



**FACULTAD DE MEDICINA HUMANA Y CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

TESIS

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIFÚNGICO DEL EXTRACTO
HIDROALCÓHOLICO DE *Annona muricata* (Guanábana) POR EL
MÉTODO DE DIFUSIÓN EN PLACA SOBRE CEPAS DE *Cándida
albicans* ATCC 10231”**

PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO

MAMANI LARICO, Glenda Elena

ASESOR: Q.F. BELLIDO ACHAHUI, Cristofer Johel

Lima, Perú

2015

A Dios, por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mis padres por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo.

A mi hermano, pues él es el principal cimiento para la construcción de mi vida profesional, sentó en mí las bases de responsabilidad y deseos de superación.

A mi tía Nelly, por su apoyo incondicional y por demostrarme la gran fe que tiene en mí.

En primer lugar quiero agradecer a Dios por haberme dado la sabiduría, el entendimiento y la fortaleza para poder llegar al final de mi carrera, por no haber dejado que me rindiera en ningún momento e iluminarme para salir adelante.

A mis padres por el apoyo incondicional brindado, por ser un ejemplo de perseverancia y constancia que los caracteriza y que me han infundado siempre, y por su valor mostrado para salir adelante.

A mi asesor Q.F. Cristofer Bellido Achahui por su conocimiento compartido, orientación y motivación que ha sido fundamental para mi formación como investigador.

A mi amiga Alejandra por acompañarme en este reto que empezamos juntas, por ser mi apoyo, por las aventuras que pasamos juntas y por estar siempre ahí cuando más la necesite.

RESUMEN

Las infecciones por hongos superficiales son las micosis más comunes en todo el mundo y constituyen un problema de salud pública. El clima húmedo, la sobrepoblación y las malas condiciones higiénicas han conducido a un aumento de la prevalencia de estos patógenos. La resistencia de los hongos a los fármacos antimicrobianos, la toxicidad de ellos, ha producido una intensa búsqueda de moléculas nuevas, obtenidas por síntesis o bien desde fuentes naturales.

El presente estudio tiene como objetivo determinar la actividad antifúngica del extracto hidroalcohólico de las hojas *Annona muricata* "Guanábana" sobre cepas de *Candida albicans* ATCC 10231. El Diseño Metodológico es no experimental: porque no se influye en las variables para medir el efecto solo se describe el fenómeno.

Se estudió la actividad antifúngica utilizando el método de difusión en placa, sobre cepas de *Candida albicans*. Los resultados finales obtenidos en los ensayos fueron los siguientes: En la determinación de la actividad antifúngica sobre cepas de *Candida albicans* ATCC 10231 se observó que a la concentración de 60mg/ml el extracto presenta una actividad antifúngica con un halo de inhibición de 14mm en promedio a las 24 horas, a la concentración de 60 mg/ml el extracto presenta una actividad antifúngica con un halo de inhibición de 17mm en promedio a las 48 horas.

Con estos resultados se concluyó que el extracto de las hojas de *Annona muricata* "Guanábana" presenta actividad antimicótica frente a *Candida albicans* ATCC 10231.

Palabras Clave: antifúngico, difusión, extracto, acetogeninas, candidiasis.

ABSTRACT

Superficial fungal infections are the most common fungal infections worldwide and are a public health problem.

Wet weather, overcrowding and unsanitary conditions have led to an increased prevalence of these pathogens.

Fungi resistance to antimicrobial drugs, the toxicity of them, has been an intensive search for new molecules, obtained by synthesis or from natural sources.

This study aims to determine the antifungal activity of the hydroalcoholic extract of leaves *Annona muricata* "Guanábana" on strains of *Candida albicans* ATCC 10231.

Methodological experimental design is not, because there are influences the variables to measure the effect just described the phenomenon.

Antifungal activity was studied using the disk diffusion method on strains of *Candida albicans*.

The final results of the tests were as follows: In the determination of the antifungal activity on *Candida albicans* strains ATCC 10231 was observed that the concentration of 60 mg/ml extract has an antifungal activity with an inhibition zone of 14 mm on average at 24 hours, the concentration of 60 mg/ml extract has an antifungal activity with an inhibition zone of 17mm on average at 48 hours.

With these results it was concluded that the extract from the leaves of *Annona muricata* "Guanábana" shows antifungal activity against *Candida albicans* ATCC 10231.

Keywords: antifungal, broadcast, abstract, acetogenins, candidiasis.

ÍNDICE

CARÁTULA	I
DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTO	III
RESUMEN	IV
ABSTRACT.....	V
LISTA DE TABLAS	X
LISTA DE CUADROS.....	XI
LISTA DE FIGURAS.....	XII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIII
INTRODUCCIÓN	XIV
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
1.1.- Descripción de la Realidad Problemática	15
1.2.- Formulación del Problema.....	16
1.3.- Objetivos de la Investigación	17
1.3.1.- Objetivo General	17
1.3.2.- Objetivos Específicos.....	17
1.4.- Hipótesis de la Investigación	17
1.4.1.- Hipótesis General.....	17
1.4.2.- Hipótesis Específicos	17
1.5.- Justificación e Importancia de la Investigación	18
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	19
2.1.- Antecedentes de la Investigación	19
2.2.- Marco Conceptual.....	22

2.2.1.- Aspectos Botánicos de la Especie en Estudio	22
2.2.1.1.- Clasificación Científica.....	22
2.2.1.2.- Descripción Botánica	23
2.2.1.3.- Distribución Geográfica	25
2.2.1.4.- Composición Química y Fitoquímico de la Hoja de Guanábana	26
2.2.1.5.- Usos Tradicionales	27
2.2.2.- Aspectos Generales sobre el Agente Patógeno en estudio ..	28
2.2.2.1.- Fundamentos de Micología	28
2.2.2.2.- Candidiasis	28
2.2.3.- Curva de Crecimiento Microbiano	34
2.2.4.- Métodos de Susceptibilidad Antimicrobiana.....	36
a) Difusión en Agar	36
b) Dilución en Agar	36
c) Dilución en Caldo.....	37
d) E-test	37
e) Métodos automatizados.....	38
2.2.5.- Agentes Antifúngicos	38
2.2.5.1.- Clasificación de los Antifúngicos	38
2.2.5.2.- Mecanismo de Acción de los Antifúngicos.....	39
2.2.5.3 Fluconazol	42
2.3 Definición de Términos Básicos.....	45
CAPÍTULO III: METODOLOGIA DE LA INVESTIGACIÓN	46
3.1.- Tipo de Investigación.....	46

3.2.- Población y Muestreo de la Investigación.....	46
3.2.1.- Población	46
3.2.2.- Muestra	46
3.3.- Variables e Indicadores	46
3.3.1.- Variables Implicadas	46
3.3.1.1.- Variable Independiente.....	46
3.3.1.2.- Variable Dependiente	47
3.3.1.3.- Variable No Implicada.....	48
3.4.- Técnicas e Instrumentos de Recolección de datos	50
3.4.1.- Materiales, Equipos y Reactivos	50
a) Materiales de Laboratorio	50
b) Medios de Cultivo.....	51
c) Reactivos	51
d) Equipos e Instrumentos	51
e) Otros Materiales.....	51
f) Fármaco Patrón	52
3.4.2.- Técnica.....	52
a) Obtención del Extracto.....	52
b) Determinación del porcentaje Extracto	54
c) Estándar de turbidez para preparación del Inoculo .	54
d) Preparación del Inóculo	55
e) Inoculación en las placas	55
f) Aplicación de los discos a las placas Inoculadas.....	55

CAPÍTULO IV: PRESENTACIÓN, ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.....	56
4.1.- Resultados.....	56
a) Determinación del Porcentaje de Extracción de las hojas de <i>Annona muricata</i> (Guanábana)	56
b) Ensayo de la Sensibilidad Fúngica	58
c) Análisis Estadístico del ensayo de la sensibilidad antifúngica	62
DISCUSIÓN	66
CONCLUSIONES	69
RECOMENDACIONES	70
BIBLIOGRAFIA	71
ANEXOS	75

LISTA DE TABLAS

Tabla N°1: Clasificación Científica.....	23
Tabla N°2: Composición Química de hoja de <i>Annona muricata</i>	26
Tabla N°3: Identificación fitoquímico de hoja de <i>Annona muricata</i>	27
Tabla N°4: Especies de <i>Cándida</i> asociadas Patógenos	29
Tabla N°5: Clasificación Taxonómica de <i>Candida albicans</i>	30
Tabla N°6: Clasificación de los Antifúngicos por su sitio de Acción.....	39
Tabla N°7: Clasificación de los antifúngicos por su sitio de Acción en el Hongo..	39
Tabla N°8: Tabla de Variables	49
Tabla N°9: Porcentaje de Extracción de las hojas de <i>Annona muricata</i> (Guanábana).....	57

LISTA DE CUADROS

Cuadro N°1: Resultados de los diámetros de los halos de inhibición de la actividad antifúngica del extracto de las hojas de <i>Annona muricata</i> (Guanábana) sobre cepas ATCC 10231 de <i>Candida albicans</i> a las 24 horas	58
Cuadro N°2: Resultados de los diámetros de los halos de inhibición de la actividad antifúngica del extracto de las hojas de <i>Annona muricata</i> (Guanábana) sobre cepas ATCC de <i>Candida albicans</i> a las 48 horas	59
Cuadro N°3: Diámetros de los halos de inhibición formados con el fármaco patrón sobre cepas ATCC de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 a las 24 horas	60
Cuadro N°4: Diámetros de los halos de inhibición formados con el fármaco patrón sobre cepas ATCC de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 a las 48 horas	61
Cuadro N°5: Análisis de varianza de la actividad antifúngica del extracto de las hojas de <i>Annona muricata</i> (Guanábana) sobre cepas ATCC 10231 de <i>Candida albicans</i> a las 24 horas.....	62
Cuadro N°6: Prueba de Duncan de la actividad antifúngica del extracto de las hojas de <i>Annona muricata</i> (Guanábana) sobre cepas ATCC 10231 de <i>Candida albicans</i> a las 24 horas	63
Cuadro N°7: Análisis de varianza de la actividad antifúngica del extracto de las hojas de <i>Annona muricata</i> (Guanábana) sobre cepas ATCC 10231 de <i>Candida albicans</i> a las 48 horas	64
Cuadro N°8: Prueba de Duncan de la actividad antifúngica del extracto de las hojas de <i>Annona muricata</i> (Guanábana) sobre cepas ATCC10231 de <i>Candida albicans</i> a las 48 horas	65

LISTA DE FIGURAS

Figura N°1: Hojas de <i>Annona muricata</i>	24
Figura N°2: Colonias de <i>Candida albicans</i>	32
Figura N°3: Filamentización en suero de <i>Candida albicans</i>	34
Figura N°4: Curva de Crecimiento Microbiano	35
Figura N°5: Estructura del Fluconazol.....	43
Figura N°6: Obtención del Extracto Hidroalcoholico	53

LISTA DE ABREVIATURAS

NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards

DL50: Dosis Letal 50

UNMSM: Universidad Nacional Mayor de San Marcos

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria.

ATCC: American Type Culture Collection

INTRODUCCIÓN

La Amazonía peruana es una de las zonas del planeta con mayor diversidad vegetal, conviven en la zona el 8% del total de especies vegetales, de las cuales menos del 1% han sido estudiadas desde el punto de vista fitoquímico o farmacológico, por lo tanto su estudio podría conducir al descubrimiento de un gran número de nuevas moléculas bioactivas con posible aplicación terapéutica.

