EVALUACIÓN IN VITRO DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA Y CITOTÓXICA DEL EUGENOL Y SUS DERIVADOS SEMISINTÉTICOS FRENTE A *Trichophyton spp*

YOHANA RIVERA RINCON

UNIVERSIDAD DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
MAESTRÍA EN INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS
BUCARAMANGA
2018

EVALUACIÓN IN VITRO DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA Y CITOTÓXICA DEL EUGENOL Y SUS DERIVADOS SEMISINTÉTICOS FRENTE A *Trichophyton spp*

YOHANA RIVERA RINCON
16861005

Trabajo de grado presentado como parte de los requisitos para la obtención del título de magister en investigación de enfermedades infecciosas.

SANDRA MILENA LEAL PINTO, PhD.
TUTORA

UNIVERSIDAD DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
MAESTRÍA EN INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS
BUCARAMANGA
2018

Universidad de Santander UDES	VICERRECTORÍA DE POSGRADOS	
	ACTA SUSTENTACIÓN TESIS	Fecha: 26/05/2018
	POS-FT-012-UDES	Versión: 06

ACTA EVALUACIÓN DE TRABAJOS DE GRADO

En Bucaramanga, a los veintiséis (26) días del mes de Junio del 2018, en cumplimiento de los requisitos exigidos para la culminación del trabajo de grado, se llevó a cabo la evaluación de:

RESUMEN DEL TRABAJO DE GRADO

NOMBRE DEL TRABAJO DE GRADO

Evaluación *in vitro* de la actividad antifúngica y citotóxica del eugenol y sus derivados semisintéticos frente a *Trichophyton spp.*

NOMBRES ESTUDIANTE	APELLIDOS ESTUDIANTE	CÓDIGO ESUDIANTE
Yohana Judith	Rivera Rincón	16861005

	NOMBRES Y APELLIDOS	C.C. NO.
DIRECTOR	Sandra Milena Leal Pinto	63.452.804 de Bucaramanga
CALIFICADOR 1	Inés Hernandez Celi	1.098.658.564 de Bucaramanga
CALIFICADOR 2	Claudia Johanna Sandoval Lozano	37.558.216 de Bucaramanga

CONCEPTO EVALUADORES

Aprobado.

CALIFICACIÓN 3.5 Tres cinco

EN CONSTNCIA FIRMAN

DIRECTOR. Sandra Milena Leal Pinto

Inés Hernández Celi

CALIFICADOR 1. Inés Hernandez Celi

Claudia Johanna Sandoval

CALIFICADOR 2. Claudia Johanna Sandoval Lozano

ESTUDIANTE. Yohana Judith Rivera Rincón

Este trabajo está dedicado a mi amado esposo Carlos Andres
Por tu gran amor, porque me has dado todo de tu ser. Gracias Nene.

A Dios, por darme la oportunidad de cumplir mi mayor reto y protegerme en todos los viajes que realice, por guardar a mis hijos mientras no estaba en casa.

A Mi madre Susana que cuido de mis hijos y siempre me dio su voz de aliento. Porque desde pequeña supo que esta era mi carrera e hizo su mayor esfuerzo para que sus sueños estuvieran reflejados en mí.

A mi amada hija Camila, mi cariñoso Thomas, mi alegría Mariapaz, mi mayor regalo Samuel. Este es un ejemplo de perseverancia, esfuerzo y fe, que hoy su madre les entrega porque nada es fácil cuando la prioridad son tus hijos hoy les digo que son nuestras decisiones las que muestran lo que podemos llegar a ser. No es el más fuerte ni el más inteligente el que sobrevive, sino el más capaz.

A mí querida Tía Joséfa que me esperaba todas las noches cuando llegaba tan cansada de las clases. Mi querido padre, mi maravillosa suegra Aminta, mi hermanita Sandra por apoyarme siempre, esto también se lo debo a ustedes.

A mis sobrinos, Dayana, Sebastián, Santiago, Lina, Anita, Andrés para que vean en mí un ejemplo a seguir.

Todos aquellos familiares y amigos que siempre me alentaron .Gracias

AGRADECIMIENTOS

No tengo palabras más que de agradecimiento para mi querida tutora la Dra. Sandra Leal Pinto quien pudo entenderme y tener la paciencia de enseñarme y guiarme en este trabajo. Gracias por inculcarme el amor hacia los hongos. Hoy entregas una persona más disciplinada y constante, es lo que siempre recibí de ti. Dios te bendiga siempre.

A la doctora Liliana Torcoroma quien estuvo dándome voces de aliento y perseverancia.

A la profesora Leonor Yamile Vargas de la Universidad Santo Tomás por la obtención y caracterización de los derivados semisintéticos del eugenol.

A María Angélica Álvarez, estudiante del programa de Bacteriología por su colaboración y amistad brindada.

Al Programa de bacteriología y laboratorio clínico por el préstamo de los laboratorios y cepas de referencia para la realización del proyecto

Al personal encargado de los laboratorios del programa de bacteriología y laboratorio clínico por su disponibilidad en especial a Julian, Marta, Esmeralda, Andrea, Jorge.

Al personal del laboratorio de biología celular del programa de maestría en investigación de enfermedades infecciosas.

A mis queridos profesores Rocío Romero, Diana Bohada, Lucy Vargas, Daisy Carvajal, en especial a Reinaldo Gutiérrez quien desde siempre me ha inculcado la importancia de seguir estudiando e investigando.

A mis amigos que siempre estuvieron cuando los necesitaba Joelito, Piedad, Junior, Sebas, Sergio, Deiby, Andres, Laurita.

A mis compañeros de maestría: Rahitza, Laura, Wilmer, Johana, Kate, Rolando, Frank que estuvimos siempre unidos como una familia.

CONTENIDO

Pág.

1. INTRODUCCIÓN 1
1.1 MICOSIS CUTÁNEAS: GENERALIDADES 1
1.2 DERMATOFITOSIS 1
1.2.1 Aspectos epidemiológicos, transmisión y factores de riesgo 1
1.2.3 Etiología. 2
1.2.4 Patogenia 7
1.2.5 Manifestaciones clínicas 8
1.2.6 Diagnóstico 15
1.2.7 Tratamiento 18
1.2.8 Compuestos naturales como fuente de sustratos bioactivos 20

2. OBJETIVOS 25
2.1 OBJETIVO GENERAL 25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 25

3. MATERIALES Y MÉTODOS 26
3.1 MICROORGANISMOS Y CÉLULAS DE MAMÍFERO 26
3.2 COMPUESTOS SEMISINTÉTICOS DEL EUGENOL. 26
3.3 CITOTOXICIDAD EN CÉLULAS DE MAMÍFERO. 28
3.4 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) . 29
3.5 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN FUNGICIDA MÍNIMA. 29
3.6 DETERMINACIÓN DE LA INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO MICELIAL. 29
3.7 ANÁLISIS DE RESULTADOS 31

4. RESULTADOS 32

5. DISCUSIÓN 49

6. CONCLUSIONES 55

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 56

ANEXOS 64

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Colonias en medio PDA de 8 días de cultivo y estructuras fúngicas en azul de lactofenol de hongos dermatofitos del género Trichophyton. (A-D) T. mentagrophytes; (B,E) T. rubrum ; (C,F) T. tonsurans 5
Figura 2. Colonias en medio PDA de 8 días de cultivo y estructuras fúngicas en azul de lactofenol de dermatofitos del género Microsporum. (A, C) M. canis; (B,D) M. gypseum 6
Figura 3. Colonias en medio PDA de 8 días de cultivo y estructura fúngicas en azul de lactofenol de dermatofitos del género Epidermophyton floccosum. (A). Cultivo de Epidermophyton floccosum; (B) Estructuras fúngicas en azul de lactofenol de Epidermophyton floccosum.....7
Figura 4. Presentación clínica de las tinea capitis y forma de parasitación (A-D) Lesiones clínicas. (E-H) Formas de parasitación del cabello. (A-E.) Placa gris: Semialopécica, seca, ectothrix M. canis B-F. Puntos negros: Endotrix, quiebre a ras. T. tonsurans C-G. Favus: costras levantadas, amarillas, malolientes, alopecia definitiva. Ectótrix T. schoenleinii D-H. Kerion o Querion: inflamación, supuración, ectótrix M. gypseum, T. mentagrophytes, M. canis.....10
Figura 5. Cuadros clínicos de tiña corporis. A: Estrato corneo de la epidermis. B: Pruriginosas. C: Anulares, bordes infiltrados y definidos, secas descamativas, eritematosas y D: Múltiples, mapiforme. 11
Figura 6. Tipos de onicomicosis. A: Onicomicosis subungueal distal .B: Onicomicosis subungueal lateral. C: Onicomicosis subungueal proximal. D: Onicomicosis distrófica total. E: Onicomicosis blanca superficial. 12
Figura 7. Formas clínicas de Tinea pedís. (A) Intertriginosa: (Pie de atleta); (B) Hiperqueratótica.; (C) Vesicular subaguda; (D) Aguda ulcerativa. 13
Figura 8. Tiña de las manos. Lesión presentada en mano. 14
Figura 9. Tiña de la ingle. Lesión presentada en ingle.....15
Figura 10. Tiña de la barba y bigote. Lesion observada en cara. A.....15
Figura 11. Árbol del clavo o clavero.....21
Figura 12. Clavo de olor. 21
Figura 13. Estructura Química del Eugenol. (4-alil-2metoxifenol) Adaptada de Olivoto, 2014.....22
Figura 14. Subcultivos de cepas. (A) Subcultivos de cepas crecido a los 12 días. (B- C) Cortes discoidales (5mm). (D) ilustración del método de sustrato impregnado.....30
Figura 15. Inhibición radial del micelio de T. mentagrophytes tratado con terbinafina.....36
Figura 16. Inhibición radial del micelio de T. rubrum tratado con terbinafina.....40

Figura 17. Inhibición radial del micelio de *T. tounsurans* tratado con terbinafina...43
Figura 18. Resultados de la Inhibición radial del micelio: posible efecto fungiestático.....44
Figura 19. Efecto inhibitorio de los derivados 3 y 8 sobre la pigmentación de *T. rubrum* luego de 10 días de tratamiento. A. derivado 3; B: derivado 8. 46
Figura 20. Resultados del Efecto citotóxico de los compuestos en estudio frente a células Vero. 48
Figura 21. Efectos del Eugenol frente a microorganismos.....52

LISTA DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Clasificación de los dermatofitos según su nicho ecológico.....3
Tabla 2. Clasificación de los antifùngico por su estructura. 18
Tabla 3. Taxonomía de *Syzygium aromaticum* 21
Tabla 4. Estructuras Químicas de los compuestos semisintèticos derivados del eugenol donados por la profesora Leonor Yamile Vargas, ...27
Tabla 4. Efecto fungiestático (CMI) y fungicida (CFM) de derivados semisintéticos del eugenol frente a hongos dermatofitos. Los resultados expresados en µg/mL fueron obtenidos a partir de tres experimentos independientes realizados por triplicado. 33
Tabla 5. Inhibición del crecimiento radial del micelio de *T. mentagrophytes* luego del tratamiento con los derivados semisintéticos del eugenol. Los resultados expresados en porcentajes de inhibición ± DS fueron obtenidos a partir de tres experimentos independientes realizados por triplicado. NI: No inhibe. 34
Tabla 6. Inhibición del crecimiento radial del micelio de *T. rubrum* luego del tratamiento con los derivados semisintéticos del eugenol. Los resultados expresados en porcentajes de inhibición ± DS fueron obtenidos a partir de tres experimentos independientes. 37
Tabla 7. Inhibición del crecimiento radial del micelio de *T. tonsurans* luego del tratamiento con los derivados semisintéticos del eugenol. Los resultados expresados en porcentajes de inhibición ± DS fueron obtenidos a partir de tres experimentos independientes realizados por triplicado. NI: No inhibe. 40
Tabla 8. Citotoxicidad frente a células Vero de compuestos en estudio. ND: no determinado, hace referencia a la máxima concentración evaluada de 300 ug/mL. 47

LISTA DE ANEXOS

Pág.

ANEXO A Divulgación de resultados. 64
ANEXO B. Registro fotográfico de experimentos.....66

LISTA DE ABREVIATURAS

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria
CFM: Concentración Fungicida Mínima
CLSI: Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio
CC_{50}: Concentración citotóxica 50
CC_{90}: Concentración citotóxica 90
IDR: Intradermorreacción cutánea
AE: Aceite esencial
DS: Desviación Estándar
ND: No determinado
DMSO: Dimetil sulfòxido
APD: Agar papa dextrosa
KOH: Hidróxido de potasio
UFC: Unidades formadoras de colonias

RESUMEN

TITULO: Evaluación *in vitro* de la actividad antifúngica y citotóxica del eugenol y sus derivados semisintéticos frente a *Trichophyton spp.*

Autor: Yohana Rivera Rincón

Palabras claves: Dermatomicosis, Dermatofitosis, *Trichophyton,* Eugenol, Actividad antifúngica, Citotoxicidad.

Descripción: Los dermatofitos son hongos queratinofílicos que infecta tejidos como piel, pelo y uñas en el hombre y animales. El tratamiento se basa en terapias tópicas, sistémicas y/o combinadas con baja penetrabilidad, variada efectividad y efectos adversos que convierten en un reto la investigación de nuevas moléculas bioactivas.

El objetivo general fue evaluar la actividad antifúngica y citotóxica in vitro de los compuestos semisintéticos derivados del eugenol en hongos del genero Trichophyton.

La susceptibilidad antifúngica de doce derivados del eugenol fue evaluada frente: *Trichophyton mentagrophytes, Trichophyton rubrum y Trichophyton tonsurans*. La CMI se determinó por el método de microdilución establecidos por CLSI, subcultivos a partir de CMI, fueron incubados por 7 días a 30°C para determinar CFM. Complementariamente, la inhibición del crecimiento radial del micelio evaluada por la técnica de sustrato impregnado durante 20 días. Así mismo, la toxicidad *in vitro* en células Vero fue testada por un ensayo colorimétrico, usando la sal de tetrazolio MTT. Terbinafina usada como medicamento de referencia.

AE, eugenol y derivados 5,10,11 y 12 mostraron inhibir *T. mentagrophytes* CMI 62.5–500 µg/mL y CFM 125–500 µg/mL. Eugenol, derivados 3, 5 y 11 inhibieron *T. rubrum* CMI y CFM 125- 250 µg/mL. AE, eugenol, compuesto 11 y 12 inhibieron *T. tonsurans* con CMI y CFM 125-250 µg/mL. 100% de inhibición del crecimiento micelial de los tres dermatofitos fue observada luego de la exposición con 300ug/mL y 100 ug/mL de los derivados 3,5,7-12 y 3, 7-9,12, respectivamente. Baja toxicidad en células Vero fue observada (CC50 54.06-<300 ug/mL). Se presentan nuevas moléculas bioactivas con efecto antimicótico y bajo toxicidad *in vitro,* lo cual representa un avance en el proceso pre-clínico de desarrollo e investigación de nuevos agentes antifúngico.

ABSTRACT

Title: *In vitro* evaluation of the antifungal and cytotoxic activity of eugenol and its semisynthetic derivatives against *Trichophyton spp*

Author: Yohana Rivera Rincon

Keywords: Dermatomycosis, Dermatophytosis, *Trichophyton*, Eugenol, Antifungal activity, Cytotoxicity.

Description: Dermatophytes are keratinophilic fungi that infect tissues such as skin, hair and nails in humans and animals. The treatment is based on topical, systemic and / or combined therapies with low penetrability, varied effectiveness and adverse effects that make it a challenge to research new natural bioactive molecules.

The general objective was to evaluate the antifungal and cytotoxic activity in vitro of the semisynthetic compounds derived from eugenol in fungi of the genus *Trichophyton.*

The antifungal susceptibility of twelve eugenol derivatives was evaluated against: *Trichophyton mentagrophytes, Trichophyton rubrum and Trichophyton tonsurans*. The MIC was determined by the microdilution method established by CLSI, subcultures from MIC, were incubated for 7 days at 30 ° C to determine MFC. In addition, the inhibition of the radial growth of the mycelium was evaluated by the substrate technique impregnated for 20 days. Likewise, in vitro toxicity in Vero cells was tested by a colorimetric assay, using the MTT tetrazolium salt. Terbinafine used as reference drug. EO, eugenol and derivatives 5,10,11 and 12 showed inhibition of *T. mentagrophytes* MIC 62.5-500 µg / mL and MFC 125-500 µg/mL Eugenol, derivatives 3,5 and 11 inhibited *T. rubrum* MIC and MFC 125-250 µg/mL EO, eugenol, compound 11 and 12 inhibited *T. tonsurans* with MIC and MFC 125-250 µg/mL 100% inhibition of mycelial growth of the three dermatophytes was observed after exposure with 300ug/mL and 100 ug/mL of derivatives 3,5,7-12 and 3, 7-9,12, respectively. Low toxicity in Vero cells was observed (CC50 54.06- <300 ug/mL).

New bioactive molecules with antifungal effect and low in vitro toxicity are presented, which represents an advance in the pre-clinical process of development and research of new antifungal agents.

INTRODUCCIÓN

Las micosis superficiales son infecciones producidas por grupos diferentes de hongos (levaduras y hongos filamentosos) que invaden las estructuras queratinizadas, como estrato córneo de la piel, pelo y uñas principalmente (Larrondo & Angulo, 2001); Ballesté y Gezuele, 2003).

1.Generalidades

1.1 MICOSIS CUTÁNEAS

Dentro de estas micosis como en el caso de las levaduras (*Candida spp, Trichosporon spp* y *Malassezia globosa*), la infección se atribuye principalmente a fuentes endógenas que permiten la proliferación del hongo, posterior a alteraciones de la microbiota. Por su parte, la infección por hongos filamentosos (Dermatofitos*, Piedraia hortae, Hortaea werneckii, Scytaldium dimidiatum, Scopulariopsis brevicaulis, Oncychocola canadensis, Aspergillus spp, Fusarium spp, Alternaria spp, Acremonium spp, Curvularia spp, entre otros*) de deben a infecciones exógenas transmitidas por contacto directo de un animal o persona. (Díaz, 2006).

1.2 DERMATOFITOSIS

Las dermatofitosis son infecciones micóticas causadas por un grupo de hongos filamentosos llamados dermatofitos, cuyas manifestaciones clínicas son conocidas como tiñas tineas (Corell, 2006); (Gubelin & Parra, 2011)

1.2.1 Aspectos epidemiológicos, transmisión y factores de riesgo. Las dermatofitosis son cosmopolitan, se presentan en climas húmedos y cálidos y son consideradas las formas más frecuentes de infecciones en los humanos, estimándose que afectan un 20-25 % de la población mundial (Havlickova B, 2009). La incidencia de las diferentes formas de tiña y de las especies que las producen es muy variable en las diferentes partes del mundo. Adicionalmente, este tipo de infecciones no son de notificación obligatoria por el sector salud, por lo tanto, saber cuál es su incidencia real no es clara. (Padilla, 2003).

Sin embargo, al revisar el gasto de los antifúngico en general, se podría estimar una alta incidencia de estas micosis en la población. (Del Palacio y Cuétara 2002).

Las especies de dermatofitos varían según la zona geográfica, sin embargo, algunas como *Trichophyton schoenleinii y T. violace* tienen restricción en Europa, África y Oriente; *Microsporum ferrugineum* en Asia y Japón; *T. soudanense* en África; y *T. concentricum* en Islas del Pacífico, Lejano Oriente e India. (Borman, Campbell, & Fraser, 2007)

En Latinoamérica especialmente en México, *T. rubrum* con 71,2 % es la especie más prevalente causante de las tiñas, afectando principalmente las uñas (López-Martínez *et al*., 2010). En Guatemala, León y colaboradores identificaron que *M. canis* es el agente causal de las tiñas con el 82% de los casos siendo tiña capitis la más prevalente (León, 2017). En Colombia, un estudio descriptivo de corte retrospectivo realizado en 1645 pacientes con diagnóstico presuntivo de micosis superficiales demostró una frecuencia de *T. mentagrophytes* (10,4%), *Epidermophyton floccosum* (1,6%), *T. rubrum* (1,5%), *M. canis* (1,1%) y *M. gypseum* (0,6%) siendo tiña pedis la manifestación de mayor prevalencia (Mejia *et al.,* 2013).

La transmisión puede ocurrir de forma indirecta a través de fómites contaminados o por contacto directo con personas o animales. En pacientes inmunocomprometidos podrían desarrollar infecciones severas por este grupo de hongos (Arenas, 2002).Las condiciones sociales y económicas como falta de higiene, la ocupación en el caso de deportistas, militares, nadadores, choferes, entre otros, que permanecen largos periodos de tiempo con los pies húmedos o calzado cerrado, son factores que predisponen las dermatofitosis. (Bonifaz, 2015)

No existe diferencia en la presentación de la enfermedad relacionada con el sexo y raza, pero, algunas formas clínicas son específicas de algún tipo de dermatofito (Hainer, 2003).

1.2.3 Etiología. Los dermatofitos son un grupo de hongos con características taxonómicas, antigénicas, fisiológicas y patogénicas similares, pero se diferencia entre sí por sus propiedades enzimáticas y nutricionales además de las características macroscópicas y microscópicas (Guarro, 2012).

