

“Actividad antifúngica de *Forsskaolea angustifolia* Retz.”

“Antifungal activity of *Forsskaolea angustifolia* Retz.”



Trabajo de Fin de Grado

Jennifer Dámaso Callero

Tutorizado por Laila Moujir Moujir y Leandro Jesús de León Guerra

Grado en Biología. Junio 2022

Índice

| | |
|---|----|
| Resumen | 1 |
| Abstract | 2 |
| 1. Introducción..... | 3 |
| 1.1. El género <i>Candida</i> como patógenos oportunistas | 3 |
| 1.2. Búsqueda de compuestos biológicamente activos: el género <i>Forsskaolea</i> (Fam. <i>Urticaceae</i>)..... | 6 |
| 1.3. <i>Forsskaolea angustifolia</i> : un endemismo canario | 8 |
| 1.4. Actividad antimicrobiana del género <i>Forsskaolea</i> | 9 |
| 2. Objetivos | 11 |
| 3. Material y métodos..... | 12 |
| 3.1. Material vegetal..... | 12 |
| 3.2. Preparación de extractos | 12 |
| 3.3. Microorganismos..... | 13 |
| 3.4. Medios de cultivo y mantenimiento de las levaduras | 13 |
| 3.5. Preparación de los inóculos fúngicos | 14 |
| 3.6. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) | 15 |
| 3.7. Análisis de datos | 16 |
| 4. Resultados y discusión | 17 |
| 5. Conclusiones | 22 |
| 6. Conclusions | 23 |
| 7. Bibliografía | 24 |

Resumen

La mayor parte de las infecciones fúngicas son producidas por patógenos oportunistas del género *Candida*: *C. albicans* y, las cada vez más frecuentes, *Candida* no *albicans*. El tratamiento de estas infecciones se ve limitado, por un lado, por los pocos fármacos de utilidad clínica disponibles y los efectos secundarios que presentan muchos de ellos, y por otro, al incremento de la resistencia de estas levaduras a los antifúngicos. En la búsqueda de sustancias antimicrobianas de fuentes naturales, este trabajo evalúa la actividad antifúngica frente a 6 especies del género *Candida* de 8 extractos de *Forsskaolea angustifolia* (Fam. *Urticaceae*), una planta endémica de las Islas Canarias que es usada en la medicina popular para el tratamiento de diferentes afecciones. Las levaduras *C. krusei*, *C. parapsilosis* y *C. albicans* fueron las levaduras más sensibles a los extractos obtenidos de la raíz y las hojas a 200 µg/ml. El extracto en n-hexano de hojas presento una mayor actividad (*C. krusei*, CMI₅₀=59 µg/ml) comparado con el hexánico y etanólico de raíz y de acetato de etilo o acuoso de hoja (*C. krusei*, CMI₅₀ entre 116 y 195 µg/ml). *C. parapsilosis* mostró una moderada sensibilidad a la acción del extracto hexánico de raíz (CMI₅₀=169 µg/ml), mientras que las levaduras *C. tropicalis*, *C. lusitaniae* y *C. glabrata* fueron insensibles a *F. angustifolia*.

Palabras clave: *Candida*, *Forsskaolea angustifolia*, extractos, actividad antifúngica, método de microdilución.

Abstract

Most fungal infections are caused by opportunistic pathogens of the *Candida* genus: *Candida albicans* and, the increasingly frequent, *Candida non albicans*. The treatment of these infections is limited, on the one hand, by the few clinically useful drugs available and the side effects that many of them present, and on the other, to the increased resistance of these yeasts to antifungals. In the search for antimicrobial substances from natural sources, this work evaluates the antifungal activity against 6 species of the genus *Candida* of 8 extracts of *Forsskaolea angustifolia* (Fam Urticaceae), a plant endemic to the Canary Islands that is used in popular medicine for the treatment of different conditions. The yeasts *C. krusei*, *C. parapsilosis* and *C. albicans* showed sensitivity to the extracts obtained from the roots and leaves at 200 µg/ml. The hexanic extract of leaf showed a higher activity (*C. krusei*, MIC₅₀=59 µg/ml) than the hexanic and ethanolic extracts of the root and the ethyl acetate or aqueous extracts of the leaf (MIC₅₀ between 116 and 195 µg/ml). *C. parapsilosis* exhibit moderate sensitivity to hexanic root extract (MIC₅₀=169 µg/ml), while the yeasts *C. tropicalis*, *C. lusitaniae* and *C. glabrata* were insensitive to *F. angustifolia*.

Keywords: *Candida*, *Forsskaolea angustifolia*, extracts, antifungal activity, microdilution method.

1. Introducción

1.1. El género *Candida* como patógenos oportunistas

Los hongos provocan al año un elevado número de infecciones superficiales en humanos con unas cifras aproximadas de 1,5 millones de muertes anuales. Estos registros son comparables a las tasas de mortalidad de enfermedades tan conocidas como la tuberculosis o la malaria (Lee et al., 2021), lo que genera una gran preocupación sanitaria a nivel mundial. Además, las enfermedades graves causadas por hongos han aumentado en las últimas décadas debido al creciente número de personas inmunodeprimidas. Entre los colectivos más afectados por estas enfermedades encontramos pacientes con cáncer, receptores de trasplantes de órganos, personas infectadas con el VIH y la población de avanzada edad, entre otros. Recientes líneas de investigación han relacionado la colonización de algunas especies de hongos con la progresión del cáncer de páncreas y cirrosis alcohólica (Arastehfar et al., 2020). Por ello, el impacto de este grupo de microorganismos en la salud humana va más allá de las infecciones agudas y crónicas que puedan producir.

Las infecciones fúngicas sistémicas están causadas principalmente por hongos del género *Candida*, *Aspergillus* y *Criptococcus*, que en conjunto representan más del 90% de las muertes por micosis (Lee et al., 2021). Si bien las levaduras forman parte de la microbiota natural, también pueden actuar como patógenos oportunistas, dando lugar a infecciones invasivas cuando se produce una alteración de las barreras naturales o de las funciones del sistema inmune. (Arastehfar et al., 2020).

Se estima que las infecciones fúngicas sistemáticas, en gran parte causadas por levaduras del género *Candida*, están asociadas con altas tasas de mortalidad (45-75%) (Healey & Perlin, 2018). Dentro de este género, *Candida albicans* es la especie que se aísla con mayor frecuencia a partir de muestras clínicas (Makanjuola et al., 2018). Sin embargo, en las últimas décadas se está observando un importante cambio epidemiológico, con el incremento de especies *Candida* no *albicans* (CNA) (Montero et al., 2016). Un ejemplo claro es *C. glabrata* que, junto con *C. albicans*, se encuentran entre las levaduras más comunes causantes de enfermedades fúngicas en humanos. El éxito de estas especies como patógenos depende de su habilidad para adquirir resistencia a los

antifúngicos empleados habitualmente para el tratamiento y de su capacidad de proliferar dentro del huésped. *Candida glabrata* y *C. krusei* son especialmente resistentes a los tratamientos con antifúngicos del grupo de los azoles (Pais et al., 2019; Jamiu et al., 2021). *Candida lusitanae* es un patógeno oportunista poco frecuente si bien puede causar infecciones graves en pacientes inmunodeprimidos. El interés clínico de esta especie radica en su capacidad para desarrollar resistencia a la anfotericina B. (Martínez et al., 2014).

En la actualidad, contamos con cuatro tipos principales de fármacos destinados al tratamiento de infecciones fúngicas: azoles (imidazoles y triazoles), polienos, pirimidinas y equinocandinas (Gregorí, 2005; Srinivasan et al., 2018). Cada uno de estos fármacos cuenta con un mecanismo de acción específico, que se fundamenta principalmente en la alteración de la membrana plasmática y la pared celular (Tabla 1).