Durante las últimas décadas, el aumento en la prevalencia de las infecciones fúngicas ha sido constante, relacionado fundamentalmente con el incremento de pacientes inmunocomprometidos y con el uso generalizado de antimicrobianos, la utilización de inmunosupresores, maniobras diagnósticas invasoras y la implantación de alimentación parenteral. Junto a estas micosis invasoras, que podríamos llamar oportunistas, coexisten otras micosis, que podríamos considerar primarias, causadas por hongos muy adaptados para la supervivencia en los tejidos infectados. Algunas de ellas se comportan como micosis profundas, y se caracterizan porque se distribuyen en determinadas zonas geográficas, donde resultan endémicas. Otras, ubicuas, se caracterizan por afectar a piel y mucosas: se trata de las dermatomicosis y candidiasis de las mucosas.

Especies pertenecientes a la familia Annonaceae han sido utilizadas como medicina tradicional debido a las propiedades curativas que han mostrado contra algunas enfermedades, esto ha despertado un interés cada vez mayor por el estudio químico de dichas especies. De estudios fitoquímicos previos realizados a especies pertenecientes a esta familia, se han aislado metabolitos secundarios con diferentes tipos de actividad biológica, determinadas por ensayos in vitro (actividad antiparkinson, antimalárica, relajante del músculo liso, antitumoral, antibacteriana, antifúngica, antimicrobiana, leishmanicida, tripanocida, citotóxica, entre otras). Siendo esta la principal motivación para la realización de este estudio.

CAPÍTULO I:

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Descripción de la Realidad Problemática:

En los últimos años, después de un periodo en que la industria farmacéutica se dedicó exclusivamente a la fabricación de fármacos de síntesis, dejando atrás las antiguas medicinas que tenían como base los extractos de plantas medicinales, hay un cambio cualitativo en los programas industriales con dedicación a la búsqueda de nuevos medicamentos de origen herbario. Estos cambios se han sustentado, por una parte en una filosofía de la vuelta a la naturaleza que impregna el modo de vivir de los países industrializados y por otra, en necesidades de salud pública, ya que se ha tornado urgente la búsqueda de moléculas para la fabricación de medicamentos. ⁽¹⁾

El avance de la fitoterapia como disciplina médica es cada vez mayor, esto se evidencia en que las plantas medicinales representan casi el 25% del total de las prescripciones médicas en países industrializados, en los países en desarrollo la participación de las plantas medicinales en el arsenal terapéutico alcanza el 80%. ⁽²⁾

La piel es proclive a padecer enfermedades originadas tanto por causas internas como externas. La protección de la epidermis frente a la infección depende de la barrera mecánica proporcionada por el estrato córneo, ya que la propia epidermis carece de vasos sanguíneos. La rotura de esta barrera por quemaduras o mordeduras, abrasiones, cuerpos extraños, trastornos dermatológicos primarios (p. ej., herpes simple, varicela, ectima gangrenoso) permite la penetración de bacterias en las estructuras más profundas. Del mismo modo, el folículo piloso puede servir de entrada a la

flora normal (p. ej., *Staphylococcus*) o a bacterias extrañas (p. ej., *Pseudomonas* en la foliculitis del baño caliente).⁽³⁾

Por otra parte, las infecciones por hongos superficiales son las micosis más comunes en todo el mundo y constituyen un problema de salud pública. El clima húmedo, la sobrepoblación y las malas condiciones higiénicas han conducido a un aumento de la prevalencia de estos patógenos. Estas micosis han adquirido renovada importancia además por ser una causa de consulta médica frecuente. La resistencia de los hongos a los fármacos antimicrobianos, la toxicidad de ellos y muchas veces su elevado costo, ha producido una intensa búsqueda de moléculas nuevas, obtenidas por síntesis o bien desde fuentes naturales. Una de ellas es la investigación en plantas, la cual se realiza en muchas latitudes con resultados muy promisorios pues se han encontrado, por ejemplo, efectos antimicóticos en muchos extractos vegetales utilizando diversos solventes o en los aceites esenciales.⁽⁴⁾

La incidencia de las micosis muestra un aumento notable debido a diferentes factores que favorecen la aparición de estas enfermedades, entre ellos, el incremento en el número de pacientes inmunodeprimidos por diferentes causas como la infección por el VIH y las terapias inmunosupresoras. Estas condiciones hacen susceptibles a estos individuos de contraer infecciones tanto por hongos patógenos primarios como por otros que son inocuos para las personas inmunosuprimidas.⁽⁵⁾

1.2 Formulación del Problema:

¿Presentará efecto antifúngico in vitro el extracto Hidroalcohólico de hojas de *Annona muricata* (Guanábana) frente a cepas ATCC 10231 de *Candida albicans*?

1.3 Objetivos de la Investigación:

1.3.1.- Objetivo general.

- Evaluar el efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de *Annona muricata* (Guanábana) por el método de difusión en placa sobre cepas de *Candida albicans* ATCC 10231.

1.3.2.- Objetivos Específicos

- Determinar el porcentaje de extracto Hidroalcohólico obtenido de las hojas de *Annona muricata* (Guanábana).
- Determinar la actividad antifúngica de las hojas de *Annona muricata* (Guanábana) a las 24 horas.
- Determinar la actividad antifúngica de las hojas de *Annona muricata* (Guanábana) a las 48 horas.

1.4 Hipótesis de la Investigación

1.4.1.- Hipótesis General.

El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Annona muricata* (Guanábana) presenta efecto antifúngico in vitro sobre cepas ATCC 10231 de *Candida albicans*.

1.4.2.- Hipótesis Específicos

El porcentaje de extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* es de 8 al 10%.

Las hojas de *Annona muricata* presenta actividad antifúngica a las 24 horas.

Las hojas de *Annona muricata* presenta actividad antifúngica a las 48 horas.

1.5 Justificación e Importancia de la Investigación

a) Justificación económica.

El conocimiento de la actividad antifúngica de las hojas de guanábana permitirá orientar los estudios en la búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento.

b) Justificación social

La guanábana es una planta que crece en áreas tropicales, en América del Centro y del Sur, especialmente en la Amazonía. Todas las partes de la planta son usadas en la medicina natural, incluyendo cortezas, hojas, raíces, semillas y frutos, pero la parte que contiene la mayor concentración de principios activos es la hoja, en donde se encuentran las Acetogeninas Anonáceas, quienes han sido estudiadas ampliamente estudiadas desde 1940 en que empezó a usarse como insecticida, llegando a asombrar a científicos por su amplio poder, sin causar ningún efecto nocivo en animales y el hombre.

c) Justificación académica

La presente investigación contribuirá aportando de una manera cognoscitiva la actividad antifúngica del extracto etanólico al 70% de las hojas de *Annona muricata* frente a cepas de *Candida albicans* ATCC 10231.

CAPÍTULO II:

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de la Investigación:

En la investigación OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN DE EXTRACTOS BIOACTIVOS PRESENTES EN SEMILLAS DE *Annona muricata* DE LA REGIÓN CAFETERA, (2010), realizada por ELIZABETH MARTÍNEZ MUÑOZ, se llega a la conclusión que tiene un potencial tóxico que presentan las semillas de *A. muricata*. Se logró la extracción de acetogeninas de las semillas de *A. muricata*, el extracto metanólico desengrasado mostró un importante efecto insecticida en las pruebas de mortalidad realizadas con *Artemia salina*, con un CL50 de 1.214 µg/mL, por lo que puede concluirse que este tipo de extracto tiene alto potencial para ser usado como componente activo en la elaboración de un biopesticida. ⁽⁶⁾

La investigación realizada por Poma M, Elizabeth (2011), ESTUDIO FARMACOGNOSTICO Y ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Annona muricata* (GUANABANA), se estudió el extracto acuoso de las hojas secas de *Annona muricata* L. “guanábana”, especie recolectada en la ceja de selva de Cuzco, la cual fue clasificada taxonómicamente en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Mediante análisis fitoquímico se demostró la presencia de flavonoides, entre otros metabolitos. Se clasificó al extracto acuoso como no tóxico según el método de dosis límite para la determinación de toxicidad aguda, resultado que fue avalado con el estudio macroscópico de órganos realizado en la facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM. Con el empleo del método del edema plantar en ratas inducido por λ-carragenina, se demostró el extracto acuoso a una concentración de 1,5 mg/kg posee actividad antiinflamatoria significativa

comparado con indometacina. El análisis estadístico se realizó por el método ANOVA a 95 % de confianza. (7)

En la investigación DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA CONTRA *Candida albicans* y *Aspergillus niger* DE 10 PLANTAS MEDICINALES DE 3 DEPARTAMENTOS DEL PERÚ (2005), realizada por Ruiz Quiroz, Julio, El presente trabajo investigo la actividad antifúngica in vitro de doce extractos etanólicos correspondientes a diez plantas medicinales peruanas; *Annona cherimolia* (hojas), *Bidens pilosa* L. (partes aéreas), *Hypericum laricifolium* L. (partes aéreas), *Juglans neotropica* Diels(corteza), *Piper spp.* (hojas), *Plantago major* L.(hojas), *Psidium guajava* L.(hojas), *Schinus molle* L.(corteza y hojas) y *Spartium junceum* L. (planta entera). Las especies fueron recolectadas en el departamento de Amazonas, excepto *Schinus molle* L. (Apurímac). La actividad antifúngica se evaluó mediante los métodos de difusión en agar y dilución en agar para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI). Los microorganismos de prueba utilizados fueron las levaduras *Candida albicans* ATCC 10231 y *Candida albicans* cepa clínica, así como, el hongo filamentoso *Aspergillus niger* ATCC 16404; las cepas fueron proporcionadas por la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. De doce extractos investigados, seis presentaron actividad antifúngica consistente con un diámetro de halos de inhibición #18mm (Prueba de Difusión en agar) frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Ningún extracto mostró actividad consistente frente a la cepa clínica de *Candida albicans* y *Aspergillus niger* ATCC 16404. La CMI de los extractos que presentaron actividad consistente frente a *Candida albicans* ATCC 10231, fue de 250 µg/mL para *Hypericum laricifolium* L., *Juglans neotropica* Diels, *Annona cherimolia* L. y *Schinus molle* L. (un extracto de corteza y uno de hojas) y de 500µg/mL para *Piper spp.* No se determinó la CMI de los extractos (*Juglans neotropica*

Diels y *Psidium guajava* L.) que presentaron halos frente al *Aspergillus niger* ATCC 16404 por considerarlos sin actividad significativa (<18mm.). Los antifúngicos Nistatina y Fluconazol fueron incluidos en el estudio como controles positivos. ⁽⁸⁾

En la investigación realizada por OCHOA FUENTES, Y (2010), EVALUACIÓN IN VITRO DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE CUATRO EXTRACTOS VEGETALES METANÓLICOS PARA EL CONTROL DE TRES ESPECIES DE FUSARIUM SPP, El objetivo de la investigación fue evaluar la actividad antifúngica in vitro de los extractos de pirul (*Shinus molle*), chirimoya (*Annona cherimola*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y tabaquillo (*Nicotiana glauca*) sobre el crecimiento micelial y esporulación de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium culmorum* y *Fusarium solani*. El trabajo de investigación se realizó en la Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA), y en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN). Las cepas de *Fusarium* fueron previamente identificadas en el Laboratorio de Parasitología de la UAA. Los extractos fueron obtenidos en el Laboratorio de Toxicología de la UAAAN. Para determinar la inhibición del crecimiento micelial, dosis efectiva media (ED50) y número de conidios, se utilizó la metodología de medio envenenado, donde se evaluaron diversas concentraciones de los extractos. Los resultados mostraron que los extractos de chirimoya y canela presentaron efecto inhibitorio sobre el crecimiento micelial y esporulación. En contraste, los extractos de tabaquillo y pirul no mostraron efecto inhibitorio sobre el crecimiento micelial. Sin embargo, el primero de ellos incrementó la producción de conidios al incrementarse la concentración del extracto. En relación a la ED50 el extracto de canela controló las tres especies en estudio a dosis de 330,34 a 538,63 ppm. Por otro lado, el extracto de chirimoya presentó el mejor control a 593 ppm contra *F. culmorum*, mientras que para *F. oxysporum* y *F. solani* se requirieron dosis de 2060 a 2571 ppm, respectivamente. Los

extractos de canela y chirimoya presentaron efecto en la inhibición micelial y esporulación de *F. oxysporum*, *F. culmorum* y *F. solani*. (9)

La investigación realizada por Restrepo, Jaime (2010), EVALUACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LA FRACCIÓN LIPÍDICA DE LAS SEMILLAS DE GUANÁBANA (*Annona muricata*) Y LA CHIRIMOYA (*Annona cherimolia*), Las semillas de guanábana (*Annona muricata*) y chirimoya (*Annona cherimolia*), a pesar de que varios estudios muestran que las Anonáceas tienen efectos farmacológicos benéficos, por ejemplo contra algunos tipos de cáncer, parece que las semillas no tuvieron utilidad alguna. No obstante, esta investigación muestra que poseen un contenido de aceite (22%) similar a las semillas de algodón (23%) y la soya (18%) y más alto que el maíz (5%). Además, los análisis físicoquímicos de los extractos lipídicos, que incluyen la cromatografía de gases, revelan la presencia de ácidos grasos como el oleico, linoleico y linolénico, estos dos últimos esenciales en la dieta humana, en concentraciones equiparables con las de otras oleaginosas comerciales. (10)

2.2.- Marco conceptual.

