inmunocomprometidos la inhalación de esporas puede producir una aspergilosis invasora de los pulmones o de los senos paranasales. La

diseminación a otros órganos no es infrecuente. Sin tratamiento estas infecciones son fatales. Con tratamiento adecuado la mortalidad es muy elevada. En pacientes inmunocompetentes el tratamiento de elección del aspergiloma pulmonar es la resección quirúrgica del mismo. En paciente neutropénicos con infección invasora una formulación de anfotericina B es el tratamiento de elección. Puede ser efectivo el tratamiento con itraconazol/voriconazol (GEFOR, 2017).

La transmisión se produce principalmente por medio de las esporas o conidios, que se encuentran presentes en el ambiente de trabajo en forma de bioaerosoles y penetran en el organismo por vía respiratoria. También es posible la transmisión por contaminación de heridas o mucosas. Es responsable de casos de enfermedad nosocomial. No se produce transmisión de persona a persona (INSST, 2012).

2.3.2 *Aspergillus flavus*



Figura 6. *Aspergillus flavus* SAB.

Fuente: Ossama Elkadi; Pinterest.

Es un hongo ambiental que puede afectar como patógeno oportunista, productor de micotoxinas y como contaminante de cultivos y productos alimenticios (Gil, 2018).

Es un moho filamentoso hialino, saprófito, perteneciente al *filo* Ascomycota, el aspecto aterciopelo; Amarillo a verde o marrón molde con un dorado a rojo-marrón inversa. En microscopía, las cabezas de los conidios se irradian. Las células conidiógenas son uni o biseriadas y conidias equinuladas.

Por otro lado, si *A. flavus* se desarrolla sobre granos de cereales como maíz, arroz y maní, producirá sobre sustancias tóxicas. Entre ellas: hepatotoxinas y aflatoxinas carcinógenas, que afectan tanto al humano como a los animales (Gil, 2018).

Aspergillus flavus se asocia más a menudo con enfermedades tales como: Aspergilosis pulmonar cavitaria crónica, Aspergilosis broncopulmonar, Sinusitis fúngica alérgica y aspergiloma sinusal, Queratitis y endoftalmitis, infecciones cutáneas y de heridas Endocarditis, infecciones osteoarticulares, infecciones del tracto urinario.

2.3.3 *Aspergillus niger*

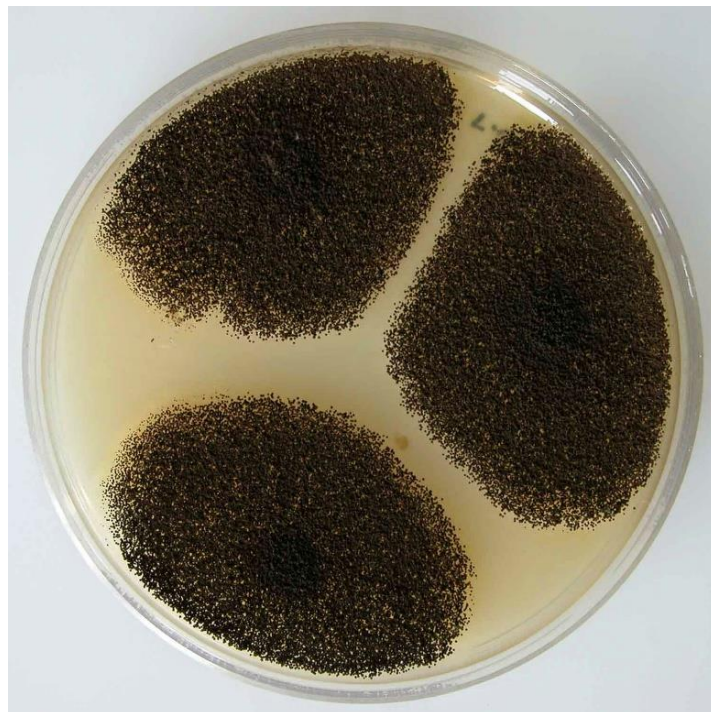


Figura 7. *Aspergillus niger*

Fuente: Fenix, A. J. (2015)

Aspergillus niger es un hongo bastante común (como que es el hongo que estropea el limón, el tomate o la cebolla, así que este organismo todo el mundo puede presumir de haberlo visto), capaz de producir varios compuestos químicos, como el ácido cítrico o el ácido glucónico (Fenix, 2015).

Es un mohó filamentoso hialino, saprófito, perteneciente al *filo* Ascomycota, que produce un mohó negro en varios vegetales, muy común en la lechuga, el tomate , la acelga y el limón. Curiosamente se encontraron sus esporas en la comida, en la ropa, en las flores y en viejas tumbas: del rey Casimiro de Polonia y en la momia y el sarcófago de Ramsés II.

Es una especie inocua para los seres humanos y también para la mayoría de los cultivos. No causa tantas enfermedades como otra especie *Aspergillus*, pero en realidad es un hongo dañino para los humanos y animales en cantidades grandes, y benéfico en cantidades pequeñas y controlables. Puede causar que crezca mohó negro en las plantas y, al igual que la mayoría de los mohos, causará enfermedades de pulmón si se inhala demasiado. *Aspergillus niger* también puede causar graves infecciones de oído si muchas esporas de mohó que se alojan en el canal auditivo. Puede encontrársele en otros sitios húmedos del cuerpo humano. En altas concentraciones puede producir aspergilosis, que provoca alteraciones pulmonares. Esta enfermedad aparece con más frecuencia en horticultores, ya que inhalan el polvo del hongo con más facilidad. La propagación rápida de *Aspergillus* en ambientes llenos de polvo y a través de los sistemas de aire acondicionado puede ser el origen de los brotes de alergia (insst, 2012).

2.4 *Cándida albicans*



Figura 8. *Candida albicans*

Fuente: Yuri (2009)

Es un hongo dimórfico, es decir, se desarrolla de forma distinta en función de la temperatura de crecimiento, como levadura, normalmente a 37°C en el huésped, y como hongo de aspecto filamentoso, a 25°C en la naturaleza. Pertenece al *filo* Ascomycota y se reproduce de forma asexual por gemación. En forma de levadura presenta un aspecto de células redondas u ovaladas, de 3-8 x 2-7 micras de tamaño, agrupadas en pequeños grupos, mientras que, en forma de hongo filamentoso, las células se alargan y se diversifican tomando la apariencia de filamentos, pseudo-hifas o pseudo-micelio.

Candidiasis o moniliasis: infección superficial que aparece principalmente en individuos con las defensas bajas, afectando a la piel (intertrigo), a las mucosas (oral, genitourinaria o digestiva) y a las uñas (paroniquia o perionixis). Los síntomas son leves como: enrojecimiento, picazón y malestar. En personas con

cáncer, trasplantados o con SIDA la infección puede hacerse sistémica (candidemia), y puede llegar a ser mortal (insst, 2012).

3. Materiales y métodos

El presente proyecto fue desarrollado en el laboratorio de Análisis especiales del Instituto Tecnológico Superior de Atlixco (ITSA), trabajando en colaboración con Instituto Tecnológico Superior de Venustiano Carranza (ITSVC).

3.1 Material biológico

Para determinar de la actividad anti fúngica del extracto de la planta *Acacia cornígera* se ocuparon las siguientes cepas: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigantes*. Así como la levadura *Candida albicans* como agentes de las pruebas anti fúngicas proporcionadas en el Instituto Tecnológico Superior de Atlixco (ITSA).

El extracto etanólico de *Acacia cornígera*, fue proporcionado por Instituto Tecnológico Superior de Venustiano Carranza (ITSVC).

3.2 Reactivos

Medio de cultivo agar dextrosa y papa (PDA), proporcionado por del Instituto Tecnológico Superior de Atlixco (ITSA).

Voriconazol solución inyectable 200 mg. proporcionado por del Instituto Tecnológico Superior de Atlixco (ITSA).

3.3 Equipo

Los equipos utilizados para el desarrollo de este proyecto fueron facilitados por el Instituto Tecnológico Superior de Atlixco (ITSA) que se ubican en el laboratorio de análisis especiales:

- Autoclave (ALLAMRICAN) su función es esterilizar material de laboratorio y ayuda a la preparación del medio de cultivo.
- Campana de flujo laminar vertical modelo (CCFLV-101) (PRENDO) permite obtener una zona estéril y segura para realizar las pruebas anti fúngicas.
- Incubadora (FELISA) proporciona la temperatura adecuada para el crecimiento de las cepas.

4. Metodología

Para la determinación de las propiedades anti fúngicas de la planta *Acacia cornígera*, se utilizó el método estandarizado por el Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) para el estudio de la sensibilidad de los anti fúngicos, con ayuda de agentes patógenos de alta toxicidad para el ser humano y mayor presencia en el entorno, entre ellas se encuentra tres especies de la familia de *Aspergillus*: *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, entre otros agentes patógenos causante de enfermedades severas se encuentra *Candida albicans* la cual tuvo participación en este estudio.

4.1 Método de micro dilución para hongos

Las técnicas de dilución en caldo o agar, se pueden utilizar para medir cuantitativamente la actividad "*In vitro*" de un anti fúngico frente a un cultivo fungí. Estos métodos se basan en la preparación de una serie de tubos o placas con caldo o agar, respectivamente, a los cuales se les agrega el anti fúngico en distintas concentraciones.

4.2. Medio de cultivo

El cultivo utilizado fue PDA (papa dextrosa agar) que tiene la infusión de papa como fuente de almidones y la dextrosa son la base para el crecimiento de hongos y levaduras.

El medio de cultivo debe tener la preparación adecuada referente a las indicaciones dadas en el mismo, para que pueda dar resultados favorables al crecimiento de los hongos.

