

# VALORACIÓN *IN VITRO* DE *Bocconia frutescens* L. CONTRA *Trichophyton rubrum*. COMPROBANDO LA MEDICINA TRADICIONAL

ENRIQUE SUAREZ LASSO\*

Recibido: 17 de agosto de 2010

Aprobado: 5 de octubre de 2010

## RESUMEN

El *Trichophyton rubrum* es el principal causante de dermatomicosis, para este hongo se han utilizado fármacos sintéticos los cuales presentan efectos colaterales y además su eficacia es variable. Los extractos de *Bocconia frutescens* son usados en la medicina popular para casi todo tipo de problema de dermatitis infecciosa. En este estudio se muestra la evaluación antifúngica *in vitro* de 3 partes de la especie vegetal de *Bocconia frutescens*: hoja, tallo y semilla contra cepas de *Trichophyton rubrum* patógenas para el hombre. Los extractos de cada parte de la planta se obtuvieron mediante extracción Soxhlet utilizando como disolvente etanol al 95%; para la preparación de los agares se utilizó agar P.D.A; se inoculó el hongo en el centro de cada caja petri para medir el crecimiento del diámetro durante 15 días. Se realizó una prueba Kruskal-Wallis, análisis multifactor anova, prueba Tukey y la determinación del DL50 y DL100. Se halló que *T. rubrum* es sensible *in vitro* a los tres extractos de *B. frutescens*, la acción del tallo es diferente a la hoja, el tallo es diferente a la semilla y la hoja es igual a la semilla. Estos resultados permiten proponer a esta especie como una fuente potencial de compuestos antimicóticos y debe ser sometida a nuevos bioensayos y realizar estudios fitoquímicos para obtener el porcentaje de componentes fitoquímicos de cada parte de la planta.

**Palabras clave:** *T. rubrum*, *B. frutescens*, medicina tradicional, dosis mínimas.

---

\* Biólogo. Correo electrónico: biologotropicalandino@gmail.com

## ***Bocconia frutescens* L. IN VITRO EVALUATION VERSUS *Trichophyton rubrum*. CONFIRMING TRADITIONAL MEDICINE.**

### **ABSTRACT**

*Trichophyton rubrum* is the main cause of dermatomycoses. Synthetic drugs which have side effects and present a variable effectiveness have been used for treatment of this fungus. *Bocconia frutescens* extracts are used in folk medicine to treat almost all problems of infectious dermatitis. This study shows *in vitro* antifungal evaluation of 3 parts of the plant species of *Bocconia frutescens* leaf, stem and seed, versus *Trichophyton rubrum* strains pathogenic for humans. Extracts of each plant part were obtained by Soxhlet extraction using 95% ethanol as solvent; for the preparation of agar PDA agar was used; the fungus was inoculated in the middle of each petri dish to measure the diameter growth during 15 days. A Kruskal-Wallis test was performed, multifactor ANOVA analysis was made, and Tukey test and determination of the DL50 and DL100 were carried out. It was found that *T. rubrum* is susceptible *in vitro* to the three *B. frutescens* extracts, the action of the stem is different from that of the leaf, the stem is different from the seed and the leaf is equal to the seed. These results allow proposing this species as a potential source of antifungal compounds and must be subject to new bioassays and phytochemical studies to obtain the percentage of phytochemical components of each part of the plant.

**Key words:** *T. rubrum*, *B. frutescens*, traditional medicine, small doses.

### **INTRODUCCIÓN**

Las dermatofitosis son las micosis más comunes según el hospital general de la ciudad de México, siendo *Trichophyton rubrum* el agente causal hasta en el 80% de los casos (Hernández *et al.*, 2007). La terapia tópica constituiría el tratamiento ideal, ya que no produce efectos adversos sistémicos ni interacciona con otros posibles fármacos que reciba el paciente, pero sólo consigue la curación en un pequeño subgrupo de onicomycosis. Por ello, en el resto de casos se precisa la administración de antifúngicos sistémicos. El más utilizado clásicamente en el tratamiento de las

onicomicosis es el ketoconazol. Han sido sustituidos por nuevos principios, activos que consiguen mejores resultados con menor duración de tratamiento y mejor perfil de seguridad, como el itraconazol, un derivado azólico cuyo tratamiento dura de seis a nueve meses (Llambrich & Lecha 2002).