En 1892 Raymond Sabouraud clasificó los agentes que causan las dermatofitosis y los dividió en tres géneros basado en las características de los conidios, células reproducidas mediante una fase asexual: *Microsporum, Trichophyton y Epydermophyton.* Estos dermatofitos fueron clasificados según su forma de reproducción como ascomicetos dentro de la familia *Gymnoascaceae.* (Rubio *et al*., 1999)

En la actualidad se consideran 40 las especies causantes de esta infección, entre los más frecuentes: *T. rubrum, T. mentagrophytes, T. tonsurans, M. gypseum, M. canis* y *E. Floccosum* causantes de >90% de los casos, sin embargo, no todas las especies de dermatofitos se aíslan con frecuencia en el laboratorio. (Cabañes, 2001).

De acuerdo con su hábitat natural, los dermatofitos pueden dividirse en tres grupos ecológicos (ver Tabla 1). Antropofílicos, aquellos que parasitan el tejido humano; Zoofílicos, son dermatofitos que afectan a una gran variedad de aves y mamíferos que actúan como hospederos; y Geofílicos, grupo de dermatofitos que viven en el suelo. La mayoría de las especies no son patógenas (Bonifaz, 2010).

Tabla 1. Clasificación de los dermatofitos según su nicho ecológico

Antropofílicos	Zoofílicos	Geofílicos
Microsporum audouinii, T. rubrum, *T. schoenleinii,* *T. mentagrophytes var. interdigitale,* *T. tonsurans,* *T. violaceum*	*M. canis,* *T. mentagrophytes* *T. verrucosum* *T. equinum* *M. gallinae*	*M. gypseum* *M. fulvum* *M. nanum* *M. cookei* *M. gypseum* *T. racemosum* *T. terrestre*

Fuente: Modificada de Graser Y, El Fari,Presber, Sterry,Tietz. Identification of common dermatophytes (Trichophyton,Microsporum, Epidermophyton) using polymerase chain reactions. British Association of Dermatology. 1998. 138(4): 576-582 y Echevarría, Lourdes. Reseña histórica del descubrimiento de hongos dermatofitos del siglo 1 hasta trabajos actuales. scientific International journal. 2016. vol. 13

A continuación, se realizará una breve revisión del grupo de hongos dermatofitos causantes de las tiñas comprendidos dentro de los tres géneros: *Trichophyton, Microsporum y Epidermophyton.*

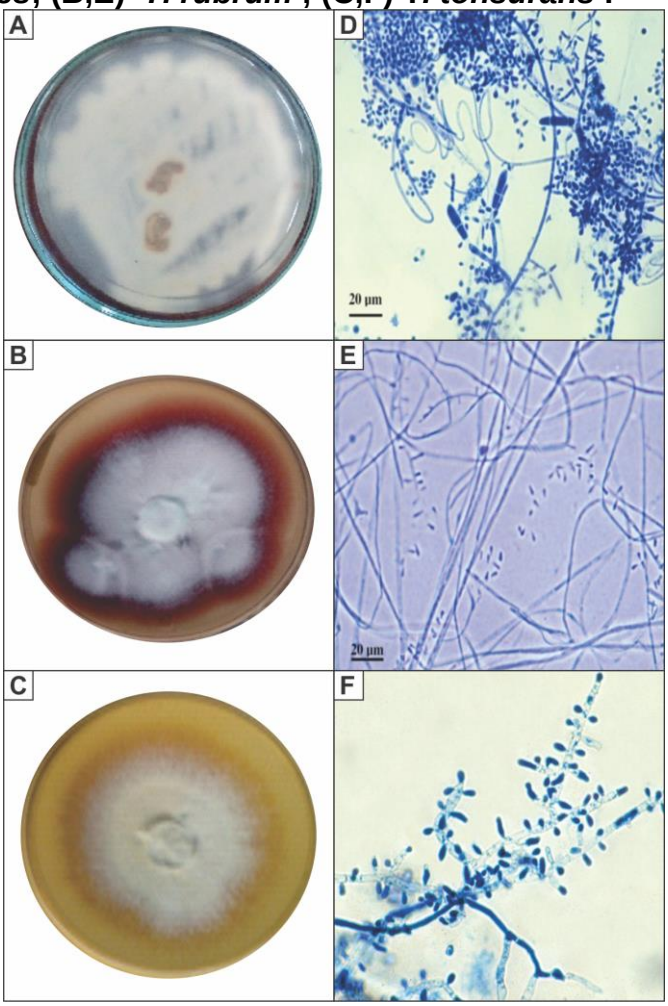
1.2.3.1 Género Trichophyton: En el género *Trichophyton* se encuentra las especies *T. rubrum, T. mentagrophytes, T. tonsurans, T. verrucosum, T. violaceum*

y T. schoenleinii, como principales causantes de dermatofitosis; se caracterizan por ser productoras de tricofiticias y parasitan la piel, uñas y pelo. El parasitismo de los pelos es “endothrix” y en las formas inflamatorias y supuradas (Kerion, sicosis) es endoectothrix”. Este género se puede identificar morfológicamente por la producción de microconidios o microaleuroconidios en abundancia. (Bonifaz, 2015)

Estos pueden ser redondeados formando grupos que asemejan racimos de uva inmaduros, presencia de hifas espiriladas (*T. mentagrophytes*); o Microconidios piriformes y estrechos, en forma de lágrima, aislados y dispuestos lateralmente en las hifas (*T. rubrum)* o microconidios de mayor tamaño, en forma de porra más o menos alargados, algunos en forma de globo (*T. tonsurans*) (Saenz, 2001)

Los macroconidios son escasos, lisos, en forma de clava y de pared delgada, pueden contener septos dependiendo de la especie. Se requiere de nutrientes (en medios de cultivos selectivos o enriquecidos) para poder incitar estas últimas formaciones. (Bonifaz, 2015). La figura 1 muestra las estructuras fúngicas y colonias características de los principales dermatofitos de este género.

Figura 1. Colonias en medio PDA de 8 días de cultivo y estructuras fúngicas en azul de lactofenol de hongos dermatofitos del género *Trichophyton*. (A-D) *T. mentagrophytes*; (B,E) *T. rubrum* ; (C,F) T*. tonsurans* .

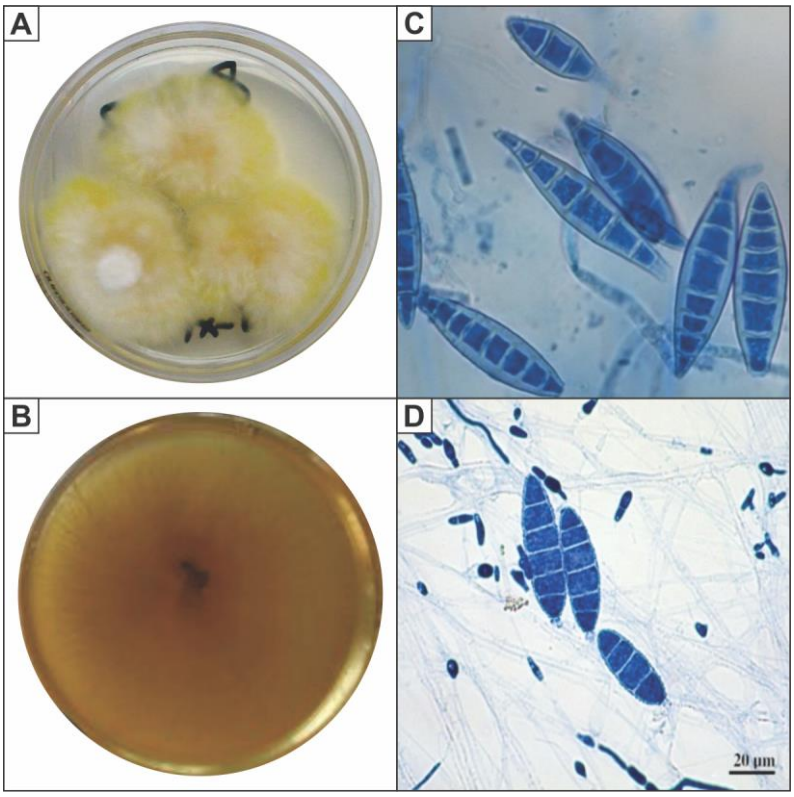


Fuente: Rivera,Y, 2018.

1.2.3.2 Género *Microsporum*: En género Microsporum encontramos las especies más prevalentes: *M. canis, M. gypseum , M. audouinii.* Este género se caracterizan por parasitar la piel lampiña y los pelos, en forma “endo-ectothrix” de manera que se encuentran filamentos en el interior y esporas en el exterior. *M. canis* microscópicamente se observa con abundante micelio, hifas delgadas tabicadas y ramificadas con macroconidios de pared gruesa equinuladas o espiculadas. Su colonia es de aspecto vellosos, plano, de color amarillo y blanco el micelio. Al reverso es de pigmento amarillo- naranja. (Bonifaz, 2015)

M. gypseum microscópicamente se observa con poco micelio delgado y tabicado, abundante macroaleurioconidios en forma de huso, pueden presentar pequeñas espiculas. Su colonia es de aspecto arenoso de color blanco se torna beige sin pigmento al reverso. (Bonifaz, 2015). La figura 2 muestra las colonias y estructuras fúngicas de estos hongos.

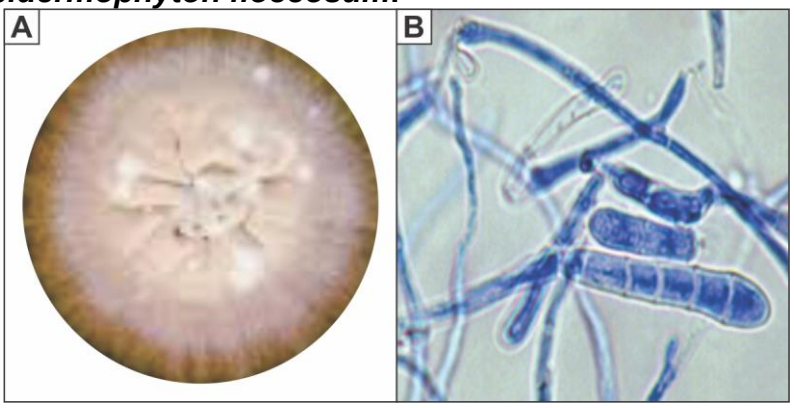
Figura 2. Colonias en medio PDA de 8 días de cultivo y estructuras fúngicas en azul de lactofenol de dermatofitos del género *Microsporum*. (A, C) M. *canis*; (B,D) *M. gypseum*



Fuente: The University of Adelaide. Mycology Online. Disponible en: www.mycology.adelaide.edu.au.

1.2.3.3 Género *Epidermophyton*: En género *Epidermophyton* encontramos la especie *E. floccosum* que afecta la piel y a veces las uñas, pero es incapaz de parasitar el pelo.(Martin, 1997). Microscópicamente se observan micelios delgados y tabicados con macroconidios en forma de bastos, con base delgada y extremo romo y abundantes clamidoconidias. (Saenz, 2001).Sus colonias son aterciopeladas de color blanco, se torna beige con el tiempo, rugosa, al reverso es de pigmento amarillo-verdoso (Bonifaz, 2015) Ver figura 3.

Figura 3. Colonias en medio PDA de 8 días de cultivo y estructura fúngicas en azul de lactofenol de dermatofitos del género *Epidermophyton floccosum*. (A). Cultivo de *Epidermophyton floccosum*; (B) Estructuras fúngicas en azul de lactofenol de *Epidermophyton floccosum*.



Fuente: Mycology Online. Disponible en: www.mycology.adelaide.edu.au.

1.2.4 Patogenia. La patogénesis de los dermatofitos consta de tres fases: adhesión, invasión y respuesta inmune (Uribe y Cardona, 2013).

El contacto de los tejidos epiteliales queratinizados con las conidias de los hongos, da el inicio al establecimiento de la infección o dermatofitosis. Este primer contacto, requiere de la interacción de diferentes factores tanto del microorganismo (proteínas) como del hospedero (receptores). En este sentido, la expresión de adhesinas en la superficie de las microconidias que reconocen manosa y galactosa parece juegan un rol importante en este proceso, en el caso de *T. mentagrophytes* y *T. rubrum* (Pérez y Albuquerque, 2010; Esquenazi, 2004).

En adición, adhesinas fibrilares que se desprenden de las artroconidias de *T.mentagrophytes* fueron reportadas por su importancia en la adherencia o anclaje y conexión al tejido (Kaufman, 2007) De otro lado, en *M. canis* se ha demostrado el papel de proteasas pertenecientes a la familia de las subtilisinas (Subs), principalmente, estas proteasas podrían actuar como ligandos sobre las células hospederas sin ninguna otra actividad o con actividad enzimática generando cambios estructurales en determinados ligandos ubicados en las superficies de las células fúngicas y de las células del hospedador, facilitando la adherencia del dermatofito (Dahl y SA, 1994).

El proceso invasivo ocurre cuando las artroconidias germinan y se da la formación y extensión de hifas en la superficie, este mecanismo es realizado mediante la lisis de puentes disulfuro presentes en la red proteica de los tejidos queratinizados por bombas de eflujo de sulfito (Uribe, 2013). De esta manera, las proteínas son degradadas en aminoácidos, dipéptidos y tripéptidos por subtilisinas, fungalisinas y otras peptidasas como la leucina aminopeptidasa, dipeptidil peptidasas, estos productos de degradación servirán de nutrientes para la supervivenica del hongo (Ogawa H, 1998) .

Los queratinocitos son las células más abundantes en la epidermis y conforman una barrera física contra microorganismos, considerados mediadores de la respuesta inmune. Estas células secretan factores solubles capaces de regular la respuesta inmune tales como factores de crecimiento (Factor de Crecimiento Básico de Fibroblastos, Factor de crecimiento transformador, bFGF; Factor de crecimiento Beta, TGF-β, Factor de necrosis Tumoral alfa TNF-α) e interleuquinas (IL-1, IL-3, IL-6, IL-7, IL- 8). La interleuquina 8 es un potente factor quimiotactico para neutrófilos, lo que facilita la acumulación de estas células en el estrato corneo afectado por estos hongos, estímulos como el de la IL-8 y otros producidos por los queratinocitos bajo estímulos apropiados conducen a una respuesta inflamatoria en respuesta a lesiones por dermatofitos. (Wagner,1995; Giddey K, 2007)

En las infecciones agudas se produce una respuesta inmune celular, mientras que en las infecciones crónicas se detectan altos niveles de Ig E e Ig G4; estas subclases de inmunoglobulina se aumentan en infecciones crónicas en las cuales la respuesta inmunes deficiente (De la calle *et al*,2012) .

1.2.5 Manifestaciones clínicas. Los dermatofitos generan variadas manifestaciones clínicas que pueden ir desde síntomas leves, hasta lesiones supuradas e inflamatorias intensas. Estas manifestaciones dependen del área anatómica afectada y del tipo de especie involucrada en la infección principalmente, sin embargo, infecciones mixtas pueden presentarse en las diferentes áreas anatómicas (Larrondo y Angulo, 2001). A continuación, se realizará su descripción:

1.2.5.1 Tiña de la cabeza o tinea capitis: El 97% de esta tiña se presenta en niños afectando la piel de la cabeza y/o el pelo atribuidos a factores como el pH y depósitos de grasas (del Mercado et al 2007). No influye su sexo, raza, ni factores de predisposición. En adultos ocurren casos entre el 1-3% en mujeres mayormente

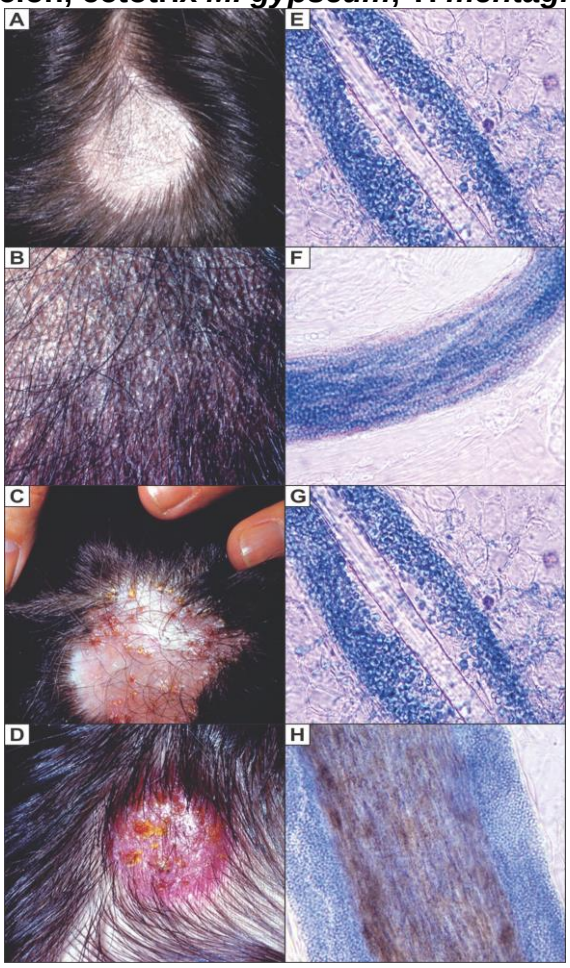
por procesos hormonales (Rebollo et al., 2008). Se inicia cuando las conidias o esporas se depositan en la cabeza presentando dos formas:

Inflamatorias: Por las especies *T. tonsurans, T. violaceum, T. mentagrophytes y T. schoenleinii,* se observa pústulas foliculares y abscesos hasta la formación del querion de Celso que son placas descamativas e inflamatorias adheridas al pelo y se manifiesta con eritema, edema, formación de costras y la presencia de abscesos. La lesión es dolorosa y suele acompañarse de fiebre y adenopatías retroauriculares y laterocervicales. Esta infección está causada por *T. mentagrophytes y T. verrucosum.* Una variedad de esta infección, es la tiña favosa o favus donde se observa costras amarillentas, cóncavas con forma de cazoletas fávicas, pueden dar lugar a alopecias se observa mayormente en el cuero cabelludo,y las uñas. Esta infección es causada por *T. schoenleinii* y en menor proporción por *M. gypseum.* (Bonifaz, 2015)

No inflamatorias: Se observa lesiones no inflamatorias que se manifiestan como una placa eritematosa de bordes descamativas y bien delimitados. (Bonifaz, 2015).

Existen varios tipos de parasitación del pelo como: la Lesión Ectótrix: donde se observa conidios pequeños que forman una masa en un patrón de mosaico en la superficie del pelo. La Lesión Endótrix formación de artroconidias dentro del tallo piloso sin destrucción de la cutícula, los límites del cabello permanecen conservados. Fávicos: hifas anchas con burbuja de aire. Megasporico: numerosas conidias con predominio ectótrix, microide: numerosas conidias dispuestas en fila e hifas (Bonifaz, 2015).

Figura 4. Presentación clínica de las tinea capitis y forma de parasitación (A-D) Lesiones clínicas. (E-H) Formas de parasitación del cabello. (A-E.) Placa gris: Semialopécica, seca, ectothrix M. canis B-F. Puntos negros: Endotrix, quiebre a ras. *T. tonsurans* C-G. Favus: costras levantadas, amarillas, malolientes, alopecia definitiva. Ectótrix T. schoenleinii D-H. Kerion o Querion: inflamación, supuración, ectótrix *M. gypseum*, T. *mentagrophytes*, *M. canis*.



Fuente: Bonifaz. Micologia Medica Basica. Mexico: McGraw-Hill. 2015

1.2.5.2 Tiña corporis: *Se localiza en hombros, extremidades, tronco y cara. Las lesiones, tienen un aspecto anular que forman una circunferencia y pueden ser de tres tipos:*

Inflamatorias: poco eritematosas causadas frecuentemente por *Microsporum spp.* Esta forma se presenta en cualquier parte del cuerpo; predomina en el tronco (50%), extremidades (30%) y cara (20%) (Herrera *et al*.,2016)

Inflamatorias agudas: eritematosas observa pústulas y vesículas; frecuentemente causadas por *Trichophyton spp*. (Fari y Gräser 2000).

Severas: pacientes con compromiso inmunitario, lesión que invade el estrato dérmico de la piel ocasionando lesiones muy inflamatorias denominadas «granuloma de Majocchi» o «granuloma perifolicular».causado frecuentemente *T. rubrum* (Martin, 1997)

Existen diferentes tipos de lesiones (Ver fig. 5)

Figura 5. Cuadros clínicos de tiña corporis. A: Estrato corneo de la epidermis. B: Pruriginosas. C: Anulares, bordes infiltrados y definidos, secas descamativas, eritematosas y D: Múltiples, mapiforme.