4.3 Activación de hongos

Se realizó el proceso de vertido en placa para la activación de los hongos, las cajas Petri tuvieron la capacidad de almacenar 40 mL de la dilución, se mantuvieron cinco días dentro de la incubadora donde en el lapso de 48 horas estuvieron a 36°C (\pm 2°C) y las horas restantes solo en almacenamiento en posición invertida.

4.4. Preparación del inóculo

Se tomó muestra de cada cepa (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans*), se hizo una suspensión en 3 mL de agua estéril y posteriormente se obtuvo una mezcla homogenizada con turbidez visible que se ajusta a 0.5 en la escala de McFarland.

4.5 Preparación de las placas

Se preparó agar PDA (agar papa dextrosa), posteriormente se esparció en cajas Petri y se dejó en reposo por 30 min.

Una vez listas las placas se realizó el cultivo de los hongos por el método de dispersión con hisopo en donde el método consta de sumergir un hisopo de algodón estéril en el inóculo, antes de sacarlo se elimina el exceso de la solución haciendo girar el hisopo y oprimiendo ligeramente contra las paredes dentro del tubo. La muestra que contiene el hisopo se extendió por toda la placa, fue necesario repetir el proceso en la misma placa cuatro veces seguidas haciendo girar la placa 45° para que sea una mejor distribución del inóculo en toda la superficie del agar gelificado.

4.6 Proceso de las soluciones antifúngicas

Se utilizaron dos soluciones como control, uno positivo y otro negativo, el control positivo fue voriconazol preparado a 1 mg/mL y el control negativo fue etanol. También fueron incluidas seis diluciones a diferentes concentraciones del extracto *Acacia cornígera* (C1 100 µg/mL, C2 200 µg/mL, C3 300 µg/ml, C4 400 µg/mL, C5 500 µg/mL, y C6 600 µg/mL).

Las diluciones y los controles fueron concentradas en tubos Eppendorf.

4.7. Preparación de los sensidiscos

De acuerdo a las recomendaciones de la “United States Food and Drug Administration Standards”, el papel filtro pesó 30 ± 4 mg/cm² y tuvo la suficiente capacidad para absorber 2-3 veces su propio peso en agua. Los discos tuvieron un diámetro de 6,35 mm. Para prepararlos se utilizó un sacabocados cuyo diámetro interno sea de 6,35 mm.

4.8. Colocación de sensidiscos con antifúngico

Como primer paso los sensidiscos se tuvieron que humedecer en voriconazol como control positivo, etanol como control negativo y en las seis diluciones del extracto de la planta *Acacia cornígera*. Para la colocación de sensidiscos se realizó en dirección de las manecillas de reloj se fueron colocando con ayuda de unas pinzas previamente esterilizadas una vez colocadas se evitó moverlos ya que la reacción es inmediata, dejando como espacio 20 ± 2 mm entre cada disco para poder hacer la lectura del halo de inhibición, se colocó control positivo, control negativo, C1 100 µg/mL, C2 200 µg/mL, C3 300 µg/ mL, C4 400 µg/mL, C5 500 µg/mL, y C6 600 µg/mL. Las placas fueron incubadas 32-48 horas a una temperatura de 36°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) y 48 horas en almacenamiento en posición invertida. Cabe de mencionar que este proceso se hizo por triplicado para corroborar los resultados obtenidos en cada placa de Petri.

4.9 Halos de inhibición

El diámetro de cada zona de inhibición se midió con un vernier digital para verificar el halo de inhibición en el que actuó el anti fúngico. De acuerdo a los Métodos estandarizados por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) para el estudio de la sensibilidad a los anti fúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A). Estas categorías están basadas en los puntos de corte que se establecieron mediante el método de dilución en caldo, las concentraciones que el anti fúngico alcanza en suero y la distribución de las CMI's para la especie estudiada. El documento M44-A describe el método de difusión en agar para levaduras del género *Candida*.

5 Resultados

5.1 Comparación de resultados

Se muestran los resultados obtenidos en cada cepa, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans* mostrando como fue la reacción de la susceptibilidad antifúngica en los controles y las diluciones de *Acacia cornígera*.

Aspergillus fumigatus

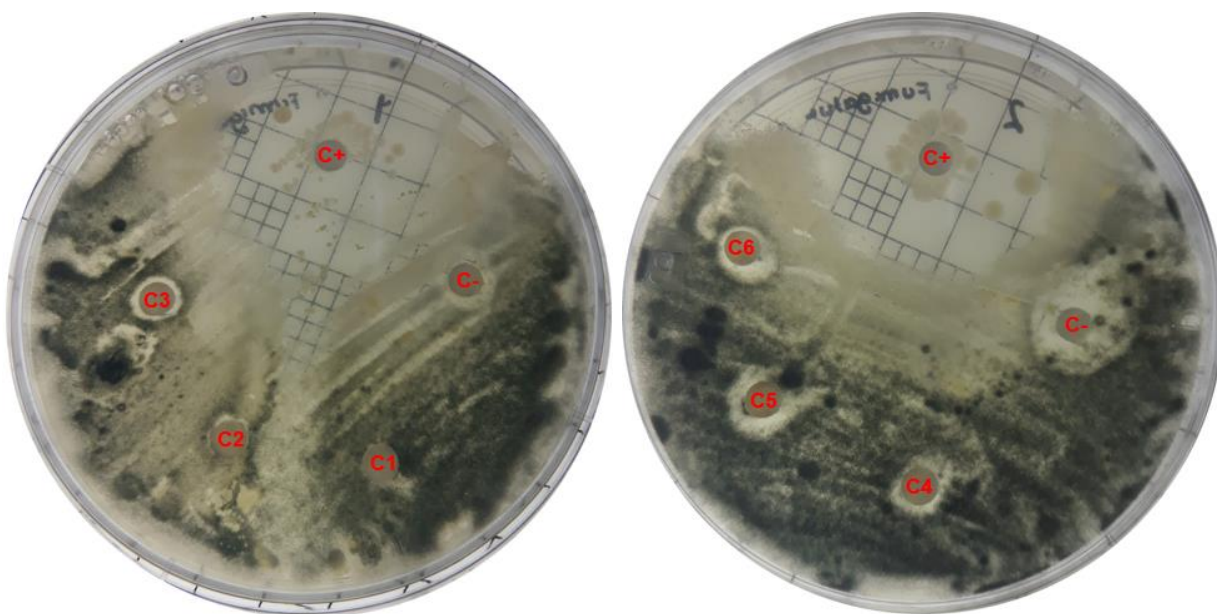


Figura 9 *Aspergillus fumigatus* control positivo (C+), control negativo (C-) y las concentraciones de *Acacia cornígera* C1 100 µg/mL, C2 200 µg/mL, C3 300 µg/ml, C4 400 µg/mL, C5 500 µg/mL, y C6 600 µg/mL

Observamos que la planta *Acacia cornígera* tubo susceptibilidad anti fúngica en el hongo *Aspergillus fumigatus* en las concentraciones C3 300 µg/mL, C4 400 µg/mL, C5 500 µg/mL y C6 600 µg/mL, un buen resultado con respecto al radio de los

halos de inhibición de 3.01 mm, 3.66 mm, 4.87 mm y 4.05 mm. En el control positivo se observó un halo de 18.55 mm promedio.

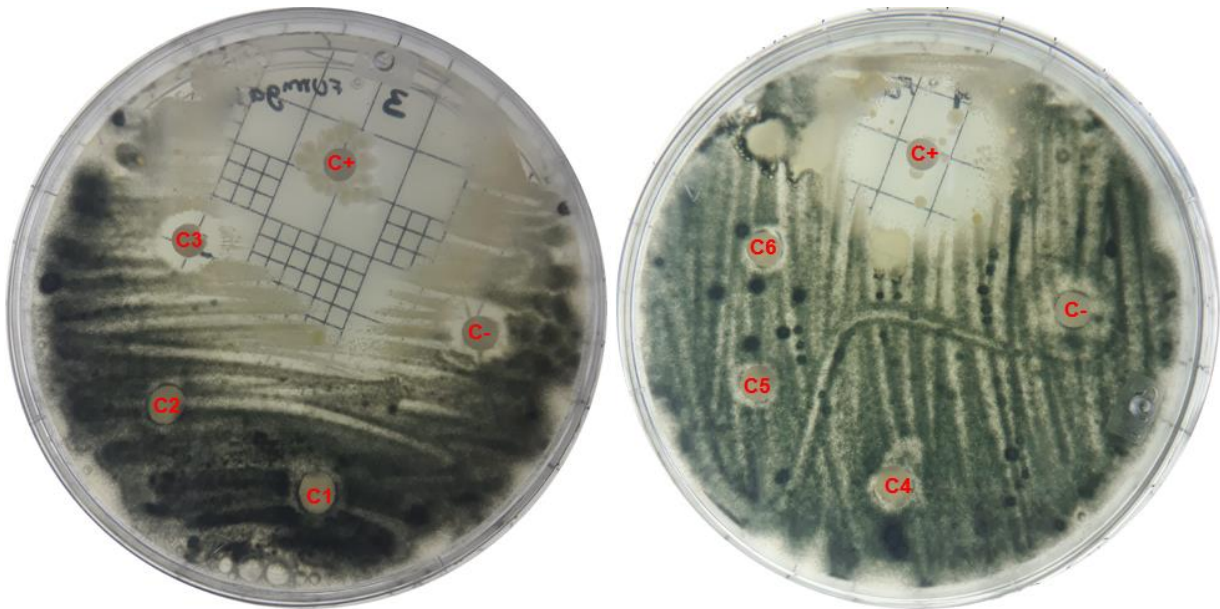


Figura 10 *Aspergillus fumigatus* control positivo (C+), control negativo (C-) y las concentraciones de *Acacia cornígera* C1 100 $\mu\text{g/mL}$, C2 200 $\mu\text{g/mL}$, C3 300 $\mu\text{g/mL}$, C4 400 $\mu\text{g/mL}$, C5 500 $\mu\text{g/mL}$, y C6 600 $\mu\text{g/mL}$.