El ketoconazol y sus efectos secundarios causan erupción cutánea, prurito, náuseas o vómitos, dolor abdominal, dolor de cabeza, mareos, fatiga, causa una reacción que da lugar a grave reducción de la presión arterial, shock o anafilaxia, depresión, pérdida del cabello, sensaciones de hormigueo (Nizoral 2008). Mundialmente se ha observado incremento en los casos de micosis asociada a falla terapéutica. Ante el desconocimiento real de este fenómeno en México, se decidió estudiar la resistencia a antifúngicos. Aislamientos de *T. rubrum* a partir de onicomicosis fueron resistentes a fluconazol, ketoconazol e itraconazol (Manzano *et al.*, 2008).

Existen alternativas naturales como plantas como *Bocconia frutescens* (Papaveraceae) que puede servir para el tratamiento de *Trichophyton rubrum*, ya que esta es usada gracias al conocimiento tradicional en algunas comunidades colombianas para tratar casi todo tipo de afección en la piel (Lasso, 2010). La *B. frutescens* se encuentra frecuentemente en bordes de caminos, derrumbes y crecimiento secundario, es una planta de distribución amplia y propia de sitios perturbados con buena iluminación y humedad. Está distribuida desde México hasta Sudamérica, a lo largo de las cadenas montañosas, en Colombia se distribuye en las tres cordilleras, en el Eje Cafetero se encuentra desde 1500 hasta cerca de los 3200 metros de altitud (Vibrans, 2009; Red Nacional de Jardines Botánicos 2008; Vargas, 2002).

En esta práctica investigativa se evaluaron tres partes de la planta *Bocconia frutescens* L.: semilla, hoja y tallo, contra el crecimiento de cepas de *Trichophyton rubrum*, hongo conocido popularmente como tiña.

## METODOLOGÍA

Se prepararon 3 extractos orgánicos: hoja, tallo y semilla, los cuales se obtuvieron mediante el método Soxhlet<sup>1</sup>. Se recuperaron 60 ml de extracto de cada parte de

<sup>1</sup> La extracción Soxhlet se fundamenta en la colocación del solvente en un balón; ebullición del solvente que se evapora hasta un condensador a reflujo; el condensado cae sobre un recipiente que contiene un cartucho poroso con la muestra en su interior; ascenso del nivel del solvente cubriendo el cartucho hasta un punto en que se

la planta. Posteriormente, se redujo por evaporación en frío de etanol el nivel del extracto de 60 ml hasta 30 ml, luego se adicionó 30 ml de ADE (Agua Destilada Estéril) para recuperar los 60 ml, lo anterior con el fin de bajar la concentración de alcohol del extracto debido a que puede afectar el crecimiento de *Trichophyton rubrum* y alterar los resultados.

Se preparó agar PDA según las indicaciones del fabricante. De cada tratamiento semilla, tallo, hoja se tomaron 1.6, 0.8, 0.4 y 0.2 ml vertiendo cada cantidad en cada caja de petri luego se agregaron 20 ml de agar a cada uno, de cada concentración de extracto se realizaron seis réplicas. Igualmente se prepararon cuatro cajas con agar más 1.6, 0.8, 0.4 y 0.2 ml de alcohol etílico como control. Las concentraciones resultantes fueron 25.000 ppm, 12.500 ppm, 6.250 ppm y 3.125 ppm para cada parte de la planta.

La cepa de *Trichophyton rubrum* fue obtenida en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Caldas. El hongo empleado para inocular todos las cajas se sembró inicialmente en agar PDA para su desarrollo, posteriormente el agar con el hongo se cortó asépticamente en cuadrillos de 3 mm, los cuales se inocularon en todo el centro de los agares con el extracto. El diámetro fue medido diariamente y durante 15 días tomando dos medidas, el ancho y el largo de la circunferencia del hongo, con calibrador o vernier.