2.2.1.- Aspectos botánicos de la especie en estudio. (11)

2.2.1.1.- Clasificación científica.

Tabla N°1: Clasificación científica

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Magnoliales
Familia	Annonoaceae
Subfamilia	Annonoideae
Género	Annona
Especie	<i>A. Muricata</i>

Fuente: Taylor L. *Annona muricata*. En Herbal Secrets of the Rainforest. 2nd edition

2.2.1.2.- Descripción botánica.

- **Árbol o arbusto:** Perennifolio/caducifolio, de 3 a 8 m (hasta 10 m) de altura. Tronco ramificado cerca de su base. Despide mal olor cuando se le tritura. Ramas cilíndricas, arrugadas, ásperas, de color café, rojizo y con numerosas lenticelas. Presenta una corteza externa de color castaño más o menos lisa y la interna rosada e insabora. La copa se ramifica desde su base y desarrolla una copa algo cónica.
- **Hojas:** Son de color verde oscuro, brillante en el lado superior y amarillento en el inferior, oblongas a ovadas, miden de 5 a 15 cm de largo por 2 a 6 cm de ancho.

Figura N°1: Hojas de *Annona muricata* (Guanábana)



Fuente: Taylor L. *Annona muricata*. En Herbal Secrets of the Rainforest

- **Flores:** Nacen solitarias o en pares en tallitos cortos que brotan de las ramas viejas. Los 3 sépalos miden de 2 a 3 mm de largo. Los 3 pétalos externos muy anchos y coriáceos, amarillos, miden 2 a 3 cm. de largo por 3 cm de ancho, y están colocados alternando con los primeros. El receptáculo es grande, pubescente, y contiene numerosos estambres en la base y ovarios en la parte superior. Las flores de esta especie se abren al amanecer, cuando las anteras están iniciando la expulsión del polen; los pétalos externos caen algunas horas después, y los internos duran unos días más o a veces caen juntos.
- **Fruto:** Es el más grande en el género, llegando a medir hasta 40 cm de largo elipsoidal u ovoide, a menudo asimétrico en el ápice debido a la polinización deficiente. Los carpelos aparecen separados por un surco fino, y en la mayoría llevan al centro una

espina, curva hacia abajo, aunque hay variedades de frutos casi lisos.

La superficie, aun en la madurez, es verde brillante, En la estructura interna no difiere de la *Annona cherimola* (chirimoya), excepto en que la capa de esclerénquima permite remover la cáscara más fácilmente. Los carpelos tienen pulpa blanca, jugosa y ácida, muy aromática y rica en ácido ascórbico, láctico, málico y cítrico. Además contiene minerales y vitaminas como el hierro, fósforo, calcio, vitamina A, B1, B2 y C.

- **Semillas:** Son obovoides y aplanadas, de 15 a 20 mm de largo con testa oscura y brillante.

2.2.1.3.- Distribución geográfica.

La guanábana es oriunda del Perú y se cultiva en la mayor parte de América tropical, pero generalmente como plantas dispersas en los huertos.

También se planta en Hawái, la India, Filipinas y Australia. La zona de producción en el Perú es la selva central de Chanchamayo.

- **Hábitat:** Requiere una temperatura promedio de 25 a 28 °C y una precipitación media anual de 1.000 a 3.000 mm bien distribuida, aunque puede cultivarse en zonas con una estación seca moderada, siempre que se cuente con agua de regadío. Este cultivo se puede desarrollar en campos ubicados muy cercanos al litoral y hasta zonas con una altitud no superior a los 1000 msnm, siendo la altura ideal aquellas zonas que se ubican entre los 400 a los 600 msnm.

Los suelos en que se cultive guanábana comercialmente, deben ser profundos, arenosos y con muy buen drenaje. Son más convenientes los suelos con pH entre 5,5 y 6,5.

2.2.1.4.- Composición química y fitoquímico de la Hoja de Guanábana. ⁽¹²⁾

Tabla N°2: Composición química de hoja de *Annona muricata*

Lactonas	Isoquinolinas	Lípidos
Annohexocina	Anonaine	Acidogentísico
Annomuricina A, B, C y E	Anoniine	Ácido lignocérico
Annomutacina	Atherospermine	Ácido linoleico
Annopentocinas A, B y C	Coreximine	Acido esteárico
Muricoreacina		

Fuente: Salinas A, Dorka, Araujo G, Juan, Inhibición del tránsito intestinal por el extracto etanólico de las hojas de *Annona muricata*(Guanábana) en ratones.

Tabla N°3: Identificación fitoquímico de hojas de *Annona muricata*.

Prueba	Identificación	Resultado
Gelatina	Taninos	(++)
Nihidrina	Aminoacidos libres	(-)
Tricloruro de hierro	Compuestos fenólicos	(++)
Draggendorf	Alcaloides	(+)
Mayer	Alcaloides	(+)
Hidróxido de sodio	Quinonas	(-)
Alfa-naftol (Molish)	Glicósidos	(+)
Shinoda	Flavonoides	(++)
Lieberman	Terpenos	(+)

(-) negativo; (+) poca cantidad; (++) regular cantidad; (+++) abundante cantidad.

Fuente: Salinas A, Dorka, Araujo G, Juan, Inhibición del tránsito intestinal por el extracto etanólico de las hojas de *Annona muricata* (Guanábana) en ratones.

2.2.1.5.- Usos tradicionales.

En los andes Peruanos el té de las hojas son usadas para el catarro (Inflamación de las membranas mucosas) y las semillas estrujadas son usadas para matar parásitos. En la amazonia peruana la corteza, raíces y hojas son usadas para diabetes y como un sedativo y un antiespasmódico. Otros usos populares en el Perú son para diarrea, disentería, fiebre,

hipertensión, indigestión, piojos, desordenes hepáticos, sedativo, tumores (piel), úlceras (internas) y como insecticida.

Es un fuerte remedio antibacteriano, sirve contra los parásitos, es citotóxico, febrífugo, vermífugo e insecticida.

2.2.2.- Aspectos generales sobre el agente patógeno en estudio.

2.2.2.1.- Fundamentos de micología. ⁽¹³⁾

Microscópicamente, los hongos pueden observarse bien como formaciones redondeadas con gemación (microorganismos parecidos a levaduras) o bien como hifas (mohos). Las colonias de tipo levadura son lisas, mientras que las de mohos son vellosas; entre los hongos que crecen como levaduras se encuentran las especies de *Candida* y *Cryptococcus*, mientras que los hongos que se desarrollan como mohos comprenden las especies de *Aspergillus*, *Rhizopus* y los dermatofitos (hongos de las tiñas). Los hongos que producen histoplasmosis, blastomicosis, esporotricosis, coccidioidomicosis y paracoccidioidomicosis se denominan dimórficos ("que tienen dos formas") porque son redondeados en los tejidos pero cuando se cultivan a temperatura ambiental crecen como los mohos.

2.2.2.2.- Candidiasis. ⁽¹³⁾

La candidiasis es una micosis causada por diversas especies de levaduras del género *Candida*. Cualquier tejido puede ser afectado por lo que se presentan diversos cuadros clínicos, cada uno de ellos asociado directamente al estado inmunológico del paciente. Las candidiasis de mucosas y piel

son las más frecuentes, mientras que las sistémicas son de evolución aguda o crónica y generalmente severas.

a) Agentes etiológicos.

Los agentes patógenos son levaduras (el estado anamorfo) del género *Candida* pertenecientes al Phylum Ascomycotina. Muchas especies se han aislado de vegetales, suelo, agua, aire, alimentos y algunas de ellas forman parte de la biota normal de la piel y membranas mucosas (boca, vagina, vías respiratorias altas, tracto gastrointestinal) de mamíferos. Este género incluye aproximadamente 150 especies identificadas.

Candida spp., son levaduras mitospóricas alargadas o ligeramente redondas de 2 - 6 x 3 - 9 µm que se reproducen por gemación (blastoconidios). A excepción de *C. glabrata*, el resto de las especies asociadas a candidiasis pueden formar seudomicelios; *C. albicans* y *C. dubliniensis* además son formadoras de hifas.

Tabla N°4: Especies de Candida asociadas patógenas	
Especie	Frecuencia
<i>C. albicans</i>	50%
<i>C. tropicalis</i>	15-30%
<i>C. parapsilosis</i>	15-30%
<i>C. glabrata</i>	15-30%
<i>C. krusei</i>	~1%

<i>C. guilliermondii</i>	~1%
<i>C. lusitaniae</i>	~1%
<i>C. dubliniensis</i>	~1%

Fuente: Kasper Dennis L., Principios de Medicina Interna.

Aunque se han reportado más de 17 especies patógenas, el 90% de las infecciones se atribuyen a: *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parasilopsis*, *C. tropicalis*.

- **Clasificación taxonómica:**

Teniendo en cuenta la reproducción sexuada de las levaduras se las incluye en las subdivisiones Ascomycotina, Basidiomycotina y Deuteromycotina (cuando no se conoce la reproducción sexuada).

Tabla N°5: Clasificación taxonómica Candida albicans

Dominio	Eucarya
Reino	Fungi
División	Eumycota
Subdivisión	Deuteromycotina
Clase	Blastomycetes
Familia	Cryptococaceae
Género	Candida
Especies	<i>C. albicans</i> ; <i>C. glabrata</i> ; <i>C. krusei</i> ; <i>C. parapsilosis</i> ; <i>C. tropicalis</i> ,

Fuente: Kasper Dennis L., Principios de Medicina Interna

b) Epidemiología.

Las candidiasis superficiales son frecuentes, de fácil tratamiento y no atentan contra la vida del paciente, en tanto que las sistémicas de evolución aguda o crónica son generalmente graves. La mayoría de estas infecciones se originan de un foco endógeno (tracto gastrointestinal o respiratorio) aunque no se descarta la participación de fuentes externas.

La distribución geográfica de esta micosis es universal y más de 70 % de ellas son producidas por *C. albicans* observándose un porcentaje mayor por el serotipo B. Los casos de candidiasis sistémica están relacionados a pacientes con severas deficiencias en su sistema inmune. *C. krusei* y *C. glabrata* son habitualmente resistentes a los compuestos azólicos y su hallazgo como agentes infecciosos involucrados en enfermedades sistémicas intrahospitalarias ha aumentado en los últimos años.