Fuente: Crespo, V., & Vicente, D. Atlas de Micología Cutánea. Madrid: Barcelona. 2006

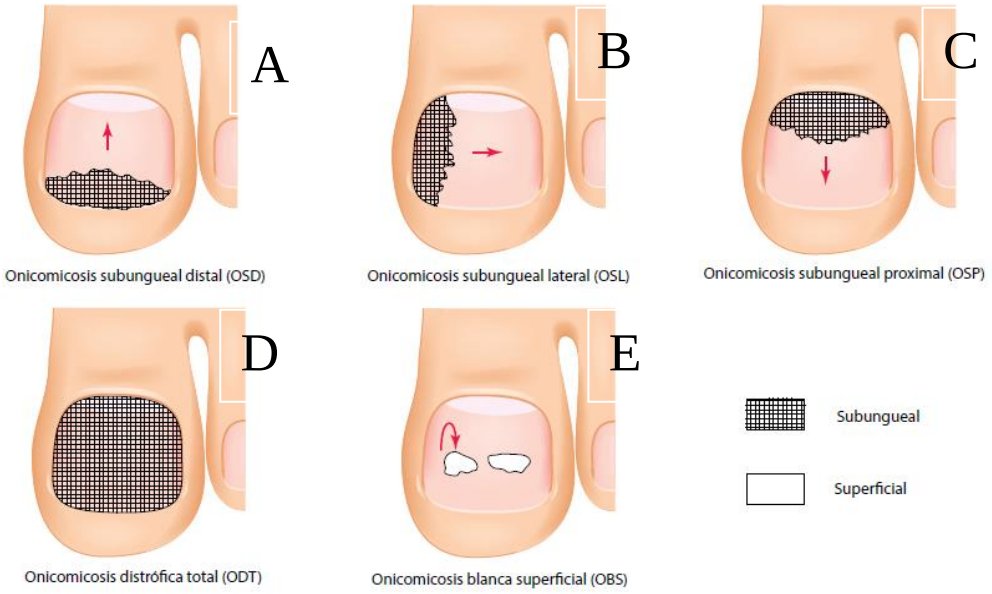
1.2.5.3 Tinea unguium (onicomicosis dermatofítica). *El tejido afectado en mayor proporción son las uñas de los pies (93%) seguido por las uñas de las manos (7%) y es frecuentemente causado por por T. rubrum (Ilkit et al., 2015).*

La infección en este tejido puede presentarse de diferentes formas clínicas relacionadas con el área afectada, pudiendo ser una onicomicosis subungueal distal y lateral causada principalmente por *T. rubrum*; onicomicosis blanca superficial causada por *T. mentagrophytes y T. rubrum*; onicomicosis proximal subungueal por *T. rubrum* y onicomicosis con distrofia total de la lámina ungueal (Larrondo *et al*., 2001).

Es la forma más crónica y difícil de tratar entre todas las dermatofitosis, se asocia a tiña pedis, y puede desarrollarse de manera secundaria sobre uñas previamente distróficas u onicolíticas, Ver Figura 6 (Bonifaz, 2015).

Las onicomicosis se dividen por su forma clínica en los siguientes tipos:

Figura 6. Tipos de onicomicosis. A: Onicomicosis subungueal distal .B: Onicomicosis subungueal lateral. C: Onicomicosis subungueal proximal. D: Onicomicosis distrófica total. E: Onicomicosis blanca superficial.



Fuente: Bonifaz. Micologia Medica Basica. Mexico: McGraw-Hill. 2015

1.2.5.4 Tinea pedís: *Se observa en la planta de los pies y espacios interdigitales de los dedos. Estas infecciones son de tres tipos:*

Inflamatoria: Presencia de lesiones vesiculares generalmente en la región dorsal del pie acompañadas de prurito y dolor.

Interdigital: Lesiones macerativas y descamativas generalmente en el cuarto y quinto espacio interdigital. (Jiménez *et al*., 2017)

Mocasín: Lesiones eritematosas y descamativas de la planta del pie, suelen ser crónicas y recurrentes (Masri-Fridling, 1996).

Según el tipo de lesiones las formas clínicas se pueden clasificar como Intertriginosa: (Pie de atleta), Hiperqueratótica, vesicular subaguda y aguda ulcerativa (Ver figura 7)

Figura 7. Formas clínicas de Tinea pedís. (A) Intertriginosa: (Pie de atleta); (B) Hiperqueratótica.; (C) Vesicular subaguda; (D) Aguda ulcerativa.

Fuente: Guzmán, R. A. Dermatología. Atlas, diagnóstico y tratamiento, 6e. Mexico: Mc Graw. 1987

1.2.5.5 Tiña de las manos o tinea manus: Afecta las palmas y dorso de las manos, causada por lo regular por especies del género *Trichophyton* (Figura 8).

Su fuente de infección casi siempre es a partir de un foco de tiña de los pies (autoinoculación). Es propio de hombres adultos, con mayor incidencia entre la tercera y cuarta décadas de la vida. No existe susceptibilidad de raza y el único factor de predisposición importante es la hiperhidrosis.

Las especies que con mayor frecuencia se aíslan son *T. rubrum* (80%) y *T. interdigitale* (15%).

Figura 8. Tiña de las manos. Lesión presentada en mano.

Fuente: Rivera, Y. 2018

1.2.5.6 Tiña de la ingle o tinea cruris: *Se encuentra en la región inguinocrural, periné y en raras ocasiones genitales, causada por lo regular por especies de los géneros Trichophyton y Epidermophyton. Especialmente por: E. floccosum, T. rubrum.*

Su sintomatología es prurito intenso, ardor, La lesión es bien definida, bordes ligeramente levantados, algunas veces se observan vesículas. (Figura 9)

Figura 9. Tiña de la ingle. Lesión presentada en ingle.

Fuente: Guzmán, R. 2009

1.2.5.7 Tiña de la barba y bigote o tinea barbae: *Es una dermatofitosis crónica que afecta cara y cuello, por lo general en áreas pilosas, producida por algunas especies de Trichophyton y Microsporum.*

Se complica cuando hay formación de nódulos eritematosos foliculitis postulosa, exudativa y formación de costras, compromiso del vello. (Figura 10)

Figura 10. Tiña de la barba y bigote. Lesion observada en cara.

Fuente: Guzmán, R. 2009

1.2.6 Diagnóstico. Los métodos de elección para obtener un buen diagnóstico de dermatofitosis, así como para la identificación del agente etiológico es el examen directo y el cultivo. Ambos métodos deben ser usados de manera conjunta pues se ha encontrado que cada uno de ellos por separado tiene una sensibilidad y

especificidad moderada. Adicionalmente, se utilizan las biopsias y las pruebas inmunológicas de intradermorreacción cutánea (IDR) cuando las dermatofitosis son profundas (Balazs, 2006).

Para realizar un buen diagnóstico es importante tener en cuenta los siguientes aspectos:

- Tomar adecuadamente la muestra por una persona experta, para ello, las escamas, detritos subungueales, fragmentos de uñas, cabellos y vellos de la zona afectada, son las muestras ideales para realizar el diagnóstico.
- Si hay que transportarla cumplir con las condiciones adecuadas (cámara húmeda) para procesarla correctamente.
- Que el personal sea experimentado para poder realizar un buena interpretación del examen directo.
- Utilizar los medios de cultivo adecuados como agar Sabouraud dextrosa y Mycosel.
- Poder identificar el dermatofito a nivel de especie (Cuétara MS, 1997)
- En los casos donde se presenta dificultades en la identificación de las especies de dermatofitos aisladas debido a similitudes en las estructuras fúngicas, podrían ser útiles pruebas fisiológicas o bioquímicas adicionales como prueba de perforación y parasitación de pelo, prueba de ureasa, asimilación de nutrientes como tiamina, inositol y factores de crecimiento. (Cabañes, 2001)

1.2.6.1 Exámenes directos: *Para el examen directo lo recomendado es utilizar hidróxido de potasio (KOH) como diluyente, aclarante y por su acción proteolítica, según el tipo de muestra. De esta manera, el KOH 10% es empleado para muestras de escamas; KOH 20% muestras de pelo y KOH 40% muestras de uñas, generalmente (BasualdoJA, 1996)*

Este examen permitirá la observación de hifas septadas hialinas, principalmente, relacionadas con la presencia de dermatofitos.

En el caso del pelo, como se mencionó anteriormente, existen diferentes tipos de parasitación (endótrix o ectoendótrix) que deben ser identificadas mediante la observación de formas reproductivas e hifas en la muestra (Sandoval, 2010).

En adición, el calcoflúor es un colorante que puede ser utilizado para la observación de las estructuras fúngicas, sin embargo, debe ser usado un microscopio de fluorescencia para tal fin. Un color blanco verdoso es emitido por los conidios o filamentos confirmando el diagnóstico (Bonifaz, 2015).

1.2.6.2 Cultivo: El cultivo se considera el complemento del examen directo, ideal para aislar el agente etiológico causante de la dermatofitosis. Agar saboraud dextrosa con cloranfenicol es el medio adecuado que permite el crecimiento de estos hongos filamentosos. (Cabañes, 2001)Los cultivos deben permanecer entre 28 a 30 °C y el diagnóstico se realiza luego de cuatro (4) semanas. En este sentido, la ausencia de crecimiento en los lugares de inoculación de la muestra sobre el medio de cultivo, indica un resultado negativo, contrario a ello, el crecimiento de colonias hialinas, claras, con colores que pueden ir de tonos blanquecinos, amarillos y marronáceos corresponden a cultivos positivos (Cabañes, 2001).

Por otra parte, medios de cultivo como agar arroz y agar papa dextrosa son considerados útiles para la identificación de hongos dermatofitos. El agar arroz permite diferenciar *M. canis* de *M. audouinii* por la generación de pigmentos en este último. Por otro lado, el agar papa dextrosa favorece la esporulación de todos los dermatofitos y al igual que el agar arroz, facilita la identificación de especies por producción de pigmentos (Cabañez, 2001).

1.2.6.3 Luz de Wood: La observación se realiza utilizando la (luz de Wood) cuya longitud de onda está en el rango de 400 y 450 nm. Ésta penetra hasta la dermis, siendo de utilidad para el diagnóstico de infecciones fúngicas superficiales tales como la pitiriasis versicolor, revelando una fluorescencia anaranjada. En las Tiñas capitis se visualiza en los tallos pilosos de color verde brillante si el agente causal es producida por M. *audouini* y M. c*anis*, mientras que la fluorescencia producida por T. *schoenleinii* es verde grisácea; cuando el causante es T. *tonsurans* y T. *violaceum* no se observa ninguna fluorescencia. (Vallanet, 2009)

1.2.6.4 Biopsia: Se toma cuando la muestra es un granuloma dermatofiticos y en la enfermedad de Hadida, estas muestras se tiñen con PAS O Grocott. Son pruebas más costosas y más demoradas en diagnosticar. (Bonifaz, 2015)

1.2.6.5 Prueba de la ureasa: Se realiza en medio agar-Urea según Christensen el cual utiliza un indicador de pH para la identificación de la prueba: rojo (positivo), amarillo (negativo). La ureasa permite diferenciar *T. mentagrophytes de T. rubrum,*

siendo el primero positivo para la misma y el segundo negativo (Bonifaz, 2015; Cabañes, 2001).

1.2.7 Tratamiento. El tratamiento actual de las micosis cutáneas se basa principalmente en el uso de medicamentos tópicos y orales como fluconazol, itraconazol, terbinafina, griseofulvina, amorolfina 5%, ciclopiroxolamina 8%, entre otros; o una combinación de ambos dependiendo de la localización, extensión y severidad de las lesiones, la edad del paciente y la especie de dermatofito involucrada en la infección (Conejo *et al*, 2017; Del Palacio 1994).

El antimicótico tiene diferentes estructuras químicas y mecanismos de acción. La clasificación se realiza según criterios convencionales que atienden a su estructura en: polienos, azoles, alilaminas, entre otros (Ver Tabla 2). (Gregorí, 2005; Sheeman y CM 1999).

Tabla 2. Clasificación de los antifùngico por su estructura.

Polienos	Nistatina, natamicina, amfotericina B
Azoles	Imidazol: miconazol, clotrimazol. Triazoles: fluconazol, itraconazol, ketoconazol. Triazoles de segunda generación: voriconazol, ravuconazol, posaconazol
Alilaminas	Terbinafina, naftifina
Lipopéptidos	Papulacandinas
Pirimidinas fluoradas	Flucitosina
Otros	Yoduro de potasio,ciclopirox,tolnaftato,griseofulvin.

Fuente: Modificado de Valdés, Gregorí. 2005

Entre los principales antifúngicos que se usan están los azoles (Tabla 2) que actúan inhibiendo el enzima 14-α-desmetilasa del lanosterol, como consecuencia de esta inhibición, se produce acumulación de lanosterol, el cual es incapaz de remplazar al ergosterol de la membrana citoplasmática, produciendo cambios en la permeabilidad celular, en la estructura de la membrana y en la actividad de sus enzimas resultando en la inhibición del crecimiento celular.

Dentro de esta familia hay dos grupos importantes, según presenten dos o tres nitrógenos en el anillo azol. Los imidazoles y triazoles con excepción del ketoconazol, los primeros son de aplicación exclusivamente tópica, por lo que su uso se limita al tratamiento de las micosis superficiales y cutáneas, mientras que los

segundos tienen diversas aplicaciones. Por su alta eficacia y su buena tolerancia se consideran como tratamiento de elección para este tipo de micosis (Bonet R, 2005).

Los triazoles ganaron mucha notoriedad entre todos los agentes antifúngicos, debido a su reducida toxicidad respecto de los imidazoles y la posibilidad de múltiples formas de administración. Sin embargo, la resistencia a triazoles tales como Fluconazol é Itraconazol está informada cada vez con más frecuencia especialmente contra especies de Candida. Otro problema de los azoles es que son fungistáticos y no fungicidas produciendo recurrencias (Edlind, 2004).

La Terbinafina es una alilamina capaz de inhibir la enzima escualeno-epoxidasa ; en la posición 2,3 es la primera etapa en la conversión del escualeno al esqueleto tetracíclico de los esteroles. Se administra oralmente, logrando una absorción >70% y siendo altamente lipofílica y queratofílica. Se conoce por su acción fungicida in vitro sobre dermatofitos, hongos filamentosos y dimórficos, y es considerada el medicamento de primera elección para el tratamiento de la onicomicosis (Gupta *et al*., 1999; Kulla *et al*, 1997).

La Griseofulvina es un antimicótico restringido a la onicomicosis producida por dermatofitos únicamente. Tiene un efecto fungistático inhibiendo la mitosis de la célula, y se une fuertemente a las células precursoras de la queratina de la piel. No es hidrosoluble y debe administrarse conjuntamente con alimentos ricos en grasas para facilitar su absorción. Este medicamento aunque es eficaz, no es considerado la primera elección para el tratamiento de la onicomicosis . (Bonet R, 2005)

En general, el tratamiento de la onicomicosis producida por dermatofitos, presenta varias limitaciones como terapias prolongadas, altos costos, hepatotoxicidad, nefrotoxicidad, alteraciones en el gusto, la respuesta al tratamiento es condicionada por el estado inmunológico del paciente dado que se presentan fallas en el tratamiento en el caso de inmunosuprimidos, inmunodeficientes, infecciones concominantes entre otros; Adicionalmente, se presentan efectos adversos durante la terapia como fiebre, nauseas, dolor de cabeza, rash cutáneo. El tratamiento combinado es una alternativa terapéutica, demostrando mejor efectividad (Gregorí Valdés, 2005 ; Krafchik,1997)

1.2.8 Compuestos naturales como fuente de sustratos bioactivos. La organización mundial de la salud estima que aproximadamente el 80% de la población mundial recurre a la medicina tradicional, como fuente primaria para el cuidado de la salud. Más de 100 compuestos químicos son considerados como medicamentos importantes, son ampliamente usados en muchos países, y han sido obtenidos de plantas. El 75% de estas sustancias fueron descubiertas a través de procedimientos químicos, orientados al aislamiento de los compuestos activos, presentes en plantas usadas en la medicina tradicional (Burt., 2004)

En los últimos años se ha reconocido la importancia de las infecciones fúngicas y la dificultad existente para lograr un control de las mismas, como también, el aumento en la resistencia a los antifúngicos, y esto ha motivado la búsqueda de alternativas basadas en los productos naturales. El efecto antifúngico de algunas plantas medicinales, sus aceites esenciales y extractos han sido evaluados en diferentes trabajos científicos (Quindós *et al.,* 2012; Omidbeygi,1998).

Existe una demanda de actividad antifúngica de plantas y sus componentes debido a sus propiedades biológicas es por eso que este trabajo se centra en la planta *Eugenia cariophylla* y su componente principal, el eugenol.(Liu *et al.,* 2008)

1.2.8.1 Eugenia cariophylla (*Syzygium aromaticum*). Es un árbol de la familia *Myrtaceae*, cuya taxonomía se puede observar en la tabla 3 .Es originario de Indonesia, (Figura 11) .Su promedio de vida es de 90 años. Los clavos de olor son las flores que aún no abren y se encuentran secos. Se cultiva en Madagascar, Zanzíbar, India y Sri Lanka (Kamatou GP 1, 2012).(Figura 12)

El aceite esencial se extrae de los brotes de las flores mediante destilación al vapor; su principal componente del aceite es el eugenol. (Kamatou, 2012). El aceite de clavo posee propiedades analgésicas, antioxidantes, anti inflamatorias, es un antiséptico, estimulante y activa la circulación. (Merr y Perrv, 1939 ; Leem, 2011). Adicionalmente, es activo frente a bacterias orales asociados con la caries dental y la enfermedad periodontal .(Cai y Wu, 1996). Siendo activo contra hongos y bacterias Gram negativas y Gram positivas (Chaieb *et al.,* 2002).

Figura 11. Árbol del clavo o clavero.

Fuente: Wikipedia. Syzygium aromaticum. Disponible en: https://es.wikipedia.org/wiki/*Syzygium_aromaticum*

Figura 12. Clavo de olor.

Fuente: https://es.wikipedia.org/wiki/Syzygium_aromaticum

Tabla 3. Taxonomía de *Syzygium aromaticum*

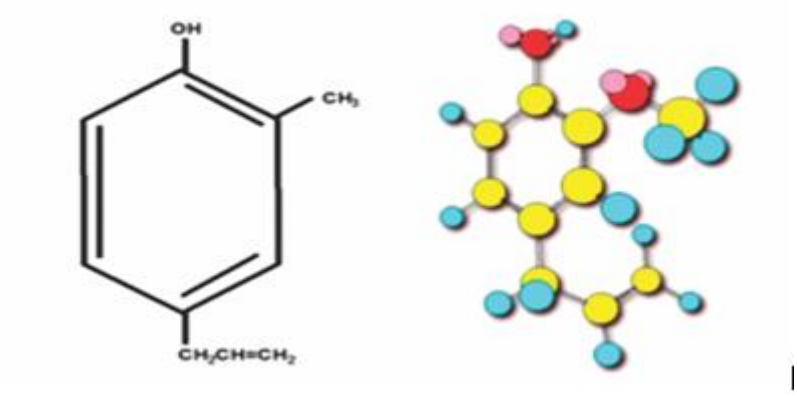
Taxonomía
Reino: Plantae
División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Subclase: Rosidae
Orden: Myrtales
Familia: Myrtaceae
Subfamilia: Myrtoideae
Tribu: Syzygieae
Género: *Syzygium*
Especie: *Syzygium aromaticum*

Fuente: Wikipedia. Syzygium aromaticum. Disponible en: https://es.wikipedia.org/wiki/Syzygium_aromaticum

Los principales constituyentes polifenólicos aislados del clavo de olor son propenos hidroxifelino, acidos fenólicos, flavonoles de estos el principal componente bioactivo es el eugenol compuesto por: beta-cariofileno y otros. (Pathak R, 2004). En estudios realizados por (Prashar A L. I., 2006) (Prashar et encontró que sus proporción en la composición varia 78% eugenol y 13% beta-cariofileno. Mientras que Pawar y Thaker (2006) encontraron un contenido de eugenol del 47.64% y alcohol bencílico 34,10%. Otros estudios aislaron el aceite por hidrodestilación pudiendo identificar 36 componentes los más principales se encuentran 88,58% eugenol, acetato de Eugenilo 5,62%, beta cariofileno 1,39 % (Pawar y Thaker, 2006 ; Chaieb, 2007).

1.2.8.2 ***Eugenol.*** El Eugenol (figura 13) es un derivado fenólico conocido comúnmente como esencia de clavo (Padilla et al., 1998), puede extraerse de pimienta, hojas de laurel, canela, alcanfor y otros aceites (Rojo del Olmo, 2009). Es de consistencia líquida y aceitosa, de color amarillo claro, con aroma característico, poco soluble en agua y soluble en alcohol. (Reddy y Lokesh, 1994) .Es un germicida por excelencia, capaz de inhibir el crecimiento de una gran diversidad de microorganismos (González ,2012; Garg y Siddiqui, 1992).

Figura 13. Estructura Química del Eugenol. (4-alil-2metoxifenol)



Fuente: Olivoto, 2014

Este compuesto, es conocido también por las propiedades analgésicas y antiiflamatorias con capacidad de reducir el dolor en tejidos próximos a la dentina, a pesar de no ser un verdadero analgésico local. Posee cierta actividad antiagregante y antipirética (Leem, 2011; Chaieb, 2007). La literatura reporta actividad anti-anafiláctica del eugenol al prevenir la degranulación de mastocitos causantes de reacciones de hipersensibilidad. Además, el eugenol actúa como agente antioxidante previniendo los procesos típicos de peroxidación de lípidos en

las primeras etapas de procesos inflamatorios, actuando como agente captador de radicales libres (Padilla *et al.*, 1998; González ,2002).

