



SEP

TECNM

DITD

INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR DE ATLIXCO

*Organismo Público Descentralizado del Gobierno del Estado de
Puebla*

**Determinación de la eficiencia antimicótica del
extracto acuoso de Flor de Sospó (*Pseudobombax
ellipticum*) en los hongos *Aspergillus flavus*,
Aspergillus niger, *Aspergillus fumigatus* y *Candida
albicans*.**

**OPCIÓN I.
TESIS PROFESIONAL**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERO BIOQUÍMICO**

**PRESENTA:
FERNANDA RAMÍREZ LEÓN**

**DIRECTORES INTERNOS:
M.T.A. GUADALUPE GABRIELA BÁRCENA VICUÑA
DRA. JOHANA RAMÍREZ HERNÁNDEZ**

**DIRECTOR EXTERNO:
DR. JOSÉ DEL CARMEN REJÓN ORANTES**

ATLIXCO PUE. SEPTIEMBRE 2020

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, quisiera agradecer a la Dra. Johana Ramírez Hernández y la Mtra. G. Gabriela Bárcena Vicuña por su apoyo incondicional no solo como docentes si no como amigas, ya que en todo momento me alentaron y brindaron sus conocimientos para poder ser de mí una mejor persona tanto académica como moralmente, sin ellas yo no hubiera descubierto ese potencial que tengo para llevar a cabo este proyecto.

Un agradecimiento al Dr. José del Carmen Rejón Orantes por ser mi asesor externo y brindarme su apoyo académico.

Agradezco inmensamente a mis papás porque me dieron la oportunidad de seguir mis sueños, de estar siempre cuando más lo necesito y que jamás dejaron de trabajar duro en mí para que pudiera salir adelante y nada me pudiera derrotar, ahora sé que todas esas pláticas y regaños no eran en vano si no para ser mejor persona.

Y finalmente a mi Dios por darme esta gran oportunidad en la vida, de darme una hermosa familia y permitirme conocer a grandes personas que sé que puedo confiar en ellas, agradezco que pueda ser una persona plena y completa, que a pesar de cometer errores puedo mejorar teniendo fe en mi desarrollo día a día.

ÍNDICE

RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	7
Objetivo general	9
Objetivos específicos	9
JUSTIFICACIÓN	10
HIPÓTESIS	11
ANTECEDENTES	12
MARCO TEÓRICO	14
1. Medicina Tradicional	14
1.1 Medicamentos herbolarios	14
2. Pseudobombax ellipticum	15
2.1 Taxonomía	16
2.2 Distribución	16
2.3 Usos	17
3. Hongos	17
3.1 Infecciones fúngicas invasoras	18
4. Candida	19
4.1 Candida albicans	20
5. Aspergillus spp.	21
5.1. Aspergillus flavus	22
5.2. Aspergillus niger	23
5.3. Aspergillus fumigatus	23
6. Medicamentos anti fúngicos	25
6.1 Voriconazol	25
7. Flavonoides	26
7.1 Estructura química	26
7.2 Funciones y propiedades	26
METODOLOGÍA	28

Para lograr la obtención del extracto se hizo la recolección de la flor de *Pseudobombax ellipticum* después fue secada en una sala de sombra y posteriormente pulverizada. Para la extracción, se disolvió el polvo en agua purificada y se calentó a ebullición con agitación. Después de enfriar, la mezcla se filtró y se liofilizó produciendo polvo seco del material vegetal original. (Rejón-Orantes. JC, Hernández JW, Grajales AC, Jiménez N; ...Pérez M. 2016)..... 28

El extracto de la flor de *Pseudobombax ellipticum* fue obtenido y proporcionado por el Laboratorio Experimental de Farmacobiología de la Facultad de Medicina Humana de la UNACH a cargo del Dr. José del Carmen Rejón Orantes..... 28

RESULTADOS..... 31

DISCUSIÓN DE RESULTADOS 38

CONCLUSIONES 40

RECOMENDACIONES 41

REFERENCIAS..... 42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Karl Sigismund Kunth..... 16

Figura 2. Flor de Sospó (*Pseudobombax ellipticum*) 17

Figura 3. Diversidad de hongos 18

Figura 4. Distintas especies de *Candida* 19

Figura 5. Cepa de *Candida Albicans*..... 21

Figura 6. Cepa de *Aspergillus flavus*..... 22

Figura 7. Cepa de *Aspergillus niger* 23

Figura 8. Cepa de *Aspergillus fumigatus*..... 24

Figura 9. Preparación de diluciones a concentraciones de 100 µg/µL, 200 µg/mL, 400 µg/m, 600 µg/mL, 800 µg/mL y 1000 µg/mL de Flor de Sospó (*Pseudobombax ellipticum*). 28

Figura 10.Preparación de inóculo para cada una de las cepas en solución de agua estéril 29

Figura 11. Momento de inoculación de hongos por triplicado sobre cajas Petri con contenido de PDA. 29

Figura 12.Colocación de sensidiscos con sus respectivas concentraciones del extracto de Flor de Sospó: 1(100 µg/µL), 2 (200 µg/mL), 3 (400 µg/m), 4 (600 µg/mL), 5 (800 µg/mL), 6 (1000 µg/mL), control (+) Voriconazol y control (-) agua 30

Figura 13. Resultado de placas de *Aspergillus niger*..... 31

Figura 14. Gráfica de comparación de concentración de extractos para *Aspergillus niger*. 32

Figura 15.Resultado de placas por triplicado de *Aspergillus flavus*. 33

Figura 16. Gráfica de comparación de concentración de extractos para *Aspergillus flavus*. 34

Figura 17. Resultado de placas por triplicado de *Aspergillus fumigatus* 34

Figura 18. Gráfica de comparación de concentración de extractos para *Aspergillus fumigatus*. ¡Error! Marcador no definido.

Figura 19. Resultado de placas por triplicado de Candida Albicans. 36
Figura 20. Gráfica de comparación de concentración de extractos para Candida albicans.
..... 37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tamaño de halo de inhibición de Aspergillus niger y promedio 32
Tabla 2. Tamaño de halo de inhibición de Aspergillus flavus y promedio. 33
Tabla 3. Tamaño de halo de inhibición de Aspergillus fumigatus y promedio..... **¡Error!**
Marcador no definido.
Tabla 4. Tamaño de halo de inhibición de Candida albicans y promedio. 37

RESUMEN

La flor de sospó (*Pseudobombax ellipticum*) es una especie originaria de México, su reproducción se ha distribuido por una gran variedad de regiones tropicales de América como planta medicinal, en algunas regiones es utilizada para aliviar enfermedades respiratorias e infecciones estomacales, en éste proyecto se pretende analizar su efecto sobre diferentes hongos: *Aspergillus (flavus, niger, fumigatus)* y *Candida albicans*. Los cuales son causantes de enfermedades como obstrucción de las vías aéreas, candidiasis, aspergilosis pulmonar invasiva, sinusitis y que estas al ser tratadas con antimicóticos de manera frecuente puede ser nocivo para la salud.

A partir del método de CLSI, se hizo un análisis de sensibilidad para los hongos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans* en soluciones acuosas a seis diferentes concentraciones del extracto de Flor de sospó (*Pseudobombax ellipticum*) que van desde 100 hasta 1000 µg / mL.

INTRODUCCIÓN

La medicina tradicional es reconocida hoy como un recurso fundamental para la salud de millones de seres humanos, es una parte importante de la cosmovisión de los pueblos indígenas y representa el conocimiento milenario sobre la madre tierra y el uso de plantas medicinales que los indígenas han resguardado y que tiene un valor incalculable fortaleciendo y preservando su identidad.

Actualmente esta es usada ampliamente y se está extendiendo rápidamente en muchos países, sin embargo, las instancias normativas y los profesionales de la salud están afrontando cuestiones relativas a la seguridad, calidad, disponibilidad, preservación y reglamentación de la medicina complementaria.

La estrategia está enfocada para ayudar a los países a determinar la mejor manera para promover la salud y proteger a los usuarios que desean recurrir a este tipo de prácticas médicas.

La diversidad de flora en México es de las más extensas en el mundo y de igual manera gran variedad son utilizadas para fines medicinales y/o terapéuticos, lo que nos da apertura al campo de la investigación y descubrir los beneficios que nos brinda la naturaleza. (Javier E. García, 2012).

Basados en las pruebas empíricas ancestrales sobre el uso de estos extractos como medicamentos suministrados por los curanderos tradicionales a sus “enfermos”, hemos propuesto confirmar el valor terapéutico de *Pseudobombax ellipticum* y, dependiendo del órgano de la planta y del tipo de extracto que se obtuvo, se definió la metodología empleada. (Rejón-Orantes, JC, Perdomo, D. P., & Roldán, G. (2011).

Pseudobombax ellipticum es una especie que en medicina tradicional es utilizada como remedio para combatir algunas enfermedades respiratorias, úlceras y dolores en general, y que algunas de estas enfermedades con probabilidad a su

vez son provocadas por hongos tales como *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans*, por lo que se busca en esta investigación demostrar que efectividad antimicótica tiene la flor de *Pseudobombax ellipticum* sobre los hongos antes mencionados.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Determinar la concentración mínima inhibitoria del extracto acuoso de la Flor de Sospó (*Pseudobombax ellipticum*) en los hongos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans*.