Los casos registrados de candidiasis muestran que el sexo no influye en la frecuencia, a excepción de la candidiasis urogenital que tiene mayor incidencia en el sexo femenino. La edad y raza de las personas son factores que, según la clínica, no influyen en la presentación de la micosis, la cual realmente dependerá del factor de inmunodeprimido asociado; sin embargo, por lo que respecta a la ocupación aunque no es un factor de importancia, se considera que algunas actividades de las personas pueden favorecer la infección.

c) Identificación de *Candida albicans*⁽¹⁴⁾

El aislamiento en cultivos es imprescindible para establecer la identificación de *Candida* al nivel de género y especie, para efectuar las pruebas de susceptibilidad “in vitro” a los antifúngicos, así como para llevar a cabo estudios moleculares (los cuales actualmente no se encuentran al alcance de los laboratorios de baja complejidad).

El agar glucosado de Sabouraud adicionado de antibióticos antibacterianos es un buen medio para el aislamiento primario a partir de diferentes muestras clínicas, pero teniendo en cuenta que la morfología macro y microscópica de las colonias de las distintas especies es similar, es deseable el empleo de medios capaces de diferenciar las especies.

Figura N°2: Colonias de *Candida albicans*.



Fuente: Arenas Roberto, Micología Medica Ilustrada

Las especies de *Candida* desarrollan habitualmente en la gran mayoría de los medios de cultivo empleados en los laboratorios de diagnóstico microbiológico (agar sangre, agar

chocolate o inclusive aquellos usados para el aislamiento de bacilos gram negativos como el EMB o CLDE).

CHROM agar Candida, es un medio cromogénico que permite diferenciar en forma presuntiva las especies más frecuentemente involucradas en patología humana: *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei* las cuales desarrollan en él colonias de diferentes colores (verde, azul metálico y rosado, respectivamente).

La producción de tubos germinativos y de clamidosporas, son pruebas sencillas, económicas y al alcance de todos los laboratorios para identificar a *C. albicans*. Que es la especie mayormente relacionada con patología fúngica humana. La producción de tubos germinativos es además una prueba rápida (puede evaluarse tras 2 a 4 horas de incubación) que puede emplearse como tamiz.

Filamentización en Suero ⁽¹⁵⁾: Se toma una pequeña porción de la colonia con un asa de platino esterilizada y se siembra en 0,5 ml de suero humano, se incuba a 37°C por 2 horas, al cabo de las cuales, se observara microscópicamente la formación de un tubo germinal sin constricción en su punto de origen y con forma característica de “espejo de mano”.

Figura N°3: Filamentización en Suero de *Candida albicans*

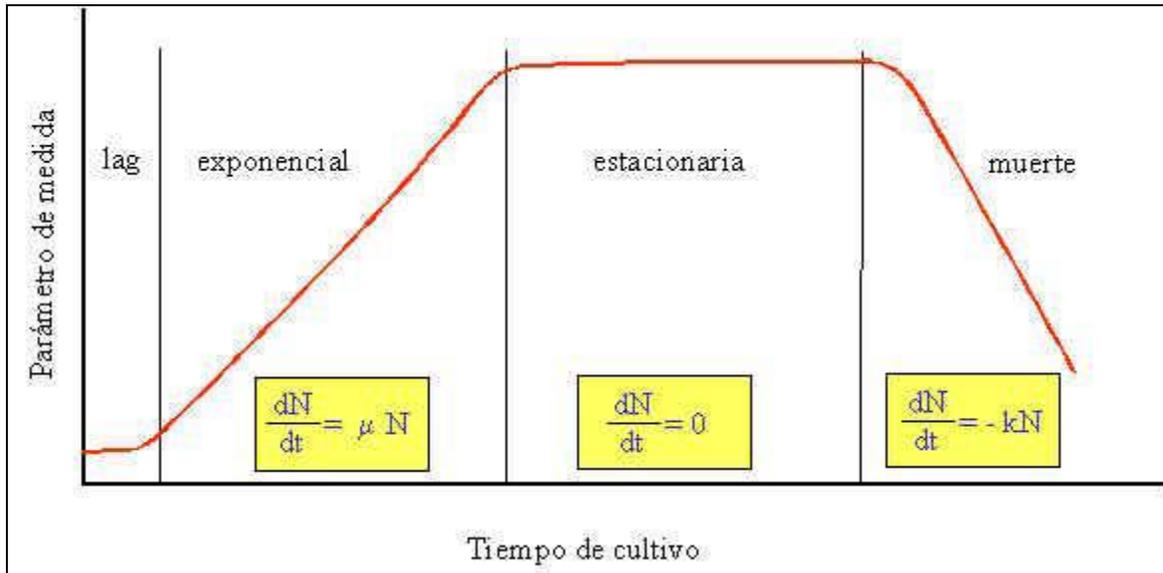


Fuente: Trujillo, V. Pruebas rápidas para la detección de *Candida albicans*.

2.2.3.- Curva de crecimiento microbiano. ⁽¹⁶⁾

Si se inoculan bacterias en un medio de cultivo líquido, crecerán por lo general hasta que un factor llegue al mínimo y el crecimiento se vea limitado. Si durante este proceso no se adiciona ningún nutriente ni se elimina ningún producto metabólico se denomina a este crecimiento en este espacio predeterminado como cultivo discontinuo. El crecimiento en un "sistema cerrado" de este tipo está sometido a leyes que son válidas para los organismos uni y pluricelulares. Una curva de crecimiento típica tiene un aspecto sigmoidal y permite diferenciar varias fases de crecimiento que se presentan regularmente de una forma más o menos acusada: fase de latencia (o lag), fase exponencial (logarítmica), fase estacionaria y fase de muerte.

Figura N°4: Curva de crecimiento microbiano



Fuente: Lastra Jorge

(<http://www.monografias.com/trabajos10/10cincrec/10cincrec.shtml#DOS>)

En la figura se pueden distinguir cuatro fases en la curva de crecimiento:

I. La fase Lag o de Latencia, en la que el microorganismo se adapta a las nuevas condiciones y pone en marcha su maquinaria metabólica para poder crecer activamente. La duración de esta fase es variable y en general es mayor cuanto más grande sea el cambio en las condiciones en las que se encuentra el microorganismo.

II. La fase exponencial. La fase de crecimiento exponencial (logarítmico; fase expo o fase log) se caracteriza por un tiempo de generación constante y mínimo. El tiempo de generación durante la fase log es un parámetro específico de cada especie y dependiente del medio.

III. La fase estacionaria, en la que no hay aumento neto de microorganismos, lo que no significa que no se dividan algunos, sino que la

aparición de nuevos individuos se compensa por la muerte de otros. La tasa de crecimiento es dependiente de la concentración de sustrato.

IV. La fase de muerte, en la que el número de microorganismos vivos disminuye de forma exponencial.

2.2.4.- Métodos de Susceptibilidad Antimicrobiana ⁽¹⁷⁾

Los métodos de susceptibilidad antimicrobiana o antibiogramas son métodos in vitro que determinan la susceptibilidad de los microorganismos a una variedad de agentes antimicrobianos, bajo condiciones específicas y estandarizadas de laboratorio.

a) Difusión en agar.

Este método, que es el más frecuentemente usado, es también llamado difusión por disco o Kirby-Bauer, En este caso, el microorganismo es inoculado en la superficie de una placa de agar, sobre el cual se colocan discos impregnados con una concentración conocida del antibiótico. Luego se incuban. Durante la incubación, el antibiótico difunde radialmente desde el disco a través del agar, por lo que su concentración va disminuyendo a medida que se aleja del disco. En un punto determinado, la concentración del antibiótico en el medio es incapaz de inhibir al germen en estudio.

b) Dilución en agar.

Es considerado el método de referencia. En este método, placas conteniendo una determinada concentración de un antibiótico son inoculadas con el microorganismo en estudio y luego son incubadas.

Después de la incubación, se examina si el organismo crece o no en cada una de las placas, con lo cual se determina la concentración inhibitoria mínima (CIM) para el antibiótico.

c) Dilución en caldo.

En este caso, tubos (macrodilución) o microplacas (microdilución) contienen concentraciones crecientes de un determinado antibiótico. El organismo en estudio es inoculado en los diferentes tubos o pocillos de la microplaca y la CIM es determinada después de la incubación, de la misma forma descrita anteriormente para el método de la dilución en agar.

d) E-test.

Este método ha sido descrito más recientemente y representa una sofisticada combinación de los métodos descritos anteriormente. El E-test es más simple que otros métodos para obtener una CIM. Utiliza una tira de plástico que contiene concentraciones crecientes de un determinado antibiótico que van desde 0,016 g/ml hasta 256 g/ml. Esta tira se pone sobre una placa de agar que ha sido inoculada con el organismo en estudio. Después de incubar la placa, se forma un área de inhibición de forma elíptica, en la cual la concentración inhibitoria mínima puede ser leída directamente.

e) Métodos automatizados.

En este momento existen varios sistemas que ofrecen diferentes niveles de automatización para el estudio de susceptibilidad. Utilizan una medición turbidimétrica o fluorométrica para detectar crecimiento bacteriano en un medio líquido. La mayoría de ellos emplea el método de microdilución y períodos de incubación menores que los habituales. Estos métodos son bastante confiables para el estudio de enterobacterias y otros gérmenes de crecimiento rápido, pero generalmente no son los adecuados para los de crecimiento lento o con requerimientos especiales.

2.2.5.- Agentes antifúngicos ⁽¹⁸⁾(19)

2.2.5.1.- Clasificación de los antifúngicos

Los antimicóticos incluyen una amplia variedad de sustancias con diferentes estructuras químicas y mecanismos de acción. La clasificación se realiza según criterios convencionales que atienden a su estructura en: polienos, azoles, alilaminas, entre otros (Tabla N°6); de acuerdo con su origen en sustancias producidas por organismos vivos o derivados de síntesis química; de acuerdo con su espectro de acción en: amplio o restringido y de acuerdo con el sitio de acción (Tabla N°7).

Tabla N° 6. Clasificación de los antifúngicos por su estructura

Polienos	Nistatina, natamicina, amfotericina B
Azoles	Imidazol: miconazol, clotrimazol
	Triazoles: fluconazol, itraconazol, ketoconazol
	Triazoles de segunda generación: voriconazol, ravuconazol, posaconazol
Alilaminas	Terbinafina, naftifina
Lipopéptidos	Papulacandinas
	Triterpenosglicosilados
	Equinocandinas: caspofungina, anidulofungina, micafungina
Pirimidinasfluoradas	Flucitosina
Otros	Yoduro de potasio, ciclopirox, tolnaftato, griseofulvin

Fuente: Goodman&Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica

Tabla N°7: Clasificación de los antifúngicos por su sitio de acción en el hongo

Antifúngicos interactuando en la pared celular	Lipopéptidos
Antifúngicos interactuando en la membrana celular	Polienos, azoles, alilaminas
Antifúngicos interactuando en el núcleo	Pirimidinasfluoradas

Fuente: Goodman&Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica

2.2.5.2.- Mecanismo de acción de los antifúngicos

La gran similitud entre las células mamíferas y fúngicas resulta un problema a la hora de diseñar la molécula antifúngica, pues esta

debe ser selectiva de la célula patógena y no de la célula humana sana. Los agentes antifúngicos comúnmente son utilizados ante infecciones de las mucosas de las cuales una de cuatro están relacionadas con hongos patógenos.

El mecanismo de acción de los medicamentos que inhiben el crecimiento de hongos, depende del lugar en el que actúen, lo cual está relacionado con la estructura química del antifúngico.

a) Acción del antifúngico sobre la membrana celular del hongo

La membrana celular de la célula humana así como la de los hongos, desempeña una importante función en la división celular y en el metabolismo. Las complejas partículas lipídicas llamadas esterolatos, son aproximadamente el 25 % de la membrana celular. Sin embargo, el contenido de esterol de la célula fúngica y mamífera es diferente. En las células de los mamíferos el colesterol es el esterol que predomina y en las células fúngicas el primario es el ergosterol. La diferencia del contenido de esteroles ha sido explotada como blanco de acción en los medicamentos antifúngicos. Dentro de ellos se tiene a los polienos, azoles y alilaminas.