En la figura 10 se muestra nuevamente que el hongo tiene susceptibilidad en las concentraciones C3 300 $\mu\text{g/mL}$, C5 500 $\mu\text{g/mL}$ y C6 600 $\mu\text{g/mL}$, con halos de inhibición de 5.19 mm, 3.12 mm y 3.15 mm, mientras que el control positivo da un halo promedio de 16.44 mm con una diferencia de 11.25 mm del halo formado en C3.

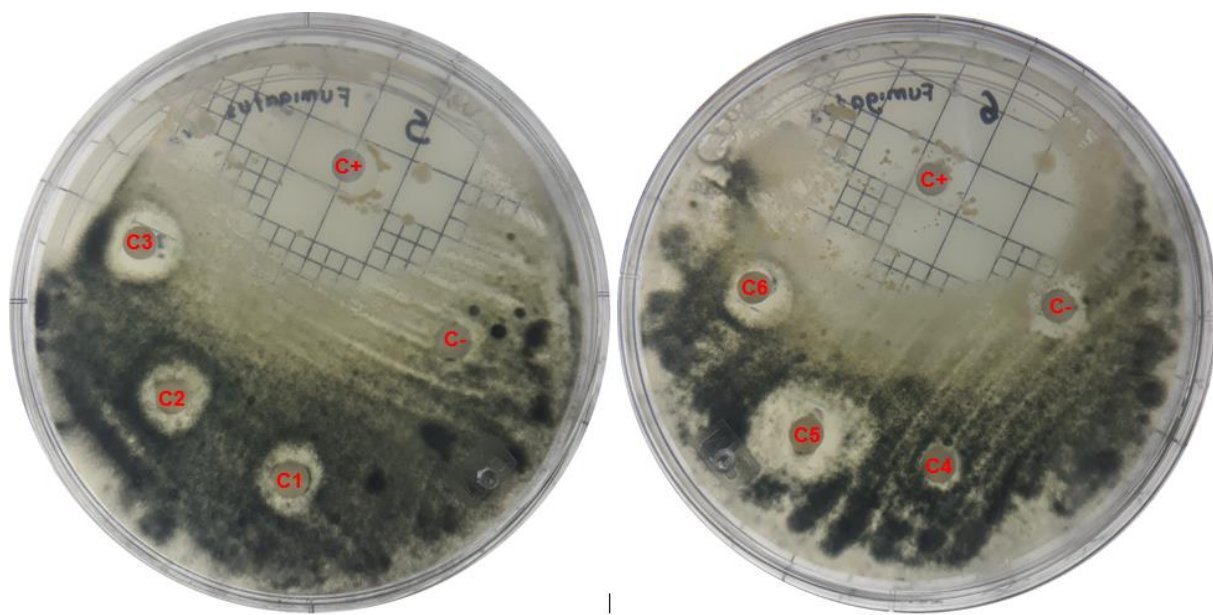


Figura 11 *Aspergillus fumigatus* control positivo (C+), control negativo (C-) y las concentraciones de *Acacia cornígera* C1 100 µg/mL, C2 200 µg/mL, C3 300 µg/mL, C4 400 µg/mL, C5 500 µg/mL, y C6 600 µg/mL.

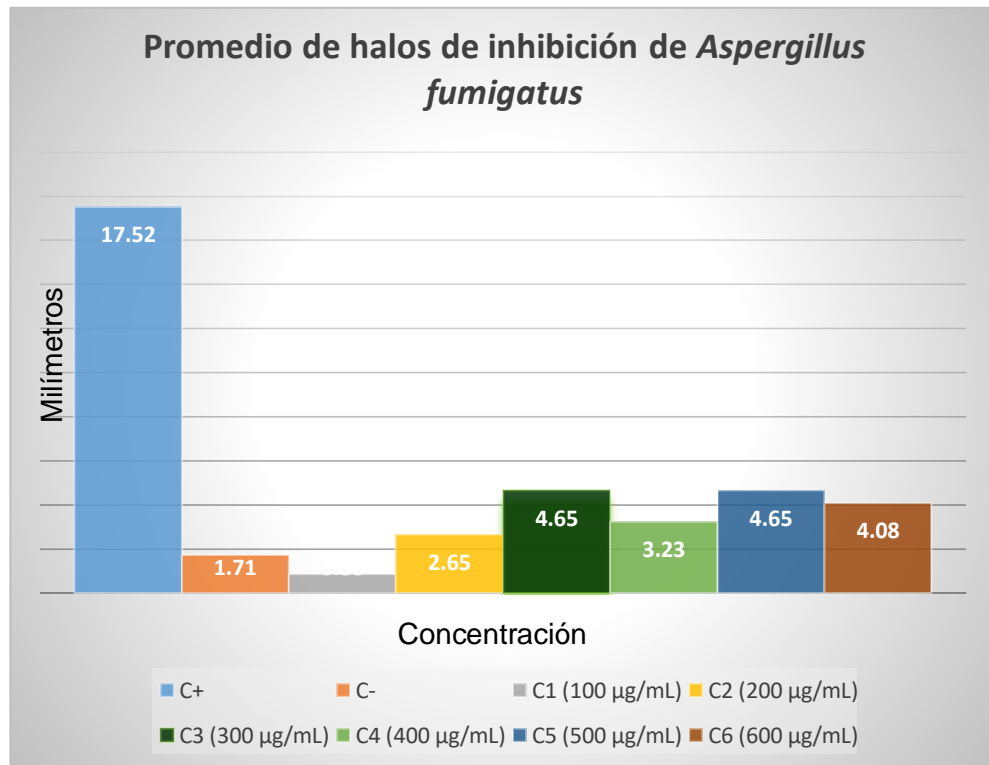
En el último triplicado también mostró resultados favorables en C3 300 µg/mL, C5 500 µg/mL y C6 600 µg/mL arrojando halos de 5.76 mm, 5.95 mm y 5.04 mm, haciendo comparativo con el control positivo con halo promedio de 17.58 mm da una diferencia de 11.63 mm.

Radio de halos de inhibición en el hongo *Aspergillus fumigatus*.

<i>Aspergillus fumigatus</i>				
	RADIO DE HALOS (mm)			
	MEDIA	MODA	MEDIANA	DESV. ESTANDAR
C+	17.52	N/A	17.58	1.05
C-	1.71	N/A	2.00	0.57
C1 (100 µg/mL)	0.86	0	0.00	1.48
C2 (200 µg/mL)	2.65	N/A	2.64	0.59
C3 (300 µg/mL)	4.65	N/A	5.19	1.45
C4 (400 µg/mL)	3.23	N/A	3.58	0.68
C5 (500 µg/mL)	4.65	N/A	4.87	1.43
C6 (600 µg/mL)	4.08	#N/A	4.05	0.95

Tabla 3. Radio de halos de inhibición en el hongo *Aspergillus fumigatus*

En la tabla se muestra el radio en milímetros de los halos de inhibición que generó el extracto de la planta *Acacia cornígera*, así como también el halo generado por el control positivo que fue el voriconazol.



Gráfica 1 Promedio del radio de los halos inhibiendo *Aspergillus fumigatus*

En la gráfica se observa la diferencia de promedio de los halos del extracto de la planta *Acacia cornígera* C1 0.86 mm (100 µg/mL), C2 2.65 mm (200 µg/mL), C3 4.65 mm (300 µg/mL), C4 3.23 mm (400 µg/mL), C5 4.65 mm (500 µg/mL), y C6 4.08 mm (600 µg/mL.) control positivo voriconazol (C+) con 17.52 mm de radio.

Con los resultados de la tabla se observa que en el C3, C5 y C6 los halos generados por el extracto son más notorios en comparación a las demás concentraciones en C3 se obtiene una desviación estándar de 1.45 mm la cual indica que el margen de error es amplio, en C5 se obtiene un desviación de 1.43 mm y también se incluye en la categoría con un margen error amplio, en C6 la desviación estándar es de 0.95 el cual indica que el margen de error es menor en las pruebas realizadas, por último se identifica el control positivo con una desviación estándar de 1.05.

Aspergillus flavus

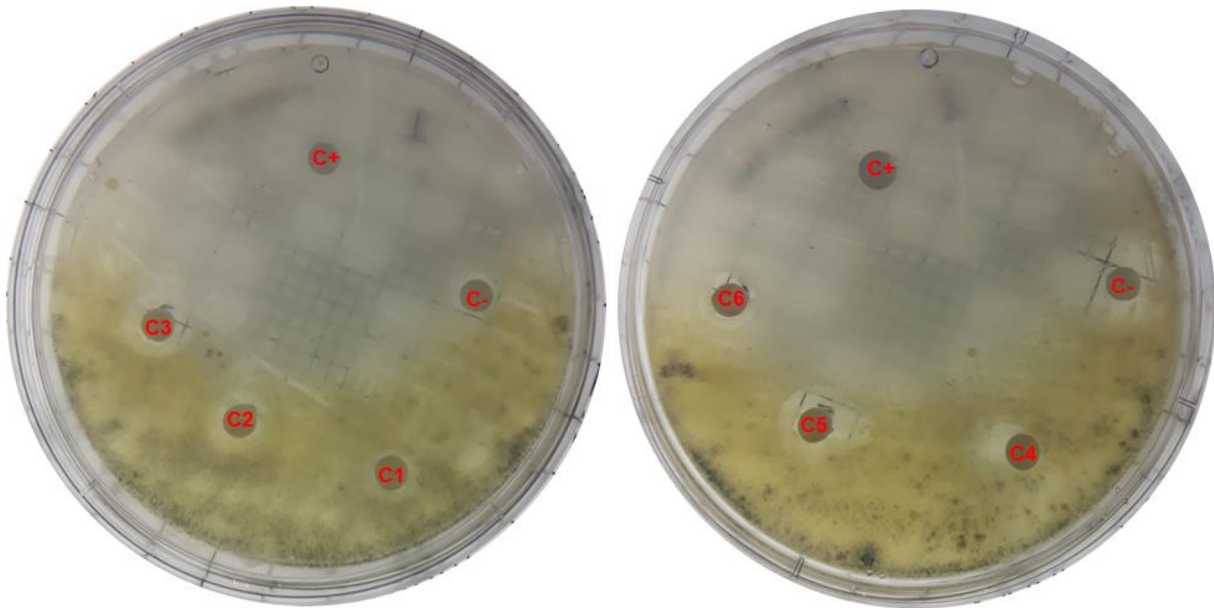


Figura 12 *Aspergillus flavus* control positivo (C+), control negativo (C-) y las concentraciones de *Acacia cornígera* C1 100 µg/mL, C2 200 µg/mL, C3 300 µg/mL, C4 400 µg/mL, C5 500 µg/mL, y C6 600 µg/mL.