Objetivos específicos

- . Obtener el extracto acuoso de *Pseudobombax ellipticum*
- Determinar la eficacia antimicótica del extracto acuoso de *Pseudobombax ellipticum* contra *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans*.
- Determinar la CMI del extracto acuoso de *Pseudobombax ellipticum*.
- Comparar la eficacia antimicótica del extracto acuoso de *Pseudobombax ellipticum* con el antimicótico de eficacia conocida Voriconazol.

JUSTIFICACIÓN

En México existe una gran variedad de flora apegada a lo que conocemos como medicina tradicional, esta es considerada un recurso fundamental para la salud de millones de seres humanos, y el uso de plantas medicinales que los indígenas han resguardado y que tiene un valor incalculable fortaleciendo y preservando su identidad sigue siendo una alternativa de curación para gran mayoría de la población.

Los hongos son patógenos que van evolucionando al pasar de los años haciendo resistencia a la diversidad de anti fúngicos; *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans*, son causantes de diferentes malestares en el ser humano, a lo que permite para la ciencia buscar alternativas que prometan mejor actividad de inhibición.

En la medicina tradicional el empleo de la *Pseudobombax ellipticum* esta reportado, se utiliza en trastornos respiratorios como la tos, contra la fiebre y como antimicrobiano (Ruiz-Terán et al., 2008).

La importancia de este hecho da lugar a la intervención de hacer una investigación donde se utilice el extracto de esta flor para la realización de un análisis donde podamos determinar el efecto de inhibición sobre los hongos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans* ya que estos son causantes que infectan la piel, uñas, membranas mucosas y tracto digestivo.

HIPÓTESIS

El extracto acuoso de la flor de *Pseudobombax ellipticum* posee propiedad antimicótica contra los hongos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans*.

ANTECEDENTES

El antecedente del empleo en la medicina tradicional de *Pseudobombax ellipticum* como antimicrobiano y antioxidante está reportado, lo que fortaleció la propuesta de este proyecto (Ruiz-Terán et al., 2008). Además, Carolina Orantes y col. mencionan en 2013 que en el estado de Chiapas de todas las especies de la zona utilizadas para curación de enfermedades y mal estar en general el 8% usan únicamente la flor en vez de raíz u hoja, como el caso de la flor de sospó (*Pseudobombax ellipticum*) que en medicina tradicional es un remedio para combatir algunas enfermedades respiratorias, úlceras y dolores en general.

En 2018 en la universidad de ciencias y artes de Chiapas estudiaron las antocianinas y fotosíntesis durante el desarrollo foliar de *Pseudobombax ellipticum*, la presencia de las antocianinas en *Pseudobombax ellipticum* (flor de sospó) está escasamente documentada, Lee y Collins (2001), determinaron la presencia de antocianinas en las hojas y partes reproductivas. Dominy et al. (2002), señalaron diferencias en la abundancia de antocianinas entre las hojas jóvenes y las maduras, mientras que las primeras son rojas y con antocianinas, las maduras son verdes y aparentemente sin tales metabolitos especializados. Scogin (1968), anteriormente aislaron a la antocianina cianidina-3,5-diglucosido y la indicaron como la molécula responsable del color rosa de las flores (Citado en Refaat et al., 2012). Las presencias de estos pigmentos también fueron identificadas en los tallos, raíces y flores de otra especie de *Pseudobombax*, la clavelina (*Pseudobombax marginatum*), con mayor abundancia en tallos (4.9 ug·g⁻¹ de extracto) y menor proporción en las flores (0.1 ug·g⁻¹ extracto) (Menezes et al., 2015). De igual manera se tiene documentado la actividad antimicrobiana y antioxidante de antocianinas de maíz morado (*Zea mays* L.), papa morada (*Solanum Tuberosum* L.) y mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) obtenidas con el uso de etanol acidificado, seguidamente fueron microencapsuladas con el polímero maltodextrina con el método de secado por aspersion (spray dryer). (Masaquiza Jerez, I. M. (2018).

Por otro lado se presenta estudio sobre la actividad gastroprotectora de *P. ellipticum* aislando el β -lupeol probado en la mucosa gástrica de ratas. (Sandoval, 2009). En Veracruz es empleada tradicionalmente, pero sin estudios científicos, junto con *Hamelia erecta*, para elaborar un té usado para esterilizar a las mujeres, siendo usadas por aquellas que ya no desean tener más hijos. (Guía Botánica, 2019).

MARCO TEÓRICO

1. Medicina Tradicional

Al pasar de los años se ha observado que la medicina tradicional es todo el conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias indígenas de las diferentes culturas, sean o no explicables, usados para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas o mentales.

1.1 Medicamentos herbolarios

El concepto de medicamentos herbarios abarca hierbas, material herbario, preparaciones herbarias y productos herbarios acabados, que contienen como principios activos partes de plantas, u otros materiales vegetales, o combinaciones de esos elementos.

1.1.1 Hierbas

Comprenden materiales vegetales brutos, tales como hojas, flores, frutos, semillas, tallos, madera, corteza, raíces, rizomas y otras partes de plantas, enteros, fragmentados o pulverizados.

1.1.2 Materiales herbolarios

Comprenden, además de hierbas, jugos frescos, gomas, aceites fijos, aceites esenciales, resinas y polvos secos de hierbas. En algunos países esos productos se pueden elaborar mediante diversos procedimientos locales, como el tratamiento con vapor, el tostado o el rehogado con miel, bebidas alcohólicas u otros materiales.

1.1.3 Preparaciones herbolarias

Son la base de los productos herbarios acabados y pueden componerse de materiales herbarios triturados o pulverizados, o extractos, tinturas y aceites grasos de materiales herbarios. Se producen por extracción, fraccionamiento, purificación, concentración y otros procesos biológicos o físicos. También comprenden preparaciones obtenidas macerando o calentando materiales herbarios en bebidas alcohólicas o miel o en otros materiales.

1.1.4 Productos herbolarios acabados

Se componen de preparaciones herbarias hechas a partir de una o más hierbas. Si se utiliza más de una hierba, se puede utilizar también la expresión “mezcla de productos herbarios”. Los productos herbarios acabados y las mezclas de productos herbarios pueden contener excipientes, además de los principios activos. Sin embargo, no se consideran herbarios los productos acabados o en forma de mezcla a los que se hayan añadido sustancias activas químicamente definidas, incluidos compuestos sintéticos o constituyentes aislados de materiales herbarios.

2. *Pseudobombax ellipticum*

El género *Pseudobombax* pertenece a la familia Malvaceae y está conformado por 22 especies, una de ellas es *Pseudobombax ellipticum* con dos variedades *Pseudobombax ellipticum* variedad *ellipticum* y *Pseudobombax ellipticum* variedad *tenuiflorum*. Esta planta fue descrita como *Bombax ellipticum* por primera vez por Karl (Carl) Sigismund Kunth (Figura 1) en 1821 en la revista *Nova Genera et Species Plantarum* (quarto ed.) 5: 299–300, en 1943 Dugand G. Armando reclasificó a la especie con su nombre actual en la revista *Caldasia* (*The Plant List*, 2013; Trópicos, 2017).



Fig.1 Karl Sigismund Kunth.

2.1 Taxonomía

Clase: Equisetopsida C. Agardh

Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht. Superorder: Rosanae Takht.

Orden: Malvales Juss. Familia: Malvaceae Juss.

Género: *Pseudobombax* Dugand

Especie: *Pseudobombax ellipticum* (Kunth) Dugand (Tropicos, 2016) (Figura 2)

Cuenta con cuatro sinonimias: *Abutilon hemsleyanum* Rose, *Bombax ellipticum* Kunth, *Bombax mexicanum* Hemsl, *Coralinea fastuosa* Sessé ex DC (The Plant List, 2013; Tropicos, 2017).

2.2 Distribución

Se distribuye desde Norte América (Florida y México) hasta Centro América (Belice, Guatemala, El Salvador, Honduras, Cuba, Haití, República Dominicana y Puerto Rico). En México se encuentra en los estados de Campeche, Chiapas, Colima, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz, Yucatán y Zacatecas. En Chiapas hay registros en los municipios de Cacahoatán, Mapastepec, Ocosingo, Ocozocoautla de Espinosa y Tuxtla Gutiérrez. (Orantes-

García et al., 2015; Calderón y Nava, 2004; Miranda, 2015; Tropicos, 2016; CONABIO, 2016; Sweetgum, 2016; Villaseñor, 2016).