Polieno. Los medicamentos que se encuentran en este grupo, se unen al ergosterol presente en la membrana celular fúngica, donde se forman poros que alteran la permeabilidad de la membrana lo que permite una pérdida de proteínas, glúcidos y cationes monovalentes y divalentes, causas de la muerte celular .

Azoles. Estos inhiben a la citocromo P-450-3-A de la célula fúngica, a través de la inactivación de la enzima C-14-a-dimetilasa, con lo cual se interrumpe la síntesis del ergosterol en la membrana celular. Debido a la falta de ergosterol se comienzan a acumular esteroides tóxicos intermedios, aumenta la permeabilidad de la membrana y se interrumpe el crecimiento del hongo.

Alilaminas. Trabajan de forma similar a los azoles, conceptualmente ellas inhiben la síntesis del ergosterol. Sin embargo, este grupo actúa en un paso temprano de la síntesis del ergosterol.

Las alilaminas inhiben a la enzima escualenoepoxidasa, de esta forma disminuye la concentración de ergosterol, aumentan los niveles de escualeno, aumenta la permeabilidad de la membrana celular, se interrumpe la organización celular y disminuye el crecimiento del hongo.

b) Antifúngicos que actúan sobre la pared celular del hongo

Lipopéptidos. La pared celular del hongo es fundamental en su viabilidad y patogenicidad. Esta sirve como cubierta protectora, le provee morfología celular, facilita intercambio de iones, la filtración de proteínas y participa en metabolismo y catabolismo de nutrientes complejos. La ausencia de pared celular es otro de los blancos de acción en la terapia antifúngica.

Desde el punto de vista estructural, la pared celular de los hongos está compuesta de un complejo protéico y polisacárido cuya composición varía en dependencia de la especie de hongo. La distribución de estas proteínas y carbohidratos en la matriz está en relación con la función de la pared celular y los procesos de osmosis y lisis. Los antifúngicos que actúan sobre ella lo hacen inhibiendo la síntesis de los glucanos a través de la inactivación de la enzima 1,3-beta-glucano sintetasa. La falta de glucanos en la pared celular la vuelve débil e incapaz de soportar el estrés osmótico, por lo que muere.

c) Antifúngicos que actúan sobre el núcleo de la célula fúngica.

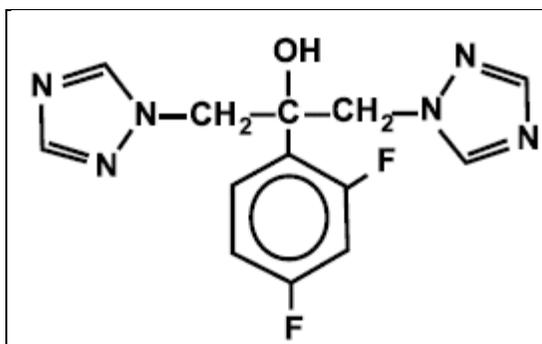
Antimetabolitos. Un clásico antimetabolito es la fluocitosina o 5-fluorocitosina. Este fármaco es transportado por la citosina permeasa en el citoplasma de la célula fúngica, donde se convierte en 5-fluorouracil (5-FU) por la citosina diaminasa. El 5-FU es fosforilado e incorporado dentro del RNA convirtiéndose en el dexosinucleotido, el cual inhibe a la timidilatosintetasa y de esta forma impide la síntesis de proteínas de la célula. También inhibe la síntesis de la proteína fúngica, reemplazando el uracil con 5-FU en el ARN fúngico.

2.2.5.3.- Fluconazol. ⁽¹⁹⁾ ⁽²⁰⁾

Agente antifúngico ampliamente usado. Como otros triazoles, tiene 2 anillos que contienen 3 átomos de nitrógeno (fig. 5). El anillo bencénico presenta 2 flúor. Su peso molecular es relativamente bajo, 306,3 Da.

El fluconazol es un bistrazolfluorado, de nombre químico 2-(2,4-difluorofenil)-1, 3-di-(1h-1, 2,4-triazol-1-il))- propan-2-ol. Cuya Estructura Química es la siguiente:

Figura N°5: Estructura del Fluconazol.



Fuente: Goodman&Gilman 10^o Ed.

Es una molécula polar y simétrica lo que favorece su hidrosolubilidad. Su aspecto es de polvo blanco y cristalino, es una base extraordinariamente débil (pKa 3,7) y no ionizable a pH fisiológico.

Su buena solubilidad en agua le hace apto para administración endovenosa, penetrando muy bien en fluidos corporales.

Mecanismo de acción: Inhibe el citocromo específico P450 en la enzima desmetil α -lanosterol, que es precursor del ergosterol, lo cual conduce a una acumulación de metilesteroles 14 - α y reduce la concentración de ergosterol, un esteroles necesario para una membrana fúngica normal.

Farmacocinética: La absorción es muy buena; la biodisponibilidad por vía oral es superior al 90%. La vida media promedio es de 30 horas. Se distribuye en toda el agua del cuerpo, y la vía más importante de eliminación es la

renal, alrededor del 80% de la dosis administrada aparece en orina como fármaco no modificado. Sólo el 11% del Fluconazol en suero está unido a proteína. Las concentraciones en el líquido cefalorraquídeo se aproximan al 70% de las concentraciones simultáneas en sangre, estén o no inflamadas las meninges. La Rifampicina disminuye el nivel sanguíneo de Fluconazol en un 25%.

Efectos adversos: Los dos efectos adversos más comunes relacionados con la administración de Fluconazol parece ser un aumento en la concentración de transaminasas y exantema. Menos de 2% de pacientes presenta náuseas, vómitos dolor abdominal y diarrea.

Indicaciones: Sus principales indicaciones son el tratamiento de infecciones por el género *Candida* (*no C. krusei ni C. glabrata*) en formas sistémicas, oftalmítis, neumonía, infecciones urinarias y vaginitis candidiásica (una dosis única de 150 mg de fluconazol por vía oral alcanza porcentajes de curación del 90%) así como infecciones por *C. neoformans*. Reviste especial interés su utilidad en las infecciones fúngicas de los pacientes infectados por el VIH, como la candidiasis orofaríngea y esofágica y la criptococosis del SNC, tanto como tratamiento inicial (alternativa a la amfotericina B o de elección en formas no graves), y fundamentalmente como mantenimiento crónico una vez superada la fase aguda. En pacientes neutropénicos se ha utilizado con éxito como profilaxis de infecciones fúngicas.

2.3 Definición de Términos Básicos:

- ✓ **Antifúngico:** Se entiende por antifúngico o antimicótico a toda sustancia que tiene la capacidad de evitar el crecimiento de algunos tipos de hongos o incluso de provocar su muerte.
- ✓ **Acetogeninas:** Son una clase de policétidos, productos naturales encontrados en las plantas de la familia Annonaceae. Se caracterizan por cadenas lineales de 32 o 34 carbonos que contienen grupos funcionales oxigenados incluyendo hidroxilos, cetonas, epóxidos, tetrahidrofuranos y tetrahidropiranos.
- ✓ **Lactonas:** Una lactona es un compuesto orgánico del tipo éster cíclico. Se forma como producto de la condensación de un grupo alcohol con un grupo ácido carboxílico en una misma molécula.
- ✓ **Candidiasis:** Es una infección fúngica (micosis) de cualquiera de las especies Candida (todas ellas levaduras), de las cuales la Candida albicans es la más común. Comúnmente conocida como infección por deuteromicetos, la candidiasis también se conoce técnicamente como candidosis, moniliasis y oidiomicosis.
- ✓ **Inmunodepresión:** Situación general patológica del organismo, espontánea o provocada, en la que hay una disminución de las defensas del sistema inmunológico.
- ✓ **Farmacocinética:** Es la rama de la farmacología que estudia los procesos a los que un fármaco es sometido a través de su paso por el organismo. Trata de dilucidar qué sucede con un fármaco desde el momento en el que es administrado hasta su total eliminación del cuerpo.

CAPÍTULO III:

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1.-Tipo de Investigación

Descriptiva: Porque se busca especificar o identificar las propiedades importantes del sujeto de estudio o producto a estudiar, o cualquier otro fenómeno que se mida en cada uno de sus propiedades independientemente, para así describir lo que se desea investigar.

Transversal: Se recolectan datos en un solo momento. Intentan analizar el fenómeno de un periodo de tiempo corto. Su propósito es describir variables y analizarlas en un momento dado.

No experimental: Porque no se influye en las variables para medir el efecto solo se describe el fenómeno.

3.2.- Población y Muestreo de la Investigación

3.2.1. Población

Placa de *Candida Albicans* ATCC 10231.

3.2.2. Muestra

Colonia tomada de la placa aproximadamente $1 - 2 \times 10^8$ UFC/ml.

3.3.- Variables e Indicadores

3.3.1.- Variables Implicadas.

3.3.1.1.- Variable Independiente.

- **Concentración del Extracto etanólico de las hojas de *Annona muricata* (Guanábana).**

Definición conceptual: Es la cantidad de extracto, producto solido obtenido por evaporación del etanol, previa maceración de las hojas en esta.

Definición operacional:

- Naturaleza: Cuantitativa.
- Medición: Directa
- Escala: De razón o proporción.
- Instrumento de medición: Balanza analítica.
- Procedimiento de medición: Se pesara el extracto seco (mg) luego se realizara su dilución con agua destilada.
- Indicadores: Cantidad de extracto disuelto/Cantidad de agua disuelto.
- Expresión final: mg/ml.

3.3.1.2.- Variable Dependiente.

- **Actividad antifúngica in vitro sobre cepas de *Candida albicans***

Definición conceptual: Es la capacidad inherente a una sustancia de origen sintético o natural de inhibir el crecimiento del hongo.

Definición operacional:

- Naturaleza: Cuantitativa.
- Medición: Directa.
- Escala: De razón o proporción.
- Instrumento de medición: Regla milimetrada.

- Procedimiento de medición: Se medirá el halo de inhibición del crecimiento fúngico producido por las diferentes concentraciones del extracto.
- Indicador: Diámetro del halo de inhibición del crecimiento fúngico.
- Expresión final: mm.

3.3.1.3.- Variables No Implicadas.

- Variables Intervinientes.

De la planta:

- Lugar de recolección: Mercado central- Lima
- Parte de la planta a estudiar: Hojas.
- Tipo de extracción: Maceración
- Tiempo de maceración: 10 días.
- Solvente usado: Etanol 70%.

Tabla N°8: Tabla de Variables

Tipo de Variable	Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Indicadores	Expresión final
Variable Independiente	Concentración del extracto etanólico al 70% de hojas de <i>Annona muricata</i> (Guanábana).	Son las cantidades del extracto (producto sólido obtenido por evaporación del etanol, previa maceración de las hojas disueltas en agua destilada.	Naturaleza: Cuantitativa Medición: Directa Escala: de razón o proporción. Instrumento de medición: Balanza analítica Procedimiento de medición: Se procedió a pesar el extracto seco (mg) luego se realizó su dilución en agua destilada (ml).	Cantidad de extracto disuelto /Cantidad de agua.	mg/ml
Variable dependiente	Actividad antifúngica In Vitro sobre cepas de <i>Candida albicans</i> .	Es la capacidad inherente a una sustancia de origen sintético o natural de inhibir el	Naturaleza: Cuantitativa Medición: Directa Escala: De razón o proporción. Instrumentos de medición: Regla	Diámetro del halo de inhibición del crecimiento fúngico.	mm

		crecimiento o matar a los hongos.	milimetrada. Procedimiento de medición: Se midió el diámetro del halo de inhibición del crecimiento fúngico producido por las diferentes concentraciones del extracto.		
--	--	-----------------------------------	---	--	--

Fuente: Elaboración propia

3.4.- Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos

3.4.1.- Técnica

Método estandarizado de difusión en disco descrito por el Laboratorio Internacional de Referencia: National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).