En la **figura 12** se observa susceptibilidad anti fúngica en las concentraciones de *Acacia cornígera* C2 200 µg/mL, C3 300 µg/mL, C5 500 µg/mL, y C6 600 µg/mL, con halos de inhibición de 4.86 mm, 5.69 mm, 3.97 mm, 4.35 mm y 3.63 mm, el control positivo C+ obtuvo un radio promedio de 30.94 mm teniendo una diferencia de 25.25 mm partiendo del halo de C3 a C+, también el control positivo corrobora que el proceso se realizó adecuadamente.

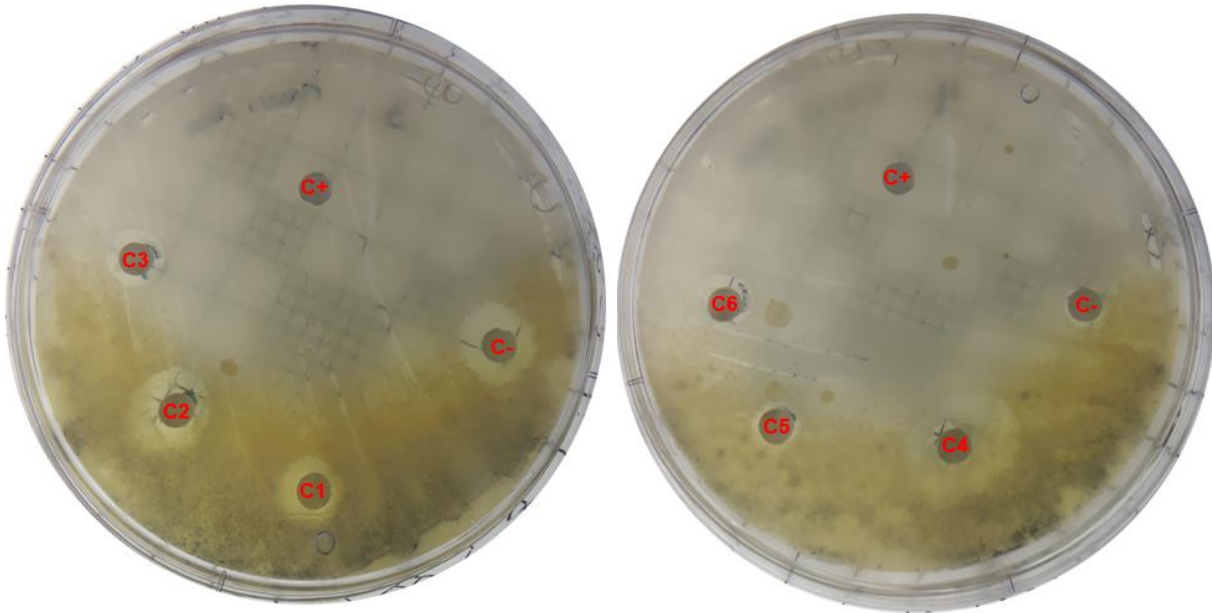


Figura 13 *Aspergillus flavus* control positivo (C+), control negativo (C-) y las concentraciones de *Acacia cornígera* C1 100 $\mu\text{g/mL}$, C2 200 $\mu\text{g/mL}$, C3 300 $\mu\text{g/mL}$, C4 400 $\mu\text{g/mL}$, C5 500 $\mu\text{g/mL}$, y C6 600 $\mu\text{g/mL}$.

En esta segunda prueba se observa mayor inhibición en la mayoría de los sensidiscos, C2 200 $\mu\text{g/mL}$, C3 300 $\mu\text{g/mL}$, y C6 600 $\mu\text{g/mL}$ fueron los que se mostraron más susceptibles con un halo de 6.05 mm, 4.32 mm y 4.01 mm, con diferencia de 22.71 mm con base al C3 al control positivo C+ con un halo promedio de 28.76 mm.

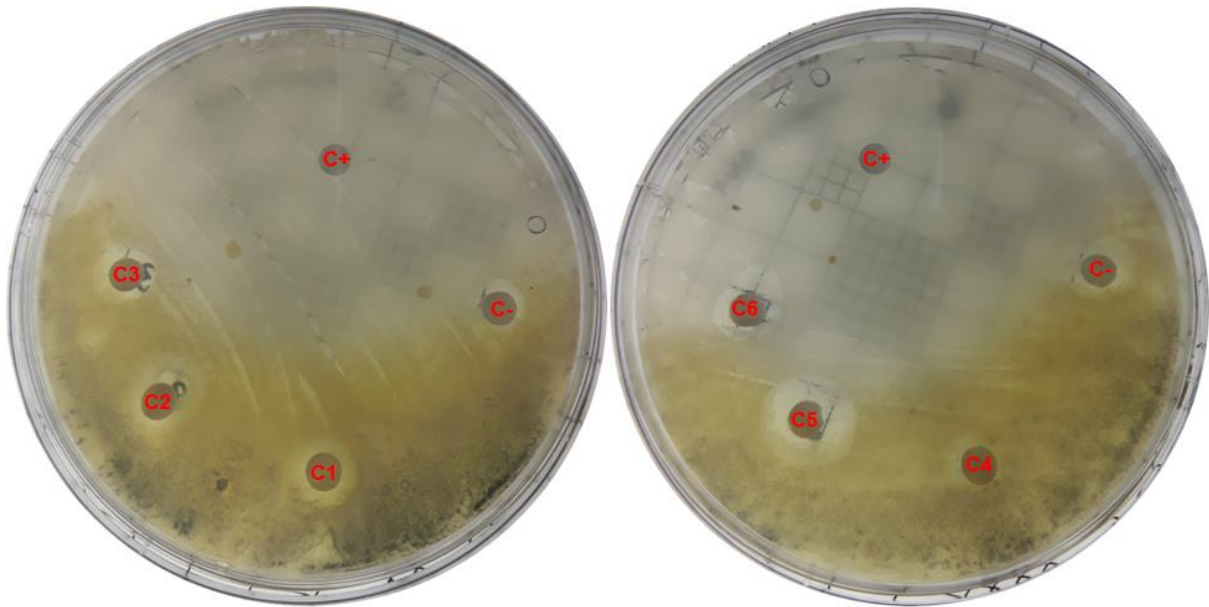


Figura 14 *Aspergillus flavus* control positivo (C+), control negativo (C-) y las concentraciones de *Acacia cornígera* C1 100 $\mu\text{g/mL}$, C2 200 $\mu\text{g/mL}$, C3 300 $\mu\text{g/mL}$, C4 400 $\mu\text{g/mL}$, C5 500 $\mu\text{g/mL}$, y C6 600 $\mu\text{g/mL}$.

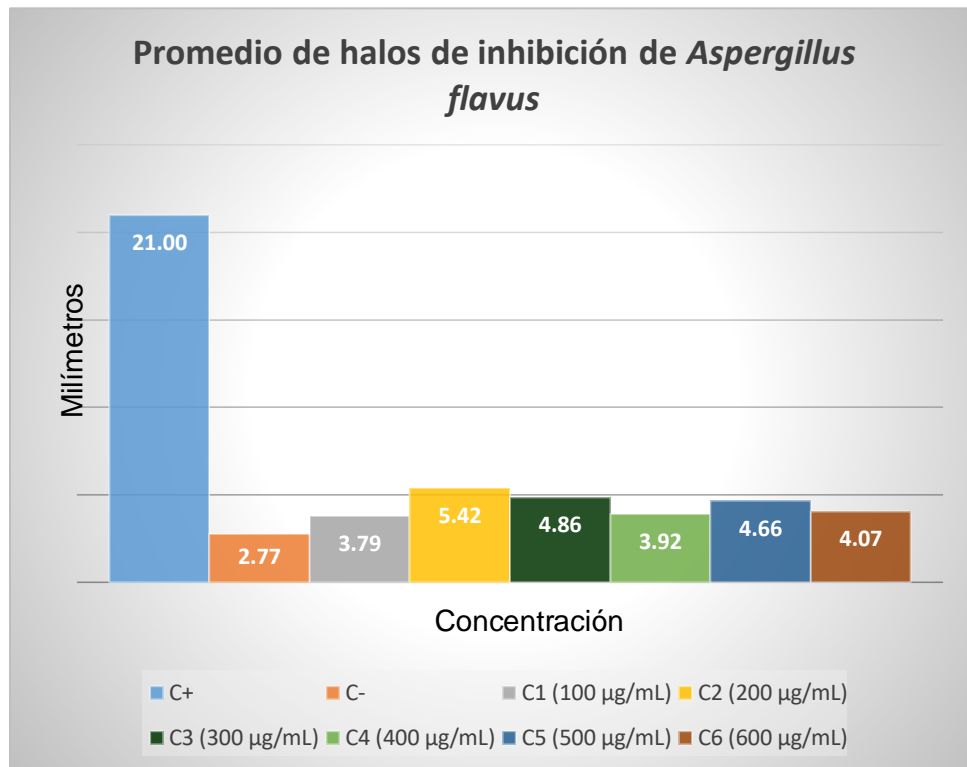
Se obtuvo susceptibilidad fúngica en C1 100 $\mu\text{g/mL}$, C2 200 $\mu\text{g/mL}$, C3 300 $\mu\text{g/mL}$, C5 500 $\mu\text{g/mL}$, y C6 600 $\mu\text{g/mL}$, con halos de 4.44 mm, 5.34 mm, 4.58 mm, 6.44 mm y 4.66 mm, un control positivo C+ con halo de promedio de 27.54, teniendo una diferencia 21.1 mm con base a C5.