Fig. 2. Flor de Sospó (*Pseudobombax ellipticum*)

2.3 Usos

Esta especie es frecuentemente plantada como árbol ornamental por sus vistosas flores en parques, calles y jardines. La pulpa del fruto inmaduro es comestible y la fibra algodonosa del fruto maduro se usa como el “kapok” de la ceiba, para rellenar almohadas. La madera es utilizada como leña, para fabricar chapas y para centros de madera terciada, tiene buenas cualidades para el torneado, aunque su alto contenido de agua y la presencia de resinas dificultan su secado; además se usa para la fabricación de canoas y boyas. También tiene usos medicinales, las flores, se utilizan para curar enfermedades respiratorias, fiebres, úlceras, dolores en general y como antimicrobiano (Gispert, Rodríguez y González, 2002; Calderón y Nava, 2004; Ruiz-Terán et al., 2008; Orantes-García et al., 2015; Miranda, 2015; CONABIO, 2016).

3. Hongos

Los hongos son organismos eucariotas, que producen esporas, no tienen clorofila, con nutrición por absorción, generalmente con reproducción sexual y asexual; el cuerpo consiste generalmente de filamentos ramificados con pared celular quitinosa (Figura 3).



Fig. 3. Diversidad de hongos

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.

3.1 Infecciones fúngicas invasoras

Existe una mínima proporción de hongos que tienen capacidad para ser patógenos del ser humano. En la actualidad las infecciones fúngicas invasoras más frecuentes son aquellas causadas por las especies de *Cándida* y de *Aspergillus*, que pueden presentar diferentes factores de virulencia que potencien su capacidad invasora. Frente a la infección fúngica, el ser humano se defiende utilizando diferentes estrategias entre las que destacan las barreras cutáneas y epiteliales y la activación del sistema inmunitario. En diferentes situaciones en la que estos mecanismos de defensa se ven comprometidos, el huésped es más susceptible a padecer una infección fúngica invasora. (Carolina García y Jordi Carratalà, 2011).

4. Candida

Aunque hay más de 150 especies de *Candida*, pocas son patógenas para el ser humano. Las especies más frecuentes en las infecciones invasoras son *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* y *Candida krusei*. La mayoría de las especies crecen únicamente en forma de levadura, células ovales que se dividen por gemación. Sin embargo, algunas especies pueden formar pseudohifas, que se corresponden con cadenas de levaduras alargadas que se forman al no producirse una correcta separación de las células tras la gemación (Figura 4).

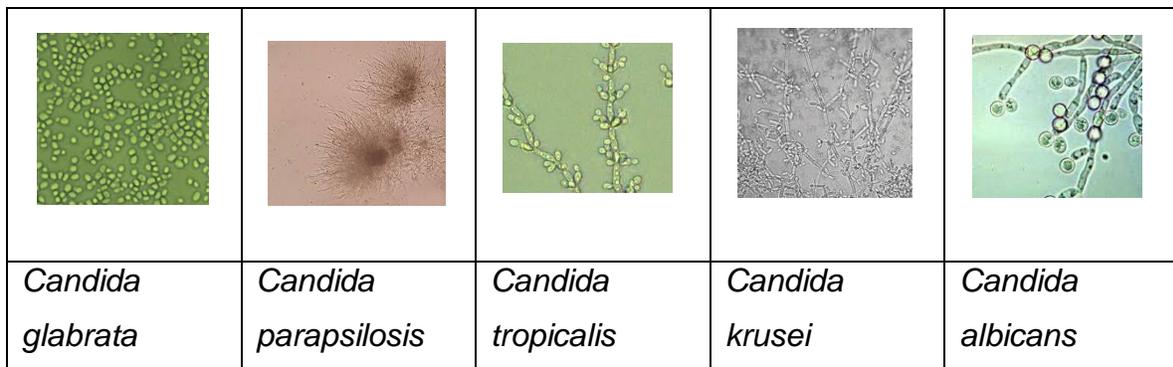


Fig. 4. Distintas especies de *Candida*

Candida posee la capacidad de producir diferentes factores de virulencia que favorecen su acción invasora. Entre estos factores destacan las proteinasas aspárticas secretadas (PAS), que dañan el tejido de las mucosas y facilitan la invasión del hongo.

Otro factor importante son las adhesinas que tienen una gran capacidad de adaptación y facilitan la unión del hongo con los epitelios. También puede favorecer la virulencia de *Candida* su capacidad de formar biofilms en algunas superficies, de cambiar su morfología, o de alterar las propiedades de la superficie celular y/o bioquímicas. (Carolina García y Jordi Carratalà, 2011).

4.1 *Candida albicans*

Candida albicans es un hongo dimórfico perteneciente al Phylum Ascomycota, que presenta pseudohifas, hifas y blastoconidios subesféricos, poseen la facultad de adaptarse a una temperatura de 37°C, asociada a animales de sangre caliente, este saprobio coloniza la vagina y los tractos digestivo y respiratorio humanos. Puede infectar la piel, uñas y membranas mucosas, pero la presentación diseminada que se desarrolla en pacientes inmunodeprimidos es la complicación más seria de la enfermedad. (Figura 5).

La presencia de *Candida albicans* como comensal en las membranas mucosas de sujetos asintomáticos es común, por lo que, en sujetos sanos, existe un balance entre los mecanismos de defensa del hospedero y el potencial invasivo por parte de las levaduras. Sin embargo, cuando el sistema de defensa del hospedero se daña, tal y como ocurre en sujetos inmunosuprimidos o médicamente comprometidos, la infección por *Candida albicans*, así como por otras especies de *Candida* puede derivar en el establecimiento de una Candidiasis, la cual se puede manifestar bien sea de manera superficial, involucrando la mucosa bucal, o diseminada, la cual constituye una forma invasiva más seria.

Diversas observaciones clínicas indican que los cambios en el hospedero son usualmente los responsables del desequilibrio ecológico. Estos cambios incluyen además de la disminución de los mecanismos de defensa del hospedero, reducción del flujo salival, disminución de las inmunoglobulinas, trauma local con pérdida de la integridad tisular, debilidad general, estados de malnutrición, cuando esta ocurre en sujetos con dietas ricas en carbohidratos, deficiencia de hierro, ácido fólico o vitamina B12, desórdenes endocrinos como hipotiroidismo, enfermedad de Addison (Insuficiencia adrenocortical) y diabetes mellitus, infección por virus de inmunodeficiencia humana (V.I.H.), alteraciones de la sangre tales como leucemia aguda y agranulocitosis, antibióticoterapia prolongada, quimioterapia, radioterapia, y xerostomía. (K. Chilán y S. Figueroa, 2019).

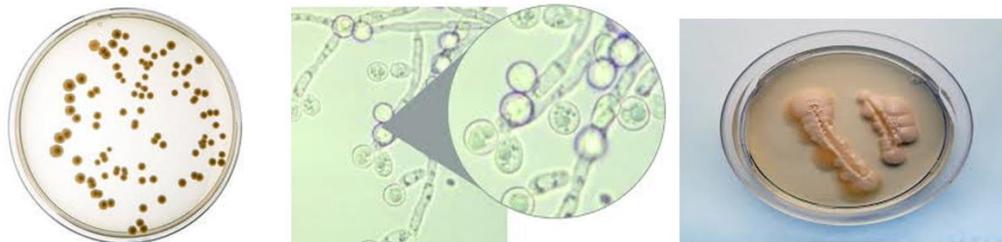


Fig. 5. Cepa de Candida Albicans.

5. Aspergillus spp.

El género *Aspergillus* incluye unas 200 especies, de las que más de 20 pueden causar infecciones en humanos. *Aspergillus* es un hongo filamentoso ubicuo en la naturaleza. Aunque su principal nicho ecológico es la tierra, el agua o la vegetación, las esporas de *Aspergillus* se pueden dispersar fácilmente en el aire y sobrevivir en diferentes condiciones ambientales. Este hongo tiene un ciclo biológico muy simple en el cual se forman esporas para su reproducción y tras la germinación de estas esporas se forman las hifas que serán las formas invasivas del hongo. La simplicidad del ciclo biológico favorece una alta capacidad del hongo para la esporulación y, como consecuencia, la presencia de concentraciones altas de esporas en el aire.

Existen otros factores de virulencia comunes del género *Aspergillus* que facilitan la invasión del hongo en el huésped. *Aspergillus* puede secretar toxinas (gliotoxina) que son capaces de actuar en el momento crucial de la patogénesis, cuando el hongo coloniza el epitelio mucoso e interacciona con el huésped.

La inhalación de las esporas de *Aspergillus* es la etapa inicial de la patogenia de la aspergilosis invasora. Aunque la inhalación de estas esporas por el ser humano es muy frecuente, se calcula que inhalamos más de 200 esporas diarias, habitualmente, no producen ninguna enfermedad al ser eliminadas eficientemente por el sistema inmunitario. (Carolina García y Jordi Carratalà, 2011).

5.1. *Aspergillus flavus*

Una característica de *Aspergillus flavus* es que pueden producir metabolitos secundarios. Esto quiere decir que no tienen una función directa en el metabolismo fisiológico del hongo, sino más bien actúan como un factor de defensa para un medio hostil. Estos son elaborados durante el desarrollo fúngico, denominadas aflatoxinas, entre otros compuestos. Aunque no es una propiedad única de *A. flavus*, pues también son producidas por *A. parasiticus*, y *A. nonius*. El peligro se presenta cuando el hongo se instala y produce las sustancias tóxicas sobre granos y legumbres, que posteriormente van a ser consumidos por los humanos y animales.