3.4.1.1.- Materiales, equipos y reactivo.

a) Material de Laboratorio.

- ✓ Tubos de ensayo de 5 y 10 ml.
- ✓ Vasos de precipitado de 100 y 200ml.
- ✓ Placas petri.
- ✓ Baguetas.
- ✓ Asa de Digrafsky.
- ✓ Pipetas de 1, 5 y 10ml.
- ✓ Embudo.
- ✓ Matraz de 200 y 250ml.

- ✓ Probeta de 100ml.
- ✓ Gradillas
- ✓ Asa de siembra
- ✓ Mechero Bunsen.
- ✓ Pinzas

b) Medios de cultivo.

- ✓ Agar Saboraud.
- ✓ Agar MuellerHinton.
- ✓ Caldo Sabouraud

c) Reactivos

- ✓ Etanol al 70%
- ✓ BaCl₂
- ✓ H₂SO₄
- ✓ Solución de Buffer Fosfato.

d) Equipos e Instrumentos.

- ✓ Balanza analítica.
- ✓ Refrigeradora.
- ✓ Autoclave.
- ✓ Estufa.

e) Otros materiales.

- ✓ Frascos oscuros de vidrio.
- ✓ Papel filtro.
- ✓ Algodón
- ✓ Gasas.
- ✓ Regla
- ✓ Hisopos.
- ✓ Papel Kraf

✓ Regla métrica.

f) Fármaco Patrón

✓ Fluconazol.

3.4.2.- Técnica.

a) Obtención del extracto

➤ **Adquisición de Especie Vegetal.**

Las hojas secas de *Annona muricata* (Guanábana), se compraron del mercado central de Lima en el mes de Febrero.

➤ **Selección**

Se eliminó las impurezas como piedrecillas, palitos, u objetos ajenos a las hojas, se seleccionó hojas en buen estado y color característico.

➤ **Trozado**

Se realizó en un mortero de porcelana, en donde se fracciono el material vegetal logrando uniformidad.

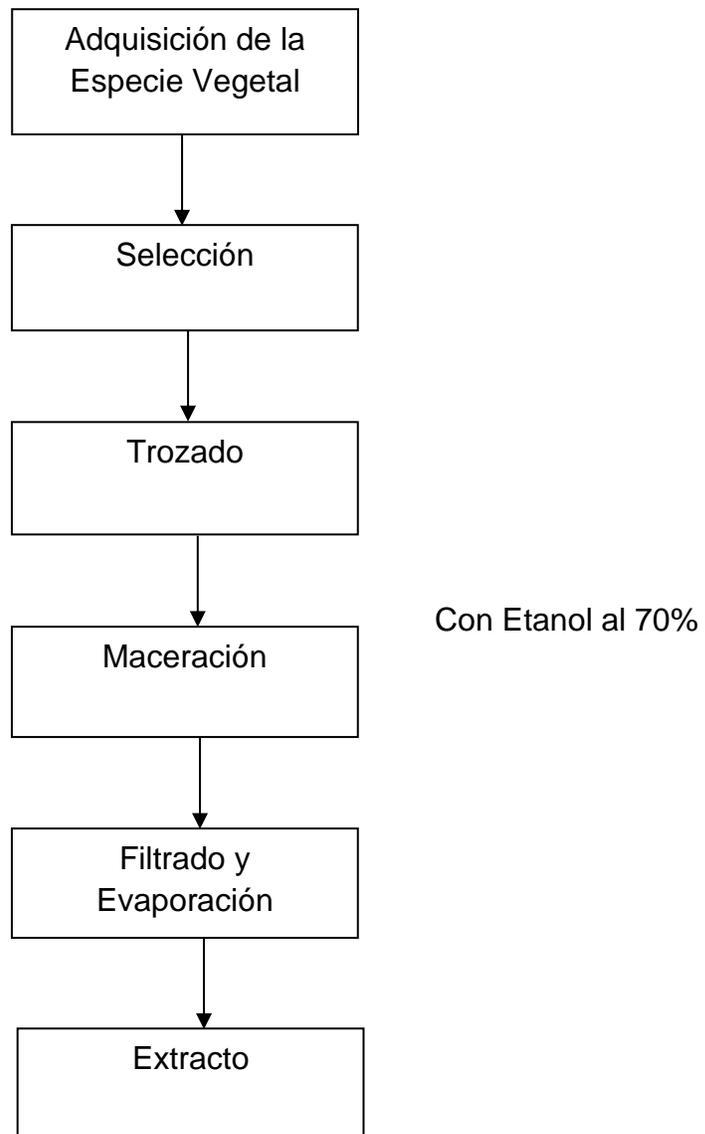
➤ **Maceración**

Se pesó 30 g de hojas secas de *Annona muricata* (Guanábana), y se colocó en una frasco de color ámbar con 500 ml de etanol al 70%, y se dejaron en maceración por 10 días a temperatura ambiente.

➤ **Filtrado y Evaporación**

El macerado fue filtrado (Papel filtro N°3), se le adicionó solución de Buffer Fosfato para equilibrar el pH del extracto para que sus principios activos no sean alterados y posteriormente se llevó a evaporación a una temperatura no mayor a 37°C.

Figura N°6: Obtención del Extracto Hidroalcohólico



Fuente: Elaboración propia

b) Determinación del Porcentaje de Extracción

Se pesó 30g de las hojas de la planta *Annona muricata* (Guanábana), previamente secas y molidas, se sometió a maceración con etanol al 70%, durante 10 días, luego se filtró hasta agotamiento.

Para calcular el porcentaje de extracción se utilizó la siguiente fórmula:

$$\%E = \frac{Pf}{Pi} \times 100$$

Dónde:

%E: Porcentaje de extracción.

Pi: Peso de la muestra molida.

Pf: Peso del extracto seco.

c) Estándar de turbidez para preparación del inóculo

Para estandarizar la densidad del inóculo para una prueba de susceptibilidad, se utiliza el estándar de turbidez de BaSO₄, equivalente a un estándar de 0.5 McFarland. El estándar de 0.5 McFarland de BaSO₄ se preparó como sigue:

Una alícuota de 0,5 ml de BaCl₂ al 1% se agrega a 99,5 ml de H₂SO₄ al 1% con agitación constante para mantener la suspensión.

La suspensión de Sulfato de Bario se transfiere de 4 a 6 ml a tubos con tapa rosca del mismo tamaño.

d) Preparación del inóculo

- Se toma 3 a 5 colonias bien aisladas del agar de cultivo. Se toca la colonia por arriba con un asa y el crecimiento se transfiere a un tubo con 5 ml de un medio de caldo Sabouraud.
- El caldo de cultivo es incubado a 37°C hasta que alcance la turbidez del estándar de 0.5 McFarland. Esto resulta una suspensión que contiene aproximadamente $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ UCF/mL.

e) Inoculación de las placas

- En un lapso de tiempo óptimo de 15 minutos después de ajustar la turbidez de la suspensión del inóculo, se saca con una pipeta esterilizada 1 ml de la suspensión.
- Se inocular en la superficie de la placa de agar Mueller -Hinton y con el asa de digralsky esterilizada y fría se extiende con movimientos circulares en toda la placa, se tapa la placa y se deja que se absorba en la superficie del medio, una vez ya absorbido se coloca la placa en posición invertida.

f) Aplicación de los discos a las placas inoculadas

Los discos son previamente esterilizados, y se prepara con las diferentes concentraciones del extracto dejando reposar por 15 minutos antes de la aplicación.

Los discos se dispensan sobre la superficie del agar. Cada disco es presionado para asegurar contacto pleno con la superficie del agar.

Las placas son invertidas y puestas en la incubadora a 37°C por 24 horas.

CAPÍTULO IV

PRESENTACIÓN, ANALISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1.-Resultados

a) Determinación del porcentaje de extracción de las hojas de *Annona muricata* (Guanábana)

Se pesó 30g de las hojas secas de *Annona muricata* (Guanábana), molidas, se sometió a maceración con etanol al 70%, durante 10 días, luego se filtró hasta agotamiento.

El extracto tuvo las siguientes características organolépticas:

- Color: solución de color verde oscuro.
- Olor: sui generis.

Para calcular el porcentaje de extracción se utilizó la siguiente formula:

$$\%E = \frac{Pf}{Pi} \times 100$$

Dónde:

%E: Porcentaje de extracción.

Pi: Peso de la muestra molida.

Pf: Peso del extracto seco.

Remplazando los datos obtenidos se tiene:

Tabla N°9: Porcentaje de extracción de las hojas de *Annona muricata* (Guanábana)

Peso inicial (g)	Peso final (g)	% de Extracción
30	1,2	4

Fuente: Datos experimentales

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

Este dato nos permite determinar la cantidad de muestra vegetal que necesitamos para la realización de los diferentes ensayos del trabajo de investigación además nos da información que permite saber si la planta es una buena materia prima o no.

El porcentaje de extracción obtenido por maceración con etanol al 70% de las hojas de *Annona muricata* (Guanábana) fue de 4%.

Como se puede observar esta planta posee un bajo porcentaje de extracción con etanol lo cual nos indica que para la obtención de un extracto se requiere emplear una mayor cantidad de materia prima.

b) Ensayo de la sensibilidad fúngica.

Cuadro N° 1: Resultados de los diámetros de los halos de inhibición de la actividad antifúngica del extracto de las hojas de *Annona muricata* (Guanábana) sobre cepas ATCC 10231 de *Candida albicans* a las 24 horas

Concentración (mg/ml)	Diámetro del halo de Inhibición (mm) del extracto de las hojas de <i>Annona muricata</i> (Guanábana) sobre cepas ATCC 10231 de <i>Candida albicans</i> a las 24 horas						
	A	B	C	D	E	F	Promedio
60	15	14	14	13	14	13	13.67
30	10	10	9	7	9	7.5	8.75
15	3	4	0	3	3.5	3.5	3.0
7.5	0,5	0	0	0.5	0	0	0.17
3.75	0	0,5	0	0,5	0,5	0	0.25
Blanco	0	0	0	0	0	0	0.00

Fuente: Elaboración propia

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

En el cuadro N° 1 se reportan los resultados de los diámetros de los halos de inhibición obtenidos del ensayo de la actividad antifúngica. En esta prueba se evidencia la actividad antifúngica del extracto de las hojas de *Annona muricata* (Guanábana), el cuál presenta un halo mínimo de inhibición de 0.25 mm en promedio a una concentración de 3.75mg/ml y un halo máximo de inhibición de 13.67 mm en promedio a una concentración de 60mg/ml.

Cuadro N° 2: Resultados de los diámetros de los halos de inhibición de la actividad antifúngica del extracto de las hojas de *Annona muricata* (Guanábana) sobre cepas ATCC de *Candida albicans* a las 48 horas

Concentración (mg/ml)	Diámetro del halo de Inhibición (mm) del extracto de las hojas de <i>Annona muricata</i> (Guanábana) sobre cepas ATCC 10231 de <i>Candida albicans</i> a las 48 horas						
	A	B	C	D	E	F	Promedio
60	18	17	18	16	18	17	17.33
30	10	12	12	9	10	8.5	10.25
15	3	4	0	2	3	3	2.50
7.5	0,5	0	0	1	1	1	0.58
3.75	0	0,5	0	0,5	0.5	0	0.25
Blanco	0	0	0	0	0	0	0.00

Fuente: Elaboración propia

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

En el cuadro N° 2 se reportan los resultados de los diámetros de los halos de inhibición obtenidos del ensayo de la actividad antifúngica. En esta prueba se evidencia la actividad antifúngica del extracto de las hojas del *Annona muricata* (Guanábana) sobre cepas de *Candida albicans* ATCC 10231, el cuál presenta un halo mínimo de inhibición de 0,25 mm en

promedio a una concentración de 3,75mg/ml y un halo máximo de inhibición de 17,33 mm en promedio a una concentración de 60mg/ml.

