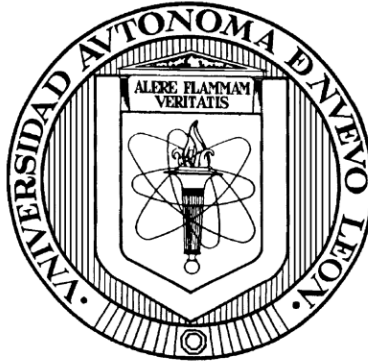


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

**POSGRADO EN CONJUNTO
AGRONOMÍA - VETERINARIA**



**ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA *in vitro* DE EXTRACTOS DE PLANTAS
CONTRA *Microsporium canis*.**

TESIS PRESENTADA POR:

BEATRIZ AMARI MEDINA SOTO

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL

ESCOBEDO, N.L. 26 DE OCTUBRE 2022

“Actividad antimicótica *in vitro* de extractos de plantas contra *Microsporum canis*”.

Comité de Tesis



Dr. José Pablo Villarreal Villarreal
Presidente



Dr. Jesús Jaime Hernández Escareño
Secretario



Dr. Sergio Arturo Galindo Rodríguez
Vocal

“Actividad antimicótica *in vitro* de extractos de plantas contra *Microsporum canis*”.

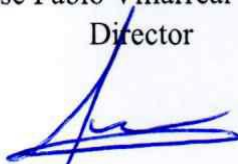
POR

Beatriz Amari

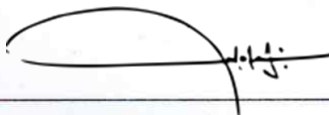
Comité de Tesis



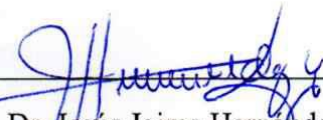
Dr. José Pablo Villarreal Villarreal
Director



Dr. Sergio Arturo Galindo Rodríguez
Co-director- Externo



Dr. Michel Stéphane Heya
Co-director- Externo



Dr. Jesús Jaime Hernández Escareño
Co- director



Dr. Uziel Castillo Velázquez
Co- director



Dra. Karina Wendoline Vázquez
Co- director

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), a la Facultad de Ciencias Biológicas (FCB) y a la Facultad de Medicina (FM), por el material dado y las instalaciones utilizadas para la realización de este trabajo. Agradezco mucho a todo el cuerpo de investigación involucrado en la realización de esta tesis. Principalmente al Dr. José Pablo Villarreal Villarreal por permitirme trabajar una vez más bajo su dirección en este proyecto, así como al Dr. Jesús Jaime Hernández Escareño en la parte de la microbiología y al Dr. Michel Stephane Heya por su gran apoyo y aportación de conocimientos acerca de los dermatofitos y las técnicas para trabajar con ellos, así como al Dr. Sergio Galindo por facilitarme el equipo y las instalaciones para la realización de los extractos metanólicos. En general a todo el equipo de trabajo. A mi familia y a Edmundo por el apoyo recibido en este proceso. Al CONACYT por el apoyo recibido para la realización de este trabajo. Agradezco al universo y a mí misma, por tener la vida, la energía y la capacidad suficiente para la realización de este trabajo. Gracias, gracias, gracias.

DEDICATORIAS

Dedico este proyecto a mis abuelos y bisabuelos que en paz descansan y que sin embargo no han dejado de ser una gran inspiración para mí, ya que eran personas trabajadoras, amorosas e inteligentes. También lo dedico a mis padres en agradecimiento por el apoyo recibido y a todas las personas que han formado parte de mi vida en cualquier punto y cualquier situación, pues de ellos he obtenido experiencias y aprendizajes. A mi familia Edmundo, Antonia, Nagga y Blacky. Confío en que el camino de la herbolaria terapéutica es una opción muy favorable para tratar diversas patologías ante las cuales nos enfrentamos día con día y espero que, como científicos, podamos desarrollar más investigaciones de este tipo recordando el origen de la medicina.

“Contra cada padecimiento crece una planta.” Paracelso Siglo XVI

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	10
2. ANTECEDENTES	11
2.1. Generalidades de los hongos.....	11
2.2. Dermatofitos.	11
2.2.1. Taxonomía y clasificación.	11
2.3. <i>Microsporum canis</i>	12
2.3.1. Morfología e identificación.	13
2.3.2. Epidemiología.	15
2.3.3. Factores de riesgo.	16
2.4. Dermatofitosis por <i>M. canis</i> (Patogenia, respuesta inmunológica y lesiones).	16
2.4.1. Diagnóstico.....	20
2.4.2. Tratamientos convencionales.....	20
2.4.2.1. Efectos adversos de los tratamientos convencionales.....	21
2.5. Resistencia de <i>M. canis</i>	22
2.6. Extractos de plantas como tratamiento alternativo.	22
2.6.1. Familia Boraginaceae.....	24
2.6.1.1. <i>Cordia boissieri</i> (Anacahuita).....	24
2.6.2. Familia Asteraceae.	25
2.6.2.1. <i>Artemisia ludoviciana</i> (Estafiate).	25
3. JUSTIFICACIÓN	27
4. HIPÓTESIS	28
5. OBJETIVO GENERAL	28
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
7.1. Obtención de la materia vegetal.	29
7.2. Obtención de los extractos.	29
7.2.1. Extracción Soxhlet.....	29
7.2.2. Evaporación a presión reducida.....	29
7.2.3. Evaporación del solvente y almacenamiento.	30
7.3. Caracterización parcial (Tamizaje fitoquímico).	30
7.3.1. Grupo carbonilo (Prueba de la 2-4 dinitrofenilhidrazina).	31

7.3.2. Oxidrilos fenólicos (taninos vegetales) (Prueba del FeCl ₃).	31
7.3.3. Esteroides y terpenos (Prueba de Salkowski).	31
7.3.4. Prueba de Molish para carbohidratos.	31
7.3.5. Prueba de las cumarinas.	31
7.3.6. Sesquiterpenlactonas (Prueba de Baljet).	31
7.3.7. Flavonoides (Prueba del H ₂ SO ₄).	32
7.3.8. Alcaloides (Prueba de Dragendorff).	32
7.3.9. Prueba del NaHCO ₃ para saponinas.	32
7.3.10. Prueba de Salkowski para saponinas.	32
7.3.11. Aromaticidad (Prueba del H ₂ SO ₄ - CH ₂ O).	32
7.4. Activación de la cepa de <i>Microsporium canis</i> .	33
7.4.1. Preparación del Agar bacteriológico.	33
7.4.2. Siembra y activación de la cepa de <i>M. canis</i> .	33
7.4.3. Identificación morfológica de <i>M. canis</i> .	34
7.4.4. Conservación de las conidias para cepario.	34
7.5. Cálculo de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).	34
7.5.1. Preparación de la microplaca CMI.	34
7.5.2. Cálculo de la Concentración Mínima Fungicida (CMF).	35
7.6. Evaluación de la citotoxicidad en línea celular HaCaT-1.	35
7.6.1. Desinfección y limpieza de áreas de trabajo para los ensayos.	35
7.6.2. Descongelación y cultivo celular.	36
7.6.3. Conteo celular.	36
7.6.4. Ensayo bromuro de 3- (4,5- di metil tiazol -2-il) -2,5-di fenil tetrazolio (MTT).	37
7.6.5. Ensayo de Azul Tripán.	38
7.7. Análisis estadístico.	38
8. RESULTADOS.	38
8.1. Obtención y caracterización de los extractos.	38
8.2. Activación e identificación de la cepa de <i>Microsporium canis</i> .	39
8.3. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Fungicida (CMF).	41
8.4. Evaluación del porcentaje de inhibición de crecimiento de <i>M. canis</i> en presencia de los extractos de <i>A. ludoviciana</i> y <i>C. boissieri</i> .	43

8.5. Evaluación de la citotoxicidad de los extractos en línea celular de queratinocitos (HaCaT-1), en presencia de los extractos de <i>Artemisia ludoviciana</i> y <i>Cordia boissieri</i> mediante el ensayo MTT.....	44
8.6. Evaluación de la mortalidad de los extractos en línea celular de queratinocitos (HaCaT), en presencia de los extractos de <i>Artemisia ludoviciana</i> y <i>Cordia boissieri</i> . mediante el ensayo Azul Tripán.....	45
8.7. Resultados del modelo estadístico.	46
9. DISCUSIÓN	47
10. CONCLUSIONES.....	53
11. BIBLIOGRAFÍAS.....	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Sistema de clasificación de los dermatofitos (CSPH, 2005; de Hoog et al., 2017;).....	12
Tabla 2. Taxonomía de <i>M. canis</i> (Graser et al., 2000).	12
Tabla 3. Algunos efectos adversos y tóxicos, en el uso de antimicóticos utilizados actualmente en medicina veterinaria (Guía ESCCAP No2, 2011; Romero & González, 2020).....	21
Tabla 4. Estudios y reportes de la utilización de extractos de diversas plantas para la erradicación de agentes patógenos.....	23
Tabla 5. Taxonomía de la planta <i>C. boissieri</i> (Feuillet Christian, 2018).....	25
Tabla 6. Taxonomía de la planta <i>Artemisia ludoviciana</i> (Shultz Leila M, 2018).....	26
Tabla 7. Porcentaje de rendimiento de los extractos.	38
Tabla 8. Tamizaje fitoquímico de los extractos de las hojas de <i>Artemisia ludoviciana</i> y <i>Cordia boissieri</i>	39
Tabla 9. Tiempo de crecimiento de <i>M. canis</i> en distintos agares.	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cultivo de <i>M. canis</i>. A) Anverso, colonia amarillo-naranja. B) Reverso, color amarillosa amarillo con micelio blanco, aspecto algodonoso. Medio de cultivo agar dextrosa de Sabouraud (V. , & T. C. Sarmiento, 2006).	14
Figura 2. Macroconidias de <i>Microsporum canis</i> 1000 x. (Boehm & Mueller, 2019).	14
Figura 3. A) Tiña de la cara en un neonato, lesiones por <i>M. canis</i> (Mayorga et al., 2016). B) Tiña de cuerpo, paciente pediátrico, lesiones con placas eritematosas redondeadas por <i>M. canis</i> (Arenas, 2014).	18
Figura 4. Yorkshire terrier joven con infección debido a <i>M. canis</i> con zonas alopécicas y eritema (Boehm & Mueller, 2019)	18
Figura 5. Lesiones causadas por <i>M. canis</i> en pacientes humanos. A) Lesión facial en infante. B) Lesión supurativa en tiña de la cabeza, Querion de Celso (Bonifaz, 2015). .	19
Figura 6. Lesiones nasales en felino causadas por <i>M. canis</i> y contaminación zoonótica a su propietario (Chermette et al., 2008).	19
Figura 7. Crecimiento de <i>M. canis</i> en Agar Avena.	40
Figura 8. Crecimiento de <i>M canis</i> en Agar SDA (A) y Agar PDA (B).	40
Figura 9. Observación microscópica de macroconidias de <i>Microsporum canis</i> 40x.	41
Figura 10. Pocillos donde se ubican la CMI y la CMF para el extracto de hojas de <i>A. ludoviciana</i> y su comparación con el C.R. (Control de crecimiento).	42
.....	42
Figura 11. Pocillos donde se ubican la CMI y la CMF para el extracto de hojas de <i>C. boissieri</i> y su comparación con el C.R. (Control de crecimiento).	42
Figura 12. Determinación de la Concentración Mínima Fungicida (CMF) para Es80 (<i>A. ludoviciana</i>) y An80 (<i>C. boissieri</i>) en diferentes concentraciones del extracto (ppm).	43
Figura 13. Porcentaje de inhibición del crecimiento de <i>M. canis</i> en presencia de distintas concentraciones de los extractos de (Es) <i>A. ludoviciana</i> P=0.168 (P≤ 0.05) y (An) <i>C. boissieri</i> P=0.063 (P≤0.05). * Diferencia estadísticamente significativa entre el porcentaje de inhibición de estas concentraciones mediante prueba de Tukey.	44
Figura 14. Porcentaje de Viabilidad de células HaCaT en presencia del extracto de <i>A. ludoviciana</i> P=0.034 (P≤0.05) y <i>C. boissieri</i> P=0.268 (P≥0.05) (ENSAYO MTT).	45
Figura 15. Porcentaje de Viabilidad de células HaCaT en presencia del extracto de <i>A. ludoviciana</i> P=0.695 (P≥0.05) y de <i>C. boissieri</i> P=0.253 (P≥0.05) (ENSAYO AZUL TRIPAN).	46

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

A. ludoviciana: *Artemisia*

C°: grados Celsius.

C. boissieri: *Cordia boissieri*.

CLSI: The clinical and Laboratory Standards Institute. *ludoviciana*.

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria.

CMF: Concentración Mínima Fungicida.

DppIV: Dipeptidil peptidasas.

λ: Longitud de onda (lambda).

Lap 2: Leucinas aminopeptidasas.

μm: micrómetro.

μl: microlitro.

M. canis: *Microsporium canis*.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

ppm: partes por millón.

PDA: Agar Papa Dextrosa.

SDA: Agar Dextrosa Saboraud.

1. INTRODUCCIÓN

Los hongos son organismos eucariontes que componen el reino Fungi. Dentro de este reino se encuentran los dermatofitos, que son un grupo de hongos filamentosos, queratinofílicos responsables de las principales infecciones cutáneas denominadas dermatofitosis o tiña; los cuales ocasionan síntomas y lesiones en la piel de los animales y seres humanos. Se pueden transmitir de forma directa por contacto con la piel y/o sus anexos del hospedador, así como de forma indirecta, por contacto de material contaminado con propágulos o fómites.

La dermatofitosis es considerada una zoonosis con una distribución mundial, debido a su fácil transmisión entre animales y personas. Se reporta que tan solo en los Estados Unidos se ha registrado un gasto de \$400 millones de dólares al año según los datos recabados por la Academia Americana de Dermatología, por lo que, son consideradas patologías de interés epidemiológico a nivel mundial con un impacto económico importante. En México, las micosis superficiales son muy frecuentes en la salud pública, considerándose dentro de las diez dermatosis más frecuentes, alrededor del 80% de todas las micosis presentes en consultas dermatológicas, son causadas por dermatofitos.

Microsporum canis es uno de los agentes causales más frecuentes de dermatofitosis en todo el mundo, provocando tiña en los seres humanos. Un problema alarmante respecto a estas patologías micóticas, es la inevitable resistencia que han desarrollado estos microorganismos a los tratamientos convencionales, debido; a la prescripción excesiva, el uso inadecuado e interrupción de los tratamientos. Además, se han observado efectos secundarios y niveles altos de toxicidad en pacientes con el uso prolongado de estos, lo que ha llevado a la búsqueda de soluciones alternativas como aquellos derivados de plantas medicinales.

Se ha considerado a los fitoquímicos como una alternativa confiable para satisfacer las necesidades de desarrollar nuevos agentes antimicóticos eficaces, menos tóxicos que superen las desventajas de los medicamentos antimicrobianos convencionales, incluidos los efectos secundarios, toxicidad e ineficacia, que los ha hecho menos exitosos en las estrategias terapéuticas.

Algunos estudios han demostrado que algunas plantas como *Artemisia ludoviciana* y *Cordia boissieri*, las cuales son endémicas del estado de Nuevo León, poseen importante actividad antimicótica, antimicrobiana e incluso ixodicida.

En base a lo anterior el presente trabajo tiene como objetivo; evaluar la actividad antimicótica de *A. ludoviciana* y *C. boissieri* contra el hongo *M. canis*.

2. ANTECEDENTES

2.1. Generalidades de los hongos.

Los hongos son organismos eucariontes que componen el reino Fungi y que se dividen en dos grandes categorías; filamentosos y levaduriformes. Cuentan con una pared rígida de quitina y glucano (Graser et al., 2000). Dentro de los hongos filamentosos, se encuentran los dermatofitos (Hayette & Sacheli, 2015), que pertenecen a la familia Arthrodermataceae (de Hoog et al., 2017; Monod, 2008).