Aspergillus flavus se clasifica en dos grupos de acuerdo al tamaño de sus esclerocios, donde el grupo I (cepas L) tienen esclerocios mayores a 400 μm y las del grupo II (cepas S) poseen esclerocios de tamaño menor a 400 μm .

Entre las patologías más frecuentes causadas por *A. flavus* están la sinusitis fúngica, infección cutánea y neumonía no invasiva. También puede causar infecciones de córnea, nasorbitales y enfermedad diseminada. *Aspergillus flavus* (Figura 6) es la responsable del 10% de las enfermedades invasivas y es la tercera causa de onicomycosis en el humano. (M. Gill, 2018).



Fig. 6. Cepa de *Aspergillus flavus*

5.2. *Aspergillus niger*

Aspergillus niger es un hongo ascomiceto filamentoso que es ubicuo en el medio ambiente y se ha implicado en infecciones oportunistas de humanos. Además de su papel como patógeno humano oportunista. (Scott E Baker, Medical Mycology, 2006).

Este es un hongo micelial ambiental, formado por hifas hialinas tabicadas. Es un hongo ubicuo de distribución mundial de vida saprófita. Esto quiere decir que su ciclo de vida es en la naturaleza, sin involucrar al hombre. Por tanto, su implantación en tejidos del humano es incidental a su ciclo normal.

En infecciones invasivas *Aspergillus niger* (Figura 7) representa el 3-7%, siendo más frecuentes en infecciones oticomícóticas y afectaciones cutáneas. A pesar de que puede ocasionar patologías oportunistas, tiene un lado beneficioso a nivel industrial.

Este microorganismo afecta preferentemente más a los adultos que a los niños y a los hombres más que a las mujeres. Todas las razas pueden verse afectadas y las enfermedades que produce no son contagiosas. (M. Gill, 2018).



Fig. 7. Cepa de *Aspergillus niger*

5.3. *Aspergillus fumigatus*

Aspergillus fumigatus es un hongo patógeno oportunista productor de esporas muy numeroso en el entorno es un hongo ambiental cosmopolita que produce infecciones oportunistas en el hombre y forma parte de la microbiota habitual hallada en el ambiente; aire, suelo y vegetación en descomposición (M. Gill, 2018) (Figura 8). Es muy resistente a cualquier tipo de estrés ambiental, por ejemplo,

tiene una alta concentración de melanina que le protege de los rayos ultra violeta (UV).

De las cuatro especies de *Aspergillus* más frecuentemente aisladas de pacientes hospitalizados, *Aspergillus fumigatus* es la que produce la mayoría de las enfermedades pulmonares alérgicas e invasoras.

Las esporas, conocidas como conidias, son muy fáciles de inhalar, estimándose que respiramos entre cientos y miles al día. Cuando lo hacemos, las células del sistema inmunitario residentes en nuestros pulmones las fagocitan y destruyen, lo que previene el desarrollo de la infección.

Aspergillus fumigatus es uno de los principales problemas en pacientes que han recibido trasplantes de órganos y por lo tanto están recibiendo terapia inmunosupresora, puesto que son susceptibles a la aspergilosis pulmonar invasiva (API) (A. Drummond, SEI, 2017).

También en algunas oportunidades se puede ver a este microorganismo contaminando los alimentos. Los más comúnmente atacados son aquellos ricos en carbohidratos y fibras como el pan, dulces y granos.

Por otra parte, *Aspergillus fumigatus* es capaz de crecer a 37 °C, pero también puede hacerlo a 50°C. Por ello, se dice que es una especie termo tolerante. Sus conidias pueden sobrevivir a 70°C.

Se cree que *Aspergillus fumigatus* se reproduce casi exclusivamente por vía asexual a través de la producción de conidios.

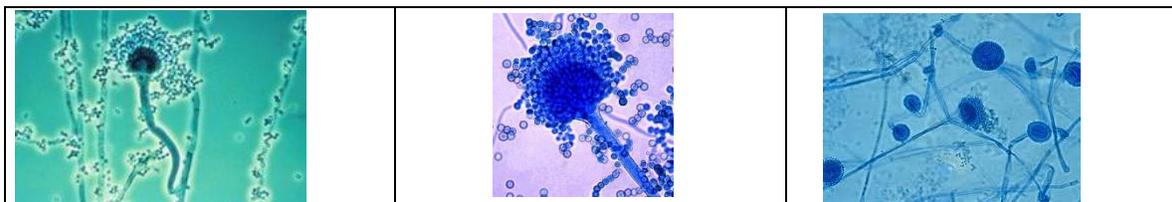


Fig 8. Cepa de *Aspergillus fumigatus*

6. Medicamentos anti fúngicos

El concepto de agente anti fúngico o antimicótico engloba cualquier sustancia capaz de producir una alteración tal de las estructuras de una célula fúngica que consiga inhibir su desarrollo, alterando su viabilidad o capacidad de supervivencia, bien directa o indirectamente, lo que facilita el funcionamiento de los sistemas de defensa del huésped.

Las infecciones fúngicas pueden ser superficiales o sistémicas. Las infecciones superficiales sólo afectan a la piel, cabello, uñas o membranas mucosas, mientras que las infecciones fúngicas sistémicas pueden afectar a todo el cuerpo.

Las infecciones fúngicas sistémicas están producidas a veces por inhalación, ingestión o inoculación de patógenos primarios, y a veces por invasión oportunista de comensales en pacientes con baja resistencia del huésped. Su prevalencia ha aumentado no sólo debido a la infección pandémica por el VIH, sino también a causa del uso elevado de drogas ilegales por vía parenteral en muchos países, y un mayor uso de antibióticos de amplio espectro e intervenciones médicas invasivas. En pacientes inmunodeficientes, las infecciones fúngicas sistémicas suelen ser diseminadas. (OMS, 2018).

6.1 Voriconazol

El voriconazol se usa en adultos y niños de 2 años de edad y mayores para tratar infecciones fúngicas graves como la aspergilosis invasiva (una infección fúngica que comienza en los pulmones y se propaga a través del torrente sanguíneo a otros órganos), candidiasis esofágica (un hongo un tipo de infección por hongos que puede causar parches blancos en la boca y la garganta) y fungemia (una infección por hongos en la sangre). También se usa para tratar algunas otras infecciones por hongos cuando otros medicamentos no funcionan para ciertos pacientes. Funciona retrasando el crecimiento de los hongos que causan la infección.

Este fármaco es derivado de triazoles. Disponible en forma oral e intravenosa, se absorbe muy bien en el tracto digestivo (como fluconazol), no se excreta por la orina (no administrar en micosis del tracto urinario). Actividad: tiene el espectro más amplio de los azoles. Incluye especies sensibles a fluconazol, algunas especies de *Candida* resistentes a fluconazol (hay posibilidad de resistencia cruzada), hongos de los géneros *Aspergillus*, *Scedosporium* y *Fusarium*. Activo frente a cepas de *A. terreus* resistentes a la anfotericina B (Medicina interna, 3ra edición, 2019).

7. Flavonoides

Denota un grupo muy amplio de compuestos polifenólicos, los cuales están ampliamente distribuidos en el reino vegetal y se encuentran de forma universal en las plantas vasculares, en forma de glicósidos.

En estos se encuentran diferentes beneficios, uno de ellos es contra la infección por organismos fitopatógenos; además, estos compuestos presentan propiedades relacionadas con la salud humana, lo cual está basado en su actividad antioxidante.

7.1 Estructura química

Químicamente, estas sustancias son de naturaleza fenólica y se caracterizan por poseer dos anillos aromáticos bencénicos unidos por un puente de tres átomos de carbono, con la estructura general C₆ -C₃ -C₆ , los cuales pueden formar o no un tercer anillo.

7.2 Funciones y propiedades

Los flavonoides son importantes para el desarrollo normal de las plantas; estos se encuentran localizados en la membrana del tilacoide de los cloroplastos. Sus funciones en las plantas se pueden resumir en tres grupos: papel de defensa, papel de señal química y efecto sobre las enzimas.

Estos juegan un papel en la defensa de las plantas frente a agentes agresores externos. Entre estos agentes se puede mencionar la radiación UV de los rayos solares, los microorganismos tanto bacterias, como hongos e insectos y otros animales herbívoros, las otras plantas y el entorno.

En su relación con el hombre, estas sustancias presentan una serie de actividades farmacológicas, dependiendo de ciertas características de su molécula, entre las que se destaca su actividad sobre el sistema circulatorio, que conduce a una disminución de la fragilidad capilar y previene la formación de varicosidades mejorando la circulación periférica, lo cual es la primera manifestación en los procesos inflamatorios.

Los flavonoides con respecto a la actividad antifúngica es mayor en los compuestos cuya molécula está completamente metilada, como es el caso de la tangeretina de los cítricos, y disminuye dramáticamente cuando se remueve el grupo metilo de la posición 5. (Cartaya. O, Reynaldo, Inés, 2001).

