

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN

Facultad de Ciencias de la Salud

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

EFEECTO ANTIFÚNGICO “*in vitro*” DEL EXTRACTO
HIDROALCOHÓLICO DE *Annona muricata*
SOBRE *Trichophyton interdigitale* y
Aspergillus brasiliensis, 2022

TESIS

Presentada por:

Bach. Luis Alonso Fernández Clavijo

Para optar el Título Profesional de:

QUÍMICO FARMACÉUTICO

TACNA – PERÚ

2023

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN

Facultad de Ciencias de la Salud

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

**EFFECTO ANTIFÚNGICO “*in vitro*” DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO
DE *Annona muricata* SOBRE *Trichophyton interdigitale*
y *Aspergillus brasiliensis*, 2022**

TESIS

Presentada por:

Bach. LUIS ALONSO FERNÁNDEZ CLAVIJO

Para optar el Título Profesional de:

QUÍMICO FARMACÉUTICO

Aprobada por UNANIMIDAD, ante el siguiente jurado



Mgr. Juan Carlos Efraín Cervantes Zegarra
Presidente



Mgr. Orlando Agustín Rivera Benavente
Miembro



Dra. Yemile del Carmen Berrios Espejo
Miembro



Mgr. Juan José Vargas Mamani
Asesor

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, **JUAN JOSE VARGAS MAMANI** en mi condición de asesor acreditado por la Resolución de Facultad N° 11287-2022-FACS-UNJBG, de la tesis de investigación titulada:

EFFECTO ANTIFÚNGICO "in vitro" DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Annona muricata* SOBRE *Trichophyton interdigitale* y *Aspergillus brasiliensis*, 2022

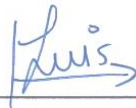
Presentado por el bachiller **LUIS ALONSO FERNÁNDEZ CLAVIJO** para optar el título profesional de **QUÍMICO FARMACÉUTICO**.

Habiendo cumplido con lo establecido en el reglamento de originalidad y de similitud de trabajos de investigación y producción intelectual, considerando que según la revisión, evaluación y análisis realizado a través del software de similitud textual **TURNITIN**, cuenta con el nivel de similitud permitido cuyo porcentaje es de **12 %**.

Por lo que **CERTIFICO LA SIMILARIDAD** de la tesis enunciado líneas arriba, la cual está expedita para continuar con los trámites para la obtención de Título Profesional de Químico Farmacéutico, según corresponda consiguientemente la publicación en el repositorio institucional.



MSc. JUAN JOSE VARGAS MAMANI
DNI: 42224279



Bach. LUIS ALONSO FERNÁNDEZ CLAVIJO
DNI: 44980006



DEDICATORIA

A Dios, por ser la luz en cada momento incierto. Por darme fuerza, paciencia y perseverancia para seguir mi camino.

A mis padres Manuel Fernández y Modesta Clavijo, por su apoyo incondicional en mi formación como hijo y estudiante, gracias por su sacrificio y apoyo incondicional en todo momento.

A mi hermano Cristian Fernández por su apoyo incondicional.

A Claudia Rivera, por ser mi compañera y amiga incondicional en todo momento.

A la señora Norma Gonzales y Christian Rivera que son como una segunda familia para mí.

AGRADECIMIENTO

A mi asesor MSc. Juan Jose Vargas Mamani por su tiempo brindado en la preparación y realización de la presente tesis, dedicación y su valiosa asesoría.

Al Mblgo. Edwin Obando Velarde por su constante apoyo, paciencia, dedicación y consejos para la culminación de este trabajo.

A la MSc. Mblga. Angela Veronica Choque Miranda por su apoyo para la culminación de este trabajo.

ÍNDICE

DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE	vi
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE GRÁFICOS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xii
RESUMEN	xv
ABSTRACT	xvi
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
1.1. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA	3
1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	7
1.2.1. Problema principal	7
1.2.2. Problemas secundarios	7
1.3 JUSTIFICACIÓN	8
1.4. OBJETIVOS	9
1.4.1. Objetivo general	9
1.4.2. Objetivos específicos	9
1.5. HIPÓTESIS	10

1.6. DETERMINACIÓN DE VARIABLES	10
1.6.1. Variable independiente	10
1.6.2. Variable dependiente	11
1.7. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES	13
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	14
2.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN	14
2.2. BASES TEÓRICAS	22
CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO	32
3.1. TIPO, DISEÑO Y NIVEL DE LA INVESTIGACIÓN	32
3.1.1. Tipo de investigación	32
3.1.2. Diseño de investigación	32
3.1.3. Nivel de la investigación	33
3.2. POBLACIÓN Y MUESTRA	33
3.2.1. Población Vegetal	33
3.3. TÉCNICAS, INSTRUMENTOS Y PROCEDIMIENTOS PARA LA RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN	37
3.3.1. Obtención de muestra de la planta	37
3.3.2. Secado	37
3.3.3. Obtención del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Annona muricata</i> (Guanábana)	38
3.3.4. Preparación del “Extracto hidroalcohólico de las hojas...	39

secas de <i>Annona muricata</i> (Guanábana)”	39
3.3.5. Tratamiento de la muestra	40
3.3.7. Marcha fitoquímica:	42
3.3.8. Estudio Microbiológico	45
3.3.10. Evaluación de la concentración mínima fungicida (CMF)	59
3.4. ANÁLISIS DE DATOS	60
CAPÍTULO IV: RESULTADOS	62
DISCUSIÓN	84
CONCLUSIONES	88
RECOMENDACIONES	90
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
ANEXOS	97

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Características organolépticas.....	40
Tabla 2.	Activación de <i>Trichophyton interdigitale</i> ATCC 9533.....	45
Tabla 3.	Activación de <i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404.....	46
Tabla 4.	Preparación de las cantidades necesarias para llevar a cabo la concentración mínima inhibitoria.....	52
Tabla 5.	Preparación de las cantidades requeridas para la realización de la concentración mínima inhibitoria (CMI).....	53
Tabla 6.	Elaboración de la concentración mínima inhibitoria para <i>Trichophyton interdigitale</i> ATCC 9533.....	55
Tabla 7.	Elaboración de la concentración mínima inhibitoria para <i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404.....	57
Tabla 8.	Análisis fitoquímico del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Annona muricata</i> "Guanábana".....	63
Tabla 9.	Perfil de compuestos Fenólicos del extracto hidroalcohólico de las hojas de Guanábana.....	64
Tabla 10.	Evaluación de la actividad antifúngica del extracto hidroalcohólico de Guanábana contra <i>Trichophyton</i> <i>interdigitale</i> ATCC 9533 utilizando la técnica de Kirby-Bauer.	66

Tabla 11.	Evaluación de la sensibilidad de <i>Trichophyton interdigitale</i> ATCC 9533 ante diversas concentraciones del extracto hidroalcohólico de <i>Annona muricata</i> "Guanábana".....	68
Tabla 12.	Se presentan los resultados de la evaluación de la actividad antifúngica del extracto hidroalcohólico de Guanábana frente a <i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404 mediante la técnica de Kirby Bauer.	71
Tabla 13.	Se evaluó el grado de sensibilidad de <i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404 a distintas concentraciones del extracto hidroalcohólico de Guanábana.	72
Tabla 14.	Efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Annona muricata</i> contra <i>Trichophyton interdigitale</i>	75
Tabla 15.	Efecto antimicótico del extracto hidroalcohólico de las hojas de Guanábana sobre <i>Aspergillus brasiliensis</i>	77
Tabla 16.	Evaluación para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto hidroalcohólico de la guanábana frente a <i>Trichophyton interdigitale</i>	80
Tabla 17.	Estimación de la concentración mínima inhibitoria del extracto hidroalcohólico de la Guanábana contra <i>Aspergillus brasiliensis</i>	82

ÍNDICE DE GRÁFICOS

- Grafico 1.** Cromatograma 65
- Grafico 2.** Se presentan los promedios de los halos de inhibición generados por el extracto hidroalcohólico de Guanábana frente a *Trichophyton interdigitale* ATCC 9533, indicando la distribución de los resultados..... 68
- Grafico 3.** Representación visual del nivel de sensibilidad de *Trichophyton interdigitale* ATCC 9533 a diversas concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Annona muricata* "Guanábana", siguiendo la escala de Duraffourd y Lapraz..... 70
- Grafico 4.** Distribución de las medias de halos de inhibición en base al extracto hidroalcohólico de Guanábana frente a *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404. 72
- Grafico 5.** Se presenta una representación gráfica que muestra el grado de sensibilidad de *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 a diversas concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Annona muricata*. "Guanábana" 74

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1.	Matriz de consistencia	98
Anexo 2.	Foto de árbol de <i>Annona muricata</i> (Guanábana).....	99
Anexo 3.	Fotos del proceso de secado de hojas de <i>Annona muricata</i> (Guanábana) al aire libre.	100
Anexo 4.	Fotos de la selección de las hojas secas de <i>Annona</i> <i>muricata</i> (Guanábana).	101
Anexo 5.	Fotos del proceso de molienda de las hojas secas de <i>Annona</i> <i>muricata</i> (Guanábana).	102
Anexo 6.	Fotos del proceso de maceración de las hojas secas de <i>Annona muricata</i> (Guanábana).....	103
Anexo 7.	Fotos del filtrado del extracto hidroalcohólico de Las hojas secas de <i>Annona muricata</i> (Guanábana).	104
Anexo 8.	Fotos del frasco hermético que se usaron para guardar extracto hidroalcohólico filtrado.....	105
Anexo 9.	Fotos de la activación de <i>Trichophyton interdigitale</i> y <i>Aspergillus brasiliensis</i>	106
Anexo 10.	Fotos de la marcha fitoquímica; determinación cualitativa de los metabolitos secundarios.....	107
Anexo 11.	Análisis fitoquímico del extracto hidroalcohólico de <i>Annona</i> <i>muricata</i> “Guanábana”	108

Anexo 12. Análisis por HPLC perfil de compuestos fenolicos del extracto hidroalcohólico de <i>Annona muricata</i> “Guanábana”	109
Anexo 13. Condiciones de análisis por HPLC.....	110
Anexo 14. Técnica de Kirby - Bauer	111
Anexo 15. Fotos de la preparación de la prueba de la actividad antimicótica del extracto hidroalcohólico de <i>Annona muricata</i> “Guanábana” frente a <i>Trichophyton interdigitale</i> ATCC 9533 por la técnica de Kirby Bauer (método de difusión con discos).	112
Anexo 16. Fotos de la preparación de la prueba de la Actividad antimicótica del extracto hidroalcohólico de <i>Annona muricata</i> “Guanábana” frente a <i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404 por la técnica de Kirby Bauer (método de difusión con discos).	113
Anexo 17. Técnica de susceptibilidad en caldo de dilución.	114
Anexo 18. Fotos de la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto hidroalcohólico de la Guanábana frente a <i>Trichophyton interdigitale</i>	115
Anexo 19. Fotos de la determinación de la concentración mínima fungicida (CMF) del extracto hidroalcohólico de la Guanábana frente a <i>Trichophyton interdigitale</i>	116

Anexo 20.	Fotos de la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto hidroalcohólico de la Guanábana frente a <i>Aspergillus brasiliensis</i>	117
Anexo 21.	Fotos de la determinación de la concentración mínima fungicida (CMF) del extracto hidroalcohólico de la Guanábana frente a <i>Aspergillus brasiliensis</i>	118
Anexo 22.	Certificado de análisis de <i>Trichophyton interdigitale</i> ATCC 9533.....	119
Anexo 23.	Resultados de la clasificación	120
Anexo 24.	Certificado de análisis de <i>Aspergillus Brasiliensis</i> ATCC 16404.....	121
Anexo 25.	Resultados de la clasificación	122
Anexo 26.	Constancia de identificación botánica.....	123

RESUMEN

Las infecciones fúngicas son comunes en Perú, busca a la guanábana como alternativa terapéutica, aunque se requiere más investigación.

Objetivo: Evaluar el efecto antifúngico “*in vitro*” del extracto hidroalcohólico de *Annona muricata* sobre *Trichophyton interdigitale* y *Aspergillus brasiliensis*, 2022. **Metodología:** El extracto hidroalcohólico de *Annona muricata* "Guanábana" se obtuvo a través del proceso de maceración con alcohol. Empleando las siguientes técnicas: a) Kirby Bauer, se evaluó la sensibilidad según el tamaño de los halos de inhibición, b) La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se determinó mediante diluciones seriadas o dilución en medio líquido y c) la Concentración Mínima Fungicida (CMF) del extracto hidroalcohólico mediante difusión en agar. **Resultados:** Se demostró que el *Trichophyton interdigitale* y *Aspergillus brasiliensis* presenta sensibilidad al extracto hidroalcohólico de *Annona muricata*. La CMI para *Trichophyton interdigitale* fue de 31,50 mg/ml y la CMF fue de 45,01 mg/ml. La CMI para *Aspergillus brasiliensis* fue de 40,50 mg/ml y la CMF fue de 31,50 mg/ml. **Conclusión:** El extracto hidroalcohólico de *Annona muricata* presenta actividad antifúngica frente a *Trichophyton interdigitale* y *Aspergillus brasiliensis*.

Palabras clave: *Trichophyton*, Micosis, Antifúngicos, Tiña, *Annona*.

ABSTRACT

Fungal infections are common in Peru, and soursop (*Annona muricata*) is being explored as a therapeutic alternative, although further research is needed.

Objective: To evaluate the in vitro antifungal effect of the hydroalcoholic extract of *Annona muricata* on *Trichophyton interdigitale* and *Aspergillus brasiliensis* in 2022. **Methodology:** The hydroalcoholic extract of *Annona muricata* "Guanábana" was obtained through the alcohol maceration process. Using the following techniques: a) Kirby Bauer, the sensitivity was evaluated according to the size of the inhibition zones, b) the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined by serial dilutions or dilution in liquid medium and c) the Minimum Fungicide Concentration (MFC) of the hydroalcoholic extract by diffusion in agar. **Results:** It was demonstrated that *Trichophyton interdigitale* and *Aspergillus brasiliensis* exhibit sensitivity to the hydroalcoholic extract of *Annona muricata*. The MIC for *Trichophyton interdigitale* was 31.50 mg/ml, and the MFC was 45.01 mg/ml. The MIC for *Aspergillus brasiliensis* was 40.50 mg/ml, and the MFC was 31.50 mg/ml. **Conclusion:** The hydroalcoholic extract of *Annona muricata* exhibits antifungal activity against *Trichophyton interdigitale* and *Aspergillus brasiliensis*.

Keywords: *Trichophyton*, Mycosis, Antifungals, Ringworm, *Annona*.

INTRODUCCIÓN

Actualmente, las infecciones micóticas, especialmente las dermatofitosis, como la Tiña, se encuentran entre las afecciones cutáneas más comunes en el Perú/mundo. En nuestro país, se han realizado múltiples estudios epidemiológicos para evaluar su incidencia en la población general. Este problema se agrava debido a la creciente resistencia, los fallos en los tratamientos, los posibles efectos adversos y la toxicidad vinculados al empleo de antifúngicos tradicionales. Por lo tanto, es importante descubrir alternativas terapéuticas novedosas para abordar esta patología. A pesar de que la medicina tradicional constituye una opción relevante, es necesario validarla en el contexto de la medicina convencional.

En el territorio peruano la Guanábana, identificada científicamente como *Annona muricata*, es una fruta que ha sido ampliamente consumida en Perú desde tiempos prehispánicos. Esta planta se encuentra en las zonas occidentales de Perú. Este estudio investiga el conocimiento y utilización tradicional de la Guanábana por parte de la población del norte del país, particularmente en la zona de La Libertad, donde ha sido consumida como alimento desde tiempos antiguos (1).

Se ha estudiado previamente los compuestos activos extraídos de partes de la planta, como la semillas y hojas, atribuyéndoles propiedades anticancerígenas en cultivos celulares (*in vitro*). Sin embargo, el estudio de las partes frescas de la planta, el consumo del fruto en infusiones o sus extractos. Esto plantea dudas sobre si las partes frescas de la planta, el consumo del fruto en infusiones o sus extractos pueden realmente manifestar los efectos que se les atribuyen (2).