Radio de halos de inhibición en el hongo *Aspergillus flavus*

<i>Aspergillus flavus</i>				
	RADIO DE HALOS (mm)			
	MEDIA	MODA	MEDIANA	DESV. ESTANDAR
C+	21.00	N/A	28.76	15.37
C-	2.77	N/A	2.54	0.62
C1 (100 µg/mL)	3.79	N/A	3.99	0.76
C2 (200 µg/mL)	5.42	N/A	5.34	0.60
C3 (300 µg/mL)	4.86	N/A	4.58	0.73
C4 (400 µg/mL)	3.92	N/A	3.97	0.10
C5 (500 µg/mL)	4.66	N/A	4.35	1.64
C6 (600 µg/mL)	4.07	N/A	4.01	0.47

Tabla 4. Radio de halos de inhibición en el hongo *Aspergillus flavus*.

La **tabla 4** se muestra el radio de cada halo de inhibición que se formó en la placa para cada una de las concentraciones, así como también para los controles C+ y C-.



Gráfica 2. Promedio del radio de los halos inhibiendo *Aspergillus flavus*

En la **gráfica 2** se aprecia la diferencia de mm que existe entre el control C+ (voriconazol) y las diluciones. La concentración C2 (200 µg/mL) es la que nos muestra un mejor comportamiento en comparación con las demás diluciones con 23.66 mm de diferencia de C2 a C+, con una variación estándar de 0.60 mm y un radio promedio de 5.42 mm a diferencia del control positivo con radio de 15.77 mm y desviación estándar de 15.37 que marca un gran margen de error.

Aspergillus niger

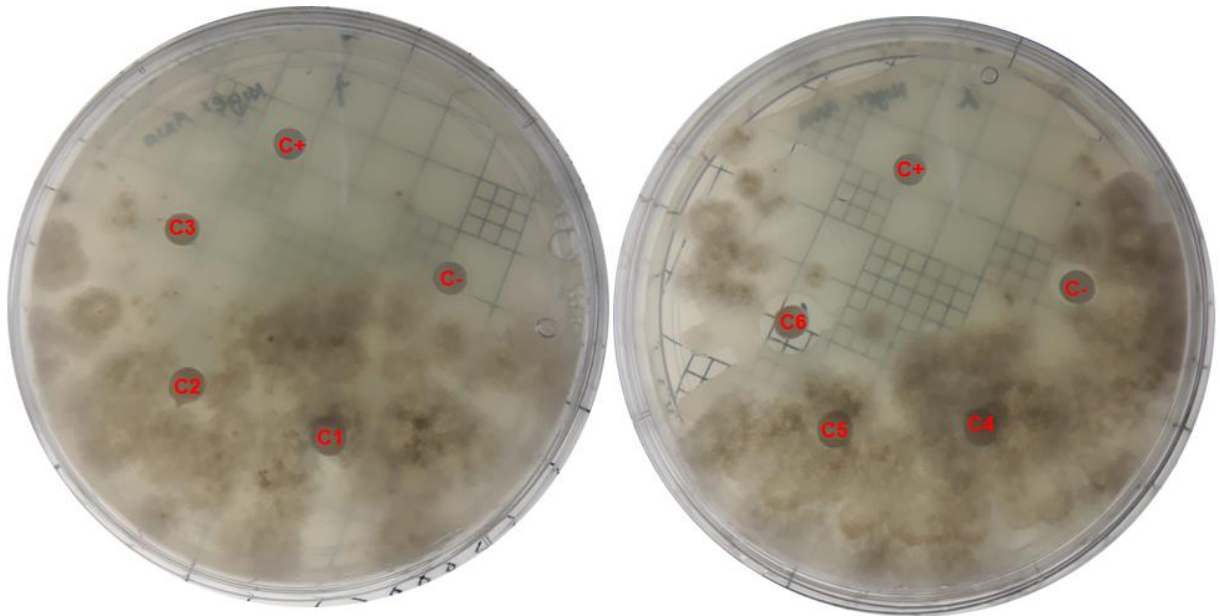


Figura 15. *Aspergillus niger* (C+), control negativo (C-) y las concentraciones de *Acacia cornígera* C1 100 µg/mL, C2 200 µg/mL, C3 300 µg/mL, C4 400 µg/mL, C5 500 µg/mL, y C6 600 µg/mL.

En la **figura 15** da como resultado que el extracto de la planta *Acacia cornígera* tiene actividad inhibitoria únicamente en la concentración C6 600 µg/mL contra el hongo *Aspergillus niger*, con un halo de 4.95 mm, mientras que el control positivo tiene un halo de 24.91

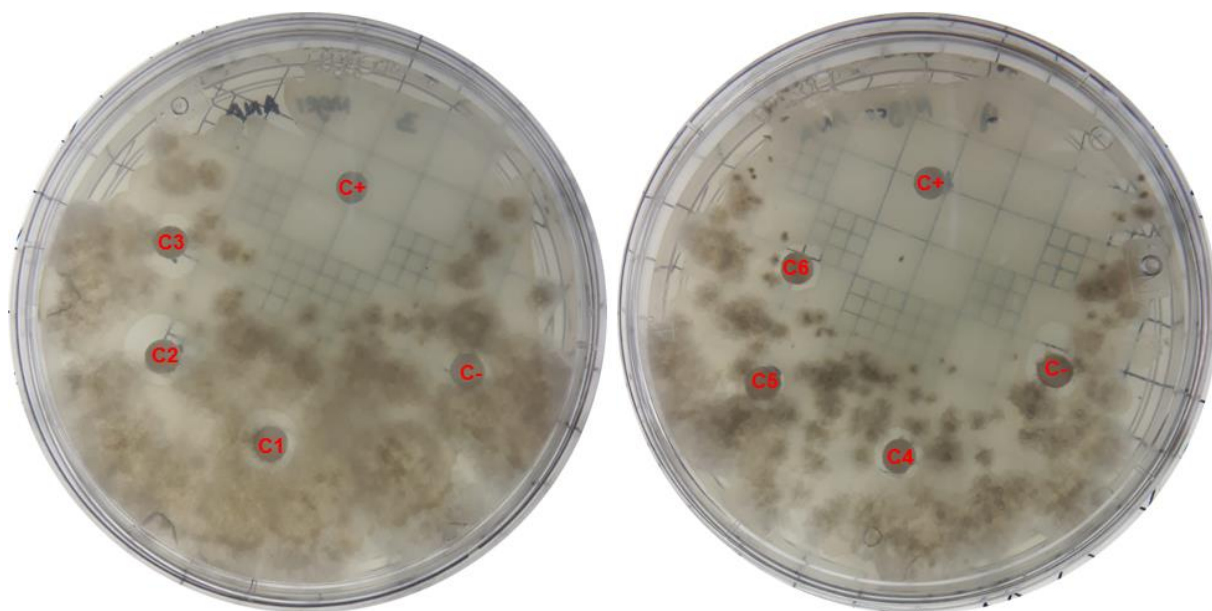


Figura 16. *Aspergillus niger* control positivo (C+), control negativo (C-) y las concentraciones de *Acacia cornígera* C1 1 $\mu\text{g/mL}$, C2 2 $\mu\text{g/mL}$, C3 3 $\mu\text{g/mL}$, C4 4 $\mu\text{g/mL}$, C5 5 $\mu\text{g/mL}$, y C6 6 $\mu\text{g/mL}$.

En la **figura 16** muestra halos de inhibición en las diluciones C1 100 $\mu\text{g/mL}$, C2 200 $\mu\text{g/mL}$, C3 300 $\mu\text{g/mL}$ y C4 400 $\mu\text{g/mL}$, con radio de 4.89 mm, 6.16 mm, 5.31 mm, y 4.13 mm, en el control positivo se observa que su halo de inhibición es más notorio con un radio de 23.17 mm, que marca una diferencia de 17.01 mm entre la concentración C2 200 $\mu\text{g/mL}$ y el control positivo C+ (voriconazol).