Tabla 1: Mecanismo de acción y actividad de los principales compuestos para el tratamiento de las infecciones fúngicas. Modificado de Quiles-Melero & García-Rodríguez (2021).

| Clase | Antifúngico | Mecanismo de acción | Actividad |
|-----------------------|----------------|---|--------------|
| Polienos | Anfotericina B | Alteración de las propiedades de barrera de la membrana celular y efectos sobre las vías de oxidación intracelulares. | Fungicida |
| | Natamicina | | |
| | Nistatina | | |
| Pirimidinas | Fluorocitosina | Interfiere con la síntesis de ácidos nucleicos del hongo. | Fungistática |
| Imidazoles | Miconazol | Bloqueo de la síntesis de ergosterol al inhibir la 14-alfa-demetilasa. | Fungistática |
| | Ketoconazol | | |
| | Clotrimazol | | |
| Triazoles | Fluconazol | Bloqueo de la síntesis de ergosterol al inhibir la 14-alfa-demetilasa. Tienen una afinidad superior a la de los imidazoles por las enzimas fúngicas. | Fungistática |
| | Itraconazol | | |
| | Voriconazol | | |
| | Posaconazol | | |
| | Isavuconazol | | |
| Equinocandinas | Caspofungina | Inhibición de la enzima 1,3-beta-D-glucano sintasa, responsable de la síntesis de 1,3-beta-D-glucano, polisacárido esencial de la pared celular de muchos hongos. | Fungicida |
| | Anidulafungina | | |
| | Micafungina | | |

La membrana plasmática de células humanas y de células fúngicas posee una estructura similar, diferenciándose principalmente en el esteroles predominante, siendo el colesterol en las primeras, y el ergosterol en las segundas (Venegas, 2018). Esta diferencia

en el contenido de esteroides ha sido clave para la obtención de medicamentos antifúngicos. Sin embargo, la aparición de resistencias y la gran similitud de las células con las de mamíferos, ha dificultado el desarrollo de nuevas sustancias antifúngicas eficaces y seguras.

Los antifúngicos del grupo de los azoles se utilizaron durante décadas como terapia primaria para tratar infecciones fúngicas, especialmente las producidas por el género *Candida*. Estos compuestos inhiben la síntesis del ergosterol de la membrana plasmática alterando la permeabilidad celular e impidiendo el desarrollo del hongo. Los imidazoles presentan toxicidad cuando son administrados por vía sistémica debido a su afinidad por algunas enzimas humanas, por lo que se emplea de forma tópica en el tratamiento de la candidiasis vaginal o de infecciones cutáneas. Los triazoles son más específicos ya que tienen afinidad por las membranas de las células fúngicas y por ello menos tóxicos para las células humanas (Quiles-Melero & García-Rodríguez, 2021).

El fluconazol, un triazol con actividad frente a levaduras y hongos patógenos primarios, presenta la ventaja de ser soluble en agua por lo que se puede administrar por vía oral y parenteral, y tiene escasos efectos secundarios incluso cuando es administrado a dosis elevadas. Sin embargo, algunas levaduras como *C. krusei*, que muestran resistencia intrínseca a este compuesto, o *C. glabrata*, que puede adquirir la resistencia con cierta rapidez en tratamientos prolongados, ha llevado a emplear otros antifúngicos como las equinocandinas (Healey & Perlin, 2018). Estos compuestos inhiben la síntesis de β -glucano en la pared celular del hongo a través de la inhibición no competitiva de la enzima 1,3- β glucano sintasa. A esta clase de antifúngicos se le ha denominado la "penicilina de los antifúngicos", ya que su mecanismo de acción se asemeja al de la penicilina en bacterias (Diomedí, 2004).

Los polienos como la anfotericina B, la natamicina o la nistatina, presentan un amplio espectro de actividad comparado con otras formulaciones y fueron de los primeros fungicidas de uso clínico. Su mecanismo de acción está basado en la unión al ergosterol, aunque sin inhibir su síntesis, formando poros que alteran la permeabilidad de la membrana y la muerte celular (Gregorí, 2005). Se ha reportado que la afinidad de la anfotericina B por el ergosterol es 10 veces mayor que por el colesterol, lo que le confiere cierta selectividad por las membranas fúngicas (Azanza & Barberán, 2012; Eleazar, 2010). Sin embargo, los hongos desarrollan mecanismos de resistencia a estos

antifúngicos reduciendo la síntesis de ergosterol o aumentando la actividad de la enzima catalasa para reducir el daño por peroxidación de lípidos (Rivera-Toledo et al., 2020).

La fluorocitosina actúa como un antimetabolito de pirimidina, incorporándose en el ADN fúngico e impidiendo la síntesis durante el proceso de replicación celular (Rivas & Cardona-Castro, 2009). Se suele administrar conjuntamente con anfotericina B o azoles frente a infecciones producidas por *Cryptococcus* spp y *Candida* spp., aunque presenta un espectro de acción limitado debido a sus efectos adversos y a las altas tasas de desarrollo de resistencias.

A pesar de los esfuerzos en el desarrollo de nuevos fármacos, la resistencia a los antifúngicos continúa incrementándose, lo que complica el tratamiento de las infecciones sistémicas. Debido a ello, es especialmente interesante la búsqueda de nuevas sustancias en las que las plantas juegan un papel central como productoras de metabolitos con actividad biológica (Carillo-Muñoz et al., 2015).

1.2. Búsqueda de compuestos biológicamente activos: el género *Forsskaolea* (Fam. *Urticaceae*)

En las últimas décadas el ser humano ha tenido un creciente interés por la búsqueda de compuestos con actividad biológica a partir de fuentes naturales. En este sentido, la habilidad de las plantas para producir moléculas estereoespecíficas con variedad de esqueletos complejos, es un aspecto que las hace atractivas como fuente de nuevos metabolitos (Houghton, 2001). Esta habilidad de las plantas, especialmente de aquellas consideradas medicinales, hace que sean fuentes ricas de compuestos activos para el tratamiento de muchas enfermedades (Ahmed et al. 2019). Un buen punto de partida para la obtención de sustancias bioactivas es centrar la investigación en aquellas plantas usadas en la medicina popular, especialmente en regiones donde la medicina tradicional es una vía importante para el tratamiento de afecciones de distinta naturaleza.

La familia *Urticaceae* se ha utilizado durante siglos, ya que presenta una gran cantidad de compuestos biológicamente activos. Comprende aproximadamente 2000 especies distribuidas en 54 géneros diferentes. Desde el punto de vista de su fitoquímica, el género *Urtica* es uno de los más estudiados de esta familia. Ha despertado gran interés por sus numerosas propiedades curativas entre las que se encuentran analgésicas,

antialérgicas, antiinflamatorias, astringentes, diuréticas, hemostáticas, hipoglucemiantes y remineralizantes, entre otras. Las hojas son ricas en terpenoides, carotenoides, ácidos grasos, polifenoles etc., mientras que las raíces contienen ácido oleanol, esteroides y esterilglucósidos (Kregiel et al., 2018).

Dentro de la familia *Urticaceae* también encontramos el género *Forsskaolea*, compuesto por 7 especies: *F. angustifolia*, *F. griersonii*, *F. hereroensis*, *F. tenacissima*, *F. viridis*, *F. candida*, y *F. procrdifolia*. Estas especies se distribuyen en regiones áridas desde las Islas Macaronésicas y la península Ibérica, como límite occidental, hasta Pakistán y el noroeste de la India (POWO, 2022) (Figura 1).