2.2. Dermatofitos.

Los dermatofitos son hongos queratinofílicos es decir, se alimentan de la queratina presente en la piel y sus anexo (Chermette et al., 2008). Son patógenos que causan infecciones tópicas (Guarro, 2012). Se aíslan de manera frecuente en humanos y animales (Murmu et al., 2015; Weitzman & Summerbell, 1995). Con el tiempo, han evolucionado debido a las crecientes interacciones que han tenido con los animales de compañía, animales de vida silvestre y animales de producción, adaptándose a un estilo de vida parasitario infectando a las personas (Paryuni et al., 2020; Rodríguez-Cerdeira et al., 2021; Segundo et al., 2004).

2.2.1. Taxonomía y clasificación.

Su taxonomía se fundamenta en criterios morfológicos, macro y microscópicos, relacionados con la fase de reproducción asexual (M. M. Sarmiento et al., 2016). Actualmente se reconocen seis géneros, entre los cuales se encuentran; *Microsporum* spp, *Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Arthroderma*, *Lophophyton* y *Nannizzia* (Begum et al., 2020; Graser et al., 2000). De acuerdo con su hábitat, podemos clasificarlos en: Zoofílicos, antropofílicos y geofílicos (Boehm & Mueller, 2019; Rodríguez-Cerdeira et al., 2021) .

Tabla 1. Sistema de clasificación de los dermatofitos (CSPH, 2005; de Hoog et al., 2017;).

Clasificación	Ubicación
Dermatofitos Zoofílicos	Principalmente se encuentran en animales y son transmisibles a humanos.
Dermatofitos Antropofílicos	Principalmente se encuentran en humanos.
Dermatofitos Geofílicos	Se encuentran en el suelo y se asocian con pelo, plumas y pezuñas en descomposición, entre otros. Infechan tanto a humanos como a animales.

2.3. *Microsporum canis*.

Es un hongo filamentoso queratinofílico, el cual posee dos formas de reproducción, usualmente *M. canis* interactúa con su entorno como un hongo asexual o imperfecto (anamorfo) (Martinez-Rossi et al., 2008), es decir que para reproducirse no necesita una meiosis previa a la mitosis sin embargo en algunas ocasiones se le puede encontrar con reproducción sexual o perfecto (telemorfo), el cual supone una meiosis antes de la división celular, sin embargo habitualmente se aíslan en un estado asexual (Singh & Srivastava, 2019; Weitzman & Summerbell, 1995).

Tabla 2. Taxonomía de *M. canis* (Graser et al., 2000).

Reino:	Fungi
División:	Ascomycota
Clase:	Eurotiomicetos
Pedido:	Onygenales
Familia:	Arthrodermataceae
Genero:	Microsporum
Especie:	<i>Microsporum canis</i>

2.3.1. Morfología e identificación.

Macroscópicamente, las colonias tienen una coloración blanca, con aspecto algodonoso o veloso, plano radial y produce una coloración amarilla intenso o naranja al reverso de la colonia. Crecen a una temperatura que oscila entre 28 a 32°C, con un periodo de incubación de 7 a 14 días (Aneke et al., 2018; Moreno-Coutiño, 2009; Stuntebeck et al., 2018) (Koneman, 2006; Pasquetti et al., 2017).

Microscópicamente, *M. canis*, presenta abundantes macroconidias, estructuras fusiformes con una medida aproximada de 35-110 x 12-25 µm, con varios septos, conteniendo entre 6 y 12 células cada uno, característico de esta especie, presenta paredes rugosas y anchas con un diámetro aproximado de 2 µm, presenta tabiques de manera transversa creando especies de celdillas. Por lo general, presenta escasas microconidias, estructuras piriformes dispuestas a lo largo de la hifa de forma alterna, con un tamaño de entre 1 y 2 µm (Sarmiento et al., 2006). Presenta abundantes hifas, que son estructuras alargadas, delgadas, y forman ramificaciones con aspecto de árbol, parecido a raquetas (Betancourt et al., 2009; Moreno-Coutiño, 2009; Segundo et al., 2004).

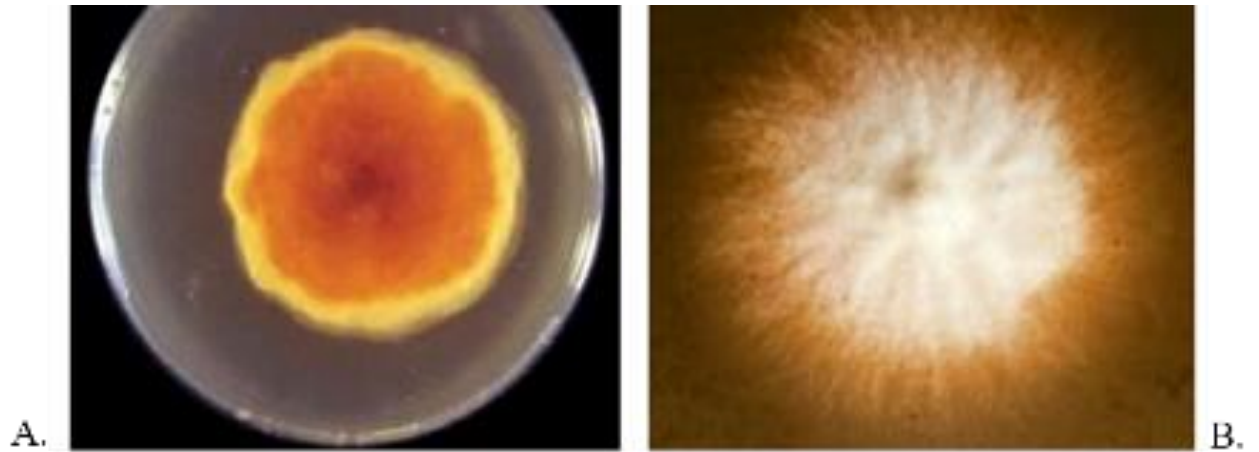


Figura 1. Cultivo de *M. canis*. A) Anverso, colonia amarillo-naranja. B) Reverso, color amarillosa amarillo con micelio blanco, aspecto algodonoso. Medio de cultivo agar dextrosa de Sabouraud (V. , & T. C. Sarmiento, 2006).



Figura 2. Macroconidias de *Microsporium canis* 1000 x. (Boehm & Mueller, 2019).

2.3.2. Epidemiología.

El departamento de Dermatología del Hospital Universitario, ubicado en la ciudad de Monterrey, Nuevo León, México, realizó un estudio en el que se recopiló la información de 2,397 casos de dermatofitosis entre los años 1978-1990, de los cuales se aislaron *Trichophyton rubrum* (45%), *Trichophyton mentagrophytes* (23.7%), *Trichophyton tonsurans* (21%), *Microsporum canis* (7.1%) y *Epidermophyton floccosum* (2.5%) (Welsh et al., 2005). Por otro en el 2021, se reportó que de 140 casos de aislados clínicos de tinea pedis, se observó a *T. rubrum* (45%) como la especie más frecuente, seguida de *T. mentagrophytes sensulato* (23%), *Epidermophyton floccosum* (9%), *T. tonsurans* (7%) y *Trichophyton* spp., (17%) (Heya et al., 2021).

Uno de los principales dermatofitos que afecta a perros y gatos es *M. canis*. La alta incidencia en la transmisión hacia las personas amerita la educación preventiva a los propietarios de mascotas. Además de poder infectar una gran variedad de animales, existen estudios que han reportado una prevalencia en perros del 46% y del 69.7% en gatos (Seker & Dogan, 2011). Varios estudios retrospectivos, han reportado que la incidencia de *M. canis* en animales de compañía ha sido del 81.8% al 97% (Havlickova et al., 2008.; Indarjulianto et al., 2017).

Alrededor del 90% de las infecciones por dermatofitos en gatos han sido por *M. canis*. Siendo este el principal hospedador, el cual puede infectar otros animales como: perros, conejos, cerdos, cabras, roedores, tigres, conejillos de indias, simios y personas, considerando los factores antes mencionados (Frymus et al., 2013). Es uno de los agentes causales de dermatofitosis más frecuentes en todo el mundo, ocasionando en las personas principalmente tiña de cabeza y cuerpo en niños. En México, se realizó un estudio retrospectivo de 20 años (1994-2014), donde se mostró una prevalencia del 1.8%, no se demostró preferencia por género, 49.7% en hombres y 49.4% en mujeres, en cuanto a las edades, se presentó en pacientes de 2 años con un 43% y de 6 a 9 años con un 67% (Ávila-Sosa et al., 2020). En México, *M. canis* es responsable del 60-80% de los casos de tiña de la cabeza (*tinea*

capitis) en infantes. Alrededor de 83% de estos casos son zoonosis (Arenas, 2014; Arrazola-Guerrero et al., 2015; Segundo et al., 2004).

2.3.3. Factores de riesgo.

Los factores asociados a la predisposición de la enfermedad son: la higiene deficiente, el hacinamiento, el contacto con animales domésticos como son los perros y gatos infectados, además de comorbilidades y situaciones de inmunodepresión por parte del paciente, así como climas cálidos, tropicales y subtropicales que facilitan la proliferación del patógeno (Arrazola-Guerrero et al., 2015). A menudo se observan epidemias en familiares que tuvieron contacto con mascotas infectadas (Copetti et al., 2006; Ginter-Hanselmayer et al., 2017; Hayette & Sacheli, 2015; Murmu et al., 2015).

2.4. Dermatofitosis por *M. canis* (Patogenia, respuesta inmunológica y lesiones).

La dermatofitosis es una enfermedad zoonótica de alta importancia (Paryuni et al., 2020). Se conoce comúnmente como tiña y se caracteriza macroscópicamente por alopecia multifocal y costras en la piel, acompañada de lesiones de tipo “ringworm” (lesiones circulares enrojecidas) (Fig. 3, 5A y 6) con prurito y descamación (Fig. 4) (Indarjulianto et al., 2017; Murmu et al., 2015). La patogenia se divide en tres etapas y estas se clasifican desde el momento en que el hongo entra en contacto con el hospedero, hasta que se manifiestan los signos clínicos. Las etapas son: adhesión, invasión y respuesta inmunológica (Begum et al., 2020). La adhesión de las arthroconidias del hongo al tejido del hospedador, es dependiente del tiempo. El tiempo de adherencia *in vitro* para *M. canis*, inicia a las dos horas, con un incremento marcado a las seis horas post inoculación (Uribe & Castro et al., 2013; Stuntebeck et al., 2018). Este proceso es mediado a través de adhesinas fúngicas y su interacción con los receptores de las células hospederas (Vermout et al., 2008).

En *M. canis* se ha demostrado la función de proteasas (Monod, 2008). La enzima exopeptidasa dipeptidil peptidasa participa en la activación o inactivación de diversos péptidos en el extremo N – terminal (Seker & Dogan, 2011). Una vez adherido a las células hospederas, las hifas comienzan el proceso de invasión y crecimiento (Paryuni et al., 2020), donde se reducen los puentes disulfuro mediante una bomba de flujo de sulfito, degradando las proteínas, permitiendo el acceso de las enzimas fúngicas a la queratina (Uribe & Castro et al., 2013; Vermout et al., 2008). Las subtilisinas y las fungalisinas, digieren las proteínas en péptidos de cadena larga, los cuales se convierten en aminoácidos y péptidos por la acción sinérgica de las leucinas aminopeptidasas (Lap 2) y las dipeptidil peptidasas (DppIV) (Monod, 2008; Murmu et al., 2015). Una vez degradadas las proteínas de la queratina, quedan aminoácidos, dipéptidos y tripéptidos, los cuales son fuentes nutricionales para los dermatofitos (Copetti et al., 2006; Frymus et al., 2013; Pin, 2017).

El dermatofito interfiere en el mecanismo de defensa del huésped y esto influye en la respuesta inmune del paciente (Romani, 2004). Este hongo posee antígenos inespecíficos, siendo el más conocido; la tricofitina, que estimula la producción de interleucina-8 (IL-8) mediante queratinocitos y promueve la acumulación de neutrófilos en el estrato córneo (Almeida, 2008; Monod, 2008). El glucopéptido que estimula la respuesta inmune celular y su parte peptídica, la respuesta inmune humoral. Las conidias suelen ser fagocitadas por macrófagos, sin embargo, este proceso puede ser inhibido por exoantígenos o carbohidratos como el manano, que se une a receptores de manosa o de B-glucano (Monod, 2008). Los carbohidratos de membrana del hongo, forman parte de la fagocitosis de conidias. Los receptores tipo lectina, juegan un papel importante en este sistema, ya que se unen a los carbohidratos (da Cunha et al., 2019; Richmond & Harris, 2014). Citocinas como: IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-15, TNF- α y factor de crecimiento transformante β , tienen funciones inmunológicas en las respuestas a infecciones por este hongo (Monod, 2008b; Moriello et al., 2017).

La interleucina IL-17, es una citocina que se encarga principalmente de crear conexiones entre la respuesta humoral y la inmunidad celular; en las respuestas inflamatorias a la infección por hongos (Almeida, 2008; Carvalho Reis et al., 2019; Paryuni et al., 2020a; Richmond & Harris, 2014; Romani, 2004).

M. canis, se caracteriza por provocar síntomas como prurito y lesiones características, como: alopecia, pápulas, eritemas y descamaciones (Fig. 4 y 5), pudiendo inducir a infecciones secundarias (Aneke et al., 2018a; Havlickova et al., 2008; Hayette & Sacheli, 2015; K. A. Moriello, 2003). Pacientes que padecen comorbilidades como: diabetes, obesidad, hipertensión, o padecimientos inmunocomprometedores, son más susceptibles a adquirir esta clase de infecciones (Indarjulianto et al., 2017) .



Figura 3. A) Tiña de la cara en un neonato, lesiones por *M. canis* (Mayorga et al., 2016). B) Tiña de cuerpo, paciente pediátrico, lesiones con placas eritematosas redondeadas por *M. canis* (Arenas, 2014).



Figura 4. Yorkshire terrier joven con infección debido a *M. canis* con zonas alopécicas y eritema (Boehm & Mueller, 2019).



Figura 5. Lesiones causadas por *M. canis* en pacientes humanos. A) Lesión facial en infante. B) Lesión supurativa en tiña de la cabeza, Querion de Celso (Bonifaz, 2015).



Figura 6. Lesiones nasales en felino causadas por *M. canis* y contaminación zoonótica a su propietario (Chermette et al., 2008).

2.4.1. Diagnóstico.

El diagnóstico se lleva a cabo principalmente a través de la observación de los signos clínicos y mediante observación de las lesiones bajo luz de lámpara de Woods, (Begum et al., 2020; Hayette & Sacheli, 2015; Molina De Diego, 2011; K. A. Moriello et al., 2017). Una vez que se sospecha de esta enfermedad, es indispensable la utilización de pruebas como: diagnóstico directo (KOH 10%), pruebas dermatológicas como Fungassay Ringworm Kits e incluso PCR (Reacción Cadena de la Polimerasa) para una mayor especificidad en la identificación del patógeno y tener con una mejor orientación del tratamiento (Betancourt et al., 2009; Blasco-Morente et al., 2014).

2.4.2. Tratamientos convencionales.

La mayoría de los tratamientos antifúngicos pertenecen a la familia de los azoles (clotrimazol, miconazol, econazol, oxiconazol, fluconazol, itraconazol, fluconazol, entre otros), otros fármacos utilizados son los compuestos de alilamina como son: la terbinafina y la naftinina (Gupta & Cooper, 2008). Por lo regular, son tratamientos tópicos administrados en lesiones no extensivas, en ocasiones la infección es persistente y no cede a los tratamientos tópicos, por lo que es necesario brindar un tratamiento sistémico, considerando que tenga actividad fungistática (Martinez-Rossi et al., 2008; Pfaller, 2012; Teixeira De Aguiar Peres et al., 2010). En casos severos de dermatofitosis, con lesiones expuestas que provocan infecciones secundarias por bacterias, es necesario la administración de antibióticos (Castan et al., 2001; Lopes et al., 2017).

2.4.2.1. Efectos adversos de los tratamientos convencionales.

A continuación, se muestra una tabla con algunos efectos adversos y tóxicos de algunos antifúngicos de uso común:

Tabla 3. Algunos efectos adversos y tóxicos, en el uso de antimicóticos utilizados actualmente en medicina veterinaria (Guía ESCCAP No2, 2011; Romero & González, 2020).