En cuento a la actividad antimicrobiana, análogos sintéticos del eugenol como -4-alil-2-methoxi-5-nitrofenol- han demostrado propiedades antifúngicas *in vitro* contra dermatofitos de importancia clínica, hongos oportunitas como *Candida albicans* y no albicans y patógenos como *Cryptococcus neoformans* (Pinto *et al.,* 2007 ; Reddy y Lokesh, 1994).

La actividad antifúngica del aceite esencial de clavo y su componente principal el eugenol, extraído de *Syzygium aromaticum* , fue reportada sobre diferentes especies de dermatofitos, *Candida y Aspergillus*; tanto el aceite esencial como el eugenol mostraron CMI y CFM similares para todas las especies de hongos evaluadas (CMI 0.16-0.64 µg/mL; CFM 0.32-1.25 µg/mL) utilizando el método de macrodilución, además, su actividad antifúngica se vio reflejada en causar lesión de la membrana celular (González y López, 2013).

En adición, Park M y colaboradores evaluaron el efecto del aceite esencial de *S. aromaticum* y eugenol por el método de difusión en agar contra *T. mentagrophytes, T. rubrum y M. gypseum* inhibiendo el crecimiento de las hifas de estos dermatofitos y causando cambios morfológicos en la membrana celular y retículo endoplásmico. (González y López, 2013).

Por otra parte, el aceite esencial y el eugenol extraídos de *Eugenia cariophyllata* presentaron acción antifúngica con CMI de 1% y 4%, respectivamente. Tullio y colaboradores reportaron el efecto inhibitorio del aceite esencial de clavo, pino, tomillo rojo, hinojo, salvia, melisa y lavanda, usando el método de microdilución y el ensayo de contacto de vapor contra diferentes especies de dermatofitos y hongos dematiáceos. Este estudio demostró que los aceites esenciales en estado de vapor presentan mayor efecto antifúngico (Reyes y Palou, 2012).

Otros estudios sugieren que la actividad antimicrobiana del eugenol puede ser atribuida a la presencia de un grupo hidroxilo libre (Nazzaro, 2016). Previniendo la accion enzimatica. Filgueiras y Vanetti (2006),estudiaron el flujo de los iones Kþ de *Listeria monocytogenes* evidenciando este compuesto aumenta la permeabilidad de Kþ en tampon de solucion salina con fosfato. (Fil Filgueiras y Vanetti 2006).

El mecanismo de accion del eugenol en hongos estudiado por Bennis y colaboradores (2004) y Braga y colaboradores (2007) mostro como el eugenol induce a alteraciones morfologicas sobre *S. cerevisiae and C. albicans,* al exponerlo reduce el numero de levaduras. Como el eugenol es lipofilico de naturaleza puede entrar en las cadenas de acido graso de la membrana perturbando la fluidez y permeabilidad (Bennis *et al*; 2004 ; Braga *et al* ., 2007).

Teniendo en cuenta el panorama global de las dermatofitosis y las limitaciones en el tratamiento actual, así como, las diferentes propiedades biológicas y antimicrobianas que se han atribuido al eugenol, un sustrato natural; enfocamos este estudio al uso de este fenol como sustrato para el desarrollo de nuevos compuestos (derivados semisintéticos del eugenol) que podrían ejercer un mejor efecto antifúngico y no tóxico frente a hongos dermatofitos y células de mamífero. En este sentido, se planteó las siguientes preguntas de investigacion:

¿ Son los derivados semisintéticos del eugenol activos frente a dermatofitos del genero *Trichophyton spp* ?

¿ Los derivados semisintéticos del eugenol presentan citotoxicidad en células de mamífero?

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antifúngica y citotóxica *in vitro* de derivados semisintéticos del eugenol en hongos del genero *Trichophyton spp.*

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar la inhibición del crecimiento micelial de los dermatofitos *Trichophyton mentagrophytes, Trichophyton rubrum, Trichophyton tounsurans,* tratados con derivados semisintéticos del eugenol.

Establecer la concentración mínima inhibitoria y fungicida mínima de los compuestos en estudio sobre *T. rubrum, T. mentagrophytes y T. tounsurans*.

Determinar la citotoxicidad en células de mamífero de los derivados semisintéticos del eugenol.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MICROORGANISMOS Y CÉLULAS DE MAMÍFERO

Trichophyton mentagrophytes (ATCC, cod:28185), *Trichophyton rubrum* (ATCC, cod:28188) y *Trichophyton tounsurans* (ATCC, cod: 28942) fueron mantenidos en medio APD (Agar papa Dextrosa, Difco) a 30°C, bubcultivos fueron realizados cada 10 días para el mantenimiento de cada cepa bajo las mismas condiciones descritas anteriormente.

Células epiteliales de riñón de mono verde africano Cercopithecus aethiops (VERO, ATCCL- 81) fueron mantenidas en medio Dulbecco's Modified Eagle (escrito en inglés, D-MEM, Gibco, Grand Island NY, USA) suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado (SBFi, Gibco, Grand Island NY, USA) a 37ºC, 5% de CO2, 95% de humedad.

Se realizaron repiques cada 3 a 4 días según la formación de la monocapa para su mantenimiento.

3.2 COMPUESTOS SEMISINTÉTICOS DEL EUGENOL.

Los compuestos semisintéticos derivados del Eugenol fueron suministrados por la Profesora Leonor Yamile Vargas del programa de Química ambiental de la Universidad Santo Tomás de Bucaramanga. Quien los obtuvo por procesos de química verde, a partir de materia prima renovable, biodegradable, económica y asequible comercialmente.

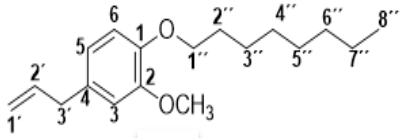
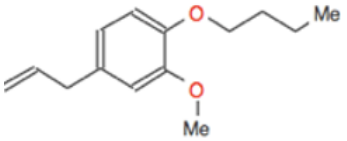
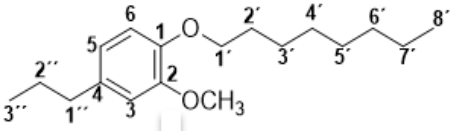
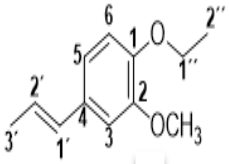
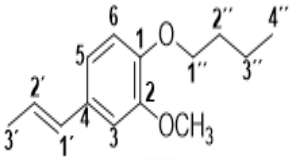
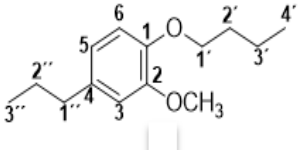
Brevemente la obtención fue realizada de la siguiente manera: el aceite esencial fue extraído del árbol *Eugenia caryophyllus* por la técnica de hidrodestilación (HD) asistida por calentamiento convencional y caracterizado cualitativa y cuantitativamente utilizando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, encontrando que los principales componentes del aceite esencial, y sus cantidades relativas son: Eugenol 71.8%, Acetato de Eugenilo 18.4%, Trans-β-Cariofileno 7.5%, α-Humuleno 1.1%, Oxido de Cariofileno 0.5%, Salicilato de Metilo

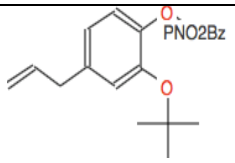
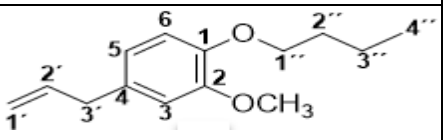
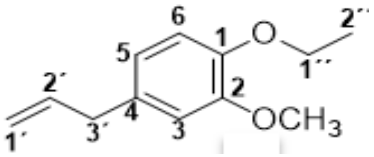
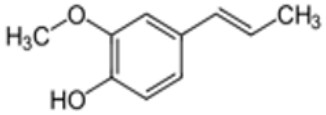
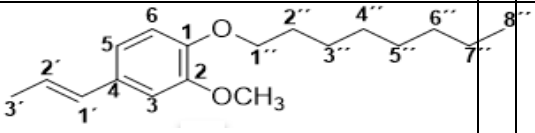
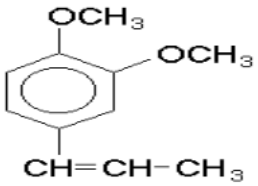
0.2%, Chavicol 0.2%, Acetato de 2-heptilo 0.1%, Acetato de Bencilo 0.1%, 2-heptanona <0.1%, 2-nonanona <0.1%, y benzoato de etilo <0.1%.

Por otra parte, el Eugenol , componente principal del aceite esencial fue de 99% , adquirido de Sigma-aldrich.

Los derivados del Eugenol se obtuvieron mediante reacciones de sustitución nucleofílica bimolecular para formar alquil-aril-éteres utilizando la síntesis de Williamson (Ver tabla 4). El antifùngico terbinafina fue purificado a partir de su comprimido comercial por la profesora Leonor Yamile Vargas y fue utilizado como medicamento de referencia.

Tabla 4. Estructuras Químicas de los compuestos semisintèticos derivados del eugenol donados por la profesora Leonor Yamile Vargas,

ESTRUCTURAS QUIMICAS DERIVADOS SEMISINTETICOS DEL EUGENOL			
			
1	4-alil-2-metoxi-1-(octiloxi)benceno	7	butileugenol
			
2	2-metoxi-1-(octiloxi)-4-propilbenceno	8	1-etoxi-2-metoxi-4-(prop-1-en-1-il)benceno
			
3	1-butoxi-2-metoxi-4-(prop-1-en-1-il)benceno	9	1-butoxi-2-metoxi-4-propilbenceno

ESTRUCTURAS QUIMICAS DERIVADOS SEMISINTETICOS DEL EUGENOL			
			
4	4-alil-2-metoxi-1-1(4-nitrofenoxibenceno	10	4-alil-1-butoxi-2-metoxibenceno
			
5	4-alil-1-etoxi-2-metoxibenceno	11	Isoeugenol
			
6	2-metoxi-1-(octiloxi)-4-(prop-1-en-1-il)benceno	12	Metilisoeugenol

3.3 CITOTOXICIDAD EN CÉLULAS DE MAMÍFERO.

Células Vero ($3x10^4$ células/mL) fueron cultivadas en placas de 96 pozos a 37ºC, 5% de CO_2, 95% de humedad durante 24 horas hasta formar la monocapa. Posteriormente fueron tratadas con los derivados semisintéticos del Eugenol en concentraciones de 300, 100, 33.3, 11.1 µg/ml por 72 horas. La citotoxicidad celular fue evaluada mediante la técnica del MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-y1), la densidad óptica fue medida a una longitud de onda de 590nm.

El porcentaje de toxicidad se calculó mediante la fórmula % de citotoxicidad= 1-(número de células del grupo tratado/ número de células del grupo control) x100. Las concentraciones citotóxicas 50 y 90 (CC50 y CC90) fueron calculadas por regresión sigmoidal usando el software estadístico Msxlfit™

3.4 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)

Los ensayos fueron realizados usando el método de microdilución, protocolo M-38A para hongos filamentosos de acuerdo con el "Clinical Laboratory Standard Institute" (CLSI). En resumen, una solución de agua destilada con tween 20 al 0.5% fue empleada para la obtención de la suspensión de conidias hasta alcanzar la turbidez de la escala 0.5 McFarland, posteriormente se determinó el número total de conidias contando bajo microscopio de luz con cámara Neubauer, el inóculo fue ajustado a $0.4\text{-}5.0\times10^4$ conidias/mL en medio de cultivo RPMI1640 (Sigma, St. Louis, MO, USA) buferado con Acido 3-morfolinopropanosulfonico (MOPS, Roswell Park Memorial Institute); La suspensión fue posteriormente tratada con cada uno de los derivados semisintéticos del Eugenol en concentraciones de 1000 -0.97 µg/mL realizando diluciones seriadas 1:2 durante 7 días a 30ºC. Controles sin tratar fueron igualmente evaluados.

Los compuestos fueron disueltos inicialmente en DMSO y una solución de trabajo de los mismos fue preparada en medio RPMI.

La determinación de la CMI fue realizada mediante la observación visual de la menor concentración que inhibía el crecimiento del hongo. La CMI fue determinada como la menor concentración capaz de inhibir el crecimiento fúngico observado por turbidez. Terbinafina fue probada como medicamento de referencia en concentraciones de 10.5 – 0.004 µg/ ml

3.5 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN FUNGICIDA MÍNIMA.

La concentración fungicida mínima (CFM) fue determinada a partir de la CMI, 20 µL de cada pozo fueron sembrados en cajas de petri con agar Saboraud Dextrosa (OXOID LTD, CM0041, Basingstoke, Hampshire, England) e incubados a 30ªC por 7 días. La CFM fue definida como la concentración del compuesto en la cual el crecimiento fúngico fue <3 UFC.

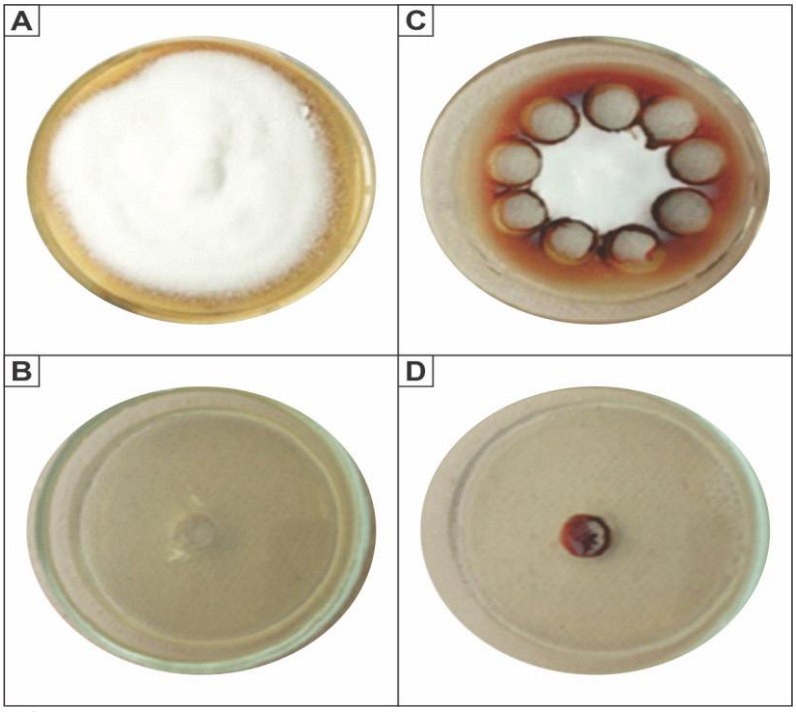
3.6 DETERMINACIÓN DE LA INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO MICELIAL.

Subcultivos de 12 días de cada uno de los microorganismos crecidos en APD, fueron utilizados como inóculo para los ensayos de inhibición radial del crecimiento

micelial. La inhibición fue evaluada por el método del sustrato impregnado. Brevemente, se preparó APD en cajas de Petri pequeñas mezclados con diferentes concentraciones de los compuestos en estudio (300, 100, 64.9, 11.1 µl/ml), cada concentración fue evaluada por triplicado en dos experimentos independientes; cajas control sin tratamiento fueron igualmente preparadas. A cada uno de los medios se les realizó cortes discoidales de 5mm de diámetro en el centro del agar, los cuales fueron reemplazados por cortes del mismo diámetro a partir de los subcultivos crecidos de 12 días en la zona de reproducción de la cepa como se muestra en la figura 17.

Posteriormente, los nuevos cultivos fueron incubados a 30°C por 20 días, realizando registro del crecimiento de la colonia mediante la medición del diámetro con un calibrador manual los días 6, 9, 13, 16 y 20. El porcentaje de inhibición del crecimiento micelial fue calculado mediante la fórmula: ((diámetro grupo control – diámetro grupo tratado) / diámetro grupo control) x 100.

Figura 14. Subcultivos de cepas. (A) Subcultivos de cepas crecido a los 12 días. (B- C) Cortes discoidales (5mm). (D) ilustración del método de sustrato impregnado.



Fuente: Rivera, Yohana.

3.7 ANÁLISIS DE RESULTADOS

Todas las concentraciones de los compuestos fueron evaluadas por triplicado en dos experimentos realizados en tiempos independientes.

Las viabilidad celular fue expresada como la concentración citotóxica 50 y 90 (CC50 y CC 90) mediante análisis sigmoidal por el programa estadístico MsxlfitTM (ID Business Solution, Guildford, UK).

Se determinó la inhibición del crecimiento micelial aplicando la siguiente fórmula: PI=(Gc-Go/Gc)x100, donde Gc: diámetro del control - 5 mm, y Go: diámetro de las colonias crecidas en el agar con la dilución del compuesto -5 mm.

Los resultados de actividad antifúngica serán expresados como Porcentaje de Inhibición (PI) que equivale a la capacidad del compuesto evaluado para inhibir el crecimiento micelial a una concentración determinada y en un tiempo establecido.

Las diferencias significativas se determinarán usando la Prueba t-Student para comparación de dos medidas o ANOVA para comparación de varias mediciones. Se considerarán estadísticamente significativos valores $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

El efecto fungiestático y fungicida de doce derivados semisintéticos del eugenol, el AE de *E. cariophylla* y eugenol puro fueron evaluados frente a tres especies de dermatofitos del género *Trichophyton (T. mentagrophytes, T. rubrum y T. tonsurans).* Los resultados se muestran en la tabla 5.

El AE, eugenol y los derivados 5, 10, 11 y 12 mostraron inhibir *T. mentagrophytes* con CMI entre 62.5 – 500 µg/mL y CFM entre 125 – 500 µg/mL. Isoeugenol y metiliso-eugenol (derivados 11 y 12) fueron los que mejor inhibieron este hongo (CMI 62.5 µg/mL, $p<0.05$). En el caso de *T. rubrum* el eugenol, derivado 3, 5 y 11 presentaron CMI y CFM entre 125- 250 µg/mL. Eugenol demostró inhibir en menores concentraciones (125 µg/mL) *T. rubrum.* Por otra parte, el AE, eugenol y derivados 11 y 12 inhibieron *T. tonsurans* con CMI y CFM entre 125- 250 µg/mL, siendo isoeugenol y Metilisoeugenol, los derivados que mostraron mayor inhibición.

En general, eugenol e isoeugenol (derivado 11) mostraron inhibir las tres especies de dermatofitos evaluados, siendo el segundo el que mayor presentó efecto fungiestático con CMI de 62.5 µg/mL frente a *T. mentagrophytes.* Así mismo, metiliso-eugenol (derivado 12) inhibió *T. mentagrophytes* y *T. tonsurans* y el derivado 5 fue igualmente activo para *T. mentagrophytes y T. rubrum.*

Los demás derivados semisintéticos del eugenol no inhibieron los dermatofitos ni con la máxima concentración probada (1000 µg/mL).

Tabla 4. Efecto fungiestático (CMI) y fungicida (CFM) de derivados semisintéticos del eugenol frente a hongos dermatofitos. Los resultados expresados en µg/mL fueron obtenidos a partir de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

COMPUESTOS	Microorganismos					
	T. mentagrophytes		*T. rubrum*		*T. tonsurans*	
	CMI	CFM	CMI	CFM	CMI	CFM
Aceite esencial	125	250	1000	1000	250	250
Eugenol	125	500	125	125	250	250
1	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
2	>1000	>1000	500	1000	>1000	>1000
3	>1000	>1000	250	250	>1000	>1000
4	>1000	>1000	500	500	>1000	>1000
5	250	500	250	250	500	500
6	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
7	>1000	>1000	500	500	>1000	>1000
8	>1000	>1000	500	>1000	>1000	>1000
9	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
10	250	250	500	500	>1000	>1000
11 Isoeugenol	62.5	125	250	250	125	125
12 Metil-Isoeugenol	62.5	500	500	>1000	125	125
Terbinafina	0.0097-0.625	0.312	0.039-0.156	0.039-0.312	0.62	0.62

Por otra parte, la inhibición del crecimiento radial del micelio de los tres dermatofitos fue evaluada por el método de sustrato impregnado evaluando cuatro concentraciones de cada derivado semisintéticos del eugenol (300, 100, 64.9 y 11.1 µg/mL). Los resultados se muestran en las tablas 6-8.

Eugenol y metiliso-eugenol (derivado 12) inhibieron el 100% del crecimiento micelial de *T. mentagrophytes* en concentraciones de 100 y 300 µg/mL durante el tiempo de duración del experimento (20 días). En el caso del derivado 10 inhibió el 100% del micelio de este mismo hongo cuando fue probado en la concentración de 300 µg/mL. En el caso del derivado 3, demostró una inhibición del 100% del crecimiento de *T. mentagrophytes* hasta el sexto día de tratamiento, luego del cual, esta inhibición disminuyó a un 30% (Ver tabla 5).

Tabla 5. Inhibición del crecimiento radial del micelio de T. mentagrophytes luego del tratamiento con los derivados semisintéticos del eugenol. Los resultados expresados en porcentajes de inhibición ± DS fueron obtenidos a partir de tres experimentos independientes realizados por triplicado. NI: No inhibe.