Cuadro N°3: Diámetros de los halos de inhibición formados con el fármaco patrón sobre cepas ATCC de *Candida albicans* ATCC 10231 a las 24 horas.

Concentración de disco de Fluconazol	Diámetros de los halos de inhibición formados con el fármaco patrón sobre cepas ATCC 10231 de <i>Candida albicans</i> a las 24 horas			
	F1	F2	F3	F4
0,2 mg/20 µl	22	20	22	23
0,2 mg/20 µl	24	20	23	22
0,2 mg/20 µl	20	20	21	22
0,2 mg/20 µl	22	22	23	23
0,2 mg/20 µl	22	21	20	20

Fuente: Elaboración propia.

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

En el Cuadro N° 3 se observan los resultados de los diámetros de los halos de inhibición obtenidos con el fármaco patrón Fluconazol (a una concentración de 0.2mg/20µl), reportándose para esta un halo de inhibición promedio de 21,6 mm, Haciendo una comparación entre los halos de inhibición del extracto y el fármaco patrón podemos decir que la concentración que se aproxima al halo de inhibición del Fluconazol es la que corresponde a la concentración de 60mg/ml que reporta un halo de inhibición de 13,67 mm en promedio.

Cuadro N°4: Diámetros de los halos de inhibición formados con el fármaco patrón sobre cepas ATCC de *Candida albicans* ATCC 10231 a las 48 horas.

Concentración del disco de Fluconazol	Diámetros de los halos de inhibición formados con el fármacos patrón sobre cepas ATCC 10231 de <i>Candida albicans</i> a las 48 horas			
	F1	F2	F3	F4
0,2 mg/20 µl	22	21	24	24
0,2 mg/20 µl	24	22	23	22
0,2 mg/20 µl	22	22	23	22
0,2 mg/20 µl	22	23	24	24
0,2 mg/20 µl	22	24	22	23

Fuente: Elaboración propia.

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

En el Cuadro N° 4 se observan los resultados de los diámetros de los halos de inhibición obtenidos con el fármaco patrón Fluconazol (a una concentración de 0.2mg/20µl), reportándose para esta un halo de inhibición promedio de 22,75 mm, Haciendo una comparación entre los halos de inhibición del extracto y el fármaco patrón podemos decir que la concentración que se aproxima al halo de inhibición del Fluconazol es la que corresponde a la concentración de 60mg/ml que reporta un halo de inhibición de 17,33 mm en promedio.

c) Análisis estadístico del ensayo de la sensibilidad antifúngica.

Cuadro N°5: Análisis de varianza de la actividad antifúngica del extracto de las hojas de *Annona muricata* (Guanábana) sobre cepas ATCC 10231 de *Candida albicans* a las 24 horas

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	908,750	4	227,188	375,517	,000
Intra-grupos	15,125	25	,605		
Total	923,875	29			

Fuente: Elaboración propia

Según se aprecia en el cuadro N°5, los promedios de inhibiciones son significativamente distintos, dependiendo de las concentraciones del extracto de las hojas de *Annona muricata* ($p < 0.05$)

Es decir que existen diferencias en el efecto antifúngico a diferentes concentraciones del extracto de las hojas de *Annona muricata*.

Cuadro N°6: Prueba de Duncan de la actividad antifúngica del extracto de las hojas de *Annona muricata* (Guanábana) sobre cepas ATCC 10231 de *Candida albicans* a las 24 horas

Concentración antifúngica del extracto de las hojas de <i>Annona muricata</i> (mg/ml)	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
7,50	6	,17		
3,75	6	,25		
15,00	6		3,0	
30,00	6		8,75	
60,00	6			13,67
Sig.		,13	1	1

Fuente: Elaboración propia.

Luego de realizada la prueba de Duncan, de acuerdo a la proximidad de valores de inhibición se conformaron tres subconjuntos para un nivel de confianza del 95%. Así, las placas a las que se les aplicaron concentraciones de 7.5mg/ml, 3.75 mg/ml, conformaron el primer subgrupo; luego, las placas a las que se les aplicó concentración de 30mg/ml y 15 mg/ml conformaron el segundo grupo y el tercero de los subgrupos se conformó con las placas a las cuales se les aplicó una concentración de 60 mg/ml. Cada uno de los subgrupos conformados poseen promedios similares; por ejemplo en el caso del primer subgrupo los promedios de las inhibiciones no son significativamente diferentes entre sí ($p=0.13>0.05$).

Cuadro N°7: Análisis de varianza de la actividad antifúngica del extracto de las hojas de *Annona muricata* (Guanábana) sobre cepas ATCC 10231 de *Candida albicans* a las 48 horas

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	1357,550	4	339,388	411,379	,000
Intra-grupos	20,625	25	,825		
Total	1378,175	29			

Fuente: Elaboración propia

Tal y como se constata en el Cuadro N°7, mediante la prueba de ANOVA, a las 48 horas los promedios de inhibiciones son significativamente distintos, dependiendo de las concentraciones del extracto de las hojas de *Annona muricata* ($p < 0.05$)

Es decir que existen diferencias en el efecto antifúngico en función de las diferentes concentraciones del extracto de las hojas de *Annona muricata*.

Cuadro N°8: Prueba de Duncan de la actividad antifúngica del extracto de las hojas de *Annona muricata* (Guanábana) sobre cepas ATCC 10231 de *Candida albicans* a las 48 horas

Concentración antifúngica del extracto de las hojas de <i>Annona muricata</i> (mg/ml)	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
3,75	6	0,25			
7,50	6	0,58			
15,00	6		3,0		
30,00	6			10,25	
60,00	6				17,33
Sig.		0,53	1	1	1

Fuente: Elaboración propia

Luego de realizada la prueba de Duncan, de acuerdo a la proximidad de valores de inhibición se conformaron tres subconjuntos para un nivel de confianza del 95%. Así, las placas a las que se les aplicaron concentraciones de 7.5mg/ml, 3.75 mg/ml, conformaron el primer subgrupo; luego, las placas a las que se les aplicó concentraciones de 15 mg/ml conformaron el segundo grupo, a las placas que se les aplicó concentraciones de 30mg/ml conformaron el tercer grupo y el cuarto grupo se conformó con las placas a las cuales se les aplicó concentración de 60 mg/ml. Cada uno de los subgrupos conformados poseen promedios similares; por ejemplo en el caso del primer subgrupo los promedios de las inhibiciones no son significativamente diferentes entre sí ($p=0.53>0.05$).

DISCUSIÓN

En la investigación DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA CONTRA *Candida albicans* y *Aspergillus niger* DE 10 PLANTAS MEDICINALES DE 3 DEPARTAMENTOS DEL PERÚ (2005), realizada por Ruiz Quiroz, Julio, El presente trabajo investigo la actividad antifúngica in vitro de doce extractos etanólicos correspondientes a diez plantas medicinales peruanas; *Annona cherimolia* (hojas), *Bidens pilosa* L. (partes aéreas), *Hypericum laricifolium* L. (partes aéreas), *Juglans neotropica* Diels(corteza), *Piper* spp. (hojas), *Plantago major* L.(hojas), *Psidium guajava* L.(hojas), *Schinus molle* L.(corteza y hojas) y *Spartium junceum* L. (planta entera). La actividad antifúngica se evaluó mediante los métodos de difusión en agar y dilución en agar para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI). Los microorganismos de prueba utilizados fueron las levaduras *Candida albicans* ATCC 10231 y *Candida albicans* cepa clínica. De doce extractos investigados, seis presentaron actividad antifúngica consistente con un diámetro de halos de inhibición #18mm (Prueba de Difusión en agar) frente a *Candida albicans* ATCC 10231. La CMI de los extractos que presentaron actividad consistente frente a *Candida albicans* ATCC 10231, fue de 250 µg/mL para *Annona cherimolia* un extracto de hojas. Los antifúngicos Nistatina y Fluconazol fueron incluidos en el estudio como controles positivos. En el presente trabajo se determino la actividad antifúngica por el método de difusión en placa, técnica estandarizada para determinar la susceptibilidad antimicrobiana, el extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* presento actividad antifúngica con un halo de inhibición de 17mm a una concentración de 60 mg/ml frente a cepas ATCC 10231 de *Cándida albicans*, lo que indica que el extracto tiene presencia de metabolitos bioactivos al igual que la *Annona cherimola*, ya que ambas pertenecen a la misma familia Annonaceae.

En la investigación realizada por OCHOA FUENTES,Y (2010), EVALUACIÓN IN VITRO DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE CUATRO EXTRACTOS VEGETALES METANÓLICOS PARA EL CONTROL DE TRES ESPECIES DE

FUSARIUM SPP, se evaluó la actividad antifúngica in vitro de los extractos de pirul (*Shinus molle*), chirimoya (*Annona cherimola*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y tabaquillo (*Nicotiana glauca*) sobre el crecimiento micelial y esporulación de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium culmorum* y *Fusarium solani*. Para determinar la inhibición del crecimiento micelial, dosis efectiva media (ED50) y número de conidios, se utilizó la metodología de medio envenenado, donde se evaluaron diversas concentraciones de los extractos. Los resultados mostraron que los extractos de chirimoya y canela presentaron efecto inhibitorio sobre el crecimiento micelial y esporulación. Sin embargo, el primero de ellos incrementó la producción de conidios al incrementarse la concentración del extracto, el extracto de chirimoya presentó el mejor control a 593 ppm contra *F. culmorum*. Los extractos de canela y chirimoya presentaron efecto en la inhibición micelial y esporulación de *F. oxysporum*, *F. culmorum* y *F. solani*.

En presente trabajo se observa que va a ver un mayor efecto antifúngico a medida q se incrementa la concentración del extracto dando como resultado un halo de inhibición mayor a una concentración de 60 mg/ml.

La investigación realizada por Poma M, Elizabeth (2011), ESTUDIO FARMACOGNOSTICO Y ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Annona muricata* (GUANABANA), se estudió el extracto acuoso de las hojas secas de *Annona muricata* L. "guanábana", especie recolectada en la ceja de selva de Cuzco, la cual fue clasificada taxonómicamente en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Mediante análisis fitoquímico se demostró la presencia de flavonoides, entre otros metabolitos. Se clasificó al extracto acuoso como no tóxico según el método de dosis límite para la determinación de toxicidad aguda, resultado que fue avalado con el estudio macroscópico de órganos realizado en la facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM.

En el presente trabajo se evidencia la presencia de metabolitos secundarios que le confieren el efecto antifúngica frente a cepas de *Candida albicans*.

CONCLUSIONES

- El extracto hidroalcoholico de *Annona muricata* (Guanábana) a una concentración de 60 mg/ml, presenta actividad antifúngica significativa con un halo de inhibición de 17 mm en la prueba de difusión en placa sobre *Candida albicans* ATCC 10231, y una débil actividad antifúngica a una concentración de 15 mg/ml con un halo de inhibición de 3 mm.
- El porcentaje de extracto hidroalcoholico obtenido de las hojas de *Annona muricata* (Guanábana) por maceración fue del 4%.
- La actividad antifúngica in vitro de las hojas de *Annona muricata* (Guanábana) frente a cepas ATCC 10231 de *Candida albicans* a las 24 horas fue de 14 mm a una concentración de 60 mg/ml.
- La actividad antifúngica in vitro de las hojas de *Annona muricata* (Guanábana) frente a cepas ATCC 10231 de *Candida albicans* a las 48 horas fue de 17 mm a una concentración de 60 mg/ml.