Por esta razón, el objetivo de este estudio es examinar el análisis fitoquímico y efecto antifúngico "*in vitro*" del extracto hidroalcohólico de *Annona muricata* sobre *Trichophyton interdigitale* y *Aspergillus brasiliensis*, 2022.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

La micosis es una afección en la población a nivel local, nacional e internacional. A pesar que en el mercado se encuentran disponibles diversos productos farmacéuticos, muchos de ellos acarrearán efectos secundarios.

En la actualidad existe interés sobre los beneficios potenciales para el control o prevención de enfermedades (antitumoral, antibacterial, antifúngica, antimicrobial, leishmanicida, tripanocida, citotóxica) mediante la adopción de una alimentación saludable. Los compuestos fenólicos provenientes de la ingesta de frutas y vegetales (Uva blanca, uva rosada, ciruelo, manzana, kiwi, maracuyá) están asociados con beneficios para la salud debido a su habilidad para secuestrar radicales libres (3).

El Perú alberga una abundancia de especies vegetales, entre las cuales destaca la planta Guanábana (*Annona muricata*), sus hojas y semillas contienen notables propiedades, incluyendo su efectivo

poder antioxidante y antimicrobiano, que son utilizados de manera tradicional en forma de infusión para aliviar diversas enfermedades (actividad antipáarkinson, antimalárica, relajante del músculo liso, antitumoral, antifúngica, antimicrobial, leishmanicida, tripanocida, citotóxica) (3).

Mediante diversas investigaciones, se ha logrado demostrar la existencia de compuestos fenólicos, alcaloides, flavonoides y taninos, junto con otros compuestos orgánicos. Estos, en su mayoría, poseen anillos o cadenas largas de carbono, así como radicales OH, y contienen elementos como oxígeno o nitrógeno en su estructura. La comunidad científica muestra un notable interés en la presencia de estos metabolitos secundarios, presentes en extractos de hojas, tallos, raíces, frutos, cáscaras y otras partes de diversas plantas (4).

Por este motivo este trabajo busca encontrar una alternativa menos agresiva a esta enfermedad.

En el territorio peruano, la Guanábana (*Annona muricata*) es un fruto autóctono que está siendo reconocido por sus propiedades antioxidantes. Además, todas las partes de esta especie se utilizan

como remedios naturales, abarcando cortezas, hojas, raíces y frutos; sin embargo, la hoja es la que cuenta con mayor cantidad de principios bioactivos, se le han atribuido propiedades que incluyen el alivio de los síntomas de la diabetes al actuar como controlador de los niveles de glucosa en la sangre. Se ha evidenciado su destacada eficacia en los procesos endocrinos del hígado, riñón, tiroides, páncreas, intestinos, ovarios y próstata. Además, se destaca su capacidad para relajar el músculo liso, incluido el corazón, así como sus beneficios en la vesícula, apéndice. También se ha comprobado que combate el cáncer de pulmón o de Lewis, cáncer de seno y tumores cerebrales, además de tener propiedades hipotensoras, antiespasmódicas, vasodilatadoras y beneficios en enfermedades bronquiales (5).

La *Annona muricata* es reconocida como una planta medicinal que se presenta como una opción frecuente en diversos países para el tratamiento de cánceres como el gástrico y gastrointestinal, entre otros (5).

Las micotoxinas generadas por hongos pertenecientes a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, tales como las aflatoxinas y las

ocratoxinas, se vinculan con el cáncer hepático y tienen la capacidad de inducir tumores en el colon, riñón y pulmón. Esto impulsó la ejecución de la presente investigación con el propósito de explorar los estudios relacionados con la actividad antimicótica de las hojas, así como los compuestos responsables de dicha actividad (6).

Aunque se ha documentado evidencia en varias partes del mundo acerca de la posible aparición de parkinsonismo atípico asociado al consumo regular de Guanábana o la infusión de sus hojas, la información predominante se centra en sus propiedades beneficiosas contra diversas enfermedades (7).

El propósito de la investigación expuesta fue reconocer los compuestos secundarios y analizar el efecto antifúngico "*in vitro*" del extracto etanólico en concentraciones de 15,75 mg/ml; 18 mg/ml; 20,25 mg/ml; 22,5 mg/m; 24,75 mg/ml y 27 mg/ml de *Annona muricata* sobre *Trichophyton interdigitale* y *Aspergillus brasiliensis*.

1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

1.2.1. Problema principal

¿El extracto hidroalcohólico de *Annona muricata* tendrá efecto antifúngico sobre *Trichophyton interdigitale* y *Aspergillus brasiliensis*, 2022?

1.2.2. Problemas secundarios

- a) ¿Cuáles serán los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas de la especie *Annona muricata* (Guanábana), 2022?
- b) ¿Cuál es la concentración del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Annona muricata* (Guanábana) que presenta efecto antifúngico frente a cepas de *Trichophyton interdigitale*, 2022?
- c) ¿Cuál es la concentración del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Annona muricata* (Guanábana) que presenta efecto antifúngico frente a cepas de sobre *Aspergillus brasiliensis*, 2022?

1.3 JUSTIFICACIÓN

Este estudio tiene como objetivo descubrir la acción antifúngica de las hojas de *Annona muricata* (Guanábana), abordando la falta de información existente y ofreciendo una nueva opción terapéutica. Además, busca respaldar las creencias medicinales ancestrales en la comunidad al demostrar la actividad fitoterapéutica de la guanábana.

Uno de los motivos que promueve la investigación en este ámbito, especialmente en el contexto de los antifúngicos, es la aparición de mecanismos de resistencia presentes en ciertas especies. Esto se debe, al menos en parte, a que la mayoría de los fármacos antifúngicos poseen propiedades que inhiben el crecimiento de los hongos, lo que abre la puerta a la aparición de cepas resistentes debido a la administración prolongada de estos tratamientos. Por consiguiente, dado el incremento de las infecciones por hongos, se busca constantemente alternativas terapéuticas efectivas en el reino de las plantas medicinales.

Por lo tanto, este estudio tiene como objetivo descubrir el impacto antifúngico "*in vitro*" del extracto hidroalcohólico de *Annona muricata* en *Trichophyton interdigitale* y *Aspergillus brasiliensis* a diversas concentraciones.

1.4. OBJETIVOS

1.4.1. Objetivo general

Evaluar el efecto antifúngico “*in vitro*” del extracto hidroalcohólico de *Annona muricata* sobre *Trichophyton interdigitale* y *Aspergillus brasiliensis*, 2022.

1.4.2. Objetivos específicos

- a) Identificar los metabolitos secundarios presentes en el análisis fitoquímico y efecto antifúngico “*in vitro*” del extracto hidroalcohólico de *Annona muricata* sobre *Trichophyton interdigitale* y *Aspergillus brasiliensis*, 2022.
- b) Determinar el efecto antimicótico de la concentración del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Annona muricata* (Guanábana) sobre *Trichophyton interdigitale*, 2022.
- c) Determinar el efecto antimicótico de la concentración del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Annona muricata* (Guanábana) sobre *Aspergillus brasiliensis*, 2022.

1.5. HIPÓTESIS

Hipótesis general

El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Annona muricata* (Guanábana) presenta efecto antifúngico sobre *Trichophyton interdigitale* y *Aspergillus brasiliensis*.

Hipótesis específicas

- a) El extracto hidroalcohólico de las hojas de la especie *Annona muricata* (Guanábana), tiene metabolitos secundarios que son los responsables de la actividad antifúngica.
- b) La concentración del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Annona muricata* (Guanábana), tiene efecto antifúngico frente a cepas de *Trichophyton interdigitale*, 2022.
- c) La concentración del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Annona muricata* (Guanábana), tiene efecto antifúngico frente a cepas de sobre *Aspergillus brasiliensis*, 2022.

1.6. DETERMINACIÓN DE VARIABLES

1.6.1. Variable independiente

Solución hidroalcohólica extraída de las hojas de *Annona muricata* (Guanábana).

Indicadores

Niveles de concentración.

- 15,75 mg/ml.
- 18 mg/ml.
- 20,25 mg/ml.
- 22,5 mg/ml.
- 24,75 mg/ml.
- 27 mg/ml.

1.6.2. Variable dependiente

Efecto antifúngico.

Indicadores:

Escala de interpretación propuesta por Duraffourd y Lapraz en 1983 para el diámetro en milímetros (mm) del área de inhibición.

- (-) Ausencia de sensibilidad: diámetro (< 8 mm).
- (+) Sensible con moderación: diámetro (9 - 14 mm).
- (++) Altamente sensible: diámetro (15 - 19 mm).
- (+++) Muy altamente sensible: diámetro (> 20 mm).

Concentración mínima inhibitoria (CMI)

- Leve efecto antimicótico: CMI de 500 a 1000 $\mu\text{g/ml}$.
- Moderado efecto antimicótico: CMI de 100 a $< 500 \mu\text{g/ml}$.
- Significativo efecto antimicótico: CMI $< 100 \mu\text{g/ml}$.

1.7. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

VARIABLES	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICION OPERACIONAL	DIMENSIONES	INDICADORES	TIPO DE VARIABLE	ESCALA
Variable Dependiente Efecto antifúngico frente a cepas de <i>Trichophyton interdigitale</i> y <i>Aspergillus brasiliensis</i>	Se trata de la habilidad de una sustancia para frenar el desarrollo en un cultivo particular.	Lo logramos al evaluar las dimensiones de las zonas de inhibición.	Inhibición del desarrollo.	Dimensión del área de inhibición.	Cuantitativo continuo	Ordinal
Variable Independiente Solución hidroalcohólica extraída de las hojas de <i>Annona muricata</i> (Guanábana).	Es la técnica práctica para concentrar y extraer los principios activos que los vegetales sintetizan. Con lo cual se obtienen sustancias que ejercen algún tipo de actividad en nuestro organismo.	Se utilizará alcohol de 70° y hojas secas molidas para realizar una maceración y así extraer las propiedades del vegetal a estudio.	Diluciones del extracto hidroalcohólico	Concentraciones específicas de 15,75mg/ml; 18mg/ml; 20,25mg/ml; 22,5mg/ml; 24,75mg/ml y 27mg/ml.	Cuantitativo continuo	Ordinal

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

2.1.1 Antecedentes internacionales

En Irak; Zainab M. Alzubaidy , et al,(8), realizaron el estudio “Impacto de los extractos alcohólicos y acuosos de *Annona muricata* en el crecimiento de aislados de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*” (2022), para ello utilizaron el ensayo por el método de Kirby-Bauer y el efecto inhibitor del extracto alcohólico fue más evidente debido a la solubilidad de muchos compuestos activos en el alcohol.

En España; Paola Natalia Alvarado Mayor, et al,(9), realizaron el estudio “Efecto citotóxico del extracto hidroalcohólico de la *Annona muricata* frente a la línea celular humana de adenocarcinoma gástrico ” (2022), el análisis fitoquímico mostró la presencia de carbohidratos reductores, alcaloides,

fenoles, taninos, triterpenos, esteroides, saponinas, flavonoides, proteínas, glucósidos cardíacos y antocianinas.

En África; Isabelle A Appoline, et al, (10), realizaron el estudio “Un análisis comparativo de los metabolitos secundarios, el contenido de polifenoles y el potencial antioxidante de los extractos etanólico, hidroetanólico y acuoso de las hojas de *Annona muricata*”, (2021), este estudio tuvo como objetivo comparar la composición fitoquímica y la actividad antioxidante entre extractos etanólicos y acuosos. Se utilizaron pruebas fitoquímicas cualitativas y cuantitativas para detectar la presencia de metabolitos. El examen fitoquímico mostró la presencia de flavonoides, taninos, alcaloides, antocianinas, leucoantocianinas, triterpenoides, esteroides, mucílagos, compuestos reductores y cumarinas.

En India; Hosakatte Niranjana Murthy, et al,(11), realizaron el estudio “Compuestos Bioactivos del Fruto de Guanábana (*Annona muricata* L.)”, (2020), se centra en la calidad nutricional, los usos tradicionales, los metabolitos de *A. muricata* y su relación con las actividades biológicas.

En Colombia; Dueñas Cely, et al,(12) , realizaron el estudio “Estudio Fitoquímico Y Evaluación De La Actividad Citotóxica De Un Extracto De Hojas De *Annona muricata* (Guanábana) Frente A Las Líneas Celulares MCF-7, 4T1, B16 y 3T3”, (2019), en el extracto etanólico obtenido de hojas de *A. muricata* se observó que poseen un mayor contenido de metabolitos secundarios como flavonoides, taninos y alcaloides, por lo cual sugiere que estos compuestos puedan estar relacionados con la actividad farmacológica encontrada.

En Nigeria; Olugyuro JAO , et al, (13), realizaron el estudio “Actividades antimicrobianas y propiedades fitoquímicas de la hoja de *Annona muricata*” (2017), El estudio investigó las propiedades de los constituyentes y las actividades antibactericida y antimicóticas de los extractos de la hoja de *A. muricata*. Los hallazgos del análisis fitoquímico revelaron la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides, taninos, alcaloides, saponinas y glucósidos cardíacos en los extractos.

En Cuba; García YH, et al, (14), realizaron el estudio “Optimización de variables para extracción de flavonoides a

partir de hojas de *Annona muricata L.*" (2016), se realizó una selección de las mejores condiciones para la obtención de un extracto de hojas de Guanábana que contienen flavonoides, en las que se obtuvo un rendimiento de extracción del 87% logrado en el proceso de extracción.

2.1.2 Antecedentes nacionales

En Huancayo; Urbano Palomino, Silveria, et al,(15), realizaron el estudio "EVALUACIÓN DE LA EFICACIA ANTIMICÓTICA DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE HOJAS DE *Annona muricata L.* (GUANÁBANA) FRENTE A *Candida albicans* ATCC 10231" (2022), se realizaron ensayos de solubilidad, identificación de metabolitos secundarios y la actividad antimicótica del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Annona muricata L.* "Guanábana" a concentraciones del 25 %, 50 %, 75 % y 100 % frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Finalmente, no se evidenció actividad antimicótica, reportándose halos de inhibición de 6 mm de igual medida al control negativo de agua destilada.

En Huancayo; Guevara Caballero, Aynita, et al,(16) , realizaron el estudio “Actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Annona muricata* (Guanábana) sobre *Staphylococcus aureus* ” (2021). La metodología de la investigación requiere una muestra de estudio a las hojas de *Annona muricata*, donde se maceró por 10 días. Se usó la técnica por difusión en pozos donde se inoculó los extractos etanólicos al 50%, 75% y 100%.

En Trujillo; Barreto Gavelan, Mary Lina, (17), realizaron el estudio “Efecto antifúngico in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Annona Muricata* sobre *Candida albicans* ATCC 10231” (2019), El presente estudio tuvo como objetivo determinar el efecto antifúngico in vitro del extracto etanólico de *Annona muricata* al 5%, 10% y 15 % sobre *Candida albicans*. Conclusiones: El extracto etanólico de hoja de *Annona muricata* presentó efecto antifúngico en las tres concentraciones frente a *Candida albicans* ATCC 10231.

En Lima; Cayra Ramos, et al, (18), realizaron el estudio “Optimización de los parámetros de secado de hojas de

Guanábana (*Annona muricata* L.) Sobre el contenido de polifenoles y capacidad antioxidante” (2019). Donde se buscó evaluar la influencia de secado por aire caliente en el contenido de humedad y compuestos fenólicos de la hoja de Guanábana (*Annona muricata* L.).

En Lima; Anselmo Ramos, Roxana, (19), realizaron el estudio “Actividad antimicótica del extracto etanólico de las hojas de *Lomanthus truxillensis cabrera* en cepas de *Candida albicans* ATCC 10231 y *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, in vitro” (2018), el propósito principal de esta investigación fue evaluar la actividad antimicótica del extracto etanólico obtenido de las hojas de *Lomanthus truxillensis cabrera*, con el objetivo de verificar su capacidad inhibitoria sobre cepas de *Candida albicans* y *Aspergillus brasiliensis*.