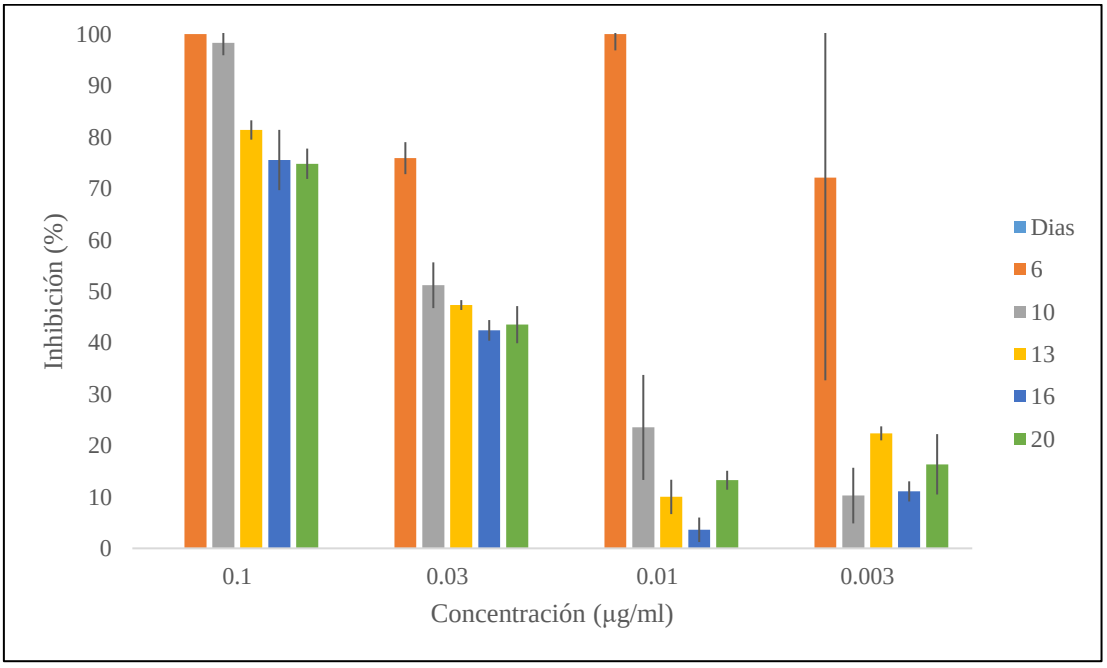
Compuesto	Dias	*T. mentagrophytes*			
		Concentración (µg/mL ±SD)			
		300	**100**	**64.9**	**11.1**
Aceite Esencial	6	26,25±8.83	12.05±3.53	NI	NI
	9	12.01±2.03	8.0±0.0	NI	NI
	13	6.0±2.82	4.0±0.0	NI	NI
	16	NI	NI	NI	NI
	20	NI	NI	NI	NI
Eugenol	6	100±0.0	100±0.0	100±0.0	70.52±1.2
	9	100±0.0	100±0.0	100±0.0	58.5±1.2
	13	100±0.0	100±0.0	70.52±1.2	39.4±37.1
	16	100±0.0	100±0.0	60.5±1.2	34.9±31.4
	20	100±0.0	10±0.0	57.5±1.1	24.5±24.3
1	6	21.40±1.28	18.14±0.50	16,4±0,59	9,32±0,73
	9	19.59±1.13	16.62±0.56	8,15±7,4	2,01±0,79
	13	16.98±1.47	16.35±0.88	5,40±1,3	3,27±2,5
	16	13.34±1.15	8.00±0.82	7,53±2,3	6,36±1,5
	20	15.43±1.33	1.15±1.12	11,0±6,4	9,99±5,0
2	6	50.53±3.02	14.62±1.69	6,09±1,9	5.2±13.1
	9	27.32±1.58	12.69±0.41	9,31±4,9	4±17.4
	13	19.59±1.13	10.24±0.43	12,2±9,3	3,6±5.44
	16	10.05±3.58	9.65±3.05	10,6±8,9	3.8±7.45
	20	4.49±2.59	8.50±1.09	9,6±6,2	9±2.12
3	6	100±0.0	66.48±3.38	72.4±38.8	72.7±32.2
	9	30.40±0.50	19.23±1.01	19.8±12.1	18.3±0.1
	13	19.18±1.33	12.67±2.17	12.7±41.4	19.4±33.1
	16	12.92±0.36	3.90±0.82	9.1±33.2	2.9±1.4
	20	7.71±0.41	3.77±0.88	4.5±26.2	3.6±2.01
4	6	7.84±1.69	2.64±1.01	2.5±11.2	6.8±5.35
	9	5.16±0.50	2.39±0.37	1.7±5.43	NI
	13	4.08±0.44	2.09±0.88	1.4±7.31	NI

Compuesto	Dias	*T. mentagrophytes*			
		Concentración (µg/mL ±SD)			
		300	**100**	**64.9**	**11.1**
	16	1.44±0.36	1.11±0.24	NI	NI
	20	1.00±0.41	0.97±0.27	NI	NI
5	6	15.00±7.07	NI	NI	NI
	9	10.00±00	NI	NI	NI
	13	NI	NI	NI	NI
	16	NI	NI	NI	NI
	20	NI	NI	NI	NI
6	6	17.25±2.52	10.92±3.05	12.3±1.2	7.56±6.01
	9	15.08±1.60	7.19±0.31	13.9±13	2.44±1.24
	13	11.76±2.70	5.95±0.97	23.5±22.3	9.2±18.2
	16	9.53±1.15	3.57±0.72	18.7±23.9	15.2±10.8
	20	2.19±0.24	1.57±1.15	25.6±10.2	23.2±17.1
7	6	14.69±0.57	3.45±1.12	12.2±5.42	7.9±3.79
	9	13.46±0.11	3.36±2.03	8.31 ±5.2	1.39±1.07
	13	12.23±3.38	2.80±2.18	4.77±1.32	3.24±1.88
	16	7.12±0.41	2.44±0.41	6.73±2.0	5.35±1.83
	20	6.08±0.13	1.45±0.60	13.1±5.5	7.08±3.79
8	6	14.98±2.51	4.10±0.27	9.74±3.89	NI
	9	13.43±2.82	3.09±0.85	7.40±1.4	NI
	13	12.74±1.01	2.82±1.25	2.28±1.00	NI
	16	6.83±0.82	2.65±1.42	1.39±2.02	NI
	20	3.00±0.12	2.29±0.48	1.41±0.31	NI
9	6	13.03±2.25	6.35±0.59	7.0±4.29	16.7±8.12
	9	9.98±0.50	5.28±1.50	5.8±11.8	15.1±1.55
	13	7.89±1.55	5.05±1.12	4.6±27.6	19.5±7.53
	16	5.66±1.65	4.19±1.24	3.5±23.8	13.5±11.1
	20	5.16±0.50	3.00±0.50	2.9.5±22.3	12.1±1.71
10	6	100±0.0	32.5±3.53	30.0±3.39	17.8±8.13
	9	100±0.0	19.00±1.41	NI	NI
	13	100±0.0	10.00±2.82	NI	NI
	16	100±0.0	5.00±1.41	NI	NI
	20	100±0.0	NI	NI	NI
Isoeugenol 11	6	41.51±2.04	9.84±3.89	9,7±0,98	9,28±0,12
	9	26.16±1.09	7.40±1.84	5,47±5,17	3,63±6,64

Compuesto	Dias	*T. mentagrophytes*			
		Concentración (µg/mL ±SD)			
		300	**100**	**64.9**	**11.1**
	13	23.100.82	2.38±1.00	2,83±1,06	1,4±6,78
	16	18.82±3.92	1.49±2.02	1,47±1,94	1,08±0,1
	20	13.860.82	1.41±0.41	1,26±5,03	1,0±8,05
Metil-isoeugenol 12	6	100±0.0	100±0.0	100±0.0	96,4±5,09
	9	100±0.0	100±0.0	100±0.0	94,5±7,68
	13	100±0.0	100±0.0	70.52±1.2	76,2±12.1
	16	100±0.0	100±0.0	68.5±1.3	48,2±2,1
	20	100±0.0	100±0.0	50.5±2.7	41,1±3,1

Adicionalmente, la terbinafina usada como medicamento de referencia fue evaluada frente a *T. mentagrophytes* en concentraciones de 0.1, 0.03, 0,01 y 0,003 µg/mL. Demostrando la inhibición del hongo durante los días del experimento con porcentajes entre el 98 al 4 % (ver figura 15).

Figura 15. Inhibición radial del micelio de T. mentagrophytes tratado con terbinafina



En adición, los derivados 3, 5, 7 y 12 inhibieron 100% el crecimiento micelial de *T. rubrum* al ser probados en la concentración de 300 µg/mL. Así mismo, los derivados 3 y 12 inhibieron solo hasta el día 9 el 100% del crecimiento micelial de este hongo en concentraciones de 100 µg/mL; inhibición que fue disminuyendo a medida del tiempo.

Igualmente, los derivados 8, 9 y 10 en el día 6 de tratamiento con 300 µg/mL mostraron una inhibición del 100% de *T. rubrum*, sin embargo, a lo largo del tiempo de incubación, el efecto disminuyó y con ello la inhibición (38 – 90%) (Ver tabla 7)

En la figura 16 se muestran los resultados de la terbinafina evaluada frente a *T. rubrum* en las concentraciones de 0.1, 0.03, 0,01 y 0,003 µg/mL. Indicando que el porcentaje de inhibición esta entre el 96 al 4 %.

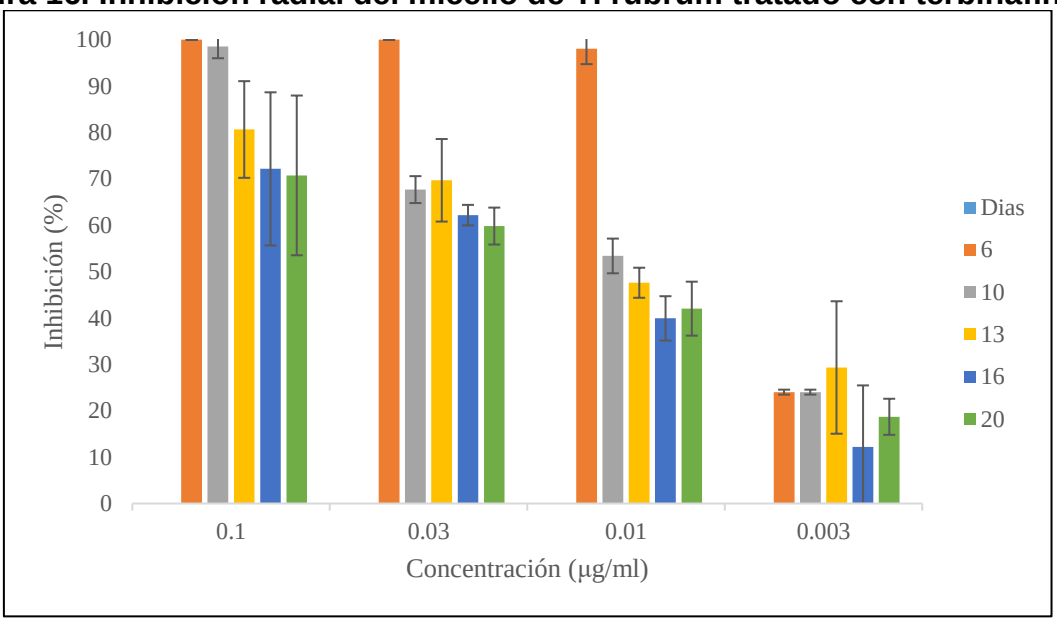
Tabla 6. Inhibición del crecimiento radial del micelio de T. rubrum luego del tratamiento con los derivados semisintéticos del eugenol. Los resultados expresados en porcentajes de inhibición ± DS fueron obtenidos a partir de tres experimentos independientes.

Compuesto	Dias	*T. rubrum*			
		Concentración (µg/mL ±SD)			
		300	**100**	**64.9**	**11.1**
Aceite Esencial	6	49,7±0,98	39,28±0,12	16.94±6.4	13.2±5.52
	9	35,47±5,17	33,63±6,74	15.48±3.1	8.21 ±5.35
	13	26,83±1,06	19,84±6,88	10.34±5.5	4.67±1.2
	16	26,47±1,94	15,08±0,71	9.7±1.21	6.73±2.5
	20	21,26±5,03	13,91±8,06	16.94±6.84	12.2±5.42
Eugenol	6	27,70± 7.68	22,18±14,65	13.4±5.80	4.82±3.70
	9	22,03± 4.0	16,81±11,57	12.6±12.4	7.91±6.12
	13	20,18± 3,59	14,87±4,57	14.5±12.3	6.21±7.41
	16	17,91±1,39	11,77±2,50	10.3±7.63	4.82±5.86
	20	17,15± 4.8	10,89±4,13	15.2±7.5	8.61±4.82
1	6	17.26±0.47	17.94±6.94	13.2±5.52	7.09±3.89
	9	20.19±2.93	15.49±3.18	8.31 ±5.25	1.49±1.06
	13	15.78±2.63	10.35±5.45	4.77±1.42	3.23±1.78
	16	20.52±1.86	9.47±1.31	6.83±2.05	5.45±1.93
	20	17.15±9.62	1.12±1.98	10.3±4.74	6.89±1.93
2	6	41.60±1.24	33.42±1.01	27.0±15.1	15.2±14.9

Compuesto	Dias	*T. rubrum*			
		Concentración (µg/mL ±SD)			
		300	**100**	**64.9**	**11.1**
	9	35.47±5.17	30.90±6.71	29.0 ±8.20	12.4±17.4
	13	26.47±1.94	17.25±8.11	15.8±7.93	8.36±5.44
	16	26.83±1.06	2.07±5.09	17.13±3.92	9.88±7.45
	20	21.26±5.03	1.64±2.48	15.0±2.21	10.9±2.12
3	6	100±0.0	100±0.0	77.6±32.6	74.7±36.9
	9	100±0.0	100±0.0	72.9±37.8	49.3±30.1
	13	100±0.0	69.15±5.34	52.7±41.4	39.4±37.1
	16	100±0.0	61.03±3.82	39.1±33.2	34.9±31.4
	20	100±0.0	54.82±2.59	42.5±26.2	37.6±26.01
4	6	41.91±1.82	21.46±9.66	12.5±11.2	6.78±5.35
	9	40.68±1.63	20.22±9.34	11.7±5.43	11.8±5.45
	13	30.00±2.31	18.95±1.22	10.4±7.31	16.3±16.3
	16	26.60±2.43	18.28±1.05	14.1±6.38	16.3±11.9
	20	28.71±2.44	17.39±7.83	12.2±6.30	16.2±13.7
5	6	100±0.0	31.00±8.47	14.4±5.90	4.92±3.70
	9	100±0.0	24.90±1.58	13.7±12.3	7.91±6.13
	13	100±0.0	20.67±4.68	14.5±13.3	6.21±7.41
	16	100±0.0	18.16±1.10	10.3±7.63	4.83±5.86
	20	100±0.0	17.99±9.21	15.2±7.58	8.71±4.92
6	6	36.64±1.78	27.75±2.00	13.3±11.2	6.56±6.01
	9	34.50±1.69	27.04±2.28	14.9±13.3	1.44±1.24
	13	30.41±2.18	21.26±2.39	24.5±24.3	19.2±19.2
	16	30.04±1.18	20.43±9.85	19.7±24.9	16.2±20.9
	20	28.13±2.36	17.34±3.17	26.6±20.2	22.2±18.1
7	6	100±0.0	100±0.0	72.4±38.9	14.7±10.4
	9	100±0.0	32.02±1.06	19.8±12.1	8.44±1.55
	13	100±0.0	42.25±1.77	25.5±13.5	17.4±6.63
	16	100±0.0	29.52±1.12	20.7±11.7	14.8±6.57
	20	100±0.0	32.33±5.12	26.8±5.07	19.7±1.54
8	6	100±0.0	69.93±4.25	69.6±42.9	14.04±0.06
	9	94.80±7.35	41.08±2.48	21.0±4.60	14.04±0.06
	13	69.09±2.33	39.67±2.10	26.1±7.92	21.96±8.37
	16	45.49±2.62	29.62±1.29	20.8±12.2	20.5±0.78
	20	43.38±2.88	28.91±1.83	21.7±3.63	17.6±0.02
9	6	100±0.0	81.04±2.68	37.0±4.39	16.8±8.13

Compuesto	Dias	*T. rubrum*			
		Concentración (µg/mL ±SD)			
		300	**100**	**64.9**	**11.1**
	9	84.20±2.23	27.70±2.20	22.8±11.9	15.1±1.67
	13	53.17±6.62	27.27±2.33	24.6±28.5	19.5±8.63
	16	43.75±4.72	27.08±1.94	27.5±24.8	14.5±12.1
	20	38.81±3.74	25.79±2.53	29.5±23.3	12.1±16.7
10	6	100±0.0	92.09±11.1	37.0±4.39	16.8±8.13
	9	80.40±2.77	41.10±3.25	23.4±11.1	16.1±0.25
	13	75.00±3.53	34.93±1.24	28.2±11.1	18.6±9.95
	16	49.31±3.93	28.20±2.20	27.5±24.8	14.5±12.1
	20	48.72±2.34	27.08±1.94	29.5±23.3	12.1±16.7
Isoeugenol 11	6	44,35±16,73	17,51±11,9	NI	NI
	9	40,86±18,16	16,17±1,39	NI	NI
	13	37,66±25,30	15,57±1,11	NI	NI
	16	36,24±6,97	14,37±9,10	NI	NI
	20	40,37±14,89	7,4±0,37	NI	NI
Metil-isoeugenol 12	6	100±0.0	100±0.0	100±0.0	
	9	100±0.0	100±0.0	100±0.0	
	13	100±0.0	73.52±1.2	70.52±1.2	
	16	100±0.0	61.42±1.4	58.5±1.3	
	20	100±0.0	44.75±2.8	40.5±2.7	

Figura 16. Inhibición radial del micelio de T. rubrum tratado con terbinafina



En el caso de *T. tonsurans,* los derivados 3, 7, 9 y 12 demostraron inhibir el 100% del crecimiento micelial de este dermatofito en concentraciones de 300 y 100 µg/mL durante los 20 días de exposición a los compuestos. De la misma forma, el derivado 8 presentó inhibición del 100% hasta el día 16 de tratamiento en concentraciones de 300 y100 µg/mL. A su vez, el derivado 10 solo en concentraciones de 300 µg/mL inhibió el 100% (ver tabla 7).

Tabla 7. Inhibición del crecimiento radial del micelio de T. tonsurans luego del tratamiento con los derivados semisintéticos del eugenol. Los resultados expresados en porcentajes de inhibición ± DS fueron obtenidos a partir de tres experimentos independientes realizados por triplicado. NI: No inhibe.