RECOMENDACIONES

- Realizar bioensayos en animales de experimentación para determinar la toxicidad aguda del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Annona muricata* (Guanábana).
- Realizar ensayos de la actividad antimicrobiana de *Annona muricata* (Guanábana) con otros microorganismos patógenos para poder ampliar el espectro de acción de esta planta.
- Se recomienda realizar la extracción, con diferentes tipos de solventes metanol, acetona, éter, hexano, para así obtener un mejor rendimiento de extracción.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Estrella E. Plantas Medicinales Amazónicas: Realidad y Perspectivas Tratado de Cooperación Amazónica: Secretaría Pro Tempore, Lima 1995.
- 2.- Machado Rocha Leandro, Materias primas vegetales para la industria de fitofármacos, Lima, 2003.
- 3.- Kasper Dennis L., Braunwald Eugene, Fauci Anthony S., Hauser Stephen L., Longo Dan L., J. Jameson Larry, y Isselbacher Kurt J., Eds. Harrison, Principios de Medicina Interna. 16^o Edición. Editorial Mc Graw Hill. 2005.
- 4.- Acosta A. Sandra Milena, Álvarez L. María Elena, Isaza M. Gustavo, Yepes Andrés Gilberto. Actividad antimicótica de *Phenaxrugosus* (lam) pers y *Baccharistrinervis* (sw) wedd. Resumen publicado en la Revista Ciencias Básicas BIOSALUD. Facultad de Ciencias para la Salud. Universidad de Caldas. Manizales. Colombia. Año 2005.
- 5.- Navarro Garcia VM, Gonzalez A, Fuentes M, Aviles M, Rios MY, Zepeda G, Rojas MG Antifungalactivities of ninetraditionalMexican medicinal plants. J Ethnopharmacol. 2003.
- 6.- Martínez Muñoz, Elizabeth. Obtención y evaluación de extractos bioactivos presentes en semillas de *Annona muricata* de la región cafetera. Pereira 2005.
- 7.- Poma M, Elizabeth. Estudio fitoquímico y actividad antiinflamatoria de la *Annona muricata*. (Guanábana) de Cuzco. Lima, Perú. 2011.
- 8.- Ruiz Quiroz, Julio. Determinación de la actividad antifúngica contra *Candida Albicans* y *Aspergillus Niger* de 10 plantas medicinales de 3 departamentos del Perú. Lima 2010.
- 9.- Ochoa Fuentes YM1, E Cerna Chávez1, J Landeros Flores1, S Hernández Camacho2, JC Delgado Ortiz. Evaluación in vitro de la actividad antifúngica de

cuatro extractos vegetales metanólicos para el control de tres especies de *Fusarium spp*, México, 2010.

10.- Restrepo, Jaime. Evaluación fisicoquímica de la fracción lipídica de las semillas de guanábana (*Annona muricata*) y la chirimoya (*Annona cherimolia*). 2010.

11. - Taylor L. *Annona muricata*. En Herbal Secrets of the Rainforest. 2nd edition. Austin: Sage Press, Inc.; 2002.

12. Salinas A, Dorka, Araujo G, Juan, Inhibición del tránsito intestinal por el extracto etanólico de las hojas de *Annona muricata* (Guanábana) en ratones, Lima, 2011.

13.- Kasper Dennis L., Braunwald Eugene, Fauci Anthony S., Hauser Stephen L., Longo Dan L., J. Jameson Larry, y Isselbacher Kurt J., Eds. Harrison, Principios de Medicina Interna. 16º Edición. Editorial Mc Graw Hill. 2005.

14.- Arenas Roberto, Micología Medica Ilustrada, 3º Edición, Editorial McGraw-Hill Interamericana, México, 2008.

15.- Trujillo, V. Guillarte, C. Pardi, G., Pruebas rápidas para la detección de *Candida albicans* en cavidad bucal. Venezuela, 2006.

16.- Lastra Jorge, Consultado el 20/03/2015 en:

(<http://www.monografias.com/trabajos10/10cinrec/10cinrec.shtml#DOS>)

17.- Palavecino Rosales Elizabeth. Interpretación de los estudios de susceptibilidad antimicrobiana. Boletín de la escuela de Medicina. Pontificia Universidad Católica de Chile. Vol. 26. 1997
<http://escuela.med.puc.cl/publ/boletin/Laboratorio/Interpretacion.html>

18. http://www.bvs.sld.cu/revistas/far/vol39_2_05/far12205.htm/ Consultado: 18/03/15 – 10:30

19. Goodman&Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 10^o edición. Editorial McGraw-Hill. 2003.

20. Farreras – Rozman. Medicina Interna. Editorial Mosby – Doyma. Décimo tercera Edición. Edición CD ROM. Barcelona. España. 2003.

GLOSARIO

Difusión: Proceso de propagación

Extracto: Un extracto es la sustancia que en forma concentrada se extraerá de otra de la cual conservará sus propiedades esenciales y constitutivas.

Acetogeninas: Son una clase de policétidos, productos naturales encontrados en las plantas de la familia Annonaceae.

Candidiasis: Es una infección fúngica (micosis) de cualquiera de las especie de Candida.

Tripanocida: Fármaco o agente que detiene la propiedad de destruir los tripanosomas.

Dermatomicosis: Comprende las infecciones de la piel causadas por hongos parasitarios.

Citotóxico: Un efecto Citotóxico consiste en lisar o destruir a una célula por acción de las Citotoxinas,

ANEXOS

Anexo N°1: Matriz de consistencia.

PROBLEMA	OBJETIVO	HIPÓTESIS	VARIABLES	TIPO
¿Presentará actividad antifúngica in vitro el extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Annona muricata</i> (Guanábana) frente a cepas ATCC 10231 de <i>Candida albicans</i> ?	<ul style="list-style-type: none"> Determinar la actividad antifúngica in vitro de las hojas de <i>Annona muricata</i> (Guanábana) frente a cepas ATCC 10231 de <i>Candida albicans</i>. 	El extracto etanólico de las hojas de <i>Annona muricata</i> (Guanábana) presenta actividad antifúngica in vitro sobre cepas de <i>Candida albicans</i> , microorganismo causante de Candidiasis.	V.D. Actividad antifúngica V.I. Concentración del extracto	Inducción.
	OBJETIVOS EPECIFICOS.	HIPÓTESIS ESPECIFICOS		
	O.E.1.	<ul style="list-style-type: none"> Determinar el porcentaje de extracto hidroalcohólico obtenido de las 	H.E.1 El porcentaje de extracto etanólico de hojas de <i>Annona</i>	
				No experimental

	hojas de <i>Annona muricata</i> (Guanábana).	muricata es de 8 al 10%.		
	O.E.2. Determinar la actividad antifúngica de las hojas de <i>Annona muricata</i> (Guanábana) a las 24 horas.	H.E.2 Las hojas de <i>Annona muricata</i> presenta actividad antifúngica a las 24 horas.		
	O.E.3. Determinar la actividad antifúngica de las hojas de <i>Annona muricata</i> (Guanábana) a las 48 horas.	H.E.3 Las hojas de <i>Annona muricata</i> presenta actividad antifúngica a las 48 horas.		

Fuente: Elaboración propia.



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: <i>Candida albicans</i> Catalog Number: 0443 Lot Number: 443-228 Reference Number: ATCC® 10231™ Purity: < 0.1% Total Pellet CFU Recovery: > 1000 CFUs per Pellet Passage from Reference: 4	Expiration Date: 2014/05 Release Information: Quality Control Technologist: Christine Condon Release Date: 2/12/13
---	---

Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the packing slip is (are) a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, its unique environment of the card combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.

⚠ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.



(†) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.

TESTING CERT #2655.01

Anexo N°3: Filtrado del extracto



Fuente: Elaboración propia

Anexo N°4: Preparación del Inóculo de *Candida albicans*



Fuente: Elaboración propia

Anexo N°5: Preparación de los discos



Fuente: Elaboración propia

Anexo N°6: Esterilización de discos



Fuente: Elaboración propia

Anexo N°7: Autoclavado de placas



Fuente: Elaboración propia

Anexo N°8: Inoculación de Cepa.



Fuente: Elaboración propia.

Anexo N°9: Inoculación en placas



Fuente: Elaboración propia.

Anexo N°10: Discos con extracto



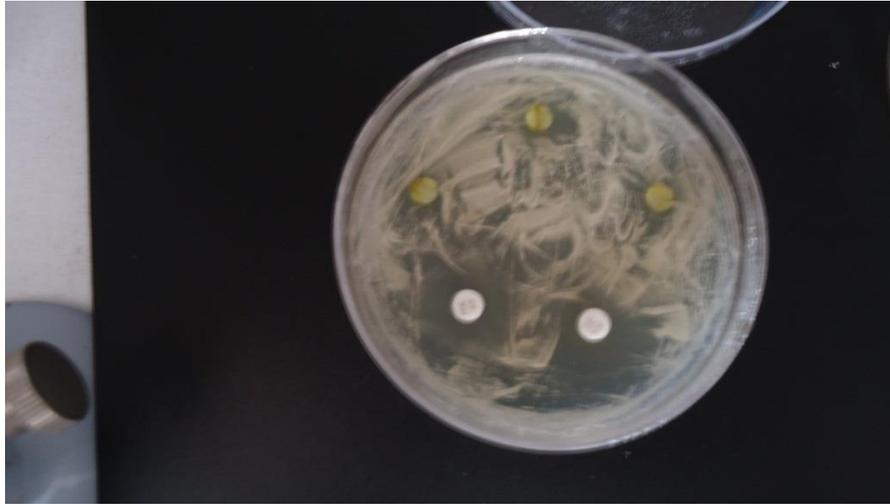
Fuente: Elaboración propia

Anexo N°11: Aplicación de discos



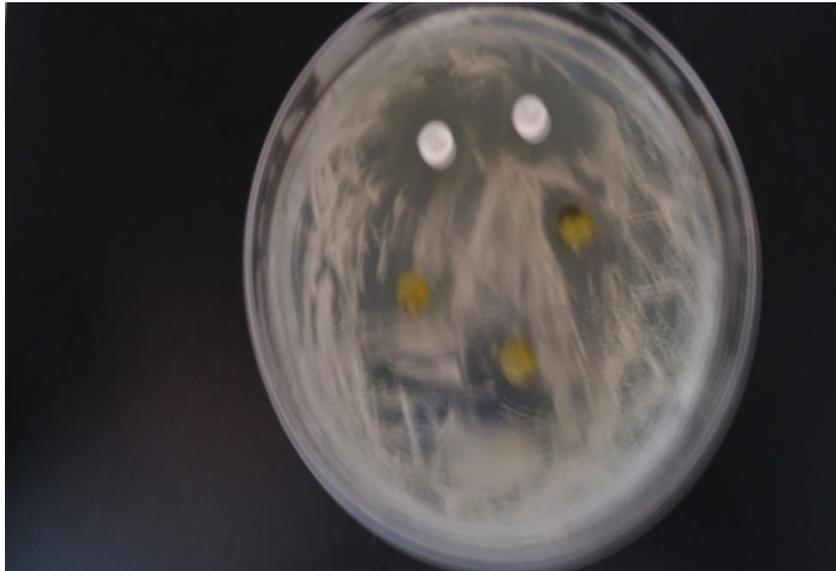
Fuente: Elaboración propia.

Anexo N°12: Lectura de los Halos de Inhibición del extracto



Fuente: Elaboración propia

Anexo N°13: Lectura de los Halos de Inhibición del extracto



Fuente: Elaboración propia

Anexo N°14: Lectura de los Halos de Inhibición del extracto



Fuente: Elaboración propia