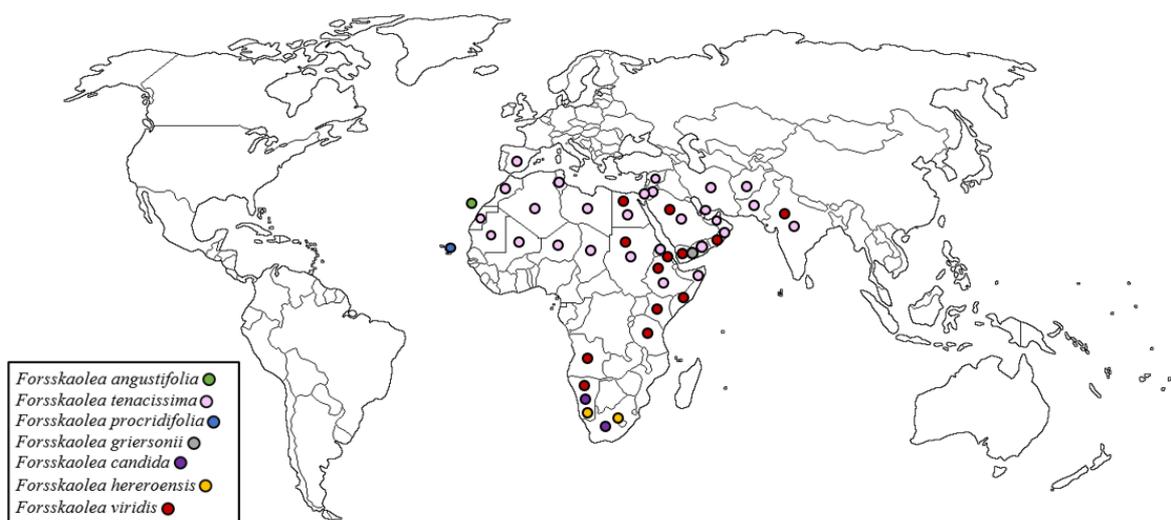


Figura 1: Distribución mundial de las 7 especies del género *Forsskaolea* (POWO, 2022).

Aunque algunas especies se han usado en la medicina popular para el tratamiento de diferentes afecciones, las plantas que componen este grupo han sido escasamente estudiadas y las propiedades etnobotánicas son menos conocidas que las de sus parientes del género *Urtica*. Se trata de hierbas monoicas anuales o perennes, a veces leñosas en la base, a menudo cubiertas de pelos hispídos y con cistolitos en forma de punto. Sus hojas son alternas, pecioladas y aserradas, con la lámina a menudo blanca por debajo y más o menos escabrosa por encima, con estípulas laterales y libres. Poseen inflorescencias bisexuales y sésiles en las axilas de las hojas y encerradas en un involucre campanulado de brácteas, recubiertas por un indumento denso, largo y lanoso (POWO, 2022).



Figura 2. Envés (A) y haz (B) de una hoja típica del género *Forsskaolea*. (Danin & Fragman-Sapir, s.f.)

1.3. *Forsskaolea angustifolia*: un endemismo canario

La especie *F. angustifolia*, también conocida en las Islas Canarias como “hierba ratonera”, es una planta herbácea a subarborescente, que puede llegar a medir hasta 1 metro de altura. Según las condiciones meteorológicas se comporta como planta anual o como un arbusto perenne de tallo leñoso y muy ramificado en la base, de coloración rojiza o morada (Figura 3, B). Lo más característico visualmente de esta planta son sus hojas estrechas, lanceoladas, aserradas y con bordes espinosos y pelos rígidos de color verde vivo en el haz y verde pálido y vellosas por el envés. Las hojas se disponen de manera alterna sobre el tallo (Figura 3, A). Se encuentra presente en todas las islas incluyendo los islotes y forma parte de ambientes nitrófilos y antropizados, creciendo en diferentes ambientes como bordes de caminos, carreteras, en terrenos de cultivo abandonados y suelos erosionados. (Fichas: ratonera. Atlas Rural de Gran Canaria, s.f.). Es una planta frecuente y no se encuentra incluida en ningún catálogo o figura de protección legal.



Figura 3: Detalle de la disposición de las láminas foliares (A), del tallo y el aspecto piloso de las inflorescencias y hojas (B) de *Forsskaolea angustifolia* (Gobierno de Canarias, s.f.)

La ratonera se ha empleado tradicionalmente en Canarias por sus propiedades diuréticas, calculolíticas y antigripales (Pérez-García et al., 1996). En concreto en la isla de Lanzarote, los pastores y agricultores la tienen muy bien considerada, pues les conceden multitud de propiedades curativas. Las hojas trituradas se empleaban para la desinfección de pequeñas heridas o para aliviar el dolor de muelas. La infusión de la parte aérea se usaba para tratar infecciones urinarias, la atenuación de síntomas propios de las pulmonías, o aliviar el estreñimiento. El emplasto de las hojas era empleado para tratar la ‘tetera’ de las cabras, una enfermedad infecciosa que atacaba las ubres del ganado. La raíz también se usaba por vía tópica para acelerar la recuperación y cicatrización de golpes y heridas, tratar el estreñimiento o como abortivo (Gil González et al., 2009).

1.4. Actividad antimicrobiana del género *Forsskaolea*

Los estudios fitoquímicos realizados sobre el género *Forsskaolea* están centrados mayoritariamente en *F. viridis* y *F. tenacissima* (Figura 4), las dos especies más extendidas a nivel mundial y de las que se han aislado varios constituyentes químicos. Por el contrario, *F. angustifolia*, ha sido escasamente estudiada y sus propiedades etnobotánicas son menos conocidas. *Forsskaolea tenacissima* es una planta utilizada en Oriente Medio en la medicina popular por sus propiedades antidiabéticas, antiinflamatorias y antiespasmódicas, además de emplearse en muchos otros países como terapia para la cicatrización de heridas y como hemostático (Sher et al., 2017). También se prepara té con sus hojas para tratar la artritis reumatoide y para eliminar los cálculos biliares. De esta especie se han aislado diferentes principios activos como lupeol, ácido esteárico, ácido palmítico, ácido araquídico, 1-hexadecanol, β -sitosterol, ácido maslínico, 2-hidroxi-imino-3-ácido-fenil-propiónico, β -amirina y forsskamida (Assaf et al., 2015; Assaf et al., 2020).

Se ha demostrado que diferentes extractos obtenidos de *F. tenacissima*, presentaban actividad antifúngica y antibacteriana. En ensayos de difusión en placa frente a *Proteus mirabilis*, los extractos obtenidos con acetato de etilo mostraron resultados significativos que revelaron $33,33 \pm 0,50\%$ ZOI (*zone of inhibition*) a una concentración de 1 mg/disco y $56,66 \pm 0,20\%$ ZOI a 2 mg/disco. Del mismo modo, los extractos obtenidos con n-butanol mostraron zonas de inhibición del $23,33 \pm 0,51\%$ y $30,00 \pm 0,17\%$

a una concentración de 1 y 2 mg/disco, respectivamente (Sher et al., 2017). Los extractos obtenidos con n-hexano también presentaron actividad frente a *Staphylococcus aureus*, con halos de inhibición de 10 y 12 mm, y *Bacillus subtilis*, de 7 y 10 mm, a concentraciones de 500 y 1000 µg/ml, respectivamente. Por otra parte, el extracto acuoso a las mismas concentraciones inhibió el crecimiento de *Xanthomonas maltophilia*, con halos de 9 y 11 mm (Aslam et al., 2018).

Forsskaolea viridis es rica en carbohidratos, proteínas, aminoácidos, alcaloides, flavonoides y taninos (Wu et al., 2013). Los extractos en cloroformo y acetato de etilo de la parte aérea revelaron actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas. Esta actividad puede ser atribuible a la presencia de flavonoides y compuestos fenólicos que presentan estas especies y cuyos compuestos químicos han sido relacionados con un efecto antimicrobiano (Ahmed et al., 2019).

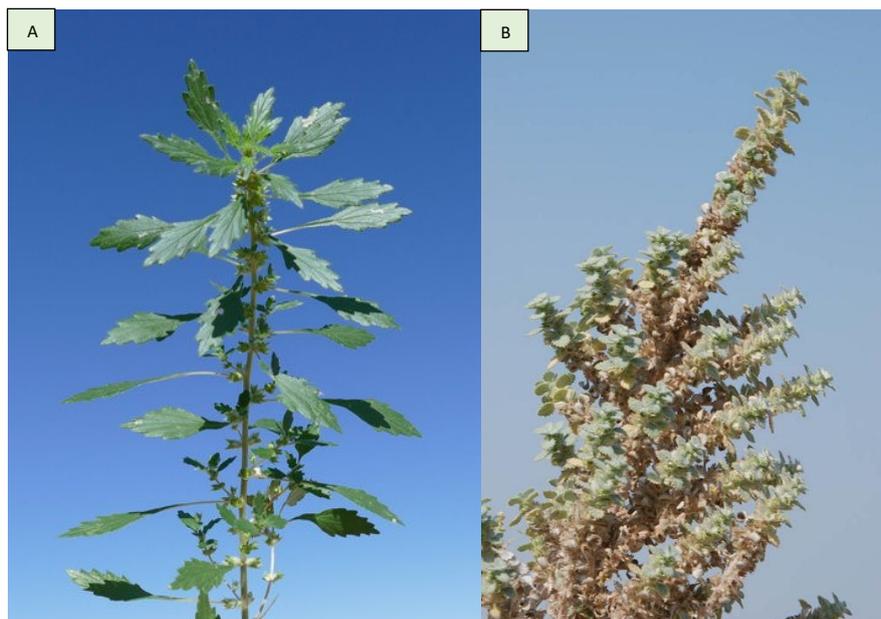


Figura 4: *Forsskaolea viridis* CITATION Nat22 \l 3082 (*Natusfera: Desert Nettle2022*) (A) y *Forsskaolea tenacissima* (B) CITATION POW22 \l 3082 (*POWO, 2022*).