Fármacos	Efectos adversos
Enilconazol	Decoloración del pelaje, debilidad del tren posterior, elevaciones en la fosfatasa alcalina sérica.
Formulaciones terbinafina + clorhexidina	Manchas en el pelaje, irritación, poca eficacia para combatir al dermatofito. Tratamientos constantes y prolongados.
Formulaciones ketoconazol + gluconato de clorhexidina	Manchas en el pelaje, irritación, poca eficacia para combatir al dermatofito. Tratamientos constantes y prolongados.
Itraconazol	Embriotoxicidad y teratogenicidad.
Ketoconazol	En perros se ha demostrado que interfiere con la síntesis de esteroides endógenos, depresión, inapetencia, aumentos de albumina, calcio y fosfatasa alcalina. En los gatos el pelo se torna áspero y seco.
Fluconazol	Vómito, diarrea y alanin aminotransferasa elevada bajo dosificaciones altas.
Terbinafina	Hinchazón periocular, quemosis y eritema conjuntival.
Griseofulvina	Cefalea, malestar estomacal, vómitos, diarrea y debilidad.
Lufenurón	Vómito, letargia o depresión, anorexia, diarrea, disnea, prurito y otros efectos cutáneos.

2.5. Resistencia de *M. canis*.

El fenómeno de resistencia que ha presentado *M. canis* en los últimos años, se debe a su alta capacidad de contagio y tratamientos fallidos, ya que su reincidencia ha sido del 25% y 40% en los pacientes con dermatofitosis. Este fenómeno ocurre cuando se administra una dosis mayor al rango indicado para las cepas salvajes (Pfaller, 2012). El mal diagnóstico y el tratamiento inadecuado por largos periodos de tratamiento, incentivan el surgimiento de cepas resistentes (Martinez-Rossi et al., 2008). Un estudio evaluó la resesistencia de cepas dermatofíticas, exponiendo a *M. canis* ante el voriconazol y el fluconazol, mediante el protocolo clínico laboratorial estandarizado de ensayo por dilución. Los rangos de CMI para el voriconazol fueron del 0.002 al 0.06 µg/mL y del 0.25 al 32 µg/mL para el fluconazol, sugiriendo una resistencia inata al fluconazol por parte de estas cepas (Ghannoum et al., 2006). Por su parte Aneke et al., en 2018, revelaron que tratamientos como el fluconazol y la griseofulvina, dejaron de ser opciones terapéuticas viables para el tratamiento de *M. canis*, esto debido al desarrollo de resistencia, mientras que aún existe susceptibilidad ante el itraconazol y la terbinafina.

2.6. Extractos de plantas como tratamiento alternativo.

En la actualidad existe una gran cantidad de estudios, donde se ha comprobado la efectividad de diversos extractos de plantas en múltiples aplicaciones antibacterianas y antimicóticas (Waksman De Torres et al., 2011). En la Tabla 4, se muestran los diversos estudios realizados con diferentes extractos de plantas en la erradicación de agentes patógenos.

Tabla 4. Estudios y reportes de la utilización de extractos de diversas plantas para la erradicación de agentes patógenos.

Planta.	Agente infeccioso.	Referencia bibliografica.
<i>Cymbopogon nardus L.</i>	<i>Microsporum canis.</i>	(Capoci et al., 2015).
140 plantas diferentes.	Varias especies de dermatofitos.	(Cock & van Vuuren, 2020).
<i>Armoracia rusticana.</i>	<i>Trichophyton rubrum, Trichophyton mentagrophytes, M. canis, y Epidermophyton floccosum.</i>	(Choi et al., 2017).
Ungüento de timol, alcanfor, mentol o aceite de eucalipto.	<i>Candida parapsilosis</i> y <i>Trichophyton mentagrophytes.</i>	(Derby et al., 2011).
<i>Alnus rubra, Artemisia ludoviciana, Artemisia triakntata, Geum macrophyllum, Mahonia aquifolium, y Moneses unifora.</i>	<i>Aspergillus flavus, Aspergillus fumigatus, Candida albicans, Fusarium tricinctum, Microsporum cookei y Microsporum gypseum, Saccharomyces cerevisiae, Trichoderma viridae y Trichophyton mentagrophytes.</i>	(Mccutcheon et al., 1994).
<i>Cordia verbenacea.</i>	<i>Candida albicans, Candida Krusei, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, (Escherichia coli 27) multiresistente Gram-negativa.</i>	(Rodrigues et al., 2012).
<i>Chrysanthinia mexicana, Colubrina greggii, Cyperus alternifolius, Ceanothus coeruleus, Schinus molle, Cordia boissieri.</i>	Gram-negativas (<i>Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae</i> y <i>Acinetobacter baumannii</i>), Gram positivas (<i>Enterococcus faecalis</i>), dos cepas de (<i>Staphylococcus aureus</i>), y levaduras (<i>Candida albicans, C. krusei, C. tropicalis, C. parapsilosis</i> and <i>C. glabrata</i>)	(Waksman De Torres et al., 2011).
<i>Litchi chinensis.</i>	<i>Trichoderma virens.</i>	(Hu et al., 2019).

2.6.1. Familia Boraginaceae

La familia Boraginaceae, borraja o nomeolvides, abarca plantas con flores, constituidas en 148 géneros y con más de 2,700 especies. Las boragináceas son frecuentemente herbáceas y peludas, anuales o perennes. Esta familia incluye una serie de plantas ornamentales de jardín, como la: *Heliotropium* (heliotropo), *Mertensia virginica* (Virginia bluebell), *Phacelia* (escorpión), *Pulmonaria* (lungwort) y *Myosotis* (nomeolvides). Muchas especies son venenosas, pero algunas se han usado con fines medicinales, como son: *Borago officinalis* (borraja), *Symphytum officinale* (consuelda) y *Lithospermum* (puccoon o stoneseed). En los trópicos se encuentra el género *Cordia*, con más de 200 especies (Berry, 2008).

2.6.1.1. *Cordia boissieri* (Anacahuita)

Cordia boissieri, comúnmente llamada de Anacahuita, es una planta cuyos extractos de raíz, se utilizan como emolientes en las Antillas y en México (Waksman De Torres et al., 2011). Las jaleas hechas de los frutos son seguros de comer, mientras que el jarabe hecho de las frutas, se usa para teñir telas y tratar la tos (Owis et al., 2017). Las hojas son usadas para aliviar el reumatismo y problemas pulmonares.

Es considerada un potente antimicrobiano debido a sus metabolitos secundarios activos, tal efecto se ha probado contra *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* y *Mycobacterium tuberculosis* (Molina-Salinas et al., 2007). Además, se ha reportado actividad antimicótica de *C. boissieri* sobre la levadura *Candida glabrata* (Waksman De Torres et al., 2011). A continuación, se observa la taxonomía de *C. boissieri* (Tabla 5.)

Tabla 5. Taxonomía de la planta *C. boissieri* (Feuillet Christian, 2018).

Reino: Plantae

Filo: Tracheophyta

Clase: Magnoliopsida

Familia: Boraginaceae

Orden: Lamiales

Género: *Cordia*

Especie: *Cordia boissieri*

2.6.2. Familia Asteraceae.

También llamada de Compositae, posee más de 1,620 géneros y 23,600 especies de hierbas, arbustos y árboles, distribuidos en todo el mundo. Son importantes principalmente por sus plantas ornamentales, como las incluidas en los géneros; *Ageratum*, *Aster*, *Chrysanthemum*, *Cosmos*, *Dahlia*, *Tagetes* y *Zinnia*. Así también, se incluyen dentro de esta familia otras plantas de jardín, flores silvestres, vegetales y semillas comestibles (Sampaolo M. & Petruzello M., 2008).

2.6.2.1. *Artemisia ludoviciana* (Estafiate).

Ha sido utilizada en México desde tiempos prehispánicos. El registro más antiguo que se tiene del uso de esta planta es en el Códice Badiano. Es de las especies más antiguas reportadas en escrito, bajo el nombre de *Iztauhyatl*, es de mucha utilidad para tratar debilidad en las manos, dolores de pies, hemorroides y dolores de cabeza (Anaya-Eugenio et al., 2014).

De acuerdo con el Códice Florentino, esta especie era considerada valiosa para tratar dolor, fiebre y resfriados. Posteriormente se documentó, que era muy útil para las hemorroides, padecimiento de estómago, cólicos, bronquitis, indigestión, flatulencia e inflamación y es considerado un poderoso antihelmíntico (Palacios-espínosa et al., 2021).

En la actualidad es utilizada para tratar; enfermedades parasitarias, malestar estomacal, diarrea, padecimientos de la vesícula y diabetes. Se ha reportado actividad antimicótica de *A. ludoviciana* sobre *Microsporium cookeri*, *Microsporium gypseum* y *Trichophyton mentagrophytes* (Mccutcheon et al., 1994). Esta planta se ha analizado en cuestiones fitoquímicas, obteniendo metabolitos secundarios como; los monoterpenos, sesquiterpenos, lactanos y flavonoides (Bisht et al., 2021; Trendafilova et al., 2021).

Tabla 6. Taxonomía de la planta *Artemisia ludoviciana* (Shultz Leila M, 2018).

Reino: Plantae

Filo: Tracheophyta

Clase: Magnoliopsida

Familia: Asteraceae

Orden: Asterales

Género: *Artemisia*

Especie: *Artemisia ludoviciana*

3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente los problemas micóticos causados por dermatofitos representan un problema alarmante en la salud humana y veterinaria, debido a su fácil transmisión entre animales y personas, así como a los costos y dificultades para su control. Las dermatofitosis son consideradas patologías de interés epidemiológico a nivel mundial con un alto impacto económico. Tan solo en los Estados Unidos, se ha registrado un gasto de \$400 millones de dólares al año, según los datos recabados por la Academia Americana de Dermatología. *M. canis* es considerado uno de los agentes causales más frecuentes de dermatofitosis en todo el mundo, provocando la tiña en el ser humano. Las malas aplicaciones y diagnósticos fallidos con aquellos fármacos que en algún punto causaban la muerte de estos microorganismos, culminó con lo que en la actualidad conocemos como resistencia. A causa de esto, las dosificaciones de dichos fármacos tuvieron que incrementarse cada vez más, causando efectos de toxicidad en los usuarios, sin obtener resoluciones completas. Es por esto que se ha considerado a los fitoquímicos como una alternativa confiable para satisfacer las necesidades de desarrollar nuevos agentes antimicóticos eficaces y menos tóxicos, que superen las desventajas de los medicamentos antimicrobianos convencionales. Por lo que el presente trabajo tiene como objetivo, evaluar la actividad antimicótica de los extractos de las plantas *A. ludoviciana* y *C. boissieri* contra el hongo *M. canis*, además de evaluar su citotoxicidad en células HaCaT para futuras consideraciones terapéuticas. Esto con la finalidad, de obtener un nuevo tratamiento, con menor toxicidad y al que el hongo sea susceptible.

4. HIPÓTESIS

Los extractos de las plantas *A. ludoviciana*, y *C. boissieri*, poseen actividad antimicótica contra *M. canis* y presentan baja citotoxicidad en queratinocitos.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antimicótico de los extractos metanólicos de *A. ludoviciana* y *C. boissieri* sobre *M. canis*, así como su citotoxicidad en queratinocitos.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener los extractos metanólicos de las hojas de *A. ludoviciana* y *C. boissieri* y caracterizarlos fitoquímicamente.
2. Activar la cepa de *M. canis*.
3. Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria y la Mínima fungicida de cada extracto sobre *M. canis*.
4. Determinar la actividad citotóxica de los extractos en una línea celular HaCaT de queratinocitos.

7. MATERIALES Y MÉTODOS.

7.1. Obtención de la materia vegetal.

Las hojas de las plantas se colectaron en dos estados de la república mexicana. *A. ludoviciana* (Estafiate) se colectó en el municipio de Jaumave, Tamps, bajo las coordenadas: 23° 24' 22.36, -99° 22' 50.59; mientras que *C. boissieri* (anacahuita) se colectó en el municipio de Guadalupe, N. L. (25°71'53.09,-100°22'52.36). Posterior a la colecta, fueron trasladadas al Laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Biológicas (FCB) de la U.A. N.L.

7.2. Obtención de los extractos.

La obtención de los extractos se realizó en el Laboratorio de Química Analítica de la FCB de la U.A N.L.

7.2.1. Extracción Soxhlet.

Posterior a la colecta, la materia vegetal fresca fue lavada profundamente con agua destilada y sometida a un proceso de secado al sol durante 12 horas, cabe señalar que este secado se realizó en temporada de verano, por lo que las condiciones permitieron el secado de la planta en este periodo de tiempo. Una vez seca se cortó con tijeras en trozos pequeños y fue pesada en una balanza analítica. Para armar el cartucho del equipo Soxhlet, se colocó una base de algodón plisado en el fondo, en la parte media se colocaron 70 g de planta seca y se cubrió dicho material con una ligera capa de algodón. En la base del extractor Soxhlet, se colocó un matraz con 700 ml de metanol al 70%. El equipo Soxhlet, se mantuvo en recirculación durante 24 hrs con la mantilla para calentar a una temperatura de 30-35°C.

7.2.2. Evaporación a presión reducida.

En este proceso se utilizó un equipo rotavapor, en el cual, se sometió el extracto a una evaporación con Baño María a una temperatura de 35°C, cabe mencionar que el rotavapor mantiene una baja presión y extrae la mayor parte del metanol al 70%,

dejando únicamente componentes de la planta con una mínima cantidad del solvente. El extracto fue recolectado con ayuda de un sonicador a 25°C y almacenado en frascos de color ámbar. Se obtuvo su peso en la balanza analítica y este dato fue registrado para posteriormente calcular el porcentaje de rendimiento de cada uno de los extractos.

7.2.3. Evaporación del solvente y almacenamiento.

Los frascos se rotularon y se taparon con papel aluminio, se hicieron algunos hoyos para permitir la evaporación del exceso de solvente. Estos permanecieron en una incubadora a 30°C durante tres semanas, durante este periodo de tiempo se realizaron tres pesajes para valorar la pérdida del solvente a través de las diferencias de peso. Una vez listo, el extracto fue almacenado en refrigeración a una temperatura de 4°C. Se realizó una compilación de datos de los pesajes para el cálculo del porcentaje de rendimiento de los extractos y para ello se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Rendimiento} = \frac{PE}{PI} \times 100$$

Dónde:

PE = Peso obtenido después de la extracción.

PI = Peso inicial del material vegetal a extraer.

7.3. Caracterización parcial (Tamizaje fitoquímico).

El proceso de caracterización parcial o tamizaje fitoquímico se realizó con la finalidad de obtener información referente a los compuestos bioactivos, que contienen los distintos extractos. En este proceso se obtuvieron resultados cualitativos en cuanto a la presencia o ausencia de compuestos fitoquímicos a través de reacciones colorimétricas y de precipitación (Mendoza y Escamilla, 2018). Los resultados se registraron en cruces, relacionando la reacción observada con la presencia o ausencia del compuesto vegetal: (-) = ausente y (+) = presente.

7.3.1. Grupo carbonilo (Prueba de la 2-4 dinitrofenilhidrazina).

Una muestra de 5 mg del extracto se disolvió en 1 ml de etanol y se le añadió 1 ml de una solución saturada de 2-4 dinitrofenilhidracina en HCl 6N. La formación de un precipitado de color amarillo o naranja indicó la presencia del grupo carbonilo.

7.3.2. Oxidrilos fenólicos (taninos vegetales) (Prueba del FeCl₃).

Se disolvieron 1-2 mg del extracto en 1 ml de agua o etanol y después se agregaron gotas de FeCl₃ al 2.5% en agua. La aparición de un precipitado rojo, azul-violeta o verde se consideró positivo.

7.3.3. Esteroides y terpenos (Prueba de Salkowski).

Se disolvió de 1-2 mg de cada extracto en 1 ml de cloroformo y posteriormente se le agregó 1 ml de H₂SO₄. Se consideró un resultado positivo para esteroides y metilesteroides, al formarse un anillo rojo-marrón en la interfase.