METODOLOGÍA

Para lograr la obtención del extracto se hizo la recolección de la flor de *Pseudobombax ellipticum* después fue secada en una sala de sombra y posteriormente pulverizada. Para la extracción, se disolvió el polvo en agua purificada y se calentó a ebullición con agitación. Después de enfriar, la mezcla se filtró y se liofilizó produciendo polvo seco del material vegetal original. (Rejón-Orantes. JC, Hernández JW, Grajales AC, Jiménez N; ...Pérez M. 2016).

El extracto de la flor de *Pseudobombax ellipticum* fue obtenido y proporcionado por el Laboratorio Experimental de Farmacobiología de la Facultad de Medicina Humana de la UNACH a cargo del Dr. José del Carmen Rejón Orantes.

Una vez obtenido el extracto fue llevado a las instalaciones del Instituto Tecnológico Superior de Atlixco y tratado en el laboratorio de análisis especiales. Para este proyecto se realizó una muestra acuosa a partir del extracto de la flor de sospó en la cual se realizaron 6 diluciones a diferentes concentraciones (100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 400 $\mu\text{g}/\text{m}$, 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$). (Figura 9).



Fig. 9. Preparación de diluciones a concentraciones de 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 400 $\mu\text{g}/\text{m}$, 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Flor de Sospó (*Pseudobombax ellipticum*).

Los hongos se inocularon en el medio de cultivo PDA (agar dextrosa y papa), con los métodos estandarizados (CLSI) para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos.

Como primera parte se prepararon inóculos, los cuales partieron de un cultivo de 48 h, en agar papa dextrosa a 35°C, se tomaron colonias de cada cepa de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans* y se resuspendieron en una solución de agua estéril. (Figura 10).



Fig. 10. Preparación de inóculo para cada una de las cepas en solución de agua estéril

Una vez preparado el inóculo de cada cepa en tubos de Eppendorf, todos los hongos fueron inoculados por triplicado en el agar PDA con un asa de Digraskly (Figura 11).



Figura 11. Momento de inoculación de hongos por triplicado sobre cajas Petri con contenido de PDA.

Posteriormente se tomaron los sensidiscos ya con sus respectivas diluciones a diferentes concentraciones y se colocaron en placas Petri, tomando en cuenta un control (+) Voriconazol a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y un control (-) agua (Figura 12).



Fig. 12. Colocación de sensidiscos con sus respectivas concentraciones del extracto de Flor de Sospó: 1 (100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 2 (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 3 (400 $\mu\text{g}/\text{m}$), 4 (600 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 5 (800 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 6 (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$), control (+) Voriconazol y control (-) agua

Una vez realizado este proceso se dejó incubando el hongo a 35° durante 48 horas, posteriormente se hizo lectura del halo de inhibición midiendo el radio de cada zona inhibida con un vernier digital Mitutoyo Modelo CD4-CSX 4 haciendo clasificación de susceptible, medio o resistente dependiendo los resultados obtenidos.

RESULTADOS

Los resultados demostraron que la CMI del extracto acuoso de flor de sospó (*Pseudobombax ellipticum*) sobre *Aspergillus niger* fue de 100 µg/mL con un halo de inhibición promedio de .52mm, mientras que para 200 y 400 µg/mL es 47mm y 42mm respectivamente demostrando una leve variación de cambio en eficacia de inhibición, las siguientes concentraciones de 600, 800 y 1000 µg/mL obtuvieron resultados más elevados.

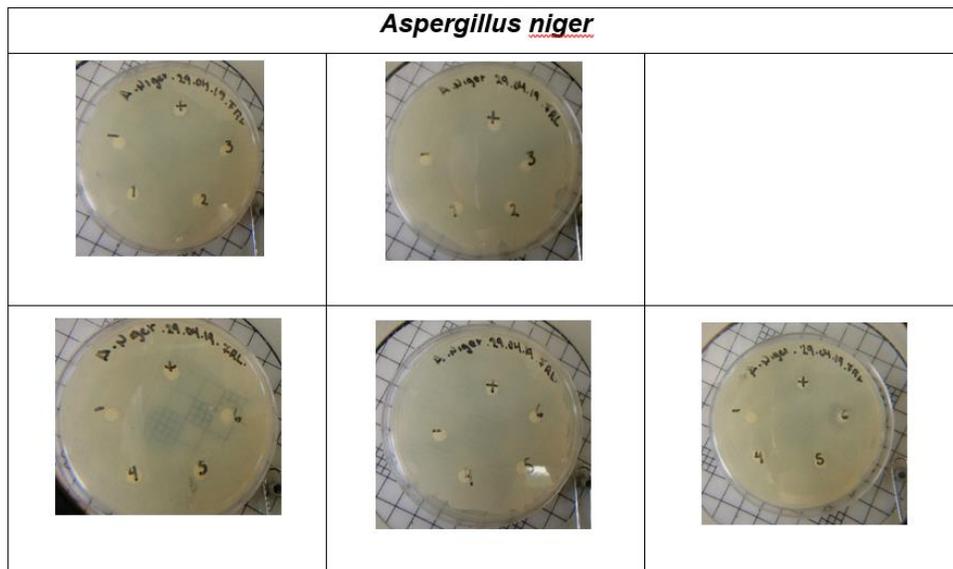


Fig. 13. Resultado de placas de *Aspergillus niger*.

	<i>Aspergillus niger</i>			
	1	2	3	PROMEDIO
Control positivo	1.7	1.2	0	0.96
Control negativo	0	0	0	0
100 µg/ml	1.11	0.45	0	0.52
200 µg/ml	1.16	0.26	0	0.47
400 µg/ml	0.4	0.88	0	0.42
Control positivo	2.1	1.8	1.3	1.73
Control negativo	0	0	0	0
600 µg/ml	1.45	0.95	0.62	1
800 µg/ml	1.57	1.30	0.82	1.23
1000 µg/ml	2.99	5.4	0.74	3.04

Tabla 1. Tamaño de halo de inhibición de *Aspergillus niger* y promedio

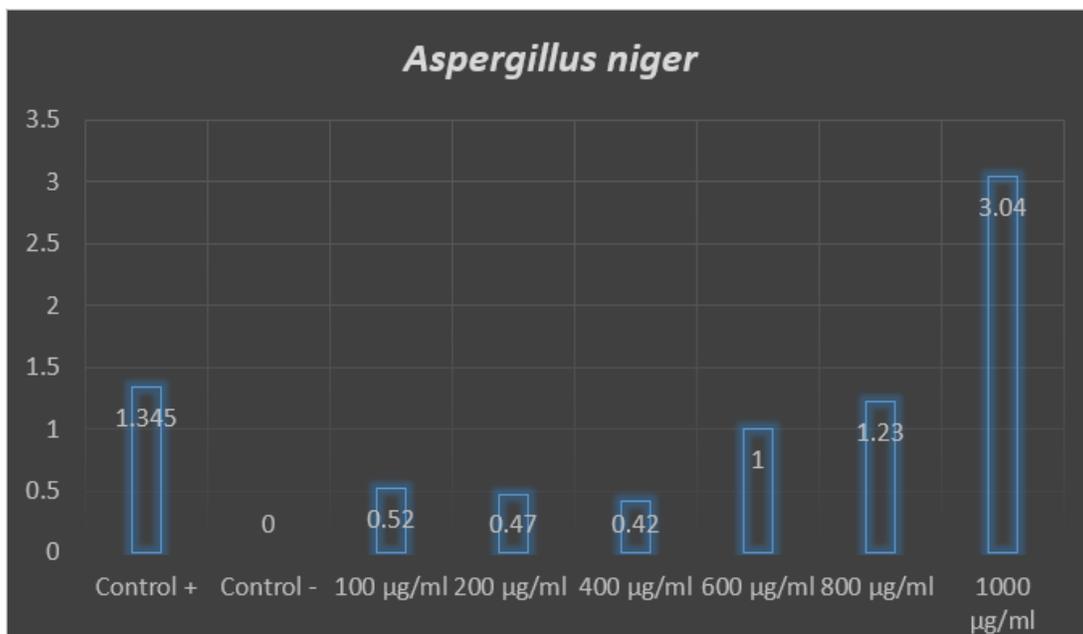


Figura 14. Gráfica de comparación de concentración de extractos para *Aspergillus niger*.

Para *Aspergillus flavus* no se obtuvo resultado positivo en ninguna de las concentraciones del extracto de *Pseudobombax ellipticum* a excepción del control positivo mostrando un halo de inhibición promedio de .825mm (Figura 16).