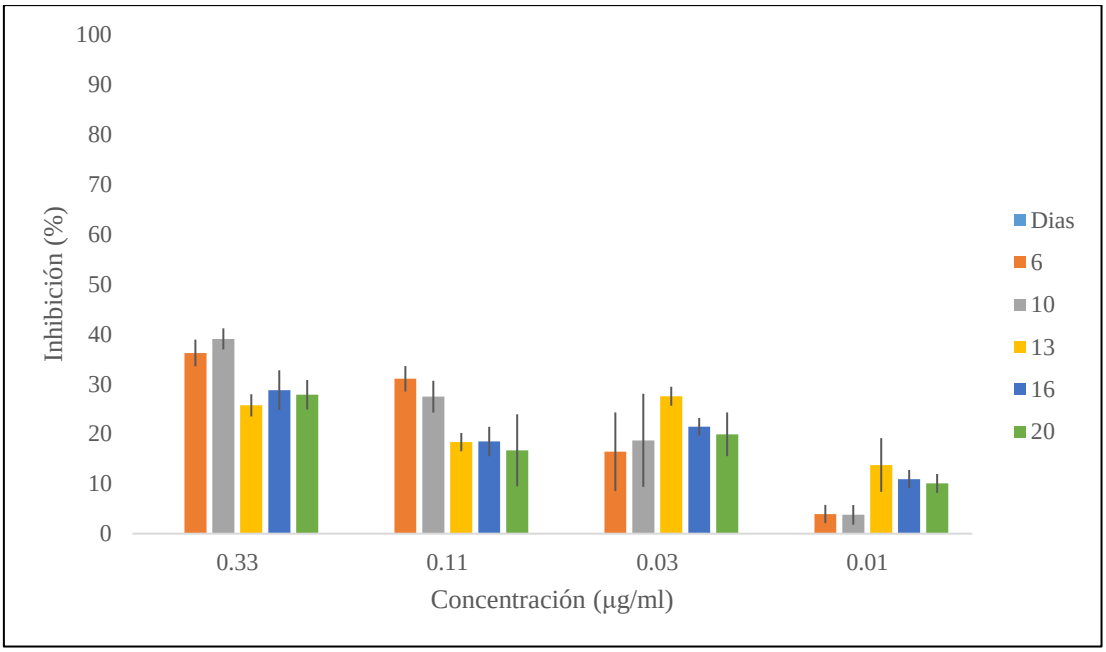
Compuesto	Día	*T. tonsurans* Concentración (µg/mL ±SD)	
		300	100
Aceite Esencial	6	13,04±0,0	NI
	9	0,79±0.0	NI
	13	NI	NI
	16	NI	NI
	20	NI	NI
Eugenol	6	100±0.0	40,57±9,04
	9	100±0.0	18,64±2,80

Compuesto	Día	*T. tonsurans* Concentración (µg/mL ±SD)	
		300	**100**
	13	100±0.0	2,114±0,57
	16	100±0.0	NI
	20	100±0.0	NI
1	6	28.34±1.87	29.23±1.38
	9	27.79±1.65	27.10±1.83
	13	20.34±1.87	24.43±2.34
	16	20.16±2.00	22.10±1.83
	20	19.11±1.81	17.56±1.02
2	6	29.67±21.37	21.34± 13.94
	9	27.67±23.42	17.57± 13.94
	13	24.41±29.67	12.66± 8.49
	16	22.25±13.29	11.80± 7.56
	20	17.83±24.10	6.303± 3.63
3	6	100±0.0	100±0.0
	9	100±0.0	100±0.0
	13	100±0.0	100±0.0
	16	100±0.0	100±0.0
	20	100±0.0	100±0.0
4	6	23.51± 5.78	14.01± 2.14
	9	16.36± 13.03	4.67± 3.24
	13	15.19± 6.13	2.51± 1.53
	16	15.08± 12.24	3.96± 2.11
	20	13.08± 10.64	3.15± 2.03
5	6	19.22± 0.87	19.22± 0.87
	9	16.61± 8.76	14.84± 9.21
	13	15.98± 12.31	14.32± 6.01
	16	12.58± 12.10	11.07± 9.65
	20	12.51± 1.20	8.0± 8.88
6	6	28.76±17.27	19.70± 16.07
	9	16.90±13.62	18.82 ± 0.31
	13	14.86±15.33	11.26± 3.80
	16	13.23±11.59	10.76± 9.22
	20	11.28±10.34	10.57± 12.51
7	6	100±0.0	100±0.0

Compuesto	Día	*T. tonsurans* Concentración (µg/mL ±SD) 300	100
	9	100±0.0	100±0.0
	13	100±0.0	100±0.0
	16	100±0.0	100±0.0
	20	100±0.0	100±0.0
8	6	100±0.0	100±0.0
	9	100±0.0	100±0.0
	13	100±0.0	100±0.0
	16	100±0.0	100±0.0
	20	77.27± 0,71	80.23± 0,62
9	6	100±0.0	100±0.0
	9	100±0.0	100±0.0
	13	100±0.0	100±0.0
	16	100±0.0	100±0.0
	20	100±0.0	100±0.0
10	6	100±0.0	19.56±3.06
	9	100±0.0	8.73±0.0
	13	100±0.0	2.14±0.0
	16	100±0.0	NI
	20	100±0.0	NI
Isoeugenol 11	6	44,35±16,73	17,51± 11,9
	9	40,86±18,16	16,17±1,39
	13	40,37±14,89	15,57±1,11
	16	37,66±25,3	14,37± 9,10
	20	36,24±6,97	7,46±0,37
Metil-isoeugenol 12	6	100±0.0	100±0.0
	9	100±0.0	100±0.0
	13	100±0.0	100±0.0
	16	100±0.0	100±0.0
	20	100±0.0	100±0.0

En adición, el medicamento de referencia evaluado en concentraciones de 0.33, 0.11, 0,03 y 0,01 µg/mL frente a *T. tounsurans* demostró una inhibición antifúngica entre el 38 al 5 % durante los días del experimento. Ver (Figura 17)

Figura 17. Inhibición radial del micelio de T. *tounsurans* tratado con terbinafina.

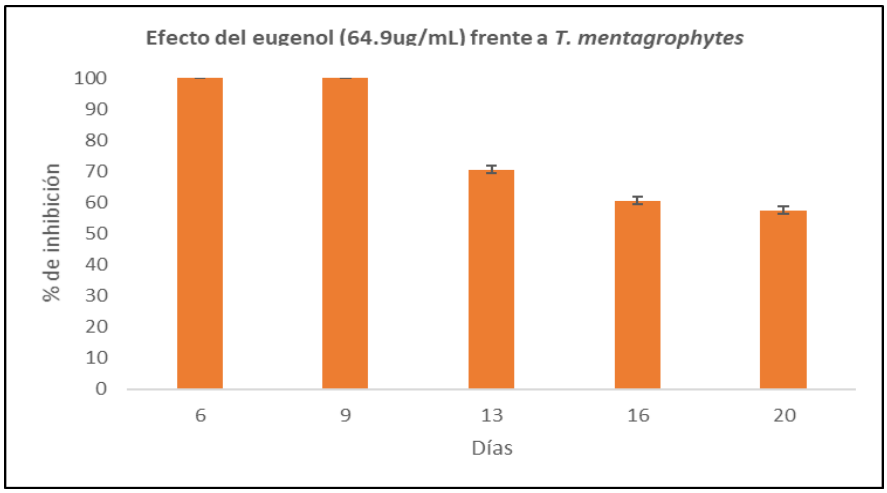


En resumen, metil-isoeugenol (derivado 12) demostró inhibir las tres especies de dermatofitos probadas en este trabajo cuando fue evaluado en las concentraciones de 300 y 100 µg/mL. El derivado 10 inhibió *T. mentagrophytes y T. tonsurans* en un 100% en concentraciones de 300 µg/mL y frente a *T. rubrum* aunque inhibió su crecimiento, su efectividad no se mantuvo durante el tiempo del ensayo (20 días). En el caso del derivado 7, su actividad fue demostrada frente *a T. rubrum y T. tonsuran* en las mayores concentraciones evaluadas.

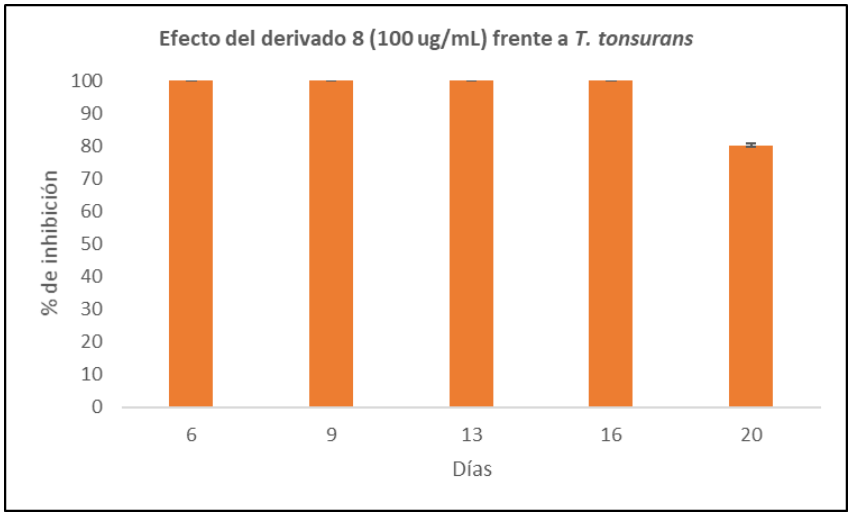
Adicionalmente se observó un posible efecto fungiestático con algunos de los derivados semisintèticos del eugenol evaluados en este estudio. En el caso de *T. mentagrophytes* se observó que el eugenol en la concentración de 64.9 µg/mL inhibió el 100% del crecimiento micelial hasta el día 9, este efecto disminuyó con el tiempo de incubación en un 70% en el día 13 (ver figura 18A). De igual forma, con el derivado 8 en concentración de 100 µg/mL frente a *T. tounsurans* se observó el mismo efecto hasta el día 16 (100% de inhibición) disminuyendo en casi un 80% al día 20 (ver figura 18B). Así mismo, los derivados 8, 9 y 10 en concentración de 300 µg/mL frente a *T. rubrum* mostraron inhibir el 100% del crecimiento hifal hasta el día 6 (figura 18C). Los derivados 3 y 12 en concentración de 100 µg/mL frente a *T. rubrum* inhibieron hasta el día 9 el 100% del crecimiento de este dermatofito (Ver figura 18D).

Figura 18. Resultados de la Inhibición radial del micelio: posible efecto fungiestático

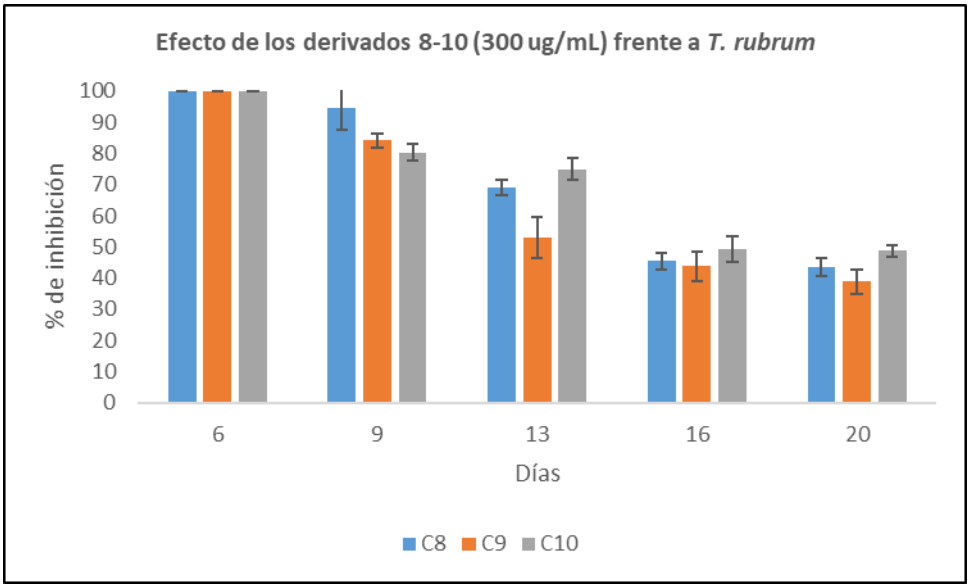
A.



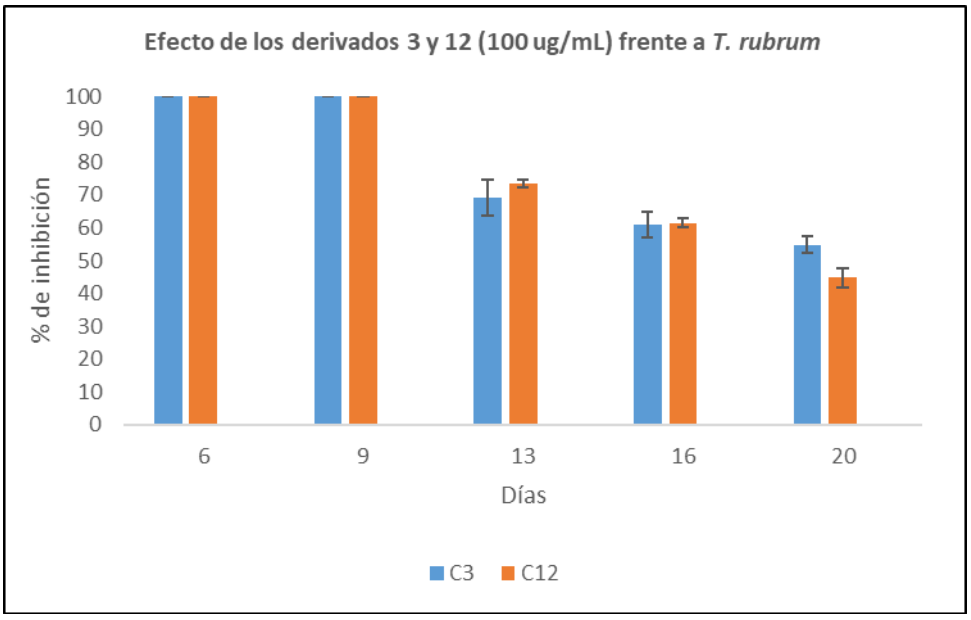
B.



C.



D.

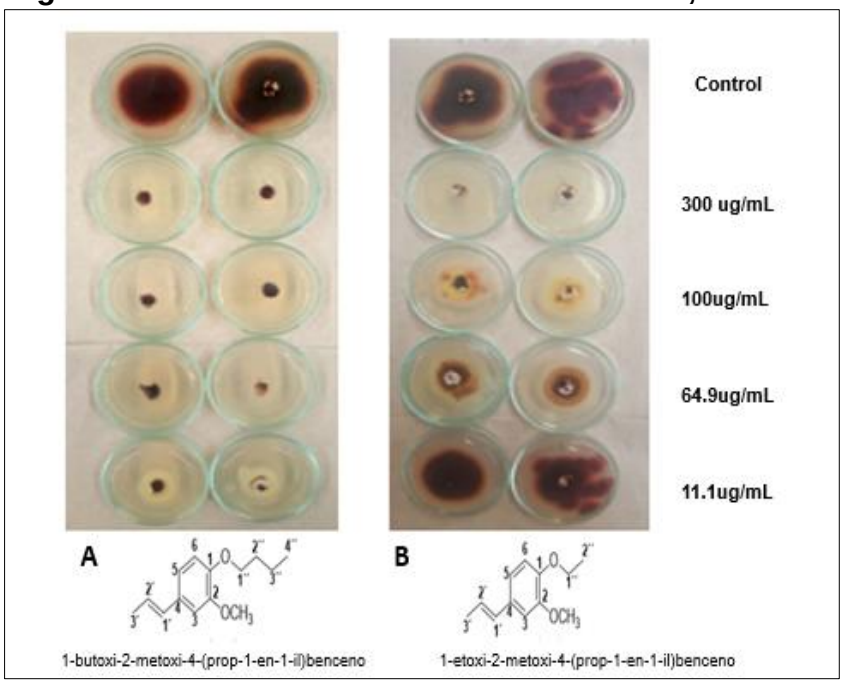


Por otra parte, se observó un efecto inhibitorio de la producción del pigmento de *T. rubrum* luego del tratamiento con los derivados 3 y 8 (ver figura 15). En el caso del derivado 3, se observa la inhibición del 100% como se describió anteriormente a una concentración de 300 µg/mL, este efecto va disminuyendo con el tiempo y

exposición al compuesto (ver tabla 7 y figura 15), sin embargo, el crecimiento del hongo continua al ser expuesto en las menores concentraciones y una disminución en la producción de pigmento es observada.

El derivado 8 que mostró una inhibición parcial del micelio entre un 69 a 100% en concentraciones de 300 µg/mL, también mostró una disminución en la producción de pigmento de *T. rubrum* efecto del tratamiento (figura 15). Esta pigmentación fue disminuyendo con la dosis y el tiempo.

Figura 19. Efecto inhibitorio de los derivados 3 y 8 sobre la pigmentación de T. r*ubrum* luego de 10 días de tratamiento. A. derivado 3; B: derivado 8.

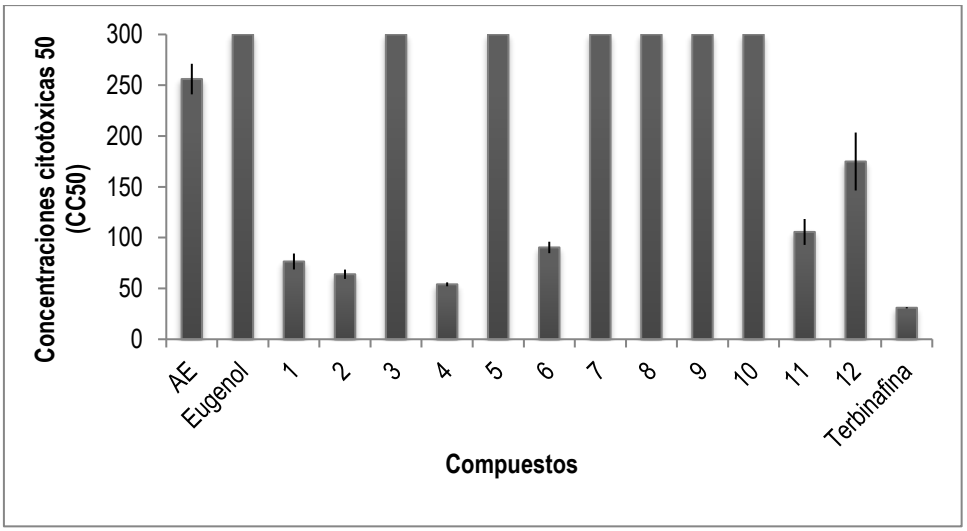


La citotoxicidad de los derivados del eugenol fue evaluada frente a células Vero. Los resultados se muestran en la tabla 9 y figura 16. En general no se observó toxicidad de los derivados del eugenol con CC_{50} entre 54.06 a >300 µg/mL y CC_{90} >300 µg/ml. El AE, eugenol y los derivados 7-12 mostraron CC_{50} >100 µg/ml, así mismo, eugenol y los derivados 3, 5 y 7-10 no presentaron toxicidad a la máxima concentración evaluada de cada compuesto, por tanto, concentraciones mayores a 300 µg/ml deben ser probadas para determinar la CC_{50} y CC_{90} específica de estos compuestos. La terbinafina, usado como medicamento de referencia mostró ser más tóxico que los diferentes derivados del eugenol (CC_{50} 31.0 µg/mL, $p<0.05$).

Tabla 8. Citotoxicidad frente a células Vero de compuestos en estudio. ND: no determinado, hace referencia a la máxima concentración evaluada de 300 ug/mL.

Compuesto	Células Vero	
	CC_{50} ±SD	CC_{90} ±SD
Aceite Esencial	265.10 ±15.05	ND
Eugenol	ND	ND
1	76.54 ±7.86	ND
2	63.99 ±4.57	ND
3	ND	ND
4	54.06±1.91	ND
5	ND	ND
6	90.36 ±5.63	ND
7	ND	ND
8	ND	ND
9	ND	ND
10	ND	ND
Isoeugenol 11	105.62 ±12.75	ND
Metil-isoeugenol 12	174.94 ±28.52	ND
Terbinafina	31.00 ±0.61	ND

Figura 20. Resultados del Efecto citotóxico de los compuestos en estudio frente a células Vero.



Efecto citotóxico de los compuestos en estudio frente a células Vero. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes. Cuatro concentraciones fueron evaluadas (300, 100, 33.3 y 11.1 ug/mL), cada una por triplicado mediante método colorimétrico.

5. DISCUSIÓN

Las especies del género *Trichophyton* son reconocidas por ser los principales agentes etiológicos causantes de dermatofitosis (Trujillo, 2015) Estos hongos tienen la capacidad de infectar tanto piel, uñas y pelo presentando manifestaciones clínicas que afectan la piel glabra como *tinea* corporis (Bohorquez, 2010). *T. rubrum* es reportado como la especie más prevalente afectando niños y adultos (69.5%), seguido por *T. mentagrophytes, T. verrucosum y T. tonsurans* (Uribe y Cardona, 2013) El tratamiento de esta infección se remite al uso de antimicóticos sistémicos y tópicos de efectividad variable, terapias prolongadas (1-6 meses) y efectos adversos que limitan el uso. Adicionalmente, son de libre acceso, lo cual ha generado la emergencia de cepas resistentes, principalmente al fluconazol (Gross-Martínez *et al,* 2014). De acuerdo con lo anterior, múltiples investigadores han enfocados sus trabajos en el estudio de nuevas moléculas tanto naturales como sintéticas con posible efecto antifúngico. En este sentido, el eugenol, un compuesto fenólico, liposoluble y no tóxico, extraído naturalmente diferentes plantas pertenecientes a las familias *Lamiaceae*, *Lauraceae*, *Myrtaceae*, y *Myristicaceae y* usado en la industria alimentaria y cosmética (Marchese *et al.,* 2017) ha demostrado presentar efecto antimicrobiano, antioxidante e insecticida, (Maldonado *et al,* 2008) se convierte en un sustrato para la síntesis de nuevas entidades químicas con potencial efecto antimicótico.

En este trabajo, se evaluaron doce derivados semisintéticos del eugenol frente a tres especies de dermatofitos del género *Trichophyton,* así como su efecto citotóxico en células de mamífero. La actividad de los derivados probados frente a estos hongos no ha sido reportada en la literatura, sin embargo, el efecto del aceite esencial de *E. cariophylla* y el eugenol (componente principal del aceite esencial) han sido ampliamente estudiados. De esta manera, estos dos últimos sustratos fueron evaluados en este estudio como controles, con la finalidad de comprobar su actividad antifúngica bajo nuestras condiciones experimentales. Lee y colaboradores informaron la actividad antifúngica del eugenol extraído del aceite de ciprés japonés contra *M. gypseum* en un modelo *in vivo*, ellos sugirieron al eugenol como un suplemento antifúngico en la terapia de las lesiones causadas por este dermatofito (Lee y T.,2007) .Así mismo, Pinto y colaboradores evaluaron el efecto del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (L.) y eugenol en diferentes especies de dermatofitos *(Trichophyton rubrum, T. mentagrophytes, M. canis, M. gypseum y Epidermophyton floccosum),* la determinación de los valores de MIC para estos hongos fue entre 0,08 -0,16 µl/mL (v/v), cuando fueron tratados con el aceite esencial y eugenol puro; *M. canis*, a diferencia de los otros dermatofitos, presentó una MIC de 0,08 µl/mL (v / v) al ser tratado con eugenol (Lee SJ, 2007). Del mismo modo, Rana y colaboradores informaron el efecto inhibitorio del aceite esencial de

Syzygium aromaticum (L.) frente a *T. rubum* y *M. gypseum* con MIC entre 9-12 ug/ml. Una corta exposición de Gayoso y colaboradores también demostró el efecto inhibitorio del aceite esencial de *E. cariophyllata* (MIC 2%) y eugenol (MIC 4%) frente a dermatofitos y levaduras que causan *onicomicosis (Candida albicans, Candida tropicalis, Candida krusei, T. rubrum, T. mentagrophytes y Geotrichum candidum)* (Rana y Singh, 2011).