2. Objetivos

Como se ha indicado anteriormente, algunas especies del género *Forsskaolea* como *F. tenacissima* y *F. viridis* han mostrado actividad antimicrobiana. Sin embargo, las propiedades medicinales de *F. angustifolia* no van más allá de las observaciones que, de forma empírica, sugieren la presencia de moléculas bioactivas. Por ello, y debido al incremento de la resistencia del género *Candida* a los antifúngicos existentes, es objetivo de este trabajo:

- Determinar la actividad antifúngica de un total de 8 extractos de la planta endémica canaria *Forsskaolea angustifolia* frente a 6 especies de levaduras del género *Candida*.

3. Material y métodos

3.1. Material vegetal

El material vegetal (*Forsskaolea angustifolia*) se recolectó en la segunda quincena de agosto de 2021 en la localidad de Los Valles, (29°05'37.5"N 13°30'54.1"W), municipio de Teguiise en la Isla de Lanzarote, ubicada a aproximadamente a 380 msnm. La identificación de la especie fue realizada en el área de Botánica del Departamento de Botánica, Ecología y Fisiología Vegetal de la Universidad de La Laguna. Un ejemplar de la planta fue depositado en el herbario del departamento con número de depósito TFC 53754. Las plantas se secaron a la sombra durante dos meses y trituradas mecánicamente (Bioblock Scientific).

3.2. Preparación de extractos

A partir de 10 g de hoja y raíces de *F. angustifolia* finamente divididas, se realizó una extracción en continuo con etanol a 96% por el método Soxhlet, durante 24 h (Figura 5). Tras evaporar el disolvente, se obtuvo un rendimiento de 535 mg del extracto etanólico de hoja (EtOH-H) y 181 mg de raíz (EtOH-R). Tras recoger una muestra de aproximadamente 20 mg, el material sobrante fue resuspendido en agua y extraído tres veces con n-hexano, obteniéndose un extracto soluble en n-hexano y una fase acuosa. La fase orgánica se llevó a sequedad en rotavapor, obteniéndose 157 mg de extracto en n-hexano de hoja (Hex-H) y 51,5 mg de extracto de raíz (Hex-R). Tras retirar unos 20 mg de este extracto, la fracción acuosa restante se extrajo tres veces con acetato de etilo, obteniéndose una fase soluble en este disolvente y una fracción acuosa. La fase orgánica se llevó a sequedad en rotavapor, obteniéndose 61,5 mg de extracto en acetato de etilo de hoja (AcEt-H) y 32,3 mg de raíz (AcEt-R). La fase acuosa fue liofilizada para la eliminación del agua y así obtener el extracto acuoso (Acuoso-H y Acuoso-R).

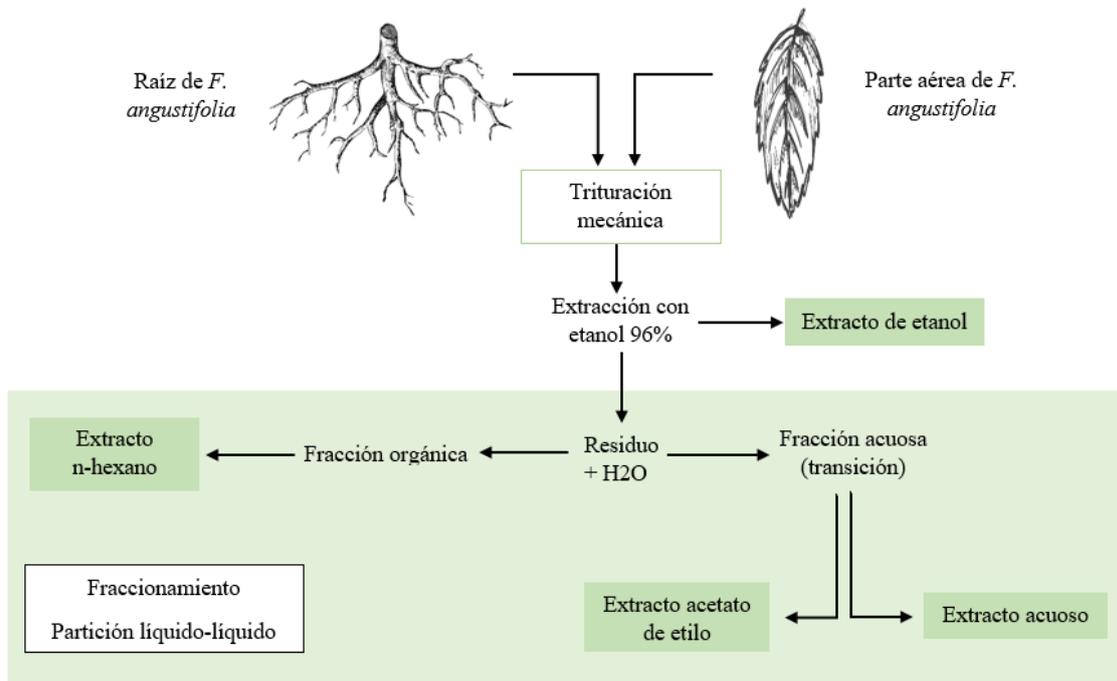


Figura 5: Procedimiento de obtención de los extractos de *F. angustifolia* evaluados en este trabajo.

3.3. Microorganismos

Las levaduras utilizadas en este trabajo fueron: *Candida albicans* procedente de la colección española de cultivos tipo (CECT1076) y las especies *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. lusitanae*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* procedentes de aislados clínicos y cedidas por la Dra. Ángeles Arias del Hospital Universitario de Canarias.

3.4. Medios de cultivo y mantenimiento de las levaduras

Los medios de cultivo utilizados en este trabajo fueron los siguientes:

- Extracto de levadura-Peptona (YP) (Tabla 2), suplementado con glucosa al 1% (YPD).

Tabla 2: Medio Extracto de levadura-peptona (YP)

| Componente | Concentración (g/L) |
|-----------------------------|----------------------------|
| Peptona | 10,0 |
| Extracto de levadura | 10,0 |

- Sabouraud Dextrosa (SB) (Scharlau) (Tabla 3).

Tabla 3: Composición del *Sabouraud Dextrose Agar* (Sabouraud)

| Componentes | Concentración (g/L) |
|---------------------------|----------------------------|
| D(+)-Glucosa | 40,0 |
| Peptona de carne | 5,0 |
| Peptona de caseína | 5,0 |

Los medios fueron esterilizados en autoclave a 121°C durante 15 minutos, mientras que la glucosa se esterilizó por filtración a través de filtros de 0,22 µm de diámetro de poro (Millipore).

Los cultivos fueron conservados a 4°C en placas de Petri con SBA, llevándose a cabo resiembras periódicas cada 10-12 días. La conservación de las cepas durante largos periodos de tiempo se realizó por congelación (-80°C), resuspendiendo una muestra del cultivo en glicerol al 20% (v/v).

3.5. Preparación de los inóculos fúngicos

Se prepararon preinóculos *over-night* de las levaduras en 20 ml de YPD a partir de cultivos en placas de SBA, que fueron incubados a 37°C en agitación orbital. Tras la incubación se realizaron las diluciones correspondientes para ajustar el inóculo a una concentración final en el ensayo de $0,5-1 \times 10^5$ UFC/ml.