En Huancayo; Huamán Torre, Evelin Yesica, et al, (20), realizaron el estudio “Análisis de la actividad antimicrobiana de el extracto etanólico de *Annona muricata* frente a microorganismos patógenos” (2017), la presente investigación tuvo como objetivo determinar la actividad

antimicrobiana de la *Annona muricata*, frente a microorganismos patógenos. Aplicó un diseño descriptivo comparativo en la que se realizaron procedimientos de inoculación en medios sólidos y preparación del extracto etanólico con hojas pulverizadas.

En Lima; Mamani Larico, Glenda Elena,(21), realizó el estudio “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” (2015), el presente estudio busco determinar la actividad antifúngica del extracto hidroalcohólico de las hojas *Annona muricata* “Guanábana” sobre cepas de *Candida albicans* ATCC 10231. Se estudió la actividad antifúngica utilizando el método de difusión en placa, sobre cepas de *Candida albicans*. Se concluyó que el extracto de las hojas de *Annona muricata* “Guanábana” presenta actividad antimicótica frente a *Candida albicans* ATCC 10231.

En Ayacucho; Jaime Gamboa, Yuri Irwin, (22), realizo el estudio “Actividad antimicótica del aceite esencial de *Citrus aurantium* L."naranja" frente a la cepa de *Trichophyton mentagrophytes*” (2015), la investigación tuvo como objetivo evaluar la actividad antimicótica in vitro del aceite esencial de *Citrus aurantium* L. "naranja" frente a la cepa de *Trichophyton mentagrophytes*. Los halos de inhibición se muestran en todas las concentraciones en promedios de 14,60 mm, 21,00 mm, 27,30 mm, 37,83 mm, 52,60 mm, para las concentraciones de 1%, 5%, 10%, 20%, 30% respectivamente, e inhibición total en la superficie del medio para la concentración del 50%. La CMI y CMF del aceite esencial fue 0,586 mg/ml y 1,172mg/ml, respectivamente. El aceite esencial de *Citrus aurantium* L. "naranja" presenta un efecto antimicótico y fungicida frente a la cepa de *Trichophyton mentagrophytes*.

En Lima; Ruiz Quiroz, Julio Reynaldo, et al, (23), realizo el estudio “Determinación de la actividad antifúngica contra *Candida albicans* y *Aspergillus niger* de 10 plantas medicinales de 3 departamentos del Perú”, (2005), 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. Ningún extracto mostró actividad consistente frente a la cepa clínica de *Candida albicans* y *Aspergillus niger* ATCC 16404.

2.2. BASES TEÓRICAS

Guanábana (*Annona muricata*)

Posicionamiento taxonómico según el Sistema de Stevens, 2017:

- Clase: *Magnoliopsida*.
- Subclase: *Magnoliidae* Novák ex Takht.
- Superorden: *Magnolianaes* Takht.
- Orden: *Poales* Small.
- Familia: *Annonaceae* Juss.
- Subfamilia: *Annonoideae* Raf.
- Género: *Annona* L.
- Especie: *Annona Muricata* L.

La familia *Annonaceae* está compuesta por alrededor de 128-129 géneros y aproximadamente 2220 especies que se encuentran en regiones tropicales o cálidas. En el territorio peruano, se han

documentado 23 géneros y 193 especies pertenecientes a la familia *Annonaceae*, siendo notables 41 especies endémicas (24).

Pequeños árboles de 3-4 (-5) metros de altura, con ramificación extensa. Los tallos viejos son gruesos, de color marrón claro, compactos, sin pelos, sin lenticelas visibles y arrugados; los tallos jóvenes son redondos, de color verde, compactos, con pubescencia y los tallos jóvenes de estos árboles, que pertenecen a la familia *Annonaceae*, están envueltos por una densa capa de pelos simples, transparentes y no glandulares, sin lenticelas, y son flexibles. Las hojas, dispuestas de manera alterna, presentan un peciolo ligeramente enrollado con una hendidura en la parte superior, de color marrón intenso y pubescencia, rodeado por una capa de pelos simples, transparentes y no glandulares. La lámina de la hoja, ovalada y de textura carnosa ligeramente coriácea, exhibe un color verde intenso en la superficie superior con nervaduras principales y secundarias de tono cremoso, mientras que en la superficie inferior es de un verde claro a veces blanquecino, opaca en ambas caras. La parte superior está casi desprovista de pelos, rodeada solo por algunos pelos simples, transparentes y no glandulares, mientras que la parte inferior es pubescente y está rodeada por una densa capa

de pelos similares. Las hojas tienen un extremo agudo, una base redondeada y bordes enteros y ligeramente ondulados (24).

Propiedades farmacológicas de las hojas de *Annona muricata*

Comprobaron que las hojas de *Annona Muricata* poseen propiedades antiinflamatorias, antidiabéticas, antiulcerosas y anticancerígenas, actuando contra diversos tipos de tumores (25).

Las especies reactivas carcinógenas que provocan la formación de tumores afectan el funcionamiento de células normales al modificar la bicapa lipídica de la membrana, alterar proteínas quinasas y desregular factores de transcripción.

Los antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos trabajan en conjunto para proteger contra los efectos del daño. El desequilibrio entre estos compuestos puede resultar en estrés oxidativo, lo que está vinculado a afecciones serias, como el cáncer (25).

El papel fundamental de las hojas de *Annona muricata* radica en su capacidad antioxidante para disminuir el nivel de lactoperoxidasa (LPO), una sustancia con capacidad mutagénica que activa un proceso regulador, como la apoptosis.

Estudios científicos realizados tanto "*in vitro*" como "*in vivo*" han desvelado como el extracto de acetato de etilo de las hojas de Guanábana actúa contra las células cancerosas de la piel y los pulmones. Estas investigaciones señalan que dicho extracto puede provocar la apoptosis en las células a través de la vía de las mitocondrias. Se observa una interrupción del ciclo celular en la fase G1, lo que se relaciona con su efecto antiproliferativo. No obstante, las investigaciones sobre *Annona muricata* y su acción contra el cáncer no se restringen únicamente a estudios en laboratorio y en organismos vivos. Un informe de caso que involucra a una mujer de 66 años con cáncer de mama metastásico reveló que el consumo del agua infundada con hojas de Guanábana resultó en la estabilización de la enfermedad (25).

Hongos

Los hongos, pertenecientes al reino *Fungi* y específicamente al grupo *Eumycota*, son organismos eucariotas y heterótrofos. Este grupo diverso incluye levaduras, mohos y productores de setas. Ubicuos y con una amplia distribución en el planeta, la mayoría de los hongos tienen efectos beneficiosos, aunque algunos pueden ser perjudiciales. Se estima que hay alrededor de 1,5 millones de

especies de hongos, y hasta el momento se ha documentado la descripción de más de 100 000 de ellas. De este conjunto, solamente alrededor de 500 especies son responsables de causar enfermedades en seres humanos. Unas 100 de estas especies fúngicas tienen la capacidad de causar infecciones en individuos sanos, mientras que el resto afecta a aquellos que están debilitados o inmunodeprimidos. Los hongos desempeñan un papel esencial en la descomposición de la materia orgánica y el ciclo de nutrientes, contribuyendo al desarrollo sostenible. Además, los hongos beneficiosos son fundamentales en la generación de metabolitos relevantes para la biotecnología y la medicina, siendo empleados en la producción de alimentos y bebidas como pan, queso, yogur, cerveza y vino. También son clave en la obtención de sustancias como inmunosupresores (por ejemplo, la ciclosporina) y antibióticos (como la penicilina). No obstante, la lucha contra estas infecciones se ve desafiada por la limitada disponibilidad de medicamentos antifúngicos y la resistencia desarrollada por los hongos causantes de las infecciones (26).

Algunos hongos que pueden resultar dañinos para los seres humanos y las patologías que provocan son:

Hongos que afectan a los seres humanos	Enfermedad
Epidermophyton <i>Epidermophyton floccosum</i>	Infecciones fúngicas cutáneas: dermatofitosis corporal, tinea pedis, onicomicosis.
Microsporium <i>Microsporium canis</i> , <i>Microsporium gypseum</i>	Dermatofitosis capilar, dermatofitosis corporal.
Trichophyton <i>Trichophyton mentagrophytes</i> , <i>Trichophyton rubrum</i>	Infecciones cutáneas: tinea pedis, tinea barbae, dermatofitosis capilar, dermatofitosis corporal, tinea inguinal.
Candida <i>Candida albicans</i>	Infecciones por Candida, candidemia.
Cryptococcus <i>Cryptococcus neoformans</i>	Criptococosis
Paracoccidioides <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Paracoccidioidomicosis
Aspergillus <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Aspergillus Flavus</i> , <i>Aspergillus niger</i>	Aspergilosis pulmonar, diseminada.
Histoplasma <i>Histoplasma capsulatum</i>	Histoplasmosis.

Micosis

Las micosis son infecciones causadas por hongos, y se dividen en superficiales y profundas para facilitar su estudio según su ubicación. Entre las superficiales se incluyen las superficiales propiamente

dichas (como la pitiriasis), las cutáneas superficiales (como las dermatofitosis) y las mucosas superficiales (como la candidiasis). En cuanto a las micosis profundas, se clasifican en subcutáneas y sistémicas (26).

Características distintivas de las infecciones fúngicas más destacadas.

Micosis (ubicación)	Clase de agente patógeno	Órgano	Géneros comúnmente encontrados
Superficial	Primaria	Piel y pelo	<i>Malassezia</i>
Superficial (cutánea)	Primaria	Piel y uñas	<i>Trichophyton</i> <i>Epidermophyton</i> <i>Microsporum</i>
Superficial (mucosa)	Oportunista	Zonas corporales incluyendo la vagina, boca, tractos digestivo y urinario, así como los ojos.	<i>Candida</i> <i>Aspergillus</i> , <i>fusarium</i>
Profunda (sistémica)	Primaria (Endémica)	Tejidos cutáneos y subcutáneos, sistema linfático cutáneo, órganos circundantes.	<i>Coccidioides</i> <i>Histoplasma</i> <i>Blastomyces</i> <i>Paracoccidioides</i>
	Oportunista	Cualquier órgano	<i>Candida</i> <i>Aspergillus</i>

2.3. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS

- **Cepa:** Se destaca por ser una característica propia de un organismo específico que conserva sus propiedades bioquímicas y macroscópicas uniformes y distintivas.
- ***Candida albicans*:** Se trata de un hongo que normalmente forma parte inofensiva de la flora mucosa. No obstante, con frecuencia, genera enfermedades en las mucosas con una significativa incidencia de morbilidad, y en individuos susceptibles, puede ocasionar infecciones del torrente sanguíneo que pueden llegar a ser potencialmente mortales (27).
- ***Trichophyton interdigitale*:** Es una línea clonal dentro de la especie sexual *T. mentagrophytes*. Causa onicomicosis y tinea pedis en humanos y nunca se ha aislado de animales (28).
- ***Aspergillus brasiliensis*:** Es un hongo y constituye una de las especies más frecuentes del género *Aspergillus*. Es ubicuo en el suelo, un contaminante común de los alimentos, y también se reporta regularmente en ambientes interiores como plantas industriales (29).
- ***Annona muricata*:** La Guanábana (*Annona muricata*) es miembro de la familia de plantas *Annonaceae*. Se utiliza ampliamente en la medicina tradicional para tratar diversas enfermedades y dolencias.

Este árbol tropical, que mantiene su verdor y florece, puede alcanzar hasta 8 metros de altura y produce frutos comestibles. Se encuentra en numerosas regiones de climas tropicales y subtropicales en todo el mundo, abarcando partes de América, Asia y África. Se le atribuyen propiedades medicinales para tratar afecciones como la inflamación, reumatismo, diabetes, hipertensión e infestaciones parasitarias (30).

- **Taxonomía:** Es una disciplina de la biología dedicada a denominar, describir y categorizar a los organismos vivos (31).
- **Principios activos:** Son compuestos químicamente puros que determinan las acciones y efectos farmacológicos de una droga, y, por ende, su utilidad terapéutica.
- **Extracción:** La técnica que implica la separación de una sustancia, la cual es soluble en dos disolventes que no se mezclan entre sí, se realiza a través de una interfaz donde ambos disolventes muestran diferentes grados de solubilidad.
- **Maceración:** Se trata de la técnica de extracción más elemental, donde se protege la combinación de sustancia y solvente de la luz para evitar posibles reacciones, siendo necesario agitar de manera continua.

- **“*in vitro*”**: Es un método que implica llevar a cabo un experimento, ya sea en un tubo de ensayo o en un entorno controlado, como un laboratorio.
- **Escala McFarland**: Se trata de un método para medir la turbidez, especialmente útil en el seguimiento del crecimiento de microorganismos, sirviendo como indicador de la concentración celular (32).
- **Halos de inhibición**: Es el área en una placa de agar inoculada con gérmenes donde no se observa crecimiento bacteriano (33).

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

3.1. TIPO, DISEÑO Y NIVEL DE LA INVESTIGACIÓN

3.1.1. Tipo de investigación

Se empleará un diseño observacional, descriptivo, prospectivo y transversal.

3.1.2. Diseño de investigación

El diseño de esta investigación será de naturaleza no experimental y se llevará a cabo en un entorno "*in vitro*". En este enfoque, se examinará un fenómeno específico al introducir factores que pueden influir en las variables que están siendo estudiadas. Estas variables se medirán en momentos predefinidos.

Los grupos experimentales se compondrán de cepas de *Trichophyton interdigitale* y *Aspergillus brasiliensis* a dichas muestras se les aplicarán concentraciones variadas de extractos hidroalcohólicos de las hojas de *Annona muricata*, también reconocida como "Guanábana", como parte del estudio.

3.1.3. Nivel de la investigación

Nivel explicativo

3.2. POBLACIÓN Y MUESTRA

3.2.1. Población Vegetal

Estaba compuesta por la especie vegetal *Annona muricata*, conocida como Guanábana.

3.2.2. Muestra Vegetal

Hojas de la planta *Annona muricata*, comúnmente conocida como Guanábana.

3.2.3. Población Microbiológica

La población estaba conformada por las cepas de *Trichophyton interdigitale* y *Aspergillus brasiliensis*.

3.2.4. Muestra Microbiológica

Se utilizaron dos cepas de hongos en su estado de latencia.

3.2.5. Materiales y/o Instrumentos

3.2.5.1. Material de Vidrio

- Matraz Erlenmeyer 250ml, 1000ml.
- Probetas 250ml.

- Tubos de ensayo 13 x 100mm y 40 de 15 x 125mm.
- Baguetas.
- Vasos precipitados 100ml y 200ml.
- Placas Petri 10 x 100mm.
- Tubo de ensayo con cierre de rosca de 15 x 125mm.

3.2.5.2. Instrumentos

- Regla Vernier.
- Asa de Drigalsky.
- Gradillas.
- Piseta con agua destilada.
- Micropipetas.
- Molino mecánico.
- Espátulas.
- Mechero de ron.

3.2.5.3. Equipos de Laboratorio

- Balanza analítica (Marca: Kern).
- Cocina eléctrica (Marca: Lizeth).
- Autoclave (Chamberlain).
- Estufa (Marca: Memmert).
- Conservadora (Marca: Biobase).

- Agitador vórtex (Marca: VWR).
- Incubadora.

3.2.5.4. Medios de Cultivo

- Agar Muller Hinton (Marca: Liofilchem).
- Agar Nutritivo BHI (Marca: Liofilchem).
- Agar Sabourau (Marca: Liofilchem).

3.2.5.5. Otros

- Papel filtro Whatman N°40.
- Una caja de guantes quirúrgicos de látex y nitrilo.
- Una caja de Mascarillas simples.
- Diez mascarillas KN95.
- Plumón marcador blanco.
- Plumón marcador negro.
- Jeringas 5ml.
- Algodón.
- Dos rollos de pabilo.
- Papel aluminio.
- 10 papel Kraft.
- Guardapolvo.
- Calculadora.