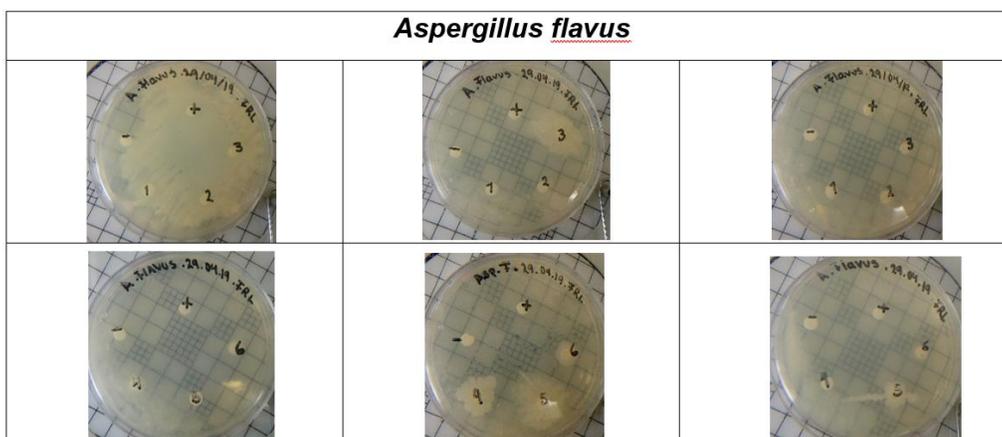


Fig. 15. Resultado de placas por triplicado de *Aspergillus flavus*.

	<i>Aspergillus flavus</i>			
	1	2	3	PROMEDIO
Control positivo	0	3.1	0.45	1.18
Control negativo	0	0	0	0
100 µg/ml	0	0	0	0
200 µg/ml	0	0	0	0
400 µg/ml	0	0	0	0
Control positivo	0.63	0.32	0.48	0.47
Control negativo	0	0	0	0
600 µg/ml	0	0	0	0
800 µg/ml	0	0	0	0
1000 µg/ml	0	0	0	0

Tabla 2. Tamaño de halo de inhibición de *Aspergillus flavus* y promedio.

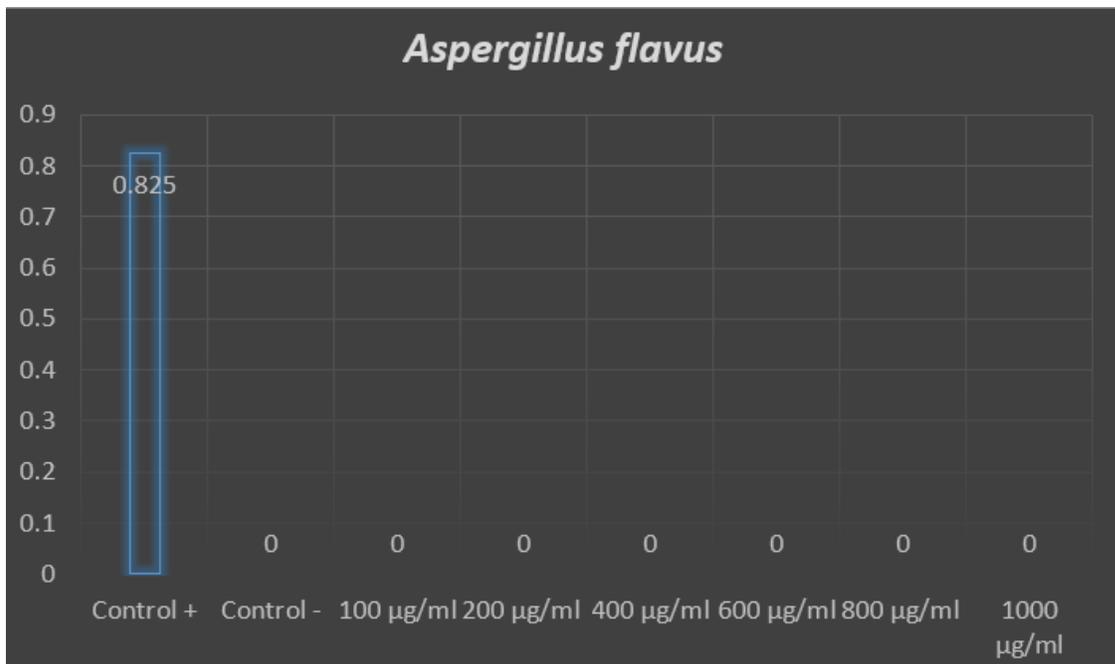


Figura 16. Gráfica de comparación de concentración de extractos para *Aspergillus flavus*.

Aspergillus fumigatus demostró que el extracto de *Pseudobombax ellipticum* obtuvo de promedio un halo de .79mm en una CMI de 200 µg/mL, mientras que para las demás concentraciones sí hay una variación y los resultados son más bajos, ahora dicho evento demostró que Voriconazol obtuvo un promedio de halo de 33.25mm, siendo así el más elevado.

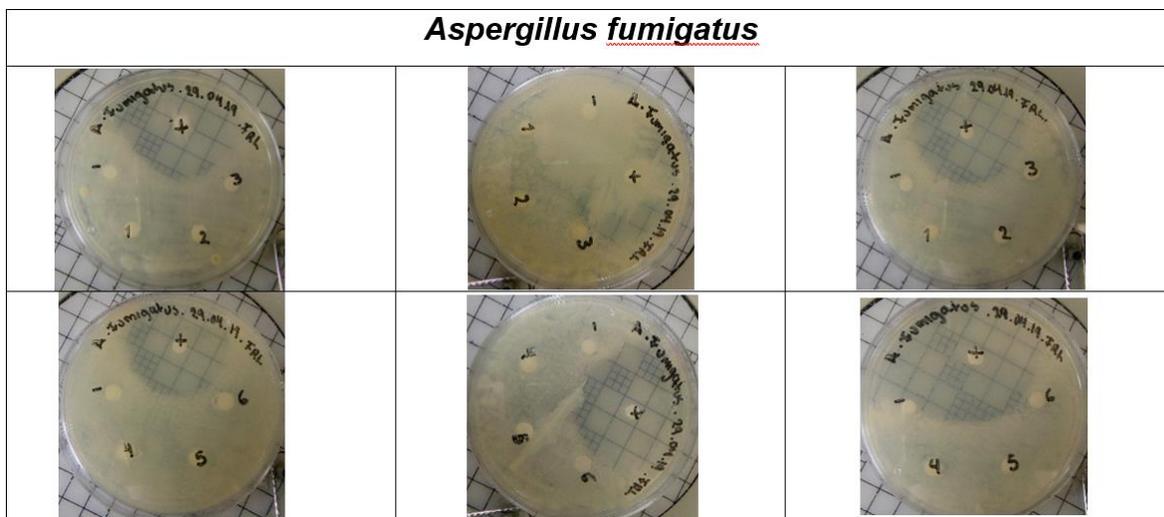


Figura 17. Resultado de placas por triplicado de *Aspergillus fumigatus*

	<i>Aspergillus fumigatus</i>			
	1	2	3	PROMEDIO
Control positivo	32.2	32.6	31.9	32.2
Control negativo	0	0	0	0
100 µg/ml	1.24	0.46	0.39	0.69
200 µg/ml	0.67	1.18	0.52	0.79
400 µg/ml	0.47	0	0.63	0.36
Control positivo	36.7	32.3	34.1	34.3
Control negativo	0	0	0	0
600 µg/ml	1.05	0	0.51	0.52
800 µg/ml	0.42	0	0.63	0.35
1000 µg/ml	0.36	0.41	0	0.25

Tabla 3. Tamaño de halo de inhibición de *Aspergillus fumigatus* y promedio

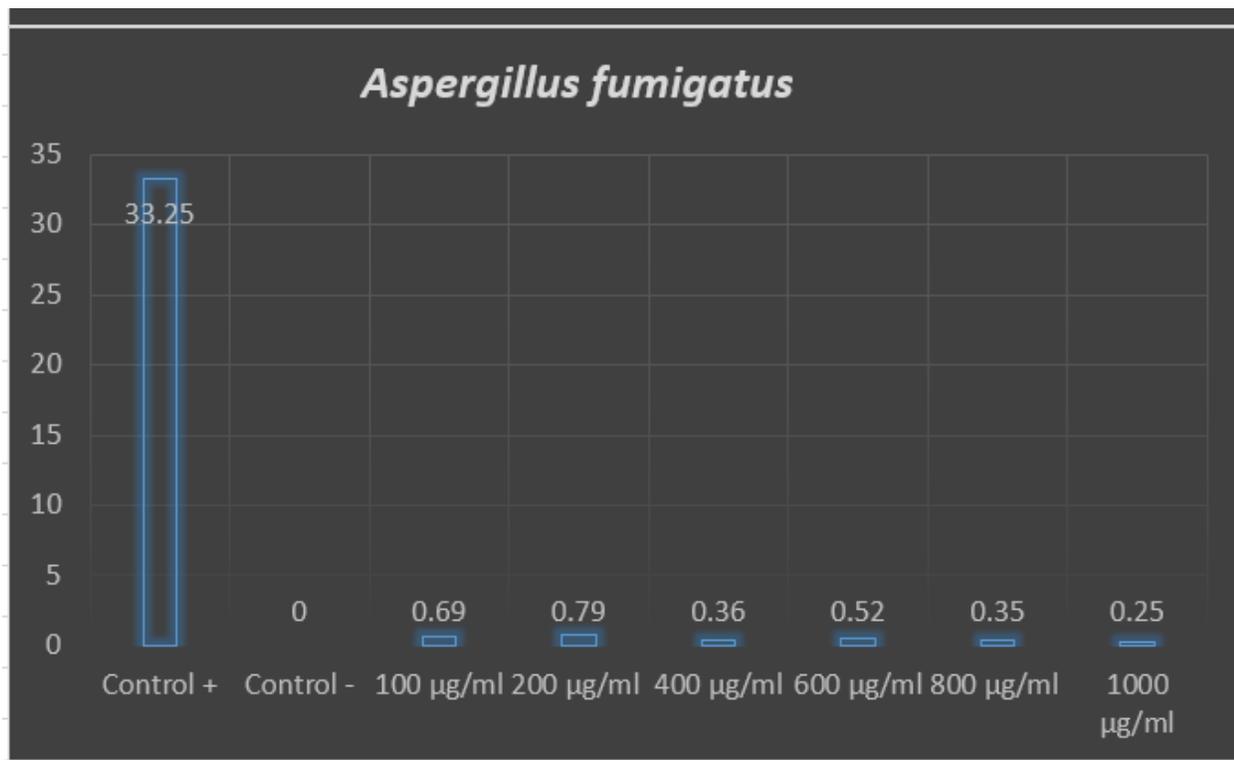


Figura 18. Gráfica de comparación de concentración de extractos para *Aspergillus fumigatus*.