3.6. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

La actividad antifúngica de los extractos de *F. angustifolia* se determinó a partir del método de microdilución en medio Sabouraud líquido, para lo cual se utilizaron placas de 96 pocillos (Nunclon Delta surface) siguiendo las directrices del *European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing* (EUCAST) (Cuenca et al., 2006).

Los extractos, previamente disueltos en dimetil-sulfóxido (DMSO) a una concentración de 20 mg/ml, se añadieron en el medio de experimentación a doble concentración (400 µg/ml) de la requerida para iniciar el ensayo. Se depositaron 200 µl de los extractos así preparados en uno de los pocillos y 100 µL de medio en los restantes, para a continuación llevar a cabo diluciones seriadas a mitades. Estas placas fueron inoculadas con 100 µl de la levadura previamente diluida. Cada ensayo fue realizado por triplicado y como control positivo se inocularon pocillos carentes de extracto, pero con DMSO a la máxima concentración empleada en el ensayo, no superándose en ningún caso el 1% (v/v). El control negativo se preparó añadiendo 200 µL de medio. Como control de referencia se usó el fluconazol (Figura 6) a una concentración máxima de 64 µg/ml.

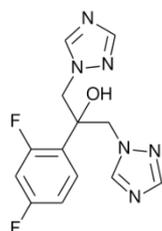


Figura 6: Estructura química del fluconazol.

Las placas se incubaron a 37°C en agitación orbital durante un periodo de tiempo dependiendo de la especie: 24 horas en el caso de *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. lusitanae* y 48 horas en el caso de *C. krusei*, *C. albicans* y *C. parapsilosis*. Pasado este tiempo, se determinó la densidad óptica de los pocillos por espectrofotometría en un lector ELISA (Infinite M200, Tecan) a una longitud de onda de 580 nm.

Se define la concentración mínima inhibitoria (CMI) como la concentración mínima de producto que inhibe completamente el crecimiento visible del microorganismo (Cuenca et al., 2006). De acuerdo con la EUCAST, la CMI de compuestos triazólicos se define como la concentración más baja de producto en la que se observa una disminución

de la densidad óptica igual o superior al 50%, con respecto al control (Cuenca et al., 2006), o como la concentración mínima de producto que inhibe el 50% del crecimiento (Fothergill, 2011), es decir, como concentración inhibitoria 50 (CMI₅₀) (Fothergill, 2011).

El tanto por ciento de inhibición se calculó según la fórmula:

$$\%inhibición = \left(1 - \frac{(DO_{problema} - DO_{blanco\ problema})}{(DO_{control} - DO_{blanco\ problema})} \right) \times 100$$

3.7. Análisis de datos

Para el tratamiento de los datos de actividad de los extractos ensayados se realizó el análisis estadístico con comparación de las medias de los porcentajes de inhibición y desviación estándar (n=3). Para verificar la normalidad de los datos se aplicó el test de Shapiro-Wilk. Para realizar las comparaciones por categorías se aplicó estadística paramétrica utilizando el test ANOVA de un factor y para verificar si existen diferencias significativas entre las variables evaluadas se aplicó un análisis post hoc de Tuckey, considerando para todos los resultados un valor significativo de p<0,05. Los análisis fueron realizados con el software estadístico R versión 4.0.3 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

4. Resultados y discusión

La concentración mínima inhibitoria (CMI) por el método de dilución se ha establecido como "gold standard" frente a otros métodos para evaluar la susceptibilidad antimicrobiana. Se define como la mínima concentración de antimicrobiano (en $\mu\text{g/ml}$) que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después del tiempo de incubación a su temperatura óptima de crecimiento.

Los extractos obtenidos de *F. angustifolia* fueron evaluados por su actividad antifúngica frente a *Candida albicans* y 5 aislados clínicos de *Candida* no albicans, implicados en micosis tanto cutáneas como sistémicas. Como puede observarse en la Figura 7, únicamente el extracto Hex-R fue activo frente a tres de las levaduras ensayadas ($\geq 30\%$ de inhibición del crecimiento). Tres de los extractos de la parte aérea (Hex-H, AcEt-H y Acuoso-H) y dos de la raíz (EtOH-R y AcEt-R) fueron activos frente a dos de las levaduras, mientras que el extracto acuoso obtenido de la raíz fue el único que no presentó actividad antifúngica. Por otra parte, 6 de los 8 extractos obtenidos (75%) inhibieron el crecimiento de *C. krusei* y *C. parapsilosis* a 200 $\mu\text{g/ml}$, mientras que sólo 2 de ellos (25%) redujeron la proliferación de *C. albicans*. Las levaduras *C. tropicalis*, *C. lusitaniae* y *C. glabrata* resultaron ser insensibles a la acción de *F. angustifolia*.

| | Etanol | | n-Hexano | | Acetato de etilo | | Acuoso | |
|------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|
| |  |  |  |  |  |  |  |  |
| <i>C. krusei</i> | | | | | | | | |
| <i>C. albicans</i> | | | | | | | | |
| <i>C. parapsilosis</i> | | | | | | | | |
| <i>C. tropicalis</i> | | | | | | | | |
| <i>C. lusitaniae</i> | | | | | | | | |
| <i>C. glabrata</i> | | | | | | | | |

Figura 7: Extractos de *F. angustifolia* que han mostrado una inhibición del crecimiento $\geq 30\%$ (coloreadas en naranja) frente a las levaduras ensayadas.

En la Tabla 4 se muestran los porcentajes de inhibición del crecimiento de las especies de *Candida* frente a los distintos extractos evaluados. Como se puede observar, *C. krusei* fue la levadura más sensible (inhibición del crecimiento $\geq 50\%$) tras el

tratamiento con todos los extractos a la máxima concentración ensayada (200 µg/ml), a excepción de los extractos de AcEt-R, Acuoso-R y EtOH-H. Los extractos más activos produjeron inhibiciones del crecimiento entre el 53% y el 84%, siendo el de Hex-H el que mostró una mayor actividad (Hex-H > Hex-R ≈ EtOH-R > AcEt-H > Acuoso-H). Frente a *C. parapsilosis* tan sólo el extracto Hex-R produjo una inhibición del crecimiento aproximadamente del 54%.

Tabla 4: Valores de densidad óptica de los cultivos de las especies de *Candida* frente a los extractos de *F. angustifolia* a 200 µg/ml. Entre paréntesis se indica el porcentaje (%) de inhibición del crecimiento respecto a células control no tratadas.

| Levadura | Densidad óptica ± desviación estándar (% de inhibición) | | | | | | | |
|------------------------|---|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | EtOH-H | EtOH-R | Hex-H | Hex-R | AcEt-H | AcEt-R | Acuoso-H | Acuoso-R |
| <i>C. krusei</i> | 1,26 ± 0,01 (13,2%) | 0,59 ± 0,04 (59,6%) | 0,24 ± 0,04 (83,6%) | 0,58 ± 0,05 (59,9%) | 0,64 ± 0,12 (55,9%) | 0,80 ± 0,13 (45,1%) | 0,68 ± 0,32 (53,2%) | 1,34 ± 0,34 (<10%) |
| <i>C. albicans</i> | 0,47 ± 0,04 (25,5%) | 0,57 ± 0,05 (11,0%) | 0,52 ± 0,04 (17,9%) | 0,40 ± 0,10 (36,9%) | 0,39 ± 0,02 (39,3) | 0,71 ± 0,06 (<10%) | 0,45 ± 0,01 (29,1%) | 0,46 ± 0,01 (27,2%) |
| <i>C. parapsilosis</i> | 0,50 ± 0,01 (40,4%) | 0,56 ± 0,02 (33,9%) | 0,43 ± 0,01 (49,6%) | 0,39 ± 0,01 (53,9%) | 0,61 ± 0,01 (28,2%) | 0,54 ± 0,06 (35,5%) | 0,47 ± 0,05 (44,3%) | 0,61 ± 0,02 (27,9%) |
| <i>C. tropicalis</i> | 1,23 ± 0,02 (18,3%) | 1,15 ± 0,02 (23,4%) | 1,23 ± 0,01 (17,8%) | 1,13 ± 0,00 (25,0%) | 1,08 ± 0,05 (28,1%) | 1,28 ± 0,04 (14,8%) | 1,12 ± 0,11 (25,2%) | 1,07 ± 0,03 (28,6%) |
| <i>C. lusitaniae</i> | 0,97 ± 0,01 (15,5%) | 0,97 ± 0,02 (15,1%) | 1,01 ± 0,04 (11,9%) | 1,20 ± 0,04 (<10%) | 0,90 ± 0,03 (21,4%) | 1,25 ± 0,00 (<10%) | 0,84 ± 0,05 (27,0%) | 1,01 ± 0,02 (12,2%) |
| <i>C. glabrata</i> | 1,06 ± 0,01 (<10%) | 1,08 ± 0,04 (<10%) | 1,06 ± 0,05 (<10%) | 1,11 ± 0,05 (<10%) | 1,06 ± 0,01 (<10%) | 1,16 ± 0,07 (<10%) | 1,04 ± 0,04 (<10%) | 1,06 ± 0,00 (<10%) |