7.3.4. Prueba de Molish para carbohidratos.

A 1-2 mg del extracto, se le agregó gota a gota el reactivo de Molish (alfa-naftol al 1% en etanol), luego, 1 ml de H₂SO₄ por las paredes del tubo. La prueba se consideró positiva cuando se formó un anillo coloreado de color púrpura en la interfase.

7.3.5. Prueba de las cumarinas.

Se disolvieron 1-2 mg del extracto en etanol y se le agregó gota a gota el reactivo NaOH al 10%. La prueba se consideró positiva en el caso de presentar una coloración amarilla que desaparece al acidificar la solución.

7.3.6. Sesquiterpenlactonas (Prueba de Baljet).

A 2-3 mg del extracto disueltos en etanol se le agregaron 3-4 gotas de la solución mezcla, siendo positiva si se tornó de color naranja a roja oscura. La solución mezcla 1:1 consistió en una solución A que contiene: C₆H₃N₃O₇ al 1% en etanol y una B de NaOH al 10%.

7.3.7. Flavonoides (Prueba del H₂SO₄).

Una pequeña cantidad del extracto se disolvió en H₂SO₄ y un resultado positivo indicó coloración amarilla para flavonoides, naranja-guinda para flavonas, rojo-azuloso para chalconas y rojo-púrpura para quinonas.

7.3.8. Alcaloides (Prueba de Dragendorff).

Se usó la modificación de Munier y Macheboeuf (Kikugawa, 1967) para la determinación de alcaloides. Para ello se prepararon dos soluciones, la solución A con 0.85 g de Bi(NO₃)₃, los cuales se mezclaron con 10 ml de CH₃COOH y 40 ml de agua y Solución B con 8 g de KI disuelto en 20 ml de agua. El reactivo se preparó mezclando 5 ml de "A", 4 ml de "B" y 100 ml de agua, la prueba se consideró positiva en caso de presentar coloraciones rojo-naranja, persistentes por 24 hrs.

7.3.9. Prueba del NaHCO₃ para saponinas.

La sal se preparó al 10% en agua. Se disolvieron de 1-2 mg del extracto en agua o etanol y se le agregaron de 2-3 gotas de H₂SO₄ concentrado. Se agitó ligeramente, y se agregaron 2-3 gotas de la solución de NaHCO₃. La aparición de burbujas y su permanencia por más de 1 min, indicaron la presencia de saponinas.

7.3.10. Prueba de Salkowski para saponinas.

Se disolvieron de 1-2 mg del extracto en 1 ml de cloroformo y se les añadió 1 ml de H₂SO₄. La prueba se consideró positiva en caso de la aparición de color rojo.

7.3.11. Aromaticidad (Prueba del H₂SO₄- CH₂O).

Se preparó una mezcla de 1 ml de H₂SO₄ concentrado con una gota de CH₂O (formaldehído). Se disolvieron de 1-5 mg del extracto disuelto en un disolvente no aromático (etanol) y se añadieron unas gotas de la mezcla anterior y al aparecer un color rojo-violeta, la prueba se consideró positiva.

7.4. Activación de la cepa de *Microsporium canis*.

7.4.1. Preparación del Agar bacteriológico.

Para la preparación del agar PDA (Agar Papa Dextrosa), se colocaron 8.775 gr del reactivo en polvo en un matraz de 500 ml previamente rotulado. Para el agar ADS (Agar Dextrosa Sabouraud), 14.625 gr de SDA. Para ambos agares, se vació gradualmente 225 ml de agua destilada, se mezcló y se colocó al calor en un mechero de Bunsen para una mayor disolución de los componentes. En la preparación del agar Avena, se utilizó avena comercial marca Quaker en hojuelas y se colocó 8.775 gr de avena en un matraz de 500 ml con 225 ml de agua destilada. La mezcla fue colocada al calor en un mechero de Bunsen en un periodo de tiempo aproximado de 5 minutos, esto se realizó con la finalidad de cocinar un poco las hojuelas y que sus componentes quedaran en la disolución. Al enfriarse un poco, se utilizó un colador para remover las hojuelas de avena. Esta mezcla se colocó en una probeta y el volumen resultó en 220 ml, esta diferencia de volumen se completó a 225 ml agregando 5 ml de agua destilada. Posteriormente se colocó en un matraz de 500 ml, donde se le agregó 8.775 gr de Agar bacteriológico. El matraz fue colocado al calor en un mechero de Bunsen para una mayor disolución de sus componentes. En los 3 matraces, se colocó cinta testigo y un tapón de torunda de gasa, después fueron colocados en la autoclave bajo condiciones de temperatura y presión adecuadas para su esterilización. Una vez fuera de la autoclave, las mezclas fueron vaciadas en cajas de Petri y se dejaron enfriar a 4°C para su posterior uso.

7.4.2. Siembra y activación de la cepa de *M. canis*.

Para la siembra de *M. canis*, se utilizó una cepa ATCC proporcionada por el Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica Hospital Universitario José E. González-U.A.N.L. Se tomó una pequeña muestra de la cepa ATCC con el asa bacteriológica y se colocó en la parte central de la caja de Petri con el medio de cultivo. La siembra fue realizada en medio PDA, SDA y agar Avena y las placas de Petri se colocaron en la incubadora a 32°C durante 7-10 días.

7.4.3. Identificación morfológica de *M. canis*.

Una vez que el hongo creció y generó conidias en el agar Avena, con un trozo de cinta scotch entre los dedos, se colectaron las conidias, posterior a esto, la cinta se pegó en una laminilla colocando la parte de las conidias sobre una gota de azul de lactofenol. Se realizó la identificación morfológica del hongo, a través de la observación de las macroconidias segmentadas, características del género *Microsporum* spp., en el microscopio óptico bajo el lente de 40x.

7.4.4. Conservación de las conidias para cepario.

Se colocó en la autoclave un tubo con 20ml de solución salina fisiológica al 0.9%. A partir de este volumen, se colocaron 4 ml en una caja de Petri con agar avena conteniendo las conidias. Con un palillo de madera, se realizó un raspado para colectar las conidias del hongo, se recolectaron los 4 ml de la caja de Petri y se colocaron en el tubo con el resto de la solución salina. El tubo con tapa de rosca fue sellado con una película de parafilm y se conservó en refrigeración a 4°C.

7.5. Cálculo de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).

7.5.1. Preparación de la microplaca CMI.

La determinación de la CMI de *M. canis* susceptible a los extractos, se realizó con algunas modificaciones del método de microdilución, descrito en el manual M38 del CLSI con microplacas de 96 pocillos. Para la preparación del medio de cultivo, se utilizó caldo Mueller Hinton con rojo fenol como indicador de pH. El extracto se trabajó en una solución madre a 80,000 ppm de la cual, se realizó una solución hija a 20,000 ppm. A partir de esta solución se realizaron las diluciones correspondientes. En cada pocillo de la microplaca, se colocaron 100 µl del medio de cultivo + 100 µl del extracto. Los ensayos se realizaron por triplicado, en los pocillos A, B y C se colocó una solución ajustada de conidias, en los pocillos F, G y H se colocó solo el extracto sin el hongo. Esto se realiza con la finalidad de obtener el valor de absorbancia del crecimiento del hongo mediante la diferencia entre ambas áreas de la microplaca. Se

realizaron las lecturas de absorbancia por medio del espectrofotómetro Epoch (Biotek, EE. UU) a 530 nm λ . Como control negativo se utilizó metanol y como control positivo Imidazol a 1,000 ppm.

La CMI se definió según la CLSI, como aquella concentración capaz de inhibir el crecimiento del hongo (%H) en un 80% en comparación con el control de crecimiento.

$$\%H = \left[\frac{\text{Control} - (\text{Tratamiento} - \text{Blanco})}{\text{Control}} \right] * 100$$

7.5.2. Cálculo de la Concentración Mínima Fungicida (CMF).

Para la obtención de la CMF, se preparó Agar PDA con rojo fenol como indicador de pH. Para la siembra se utilizó un asa bacteriológica con la cual, se inoculó la solución de cada uno de los pocillos en el medio. La evaluación del crecimiento micótico se realizó de 4 a 5 días posterior a la siembra según lo señalado en el manual M-38 de la CLSI. El resultado de la CMI fue considerado como referencia, del cual se tomó una concentración más arriba de esta y una menor para el ensayo del cálculo de la CMF. En la figura 12, se aprecia el crecimiento micótico después de 4 días para ambos extractos en sus diferentes concentraciones.

7.6. Evaluación de la citotoxicidad en línea celular HaCaT-1.

7.6.1. Desinfección y limpieza de áreas de trabajo para los ensayos.

Para el proceso de desinfección se utilizó Etanol al 70%, Lysol, toallitas desinfectantes, agua destilada estéril y sanitas. La incubadora de CO₂ se desarmó y las partes fueron colocadas sobre una mesa cubierta con papel secante, donde posteriormente se rociaron con Lysol, Etanol al 70% y finalmente se limpiaron con las toallitas desinfectantes. Después de este procedimiento las piezas fueron enjuagadas con agua destilada estéril, se dejaron secar y se colocaron de nuevo dentro de la incubadora de CO₂. Para la

campana de flujo laminar se utilizó Lysol, Etanol al 70% y toallitas desinfectantes. Todas las superficies y materiales dentro de la campana fueron desinfectadas. Las pipetas fueron desarmadas y desinfectadas de adentro hacia afuera. Una vez desinfectadas las áreas de trabajo, se colocaron dos placas de Petri con SDA para evaluar la presencia de microorganismos. Las placas se dejaron en incubación durante cinco días a 32°C en el Laboratorio de Microbiología de la FMVZ de la U.A.N.L y posteriormente se evaluó el crecimiento.

7.6.2. Descongelación y cultivo celular.

Se utilizó medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) con Suero fetal bovino al 8%, el cual se descongeló mediante un baño de inmersión en agua a una temperatura de 35-36°C. Los viales que contenían el paquete celular HaCaT-1 fueron descongelados de la misma manera. Los tubos que contienen el medio de cultivo, así como los viales fueron rociados con alcohol y secados para entrar a la campana de flujo laminar. Posteriormente, se colocó 1.5 ml del vial de cultivo celular en un tubo de 15 ml de tapa de rosca estéril y se centrifugó a 1,500 rpm durante 5 minutos. Una vez sedimentado el paquete celular, el resto del medio fue vaciado por decantación. Dentro del tubo de 15 ml se colocó 1 ml de medio DMEM y se agitó hasta disolver el pellet celular. Esta solución se colocó en un frasco de cultivo celular CellBIND CORNING, en donde se añadieron 4 ml de medio DMEM y las células se colocaron en incubación durante 5 días a 37°C. Durante este periodo, se realizaron enjuagues y cambios de medio.

7.6.3. Conteo celular.

Una vez que el cultivo celular mostró confluencia del 90-100%, se aplicaron 5 ml de tripsina al 0.25% con la finalidad de despegar los queratinocitos. Posteriormente, se dejó en incubación durante 20 minutos, para después inactivar la tripsina con 5 ml de medio DMEM. La solución obtenida fue centrifugada para obtener el pellet celular, el cual se disolvió en 1 ml de medio DMEM. Se preparó una solución de 10 µl de

colorante azul trypan y 10 µl del medio DMEM con las células. Se tomaron 10 µl de la solución y se colocó en un hematocitómetro para realizar el conteo celular y cuantificar las células vivas. A partir de este conteo se calcularon y se realizaron las diluciones correspondientes para obtener una solución que tuviera alrededor de 510,000 células.

7.6.4. Ensayo bromuro de 3- (4,5- di metil tiazol -2-il) -2,5-di fenil tetrazolio (MTT).

Para la preparación del ensayo MTT se utilizaron microplacas de 96 pocillos. En cada uno de los pocillos se colocaron aproximadamente 10,000 células HaCaT, contenidas en 100 µl con medio DMEM y se dejaron en incubación durante 24 horas a 37°C con 4% de CO₂. Los tratamientos se disolvieron a partir de una solución madre a una concentración de 10,000 ppm en medio DMEM, para cada tratamiento se prepararon tres concentraciones diferentes; una con la CMI encontrada con el hongo, otra con una concentración menor a esta y la CMF. Posteriormente, se colocaron 100 µl de los tratamientos y se añadieron en los pocillos correspondientes. Las células se dejaron en incubación durante 24 horas con los tratamientos. Se consideraron dos controles de crecimiento para los cuales solamente se añadieron 100 µl de medio DMEM. Se realizaron lavados con Buffer de Fosfato Salino (PBS) para después añadir 100 µl del reactivo MTT a una concentración de 0.1 mg/ml. Las microplacas se colocaron en incubación durante 3 horas y se añadieron 100 µl de Dimetilsulfóxido (DMSO). El ensayo se realizó por triplicado. Finalmente se realizó la lectura de las absorbancias en el espectrofotómetro a 560 nm λ. El porcentaje de citotoxicidad se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Citotoxicidad} = 100 - \left[\frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia de control}} * 100 \right]$$

7.6.5. Ensayo de Azul Tripán.

El ensayo de azul tripán tiene como finalidad evaluar el porcentaje de mortalidad de las células. Se utilizó una microplaca de 96 pocillos en la cual se colocaron aproximadamente 10,000 células HaCaT-1 por pocillo contenidas en 100 µl de medio DMEM. La microplaca se dejó en incubación durante 24 horas a 37°C y a 4% de CO₂. Posteriormente se aplicaron los tratamientos en las concentraciones anteriormente usadas y los resultados se evaluaron 24 hrs después, a través de la aplicación del reactivo azul tripán y el conteo celular en una cámara de Neubauer.

7.7. Análisis estadístico.

Para el modelo estadístico se utilizó un diseño de Bloques al Azar. La comparación de medias entre los tratamientos se realizó mediante la prueba de Tukey. Para el modelo estadístico se utilizó el software Minitab 17. En todos los análisis, los valores de $p \leq 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

8. RESULTADOS.

8.1. Obtención y caracterización de los extractos.

El porcentaje de rendimiento es la relación entre el peso de la materia vegetal utilizada para la extracción y el peso del extracto obtenido. Para ambos extractos se utilizaron 70 gramos de materia vegetal seca, a partir de la cual se obtuvieron 26.71 y 8.06 g de extractos de *A. ludoviciana* y *C. boissieri*, respectivamente.

Tabla 7. Porcentaje de rendimiento de los extractos.

Planta.	MV (g)	CE (g)	R (%)
<i>A. ludoviciana</i>	70.58	26.71	37.85
<i>C. boissieri</i>	70.62	8.06	11.42

MV: material vegetal; CE cantidad de extracto; R: rendimiento

Los resultados del tamizaje fitoquímico se expresan en la tabla 9, señalando como presencia (+) o ausencia (-) de algunos compuestos fitoquímicos a través de reacciones colorimétricas. Cabe destacar la presencia de metabolitos secundarios como: los esteroides y terpenos, los óxidos fenólicos, compuestos aromáticos, carbohidratos, flavonoides y saponina, los cuales están presentes en ambos extractos.

Tabla 8. Tamizaje fitoquímico de los extractos de las hojas de *Artemisia ludoviciana* y *Cordia boissieri*.

Metabolitos secundarios	<i>A. ludoviciana</i>	<i>C. boissieri</i>
Esteroides y Terpenos	+	+
Sesquiterpenlactonas	+	-
Coumarinas	+	-
Saponinas	+	+
Flavonoides	+	+
Carbohidratos	+	+
Alcaloides	-	-
Aromáticos	+	+
Carbonilo	-	-
Óxidos fenólicos	+	+

8.2. Activación e identificación de la cepa de *Microsporium canis*.

La cepa ATCC de *M. canis* fue proporcionada por el Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica Hospital Universitario, José E. González-U.A.N.L. Esta fue cultivada en Agar Papa Dextrosa (PDA), Agar Dextrosa Saboraud (SDA) y Agar Avena.

Tabla 9. Tiempo de crecimiento de *M. canis* en distintos agares.