Candida albicans obtuvo resultado de inhibición en una CMI de 200 µg/mL del extracto de *Pseudobombax ellipticum* con un halo promedio de .74mm (Figura 20), mientras que las demás concentraciones sus promedios variaron entre los .39mm hasta los .59mm, para el caso del control positivo su halo de inhibición fue más elevado ya que obtuvo en promedio 3.86mm.

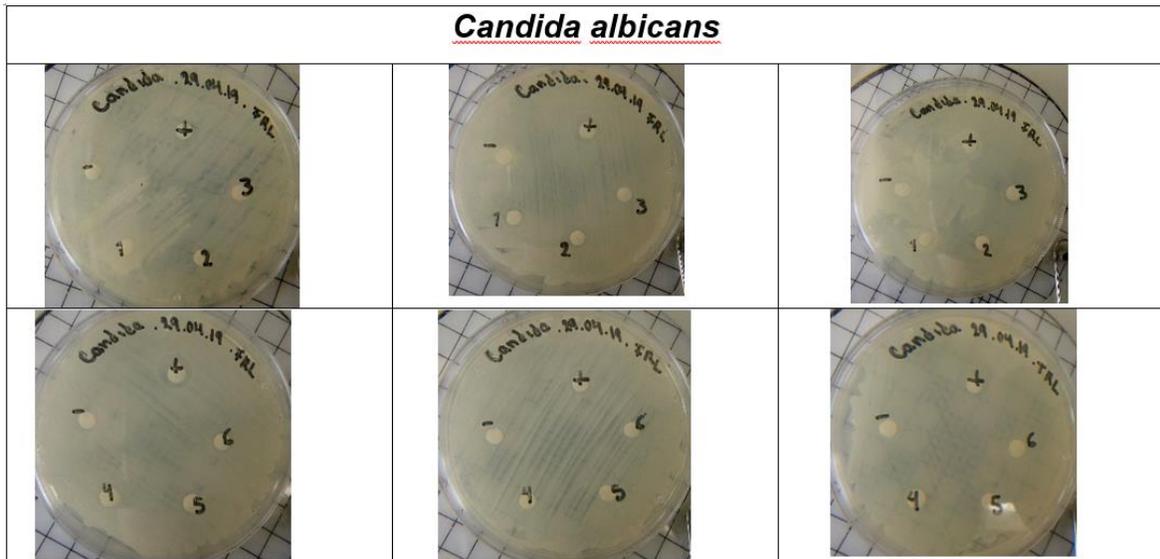


Figura 19. Resultado de placas por triplicado de *Candida albicans*.

	<i>Candida albicans</i>			
	1	2	3	PROMEDIO
Control positivo	3.5	3.8	4.3	3.86
Control negativo	0	0	0	0
100 µg/ml	1.16	0.38	0.25	0.596
200 µg/ml	0.63	0.39	1.14	0.74
400 µg/ml	0.55	0.31	0.64	0.5
Control positivo	3.2	4.1	3.5	3.6
Control negativo	0	0	0	0
600 µg/ml	0.37	0.48	0.32	0.39
800 µg/ml	0.63	0.4	0.6	0.54
1000 µg/ml	0.44	0.71	0.32	0.49

Tabla 4. Tamaño de halo de inhibición de *Candida albicans* y promedio.

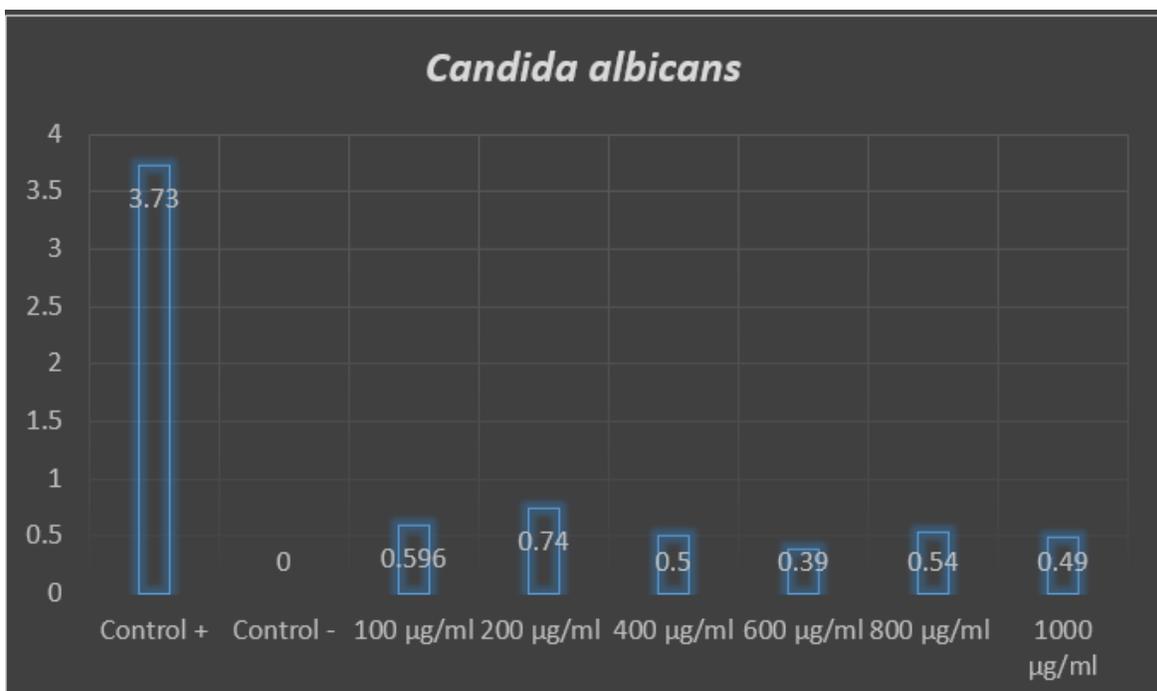


Figura 20. Gráfica de comparación de concentración de extractos para *Candida albicans*.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

****Aspergillus niger*:** Para esta cepa los resultados nos demuestran que la CMI es de 100 $\mu\text{g/ml}$ obteniendo un promedio de halo de inhibición de .52mm que a su vez si es comparado con el control positivo Voriconazol se considera bajo ya que este presenta un promedio más alto de 1.345mm, y al comparar con la investigación de Silvana M. y col. analizaron en 2017 un extracto hidroetanólico de hojas de *Passiflora edulis* (maracuyá) con método de prueba de sensibilidad al extracto por difusión en discos de papel de filtro (PSEDDi) donde no se observaron efectos inhibitorios ante la misma cepa, lo que demuestra que *Aspergillus niger* tiene un nivel media- alto de resistencia.

***Aspergillus flavus*:** Para *Aspergillus flavus* los resultados no fueron satisfactorios ya que el extracto a diferentes concentraciones no fue positivo para ninguno de los casos, se considera que esta cepa tiene un alto nivel de resistencia, inclusive al hacer observación del control positivo se muestra débil con un halo de .825mm pero en 2011 Moreno- Limón, González Solís y col. Determinan la actividad fungicida de extractos alcohólicos de gobernadora (*Larrea tridentata* L.) sobre el crecimiento de *Aspergillus flavus* y *Penicillium* sp, los resultados arrojados permitieron detectar los efectos antifúngicos que presentaron los extractos; destacando especialmente los etanólicos y metanólicos, ya que con ellos se lograron inhibiciones de hasta el 100% en ambas cepas, mostrando concentraciones mínimas inhibitorias que van de 3 a 7 mg/mL.