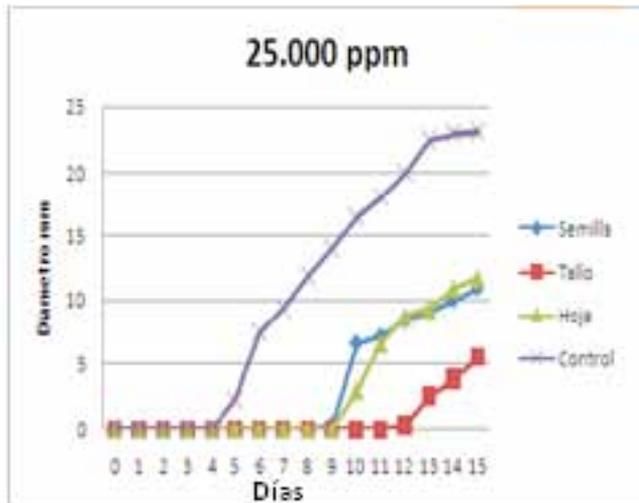
Se determinó el porcentaje de crecimiento con base al control. Se realizó análisis de varianza, ANOVAS de múltiple factor para concentraciones, tratamientos y su interacción; en la comparación entre tratamientos se tomó como variable dependiente el área de crecimiento, como factores los tratamientos y las concentraciones. Para comparar las concentraciones se tomó como variable dependiente el diámetro de crecimiento, como factores días y concentraciones, para cada ensayo a los tratamientos que no presentaron variación se les aplicó una prueba Mínima Diferencia Significativa (LSD). Por último se realizó un análisis Probit a cada parte de la planta, para determinar DL50 y DL100. Los análisis de varianza y las pruebas LSD y Kruskal-Wallis se realizaron en el software Statgraphics® Plus versión 4.1 para Windows (Statgraphics 1999) y el análisis Probit se realizó en el software Statplus versión 4.9.

---

produce el reflujo que vuelve el solvente con el material extraído al balón y se vuelve a producir este proceso la cantidad de veces necesaria para que la muestra quede agotada. Lo extraído se va concentrando en el balón del solvente.

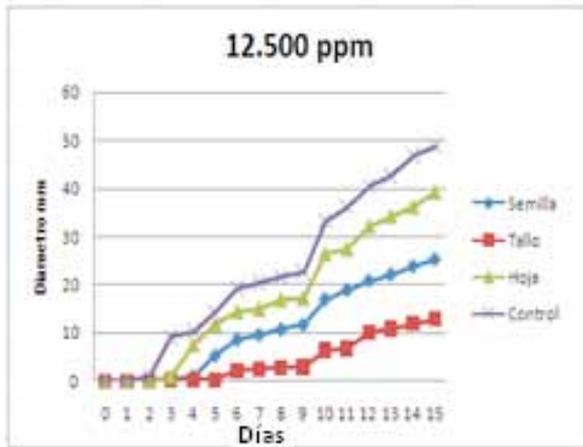
## RESULTADOS

En el primer ensayo a 25.000 ppm, se observa que el hongo en el medio control comienza su actividad de crecimiento al cuarto día, mientras que en los medios con semilla y hoja el hongo empiezan su actividad de crecimiento el día 9 de haber sido inoculado; el extracto tallo es el que tiene la mayor inhibición del crecimiento ya que el hongo comenzó su actividad de crecimiento en el día 12. Al final del experimento el hongo tratado con la hoja creció un 50,83%, el hongo tratado con extracto de semilla creció 47,47% y el hongo tratado con el tallo creció 23,52%, con respecto al hongo inoculado en el medio control (Figura 1).



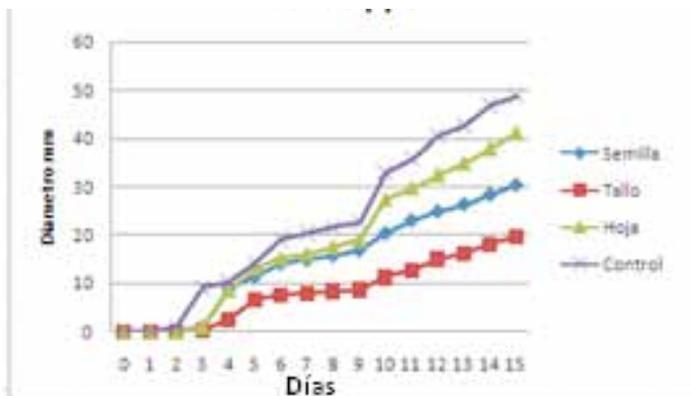
**Figura 1.** Ensayos a 25.000 ppm mostrando crecimiento (diámetro vs tiempo) de *Trichophyton rubrum* según cada tratamiento.

En el segundo ensayo a 12.500 ppm, se observa que el hongo en el medio control comienza su actividad de crecimiento al segundo día, mientras que el medio con hoja comienza su actividad al tercer día, la semilla al cuarto día y el tallo al quinto día. El hongo tratado con la semilla creció un 51,88%, el tallo creció 26% y la hoja 80%, con respecto al hongo inoculado en el medio control (Figura 2).