AGAR	Periodo de crecimiento
AVENA	7-10 días.
PDA (Agar Papa Dextrosa)	> 15 días.
SDA (Agar Dextrosa Saboraud)	> 15 días.

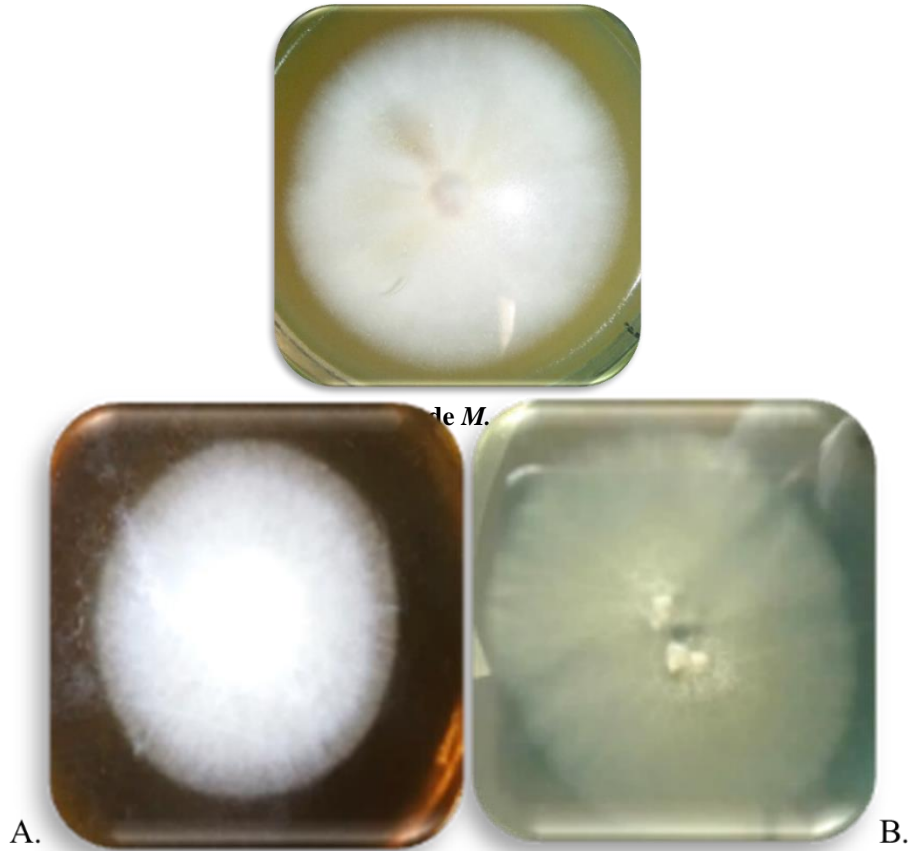


Figura 8. Crecimiento de *M canis* en Agar SDA (A) y Agar PDA (B).

Posterior a la siembra se realizó la identificación morfológica del hongo a través de su observación microscópica. Durante este proceso se logró apreciar e identificar la presencia de macroconidias en forma de raqueta segmentadas características de *M. canis*.

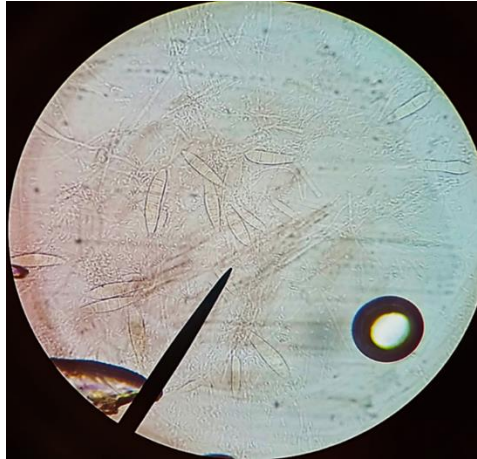


Figura 9. Observación microscópica de macroconidias de *Macrosporium canis* 40x.

8.3. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Fungicida (CMF).

En la figura 10 y 11 se observan los pocillos correspondientes a la CMI y CMF en la microplaca con el tratamiento comparando la coloración del C.R. (control de crecimiento), con la obtenida en distintas concentraciones en ppm de los extractos metanólicos de *A. ludoviciana* y *C. boissieri* respectivamente. El extracto de *A. ludoviciana* presentó una coloración ligeramente amarillenta, una CMI de 2,500 ppm y una CMF de 5,000 ppm. En el caso de *C. boissieri*, se mostró una coloración verde oscura, una CMI de 1,250 ppm y una CMF de 2,500 ppm. En los tratamientos se visualizó el cambio de coloración a rojizo, característico del cambio del pH ocasionado por el crecimiento de *M. canis* en estas concentraciones. Para la CMF se reportó un ligero crecimiento del hongo en presencia del extracto de *A. ludoviciana* a una concentración de 625 ppm, como se observa en la figura 12.

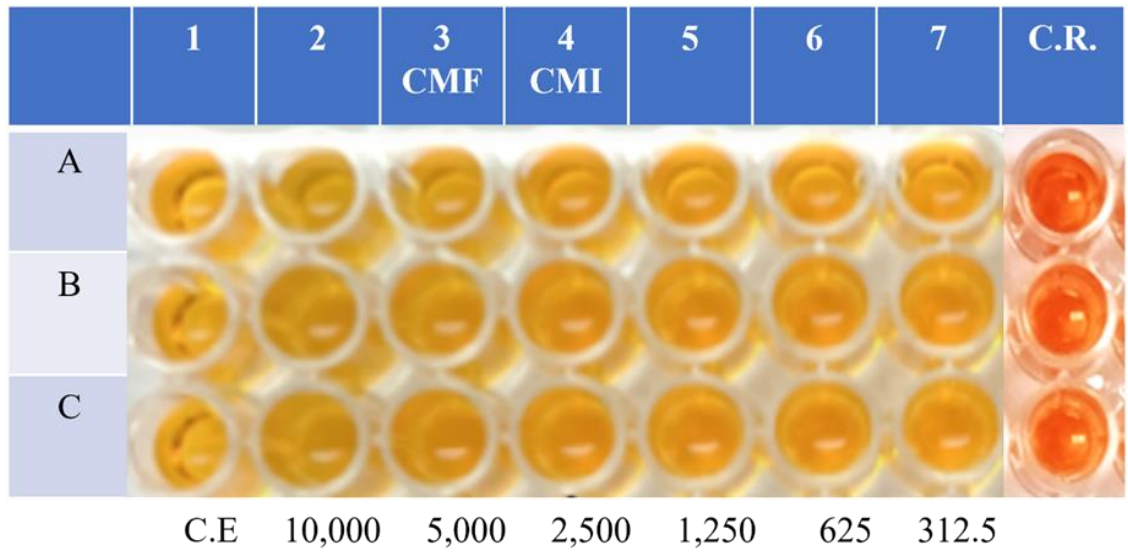


Figura 10. Pocillos donde se ubican la CMI y la CMF para el extracto de hojas de *A. ludoviciana* y su comparación con el C.R. (Control de crecimiento).

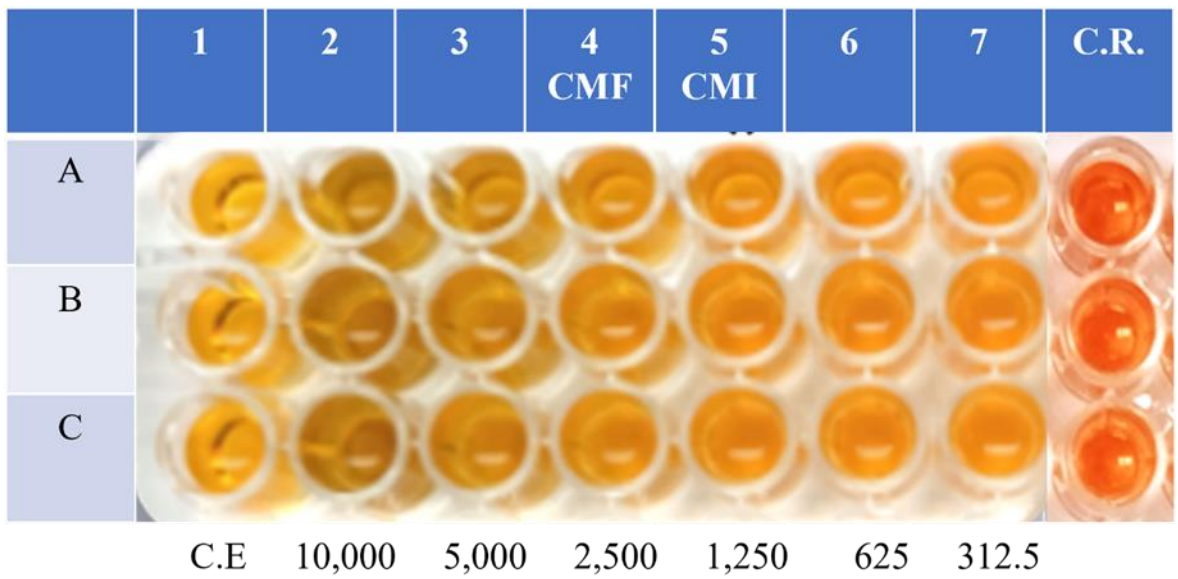


Figura 11. Pocillos donde se ubican la CMI y la CMF para el extracto de hojas de *C. boissieri* y su comparación con el C.R. (Control de crecimiento).

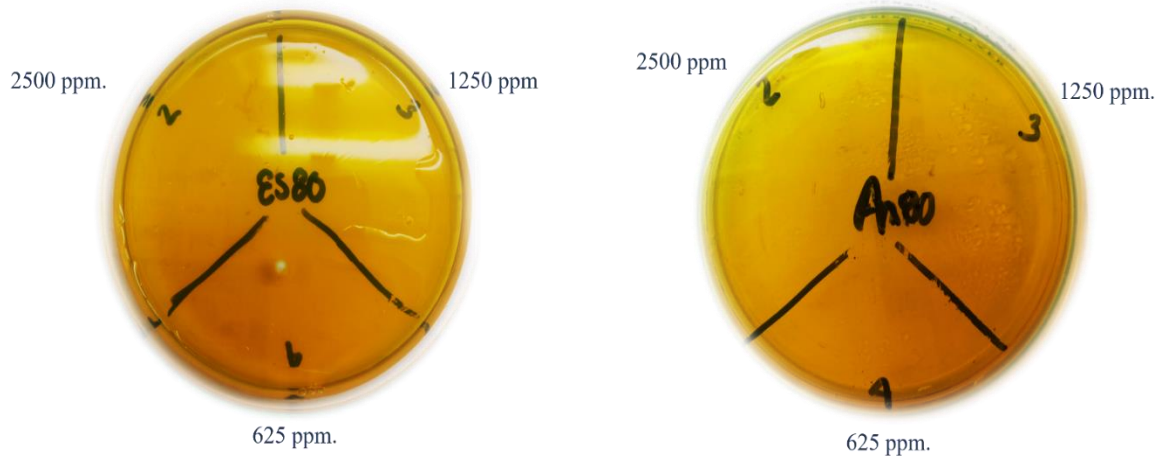


Figura 12. Determinación de la Concentración Mínima Fungicida (CMF) para Es80 (*A. ludoviciana*) y An80 (*C. boissieri*) en diferentes concentraciones del extracto (ppm).

8.4. Evaluación del porcentaje de inhibición de crecimiento de *M. canis* en presencia de los extractos de *A. ludoviciana* y *C. boissieri*.

El porcentaje de inhibición del crecimiento de *M. canis* en presencia de los extractos metanólicos de las hojas de *A. ludoviciana* y *C. boissieri*, fue calculado mediante la fórmula:

$$\% H = \left[\frac{\text{Control} - (\text{Tratamiento} - \text{Blanco})}{\text{Control}} \right] * 100$$

En el caso de los tratamientos de *A. ludoviciana* en sus tres concentraciones y el control, no existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. Para *C. boissieri* se encontró una diferencia significativa por parte de An 3 (625 ppm), en comparación con los otros tratamientos. En las figuras 13 y 14 se aprecian los porcentajes de inhibición del crecimiento del hongo para ambos extractos en diferentes concentraciones.

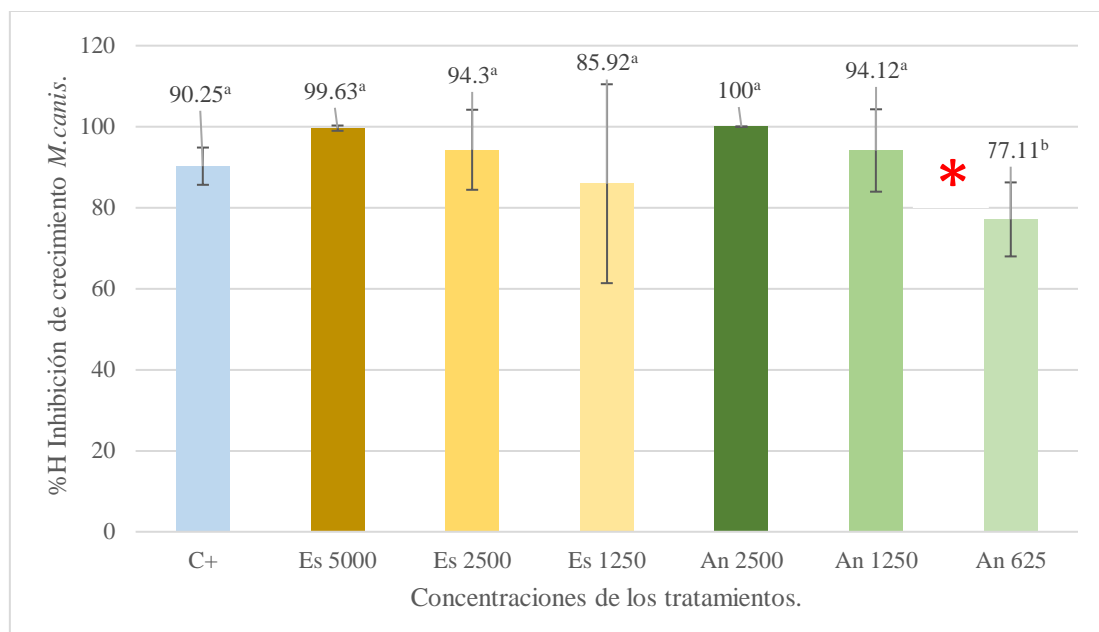


Figura 13. Porcentaje de inhibición del crecimiento de *M. canis* en presencia de distintas concentraciones de los extractos de (Es) *A. ludoviciana* $P=0.168$ ($P \leq 0.05$) y (An) *C. boissieri* $P=0.063$ ($P \leq 0.05$). * Diferencia estadísticamente significativa entre el porcentaje de inhibición de estas concentraciones mediante prueba de Tukey.

8.5. Evaluación de la citotoxicidad de los extractos en línea celular de queratinocitos (HaCaT-1), en presencia de los extractos de *Artemisia ludoviciana* y *Cordia boissieri* mediante el ensayo MTT.

Los extractos fueron sometidos a una prueba de citotoxicidad (Ensayo MTT), con la finalidad de evaluar posibles afecciones o evidencia de estrés celular en la línea celular HaCaT. Para ambos extractos, no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos y el control, el cual es medio de cultivo DMEM con células. Se obtuvo el porcentaje de viabilidad de las células en presencia de los extractos metanólicos de *A. ludoviciana* y *C. boissieri*. Los porcentajes de viabilidad de las células en presencia de los extractos se observan en las figuras 15 y 16.