Estos datos representan la media de los valores obtenidos en tres experimentos independientes ± desviación estándar.

La actividad producida por el extracto Hex-H de *F. angustifolia* a 200 µg/ml (84%) fue significativamente superior a la mostrada por el resto de los extractos ensayados (Figura 8). Las actividades de los extractos AcEt-H, AcEt-R, Hex-R, EtOH-R y Acuoso-H fueron similares frente a *C. krusei*, mientras que el EtOH-H y Acuoso-R fueron menos activos. A partir del extracto etanólico se obtuvieron los extractos en n-hexano, en acetato de etilo y la fase acuosa. La menor actividad observada para el extracto EtOH-H en comparación con las otras tres fracciones de la parte aérea, podría deberse a un efecto antagonista de los diferentes metabolitos responsables de la actividad frente a *C. krusei* cuando están presentes de forma simultánea.

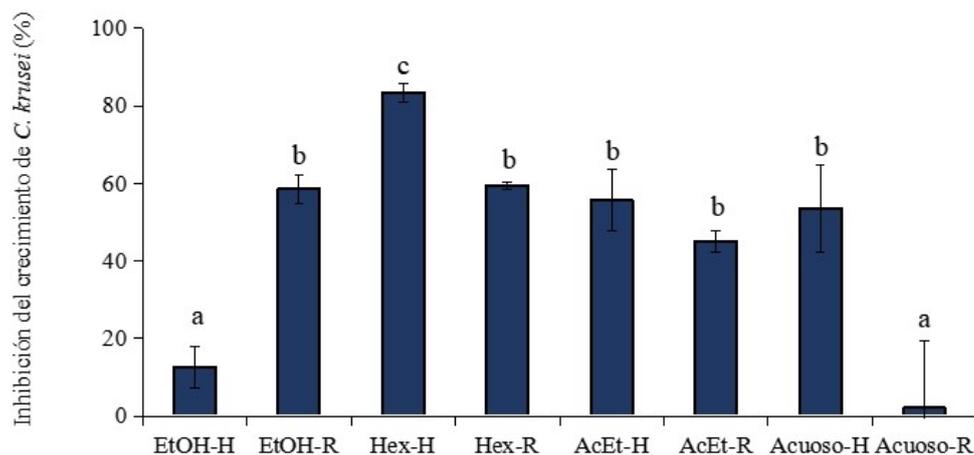


Figura 8: Inhibición del crecimiento, expresado en porcentaje, de *C. krusei* en presencia de diferentes extractos de *F. angustifolia* a 200 µg/ml. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas en el efecto de los extractos sobre la levadura ($p < 0.05$, ANOVA; Tukey's test).

La CMI para los azoles, 5-fluorocitosina, equinocandinas y en general los antifúngicos fungistáticos, se define como la mínima concentración de antifúngico cuya densidad óptica es menor o igual al 50% del pocillo control de crecimiento (CMI₅₀). (Cuenca et al., 2006)

La mayor sensibilidad mostrada por *C. krusei* y *C. parapsilosis* a los distintos extractos nos ha permitido determinar los valores de CMI₅₀ (Figura 9 A-F). Como cabría esperar, el extracto Hex-H mostró para *C. krusei* un valor de CMI₅₀ inferior (59 µg/ml) en comparación a los obtenidos con el resto de los extractos cuyos valores oscilaron entre 116 y 194 µg/ml. Frente a *C. parapsilosis* el extracto Hex-R presentó una CMI₅₀ de 169 µg/ml.

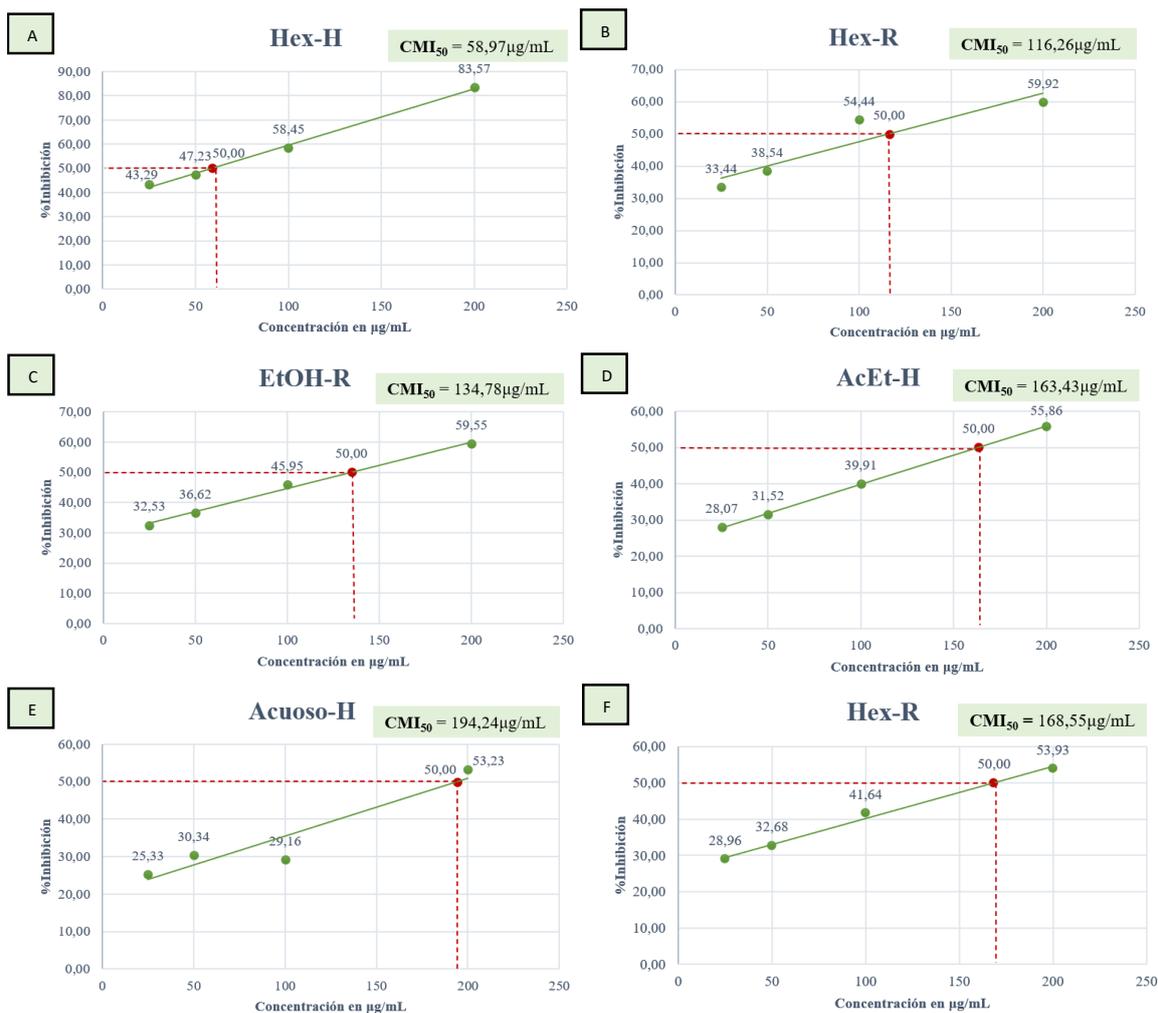


Figura 9: Determinación de los valores de CMI_{50} de diferentes extractos obtenidos de *F. angustifolia* frente a las levaduras *C. krusei* (A-E) y *C. parapsilosis* (F).