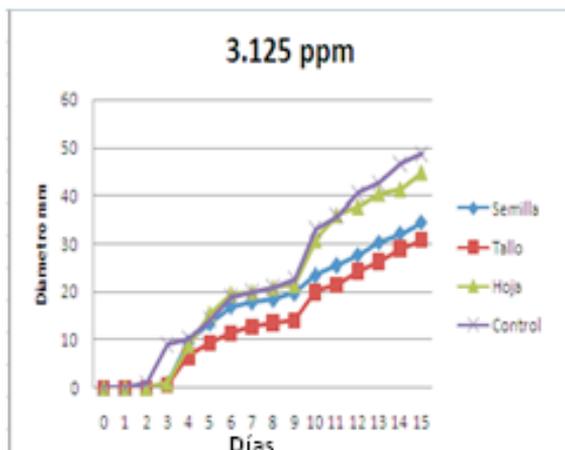
**Figura 2.** Ensayos a 12.250 ppm mostrando crecimiento (diámetro vs tiempo) de *Trichophytum rubrum* según cada tratamiento.

En el tercer ensayo a 6.250 ppm, se observa que el hongo en el medio control comienza su actividad de crecimiento al segundo día, mientras que en el medio con semilla, hoja y tallo comienza su actividad de crecimiento al cuarto día. El hongo tratado con la semilla creció 62,20% con respecto del control, el tallo creció 40,33% y la hoja 84,29% (Figura 8).



**Figura 3.** Ensayos a 6250 ppm mostrando crecimiento (diámetro vs tiempo) de *Trichophytum rubrum* según cada tratamiento

En el cuarto ensayo a 3.125 ppm, se observa que el hongo en el medio control comienza su actividad de crecimiento al segundo día, mientras que la semilla, hoja y tallo comienza su actividad de crecimiento al cuarto día. El hongo tratado con la semilla creció 70,50% con respecto al control, el hongo tratado con tallo creció 63,12% y el hongo tratado con hoja creció 91,81% (Figura 4).



**Figura 4.** Ensayos a 3125 ppm mostrando crecimiento (diámetro vs tiempo) de *Trichophyton rubrum* según cada tratamiento.

Para los ensayos las tablas ANOVA muestran que cada uno de los factores (Tratamientos: hoja, semilla, tallo, control y Concentraciones: 25.000 ppm, 12.500 ppm, 6.250 ppm, 3.125 ppm) tiene efectos significativos sobre la variable respuesta (crecimiento de *T. rubrum*) en un nivel de confiabilidad del 95%,  $p=0,000$  (Tabla 1). Con ello se demuestra estadísticamente la acción inhibitoria de *B. frutescens* L. sobre *T. rubrum*. Ahora bien, es necesario evidenciar los efectos combinados de ambos factores, es decir, mostrar el efecto de la interacción entre los tratamientos y las concentraciones, las figura 5 muestran la interacción de los tratamientos y las concentraciones en cuanto a la inhibición del crecimiento de *T. rubrum*, en estas figuras se puede observar que cada parte de la planta actúa en la inhibición y que las concentraciones también influyen esta actividad.

Analysis of Variance for respuesta - Type III Sums of Squares

---

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
<b>MAIN EFFECTS</b>					
A:tratamiento	5763.43	3	1921.14	14.40	0.0000
B:concentracion	7439.14	3	2479.71	18.59	0.0000
<b>INTERACTIONS</b>					
AB	777.501	9	86.389	0.65	0.7555
RESIDUAL	32008.6	240	133.369		
TOTAL (CORRECTED)	45988.7	255			

---

Figura 5. Análisis de varianza multifactor.

El resultado de la ANOVA para tratamientos mostró que habían diferencias significativas en ambos ensayos (P-value = 0,0000<0,05); para concentraciones arrojó que el P-value (0,0000) fue menor a 0,05 mostrando varianza significativa para todos los tratamientos en ambos ensayos. En el análisis de varianza multifactor para la interacción entre concentraciones y tratamientos se rechazó la hipótesis nula (P-value = 0,7555 en e1 y 0,7496 en e2; ambos valores mayores a 0,05) mostrando que no hay varianza significativa entre los tratamientos de hoja y semilla (Cuadro 1).

Cuadro 1. Resultados de prueba LSD para analizar interacción entre tratamiento y concentración. A: tratamiento, B: concentración.