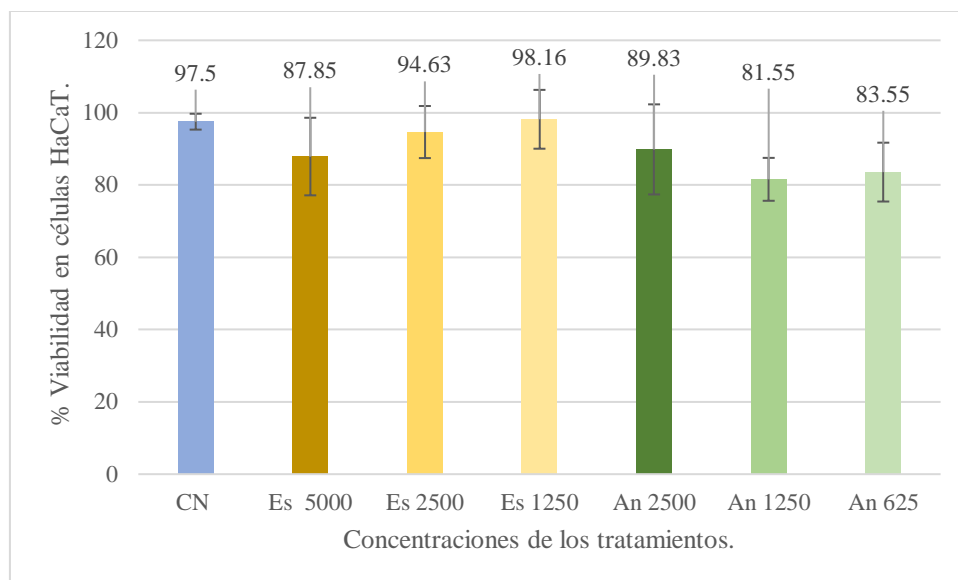


Figura 14. Porcentaje de Viabilidad de células HaCaT en presencia del extracto de *A. ludoviciana* $P=0.034$ ($P \leq 0.05$) y *C. boissieri* $P=0.268$ ($P \geq 0.05$) (ENSAYO MTT).

8.6. Evaluación de la mortalidad de los extractos en línea celular de queratinocitos (HaCaT), en presencia de los extractos de *Artemisia ludoviciana* y *Cordia boissieri*. mediante el ensayo Azul Tripán.

El ensayo Azul Tripán se realizó con la finalidad de evaluar la mortalidad celular en la línea celular HaCaT, en presencia de los extractos metanólicos de *A. ludoviciana* y *C. boissieri*. Para ambos extractos, no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos y el control, el cual es medio de cultivo DMEM con células. Se obtuvo el porcentaje de viabilidad de las células en presencia de ambos extractos.

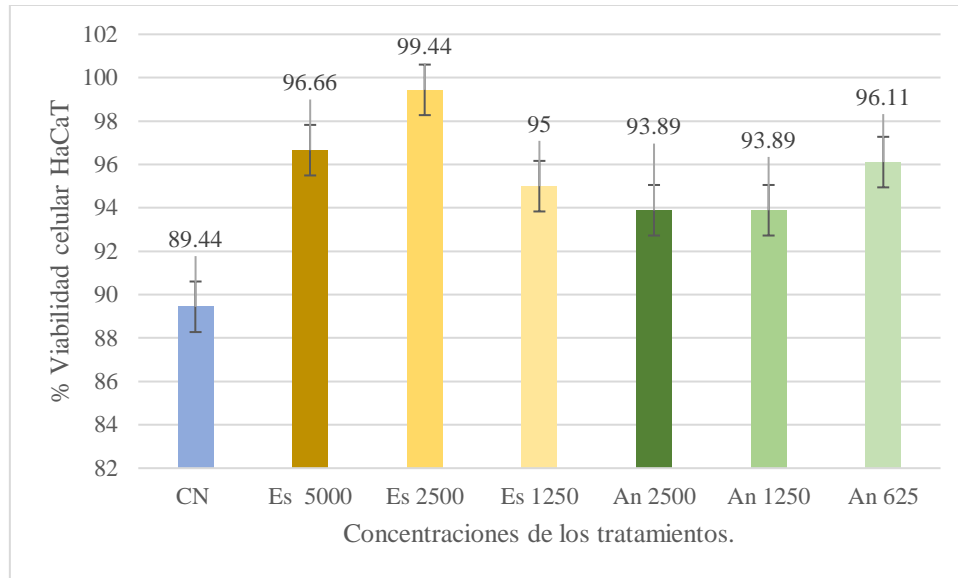


Figura 15. Porcentaje de Viabilidad de células HaCaT en presencia del extracto de *A. ludoviciana* $P=0.695$ ($P \geq 0.05$) y de *C. boissieri* $P=0.253$ ($P \geq 0.05$) (ENSAYO AZUL TRIPAN).

8.7. Resultados del modelo estadístico.

Para $p \leq 0.05$ se consideraron diferencias significativas entre los tratamientos. Por lo que estadísticamente no existe variedad entre los tratamientos, a excepción de lo obtenido mediante la comparación de medias Tukey en el porcentaje de inhibición del crecimiento de *M. canis* causado por *C. boissieri*, el cual está señalado con * en la tabla figura 13 y representa una diferencia estadísticamente significativa entre la CMI de 1250 ppm y la de 625 ppm. Así como en lo señalado en la figura 14 mediante el valor $P=0.034$ ($P \leq 0.05$) el cual señala que hay diferencia significativa entre la viabilidad celular ocasionada por la concentración de *A. ludoviciana* (Es) a 5000 ppm.

9. DISCUSIÓN

Los extractos metanólicos de las hojas de las plantas de *A. ludoviciana* y *C. boissieri*, presentaron un porcentaje de rendimiento del 37.8542% y del 11.4202% respectivamente, como se muestra en la Tabla 8. García-Ponce et al. (2020), reportó rendimientos del 1.9434% para *A. ludoviciana* y del 1.7891% para *C. boissieri* utilizando el mismo solvente. Para este estudio, las hojas de Estafiate, se colectaron en el municipio de Jaumave, localizado en la zona árida de Tamaulipas, mientras que en el estudio de García-Ponce et. (2020) se colectaron en el municipio de Guadalupe, en una zona semiárida. Las hojas de anacahuita se colectaron del municipio de Guadalupe, mientras que, en el estudio anteriormente mencionado se colectaron del municipio de Higuera, considerada una zona árida de N.L. Cabe señalar que las diferencias encontradas en el porcentaje de rendimiento de las plantas, se deben a múltiples factores, siendo uno de ellos el área de la colecta, además de sus condiciones medioambientales (Lee et al., 2022; Toumi et al., 2022). Por otro lado, Benítez-Benítez et al. (2020), obtuvo un % de rendimiento del 37.600% para Alegría (*Scutellaria incarnata*) y del 37% para Amansatoros (*Justicia pectoralis*), a partir de una extracción mediante maceración sin agitación durante 48 horas de 250 g. de materia vegetal, a diferencia del presente estudio, donde la extracción se realizó a través del método Soxhlet, utilizando 70 g de materia vegetal. El porcentaje de rendimiento varía de acuerdo a la planta y al método de extracción utilizado, además de la cantidad de la planta y la especie con la que se está trabajando (Heya et al., 2022; Benítez-Benítez et al., 2020). Tanto García-Ponce et al. (2020) utilizando *A. ludoviciana*, *C. boissieri* y *L. chinensis*, como Heya et al. (2022), utilizando *Euphorbia tirucalli* L, realizaron extracciones mediante Soxhlet con diferentes solventes (hexano, cloroformo y metanol) obteniendo ambos mayores porcentajes de rendimiento en el extracto metanólico, concluyendo que el tipo de solvente utilizado influye en el porcentaje de rendimiento adquirido. Al igual que nuestro trabajo, Imanirampa & Alele, (2016) obtuvo el extracto de *Cleome gynandra* L. mediante extracción Soxhlet con solvente metanol y además mediante maceración en frío con solución acuosa, obteniendo en

ambos extractos buena actividad antimicótica sobre dermatofitos, sin embargo, el autor encontró menor CMF en el extracto acuoso, considerándolo así la mejor opción.

Parameswari et al. (2019), realizó una extracción metanólica de hojas de *Artemisia nilgarica*, en la que encontró; taninos, flavonoides, alcaloides, saponinas, coumarinas, esteroides y óxidos fenólicos, similar a lo encontrado en el tamizaje fitoquímico del extracto de *A. ludoviciana* en el presente estudio, con la única diferencia de no presentar alcaloides en este último. García-Ponce. (2020), reportó la presencia de esteroides y terpenos, sesquiterpenlactonas, coumarinas, flavonoides y carbohidratos en el extracto de *A. ludoviciana*. Para el de *C. boissieri*, reportó la presencia de esteroides, terpenos, flavonoides y carbohidratos. Sin embargo, además, de obtener los mismos metabolitos secundarios en el presente estudio, en este se obtuvieron saponinas, aromáticos y óxidos fenólicos. Estas diferencias significativas entre los resultados obtenidos en el tamizaje fitoquímico con otros autores, son consecuencia de las diferentes áreas de colecta de las plantas, debido a que, la presencia o ausencia de los diferentes metabolitos está íntimamente relacionado con; el estrés y sus condiciones medioambientales, la época del año, la edad de la planta, su etapa productiva, el tipo de suelo, su ubicación, la parte de la planta de donde se elaboró el extracto, ya sean hojas, semillas, flores o tallos y todos aquellos factores que influyen en el desarrollo de la misma (Lee et al., 2022; Toumi et al., 2022).

En cuanto a la activación de la cepa de *M. canis*, cabe señalar que el hongo tuvo mayor crecimiento y generación de conidias en menor tiempo en el Agar Avena que en el Agar PDA y SDA, a diferencia de lo señalado por otros autores, donde mencionan la utilización del Agar Micobiotic, Agar Papa Dextrosa (PDA) y Agar Dextrosa Sabouraud (SDA) suplementado con cloranfenicol y acitiodina para la activación y el aislamiento de dermatofitos (Arrazola-Guerrero et al., 2015; Begum et al., 2020; Copetti et al., 2006; Molina De Diego, 2011).

En los resultados encontrados en este trabajo, ambos extractos mostraron actividad antifúngica contra *M. canis*. El extracto de *A. ludoviciana* con una CMI de 2,500 ppm y con una CMF de 5,000 ppm, mientras que el de *C. boissieri*, mostró una menor CMI y una CMF, siendo de 1,250 ppm y de 2,500 ppm respectivamente. En un estudio

realizado por Soares et al., (2012), se evaluó el aceite esencial de *Coriandrum sativum* (L.) contra *M. canis*, obteniendo una CMI entre 78 y 620 $\mu\text{g/mL}$ y una CMF entre 150 y 1,250 $\mu\text{g/mL}$. Capoci et al., (2015) evaluó el aceite esencial de *Cymbopogon nardus* (L.) (Citronella), con una CMI entre 9.75 y 625 $\mu\text{g/ml}$ y una CMF de 78 $\mu\text{g/ml}$. Cano et al., (2008) reportó la utilización de aceite esencial de hojas de *Minthostachys mollis* (Muña) sobre *Candida albicans*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Microsporum canis*, donde no se observó crecimiento fúngico en todo el diámetro de las placas con aceite esencial de muña al 50 y 100%. Estos valores de CMI y CMF son bajos en comparación con el presente trabajo, ya que el aceite se obtiene mediante diferentes técnicas y solventes, dando como resultado distintas cantidades de metabolitos secundarios, así como la presencia o ausencia de ellos. Además que al utilizar plantas diferentes, se obtienen otras propiedades (Duarte et al., 2005; Ruiz Benitez, 2020; Lee et al., 2022; Toumi et al., 2022).

Por su parte, Heya et al. (2022), demostraron que las particiones del extracto metanólico y etanólico de *E. tirucalli* L. poseen actividad antimicótica sobre los dermatofitos *T. rubrum* (CMI de 125 $\mu\text{g/mL}$ para etanol y CMI de 125 $\mu\text{g/mL}$ para metanol), *Trichophyton* (CMI de 500 $\mu\text{g/mL}$ para etanol y 125 $\mu\text{g/mL}$ para metanol) y además sobre otros microorganismos. En este estudio se encontraron CMI y CMF más bajas que en nuestro trabajo y posiblemente se debe a que los géneros *Trichophyton* spp. y *Epidermophyton* spp. poseen macroconidias con paredes más delgadas y lisas, mientras que aquellas pertenecientes al género *Microsporum* spp. son gruesas y rugosas, dificultando de esta forma quizás, el acceso de los metabolitos secundarios en ciertas concentraciones (Cortez Alvario et al., 2022).

Por otro lado Mccutcheon et al., (1994) utilizó el extracto metanólico de *A. ludoviciana* y evaluó sus propiedades antimicrobianas mediante el ensayo de difusión de discos en diferentes microorganismos, donde reportó buen efecto antimicótico sobre dos especies diferentes del género *Microsporum*: (*Microsporum cookeri* y *Microsporum gypseum*) por parte de este extracto, generando halos de inhibición de 10-15 mm. .

Choi et al., (2017) trabajó con el extracto en polvo de la raíz de *Amoracia rusticana* sobre *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *M. canis*, y *E. floccosum*, donde encontró que la

CMI fue de 200, 200, 100, y 100 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Al igual que en nuestro estudio, la CMI *in vitro* fue calculada mediante el método descrito en el Manual M-38 de CLSI. Se realizó además una prueba de difusión en Agar con disco, la cual reveló que estos dermatofitos son perfectamente inhibidos entre concentraciones de 5,000 $\mu\text{g/mL}$ y 10,000 $\mu\text{g/mL}$. En este caso el autor propone como responsable de la actividad antimicrobiana a los isotiocianatos, mientras que otros autores consideran que las cualidades antimicrobianas de los extractos de plantas, provienen específicamente de otros metabolitos secundarios, tal es el caso de Qasim et al., (1989) y Rasool et al., (1989) quienes mencionan que los dermatofitos *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *Microsporum gypseum* y *M. canis*, presentan sensibilidad ante la presencia de los terpenos y monoterpenos del extracto de *E. tirucalli*. L. Mientras que Duong et al., (2019) menciona que la actividad antimicrobiana sobre *T. interdigitalis* es proporcionada por las sesquiterpenlactonas en el extracto de la misma planta. Así mismo, Cano et al., (2008) asocia la actividad antimicótica de *Minthostachys mollis* a la presencia de monoterpenos. Cabe destacar que tanto esteroides y terpenos, así como sesquiterpenlactonas aparecen en el tamizaje fitoquímico de ambos extractos en nuestro estudio, por lo que bien, estos metabolitos podrían ser responsables de la actividad antimicótica de estos extractos. Sin embargo, algunos autores asocian el potencial antimicótico y antimicrobiano a un grupo funcional en específico, otros autores han reportado el fenómeno de sinergia e interacción de los diferentes compuestos para proporcionar el potencial antifúngico y antimicrobiano a las plantas (Al-Ani et al., 2015; Mahlo et al., 2016).

Respecto a los resultados obtenidos en la citotoxicidad, en el ensayo MTT (Fig. 15 y 16), se observan porcentajes de viabilidad celular del 97.50% para el control (medio de cultivo + células), es importante mencionar que el control en el ensayo tiene un margen de 10 % de mortalidad, esto debido a que hay múltiples factores que pueden llegar a afectar, como un pH elevado o la exposición prolongada de los reactivos a la luz, que pueden provocar una reducción espontánea y acelerada de las sales de tetrazolio y aumentar los valores de absorbancia de fondo (Riss et al., 2016).

En cuanto a la evaluación de la viabilidad celular en presencia de los diferentes extractos, se encontró que para el extracto de *A. ludoviciana* en las concentraciones de 5,000 ppm, 2,500 ppm y 1,250 ppm, se obtuvieron porcentajes de viabilidad del 87.85%, 94.63% y 98.16% respectivamente. En el caso del extracto de *C. boissieri*, la concentración de 2,500 ppm mostró una viabilidad del 89.83%, la de 1,250 ppm de 81.55% y la de 625 ppm de 83.55%.