- Fósforos
- Detergente.
- Lejía.
- Jabón.

3.2.5.6. Material Microbiológico

- *Trichophyton interdigitale* ATCC 9533 (Microbiologics).
- *Aspergillus Brasiliensis* ATCC 16404 (Microbiologics).

3.2.5.7. Muestra Vegetal

Extracto hidroalcohólico de hojas de *Annona muricata* al 15,75 mg/ml, 18 mg/ml, 20,25 mg/ml, 22,5 mg/ml, 24,75 mg/ml y 27 mg/ml de concentración.

3.3. TÉCNICAS, INSTRUMENTOS Y PROCEDIMIENTOS PARA LA RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN

3.3.1. Obtención de muestra de la planta

La muestra vegetal fue recogida en el sector Z del distrito de la Yarada los Palos, ubicado en el departamento de Tacna, durante el mes de junio de 2022. Las coordenadas de la ubicación son 18°17'08"S y 70°26'20"O. Se recolectó 10 kg de hojas de Guanábana. Se seleccionaron las hojas más frescas y no dañadas por el sol, parásitos y plagas.

(Anexo 02 - Foto)

3.3.2. Secado

Llevamos a cabo el proceso de secado en una habitación hecha de material noble que previamente se limpió y desinfectó. La habitación estaba bien ventilada, y para secar las hojas de manera uniforme, utilizamos bandejas de papel kraft. Durante todo el proceso de secado, se giraban las hojas tres veces al día para garantizar que se secaran de manera uniforme y para prevenir la acumulación de humedad.

(Anexo 03 - Foto)

3.3.3. Obtención del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Annona muricata* (Guanábana)

a. Selección y limpieza: Las hojas se limpiaron mecánicamente con sumo cuidado evitando no contaminar ni dañar las hojas.

b. Secado: Las hojas fueron dejadas para secar a condiciones ambientales durante un período de 41 días en un área bien ventilada.

(Anexo 03 - Foto)

c. Seleccionado: Después del secado se procedió a hacer una segunda selección en cual se escogieron las hojas secas en mejor estado.

(Anexo 04 - Fotos)

d. Pulverización: La muestra pulverizada de las hojas secas de *Annona muricata* (Guanábana) se obtuvo mediante la trituración con un molidor mecánico.

(Anexo 05 - Fotos)

e. Almacenamiento: Las hojas trituradas, se depositaron en un frasco color verde de 5 litros, con alcohol de 70° y luego se procedió a forrar el frasco con papel aluminio.

(Anexo 06 - Fotos)

3.3.4. Preparación del “Extracto hidroalcohólico de las hojas secas de *Annona muricata* (Guanábana)”

La obtención del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Annona muricata* (Guanábana) se realizó a través del método de maceración. Se pesaron 449,79 g de hojas pulverizadas, las cuales fueron maceradas en un frasco ámbar de 5 litros durante 48 días, utilizando 4500 ml de alcohol etílico al 70°. Se agitó mecánicamente el frasco cada 8 horas a lo largo de los 48 días. Al concluir el período de maceración, se filtró el macerado durante una semana mediante papel filtro, obteniendo un preparado hidroalcohólico total de 3596 ml; es importante señalar que se realizó una doble filtración. El líquido filtrado se designará como extracto hidroalcohólico.

(Anexo 07 - Fotos)

Por último, guardamos el extracto hidroalcohólico en dos recipientes herméticos y pasarán a la conservadora. Con este extracto obtenido se extrae una porción la cual se coloca en una placa petri y es pasado a la estufa para evaporar el alcohol etílico, se reconstituye con agua estéril (2 ml) para realizar los análisis microbiológicos, marcha fitoquímica y perfil de compuestos fenólicos.

(Anexo 08 - Fotos)

Tabla 1. Características organolépticas

Extracto hidroalcohólico de Hojas de <i>Annona muricata</i>	
Aspecto	Líquido verde oscuro
Color	Verde oscuro
Olor	Propio
Sabor	Picante

Fuente: Elaboración propia

3.3.5. Tratamiento de la muestra

- El extracto hidroalcohólico fue utilizado en seis concentraciones variadas: 15,75 mg/ml; 18 mg/ml; 20,25 mg/ml; 22,5 mg/ml; 24,75 mg/ml y 27 mg/ml. Luego, se procedió a la desecación del extracto hidroalcohólico en una placa Petri en la estufa durante tres días. Después de este proceso, se llevó a cabo el raspado del extracto hidroalcohólico desecado mediante el uso de un bisturí.
- Se pesaron 1,8 g de la muestra seca, la cual fue rehidratada con 2 ml de agua estéril en un tubo de ensayo con tapa de rosca. El tubo de ensayo fue agitado mediante un agitador vortex hasta alcanzar su total reconstitución.

Para hallar las siguientes concentraciones aplicamos los siguientes cálculos	
1,8g (Muestra seca) -----> 2ml Xg -----> 1ml Xg= 0,9g	0,9g -----> 1ml 0,9g -----> 1000ul
1000 mg -----> 1g X mg -----> 0,9g X mg = 900mg	900 mg -----> 1000ul
1000 mg -----> 1g X mg -----> 0,9g X mg = 900mg	

3.3.6. Evaluación de la actividad del extracto hidroalcohólico de la *Annona muricata*

Para evaluar la capacidad antifúngica del extracto hidroalcohólico de la Guanábana, se llevaron a cabo tres métodos distintos:

- 1) La estimulación de las cepas micóticas.
- 2) La elaboración del inóculo.
- 3) Las pruebas de actividad antifúngica:
 - Método de difusión en agar.
 - Evaluación de la concentración mínima inhibitoria (empleando el método de diluciones seriadas).
 - Evaluación de la concentración mínima fungicida (difusión en agar).

3.3.7. Marcha fitoquímica:

Evaluación cualitativa de los metabolitos secundarios.

Se realizó la evaluación cualitativa del extracto obtenido de las hojas de Guanábana en el laboratorio de cromatografía y espectrometría de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. Se utilizaron reactivos especializados para identificar varios metabolitos, siguiendo los procedimientos descritos por Lock de Ugaz (1993).

- a) **Reacción de Molisch:** Se añaden gotas de la muestra problema junto con gotas de solución de S. R. de Molisch "A" (alfa naftol $\beta\%$ en alcohol), seguido de agitación y la adición de ácido sulfúrico concentrado a lo largo de las paredes del tubo. La reacción se considera positiva cuando se observa la formación de un anillo de color violeta en la interfase, lo que indica la presencia de carbohidratos.
- b) **Reacción de Shinoda:** Si la porción del extracto está disuelta en etanol, se mezclan gotas de la muestra problema con el reactivo de Shinoda, que comprende magnesio y gotas de ácido clorhídrico concentrado. La presencia de un color rojo después de la reacción indica un resultado positivo para

chalconas y auronas, mientras que se considera negativo (-) para catequinas e isoflavonas.

- c) **Reacción de FeCl₃:** Se añadieron gotas de la muestra problema al reactivo de FeCl₃. La presencia de un cambio de color hacia verde-azulado indica un resultado positivo para compuestos fenólicos.
- d) **Reacción de Lieberman - Burchardat:** Se combinaron gotas de la muestra problema con el reactivo de Lieberman-Burchard, compuesto por cloroformo, anhídrido acético y ácido sulfúrico concentrado. La detección de colores verde, azul, naranja o rojo en la zona señala la presencia de esteroides o triterpenoides.
- e) **Reacción de Borntrager:** Se mezclaron gotas de la muestra problema con el reactivo de Borntrager, compuesto por hidróxido de sodio al 5%. La observación de un cambio de color hacia el rojo indica la presencia de naftoquinonas, antronas y antranonas.
- f) **Reacción de Mayer:** Se combinaron gotas de la muestra problema con el reactivo de R. Mayer, que incluye tetrayodomercuriato potásico. La observación de turbidez o la

formación de un precipitado blanco indican un resultado positivo para la presencia de alcaloides.

- g) **Reacción de Dragendorff:** Se mezclaron gotas de la muestra problema con el reactivo Dragendorff, compuesto por tetrayodobismutatopotásico en un medio ligeramente ácido. La detección de un precipitado de color naranja o rojo naranja señala la presencia de alcaloides.
- h) **Reacción de la espuma:** Un gramo de la muestra problema se mezcló con 10 ml de agua destilada y se agitó enérgicamente durante 1 minuto. La presencia de espuma con una altura de 0,5 a 1 cm durante 15 minutos indica la posible presencia de saponinas.
- i) **Reacción de la gelatina:** Se mezcló 1 ml del reactivo de gelatina (1 g de gelatina en 100 ml de agua, 10 g de NaCl) con la muestra problema. La formación de un precipitado denso y blanquecino indica la posible presencia de taninos.
- j) **Agua de bromo:** 2 ml del reactivo de agua de bromo se combinaron con la muestra problema, y la formación de un precipitado indica la presencia de taninos condensados.

(Anexo 10 - Foto)

3.3.8. Estudio Microbiológico

Desarrollo del método

Para analizar la efectividad antifúngica del extracto hidroalcohólico de *Annona muricata*, se realizaron tres procedimientos:

- a) La activación de las cepas micóticas.
- b) La preparación del inóculo.
- c) Las pruebas del efecto antifúngico.
 - Técnica Kirby-Bauer.
 - Determinación de la concentración mínima inhibitoria (utilizando el método de diluciones seriadas).
 - Determinación de la concentración mínima fungicida (mediante la difusión en agar).

A. La activación de las cepas micóticas.

Tabla 2. Activación de *Trichophyton interdigitale* ATCC 9533

<i>Trichophyton interdigitale</i> ATCC 9533	
Medio	Sabouraud Dextrose Emmons Agar
Temperatura	25°C
Atmósfera	Aerobio
Tiempo de crecimiento	7 a 14 días

Tabla 3. Activación de *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404

<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	
Medio	Sabouraud Dextrose Emmons Agar
Temperatura	25°C
Atmósfera	Aerobio
Tiempo de crecimiento	2 a 7 días

- Para activar las cepas, se procedió a su reconstitución mediante la inoculación en medios de cultivo, permitiendo su crecimiento completo. Se utilizaron tres placas para cada especie micótica, *Trichophyton interdigitale* ATCC 9533 y *Aspergillus Brasiliensis* ATCC 16404, utilizando Agar Sabouraud y Agar Mueller Hinton. Estas placas se envolvieron y se incubaron a temperatura ambiente a 25°C, durante 7 y 14 días respectivamente. Se registró desarrollo en las tres placas de Agar Mueller Hinton en ambas situaciones, las cuales se utilizarán en la creación del inóculo. (Anexo 09 - Fotos)
- **Preparación del medio de cultivo Agar Mueller Hinton.**
La preparación del agar Mueller Hinton implica seguir las instrucciones del fabricante y autoclavar a 121°C durante 15 minutos. Después de la autoclave, se permite que el agar se enfríe en un baño María a 45-50°C. Cuando alcanza la temperatura deseada, se vierte en placas Petri estériles para obtener un fondo uniforme de aproximadamente 4 mm, utilizando

alrededor de 25-30 ml para placas de 100 mm de diámetro. El agar Mueller Hinton se deja enfriar a temperatura ambiente, asegurándose de que el pH esté en el rango de 7,2 a 7,4.

Evaluación de la efectividad del extracto hidroalcohólico de *Annona muricata*.

Se examinó la capacidad antifúngica del extracto hidroalcohólico mediante el método de Kirby-Bauer (difusión en disco).

- **Elaboración de los discos para evaluar la sensibilidad.**

Los discos de sensibilidad se prepararon colocándolos en un recipiente con agua destilada para proceder a esterilizarlos y desnaturalizar el antibiótico mediante autoclave (121°C durante 15 minutos). Después de este proceso, se retiró el agua del recipiente, y se llevó el recipiente con los discos a una estufa ajustada a 170°C durante 1 hora, antes de utilizarlos.

La evaluación del efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico se llevó a cabo mediante la técnica de difusión en disco. Por lo cual se impregnaron los discos esterilizados con una cantidad específica de extracto hidroalcohólico. Cada tratamiento se replicó 8 veces.

B. Elaboración del inóculo antifúngico para *Trichophyton interdigitale* ATCC 9533 y *Aspergillus Brasiliensis* ATCC 16404.

Los agentes micóticos empleados en este estudio se cultivaron en frascos con agar Sabouraud al 2% para su mantenimiento. Posteriormente, fueron activados en caldo BHI, y se incubaron a 25 °C durante 7 a 14 días en el caso de *Trichophyton interdigitale* ATCC 9533 y de 2 a 7 días en el caso de *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404. Luego utilizando un vórtex se homogenizó de nuevo las colonias para garantizar su dispersión completa en el caldo BHI. A continuación, se estandarizó mediante la comparación de la turbidez con el tubo 0,5 de la escala de McFarland, que corresponde a una población micótica de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml.

- **Elaboración del inóculo.**

Con un asa de Kolle, se seleccionaron varias colonias con aspecto similar que crecieron en el medio de cultivo, y se transfirieron a un tubo que contenía 10 ml de caldo Mueller Hinton. Se utilizó el método de difusión en disco, que se fundamenta en el método de Kirby-Bauer.

- **Introducción del inóculo en las placas.**

Se añadió 100 µL del inóculo preparado a cada placa y, utilizando un asa de Drigalsky, se distribuyó el inóculo de manera uniforme en toda la superficie de la placa, asegurando un crecimiento homogéneo. Esto se logra deslizando el asa de manera paralela y compacta sobre la placa, cubriendo toda su extensión. Es crucial tener cuidado al sembrar las placas para evitar posibles problemas de lectura.

- **Colocación de los discos en las placas inoculadas. (Kirby Bauer):**

Se empleó la dilución del extracto hidroalcohólico, la cual fue evaporada y luego rehidratada. Posteriormente, se introdujeron los discos de sensibilidad, previamente esterilizados (cuarenta y ocho discos blancos), los cuales se impregnaron con 17,5 µl; 20 µl; 22,5 µl; 25 µl; 27,5 µl y 30 µl de extracto hidroalcohólico durante 10 minutos para asegurar una mejor absorción.

(Anexo 14 - Técnica de Kirby - Bauer)

- **Periodo de incubación:**

Las placas se sometieron a un periodo de incubación a una temperatura de 25 °C, extendiéndose por un lapso de 7 a 14 días en el caso del *Trichophyton interdigitale* y de 2 a 7 días para el

Aspergillus Brasiliensis, con el propósito de observar la formación de halos de inhibición.

- **Análisis de los resultados**

Luego de un periodo de incubación de 7 a 14 días para *Trichophyton interdigitale* y de 2 a 7 días para *Aspergillus Brasiliensis*, se procede a la evaluación de las placas. Se busca que los halos de inhibición presenten una forma circular uniforme y una capa de crecimiento fúngico homogénea. La medida de los halos de inhibición se lleva a cabo en milímetros utilizando un calibrador digital. Los resultados de estas mediciones, llevadas a cabo en tres repeticiones, se promedian y se contrastan con los tamaños de los halos de inhibición producidos por el control positivo (Nistatina).

3.3.9. Evaluación de la concentración más baja que inhibe el crecimiento de los hongos

Se llevó a cabo mediante la observación visual después de 2 a 3 días de incubación, considerando el primer tubo que no mostrara turbidez.

a) Preparación del inóculo micótico de *Trichophyton interdigitale* ATCC 9533 y *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404:

El agente micótico empleado en la investigación fue cultivado en frascos con agar Sabouraud al 2% para su mantenimiento. Posteriormente, las cepas fueron activadas y enriquecidas en caldo BHI (Infusión de cerebro y corazón), donde se homogenizaron las colonias y se mantuvieron en incubación a una temperatura de 25 °C durante un periodo de 2 a 3 días.

b) Elaboración de la solución madre:

Se sometió el extracto hidroalcohólico a un proceso de secado en una placa Petri, utilizando una estufa a una temperatura de 45°C durante tres días. Tras el período especificado, se llevó a cabo un raspado con un bisturí para obtener el principio activo. Se pesaron 1,8 g de dicho principio activo, el cual se hidrató con 2 ml de agua estéril para su aplicación en la concentración mínima inhibitoria (CMI).

c) Elaboración de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para *Trichophyton interdigitale* ATCC 9533 y *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404:

- Se dispusieron quince tubos de ensayo con dimensiones de 15 x 125 mm. destinados al *Trichophyton interdigitale* ATCC 9533, a los cuales se les incorporó lo siguiente:
(Tabla N°4)

Tabla 4. Preparación de las cantidades necesarias para llevar a cabo la concentración mínima inhibitoria.