***Aspergillus fumigatus*:** Los resultados obtenidos para *Aspergillus fumigatus* fueron los más prometedores, puesto que el halo promedio obtenido fue de .79mm en una CMI de 200 $\mu\text{g/mL}$, a comparación con los extractos restantes (Figura 17), sin embargo, Voriconazol tuvo un halo de 33.25mm, demostrando que es más efectivo, ahora bien, si tomamos en cuenta la actividad antimicótica y citotóxica de aceites esenciales de plantas de la familia *Asteraceae* realizada por Bibiana Z. y col. En Colombia (2010) obtuvieron que los aceites de las plantas *Achyrocline alata* y *Baccharis latifolia* fueron los únicos activos contra *A. fumigatus* (media geométrica de la concentración mínima inhibitoria=78,7 y 157,4 $\mu\text{g/ml}$,

respectivamente), lo que demuestra que nuestro extracto es una optativa para la inhibición de este hongo.

Candida albicans : *Candida albicans* obtuvo su mejor resultado de inhibición en una CMI de 200 µg/mL del extracto de *Pseudobombac ellipticum* con un halo promedio de .74mm, pero al comparar este resultado con el halo de inhibición de Voriconazol este se considera bajo ya que presenta un promedio de 3.86mm; Si consideramos los dos resultados obtenidos, estos son un rango bajo si tomamos en cuenta el estudio realizado por Saravia León y col. En la universidad de San Martín de Porres (2012) el extracto etanólico de *Schinus molle* utilizando las hojas de la planta con 25 µg/ml presentó un halo de inhibición de ≥ 20 mm mostrando así actividad antifúngica frente a cepas clínicas de *Candida albicans*.

CONCLUSIONES

Se demuestra que el extracto de *Pseudobombax ellipticum* entre las concentraciones de 100 µg/mL y 200 µg/mL tienen un efecto inhibitorio sobre las cepas a excepción de *Aspergillus flavus* donde no se obtuvo ningún resultado de inhibición.

Al comparar el extracto de *Pseudobombax ellipticum* con Voriconazol (Control +) se determina que, a pesar de obtener en la mayoría de los resultados promedios bajos, no deja de ser una optativa ya que se cumplió el objetivo de verificar el efecto antimicótico del extracto hacia las cepas.

Una vez realizada la investigación y haciendo observación de los resultados obtenidos se hace referencia con la investigación de Torrentera N. (2019) donde demuestra mejores resultados utilizando la misma planta *Pseudobombax ellipticum* empleando como solvente etanol sobre las mismas cepas utilizadas para dicho evento a lo que se concluye que efectivamente el extracto de esta especie es un candidato para anti fúngico.

RECOMENDACIONES

Con los resultados obtenidos por parte de las cuatro cepas puestas a prueba se recomienda el uso de concentraciones mayores para re evaluar la eficacia de *Pseudobombax ellipticum* ya que de esta manera exista la probabilidad de obtener mejores resultados, al igual que es necesario determinar qué propiedades del extracto son las que provocan el efecto inhibitorio de flor de sospó (*Pseudobombax ellipticum*), este se puede realizar con un análisis cromatográfico y espectrometría de masas.

REFERENCIAS

1. -Rejón Orantes J.C., Perdomo Suárez D.P., Rejón- Rodríguez A, Hernández Hernández S, García Liévano O.E, López Rodríguez D, López de la Morab; (2013). "Aqueous root extracts from *Mimosa albida* Humb. & Bonpl. Ex Willd display antinociceptive activity in Mice" *Journal of Ethnopharmacology*.
2. -Rejón Orantes J.C., Hernández Macías J. W., Grajales Morales A. C., Jiménez García N., Coutiño Ochoa S. S., Cañas Avalos A., ... Pérez de la Mora M. (2016), "Antinociceptive effect of aqueous extracts from the bark of *Croton guatemalensis* Lott in mice" *Pharmaceutical Sciences*.
3. - Ruiz-Terán, F., Medrano-Martínez, A., & Navarro-Ocaña, A. (2008). Antioxidant and free radical scavenging activities of plant extracts used in traditional medicine in Mexico. *African Journal of Biotechnology*, 7(12).
4. -Torretera N. (2019). Evaluación del efecto antimicótico del extracto de hoja de flor de sospó (*Pseudobombax ellipticum*) sobre los hongos: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans*.
5. - (Masaquiza Jerez, I. M. (2018). Evaluación de la actividad antimicrobiana y antioxidante de antocianinas microencapsuladas de maíz morado (*Zea mays* L.), papa morada (*Solanum Tuberosum* L.) y mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) (Bachelor's thesis, Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Carrera de Ingeniería en Alimentos.)
6. - Arnhold Silvana M., Rodríguez Lidia Sabina, Horianski Marta A., Jerke Gladis. (2017) Evaluación de la actividad antifúngica de extractos hidroetanólicos de hojas de *Passiflora edulis* Sims (Passifloraceae). *Farmacología - Actividad Biológica*.

7. - Johana Méndez., Marco L. Herrera. (2001) Métodos de susceptibilidad anti fúngica. Revisión Metodológica Vol.36, n. 1-2.
8. - Xocoyotzin Toledo M. (2018) Antocianinas y fotosíntesis durante el desarrollo foliar de *Pseudobombax ellipticum* (Kunth) Dugand". Instituto de ciencias biológicas.
9. - Orantes García C. (2013) "Aprovechamiento del recurso maderable tropical nativo en la comunidad de Emilio Rabasa, reserva de la biosfera Selva el Ocote, Chiapas, México". Madera bosques vol.19 no.3 Xalapa sep./nov.
- 10.- I. González, (2010) "Rev Cubana Med Gen Integr" v.26 n.2 Ciudad de La Habana.
- 11.- K. Chilán y S. Chalén, (2019) "Estudio comparativo de la actividad antimicótica de los extractos de *Chenopodium quínoa* y moringa oleífera en cepas de *Candida albicans*", GUAYAQUIL-ECUADOR.
- 12.- Marisela Gil, (2018) "*Aspergillus flavus*: características, morfología, enfermedades", Universidad de Carabobo, Venezuela.
13. - Cartaya, O.; Reynaldo, Inés, (2001) "Flavonoides: Características químicas y aplicaciones", Cultivos tropicales, Volumen 22, num. 2, pp. 5-14.
14. - Myriam López (2000). El hongo escurridizo En España, la tasa de infecciones hospitalarias por el microorganismo oportunista "Aspergillus" es igual o menor que otros países europeos. 14/08/20, de SALUD Sitio web: <https://www.elmundo.es/salud/1999/328/02217.html>.
15. - Espinel-Ingroff A., Kerkering T., Goldson P. & Shadomy S.(1999) Comparison study of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility. J. Clin. Microbiol. 29:1089.

16. - Ángel Alan Jiménez. (2017). Medicina Tradicional. 14/08/20, de CONAMED, Sitioweb: http://www.conamed.gob.mx/gobmx/boletin/pdf/boletin_13/medicina_tradicional.pdf
17. - M.G. Netea, N.A. Gow, C.A. Munro, S. Bates, C. Collins, G. Ferwerda, et al. (2006) Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors *J. Clin Invest.*, 116 (6) 1642-50.
18. - F. Ono, S. (2009) Yasumoto Genital candidiasis *Nihon Rinsho.*, 67 (1) 157-61
19. -S.R. Rivera, P.R. Flores, A.M. Arriaga (2006) Identificación de especies de *Candida* causantes de vaginitis en la población mexicana. *Enferm Infecc Microbiol Clin.*, 24 (10) 634-6.
20. - Germán Pardi. (2002). Algunas Consideraciones Sobre *Candida Albicans* Como Agente Etiológico De Candidiasis Bucal. 15/08/20, de *Odontológica Venezolana* Sitio web: https://www.actaodontologica.com/ediciones/2002/1/algunas_consideraciones_candida_albicans.asp.
21. - Rojas, Jhon J. (2005). Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales. 15/08/20, de *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* Sitio web: <https://www.redalyc.org/pdf/856/85640204.pdf>.
22. - Luis Alcalá. (2008). *Aspergillus* y aspergilosis. 15/08/20, de *SEIMC* Sitio web: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/micologia/aspergillus.pdf>.
23. - K.G. Juárez. (2019). Efecto de extractos crudos de ajo (*Allium sativum*) sobre el desarrollo in vitro de *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus niger*. 15/08/20, de *POLIBOTANICA* Sitio web: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1405-27682019000100099&script=sci_arttext.

24. - Londoño Orozco. (2008). Estudio de la actividad antifúngica de un extracto de propóleo de la abeja *Apis mellifera* proveniente del estado de México. 15/08/20, de Tecnología de Marcha Sitio web: <file:///C:/DialnetEstudioDeLaActividadAntifungicaDeUnExtractoDePropo-4835689.pdf>.
25. - Reyes-Ocampo, I.; González-Brambila, M.; López-Isunza, F. (2013) Un análisis del metabolismo de *Aspergillus niger* creciendo sobre un sustrato sólido. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 12(1): 41-56.
26. - Scott E Baker. (2006). Genómica de *Aspergillus niger*. pasado, presente y futuro. 16/08/19, de Medical Mycology Sitio web: https://academic.oup.com/mmy/article/44/Supplement_1/S17/1746935