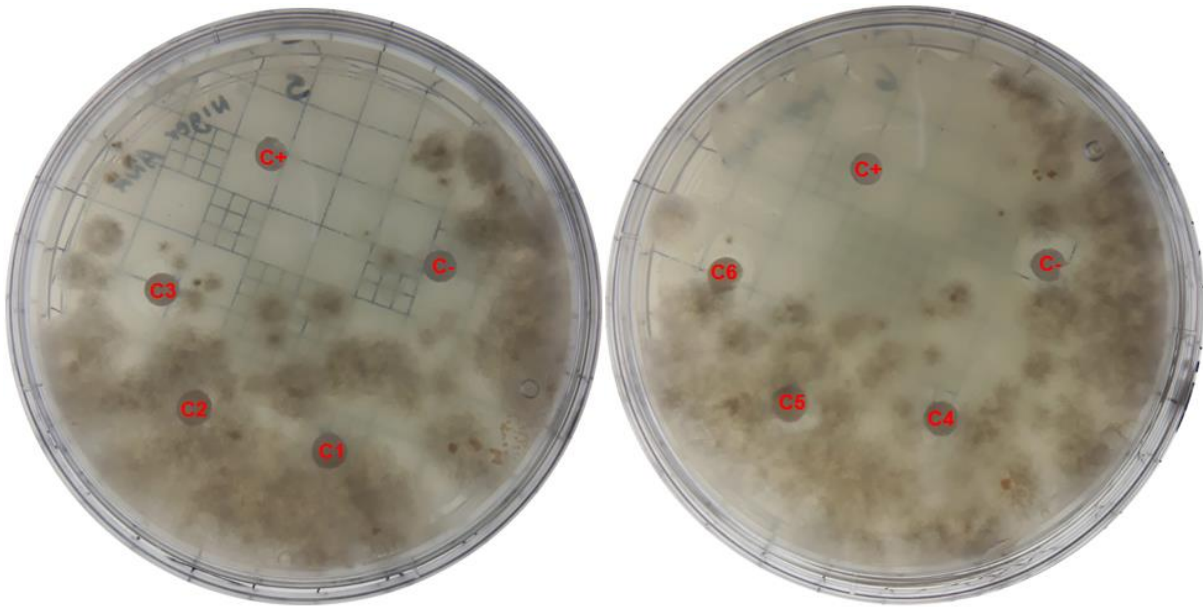


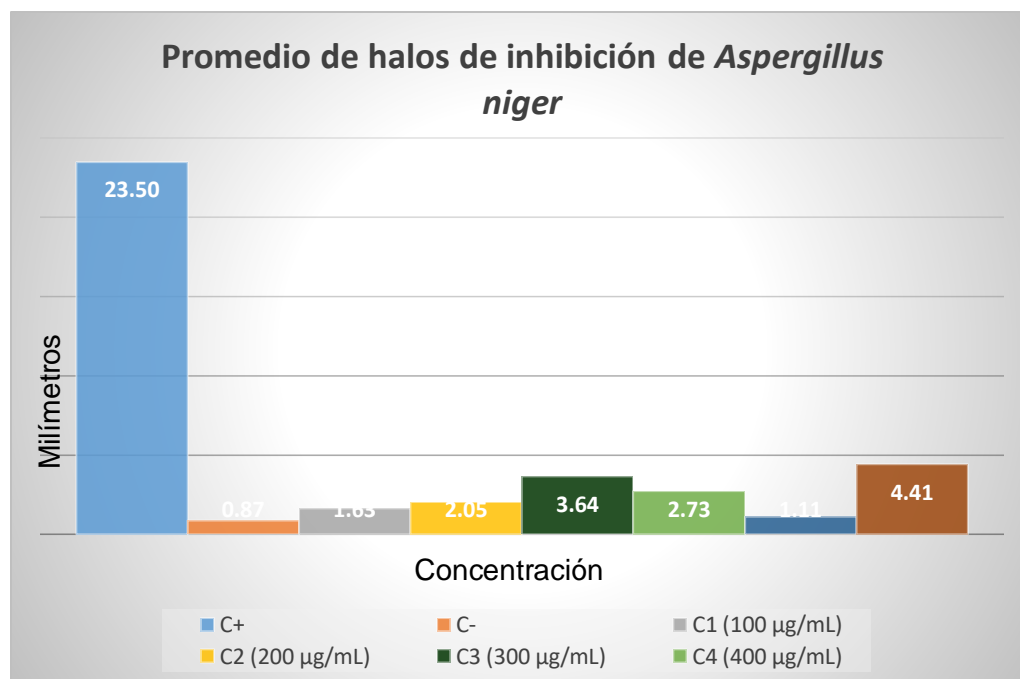
Figura 17. *Aspergillus niger* tercer triplicado control positivo (C+), control negativo (C-) y las concentraciones de *Acacia cornígera* C1 100 $\mu\text{g/mL}$, C2 200 $\mu\text{g/mL}$, C3 300 $\mu\text{g/mL}$, C4 400 $\mu\text{g/mL}$, C5 500 $\mu\text{g/mL}$, y C6 600 $\mu\text{g/mL}$.

En el último triplicado del hongo *Aspergillus niger* nos muestra halos de inhibición en las concentraciones C3 300 $\mu\text{g/mL}$, C4 400 $\mu\text{g/mL}$ y C6 600 $\mu\text{g/mL}$, con un radio de 5.66 mm, 4.07 mm y 4.64 mm, en el control positivo se encuentra con un halo de 22.41 mm, y se obtuvo una diferencia de 16.75 mm de la concentración C3 y C+.

Radio de halos de inhibición en el hongo *Aspergillus niger*.

<i>Aspergillus niger</i>				
RADIO DE HALOS (mm)				
	MEDIA	MODA	MEDIANA	DESV. ESTANDAR
C+	23.50	N/A	23.17	1.28
C-	0.87	N/A	0.67	0.37
C1 (100 µg/mL)	1.63	0	0.00	2.82
C2 (200 µg/mL)	2.05	0	0.00	3.56
C3 (300 µg/mL)	3.64	N/A	5.31	3.15
C4 (400 µg/mL)	2.73	N/A	4.07	2.37
C5 (500 µg/mL)	1.11	0	0.00	1.92
C6 (600 µg/mL)	4.41	N/A	4.64	0.68

Tabla 5. Radio de halos de inhibición en el hongo *Aspergillus niger*.



Gráfica 3. Promedio del radio de los halos inhibiendo *Aspergillus niger*.

En la **gráfica 6** y **tabla 5** se observa que los resultados obtenidos en el extracto de *Acacia cornígera* aplicados en el hongo *Aspergillus niger* no son significantes ya que la diferencia entre el control positivo y la concentración C6 la cual obtuvo mayor promedio en halo de inhibición fue de 19.09 mm. La concentración 6 mostrando un halo de inhibición de 4.41 mm radio promedio y una desviación estándar de 0.68 mm a diferencia del control positivo con una desviación de 1.28 mm confirmado que el margen de error es mínimo en la concentración C6.

Candida albicans

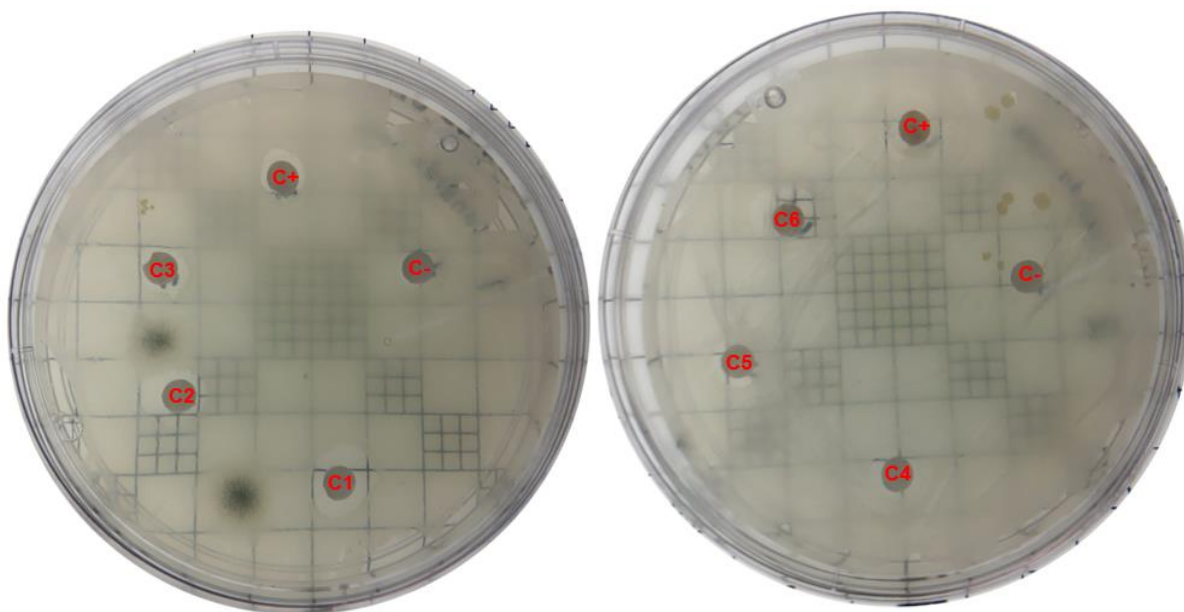


Figura 18. *Candida albicans* control positivo (C+), control negativo (C-) y las concentraciones de *Acacia cornígera* C1 100 µg/mL, C2 200 µg/mL, C3 300 µg/mL, C4 400 µg/mL, C5 500 µg/mL, y C6 600 µg/mL.

En la cepa *Candida albicans* se obtuvieron mejores resultados en sus diferentes concentraciones, C2 200 µg/mL, C3 300 µg/mL, C4 400 µg/mL, C5 500 µg/mL, y C6 600 µg/mL formando halos de 4.13 mm, 4.04 mm, 4.32 mm, 5.75 mm y 5.17 mm, el

control positivo forma un halo promedio de 6.42 mm, con esto se obtuvo una diferencia de 0.67 mm entre el halo de la concentración C5 a C+.