<i>Trichophyton interdigitale</i>				
Tubo	V (µl)	V final (µl)	Vol. caldo BHI (µl)	V total (3000 µl o 3ml)
1	10	30	2670	3000
2	10,83	32,49	2667,51	3000
3	11,67	35,01	2664,99	3000
4	12,5	37,5	2662,5	3000
5	13,33	39,99	2660,01	3000
6	14,17	42,51	2657,49	3000
7	15	45	2655	3000
8	15,83	47,49	2652,51	3000
9	16,67	50,01	2649,99	3000
10	17,5	52,5	2647,5	3000
11	18,33	54,99	2645,01	3000
12	19,17	57,51	2642,49	3000
13	20	60	2640	3000
Positivo			2700	3000
Negativo			3000	3000

LEYENDA	
V	Volumen inicial del extracto seco disuelto en agua estéril
V final	Volumen final del extracto seco disuelto en agua estéril
Vol. caldo BHI	Volumen caldo de Brain Heart Infusion
V total	Volumen total
µl	Microlitro
ml	Mililitro

Fuente: Elaboración propia

- Se dispusieron de 15 tubos de ensayo destinados al *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, a los cuales se les añadió lo siguiente:
(Tabla N°5)

Tabla 5. Preparación de las cantidades requeridas para la realización de la concentración mínima inhibitoria (CMI).

<i>Aspergillus brasiliensis</i>				
Tubo	V (µl)	V final (µl)	Vol. caldo BHI(µl)	V total (3000 µl o 3ml)
1	7	21,00	2679	3000
2	8,17	24,51	2675,49	3000
3	9,33	27,99	2672,01	3000
4	10,5	31,50	2668,5	3000
5	11,67	35,01	2664,99	3000
6	12,83	38,49	2661,51	3000
7	14	42,00	2658	3000
8	15,17	45,51	2654,49	3000
9	16,33	48,99	2651,01	3000
10	17,5	52,50	2647,5	3000
11	18,67	56,01	2643,99	3000
12	19,83	59,49	2640,51	3000
13	21	63,00	2637	3000
Positivo			2700	3000
Negativo			3000	3000

LEYENDA	
V	Volumen inicial del extracto seco disuelto en agua estéril
V final	Volumen final del extracto seco disuelto en agua estéril
Vol. caldo BHI	Volumen de caldo de Brain Heart Infusion
V total	Volumen total
μl	Microlitro
ml	Mililitro

Fuente: Elaboración propia

- Las concentraciones finales experimentaron variaciones; por ejemplo, el primer tubo de *Trichophyton interdigitale* ATCC 9533, que inicialmente tenía una concentración de 9 mg, se incrementó a 27 mg mediante la siguiente operación:

$$9 \text{ mg/ml (3)} = 27 \text{ mg/ml}$$

- Posteriormente, esta concentración fue diluida en 3,000 μl, resultando en una concentración final de 27 mg para el cálculo de la concentración mínima inhibitoria.
- Ese proceso se siguió con los tubos restantes obteniéndose la siguiente concentración del extracto hidroalcohólico de *Annona muricata*. (Tabla N°6)

Tabla 6. Elaboración de la concentración mínima inhibitoria para *Trichophyton interdigitale* ATCC 9533.

<i>Trichophyton interdigitale</i>							
Tubo	V (µl)	V final (µl)	[I] (mg/ml)	[F] (mg/ml)	Vol. caldo BHI (µl)	10% de hongos (300 µl)	V total (3000 µl o 3ml)
1	10	30	9	27,00	2670	300	3000
2	10,83	32,49	9,75	29,24	2667,51	300	3000
3	11,67	35,01	10,50	31,51	2664,99	300	3000
4	12,5	37,5	11,25	33,75	2662,5	300	3000
5	13,33	39,99	12,00	35,99	2660,01	300	3000
6	14,17	42,51	12,75	38,26	2657,49	300	3000
7	15	45	13,50	40,50	2655	300	3000
8	15,83	47,49	14,25	42,74	2652,51	300	3000
9	16,67	50,01	15,00	45,01	2649,99	300	3000
10	17,5	52,5	15,75	47,25	2647,5	300	3000
11	18,33	54,99	16,50	49,49	2645,01	300	3000
12	19,17	57,51	17,25	51,76	2642,49	300	3000
13	20	60	18,00	54,00	2640	300	3000
Positivo					2700	300	3000
Negativo					3000		3000

LEYENDA	
V	Volumen inicial del extracto seco disuelto en agua estéril
V final	Volumen final del extracto seco disuelto en agua estéril
Vol. caldo BHI	Volumen caldo de Brain Heart Infusion
[I]	Concentración inicial
[F]	Concentración final
mg	Miligramo
V total	Volumen total
10% de hongos	300 µl de <i>Trichophyton interdigitale</i>
µl	Microlitro
ml	Mililitro

Fuente: Elaboración propia

- Las concentraciones finales experimentaron variaciones; por ejemplo, el primer tubo de *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, incrementó su concentración de 6,3 mg/ml a 18,90 mg/ml mediante el siguiente cálculo.

$$6,3 \text{ mg/ml} (3) = 18,90 \text{ mg/ml}$$

Esta concentración se diluyó en 3,000 µl, dando como resultado una concentración final de 18,90 mg/ml para el cálculo de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).

Ese procedimiento se repitió con los tubos restantes, generando así las siguientes concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Annona muricata* (Tabla N°7).

Tabla 7. Elaboración de la concentración mínima inhibitoria para *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404.

<i>Aspergillus brasiliensis</i>							
Tubo	V (µl)	V final (µl)	[I] (mg/ml)	[F] (mg/ml)	Vol. caldo BHI (µl)	10% de hongos (300 µl)	V total (3000 µl o 3ml)
1	7	21,00	6,3	18,90	2679	300	3000
2	8,17	24,51	7,35	22,05	2675,49	300	3000
3	9,33	27,99	8,4	25,20	2672,01	300	3000
4	10,5	31,50	9,45	28,35	2668,5	300	3000
5	11,67	35,01	10,5	31,50	2664,99	300	3000
6	12,83	38,49	11,55	34,65	2661,51	300	3000
7	14	42,00	12,6	37,80	2658	300	3000
8	15,17	45,51	13,65	40,95	2654,49	300	3000
9	16,33	48,99	14,7	44,10	2651,01	300	3000
10	17,5	52,50	15,75	47,25	2647,5	300	3000
11	18,67	56,01	16,8	50,40	2643,99	300	3000
12	19,83	59,49	17,85	53,55	2640,51	300	3000
13	21	63,00	18,9	56,70	2637	300	3000
Positivo					2700	300	3000
Negativo					3000		3000

LEYENDA	
V	Volumen inicial del extracto seco disuelto en agua estéril
V final	Volumen final del extracto seco disuelto en agua estéril
Vol. caldo BHI	Volumen caldo de Brain Heart Infusion
[I]	Concentración inicial
[F]	Concentración final
mg	Miligramo
V total	Volumen total
10% de hongos	300 µl de <i>Aspergillus brasiliensis</i>
µl	Microlitro
ml	Mililitro

Fuente: Elaboración propia

d) Incubación

El *Trichophyton interdigitale* ATCC 9533 fue incubado durante 7 a 14 días a 25°C. Se llevaron a cabo comparaciones entre los distintos tratamientos y los siguientes controles: Control positivo (2700 µl de caldo BHI + 300 µl de solución micótica) y Control negativo (3000 µl de caldo BHI).

El *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 fue incubado durante 2 a 7 días a 25°C. Se llevaron a cabo comparaciones entre los distintos tratamientos y los siguientes controles: Control positivo (2700 µl de caldo BHI + 300 µl de solución fúngica) y Control negativo (3000 µl de caldo BHI).

e) Lectura:

***Trichophyton interdigitale* ATCC 9533**

Después de transcurrir un período de 7 a 14 días, se verifica la presencia de turbidez en los tubos, indicativa del crecimiento fúngico. El tubo de ensayo sin turbidez se considera como la concentración mínima inhibitoria (CMI), equivalente al control negativo.

***Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404**

Luego de un período de 2 a 7 días, se analiza la turbidez de los tubos de ensayo como un indicador del crecimiento micótico. Aquellos tubos que no muestren turbidez indican la ausencia de desarrollo micótico, equiparándose al control negativo, y se determinan como la concentración mínima inhibitoria (CMI).

3.3.10. Evaluación de la concentración mínima fungicida (CMF)

Para el caso del ***Trichophyton interdigitale* ATCC 9533:**

Los tubos libres de turbidez (Tubo 07, Tubo 08 y Tubo 09) fueron seleccionados, y se extrajeron 100 µl de solución de cada uno para sembrar mediante diseminación en placas de agar de Mueller Hinton. Estas placas fueron incubadas a 25 °C durante 7 días, y posteriormente se llevó a cabo el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) para cada concentración del extracto hidroalcohólico.

Para el caso del ***Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404:**

Se eligieron los tubos que no presentaban turbidez (Tubo 05, Tubo 06 y Tubo 07), y se extrajeron 100 µl de solución de cada uno para sembrar mediante diseminación en placas de agar de Mueller Hinton. Estas placas fueron incubadas a 25 °C durante 4 días, y después de este periodo, se

procedió al conteo de unidades formadoras de colonias (UFC), obteniendo así un recuento para cada concentración del extracto hidroalcohólico.

3.4. ANÁLISIS DE DATOS

Se llevó a cabo el análisis de datos relacionados con las variables de investigación utilizando el software estadístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versión 29.0 para Windows.

Se utilizó estadística descriptiva para evaluar el efecto antimicótico "in vitro" del extracto hidroalcohólico de Guanábana en *Trichophyton interdigitale* ATCC 9533 y *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404. Se aplicaron pruebas de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk a los datos y los resultados se presentaron en tablas junto con representaciones gráficas correspondientes.

Adicionalmente, se llevaron a cabo pruebas de hipótesis para contrastar los halos de inhibición y la capacidad inhibitoria entre las distintas concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Annona muricata* sobre los hongos analizados. Se consideraron las medidas numéricas de los halos de inhibición (en milímetros) y la capacidad inhibitoria (en mg/ml), y se examinó la aplicabilidad de la prueba T para una muestra de un solo factor, utilizando la concentración del

extracto hidroalcohólico como el factor de interés (cada concentración una categoría: 15,75 mg/ml; 18 mg/ml; 20,25 mg/ml; 22,5 mg/ml; 24,75 mg/ml y 27 mg/ml).

Se realizaron todos los análisis estadísticos con un nivel de significancia establecido en 0,05 mediante el método de difusión en disco, según lo descrito por DURAFFOURD y LAPRAZ en 1983, aplicado a los hongos objeto de estudio.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

Se llevó a cabo un análisis exhaustivo de la composición fitoquímica del extracto hidroalcohólico de *Annona muricata*, conocida como "Guanábana", mediante técnicas como Marcha Fitoquímica y Perfil de compuestos Fenólicos. Posteriormente, se realizó un estudio "*in vitro*" para evaluar la actividad antifúngica del extracto hidroalcohólico de *Annona muricata* frente a dos agentes micóticos, *Trichophyton interdigitale* ATCC 9533 y *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404. El experimento comprendió 8 tratamientos con 48 repeticiones para cada agente micótico. Además, se determinaron la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima fungicida (CMF) de *Trichophyton interdigitale* ATCC 9533 y *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 en respuesta al extracto hidroalcohólico de *Annona muricata*.

Los resultados de las diversas pruebas se han estructurado en tablas y gráficos para simplificar su interpretación. Se implementó un diseño completamente aleatorio, dado que se trata de una disposición simple y al azar, apropiada para procedimientos y técnicas de laboratorio.

Tabla 8. Análisis fitoquímico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Annona muricata* "Guanábana".

Metabolito	Extracto alcohólico de las hojas de <i>Annona muricata</i>
Compuestos Fenólicos	+++
Flavonoides	+++
Alcaloides	-
Triterpenos y Esteroides	+
Saponinas	-
Taninos	-
Quinonas	-
Lactonas y Cumarinas	+

Leyenda	
Abundante	+++
Poco	++
Muy Poco	+
Ausente	-

Fuente: Elaboración propia

Interpretación:

La tabla 8, muestra los resultados de la marcha fitoquímica, donde se emplearon reacciones de coloración y precipitación, como tricloruro de hierro, gelatina, Shinoda, Dragendorff, Mayer, Borntranger y espuma persistente. Se identificaron metabolitos como compuestos fenólicos, taninos y flavonoides. No obstante, no se evidenció la presencia inicial de metabolitos como antraquinonas y saponinas. (Anexo 10 y 11)

Tabla 9. Perfil de compuestos Fenólicos del extracto hidroalcohólico de las hojas de Guanábana.

Análisis por HPLC perfil de compuestos Fenólicos					
Muestra		Repeticiones			Promedio
		1	2	3	Compuestos Fenólicos Totales µg/mL de extracto
Extracto Etanolico de	hojas de Guanábana	906,75269	904,4676	896,7827	902,7

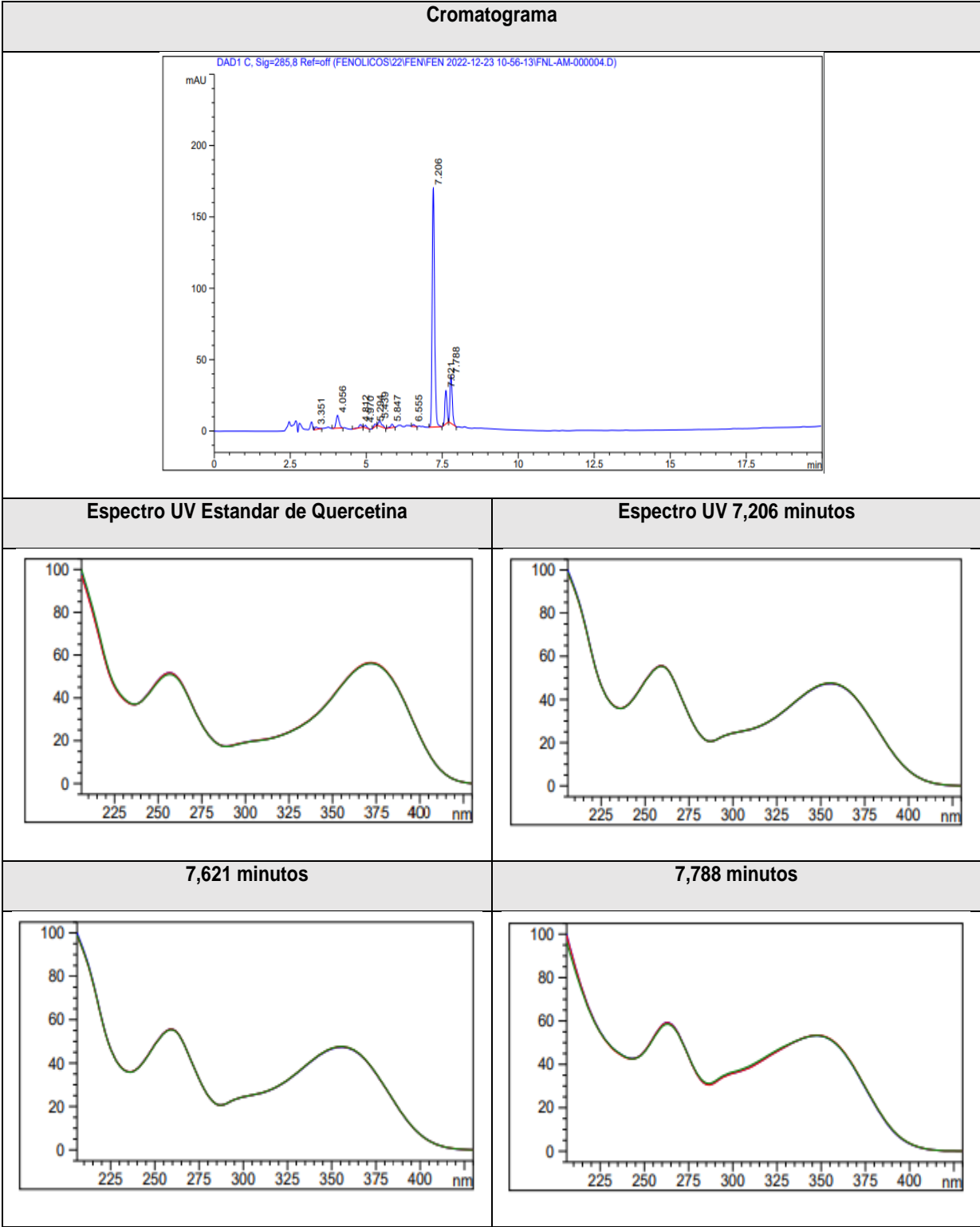


Grafico 1. Cromatograma

Interpretación:

Se identificaron un total de 11 compuestos, y los picos con tiempos de retención de 7,206, 7,621 y 7,788 minutos (consulte el cromatograma) se asemejan a derivados de la Quercetina, según el análisis del espectro UV. La cantidad de estos compuestos se determinó mediante una curva de calibración utilizando un estándar de Quercetina. La cantidad total de los compuestos identificados se indica en microgramos de equivalente de quercetina por mililitro de extracto. (Anexo 12)

Tabla 10. Evaluación de la actividad antifúngica del extracto hidroalcohólico de Guanábana contra *Trichophyton interdigitale* ATCC 9533 utilizando la técnica de Kirby-Bauer.