En contraste con estos resultados, este estudio mostró una susceptibilidad baja de las especies de *Trichophyton* evaluadas contra eugenol y AE de *Syzygium aromaticum* (L.) con MIC de 125 ug/ml. Estas diferencias podrían ser determinadas por las diferentes cepas utilizadas en los estudios las cuales fueron obtenidas por los investigadores a partir de American Type Culture Collection (ATCC, en inglés), aislados clínicos u otros bancos de células (Pinto *et al*., 2009; Rana *et al.,* 2011), además, las diferentes condiciones ambientales, climáticas o de cultivo de la planta, así como el lugar de extracción del aceite esencial a partir de la misma (hojas, tallos, raíz, flor), entre otras, podrían tener también influencia en la composición del aceite esencial y por tanto en su actividad biológica. De la misma manera, la fuente de eugenol puede ser comercial (en el caso del presente estudio) o ser extraído de otros árboles como nuez moscada, canela o clavo; según sea su origen, la actividad biológica podría variar (Chaieb *et al*., 2007). En adición, una alta variabilidad en los resultados de susceptibilidad para dermatofitos, obtenidos mediante metodologías como el test de microdilución, macrodilución, entre otros, ha sido reportado. Lo anterior, se atribuye a los variados parámetros biológicos empleados por los investigadores como inóculo, temperatura, tiempo de incubación y criterios de valoración, entre otros, que juegan un rol importante en la estandarización de las metodologías empleadas, aún recomendadas por el CLSI (Fernández, FJ, y AJ, 2002)

Complementariamente, un estudio basado en la recopilación de reportes sobre el eugenol y su efecto antimicrobiano, demostró el gran potencial de este compuesto fenólico frente a bacterias Gram negativas y Gram positivas, así mismo, frente a hongos levaduriformes (*Candida spp, Criptococcus spp*) y filamentosos (*Aspergillus spp, Alternaria spp, Cladosporium spp, Rhizopus spp, Fusarium spp, Microsporum spp, T. rubrum,* entre otros) de importancia clínica (Marchese *et al*, 2017). Estos autores presentan a su vez, diferentes mecanismos de acción del eugenol frente a hongos y bacterias (Ver figura 21). En el caso de los hongos ha sido reportado: a) inhibición de la síntesis de ergosterol mediante la formación de complejos con este componente importante de la membrana celular (Marchese *et al.,* 2017), b) la desnaturalización de proteínas, c) reacciones con los fosfolípidos de la membrana, y esto último gracias a la naturaleza del grupo OH que forma un puente de hidrogeno con un centro enzimático activo, estos últimos dos mecanismos cambian la fluidez

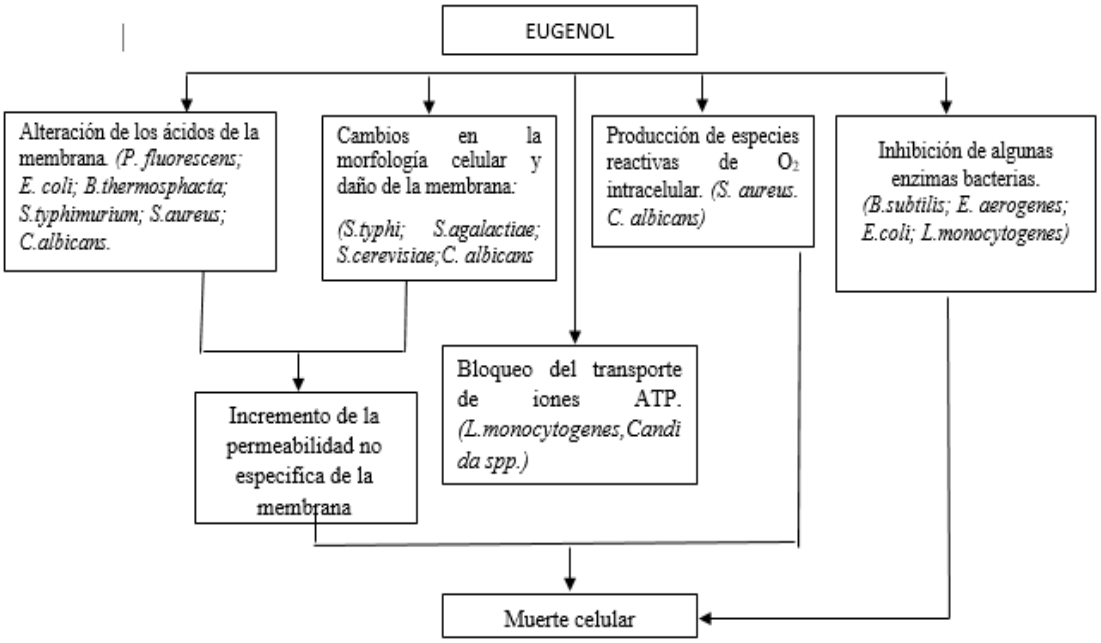
y la permeabilidad de la membrana provocando la muerte celular (Bhuiyan *et al.,* 2010), d) afectación del transporte de iones y ATP y, e) aumento de la producción intracelular de ROS que causa peroxidación lipídica de la membrana citoplasmática y muerte celular (Khan *et al*., 2011). Adicionalmente, el mecanismo de acción del eugenol en dermatofitos (*T. rubrum*) fue descrito por De Oliveira y colaboradores quienes demostraron que el blanco de acción de este fenol es el ergosterol, un componente principal de la membrana celular del hongo; de esta manera, el bajo contenido de ergosterol podría causar la perdida de la integridad y funcionalidad de esta organela mediante la inhibición de la biosíntesis del ergosterol (De Oliveira *et al*, 2013). En este estudio no se evaluó el mecanismo de acción de los derivados semisintèticos, estudios futuros enfocados en este tema, podrían ser tenidos en cuenta.

Por otra parte, la inhibición del crecimiento radial del micelio de los tres dermatofitos fue evaluada. Los resultados demostraron 100 % de inhibición de esta estructura fúngica cuando derivados como 3, 5, 7-12 inhibieron el crecimiento de los dermatofitos en estudio en concentraciones de 300 ug/mL y los derivados 3 y 7-9, 12 en concentraciones de 100 ug/ml. Estos datos demuestran un potencial efecto antimicótico frente a esta fase vegetativa de los hongos involucrada en el proceso de patogénesis de la enfermedad. Teniendo en cuenta estos resultados, es importante mencionar que durante este proceso o establecimiento de la infección, las conidias son reportadas por ser las que realizan el primer contacto del hongo con la piel, proceso que involucra la expresión de adhesinas quienes son las encargadas de este primer paso, posteriormente, el proceso de invasión empieza con las hifas, las cuales emprenden su crecimiento longitudinal y transversal para alcanzar niveles anatómicos más profundos en los tejidos queratinizados (Uribe, M. P, y Cardona 2013). De acuerdo con lo anterior, los resultados presentados demuestran el alto potencial antifùngico de los derivados del eugenol. Adicionalmente, cambios en la formación de las hifas de *T. rubrum* tratado con eugenol fueron presentados en un estudio realizado por Oliveira y colaboradores quienes evidenciaron hifas gruesas, cortas y torcidas afectando igualmente la generación de clamidoconidias en esta especie, adicionalmente, alteraciones en la conidiogénesis de este hongo, fueron observadas (De Oliveira *et al*, 2013).

Un posible efecto fungiestático de algunos de los derivados (eugenol, derivados 3, 8-12) relacionado con el tiempo de incubación fue observado. Inhibiciones del 100% del crecimiento radial del micelio de los dermatofitos fue obtenido durante los primeros días de incubación, sin embargo, este efecto disminuyó con el tiempo. Lo anterior, podría sugerir la aplicación de una segunda dosis durante la experimentación a fin de evaluar la continuidad de un efecto fungicida constante de los compuestos.

La literatura poco reporta estudios de susceptibilidad frente a *T. tonsurans*, un dermatofito de distribución limitada en Latinoamérica y sur de Estados Unidos; la frecuencia de esta especie en América Latina es estimada entre 3 – 6.9%(Bonifaz, 2015). Es un dermatofito causante de la *tinea* capitis (*Tinea* seca de la cabeza, variedad tricofìtica) y *tinea* corporis que afecta aproximadamente un 15% de la población en riesgo, principalmente niños. En este contexto, se quiere resaltar la importancia de este trabajo en la inhibición del crecimiento de esta especie de *Trichophyton*; un efecto antifúngico del 100% sobre el crecimiento micelial de *T. tonsurans* fue observado luego del tratamiento del hongo con los derivados 3, 7, 10 y 12 en concentraciones de 300 y 100 ug/mL. Adicionalmente, el derivado 9 también inhibió 100% esta estructura vegetativa en concentraciones de 300 ug/mL únicamente (Tabla 8). Es importante mencionar que para la evaluación del crecimiento radial del micelio de *T. tonsurans*, solo fueron probadas las concentraciones de 300 y 100 ug/ml debido al efecto antifúngico obtenido con los otros dermatofitos evaluados en este estudio y teniendo en cuenta que menores concentraciones de los derivados no presentaban efecto sobre los hongos.

Figura 21. Efectos del Eugenol frente a microorganismos.



Fuente: Marchese, A; Barbieri; Coppo, E; IE, Orhan. Actividad antimicrobiana del eugenol y aceites esenciales que contienen eugenol: un punto de vista mecanicista. Crit Rev Microbiol. 2017. 43 (6): 668-689

Paralelo a la inhibición del crecimiento radial del micelio, un cambio fenotípico posterior al tratamiento con los derivados 3 y 8 fue reflejado en la disminución y/o ausencia de la pigmentación de *T. rubrum*. Normalmente, cambios en el fenotipo de los microorganismos son consecuencia de variaciones ambientales y se relacionan con modificaciones genotípicas en genes funcionales (Guoling *et al*, 2006); lo anterior, sugeriría que muy posiblemente los derivados semisintéticos del eugenol interfieren con rutas biosintéticas involucradas en este fenómeno de generación de pigmentación en *T. rubrum* (Guoling *et al*, 2006).

Como se mencionó anteriormente, aún no se encuentran informes en la literatura sobre la actividad antifúngica de los derivados semisintéticos del eugenol probados en este estudio, sin embargo, las propiedades insecticidas del isoeugenol (LD_{50} 44.0µg / L) se han demostrado para el control de *Spodoptera littoralis*, un insecto considerado como una plaga de tabaco, maíz, algodón y algunos vegetables (De Leo F, 2002) . En adición, el efecto antibacteriano del metil isoeugenol, isoeugenol y eugenol contra *Campylobacter jejuni,* el agente causante principal de la gastroenteritis en humanos, fue reportado con valores de CMI de 250, 125 y 250 mg/ml, respectivamente.

En este estudio, la terbinafina fue usada como fármaco de referencia, un antimicótico de amplio espectro derivado de alilamina, este fármaco se selecciona como segunda opción para el tratamiento de la micosis cutánea, en casos de fracaso terapéutico con los azoles, es igualmente empleado. Sin embargo, se describen diferentes efectos adversos luego de su uso: dolor muscular, erupción, dolor de cabeza, náuseas, diarrea y distensión abdominal, entre otros (Haugh M, 2002). Un efecto antifúngico fue observado con concentraciones <0,3 ug/ml, así mismo, su toxicidad se demostró en nuestro modelo celular *in vitro* con CC_{50} 31 ug/mL (véase la Tabla 9).

En cuanto a los compuestos, un parcial efecto citotóxico fue observado con CC_{50} entre 54.06 - <300 ug/ml (véase la tabla 9). El eugenol, AE, y los derivados 3, 5, 7-10 presentaron menor toxicidad en comparación con derivados 1, 2, 4, 6, 11, 12 y la terbinafina ($p < 0,05$). Adicionalmente, todos los compuestos evaluados fueron menos tóxicos que el medicamento de referencia ($p<0.05$).

La toxicidad *in vitro* del eugenol extraído como componente importante del aceite esencial de *Ocimum gratissimum* fue evaluado por Binh y colaboradores sobre una línea no cancerígena de fibroblastos humanos WI38 y macrófagos murinos J774, ellos demostraron un 80% de viabilidad celular cuando fueron expuestos durante 72

horas con 50 ug/ml (Binh Le T *et al*., 2007) . Contrario a estos resultados, una alta toxicidad y genotoxicidad del eugenol sobre fibroblastos de pulpa dental humana de dientes primarios a concentraciones de 0.06uM fue reportada. Del mismo modo, Prashar y colaboradores informaron la alta citotoxicidad del aceite esencial del *Syzygium aromaticum* y eugenol en fibroblastos humanos (153BR), fibroblastos dérmicos humanos normales (HNDF), los cultivos primarios obtenidos de la biopsia y células HMEC-1, una línea celular endotelial microvascular dérmico humano transformado; la viabilidad de las tres líneas celulares sometidas se redujo en 60-90% cuando la concentración de aceite aumentó de 0,01% a 0,03%; además, el aumento de la concentración de eugenol de 0,03% a 0,06%, disminuyó la viabilidad celular de 60% a <20% (Prashar A, 2006).

Adicionalmente el efecto citotóxico del eugenol en células de leucemia promielocitica humana (HL60) a una concentración de 23.7 uM fue reportada (Yoo *el*.,*at* 2005) . Otro estudio evidenció igualmente la toxicidad de componentes mayoritarios como el eugenol, 1,8- cineol, terpineno 4-ol, limoneno y citral de aceites esenciales de *Zanthoxylum schinifolium, Melaleuca alternofolia* y *Eugenia cariophyllata* sobre líneas celulares de leucemias mieloides, linfoides, cáncer de hígado, melanoma y cáncer de cérvix (Zapata *et al.,* 2009).

A pesar de encontrar algunos efectos citotóxicos de algunos componentes naturales, es importante resaltar que el aceite de clavo, isoeugenol y eugenol continúan siendo reconocidos como 'seguros' según Food Drug Administration (FDA, escrito en inglés), son usados como cemento dental y como aditivo de alimentos (Escobar, 2002).

Finalmente, los resultados presentados, además de originales, son promisorios para continuar con estudios preclínicos y avanzar en la investigación de futuras terapias antidermatofítica basadas en plataformas naturales como el eugenol.

6. CONCLUSIONES

- El interés de estudiar nuevas moléculas con potencial efecto antifúngico para tratar las dermatofitosis causadas por hongos del género Trichophyton spp, dada las limitaciones de las terapias actuales, originó este trabajo. De esta forma, los resultados obtenidos contribuyen a la generación de nuevo conocimiento mediante el aporte de nuevas alternativas para el avance en la investigación de tratamientos para esta infección.

- Isoeugenol (derivado 11) y metil-isoeugenol (derivado 12) demostraron ejercer la mejor actividad fungiestática y fungicida frente a las tres especies de Trichophyton evaluadas, en comparación con el eugenol y el aceite esencial de *Eugenia cariophylla.*

- Así mismo, varios de los compuestos estudiados inhibieron el 100% del crecimiento micelial de las tres especies de dermatofitos probadas, demostrando un potencial efecto antifúngico cuando concentraciones de 100 y 300 ug/mL fueron evaluadas, siendo metil-isoeugenol, el compuesto con mayor actividad antidermatofítica. Adicionalmente, cambios fenotípicos relacionados a la generación del pigmento de *T. rubrum* luego del tratamiento con los derivados 3 (1-butoxi-2-metoxi-4-(prop-1-en-1-il)benceno) y 8 (1-etoxi-2-metoxi-4-(prop-1-en-1-il)benceno) fueron observados.

- Los derivados probados en este estudio no presentaron mayor actividad antifúngica en comparación con la terbinafina usada como medicamento de referencia, pero, fueron selectivos y no tóxicos *in vitro* para las células de mamífero.

- Finalmente, estos resultados realizan un aporte al conocimiento de nuevas entidades químicas con potencial efecto antimicótico y baja toxicidad *in vitro.* Lo anterior representa un avance en el proceso pre-clínico de desarrollo e investigación de nuevos fármacos que a corto y mediano plazo podrían continuar con las siguientes etapas pre-clínicas y a largo plazo con análisis complementarios, convertirse en posibles candidatos para la terapia antifúngica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arango, M., & Elizabeth, C. (2013). Micosis humanas : procedimientos diagnósticos, exámenes directos. Medellin

BasualdoJA, C. C. (1996). Diagnostico virologico. Microbiologia medica, 598,607.

Bonet R, G. A. (2005). Dermatomicosis:Clasificación, diagnóstico y tratamiento. Offarm, 24(6):56-63.

Bonifaz. (2015). Micologia Medica Basica. Mexico: MCGRAW-HILL.

_____. (2010). Micologia medica basica . Mexico: McGRAW-HIL.

Borman, Campbell, C., & Fraser, J. E. (2007). Análisis de las especies de dermatofitos aisladas en las Islas Británicas entre 1980 y 2005 y revisión de las tendencias mundiales de los dermatofitos en las últimas tres décadas. Med Mycol., 45 (2): 131-41.

Bruatto, V., Vidotto, & Valverde, G. L.-M. (1991). Dermatofitosis en Gusco (Perú). Mycoses, 183-6.

Burt. (2004). Aceites esenciales: sus propiedades antibacterianas y posibles aplicaciones en los alimentos: una revisión. od Microbiol., 94 (3): 223-53.

Cabañes, J. (2001). Identificacion de hongos dermatofitos. Iberoamericana de Micologia, 12-1 a 12-11.

Cai, L., & Wu, C. .. (1996). Compuestos de Syzygium aromaticum que poseen actividad inhibidora del crecimiento contra patógenos orales. J Nat Prod., 59 (10): 987-90.

Chaieb, K. (2007). La composición química y la actividad biológica del aceite esencial de clavo de olor, Eugenia caryophyllata (Syzigium aromaticum L. Myrtaceae): una breve reseña. Phytotherapy Research 21 (6): 501-6, 21 (6): 501-6 ·.

Chastain, R. R. (2001). Dermatofitosis profunda: informe de 2 casos y revisión de la literatura. Cutis., 457-62.

Crespo, V., & Vicente, D. (2006). Atlas de Micología Cutánea. Madrid: Barcelona.

Cuétara MS, D. P. (1997). Prevalence of undetected tinea capitis in a school survey in Spain. Mycoses. Mycoses, 40:131-7.

Dahl, M., & SA, G. (1994). Chronic dermato-phytosis: what is special about Trichophyton rubrum? Adv Dermatol, 9:97-109; dis-cussion 110-1.

De Leo F, G. R. (2002). El inhibidor de tripsina 2 de mostaza afecta la fertilidad de las larvas de Spodoptera littoralis alimentadas con plantas transgénicas. Insecto Biochem Mol Biol., 489-96.

Del Palacio, A. C. (1994). Analisis en el tratamiento de la onicomicosis y dermatofitos. Medicine, 6-24-36.

Echevarria, L. (2016). Reseña historica del descubrimiento de hongos dermatofitos del siglo 1 hasta trabajos actuales. scientific International journal, vol. 13.

Edlind, J.-P. V. (2004). Resistencia al Azole en Candida glabrata : coordinación de la regulación de múltiples transportadores y evidencia de un factor de transcripción tipo Pdr1. Antimicrob Agents Chemother, 48 (10), 3773-3781.

Elewski, & Hazen, P. (1989). Las micosis superficiales. J Am Acad Dermatol., 655-73.

Escobar, R. G. (2002). Eugenol: propiedades farmacológicas y toxicológicas. Ventajas y desventajas de su uso. Rev Cubana Estomatol , v.39 n.2 .

Esquenazi, A. C.-t. (2004). The influence of surface carbohydrates during in vitro infection of mammalian cells by the dermatophyte Trichophyton rubrum. Microbiol, 155(3):144-53.

Fernández, T., FJ, C., & AJ, C.-M. (2002). Evaluación colaborativa de las condiciones óptimas de prueba de susceptibilidad antifúngica para dermatofitos. Clin Microbiol., 40 (11): 3999-4003.

FilgueirasI, C., & Dantas, M. C. (2006). Effect of eugenol on growth and listeriolysin o production by Listeria monocytogenes. Braz. arch. biol. technol, . vol.49 no.3.

Giddey K, F. B. (2007). Quadroni M, Monod M. Closely related dermatophyte species pro-duce different patterns of secreted proteins. Microbiol Lett , 267(1):95-101.

Gonzalez, A., & A, L. (2013). Extracto y aceite esencial del clavo de olor (Syzygium aromaticum9 y su potencial aplicacion como agente antimicrobiano en alimentos. Departamento de ingenieria quimica, 35-41.