Como control de referencia se empleó el fluconazol, cuyos resultados frente a las distintas especies de *Candida* se recogen en la Tabla 5.

El fluconazol es activo frente a levaduras, incluyendo *Cryptococcus spp.* y la mayoría de *Candida spp.* Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI) ha establecido diferentes categorías de sensibilidad, incluyendo sensible, intermedio, resistente y una nueva categoría aplicable a los azoles: sensible dependiendo de la dosis administrada (S-DD) (Tabla 6). Estos criterios son aplicables a las candidemias de especies del género *Candida*, excepto *C. krusei* que es intrínsecamente resistente a fluconazol (Cantón, 2007).

Tabla 5: CMI₅₀ del fluconazol frente a las levaduras utilizadas en este ensayo.

| Levaduras | CMI ₅₀ (µg/ml) |
|------------------------|---------------------------|
| <i>C. krusei</i> | 1,15 |
| <i>C. albicans</i> | 33,57 |
| <i>C. parapsilosis</i> | 0,54 |
| <i>C. tropicalis</i> | 5,38 |
| <i>C. lusitaniae</i> | 1,04 |
| <i>C. glabrata</i> | 34,61 |

Tabla 6: Categorías de sensibilidad aplicables al fluconazol según CLSI y EUCAST (modificado de Castro et al., 2019).

| Levaduras | Sensible ≤ (µg/ml) | | S-DD (µg/ml) | Resistente ≥ (µg/ml) | |
|------------------------|--------------------|--------|--------------|----------------------|--------|
| | CLSI | EUCAST | CLSI | CLSI | EUCAST |
| <i>C. albicans</i> | 2 | 2 | 4 | 8 | 8 |
| <i>C. glabrata</i> | | 0,002 | < 32 | 64 | 64 |
| <i>C. lusitaniae</i> | NR | NR | NR | NR | NR |
| <i>C. parapsilosis</i> | 2 | 2 | 4 | 8 | 8 |
| <i>C. tropicalis</i> | 2 | 2 | 4 | 8 | 8 |

La categoría intermedia no está referenciada por CLSI ni EUCAST para las especies de *Candida* indicadas. NR: No Referenciado

De acuerdo con los valores de CMI₅₀ obtenidos frente a *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. albicans*, estos aislados clínicos no se consideran sensibles al fluconazol. La actividad mostrada por los extractos de la parte aérea de *F. angustifolia* frente a *C. krusei* hace más interesante el estudio de esta planta con el fin de determinar el compuesto o compuestos responsables de esta actividad. Esto podría suponer una alternativa al tratamiento de las candidiasis producidas por *C. krusei*, una levadura intrínsecamente resistente al fluconazol.

5. Conclusiones

En este trabajo se ha estudiado la actividad antifúngica de 8 extractos obtenidos de *F. angustifolia* y de cuyos resultados se han elaborado las siguientes conclusiones:

1. Se ha evaluado por primera vez la actividad antifúngica de distintos extractos obtenidos de las hojas y de las raíces de *Forsskaolea angustifolia*, una planta endémica de las Islas Canarias.
2. Las levaduras *Candida krusei*, *C. parapsilosis* y *C. albicans* fueron sensibles a extractos obtenidos de la parte aérea y la raíz. Por el contrario, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae* y *C. glabrata* fueron insensibles a la acción de los extractos evaluados.
3. *Candida krusei* resultó ser la levadura más sensible a la acción de todos los extractos evaluados a excepción del extracto etanólico de hoja y acuoso de raíz.
4. A la máxima concentración ensayada, los extractos hexánico de las hojas, con un 84% de inhibición del crecimiento, y hexánico de la raíz, con un 54%, fueron los más activos frente a *C. krusei* y *C. parapsilosis*, respectivamente.
5. La actividad producida por el extracto hexánico de las hojas de *F. angustifolia* frente a *C. krusei*, unido a la resistencia intrínseca de esta levadura al fluconazol, incrementa el interés de continuar los estudios para determinar el compuesto/s responsable/s de la actividad.

6. Conclusions

In this work, the antifungal activity of 8 extracts obtained from *F. angustifolia* was studied and the following conclusions have been elaborated from the results:

1. The antifungal activity of different extracts obtained from the leaves and roots of *Forsskaolea angustifolia* has been evaluated for the first time.
2. The yeasts *Candida krusei*, *C. parapsilosis* and *C. albicans* were sensitive to extracts obtained from the aerial part and the root. On the contrary, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae* and *C. glabrata* were insensitive to the action of the evaluated extracts.
3. Of the yeast evaluated, *Candida krusei* was the most sensitive to all the extracts, except for the ethanolic leaf and aqueous root extracts.
4. At the highest concentration tested, the hexanic extract from the leaves, with 84% growth inhibition, and the hexanic extract from the root, with 54% were the most active against *C. krusei* and *C. parapsilosis*, respectively.
5. The activity produced by the hexanic extract of the leaves of *F. angustifolia* against *C. krusei*, coupled with the intrinsic resistance of this yeast to fluconazole, increases the interest in continuing studies to determine the compound/s responsible for the activity.

7. Bibliografía

- Ahmed, F. A., El Mesallamy, A. M., & El Bassossy, T. A. (2019). Phytochemical analysis and biological evaluation of *Forsskaolea viridis* aerial parts. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 76(5), 815-823. doi:10.32383/appdr/108519
- Arastehfar, A., Gabaldón, T., García-Rubio, R., Jenks, J. D., Hoenigl, M., et al. (2020). Drug-Resistant Fungi: An Emerging Challenge Threatening Our Limited Antifungal Armamentarium. *Antibiotics (Basel)*, 9(12), 877. doi:10.3390/antibiotics9120877
- Aslam, T., Sadaqar Shah, S., Ahmed, S., Hassan, N., Peng, M., et al. (2018). Antimicrobial evaluation of various leaves extracted samples of nettle desert (*Forsskaolea tenacissima* L.). *Pure and Applied Biology*, 7(1), 152-159. doi:10.19045/bspab.2018.70018
- Asociación para el Desarrollo Rural de Lanzarote. (2009). *Usos Culturales de las Yervas en los Campos de Lanzarote* (Vol. 1). Arrecife - Lanzarote: ADERLAN.
- Assaf, H. K., Nafady, A. M., Abdelkader, M. S., Allam, A. E., & Kamel, M. S. (2015). Phytochemical and Biological Studies of Aerial Parts of *Forsskaolea tenacissima* Linn. (Urticaceae). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 4(3), 282-290.
- Assaf, H. K., Nafady, A. M., Allam, A. E., Hamed, A. N., & Kamel, M. S. (2020). Phytochemistry and biological activity of family "Urticaceae": a review (1957-2019). *Journal of Advanced Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 3(3), 150-176. doi:10.21608/JABPS.2020.24043.1073
- Azanza Perea, J. R., & Barberán, J. (2012). Anfotericina B forma liposómica: un perfil farmacocinético exclusivo. Una historia inacabada. *Rev Esp Quimioter*, 25(1), 19-24.
- Blinkhorn, R. J., Adelstein, D., & Spagnuolo, P. J. (1989). Emergence of a new opportunistic pathogen, *Candida lusitanae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 27(2), 236-240. doi:10.1128/jcm.27.2.236-240.1989