Nº de Halos	Diámetros de halos de <i>Trichophyton interdigitale</i> (mm)					
Halo 01	18,3	22,87	21,91	31,34	34,21	38
Halo 02	12,32	17,44	25,41	28,59	34,62	35,44
Halo 03	8,87	21,3	24,38	28,2	34,69	35,44
Halo 04	16,4	21,59	27,39	27,91	38,2	36,25
Halo 05	15,74	21,24	28,07	28,46	38,79	26,18
Halo 06	15,85	19,74	23,81	27,97	35,2	39,53
Halo 07	14,19	18,93	27,17	30,37	37,75	37,65
Halo 08	16,92	21,64	23,29	32,49	37,75	38,01
Promedio	14,82375	20,59375	25,17875	29,41625	36,40125	35,8125
Volumen (µl)	Disco de 17,5 µl	Disco de 20 µl	Disco de 22,5 µl	Disco de 25 µl	Disco de 27,5 µl	Disco de 30 µl
Concentración(mg/ml)	C= 15,75	C= 18	C= 20,25	C= 22,5	C= 24,75	C= 27

LEYENDA	
C	Concentración
mm	Milímetros
µl	Microlitros
ml	Mililitro

Fuente: Elaboración propia (Anexo 14 y 15)

Interpretación:

En la tabla 10, se presentan las medias de los halos de inhibición producidos por las diversas concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Annona muricata* "Guanábana" frente a *Trichophyton interdigitale* ATCC 9533, empleando la técnica de Kirby-Bauer. Los resultados indican que la concentración más alta; 24,75 mg/ml, muestra un diámetro promedio de halo de inhibición de 36,40125 mm, mientras que la concentración más baja; 15,75 mg/ml, genera un halo de inhibición de 14,82375 mm.

Grafico 2. Se presentan los promedios de los halos de inhibición generados por el extracto hidroalcohólico de Guanábana frente a *Trichophyton interdigitale* ATCC 9533, indicando la distribución de los resultados.

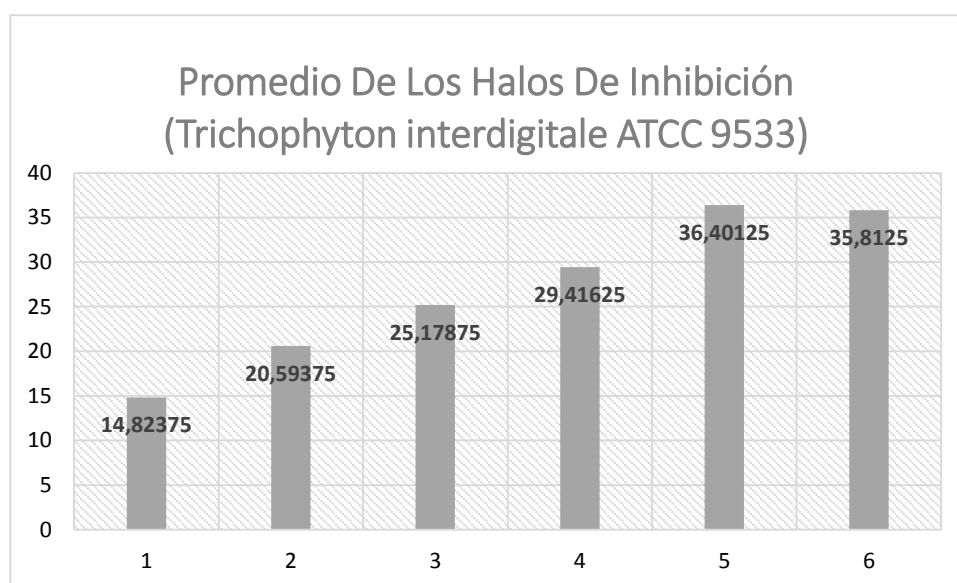


Tabla 11. Evaluación de la sensibilidad de *Trichophyton interdigitale* ATCC 9533 ante diversas concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Annona muricata* "Guanábana".

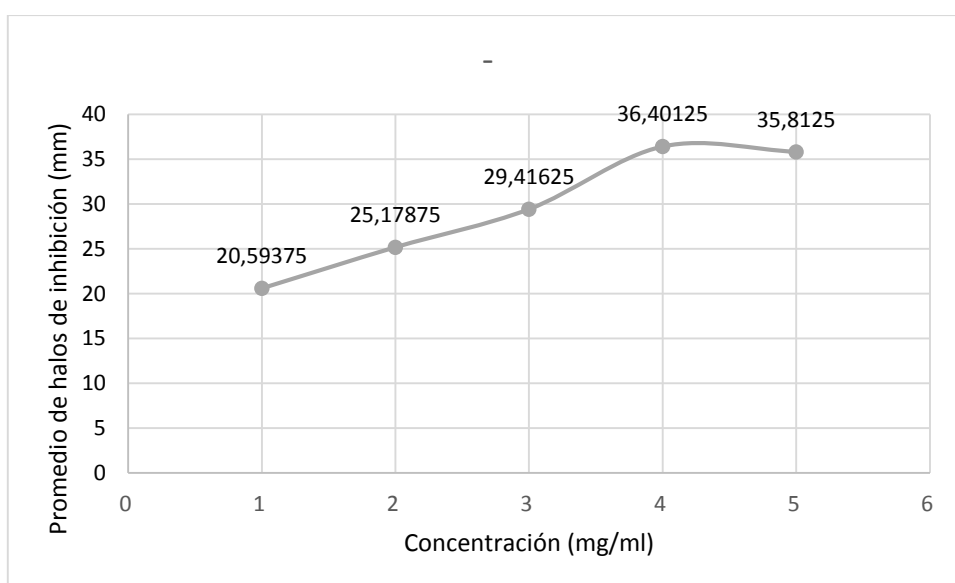
Extracto hidroalcohólico		Grado de sensibilidad		
Volumen(ul)	C(mg/ml)	Sensibilidad límite 9-14mm (Sensible=+)	Sensibilidad media 15-19mm (muy sensible=++)	Sumamente sensible 20mm a más (S.S.=+++)
17,5	15,75	-	14,82375	-
20	18	-	-	20,59375
22,5	20,25	-	-	25,17875
25	22,5	-	-	29,41625
27,5	24,75	-	-	36,40125
30	27	-	-	35,8125

Fuente: Elaboración propia

Interpretación:

En la tabla 11, la sensibilidad de *Trichophyton interdigitale* ATCC 9533 se determinó mediante la evaluación de los promedios de los halos de inhibición, de acuerdo con la escala de Duraffourd y Lapraz. En todas las concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Annona muricata*, los halos de inhibición superan los 20,0 mm, excepto en un caso en el primer volumen, indicando una sensibilidad globalmente alta de *Trichophyton interdigitale* ATCC 9533 a las distintas concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Annona muricata*.

Grafico 3. Representación visual del nivel de sensibilidad de *Trichophyton interdigitale* ATCC 9533 a diversas concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Annona muricata* "Guanábana", siguiendo la escala de Duraffourd y Lapraz.



Fuente: Gráfico obtenido de la tabla 11

En el Gráfico 3, en resumen, se muestra la sensibilidad promedio de los halos de inhibición utilizando la escala de Duraffourd y Lapraz. En todas las concentraciones evaluadas del extracto hidroalcohólico de *Annona muricata* "Guanábana", se observaron halos de inhibición que superaron los 20 mm, indicando que son sumamente sensibles según la clasificación establecida.

Tabla 12. Se presentan los resultados de la evaluación de la actividad antifúngica del extracto hidroalcohólico de Guanábana frente a *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 mediante la técnica de Kirby Bauer.

Nº de Halos	Diámetros de halos de <i>Aspergillus brasiliensis</i> (mm)					
Halo 01	26,3	30,3	34,3	38,3	46	50,93
Halo 02	26,6	30,6	34,6	38,6	42,6	54,7
Halo 03	26,25	30,25	34,25	38,25	42,25	50,42
Halo 04	26,3	30,3	34,3	38,3	42,3	46,3
Halo 05	26,4	30,4	34,4	38,4	42,4	46,4
Halo 06	26,5	30,5	34,5	38,5	42,5	46,5
Halo 07	26,7	30,7	34,7	38,7	42,7	46,7
Halo 08	26,8	30,8	34,8	38,8	42,8	46,8
Promedio	26,48125	30,48125	34,48125	38,48125	42,94375	48,59375
Volumen (µl)	Disco de 17,5 µl	Disco de 20 µl	Disco de 22,5 µl	Disco de 25 µl	Disco de 27,5 µl	Disco de 30 µl
Concentración(mg/ml)	C= 15,75	C= 18	C= 20,25	C= 22,5	C= 24,75	C= 27

Fuente: Elaboración propia (Anexo 14 y 16)

Interpretación:

En la tabla 12, los valores promedio de los halos de inhibición generados por las diversas concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Annona muricata* "Guanábana" frente a *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 se presentan mediante la técnica de Kirby Bauer. Los resultados indican que la concentración de 27 mg/ml exhibió el diámetro de halo de inhibición más extenso, con un promedio de 48,59375 mm. En contraste, la concentración más baja de 15,75 mg/ml produjo un halo de inhibición de 26,48125 mm.

Grafico 4. Distribución de las medias de halos de inhibición en base al extracto hidroalcohólico de Guanábana frente a *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404.

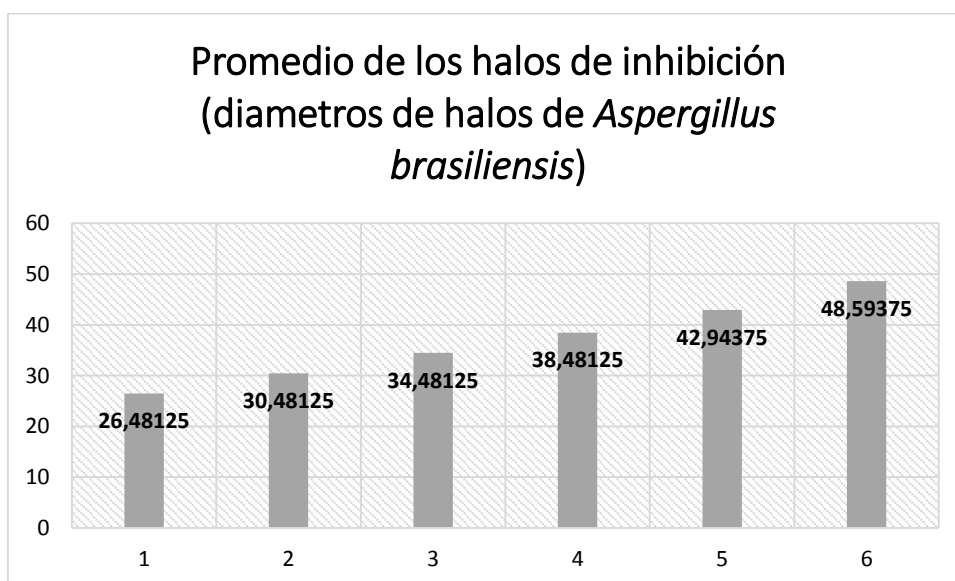


Tabla 13. Se evaluó el grado de sensibilidad de *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 a distintas concentraciones del extracto hidroalcohólico de Guanábana.

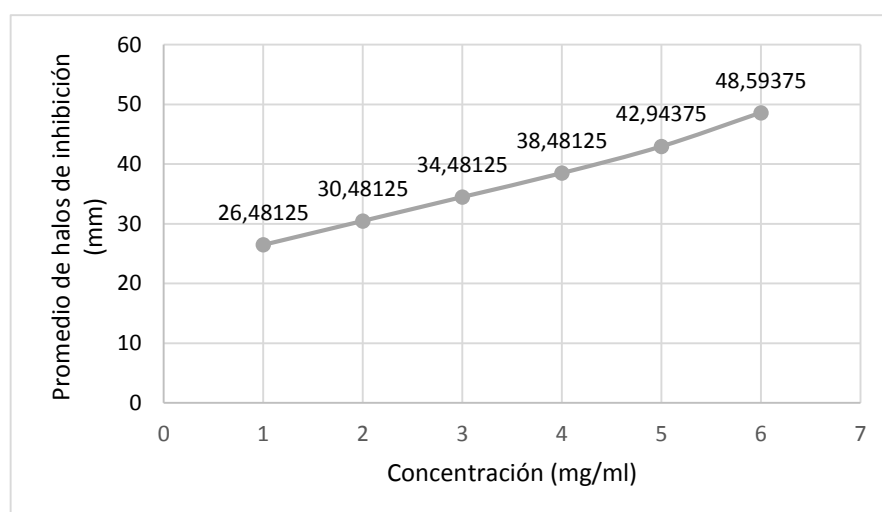
Extracto hidroalcohólico		Grado de sensibilidad			
Volumen(ul)	C(mg/ml)	Sensibilidad límite 9-14mmm (Sensible=+)	Sensibilidad media 15-19mmm (muy sensible=++)	Sumamente sensible (S.S.=+++)	Sensibilidad a más
17,5	15,75	-	-	26,48125	
20	18	-	-	30,48125	
22,5	20,25	-	-	34,48125	
25	22,5	-	-	38,48125	
27,5	24,75	-	-	42,94375	
30	27	-	-	48,59375	

Fuente: Elaboración propia

Interpretación:

En la Tabla 13, se evaluó la sensibilidad de *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 ante las distintas concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Annona muricata* "Guanábana" mediante la escala de Duraffourd y Lapraz. Los resultados indican que en todas las concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Annona muricata* "Guanábana" se obtuvieron halos de inhibición mayores a 20,0 mm. Esto sugiere que *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 es altamente sensible a las diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Annona muricata* "Guanábana".

Grafico 5. Se presenta una representación gráfica que muestra el grado de sensibilidad de *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 a diversas concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Annona muricata*. "Guanábana".