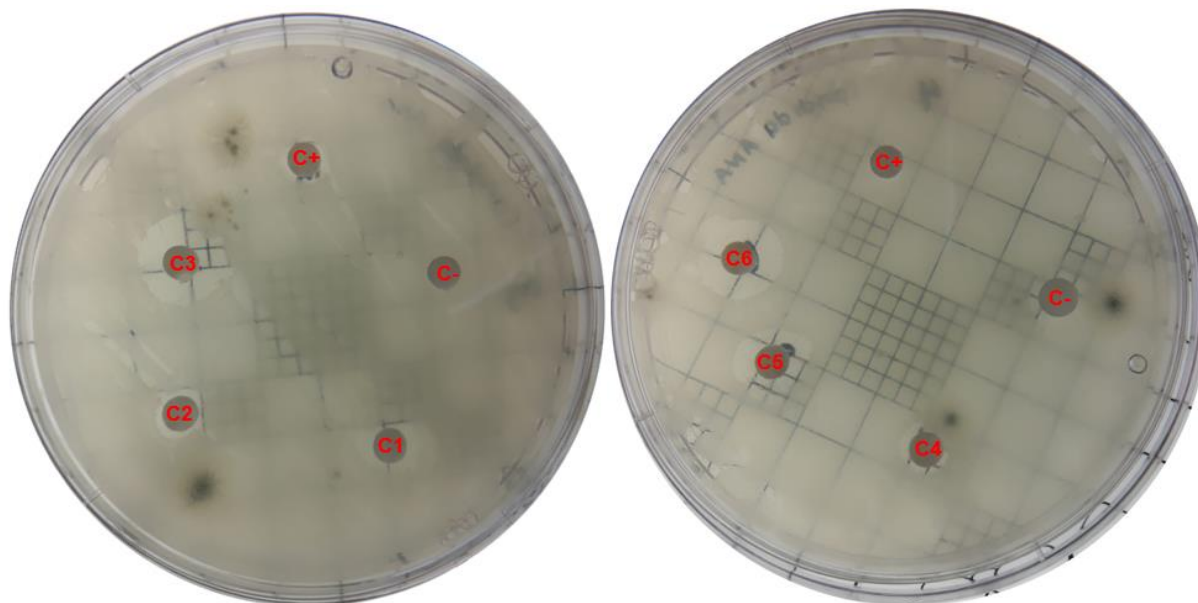


Figura 19. *Candida albicans* control positivo (C+), control negativo (C-) y las concentraciones de *Acacia cornígera* C1 100 $\mu\text{g/mL}$, C2 200 $\mu\text{g/mL}$, C3 300 $\mu\text{g/mL}$, C4 400 $\mu\text{g/mL}$, C5 500 $\mu\text{g/mL}$, y C6 600 $\mu\text{g/mL}$.

En la figura 19 observa que en el C+ no se logra ver un halo totalmente transparente como se observa en la concentración C3, C5 y C6, pero tampoco se ve un hongo dentro del espacio del control positivo esto da como resultado que el extracto de la planta *Acacia cornígera* tiene una actividad inhibitoria anti fúngica mayor que el voriconazol contra el hongo *Candida albicans*, observando un halo en las concentraciones C1 100 $\mu\text{g/mL}$, C3 300 $\mu\text{g/mL}$, C4 400 $\mu\text{g/mL}$, C5 500 $\mu\text{g/mL}$, y C6 60 $\mu\text{g/mL}$, con holas inhibitorios de 4.13 mm, 6.98 mm, 4.12 mm, 5.90 mm y 6.68 mm, en el control positivo C+ se muestra un halo de 3.86 mm.

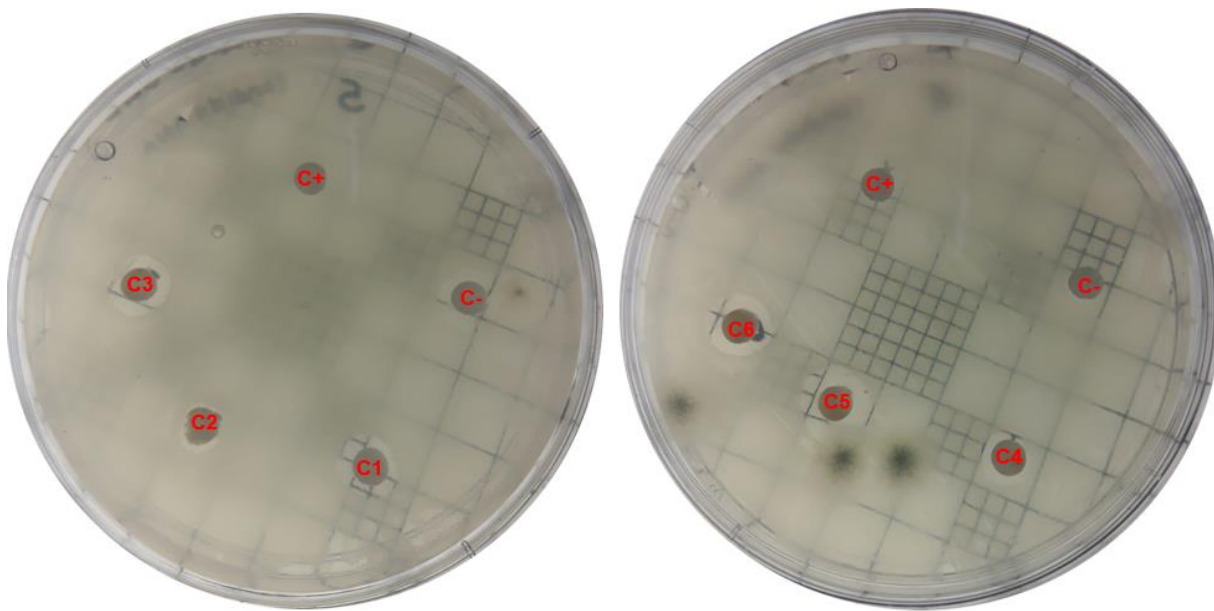


Figura 20. *Candida albicans* control positivo (C+), control negativo (C-) y las concentraciones de *Acacia cornígera* C1 100 µg/mL, C2 200 µg/mL, C3 300 µg/mL, C4 400 µg/mL, C5 500 µg/mL, y C6 600 µg/mL.

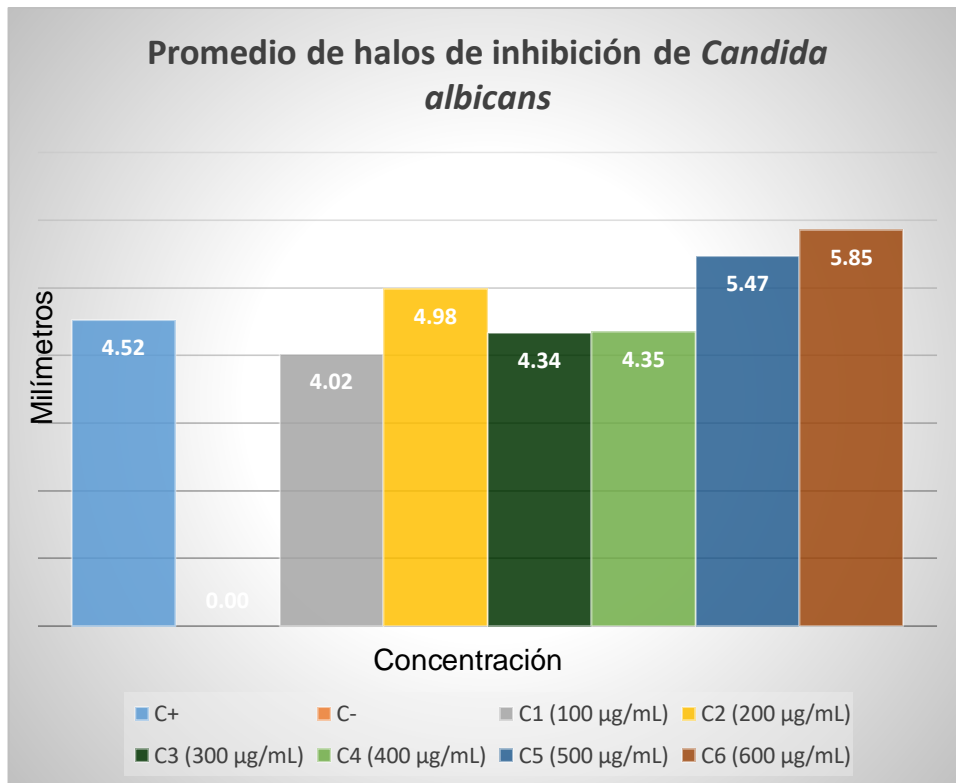
Finalmente en la **figura 20** se confirma que el extracto de la planta *Acacia cornígera* si tiene actividad anti fúngica ya que genera halos de inhibición en las concentraciones C1 100 µg/mL, C3 300 µg/mL, C4 400 µg/mL, C5 500 µg/mL, y C6 600 µg/mL, con halos de inhibición de 4.78 mm, 5.19 mm, 4.62 mm, 5.75 mm y 5.71 mm, en nuestro control positivo C+ nos arroja un halo de 3.29 mm. Se aprecia la diferencia de 2.46 mm entre C+ y C5.

Radio de halos de inhibición en el hongo *Candida albicans*.

<i>Candida albicans</i>				
	RADIO DE HALOS (mm)			
	MEDIA	MODA	MEDIANA	DESV. ESTANDAR
C+	4.52	N/A	3.86	1.67
C-	0.00	0	0.00	0.00
C1 (100 µg/mL)	4.02	N/A	4.13	0.82
C2 (200 µg/mL)	4.98	N/A	4.07	1.73
C3 (300 µg/mL)	4.34	N/A	4.04	0.75
C4 (400 µg/mL)	4.35	N/A	4.32	0.25
C5 (500 µg/mL)	5.47	5.75	5.75	0.49
C6 (600 µg/mL)	5.85	N/A	5.71	0.77

Tabla 6. Radio de halos de inhibición en el hongo *Candida albicans*.