Autores como, Ávalos-Soto et al., (2014), evaluaron la concentración inhibitoria máxima (IC₅₀) de extractos etanólicos de la semilla sin cáscara, con cáscara, cáscara y hoja de *Azadirachta indica* (Neem), así como de las particiones hexánicas y clorofórmicas del extracto de la hoja y semilla, en una línea celular HaCaT, mediante ensayo MTT y observaron que los extractos etanólicos, presentaron menor citotoxicidad que las particiones hexánicas y clorofórmicas, obteniendo las IC₅₀ en concentraciones más altas para los extractos etanólicos, lo que significa que en los extractos con base de alcohol, al igual que los utilizados en el presente estudio, se causan alteraciones en las células en dosis mayores que lo mostrado por los otros solventes. Esto puede deberse a lo mostrado por Cuatecontzi Romero et al., en 2021, donde evaluó la actividad citotóxica mediante el ensayo MTT de los extractos metanólicos y hexánicos de las hojas de *Struthanthus deppeanus* en las líneas celulares; MDA MB 231 (Cáncer de mama), MCF7, T47-D (Tumor mamario), SiHa (Carcinoma cervical con papiloma virus 16), HeLa (Cáncer cervicouterino), C33A (Cáncer de cérvix) y HaCaT, como conclusiones de ese estudio, los extractos metánolicos presentaron una mayor actividad antioxidante y una mayor cantidad de fenoles totales, polifenoles, azúcares y taninos, cabe destacar que el extracto metanólico no presentó citotoxicidad en la concentración de 100 µg/mL para ninguna de las diferentes líneas celulares. El extracto hexánico presentó mayor concentración de esteroides, además de alta citotoxicidad en las diferentes líneas celulares. En la cromatografía de la partición hexánica, se aislaron principalmente compuestos con esqueleto titerpénico, asociados a una vía de activación de las caspasas, induciendo la muerte celular por apoptosis.

Por otro lado, en el ensayo de Azul Tripán (Fig. 17 y 18), el control mostró una viabilidad del 89.44%. En el extracto de *A. ludoviciana* en las concentraciones de 5,000

ppm, 2,500 ppm, 1,250 ppm, se obtuvieron porcentajes de viabilidad del 93.89%, 93.89% y 96.11% respectivamente. Para el extracto de *C. boissieri*, la concentración de 2,500 ppm mostró una viabilidad del 96.66%, la de 1,250 ppm de 99.44% y 625 ppm de 95%.

Mediante el ensayo de Azul Tripan, Ali et al., (2021) reportó que el mayor efecto de citotoxicidad del extracto de *Artemisia aucheri* sobre las líneas celulares HT29 y HEK239, se observó en la concentración de 1,000 µg/ml, evaluando la supervivencia de las células cancerosas donde se encontró HT29 (IC₅₀ = 57,88 µg/ml) y HEK (IC₅₀ = 295 µg/ml), comprobando que la viabilidad disminuyó con el aumento de la concentración de *A. aucheri*, a diferencia del presente estudio, ya que no existe diferencia estadísticamente significativa del porcentaje de viabilidad en presencia del extracto en las diferentes concentraciones para ninguno de los dos ensayos. Rajput et al., (2018), evaluó la citotoxicidad del arsénico en queratinocitos de piel humana células HaCaT, utilizando ensayos de azul tripan, obteniendo que las concentraciones más bajas (0.1-0.5 µM) de arsénico no fueron tóxicas e incluso mejoraron la proliferación celular, similar a lo encontrado en el presente trabajo, donde los extractos mediante sus componentes otorgan actividad antioxidante y citoprotectora al cultivo celular mediante sus compuestos presentes.

Autores como Devmurari et al., (2010); Khezrilu & Heidari (2014); Pal & Gosh., (2018) Skowrya et al., (2014), asocian la actividad citoprotectora antioxidante de algunas especies del género *Artemisia* con la presencia de taninos, fenoles, flavonoides y terpenos. Por otro lado, utilizando el extracto de hojas de *C. boissieri*, Owis et al. (2017), encontró algunas moléculas de importancia terapéutica, similares al presente estudio, las cuales fueron glucósidos de flavonoides, dos agliconas de flavonoides, un ácido fenólico y un glucósido de esterol. Estos metabolitos se asocian con posibles aplicaciones en funciones metabólicas del ser humano, como; resistencia a la insulina, tolerancia a la glucosa, función renal, perfiles de lípidos, reducción del estrés oxidativo e inflamación. Mientras que, Venegas Casanova, (2019), realizó la evaluación fitoquímica preliminar del extracto metanólico y etanólico de las flores de *Cordia lutea* Lam. (Boraginaceae) y su capacidad antioxidante, las cuales fueron obtenidas en

distrito y provincia de Otuzco, Perú, encontrando compuestos fenólicos, leucoantocianidinas y flavonoides, principalmente. Nuestros resultados de viabilidad celular en ambos ensayos muy posiblemente, se deben a la presencia de óxidos fenólicos y flavonoides en los extractos, ya que, estos metabolitos secundarios otorgan actividad antioxidante a las células evitando así el estrés oxidativo y la muerte celular.

10. CONCLUSIONES

M. canis presenta un mayor desarrollo de conidias en menor tiempo en Agar Avena comparado con los otros Agares. *C. boissieri* y *A. ludoviciana* presentan actividad antimicótica contra *M. canis*. Ambos extractos presentan alta viabilidad en células HaCaT en las CMI y CMF del extracto, tanto su efecto antimicótico como citoprotector, puede deberse a la presencia de los metabolitos secundarios encontrados en el tamizaje fitoquímico y sus respectivos efectos. Los extractos de plantas *C. boissieri* y *A. ludoviciana* pueden considerarse como alternativas terapéuticas para el tratamiento de la dermatofitosis causada por este dermatofito. Sin embargo, se sugieren estudios a mayor profundidad para la evaluación más específica de sus componentes y método de aplicación *in vivo*.

11.BIBLIOGRAFÍAS

- Ali, A. N. M., Saeed, N. A. H. A. A. H., & Omeare, H. A. (2021). The Anticancer Properties of Artemisia aucheri Boiss Extract on HT29 Colon Cancer Cells. *Journal of Gastrointestinal Cancer*, 52(1), 113–119. <https://doi.org/10.1007/s12029-019-00354-2>
- Almeida, S. R. (2008). Immunology of dermatophytosis. In *Mycopathologia* (Vol. 166, Issues 5–6, pp. 277–283). <https://doi.org/10.1007/s11046-008-9103-6>
- Anaya-Eugenio, G. D., Rivero-Cruz, I., Rivera-Chávez, J., & Mata, R. (2014). Hypoglycemic properties of some preparations and compounds from Artemisia ludoviciana Nutt. *Journal of Ethnopharmacology*, 155(1), 416–425. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.05.051>
- Aneke, C. I., Otranto, D., & Cafarchia, C. (2018). Therapy and antifungal susceptibility profile of microsporum canis. In *Journal of Fungi* (Vol. 4, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/jof4030107>
- Arenas, R. (2014). *Micología Médica Ilustrada.: Vol.* (INTERAMERICANA EDITORES, Ed.; McGRAW-HILL).
- Arrazola-Guerrero, J., Isa-Isa, R., Torres-Guerrero, E., & Arenas, R. (2015). Tiña de la cabeza: Descripción de los hallazgos dermatoscópicos en 37 pacientes. *Revista Iberoamericana de Micología*, 32(4), 242–246. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2014.09.002>
- Ávalos-Soto, J., Fco Treviño-Neávez, J., Julia Verde-Star, M., Rivas-Morales, C., Oranday-Cárdenas, A., Moran-Martínez, J., Benjamín Serrano-Gallardo, L., Eufemia Morales-Rubio, M., & Ciencias Farmacéuticas, D. (2014). *Redalyc.Evaluación citotóxica de los extractos etanólicos de Azadirachta indica (A. Juss) sobre diferentes líneas celulares.*
- Ávila-Sosa, R., Saez-Gomez, K., Castañeda-Roldán, E., & Munguía-Pérez, R. (2020). [DIVERSITY OF KERATINOPHILIC FUNGI IN SOILS OF WARM CLIMATES OF MEXICO]. In *Tropical and Subtropical Agroecosystems* (Vol. 23).
- Begum, J., Mir, N. A., Lingaraju, M. C., Buyamayum, B., & Dev, K. (2020). Recent advances in the diagnosis of dermatophytosis. In *Journal of Basic Microbiology* (Vol. 60, Issue 4, pp. 293–303). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/jobm.201900675>
- Benítez-Benítez, R., Sarria-Villa, R. A., Gallo-Corredor, J. A., Pérez Pacheco, N. O., Álvarez Sandoval, J. H., & Giraldo Aristizabal, C. I. (2020). Obtención y rendimiento del extracto etanólico de dos plantas medicinales. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 15(1), 31–40. <https://doi.org/10.18359/rfcb.3597>

- Betancourt, O., Salas, V., Otarola, A., Zaror, L., Salas, E., & Neumann, J. (2009). *Microsporum canis* en gatos dermatológicamente sanos en Temuco, Chile. *Revista Iberoamericana de Micología*, 26(3), 206–210. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2009.03.002>
- Bisht, D., Kumar, D., Kumar, D., Dua, K., & Chellappan, D. K. (2021). Phytochemistry and pharmacological activity of the genus artemisia. In *Archives of Pharmacal Research* (Vol. 44, Issue 5, pp. 439–474). Pharmaceutical Society of Korea. <https://doi.org/10.1007/s12272-021-01328-4>
- Blasco-Morente, G., Garrido-Colmenero, C., López, I. P., & Tercedor-Sánchez, J. (2014). Wood' light in dermatology: An essential technique. In *Piel* (Vol. 29, Issue 8, pp. 487–494). Ediciones Doyma, S.L. <https://doi.org/10.1016/j.piel.2014.03.015>
- Boehm, T. M. S. A., & Mueller, R. S. (2019). Dermatophytosis in dogs and cats - an update. *Tierärztliche Praxis Ausgabe K: Kleintiere - Heimtiere*, 47(4), 257–269. <https://doi.org/10.1055/a-0969-1446>
- Bonifaz. (2015). *Micología Médica Básica: Vol. Capítulo 7* (5ta Edición).
- Cano, C., Bonilla, P., Roque, M., & Ruiz, J. (2008). ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA IN VITRO Y MeTABOLIToS DeL ACeITE eSeNCIAL De LAS hoJAS De *Minthostachys mollis* (MUÑA) ARTÍCULO oRIGINAL. In *Rev Peru Med Exp Salud Publica* (Vol. 25, Issue 3).
- Capoci, I. R. G., da Cunha, M. M., Bonfim-Mendonça, P. de S., Ghiraldi-Lopes, L. D., Baeza, L. C., Kioshima, E. S., & Svidzinski, T. I. E. (2015). Atividade antifúngica de *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle (citronela) contra *Microsporum canis* de animais e ambiente doméstico. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 57(6), 509–511. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000600008>
- Carvalho Reis, A. P., Correia, F. F., Jesus, T. M., Pagliari, C., Sakai-Valente, N. Y., Júnior, W. B., Criado, P. R., Benard, G., & Teixeira Sousa, M. G. (2019). In situ immune response in human dermatophytosis: Possible role of Langerhans cells (CD1a+) as a risk factor for dermatophyte infection. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 61. <https://doi.org/10.1590/s1678-9946201961056>
- Castan, L. R., Ân-Olivares, Ä., Manzano-Gayosso, P., lo Âpez-Martõ Ânez, R., de La, I. A., Âzquez, R.-V., Soto, E., & Âs, -Reyes-Solõ. (2001). Effectiveness of terbina®ne in the eradication of *Microsporum canis* from laboratory cats Terbina®n in der Eradikation von *Microsporum canis* bei Laborkatzen. In *MYCOSES* (Vol. 44).
- Chermette, R., Ferreiro, L., & Guillot, J. (2008). Dermatophytoses in animals. In *Mycopathologia* (Vol. 166, Issues 5–6, pp. 385–405). <https://doi.org/10.1007/s11046-008-9102-7>
- Choi, K. D., Kim, H. Y., & Shin, I. S. (2017). Antifungal activity of isothiocyanates extracted from horseradish (*Armoracia rusticana*) root against pathogenic dermal

- fungi. *Food Science and Biotechnology*, 26(3), 847–852.
<https://doi.org/10.1007/s10068-017-0104-4>
- Cock, I. E., & van Vuuren, S. F. (2020). A review of the traditional use of southern African medicinal plants for the treatment of fungal skin infections. In *Journal of Ethnopharmacology* (Vol. 251). Elsevier Ireland Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112539>
- Copetti, M. V., Santurio, J. M., Cavalheiro, A. S., Boeck, A. A., Siqueira Argenta, J., Canabarro Aguiar, L., & Alves, S. H. (2006). Pub. 661 Dermatophytes isolated from dogs and cats suspected of dermatophytosis in Southern Brazil Dermatofitos isolados de cães e gatos com suspeita de dermatofitose no sul do Brasil. *Acta Scientiae Veterinariae*, 34(2), 119–124. www.ufrgs.br/favet/revista
- Cortez Alvrio Saskia (2022) Morfología de los Géneros Trichophyton, Microsporum, y Epidermophyton, Micología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de Guayaquil <https://www.studocu.com/ec/document/universidad-de-guayaquil/micologia/morfologia-de-los-generos-trichophytum-microsporum-y-epidermophytum-saskia-cortez-alvario/21873949>
- Cuatecontzi Guerrero Diana, (2016); Evaluación de la actividad citotóxica de extractos de *Struthanthus deppeanus*, Tesis de Maestría en Biotecnología Aplicada; Centro de investigación en biotecnología aplicada, Instituto Politécnico Nacional.
- da Cunha, M. M., Capote-Bonato, F., Capoci, I. R. G., Bonato, D. V., Ghizzi, L. G., Paiva-Lima, P., Baeza, L. C., & Svidzinski, T. I. E. (2019). Epidemiological investigation and molecular typing of dermatophytosis caused by *Microsporum canis* in dogs and cats. *Preventive Veterinary Medicine*, 167, 39–45.
<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.03.019>
- de Hoog, G. S., Dukik, K., Monod, M., Packeu, A., Stubbe, D., Hendrickx, M., Kupsch, C., Stielow, J. B., Freeke, J., Göker, M., Rezaei-Matehkolaei, A., Mirhendi, H., & Gräser, Y. (2017). Toward a Novel Multilocus Phylogenetic Taxonomy for the Dermatophytes. *Mycopathologia*, 182(1–2), 5–31. <https://doi.org/10.1007/s11046-016-0073-9>
- Derby, R., Rohal, P., Jackson, C., Beutler, A., & Olsen, C. (2011). Novel treatment of onychomycosis using over-the-counter mentholated ointment: A clinical case series. *Journal of the American Board of Family Medicine*, 24(1), 69–74.
<https://doi.org/10.3122/jabfm.2011.01.100124>
- Devmurari VP, Jivani NP (2010) Anticancer evaluation of *Artemisia nilagirica*. *Int J Pharm Tech Res* 2(2):1603–1608
- Duarte, M. C. T., Figueira, G. M., Sartoratto, A., Rehder, V. L. G., & Delarmelina, C. (2005). Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 97(2), 305–311. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.11.016>

- Duong TH, Beniddir MA, Genta-Jouve G, Nguyen H-H, Nguyen D- P, Nguyen T-A-T, Mac D-H, Boustie J, Nguyen K-P-P, Chavasiri W, Pogam LP. 2019. Further terpenoids from *Euphorbia tirucalli*. *Fitoterapia* 135, 44–51.
- Feuillet C. 2018; IT IS. [Online] Disponible en::
https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=31744#null
- Fisiopatología, T., Paulina Uribe, M., & Cardona-castro, N. (2013). PALABRAS CLAVE Mecanismos de adherencia e invasión de dermatofitos a la piel Mechanisms of skin adherence and invasion by dermatophytes A Artículo de revisión. In *Rev CES Med* (Vol. 27, Issue 1).
- Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Pennisi, M. G., Addie, D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Hartmann, K., Hosie, M. J., Lloret, A., Lutz, H., Marsilio, F., Möstl, K., Radford, A. D., Thiry, E., Truyen, U., & Horzinek, M. C. (2013). Dermatophytosis in Cats: ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 15(7), 598–604.
<https://doi.org/10.1177/1098612X13489222>
- García Ponce Romario (2020) *Evaluación de alternativas fitoterapéuticas y acaricidas sintéticos sobre Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acarí: Ixodidae)*. Tesis de Maestría en Ciencia Animal, Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Ghannoum, M., Isham, N., & Sheehan, D. (2006). Voriconazole susceptibilities of dermatophyte isolates obtained from a worldwide tinea capitis clinical trial. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(7), 2579–2580. <https://doi.org/10.1128/JCM.00818-06>
- Ginter-Hanselmayer, G., Weger, W., Ilkit, M., & Smolle, J. (2017). *Epidemiology of tinea capitis in Europe: current state and changing patterns*.
- Graser, Y., Ser, Ú., Kuijpers, A. F. A., Fari, M. el, Presber, W., & de Hoog, G. S. (2000). Molecular and conventional taxonomy of the *Microsporum canis* complex. In *Medical Mycology* (Vol. 38).
- Guarro, J. (2012). Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30(1), 33–39.
<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.09.006>
- Guía ESCCAP N°2*. (2011).
https://www.esccap.es/wpcontent/uploads/2020/03/guia7_2020.pdf
- Gupta, A. K., & Cooper, E. A. (2008). Update in antifungal therapy of dermatophytosis. In *Mycopathologia* (Vol. 166, Issues 5–6, pp. 353–367). <https://doi.org/10.1007/s11046-008-9109-0>
- Havlickova, B., Czaika, V. A., & Friedrich, M. (2008.). *Epidemiological trends in skin mycoses worldwide*.