Fuente: Gráfico obtenido de la tabla 13

Interpretación:

En el Gráfico 5, se exhibe el promedio de sensibilidad de los halos de inhibición según la escala de Duraffourd y Lapraz. En resumen, se puede afirmar que todas las concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Annona muricata* "Guanábana" generaron halos de inhibición superiores a 20 mm, indicando que se consideran sumamente sensibles. La sensibilidad

promedio de los halos de inhibición de acuerdo con la escala de Duraffourd y Lapraz, se puede afirmar que todas las concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Annona muricata* "guanábana" presentaron halos de inhibición mayores a 20 mm, lo que indica que se clasifican como sumamente sensibles.

Evaluación estadística de la prueba de sensibilidad antifúngica:

Tabla 14. Efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Annona muricata* contra *Trichophyton interdigitale*

N° de Halos	Diámetros de los halos de <i>Trichophyton interdigitale</i> (mm)					
Halo 01	18,3	22,87	21,91	31,34	34,21	38
Halo 02	12,32	17,44	25,41	28,59	34,62	35,44
Halo 03	8,87	21,3	24,38	28,2	34,69	35,44
Halo 04	16,4	21,59	27,39	27,91	38,2	36,25
Halo 05	15,74	21,24	28,07	28,46	38,79	26,18
Halo 06	15,85	19,74	23,81	27,97	35,2	39,53
Halo 07	14,19	18,93	27,17	30,37	37,75	37,65
Halo 08	16,92	21,64	23,29	32,49	37,75	38,01
PROMEDIO	14,82375	20,59375	25,17875	29,41625	36,40125	35,8125
VOLUMEN (µl)	Disco de 17,5 µl	Disco de 20 µl	Disco de 22,5 µl	Disco de 25 µl	Disco de 27,5 µl	Disco de 30 µl
CONCENTRACION (mg/ml)	C= 15,75	C= 18	C= 20,25	C= 22,5	C= 24,75	C= 27

Fuente: Elaboración propia (Anexo 14 y 15).

Pruebas de normalidad						
	Kolmogorov-Smirnova			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Diámetro de halos frente a <i>Trichophyton interdigitale</i>	0,120	48	0,081	0,954	48	0,059
a. Corrección de significación de Lilliefors						

Interpretación:

El valor de significancia en la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov es mayor a 0,05, indicando que los datos de los diámetros de los halos de inhibición ante *Trichophyton interdigitale* siguen una distribución normal. Esto permite el uso de estadísticas paramétricas en el análisis.

De acuerdo con Duraffourd y Lapraz (1983), se clasifica como sensible la susceptibilidad de un microorganismo ante un extracto alcohólico cuando el diámetro de inhibición supera los 14 mm, entonces.

PLANTEAMIENTO DE LA HIPOTESIS

Ho: $\mu < 14\text{mm}$; $P > 0,05$

Hi: $\mu > 14\text{mm}$; $P < 0,05$

Prueba T para una muestra							
	Valor de prueba = 14						
	t	gl	Significación		Diferencia de medias	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
			P de un factor	P de dos factores		Inferior	Superior
Diámetro de halos frente a <i>T. interdigitale</i>	10,945	47	<,001	<,001	13,037708	10,64137	15,43405

Interpretación:

Con un valor de $P < 0,05$ (0,001), se respalda la hipótesis alternativa, indicando que los diámetros de los halos de inhibición evidencian susceptibilidad al enfrentar el extracto hidroalcohólico de la guanábana contra *Trichophyton interdigitale*. En consecuencia, se concluye que el extracto hidroalcohólico de la guanábana posee efecto antimicótico.

Examen estadístico de la evaluación de la sensibilidad antifúngica:

Tabla 15. Efecto antimicótico del extracto hidroalcohólico de las hojas de Guanábana sobre *Aspergillus brasiliensis*

N° de Halos	Diámetros de los halos de <i>Aspergillus brasiliensis</i> (mm)					
Halo 01	26,3	30,3	34,3	38,3	46	50,93
Halo 02	26,6	30,6	34,6	38,6	42,6	54,7
Halo 03	26,25	30,25	34,25	38,25	42,25	50,42
Halo 04	26,3	30,3	34,3	38,3	42,3	46,3
Halo 05	26,4	30,4	34,4	38,4	42,4	46,4
Halo 06	26,5	30,5	34,5	38,5	42,5	46,5
Halo 07	26,7	30,7	34,7	38,7	42,7	46,7
Halo 08	26,8	30,8	34,8	38,8	42,8	46,8
PROMEDIO	26,48125	30,48125	34,48125	38,48125	42,94375	48,59375
VOLUMEN (µl)	Disco de 17,5 µl	Disco de 20 µl	Disco de 22,5 µl	Disco de 25 µl	Disco de 27,5 µl	Disco de 30 µl
CONCENTRACION (mg/ml)	C= 15,75	C= 18	C= 20,25	C= 22,5	C= 24,75	C= 27

Fuente: Elaboración propia (Anexo 14 y 16)

Pruebas de normalidad						
	Kolmogorov-Smirnova			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Diámetro de halos frente <i>Aspergillus brasiliensis</i>	0,122	48	0,071	0,948	48	0,032
a. Corrección de significación de Lilliefors						

Interpretación:

Según los resultados de la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov, donde se obtuvo un valor de significancia mayor a 0,05 (0,071), se concluye que los datos de los diámetros de los halos de inhibición frente a *Aspergillus brasiliensis* presentan una distribución normal. Por lo tanto, se puede utilizar estadística paramétrica en el análisis de estos datos.

De acuerdo con las indicaciones de Duraffourd y Lapraz (1983), la sensibilidad de un microorganismo ante un extracto alcohólico se establece como sensible si el diámetro de inhibición supera los 14 mm, entonces.

PLANTEAMIENTO DE LA HIPOTESIS

Ho: $\mu < 14\text{mm}$; P > 0,05

Hi: $\mu > 14\text{mm}$; P < 0,05

Prueba T para una muestra							
	Valor de prueba = 14						
	t	gl	Significación		Diferencia de medias	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
			P de un factor	P de dos factores		Inferior	Superior
Diámetro de halos frente <i>Aspergillus brasiliensis</i>	20,825	47	<,001	<,001	22,91042	20,6972	25,1236

Interpretación:

El análisis estadístico revela un valor de $P < 0,05$ (0,001), lo que conduce a la aceptación de la hipótesis alternativa. Esto indica que los diámetros de los halos de inhibición indican susceptibilidad al enfrentar el extracto hidroalcohólico de la guanábana ante *Aspergillus brasiliensis*. En consecuencia, se puede concluir que el extracto hidroalcohólico de la guanábana presenta un efecto antimicótico.

Examen estadístico de la prueba para establecer la Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Tabla 16. Evaluación para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto hidroalcohólico de la guanábana frente a *Trichophyton interdigitale*

<i>Trichophyton interdigitale</i>							
Tubo	V (µl)	V final (mg)	[I] (mg/ml)	[F] (mg/ml)	Vol. caldo BHI (µl)	10% de hongos (300 µl)	V total (3000 µl o 3ml)
1	10	30	9	27,00	2670	300	3000
2	10,83	32,49	9,75	29,24	2667,51	300	3000
3	11,67	35,01	10,50	31,51	2664,99	300	3000
4	12,5	37,5	11,25	33,75	266,5	300	3000
5	13,33	39,99	12,00	35,99	2660,01	300	3000
6	14,17	42,51	12,75	38,26	2657,49	300	3000
CMI	15	45	13,50	40,50	2655	300	3000
8	15,83	47,49	14,25	42,74	2652,51	300	3000
CMF	16,67	50,01	15,00	45,01	2649,99	300	3000
10	17,5	52,5	15,75	47,25	264,5	300	3000
11	18,33	54,99	16,50	49,49	2645,01	300	3000
12	19,17	57,51	17,25	51,76	2642,49	300	3000
13	20	60	18,00	54,00	2640	300	3000
Positivo					2700	300	3000
Negativo					3000		3000

Fuente: Elaboración propia (Anexo 17)

LEYENDA	
V	Volumen inicial del extracto seco disuelto en agua estéril
V final	Volumen final del extracto seco disuelto en agua estéril
Vol. caldo BHI	Volumen caldo de Brain Heart Infusion
V total	Volumen total
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CMF	Concentración mínima fungicida
µl	Microlitro
ml	Millilitro

Pruebas de normalidad						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Conc. de Extracto hidroalcohólico	0,087	13	0,200*	0,966	13	0,837
*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.						
a. Corrección de significación de Lilliefors						

Interpretación:

Según se visualiza en la tabla de pruebas de normalidad, los valores de P registrados para los dos estadísticos son mayores de 0,05, por lo que podemos decir que los valores de las concentraciones para determinar el CMI frente a *Trichophyton interdigitale* tienen una distribución normal, ósea que existe simetría entre los datos reportados. Dando como CMI 40, 5 mg/ml y un CMF de 45,01 mg/ml.

Evaluación estadística del experimento para determinar la concentración mínima inhibitoria:

Tabla 17. Estimación de la concentración mínima inhibitoria del extracto hidroalcohólico de la Guanábana contra *Aspergillus brasiliensis*.

<i>Aspergillus brasiliensis</i>							
Tubo	V (µl)	V final (mg)	[I] (mg/ml)	[F] (mg/ml)	Vol. caldo BHI(µl)	10% de hongos (300 µl)	V total (3000 µl o 3ml)
1	7	21,00	6,3	18,90	2679	300	3000
2	8,17	24,51	7,35	22,05	2675,49	300	3000
3	9,33	27,99	8,4	25,20	2672,01	300	3000
4	10,5	31,50	9,45	28,35	2668,5	300	3000
CMI y CMF	11,67	35,01	10,5	31,50	2664,99	300	3000
6	12,83	38,49	11,55	34,65	2661,51	300	3000
7	14	42,00	12,6	37,80	2658	300	3000
8	15,17	45,51	13,65	40,95	2654,49	300	3000
9	16,33	48,99	14,7	44,10	2651,01	300	3000
10	17,5	52,50	15,75	47,25	2647,5	300	3000
11	18,67	56,01	16,8	50,40	2643,99	300	3000
12	19,83	59,49	17,85	53,55	2640,51	300	3000
13	21	63,00	18,9	56,70	2637	300	3000
Positivo					2700	300	3000
Negativo					3000		3000

Fuente: Elaboración propia (Anexo 19 - Fotos)

LEYENDA	
V	Volumen inicial del extracto seco disuelto en agua estéril
V final	Volumen final del extracto seco disuelto en agua estéril
Vol. caldo BHI	Volumen caldo de Brain Heart Infusion
V total	Volumen total
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CMF	Concentración mínima fungicida
µl	Microlitro
ml	Mililitro

Interpretación:

Según se observa en la tabla de pruebas de normalidad, los valores de P registrados para los dos estadísticos son mayores de 0,05, por lo que podemos decir que los valores de las concentraciones para determinar el CMI frente a *Aspergillus brasiliensis* tienen una distribución normal, ósea que existe simetría entre los datos reportados. Dando como CMI 31,50 mg/ml y como CMF 31,50 mg/ml.

Pruebas de normalidad						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Conc. de Extracto hidroalcohólico	0,087	13	0,200*	0,966	13	0,837
*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.						
a. Corrección de significación de Lilliefors						

DISCUSIÓN

La diversidad de moléculas bioactivas que ofrece la naturaleza puede funcionar como un punto inicial para la elaboración de nuevos tratamientos médicos destinados a resolver diversas afecciones de salud. El propósito de esta investigación fue encontrar nuevas opciones a los medicamentos antimicóticos que sean más efectivos en un rango más amplio y generen menos efectos secundarios.

En la tabla 8, los resultados del estudio muestran la composición fitoquímica del extracto etanólico de *Annona muricata*, también conocida como "Guanábana", identificándose la presencia de metabolitos como compuestos fenólicos y flavonoides. La composición de metabolitos secundarios mencionada es consistente con lo informado por Urbano Palomino, Silveria (15), en el año 2022 , quien también identificó compuestos fenólicos y flavonoides en el extracto etanólico de las hojas de *Annona muricata*. Así también en los trabajos de Isabelle A Appoline, et al,(10) en el año 2021, Dueñas Cely, et al, (12) en el año 2019 y Oluguiro JAO , et al, (13), en el año 2017, se detectó la presencia de diversos metabolitos, entre los cuales se incluyen compuestos fenólicos, flavonoides, triterpenos, esteroides, lactonas, cumarinas y otros.

En la tabla 10 y 12, se empleó el método de difusión mediante discos (técnica de Kirby Bauer) ello es acorde al trabajo realizado por Zainab M. Alzubaidy, et al (8) , en el año 2022, el propósito de este estudio fue evaluar las propiedades antibacterianas de extractos acuosos y alcohólicos obtenidos de las cáscaras y pulpa de *A. muricata* contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, utilizando la prueba de difusión en pozo estándar.

En la tabla 10, se muestran los resultados de la actividad antifúngica manifestada por la solución hidroalcohólica obtenida de las hojas de *Annona muricata*, también conocida como "Guanábana", ante la cepa *Trichophyton interdigitale* ATCC 9533. Se nota que los diámetros de los halos con la concentración más baja del extracto promediaron 14,82375 mm, mientras que aquellos con la concentración más alta mostraron un diámetro de inhibición promedio de 35,8125 mm. Algunos estudios previos indican que la *Annona muricata*, objeto de esta investigación, presenta propiedades antifúngicas, según los hallazgos de investigaciones anteriores, como la llevada a cabo por Barreto Gavelan, Mary Lina (17), en el año 2019, los investigadores que realizaron el estudio para evaluar los efectos antifúngicos *in vitro* del aceite esencial de *Annona muricata* en concentraciones del 5 %, 10 % y 15 % frente a *Candida albicans*, informaron sobre la destacada actividad del extracto.

En la tabla 12, los resultados muestran la actividad antifúngica de la solución hidroalcohólica obtenida de las hojas de *Annona muricata*, también conocida como "Guanábana", frente a la cepa *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404. Se destaca que los halos de inhibición promedio fueron de 26,48125 mm para la concentración más baja del extracto, mientras que para la concentración más alta se registró un promedio de 48,59375 mm. Hay investigaciones que señalan que la *Annona muricata* presenta actividad antifúngica, como la investigación realizada por Mamani Larico, Glenda Elena (21), en el año 2015, llevo a cabo este estudio con el fin de examinar cómo el extracto de las hojas de *Annona muricata*, conocida como guanábana, puede afectar la actividad antifúngica en las cepas ATCC 10231 de *Candida albicans*. Los resultados indicaron una actividad notable del extracto contra las cepas ATCC 10231 de *Candida albicans*.

En la tabla 16 y 17, los resultados de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para *Trichophyton interdigitale* fueron de 13,50 mg/ml, con una concentración mínima fungicida (CMF) de 15 mg/ml. En el caso de *Aspergillus brasiliensis*, la CMI fue de 10,50 mg/ml, con una CMF de 10,50 mg/ml. Otras investigaciones respaldan estos hallazgos, como el estudio

realizado por Jaime Gamboa, Yuri Irwin (22), en el año 2015, sus hallazgos indicaron que la concentración mínima inhibitoria equivalía a 0,586 mg/mL y la concentración mínima fungicida a 1,172 mg/ml, en las condiciones experimentales establecidas, se observó que el aceite esencial de *Citrus aurantium* L. "naranja" exhibe propiedades antimicóticas y fungicidas frente a la cepa de *Trichophyton mentagrophytes*.

Los resultados que hemos obtenido indican cifras alentadoras; no obstante, es fundamental resaltar la importancia de llevar a cabo investigaciones adicionales y pruebas más detalladas. Esto se debe a que las infecciones ocasionadas por las especies *Trichophyton interdigitale* y *Aspergillus brasiliensis* han experimentado un marcado aumento en las últimas tres décadas, especialmente en pacientes con sistemas inmunológicos debilitados.

CONCLUSIONES

PRIMERA: El extracto hidroalcohólico de *Annona muricata* sobre *Trichophyton interdigitale* y *Aspergillus brasiliensis*, presentaron actividad antimicótica.

SEGUNDA: Los metabolitos secundarios presentes en el análisis fitoquímico del extracto hidroalcohólico de *Annona muricata* mediante reacciones a la gota y cromatografía líquida se identificaron compuestos fenólicos, flavonoides, triterpenos, esteroides, lactonas y cumarinas.