En la tabla se muestra los radios de los haos de inhibición que formó el extracto de la planta *Acacia cornígera* en la cepa *Candida albicans*, con una desviación estándar de 1.88 mm lo cual a comparación de las demás cepas fue en la que logró un valor bajo.



Gráfica 4. Promedio del radio de los halos inhibiendo *Candida albicans*.

En la **gráfica 4** se analiza como las concentraciones C2 4.98 mm (200 µg/mL), C5 5.47 mm (500 µg/mL), y C6 5.85 mm (600 µg/mL) lograron un halo de inhibición mayor al control positivo C+ (voriconazol) con radio de 4.52 mm, arrojando una variación estándar en C2 de 1.73 mm, C5 de 0.49 mm y C6 de 0.77 mm, obteniendo un margen de error mínimo en las concentraciones C5 y C6, en el control positivo se obtuvo una desviación de 1.67 mm.

Se considera que esta cepa es en la que mejor respondió el extracto de la planta *Acacia cornígera* ya que en seis concentraciones la desviación estándar es menos a 1 mm.

5.2 Discusión de resultados

En el 2019, Torrentera y col. evidenció la susceptibilidad anti fúngica en el hongo *Aspergillus fumigatus* con el tracto de la flor de Sospó, donde además, hizo mención de que el hongo presentó susceptibilidad a la concentración de 200 µg/mL del extracto (Torrentera, 2019).

Mientras que el resultado más prometedor proporcionado por este estudio del extracto de la planta *Acacia cornígera* fue la concentración de 600 µg/mL, (C6) con radio promedio de 4.08 mm, se obtiene esta clasificación por su desviación estándar de 0.95 mm. En comparación con la información de Torrentera la concentración de *Acacia cornígera* es mayor a el extracto de la flor se Sospó.

Para *Aspergillus flavus* Caballero en 2011 expuso en el artículo “Efecto del aceite esencial de clavo de olor, canela y su combinación sobre la acción anti fúngica en *Aspergillus flavus* en agar chicha de maíz” mencionó que el análisis de varianza, con un nivel de confianza del 95%, determinó el efecto significativo del aceite esencial de clavo de olor, canela y su combinación a las diferentes concentraciones sobre la acción anti fúngica en *Aspergillus flavus*. El aceite esencial de clavo de olor al 0,20% produjo la mayor acción fungistática sobre *Aspergillus flavus* en agar chicha de maíz morado (Caballero, 2011).

Para el extracto de la planta *Acacia cornígera* la concentración con la que se obtuvo mejor resultado fue en C2 (200 µg/mL) con halo de inhibición de 5.42 mm y desviación estándar de 0.60 mm. Obteniendo un resultado significativo en el estudio.

Se determinó que el aceite esencial tiene mayor efecto inhibitorio que el extracto de la planta *Acacia cornígera* que en la concentración C2 (200 µg/mL).

Para la cepa *Aspergillus niger* en un estudio de extractos de corteza *Juglans neotropica* Diels y *Psidium guajava* L. (árboles peruanos) presentada por Quiroz en 2005 mostraron halos de <18 mm de radio a una concentración de 500µg/mL (Quiroz, 2005).

Mientras que con el extracto de la planta *Acacia cornígera* el resultado prometedor es de la concentración C6 (600 µg/mL) con un halo de 4.41 mm de radio y desviación de 0.68 mm.

Finalmente en “Determinación de la actividad antifúngica contra *Candida albicans* y *Aspergillus niger* de 10 plantas medicinales de 3 departamentos del Perú” nos hace mención sobre la susceptibilidad que tiene la cepa *Candida albicans* de doce extractos investigados, seis presentaron actividad antifúngica consistente con un diámetro de halos de inhibición ≥ 18 mm (Prueba de Difusión en agar) frente a *Candida albicans*. La CMI de los extractos que presentaron actividad consistente frente a *Candida albicans*, fue de 250 µg/mL para *Hypericum laricifolium* L., *Juglans neotropica* Diels, *Psidium guajava* L. y *Schinus molle* L. (un extracto de corteza y uno de hojas) (Quiroz, 2005).

En el extracto de la planta *Acacia cornígera* da resultados prometedores en todas sus concentraciones especialmente en C6 6 µg/mL con una halo de 6.68 mm, desviación estándar 0.77 mm a diferencia del control positivo (C+) con un halo promedio de 4.52 mm.

Conclusión

De acuerdo a los resultados anteriores, se concluye que la concentración mínima inhibitoria del extracto de la planta *Acacia cornígera* en los hongos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans*, para determinar su función como anti fungico.

Para demostrar esto, se utilizó el método estandarizado por el Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) para el estudio de la sensibilidad de los anti fúngicos, que dio como resultado que en la cepa *Candida albicans* el extracto es más susceptible para la inhibición de su crecimiento ya que los halos de inhibición en C3 3 µg/mL, C5 5 µg/mL, y C6 6 µg/mL con radio promedio 4.34 mm, 5.47 mm y 5.85 mm y la desviación estándar de 0.49 a 0.77 mm marcando un margen de error mínimo que son mayor al radio de C+, no obstante cabe destacar que las concentraciones no lograron el mismo efecto necesario para la inhibición del crecimiento de las cepas *Aspergillus flavus* con un porcentaje de inhibición del 18.6% referente al C+, *Aspergillus niger* con 18.7%, *Aspergillus fumigatus* 26.5% quizá las concentraciones no fueron las óptimas.

De acuerdo a los Métodos estandarizados por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) para el estudio de la sensibilidad a los anti fúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A) se encontraron las condiciones necesarias para inoculación confluyente y aplicación de anti fúngico eficaz, para lograr una lectura de halo de inhibición para las pruebas anti fúngicas.

Referencias bibliográficas

1. Bernal, M., Grether, & Amaro, G. (2018). LEGUMINOSAE I: Mimosoideae:Mimosa. En Martínez-Bernal, Grether, & González-Amaro., *Flora de Veracruz* (págs. 1-127). México, D.F.
2. Caballero, C. A. (2011). Efecto del aceite esencial de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y su combinación sobre la acción antifúngica en *Aspergillus flavus* en agar chicha de maíz (*Zea mays* L.), variedad morado. *Pueblo Continente*, 46-48.
3. Castillo, W. M. (2017). Botánica Sistemática DICOTILEDONEAS. *Agronomía-UNASAM*, 16.
4. Elvira. (2014). Biodiversidad de hongos en México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 76-81.
5. Fenix, A. (10 de abril de 2015). *La Red Subterránea*. Obtenido de *Aspergillus niger*, el secreto industrial mejor guardado:
<http://laredsubterránea.blogspot.com/2015/04/aspegillus-niger-el-secreto-mejor.html>
6. GEFOR. (2017). *FUNDACION GEFOR*. Obtenido de *Aspergillus fumigatus*:
<http://fundacionio.org/gefor/micologia/Aspergillus%20fumigatus.html>
7. Gil, M. (2018). *lifeder.com*. Obtenido de *Aspergillus flavus*: características, morfología, enfermedades: <https://www.lifeder.com/aspergillus-flavus/>
8. Guarro, J. (2012). Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, Vol. 30, (9-33).
9. Herrera, H. J., & Barreras, S. A. (2005). Análisis estadístico de experimentos pecuarios. *Manual de Procedimientos (Aplicaciones del Programa SAS)*, 113-118.
10. Ibarra, G. M., & Colín, S. S. (2018). Estación de la biología tropical "Los Thxtlas", Veracruz, México: Lista florística. *Botánica, UNAM.*, 2-3.

11. INSST. (23 de 09 de 2012). *INSST*. Obtenido de *Aspergillus fumigatus*:
<https://www.insst.es/documents/94886/353749/Ficha+Aspergillus+fumigatus.pdf>
12. insst. (12 de septiembre de 2012). *INSTITUTO NACIONAL DE SEGURIDAD E HIGIENE DEL TRABAJO*. Obtenido de *Aspergillus ssp*:
<https://www.insst.es/documents/94886/353749/Ficha+Aspergillus+spp.pdf/fc87d0c4-023a-4dda-95dc-cd26d346e1f2>
13. insst. (23 de septiembre de 2012). *INSTITUTO NACIONAL DE SEGURIDAD E HIGIENE EN EL TRABAJO*. Obtenido de *Candida Albicans*:
<https://www.insst.es/documents/94886/353749/Candida+albicans.pdf/>
14. Lui, A. (2013). *Aspergillus y aspergilosis*. *Centro Calidad SEIMC*, 1-2.
15. Moreno, J. Á. (2016). Los hongos: héroes o villanos de la prosperidad humana. *Revista digital universitaria*. Vol. 4, 4.
16. Popoff, D. O. (2007). *Hipertextos de area de biología* . Obtenido de Reino Fungí:
Clasificación: <http://www.biologia.edu.ar/fungi/fungiclas.htm>
17. Quiroz, R. (2005). Determinación de la actividad antifúngica contra *Candida albicans* y *Aspergillus niger* de 10 plantas medicinales de 3 departamentos del Perú. *Tesis EP Farmacia y Bioquímica*, 416.
18. Raisam, J., & Gonzales, A. M. (2007). *Reino fungí* . Obtenido de Hipertextos del área de la bilogía: <http://www.biologia.edu.ar/fungi/fungiclas.htm>
19. Torrentera. (2019). Evaluation of the antifungal effect of the leaf extract of Sospó flower. *PharmacologyOnLine*, 200-201.
20. Villaseñor, & Espinosa. (1998). Catálogo de malezas de México. *Universidad Naconal Autónoma de México y Fodo de Cultura Económica*, 12.