- Hayette, M. P., & Sacheli, R. (2015). Dermatophytosis, Trends in Epidemiology and Diagnostic Approach. In *Current Fungal Infection Reports* (Vol. 9, Issue 3, pp. 164–179). Current Medicine Group LLC 1. <https://doi.org/10.1007/s12281-015-0231-4>
- Heya MS, Verde-Star MJ, Galindo-Rodríguez SA, García-Hernández DG, Rivas-Morales C, Robledo-Leal E. Diagnóstico de la tinea pedis y tinea unguium en la zona metropolitana de Monterrey, Nuevo León, México. *Dermatol Rev Mex* 2021; 65 (6): 839-849. <https://doi.org/10.24245/dermatolrevmex.v65i6.7146>
- Heya, M. S., Verde-Star, M. J., Galindo-Rodríguez, S. A., Rivas-Morales, C., Robledo-Leal, E., & García-Hernández, D. G. (2022). In Vitro Antifungal Antibacterial Activity of Partitions from *Euphorbia tirucalli* L. *Analytica*, 3(2), 228–235. <https://doi.org/10.3390/analytica3020016>
- Hu, Z., Tao, Y., Tao, X., Su, Q., Cai, J., Qin, C., Ding, W., & Li, C. (2019). Sesquiterpenes with Phytopathogenic Fungi Inhibitory Activities from Fungus *Trichoderma virens* from Litchi chinensis Sonn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(38), 10646–10652. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b04053>
- Imanirampa, L., & Alele, P. E. (2016). Antifungal activity of *Cleome gynandra* L. aerial parts for topical treatment of *Tinea capitis*: An in vitro evaluation. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1187-9>
- Indarjulianto, S., Yanuartono, Y., Widyarini, S., Raharjo, S., Purnamaningsih, H., Nururrozi, A., Haribowo, N., & Jainudin, H. A. (2017). Infeksi *Microsporum canis* pada Kucing Penderita Dermatitis (MICROSPORUM CANIS INFECTION IN DERMATITIS CATS). *Jurnal Veteriner*, 18(2), 207–210. <https://doi.org/10.19087/jveteriner.2017.18.2.207>
- Khan AQ, Rasheed T, Kazmi NUH, Ahmed Z, Malik A. 1988. Cycloeuphordenol, a new Triterpene From *Euphorbia*. *Phytochemistry*. 27, 2279–2281.
- Khezrili BJ, Heidari R (2014) The evaluation of antioxidant activities and phenolic compounds in leaves and inflorescence of *Artemisia dracuncululus* L. by HPLC. *J Med Plants* 13(51):41–50
- Koneman. (2006). *Koneman diagnóstico microbiológico.: Vol.* (Editorial médica panamericana., Ed.).
- Lee, J.-H., Tanaka, S., & Goto, E. (2022). Growth and Biosynthesis of Phenolic Compounds of Canola (*Brassica napus* L.) to Different Ultraviolet (UV)-B Wavelengths in a Plant Factory with Artificial Light. *Plants*, 11(13), 1732. <https://doi.org/10.3390/plants11131732>
- Lopes, G., Pinto, E., & Salgueiro, L. (2017). Natural Products: An Alternative to Conventional Therapy for Dermatophytosis? *Mycopathologia*, 182(1–2), 143–167. <https://doi.org/10.1007/s11046-016-0081-9>

- Mahlo, S. M., Chauke, H. R., McGaw, L., & Eloff, J. (2016). Antioxidant and antifungal activity of selected medicinal plant extracts against phytopathogenic fungi. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 13(4), 216–222. <https://doi.org/10.21010/ajtcam.v13i4.28>
- Martinez-Rossi, N. M., Peres, N. T. A., & Rossi, A. (2008). Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. In *Mycopathologia* (Vol. 166, Issues 5–6, pp. 369–383). <https://doi.org/10.1007/s11046-008-9110-7>
- Mayorga, J. , Esquivel - González, Prado-Trillo, & Barba- Gómez. (2016). Características clínicas y epidemiológicas de pacientes con infección por *Microsporum canis*. *Dermatol Rev Mex*, 60, 18–23.
- Mccutcheon, A. R., Ellis, S. M., Hancock, R. E. W., & Columbian, G. H. N. T. (1994). screening of medicinal plants of British native peoples. In *Journal of Ethnopharmacology* (Vol. 44).
- Molina De Diego, A. (2011). Aspectos clínicos, diagnósticos y terapéuticos de las dermatofitosis. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(SUPPL. 3), 33–39. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(11\)70025-8](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(11)70025-8)
- Molina-Salinas, G. M., Pérez-López, A., Becerril-Montes, P., Salazar-Aranda, R., Said-Fernández, S., & Torres, N. W. de. (2007). Evaluation of the flora of Northern Mexico for in vitro antimicrobial and antituberculosis activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 109(3), 435–441. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.08.014>
- Monod, M. (2008). Secreted proteases from dermatophytes. In *Mycopathologia* (Vol. 166, Issues 5–6, pp. 285–294). <https://doi.org/10.1007/s11046-008-9105-4>
- Moreno-Coutiño, G. (2009). *Morphologic characteristics of 45 Microsporum canis strains Características morfológicas de 45 cepas de Microsporum canis Ramón Fernández-Martínez , Roberto Arenas.*
- Moriello, K. A. (2003). Zoonotic skin diseases of dogs and cats. *Animal Health Research Reviews*, 4(02), 157–168. <https://doi.org/10.1079/ahrr200355>
- Moriello, K. A., Coyner, K., Paterson, S., & Mignon, B. (2017). Diagnosis and treatment of dermatophytosis in dogs and cats.: Clinical Consensus Guidelines of the World Association for Veterinary Dermatology. In *Veterinary Dermatology* (Vol. 28, Issue 3, pp. 266–268). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/vde.12440>
- Murmu, S., Debnath, C., Pramanik, A. K., Mitra, T., Jana, S., Dey, S., Banerjee, S., & Batabyal, K. (2015). Detection and characterization of zoonotic dermatophytes from dogs and cats in and around Kolkata. *Veterinary World*, 8(9), 1078–1082. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2015.1078-1082>
- Owis, A. I., Abo-Youssef, A. M., & Osman, A. H. (2017). Leaves of *Cordia boissieri* A. DC. As a potential source of bioactive secondary metabolites for protection against

- metabolic syndrome-induced in rats. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 72(3–4), 107–118. <https://doi.org/10.1515/znc-2016-0073>
- Palacios-espinoza, J. F., Núñez-aragón, P. N., Gomez-chang, E., Linares, E., Bye, R., & Romero, I. (2021). Anti-helicobacter pylori activity of artemisia ludoviciana subsp. Mexicana and two of its bioactive components, estafiatin and eupatilin. *Molecules*, 26(12). <https://doi.org/10.3390/molecules26123654>
- Pal P, Ghosh AK (2018) Antioxidant, Anti-alzheimer and Antiparkinson activity of *Artemisia nilagirica* leaves with flowering tops. *UK J Pharm Biosci* 6(2):12–23. <https://doi.org/10.20510/ukjpb/6/i2/173536>
- Parameswari, P., Devika, R., & Vijayaraghavan, P. (2019). In vitro anti-inflammatory and antimicrobial potential of leaf extract from *Artemisia nilagirica* (Clarke) Pamp. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(3), 460–463. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.09.005>
- Paryuni, A. D., Indarjulianto, S., & Widyarini, S. (2020). Dermatophytosis in companion animals: A review. In *Veterinary World* (Vol. 13, Issue 6, pp. 1174–1181). *Veterinary World*. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.1174-1181>
- Pasquetti, M., Min, A. R. M., Scacchetti, S., Dogliero, A., & Peano, A. (2017). Infection by *Microsporum canis* in paediatric patients: A veterinary perspective. *Veterinary Sciences*, 4(3). <https://doi.org/10.3390/vetsci4030046>
- Pfaller, M. A. (2012). Antifungal drug resistance: Mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *American Journal of Medicine*, 125(1 SUPPL.). <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2011.11.001>
- Pin, D. (2017). Non-dermatophyte Dermatoses Mimicking Dermatophytoses in Animals. *Mycopathologia*, 182(1–2), 113–126. <https://doi.org/10.1007/s11046-016-0090-8>
- Rajput, M., Kujur, P. K., Mishra, A., & Singh, R. P. (2018). Flavonoids inhibit chronically exposed arsenic-induced proliferation and malignant transformation of HaCaT cells. *Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine*, 34(1), 91–101. <https://doi.org/10.1111/phpp.12357>
- Rasool N, Khan QA, Malik A. 1989. A taraxerane type triterpene from *Euphorbia tirucalli*. *Phytochemistry*. 28, 1193–1195.
- Richmond, J. M., & Harris, J. E. (2014). Immunology and skin in health and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 4(12). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a015339>
- Riss T, L Moravec R, Niles A.L, Duellman S, Benink H.A., J Worzella T, Minor L. (2016). Cell Viability Assays NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>

- Rodrigues, F. F. G., Oliveira, L. G. S., Rodrigues, F. F. G., Saraiva, M. E., Almeida, S. C. X., Cabral, M. E. S., Campos, A. R., & Costa, J. G. M. (2012). Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of essential oil from *Cordia verbenacea* DC leaves. *Pharmacognosy Research*, 4(3), 161–165. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.99080>
- Rodríguez-Cerdeira, C., Martínez-Herrera, E., Szepietowski, J. C., Pinto-Almazán, R., Frías-De-León, M. G., Espinosa-Hernández, V. M., Chávez-Gutiérrez, E., García-Salazar, E., Vega-Sánchez, D. C., Arenas, R., Hay, R., & Saunte, D. M. (2021). A systematic review of worldwide data on tinea capitis: analysis of the last 20 years. In *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* (Vol. 35, Issue 4, pp. 844–883). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/jdv.16951>
- Romani, L. (2004). Immunity to fungal infections. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 4, Issue 1, pp. 11–23). European Association for Cardio-Thoracic Surgery. <https://doi.org/10.1038/nri1255>
- Romero, C., & González, M. (2020). *Actualidades de la Dermatofitosis en Perros y Gatos*.
- Ruiz Benitez, M. L. (n.d.). *GUIA DE LABORATORIO Métodos Físicos de Separación Obtención de Extractos e Hidrodestilación*.
- Sampaolo M., & Petruzello M. (2008). Asteraceae. *Encyclopedia Britannica*.
- Sarmiento, M. M., Mangiaterra, M., Bojanich, M. V., Basualdo, J. Á., & Giusiano, G. (2016). Hongos queratinofílicos en suelos de parques de la ciudad de Corrientes, Argentina. *Revista Iberoamericana de Micología*, 33(1), 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2015.02.004>
- Sarmiento, V. , & T. C. (2006). *Estandarización e implementación de las técnicas en el diagnóstico clínico de micosis cutáneas en el laboratorio de micología de la pontifica universidad javeriana*.
- Segundo, C., Martínez, A., Arenas, R., Fernández, R., Cervantes, R. A., & Cervantes Olivares, R. A. (2004). Dermatomicosis por *Microsporum canis* en humanos y animales. In *Rev Iberoam Micol* (Vol. 21).
- Seker, E., & Dogan, N. (2011). Isolation of dermatophytes from dogs and cats with suspected dermatophytosis in Western Turkey. *Preventive Veterinary Medicine*, 98(1), 46–51. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2010.11.003>
- Shultz Leila M; 2018; ITIS. [Online] Disponible en: https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=183738#null

- Singh, K., & Srivastava, N. (2019). Recent trends in human and animal mycology. In *Recent Trends in Human and Animal Mycology*. Springer Singapore.
<https://doi.org/10.1007/978-981-13-9435-5>
- Skowrya M, Gallego MG, Segovia F, Almajano MP (2014) Antioxidant properties of *Artemisia annua* extracts in model food emulsions. *Antioxidants* 3(1):116–128.
<https://doi.org/10.3390/antiox3010116>
- Soares, B. v., Morais, S. M., dos Santos Fontenelle, R. O., Queiroz, V. A., Vila-Nova, N. S., Pereira, C. M. C., Brito, E. S., Neto, M. A. S., Brito, E. H. S., Cavalcante, C. S. P., Castelo-Branco, D. S. C. M., & Rocha, M. F. G. (2012). Antifungal activity, toxicity and chemical composition of the essential oil of coriandrum sativum L. *Fruits. Molecules*, 17(7), 8439–8448. <https://doi.org/10.3390/molecules17078439>
- Stuntebeck, R., Moriello, K. A., & Verbrugge, M. (2018). Evaluation of incubation time for *Microsporum canis* dermatophyte cultures. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 20(10), 997–1000. <https://doi.org/10.1177/1098612X17729286>
- Teixeira De Aguiar Peres, N., Cristina, F., Maranhão, A., Rossi, A., & Maria Martinez-Rossi, N. (2010). Dermatophytes: host-pathogen interaction and antifungal resistance * Dermatofitos: interação patógeno-hospedeiro e resistência a antifúngicos Work conducted at the. In *An Bras Dermatol* (Vol. 85, Issue 5).
- Toumi, I., Zarrouk, O., Ghrab, M., & Nagaz, K. (2022). Improving Peach Fruit Quality Traits Using Deficit Irrigation Strategies in Southern Tunisia Arid Area. *Plants*, 11(13), 1656. <https://doi.org/10.3390/plants11131656>
- Trendafilova, A., Moujir, L. M., Sousa, P. M. C., & Seca, A. M. L. (2021). Research advances on health effects of edible *Artemisia* species and some sesquiterpene lactones constituents. In *Foods* (Vol. 10, Issue 1). MDPI AG.
<https://doi.org/10.3390/foods10010065>
- Uribe, M. P., & Cardona-castro, N. (2013). Mecanismos de adherencia e invasión de dermatofitos a la piel. *Mecanismos de Adherencia e Invasión de Dermatofitos a La Piel*, 27(1), 67–75. <https://doi.org/10.21615/ces>
- Venegas Casanova, E. A. (2019). Evaluación fitoquímica preliminar del extracto metanólico y etanólico de las flores de *Cordia lutea* Lam. (Boraginaceae) y su capacidad antioxidante. *Arnaldoa*, 26(1).
<https://doi.org/10.22497/arnaldoa.261.26117>
- Vermout, S., Tabart, J., Baldo, A., Mathy, A., Losson, B., & Mignon, B. (2008). Pathogenesis of dermatophytosis. *Mycopathologia*, 166(5–6), 267–275.
<https://doi.org/10.1007/s11046-008-9104-5>
- Waksman De Torres, N., Salazar-Aranda, R., Pérez-López, L. A., López-Arroyo, J., & Alanís-Garza, B. A. (2011). Antimicrobial and antioxidant activities of plants from

northeast of Mexico. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011. <https://doi.org/10.1093/ecam/nep127>

Weitzman, I., & Summerbell, R. C. (1995). The Dermatophytes. In *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS* (Vol. 8, Issue 2). <http://cmr.asm.org/>

Welsh, O., Welsh, E., Ocampo-Candiani, J., Gomez, M., & Vera-Cabrera, L. (n.d.). *Dermatophytoses in Monterrey, México*.