Graser Y, E. F. (1998). Identification of common dermatophytes (Trichophyton,Microsporum, Epidermophyton) using polymerase chain reactions. British Association of Dermatology, 138(4): 576-582.

Gubelin, W., & Parra, R. (2011). Micosis superficiales. Medical clinica Condes, 804-812.

Guoling, Y. Y. (2006). A study on stability of phenotype and genotype of Trichophyton rubrum. Mycopathologia , 161: 205-12.

Guzmán, R. A. (1987). Dermatología. Atlas, diagnóstico y tratamiento, 6e. Mexico: Mc Graw.

_____. (2008). Micología médica ilustrada. Mexico: McGraw-Hill Interamericana Editores.

Hainer. (2003). Infeccion por dermatofitos. Soy médico de Fam., 67 (1): 101-8.

Halliday, S. K. (2016). Descriptions of medical Fung. Fungus, 44-70.

Han X, P. T. (2017). Actividad antiinflamatoria del aceite esencial de clavo de olor (Eugenia caryophyllata) en fibroblastos dermicos humanos. Pharm Biol, 1619-1622.

Haugh M, H. S. (2002). Terbinafina en infecciones fúngicas de las uñas: un metanálisis de ensayos clínicos aleatorizados. Br J Dermatol, 118-21.

Havlickova B, C. V. (2009). Tendencias epidemiológicas en las micosis cutáneas en todo el mundo. Micosis., Jan; 52 (1): 95.

Kamatou GP 1, V. I. (2012). Eugenol: desde las remotas Islas Maluku hasta el mercado internacional: una revisión de una molécula notable y versátil. Moleculas, (6): 6953-81.

Kaufman, H. B. (2007). Infection stages of the derma-tophyte pathogen Trichophyton:microscopic characterization and proteolytic enzymes. Med Mycol, 45(2):149-55.

Krafchik B 1, P. J. (1997). El uso de terbinafina oral (Lamisil) en niños. Dermatología. , 194 Suppl 1: 43-4.

Larrondo, R., & Hernandez. (2001). Micosis superficiales: Dermatofitosis. Cubana de medicina General Integral, 559-564.

Lee SJ, H. J. (2007). Efecto antifúngico de eugenol y nerolidol contra Microsporum gypseum en un modelo de cobaya. Biol Pharm Bull, 30 (1): 184-8.

Lee, K., & T., S. (2007). Propiedad antioxidante del extracto de aroma aislado de yemas de clavo [Syzygium aromaticum (L.) Merr. et Perry]. Food Chem, 74: 443 - 8 .

Leem, H. (2011). Actividades antioxidantes y antiinflamatorias de Eugenol y sus derivados del clavo de olor (Eugenia caryophyllata Thunb. Agriculture, 456-458.

Liliana Bohorquez, N. C. (2010). Diagnóstico diferencial de las micosis superficiales con enfermedades dermatológicas. CES Medicina, vol.24 no.1.

Lopez, R., & Manzano, G. (2010). Dynamics of dermatophytosis frecuency in Mexico an analysis of 20184 cases. Medical mycology, 476-479.

Maldonado, M., Azalea, R., & Martín, R. .. (2008). Eugenol: material de uso dental con riesgo de toxicidad local y sistémica. Oral, 446-449.

Marchese, A., Barbieri, Coppo, E., & IE, O. (2017). Actividad antimicrobiana del eugenol y aceites esenciales que contienen eugenol: un punto de vista mecanicista. Crit Rev Microbiol, 43 (6): 668-689.

Maria Paulina Uribe, N. C. (2013). mecanismo de adherencia e invasion de dermatofitos a la piel. CES medicina, 67-75.

Martin, A. K. (1997). Micosis superficiales dermatofitos ,tiña negra,piedra. Dermatologia en medicina General, 2519-2549.

Masri-Fridling, G. D. (1996). Dermatophytosis de los pies. Dermatologic Clinics, 33-40.

Mejía, A., & Santa, C. (2013). Etiological and epidemiological study on superficial mycoses performed. Revista CES MEDICINA, Volumen 27.

Myrtha Arango Arteaga, E. C. (2003). Micosis humanas : procedimientos diagnósticos, exámenes directos. Medellin: CIB.

Nalu Teixeira de Aguilar Peres, F. C. (2010). Los dermatofitos interaccion huesped patogeno ,resistencia antifungica. Dermatol Bras, 657-667.

Nannizzi, & Griffin. (1960). Pathogenic fungi in humans and animals. Estados Unidos: Dexter H.Howard.

Nazzaro. (2016). Eugenol and linalool: Comparison of their antibacterial and antifungal activities. Article in African journal of microbiology research , 1860-1872, 28 .

Ogawa H, S. R. (1998). Dermatophytes and host defence in cutaneous mycoses. Med Mycol , 36 Suppl 1:166-73.

Oliveira Pereira F, M. J. (2013). Investigación sobre el mecanismo de actividad antifúngica de eugenol contra Trichophyton rubrum. Med Mycol., 51 (5).

Omidbeygi. (1998). Therapeutic medicinal plants. Brazil: Marta Cristina Teixeira.

Paião, F. &.-S.-R. (2010). Análisis de la expresión del gen Trichophyton rubrum en respuesta a fármacos citotóxicos. FEMS Microbiology Letters, 180-6.

Pathak R, B. L. (2004). Gid8p (Dcr1p) y Dcr2p funcionan en una vía común para promover la terminación de START en Saccharomyces cerevisiae. 1627-38, Eukaryot Cell.

Perez, & Albuquerque. (2010). Dermatófitos: interação patógeno-hospedeiro e resistência a antifúngicos. An. Bras. Dermatol., vol.85 no.5.

Prashar A, L. I. (2006). Citotoxicidad del aceite de clavo (Syzygium aromaticum) y sus principales componentes en las células de la piel humana. cell prolif, 241-8.

Rana, I., & Singh, A. (2011). Evaluación de la actividad antifúngica en aceite esencial de Syzygium aromaticum (L.) mediante extracción, purificación y análisis de su componente principal eugenol. Braz J Microbiolv, 42 (4)

Reddy, A., & Lokesh, B... (1994). Estudios sobre los efectos inhibidores de la curcumina y el eugenol sobre la formación de especies reactivas de oxígeno y la oxidación del hierro ferroso. Mol Cell Biochem., 137 (1): 1-8.

Reyes, F., & Palou, E. (2012). Vapores de aceites esenciales alternativa antimicrobiana natural. Alimentos, 29-39.

Saenz, F. C. (2001). Identificacion de hongos dermatofitos. Iberoamericana, 12-1 a 12-11.

Sheeman DJ, H., & CM, S. (1999). Actual y emergente agentes antifungicos azolicos. Microbiol, 40.

Torre, A. M., Cuenca-Estrella, M., & Rodríguez-Tudela, J. L. (2018). Estudio epidemiológico sobre las dermatofitosis. Enferm Infecc Microbiol Clin, 21(9):477-83.

Trujillo, J. A. (2015). Micología médica básica. Mexico: McGraw.

Uribe, M., & Cardona, N. (2013). Mecanismo de invasion y adherencia de la piel en dermatofitos a la piel. CES. Medical, 67-75.

Vallanet, V. A. (2009). Dermatofitos transmitidos en animales. Acta bioquím. clín. latinoam., v.43 n.2 .

Wagner, s. P. (1995). Cutaneous defenses against dermatophytes and yeasts. Clin Mi-crobiol Rev, 8(3):317-35.

Woodfolk JA, W. L. (1998). Trichophyton antigenstigens associated with IgE antibodies and delayed type hypersensitivity. Sequence homology to two families of serine proteinases. Biol Chem , 273(45):29489-96

ANEXOS

ANEXO A Divulgación de resultados.

- 4to Simposio Internacional de actualización en Bacteriología, 28 abril /2017. Caracterización biológica in vitro del efecto antifùngico y citotóxico de derivados semisintèticos del eugenol contra *T.rubrum* y células de mamífero.

República de Colombia

Universidad de Santander

UDES

VIGILADA MINEDUCACIÓN

Certifica Que

Yohana Rivera Rincón

Participó como ponente en la modalidad póster del trabajo titulado: **Caracterización biológica in vitro del efecto antifúngico y citotóxico de derivados semisintéticos del eugenol contra Trichophyton rubrum y células de mamífero**

Yohana Rivera Rincón1, Leonor Yamile Vargas2, Laura Viviana Herrera3, Sandra Milena Leal Pinto1

En el marco del

4° SIMPOSIO INTERNACIONAL DE ACTUALIZACIÓN EN BACTERIOLOGÍA

Realizado el día 28 de Abril de 2017

En constancia se firma en la ciudad de Bucaramanga a los 04 días del mes de mayo de 2017

Bac. María Cristina Vásquez R.

Directora Bacteriología y Laboratorio Clínico- UDES

- IX Congreso latinoamericano de micología, 22-25 agosto/2017 Lima, Perú. Efecto antifùngico y citotóxico de compuestos semisintèticos derivados del eugenol contra hongos dermatófitos y células de mamífero.

IX CONGRESO LATINOAMERICANO DE MICOLOGÍA
Lima / Perú

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

CONSTANCIA

La Asociación Latinoamericana de Micología y el Comité Organizador deja constancia que:

Sandra M Leal, Yohana Rivera , Leonor Y. Vargas, Laura V. Herrera

ha participado en la presentación del trabajo: " *Efecto antifúngico y citotóxico de compuestos semisintéticos derivados del eugenol contra hongos dermatofitos y células de mamífero* "

IX CONGRESO LATINOAMERICANO DE MICOLOGÍA en Lima - Perú

22-25 de Agosto 2017

Dra. MAGDALENA PAVLICH
Presidenta

AGOSTO 2017

➢ 1er Simposio Regional de enfermedades Infecciosas, 10 y 11 noviembre/2017. Efecto antifùngico y citotóxico del aceite esencial de *Eugenia caryophyllus,* eugenol y sus derivados semisintèticos contra T.mentagrophytes y células Vero.

TRABAJOS LIBRES-MODALIDAD CARTEL

EFECTO ANTIFÚNGICO Y CITOTÓXICO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Eugenia caryophyllus*, EUGENOL Y SUS DERIVADOS SEMISINTÉTICOS CONTRA *Trichophyton mentagrophytes* Y CÉLULAS VERO

Yohana Rivera-Rincón[1], Leonor Y. Vargas[2], Laura V. Herrera-Sandoval[3], Sandra M. Leal-Pinto[1]

[1]Maestría en Investigación en Enfermedades Infecciosas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Santander
[2]Facultad de Química Ambiental, Universidad Santo Tomás
[3]Facultad de Ciencias Básicas, Grupo de investigación Sistema Estomatognático y morfofisiología, Universidad Santo Tomás

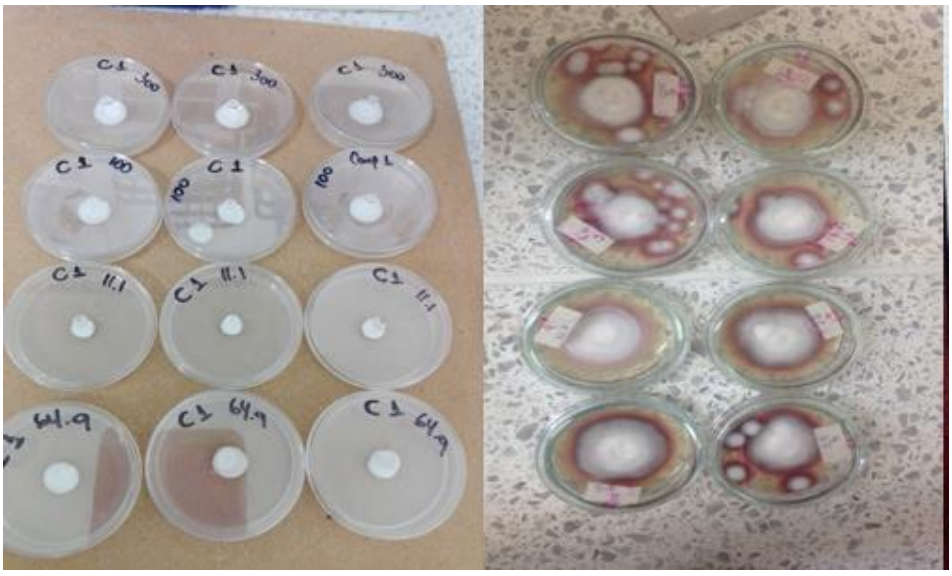
johanita092014@gmail.com, leyavar@gmail.com, l.vivianaherrera@gmail.com, sa.leal@mail.udes.edu.co

Introducción: Las dermatofitosis o tineas son micosis cutáneas superficiales que infectan la piel, uñas y pelo del hombre y animales, estas son causadas por diferentes especies de hongos de los géneros *Trichophyton sp*, *Microsporum sp* y *Epidermophyton sp*, siendo *T. mentagrophytes* el segundo agente etiológico mayormente aislado en dermatofitosis en piel y uñas. Por muchas décadas, los azoles (ketoconazol, imidazol, itraconazol, fluconazol, entre otros) han sido el tratamiento de elección para estas micosis, sin embargo, su baja efectivada, toxicidad, efectos adversos y resistencia, son una limitación. De acuerdo con lo anterior, nuestro trabajo se enfoca en la evaluación antifúngica y citotóxica de derivados semisintéticos del eugenol contra *T. mentagrophytes* y células no tumorales (Vero).
Metodología: Doce compuestos semisintéticos derivados del eugenol fueron obtenidos por la técnica de hidrodestilación (HD) asistida por calentamiento convencional y caracterizado cualitativa y cuantitativamente utilizando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Los ensayos de inhibición antifúngica fueron realizados contra *T. mentagrophytes*. La concentración mínima inhibitoria (CMI) fue determinada mediante el método de microdilución según la NCCLS evaluando concentraciones de los compuestos entre 1000- 0.97 ug/mL. A partir de la CMI se determinó la concetración fungicida mínima (CFM) en agar papa dextrosa luego de 7 días de incubación a 30ºC. Adicionalmente, fue evaluada la inhibición del crecimiento radial del micelio por el método del sustrato impregnado durante 20 días, terbinafina fue usada como medicamento de referencia. Así mismo, la toxicidad in vitro en células Vero fue testada por un ensayo colorimétrico, usando la sal de tetrazolio MTT.
Resultados: Los derivados Isoeugenol y metil-isoeugenol inhibieron *T. mentagrophytes* con valores de CMI de 62.5 µg/ml y CFM 500 µg/ml. Una inhibición del 100% del crecimiento micelial luego de 14 días de tratamiento a 300µg/ml con 4-alil-1-butoxi-2-metoxibenceno y metil-isoeugenol fue observada. Por otra parte, los compuestos mostraron baja toxicidad in vitro en células de mamífero (CC_{50} >70 µg/ml). **Conclusiones:** Demostramos el efecto antifúngico promisorio de dos de nuestros derivados, además de la baja toxicidad *in vitro*. Sin embargo, ensayos complementarios para evaluar posibles mecanismos de acción de estos compuestos son pertinentes.

Palabras clave: Eugenol, *Trichophyton mentagrophytes*, actividad antifúngica, citotoxicidad, células Vero

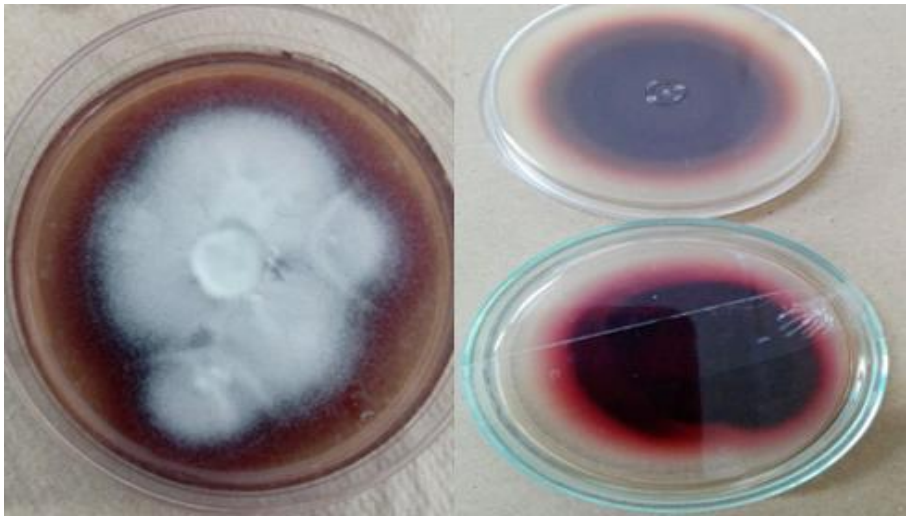
ANEXO B. Registro fotográfico de experimentos

Compuesto a diferentes concentraciones



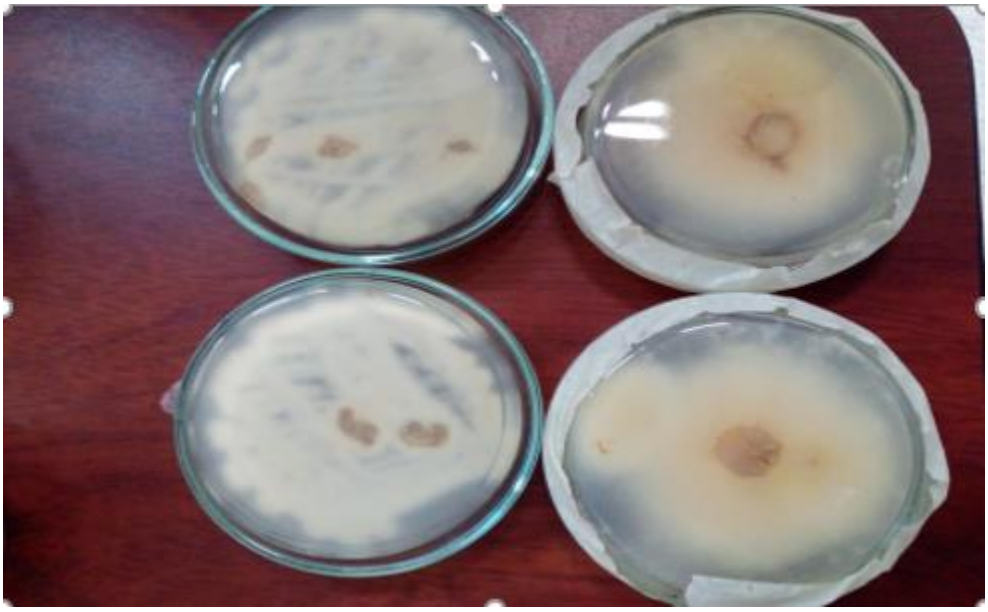
Trichophytom rubrum en medio de cultivo PDA a diferentes concentraciones

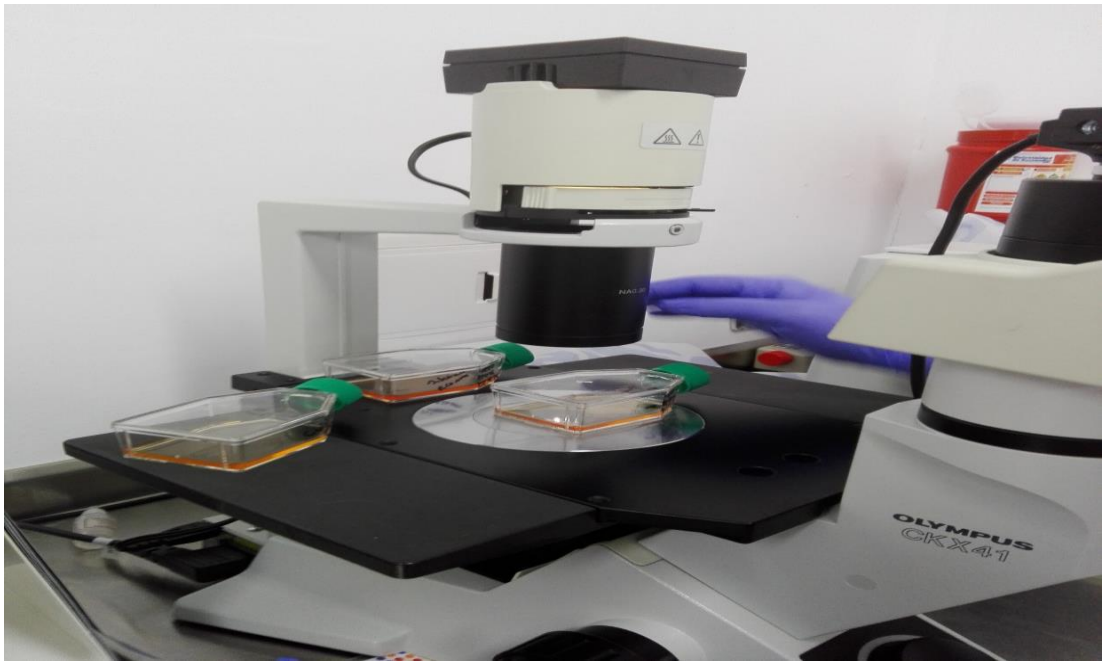
Cultivo de *T. rubrum*



Cultivo de *T.tounsurans*

Cultivo de *T. mentagrophytes*



Células Vero en placas

Células Vero