Interacción AB	Ensayo 1 (e1)
	0.7555
c – h	*4.71832
c – s	*8.30837
c – t	*12.9311
h – s	3.59006
h – t	*8.21281
s – t	*4.62275

\* diferencia significativa. c: control; h: hoja; s: semilla; t: tallo

Se realizó la prueba LSD al 95% para determinar en qué rango la semilla y la hoja se interceptan. En el primer ensayo se interceptan las medias entre 12 mm y 9 mm, en el segundo ensayo se interceptan las medias entre 12 mm y 11mm (Figura 6).

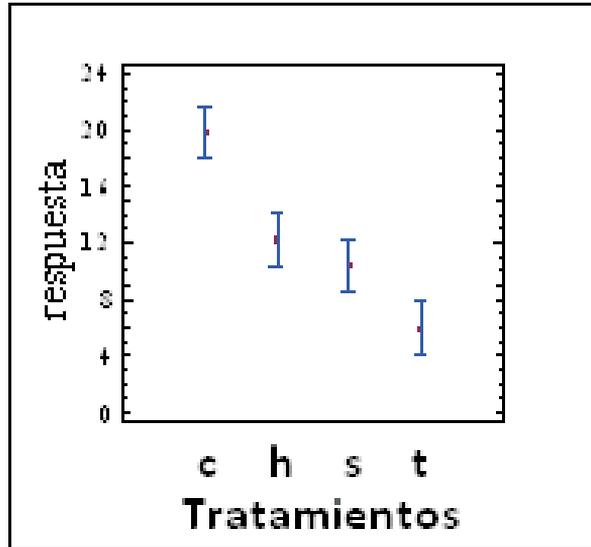


Figura 6. Prueba LSD al 95% de confianza

La DL50 muestra una letalidad de *Bocconia frutescens* L. sobre el 50% de *Trichophyton rubrum* en el decimo día, para la semilla se necesitan 0,014525g/ml, para el tallo 0,011203g/ml y para la hoja 0,015436g/ml. La DL100 muestra una letalidad de *Bocconia frutescens* L. sobre el 100 % de *Trichophyton rubrum* en el décimo día, para la semilla se necesita 0.024406g/ml, para el tallo 0.020631g/ml y para la hoja 0.024507g/ml (Cuadro 2).

Cuadro 2. Dosis letal 50 y dosis letal 100 para semilla, hoja y tallo

Dosis letales	Semilla día 10	Tallo día 10	Hoja día 10
DL50	14525ppm	11203ppm	15436ppm
DL100	24406ppm	20631ppm	24507ppm

## DISCUSIÓN

Todos los tratamientos con respecto al control obtuvieron varianza significativa, no obstante el tallo obtuvo la mayor variación con respecto al control, seguido por la semilla y por último la hoja obteniendo esta menor inhibición en el crecimiento de cepas de *Trichophyton rubrum*. Aunque no existen estudios similares a éste sobre el efecto de *Bocconia frutescens* L. sobre el hongo, en un estudio que probaba las tres partes de la planta de *Bocconia frutescens* contra la broca (*Hypothenemus hampei*) se obtuvo el mismo resultado, el orden de eficiencia según los bioensayos es el siguiente: Corteza > Semilla > Hojas (Valencia, Silva & Gómez. 2007).

Los metabolitos secundarios están presentes en concentraciones variables en todos los tejidos vegetales adultos, su función primordial parece ser la defensa contra invasiones microbianas o depredadores (Vivanco *et al.*, 2005). Se pueden encontrar diferentes metabolitos secundarios en las plantas como alcaloides, antroquinonas, saponinas, polifenoles, taninos y aceites esenciales (Vivanco *et al.*, 2005). El diferente porcentaje de metabolitos secundarios de cada parte de la planta es el responsable en el porcentaje de inhibición en las cepas de *Trichophyton rubrum*.

Según la Ley Shelford (ley de tolerancia) para que un organismo pueda crecer o sobrevivir, las condiciones ambientales deberán mantenerse dentro de un rango de tolerancia por ejemplo de temperatura, pH o humedad (Palomino 1995). En este caso la concentración de 25.000ppm del segundo ensayo superó el límite de la tolerancia del *Trichophyton rubrum* hacia la *Bocconia frutescens* L. mostrando alta capacidad de inhibición en el crecimiento de éste. Calzada, Yépez & Tapia. (2007) enfatizan que *Bocconia frutescens* debe utilizarse en la medicina natural con cuidado para evitar la toxicidad.