- Cantón Lacasa, E., Martín Mazuelos, E., & Espinel-Ingroff, A. (2007). Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A). *Revista Iberoamericana de Micología*.
- Carillo-Muñoz, A.J., Giusiano, G., Arechavala, A., Tur-Tur, C., Eraso, E., et al. (2015). La utilidad clínica de los derivados triazólicos en el tratamiento de las infecciones fúngicas. *Revista Española de Quimioterapia*, 28(4), 169-182.
- Castro Méndez, C., García Sánchez, E., & Martín Mazuelos, E. (2019). Actualización de los métodos de estudio de sensibilidad in vitro a los antifúngicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 37(1), 32-39. doi:10.1016/S0213-005X(19)30180-6
- Cuenca Estrella, M., Gadea Gironés, I., & Martín Mazuelos, E. (2006). *Diagnóstico microbiológico de las micosis y estudios de sensibilidad a los antifúngicos*. (E. Cercenado, & R. Cantón, Edits.) Procedimientos en Microbiología Clínica.
- Danin, A., & Fragman-Sapir, O. (s.f.). *Flora of Israel and adjacent areas: Forsskaolea tenacissima L*. Recuperado el 30 de Mayo de 2022, de Flora of Israel and adjacent areas: <https://flora.org.il/en/plants/FORTEN/>
- Diomedes P., A. (2004). Nuevos antifúngicos: Las equinocandinas. *Rev Chil Infect*, 21(2), 89-101.
- Eleazar Cohen, B. (2010). Amphotericin B Membrane Action: Role for Two Types of Ion Channels in Eliciting Cell Survival and Lethal Effects. *The Journal of Membrane Biology*, 238, 1-20. doi:10.1007/s00232-010-9313-y
- Fernández Andreu, C. M., González Miranda, M., Illnati Zaragoza, M. T., & Martínez Machín, G. (1998). Determinación de la concentración mínima inhibitoria de anfotericina B en levaduras de interés médico. *REV CUBANA MED TROP*, 50(1), 48-53.
- Fichas: ratonera. Atlas Rural de Gran Canaria*. (s.f.). Recuperado el 5 de Marzo de 2022, de Atlas Rural de Gran Canaria: <https://www.atlasruraldegrancanaria.com/fichas/ratonera/>

- Fothergill, A. W. (2011). Antifungal Susceptibility Testing: Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI) Methods. *Humana Press*, 65-74. doi:10.1007/978-1-59745-134-5_2
- Gobierno de Canarias. (s.f.). *Biota: especie Forsskaolea angustifolia Retz*. Recuperado el 20 de Marzo de 2022, de Biota: <https://www.biodiversidadcanarias.es/biota/especie/F00336>
- Gregorí Valdés, B. S. (2005). Estructura y actividad de los antifúngicos. *Revista Cubana de Farmacia*, 39(2).
- Healey, K. R., & Perlin, D. D. (2018). Fungal Resistance to Echinocandins and the MDR Phenomenon in *Candida glabrata*. *Journal of fungi*, 4(3), 105. doi:10.3390/jof4030105
- Houghton, P. J. (2001). Old Yet New—Pharmaceuticals from Plants. *Journal of Chemical Education*, 78(2), 175-184. doi:10.1021/ed078p175
- Jamiu, A. T., Albertyn, J., Sebolai, O. M., & Pohl, C. H. (2021). Update on *Candida krusei*, a potential multidrug-resistant pathogen. *Medical Mycology*, 59(1), 14-30. doi:10.1093/mmy/myaa031
- Kregiel, D., Pawlikowska, E., & Antolak, H. (2018). *Urtica* spp.: Ordinary Plants with Extraordinary Properties. *Molecules*, 23(7), 1664. doi:10.3390/molecules23071664
- Lee, Y., Puumala, E., Robbins, N., & Cowen, L. E. (2021). Antifungal Drug Resistance: Molecular Mechanisms in *Candida albicans* and Beyond. *Chemical Reviews*, 121(6), 3390-3411. doi:10.1021/acs.chemrev.0c00199
- Makanjuola, O., Bonhomin, F., & Fayemiwo, S. A. (2018). An Update on the Roles of Non-*albicans* *Candida* Species in Vulvovaginitis. *Journal of fungi*, 4(4), 121. doi:10.3390/jof4040121
- Martínez Espinosa, I., González Ibarra, M., & Torres Guerrero, H. K. (2014). Identificación molecular de *Candida lusitanae* en infección de tracto respiratorio inferior. *Revista Argentina de Microbiología*, 46(4), 307-310. doi:10.1016/S0325-7541(14)70087-2

- Mesa Arango, A., Bueno Sánchez, J., & Betancur Galvis, L. (2004). Productos naturales con actividad antimicótica. *Rev. esp. quimioter*, 17(4), 325-331.
- Montero, A., Gilsanz, F., & Maseda, E. (2016). Aproximación diagnóstica y terapéutica a la candidiasis intraabdominal. *Rev Esp Quimioter*, 29(1), 52-55.
- Natusfera: Desert Nettle (Forsskaolea viridis)*. (s.f.). Recuperado el 20 de Mayo de 2022, de Natusfera: <https://spain.inaturalist.org/taxa/586001-Forsskaolea-viridis>
- Pais, P., Galocha, M., Viana, R., Cavalheiro, M., Pereira, D., et al. (2019). Microevolution of the pathogenic yeasts *Candida albicans* and *Candida glabrata* during antifungal therapy and host infection. *Microbiol cell*, 6(3), 142-159. doi:10.15698/mic2019.03.670
- Pérez-García, M., Herrera, R. M., Rabanal, R. M., López-García, R., & Martín-Herrera, D. A. (1996). Diuretic Activity of Extracts from *Astydamia latifolia*, *Forsskaolea angustifolia* and *Ceterach aureum* in Rats. *Phytotherapy Research*, 10(6), 544-546. doi:10.1002/(SICI)1099-1573(199609)10:6<544::AID-PTR901>3.0.CO;2-E
- POWO. (2022). *Forsskaolea L.* Recuperado el 2 de Mayo de 2022, de Plants of the World Online: <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:40809-1#children>
- Quiles-Melero, I., & García-Rodríguez, J. (2021). Antifúngicos de uso sistémico. *Revista Iberoamericana de Micología*, 38(2), 42-46. doi:10.1016/j.riam.2021.04.004
- Rivas González, A. M., & Cardona-Castro, N. (2009). Antimicóticos de uso sistémico: ¿Con que opciones terapéuticas contamos? *CES MEDICINA*, 23(1), 61-76.
- Rivera-Toledo, E., Jiménez-Delgadillo, A.-U., & Manzano-Gayosso, P. (2020). Antifúngicos poliénicos. Mecanismo de acción y aplicaciones. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*, 63(2), 7-17. doi:10.22201/fm.24484865e.2020.63.2.02
- Ruiz-Camps, I., & Cuenca-Estrella, M. (2009). Antifúngicos para uso sistémico. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(6), 353-362. doi:10.1016/j.eimc.2009.04.001

- Sher, A. A., Afxal, M., & Bakht, J. (2017). Pharmacological Evaluation of Different Extracts of *Forsskaolea tenacissima*. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 79, 257-266. doi:10.4172/pharmaceutical-sciences.1000224
- Srinivasan Radhakrishnan, V., Reddy Mudiam, M. K., Kumar, M., Prakash Dwivedi, S., Pal Singh, S., et al. (2018). Silver nanoparticles induced alterations in multiple cellular targets, which are critical for drug susceptibilities and pathogenicity in fungal pathogen (*Candida albicans*). *Int J Nanomedicine*, 13(3), 2647-2663. doi:10.2147/IJN.S150648
- Ticona Huallpara, J. C. (2013). Metabolitos secundarios de especies de la flora Iberoamericana como potenciales agentes antiparasitarios. Servicio de Publicaciones. Universidad de La Laguna.
- Venegas Ruiz, M. (2018). *Construcción y estudio funcional de mutantes de la biosíntesis de ergosterol de la levadura carotenogénica Xanthophyllomyces dendrorhous*. Recuperado el 05 de 06 de 2022, de Repositorio Académico de la Universidad de Chile: <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/150556>
- Wu, Z. Y., Monro, A. K., Milne, R. I., Wang, H., Yi, T.-S., et al. (2013). Molecular phylogeny of the nettle family (Urticaceae) inferred from multiple loci of three genomes and extensive generic sampling. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 69(3), 814-827. doi:10.1016/j.ympev.2013.06.022