La sanguinarina y dihydrosanguinarine son alcaloides que están presentes en *Bocconia* y pueden causar, dependiendo de la concentración, tanto la necrosis como la apoptosis de las células (Vrba *et al.* 2009), por esto es importante establecer las dosis mínimas con las que se puede afectar al patógeno.

## CONCLUSIONES

*T. rubrum* es sensible *in vitro* a los tres extractos de *B. frutescens* L.; existen diferencias entre el tallo y la hoja, el tallo y la semilla y son significativamente iguales la semilla y la hoja.

Los resultados obtenidos en el presente estudio permiten proponer a esta especie como una fuente potencial de compuestos antimicóticos y debe ser sometida a nuevos bioensayos *in vitro* e *in vivo*, además de realizar estudios fotoquímicos (cromatografía) para obtener el porcentaje de componentes fitoquímicos de cada parte de la planta.

Los extractos activos encontrados en este trabajo serán una opción para desarrollar fitofármacos novedosos útiles para tratar micosis, onicomicosis o problemas dérmicos.

Los resultados obtenidos en este estudio dan apoyo científico a la utilización de la *B. frutescens* L. como planta medicinal en la tradición colombiana para el tratamiento de dermatofitos producidas por hongos como el *T. rubrum*.

La metodología utilizada en este proyecto permite evaluar el efecto microbicida de extractos vegetales de plantas reconocidas en el conocimiento popular como desinfectantes o evaluar plantas desconocidas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Calzada, F.; Yépez, L. & Tapia, A. (2007). "Effect of Mexican medicinal plant used to treat trichomoniasis on *Trichomonas vaginalis* trophozoites". *Journal of Ethnopharmacology*, 113: 248-251.
- Hernández, A.; Carbajal, P.; Martínez, R.F & Arenas, R. (2007). Dermatofitosis por *Trichophyton rubrum*. Experiencia de 10 años (1996-2005) en un servicio de dermatología de un hospital general de la Ciudad de México. *Revista Iberoamericana de Micología*, 24: 122-124.
- Suarez, Enrique. (2010). *Entrevista al maestro Javier Lasso*. Profesor de la Facultad de Artes Plásticas de la Universidad de Nariño. Director Maloca Cruz del Sur: Pensamiento Arte y Sanación. 22 de enero de 2010
- Llambrich, A. & Lecha, M. (2002). "Tratamiento actual de las onicomicosis". *Revista Iberoamericana de Micología*, 19: 127-129.
- Manzano, P. Méndez, P.J. Hernández, F. & López, R. (2008). "La resistencia a los anti fúngicos: un problema emergente en México". *Gaceta Médica Mexicana*, 144: 22-26.
- Nizoral. Generic ketoconazole. (2008). *Los efectos secundarios de Ketoconazol*. [Sitio en internet] [http://www.ketoconazole.org.uk/es/side\\_effects.html](http://www.ketoconazole.org.uk/es/side_effects.html)>. Acceso el 20 de abril 2010.

- Palomino, E.J. (1995). *Introducción a la microbiología ambiental*. Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente. Lima. 45-p.
- Red Nacional de Jardines Botánicos. (2008). *Bocconia frutescens* L. [Sitio en internet] <http://www.siac.net.co/sib/catalogoespecies/especie.do?idBuscar=1387&method=displayAAT>. Acceso el 20 de abril de 2010.
- Valencia, O.A., Silva, J.D. & Gómez, M. (2007). “Actividad insecticida de extractos de *Bocconia frutescens* L sobre *Hypothenemus hampei* F”. *Scientia Et Technica*, 33: 251-252.
- Vargas, W.G. 2002. *Guía ilustrada de las plantas de las montañas del Quindío y los Andes centrales*. Manizales: Editorial Universidad de Caldas. 813 p.
- Vibrans, H. (ed). Hanan, A.M. & Mondragón, J. (2009). Malezas de México, ficha *Bocconia frutescens* L. En: <http://www.conabio.gob.mx> (Consulta: 15 de marzo de 2010).
- Vivanco, J.M., Cosío, E., Loyolq, V.M. & Flores, H.E. 2005. “Los mecanismos químicos de defensa en las plantas. Investigación y Ciencia [Scientific American Latinoamerica] 341:68-752
- Vrba, J., Dolezel, P., Vicar, J. & Ulrichová, J. 2009. “Cytotoxic activity of sanguinarine and dihydrosanguinarine in human promyelocytic leukemia HL-60 cells”. *Toxicology in vitro*. 23: 580-588.