TERCERA: El efecto antimicótico de la concentración *del extracto hidroalcohólico de las hojas de Annona muricata* (Guanábana) sobre *Trichophyton interdigitale*, mediante el método de Kirby-Bauer indicaron mayor promedio de halo de inhibición a la concentración de 24,75 mg/ml con un diámetro de 36,40125 mm. La concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima fungicida (CMF); indicaron una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 13,50 mg/ml con una concentración mínima fungicida (CMF) de 15 mg/ml.

CUARTA: El efecto antimicótico de la concentración del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Annona muricata* (Guanábana) sobre *Aspergillus brasiliensis* mediante el método de Kirby-Bauer indicaron mayor promedio de halo de inhibición a la concentración de 27 mg/ml con un diámetro de 48,59375 mm. La concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima fungicida (CMF); indicaron una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 10,50 mg/ml con una concentración mínima fungicida (CMF) de 10,50 mg/ml.

RECOMENDACIONES

1. Es necesario evaluar la capacidad antifúngica del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Annona muricata*, conocida como “Guanábana”, en comparación con su efecto sobre otros tipos de hongos responsables de distintas enfermedades.
2. Se recomienda llevar a cabo ensayos en organismos vivos con el fin de evaluar tanto la eficacia como la seguridad de los compuestos activos del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Annona muricata*, así como para determinar las dosis terapéuticas adecuadas.
3. Preparar diversas formulaciones farmacéuticas adecuadas para una vía cutánea de administración, empleando extracto hidroalcohólico de hojas de *Annona muricata*, conocida como “Guanábana”, con el propósito de llevar a cabo ensayos clínicos en pacientes que sufren de enfermedades causadas por *Trichophyton interdigitale* y *Aspergillus brasiliensis*.

4. Establecer una correlación entre los resultados de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la dosis efectiva que los organismos biológicos pueden tolerar en investigaciones futuras. Esto podría allanar el camino para desarrollar un producto comercialmente viable.

5. Conducir investigaciones centradas en los compuestos aislados presentes en los extractos hidroalcohólicos de plantas originarias de la zona de Tacna.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Moghadamtousi SZ, Fadaeinasab M, Nikzad S, Mohan G, Ali HM, Kadir HA. *Annona muricata* (Annonaceae): A Review of Its Traditional Uses, Isolated Acetogenins and Biological Activities. *Int J Mol Sci.* julio de 2015;16(7):15625-58.
2. López Martínez CR. Atributos nutricionales, nutraceuticos y citotóxicos de tres especies de anonáceas: guanábana (*Annona muricata* L.), chirimoya (*Annona cherimola* MILL.) y chincuya (*Annona purpurea* Moc. et Sess) [Internet] [Thesis]. Universidad Autónoma Chapingo; 2021 [citado 20 de mayo de 2022]. Disponible en: <https://repositorio.chapingo.edu.mx/handle/20.500.12098/1090>
3. Llanque Apaza DS. Actividad antioxidante y antibacteriana del extracto etanólico de las semillas de Guanábana *Annona Muricata* L. 2016 [citado 18 de mayo de 2022]; Disponible en: <https://repositorio.uap.edu.pe/xmlui/handle/20.500.12990/4067>
4. Vergara Sotomayor A, Páucar Cuba K, Morales Comettant C, Castro Mandujano O, Pizarro Solís P, Díaz Rosado J. Obtención de extractos de hojas de *Annona muricata* L. (Guanábana) inducidos por su efecto inhibidor de la corrosión. *Rev Soc Quím Perú.* enero de 2018;84(1):119-32.
5. Leiva González S, Gayoso Bazán G, Chang Chávez L. *Annona muricata* L. «guanábana» (Annonaceae), una fruta utilizada como alimento en el Perú prehispánico. *Arnaldoa.* enero de 2018;25(1):127-40.
6. Serrano-Coll HA, Cardona-Castro N. Micotoxicosis y micotoxinas: generalidades y aspectos básicos. *CES Med.* junio de 2015;29(1):143-51.
7. Gordillo JC, Ortiz D, Larrahondo JE, Mejía MS, Pachón H. Actividad antioxidante en guanábana (*Annona muricata* L.): una revisión bibliográfica. :17.
8. Alzubaidy ZM, Almashhadany DA, Abdulrahman SM, Sorchee SM. Impact of Alcoholic and Aqueous Extracts of *Annona Muricata* on the Growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* Isolates. *SVU-Int J Vet Sci.* 1 de diciembre de 2022;5(4):103-13.

9. Alvarado Mayor PN, Bautista-Flores A, Lovera Arellano AA, Alvarado Mayor PN, Bautista-Flores A, Lovera Arellano AA. Cytotoxic effect of hydroalcoholic extract of *Annona Muricata* against a human cell line of gastric adenocarcinoma. *Vitae* [Internet]. abril de 2022 [citado 13 de octubre de 2023];29(1). Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0121-40042022000100003&lng=en&nrm=iso&tlng=en
10. Appoline IA, Assogba MF, Kinsou LD, Ahoton D, Yovo M, Gbenou JD, et al. A comparative analysis of the secondary metabolites, polyphenol contents and antioxidant potential of ethanolic, hydro-ethanolic and aqueous extracts of *Annona muricata* Linn leaves in Abomey-Calavi, Benin. *J Biodivers Environ Sci JBES*. 20 de enero de 2021;18(1):1.
11. Murthy HN, Bapat VA, editores. *Bioactive Compounds in Underutilized Fruits and Nuts* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2020 [citado 13 de octubre de 2023]. (Reference Series in Phytochemistry). Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-30182-8>
12. Dueñas Cely DP. Estudio fitoquímico y evaluación de la actividad citotóxica de un extracto de hojas de *Annona muricata* (Guanábana) frente a las líneas celulares MCF-7, 4T1, B16 y 3T3. 10 de junio de 2019 [citado 22 de mayo de 2022]; Disponible en: <http://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/43199>
13. O OJA, E OO, S TO, O OF, S BA, A AO, et al. Antimicrobial activities and phytochemical properties of *Annona muricata* leaf. *Covenant J Phys Life Sci* [Internet]. 2017 [citado 13 de octubre de 2023]; Disponible en: <https://journals.covenantuniversity.edu.ng/index.php/cjpls/article/view/776>
14. García YH, Izquierdo SS, Esquijarro JA, Díaz AR, López M, Vidal JM. Optimization of variables for extraction of flavonoids from *Annona muricata* L. leaves. *Rev Cuba Plantas Med*. 27 de marzo de 2017;21(3):298-308.
15. Veramendi Gomez H, Urbano Palomino S. Evaluación de la eficacia antimicótica del extracto hidroalcohólico de hojas de *Annona muricata* L.(guanábana) frente a *Cándida albicans* ATCC 10231. *Univ Priv Huancayo Frankl Roosevelt* [Internet]. 20 de agosto de 2022 [citado 18 de septiembre de 2023]; Disponible en: <http://repositorio.uoosevelt.edu.pe/handle/20.500.14140/1058>

16. Guevara Caballero A, Juarez Rojas DE. Actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Annona muricata* (Guanábana) sobre *Staphylococcus aureus*. Univ Priv Huancayo Frankl Roosevelt [Internet]. 18 de diciembre de 2021 [citado 22 de mayo de 2022]; Disponible en: <http://repositorio.uroosevelt.edu.pe/handle/ROOSEVELT/656>
17. Barreto Gavelan ML. Efecto antifungico in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Annona Muricata* sobre *candida Albicans* ATCC 10231, Trujillo - 2019. 17 de enero de 2023 [citado 18 de septiembre de 2023]; Disponible en: <https://repositorio.uladech.edu.pe/handle/20.500.13032/31541>
18. Cayra Ramos DF. Optimización de los parámetros de secado de hojas de guanábana (*Annona muricata* L.) sobre el contenido de polifenoles y capacidad antioxidante. Univ Peru Unión [Internet]. 25 de octubre de 2019 [citado 22 de mayo de 2022]; Disponible en: <https://repositorio.upeu.edu.pe/handle/20.500.12840/2122>
19. Anselmo Ramos R, Flores Huertas RE. Actividad antimicótica del extracto etanólico de las hojas de *Iomanthus truxillensis* Cabrera en cepas de *Candida albicans* ATCC 10231 y *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, in vitro. Univ Inca Garcilaso Vega [Internet]. 22 de mayo de 2018 [citado 19 de enero de 2024]; Disponible en: <http://repositorio.uigv.edu.pe/handle/20.500.11818/2628>
20. Huamán Torre EY, Seguil Alvarado VA. Análisis de la actividad antimicrobiana de el extracto Etanólico de *Annona Muricata* frente a microorganismos patógenos Huancayo 2017. Univ Peru Los Andes [Internet]. 2019 [citado 22 de mayo de 2022]; Disponible en: <http://repositorio.upla.edu.pe/handle/20.500.12848/731>
21. Mamani Larico GE. Evaluación del efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de *Annona muricata* Guanábana por el método de difusión en placa sobre cepas de *Cándida albicans* ATCC 10231. 2015 [citado 22 de septiembre de 2023]; Disponible en: <https://repositorio.uap.edu.pe/xmlui/handle/20.500.12990/9769>
22. Jaime Gamboa Y Irwin. Actividad antimicótica del aceite esencial de *Citrus aurantium* L."naranja" frente a la cepa de *Trichophyton mentagrophytes*. 2015 [citado 19 de enero de 2024]; Disponible en: <http://repositorio.unsch.edu.pe/handle/UNSCH/2262>

23. Ruiz Quiroz JR, Huamaní Achata ME. Determinación de la actividad antifúngica contra *Candida albicans* y *Aspergillus niger* de 10 plantas medicinales de 3 departamentos del Perú. Univ Nac Mayor San Marcos [Internet]. 2005 [citado 17 de enero de 2024]; Disponible en: <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/1278>
24. Leiva González S, Gayoso Bazán G, Chang Chávez L. *Annona muricata* L. «guanábana» (Annonaceae), una fruta utilizada como alimento en el Perú prehispánico. *Arnaldoa*. enero de 2018;25(1):127-40.
25. PROPIEDADESCURATIVASDELASHOJASDEGUANABANADONE-EGV.pdf [Internet]. [citado 20 de mayo de 2022]. Disponible en: <https://icup.buap.mx/sites/default/files/revista/2018/03/3E10-PROPIEDADESCURATIVASDELASHOJASDEGUANABANADONE-EGV.pdf>
26. Mendoza León JC. Actividad antifúngica del extracto etanólico de las hojas de *Solanum hispidum* Pers y citotoxicidad en líneas celulares de cáncer humano. Univ Nac Mayor San Marcos [Internet]. 2022 [citado 20 de mayo de 2022]; Disponible en: <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/17852>
27. Prasad R, editor. *Candida Albicans: Cellular and Molecular Biology* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer; 1991 [citado 3 de noviembre de 2023]. Disponible en: <https://link.springer.com/10.1007/978-3-642-75253-7>
28. Rudramurthy SM, Shankarnarayan SA, Dogra S, Shaw D, Mushtaq K, Paul RA, et al. Mutation in the Squalene Epoxidase Gene of *Trichophyton interdigitale* and *Trichophyton rubrum* Associated with Allylamine Resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 26 de abril de 2018;62(5):10.1128/aac.02522-17.
29. Ki SH, Noh H, Ahn GR, Kim SH, Kaushik NK, Choi EH, et al. Influence of Nonthermal Atmospheric Plasma-Activated Water on the Structural, Optical, and Biological Properties of *Aspergillus brasiliensis* Spores. *Appl Sci*. enero de 2020;10(18):6378.
30. Yajid AI, Ab Rahman HS, Wong MPK, Wan Zain WZ. Potential Benefits of *Annona muricata* in Combating Cancer: A Review. *Malays J Med Sci MJMS*. febrero de 2018;25(1):5-15.

31. Vega MÁP, Delgado AO, Meirinhos AR. Revisión sistemática del panorama de la investigación sobre redes sociales: Taxonomía sobre experiencias de uso. *Comun Rev Científica Iberoam Comun Educ.* 2019;(60):81-91.
32. Fiallos Núñez JE. Determinación de la correlación entre métodos visuales ópticos y difusión en placa en el crecimiento de *Escherischia coli* [Internet] [bachelorThesis]. Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Carrera de Ingeniería Bioquímica; 2017 [citado 31 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://repositorio.uta.edu.ec:8443/jspui/handle/123456789/26334>
33. Cholán Pacheco K, Zavaleta Espejo G, Saldaña Jiménez J, Blas Cerdán W. Efecto del extracto hidroalcohólico de *Caesalpinia spinosa* (Fabaceae) sobre el crecimiento de *Salmonella typhi* y *Escherichia coli*. *Arnaldoa.* mayo de 2019;26(2):699-712.

ANEXOS

Anexo 1. Matriz de consistencia

PROBLEMA	OBJETIVO	HIPOTESIS	VARIABLES	INDICADORES	MUESTRA	METODOLOGIA
<p>PRINCIPAL ¿El extracto hidroalcohólico de <i>Annona muricata</i> tendrá efecto antifúngico sobre <i>Trichophyton mentagrophytes</i> y <i>Aspergillus brasiliensis</i>, 2022?</p> <p>SECUNDARIOS a) ¿Cuáles serán los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas de la especie <i>Annona muricata</i> (Guanabana), 2022? b) ¿Cuál es la concentración del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Annona muricata</i> (Guanabana) que presenta efecto antifúngico frente a cepas de <i>Trichophyton mentagrophytes</i>, 2022? c) ¿Cuál es la concentración del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Annona muricata</i> (Guanabana) que presenta efecto antifúngico frente a cepas de sobre <i>Aspergillus brasiliensis</i>, 2022?</p>	<p>GENERAL Evaluar el efecto antifúngico “in vitro” del extracto hidroalcohólico de <i>Annona muricata</i> sobre <i>Trichophyton mentagrophytes</i> y <i>Aspergillus brasiliensis</i>, 2022</p> <p>ESPECIFICO a) Identificar los metabolitos secundarios presentes en el análisis fitoquímico y efecto antifúngico “in vitro” del extracto hidroalcohólico de <i>Annona muricata</i> sobre <i>Trichophyton mentagrophytes</i> y <i>Aspergillus brasiliensis</i>, 2022. b) Determinar la Concentración del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Annona muricata</i> (Guanabana) sobre <i>Trichophyton mentagrophytes</i>, 2022. c) Determinar la Concentración del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Annona muricata</i> (Guanabana) sobre <i>Aspergillus brasiliensis</i>, 2022.</p>	<p>GENERAL El extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Annona muricata</i> (Guanabana) presenta efecto antifúngico sobre <i>Trichophyton mentagrophytes</i> y <i>Aspergillus brasiliensis</i>.</p>	<p>VARIABLE INDEPENDIENTE Extracto hidroalcohólico obtenido de las hojas de <i>Annona muricata</i> (Guanabana).</p> <p>VARIABLE DEPENDIENTE Efecto antifúngico</p>	<p>Independiente: Concentración del extracto.</p> <p>Dependientes: Diámetro en milímetros (mm) del halo de inhibición. Escala mcfarland (0,5 Mc Farland).</p>	<p>POBLACION VEGETAL Especie vegetal de <i>Annona muricata</i> (Guanabana)</p> <p>POBLACIÓN MICROBIOLÓGICA Hongos</p> <p>MUESTRA VEGETAL Hojas de <i>Annona muricata</i></p> <p>MUESTRA MICROBIOLÓGICA <i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 9533 <i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404</p>	<p>NIVEL Experimental, Descriptivo, Prospectivo, Longitudinal</p> <p>DISEÑO Será de tipo experimental “in vitro” porque se evalúa un fenómeno dado introduciendo elementos que pueden modificar el comportamiento de las variables en estudio, los que fueron medidos en determinados momentos.</p>

Anexo 2. Foto de árbol de *Annona muricata* (Guanábana).



a) Árbol de *Annona muricata* en su hábitat de cultivo.



b) Hojas frescas de *Annona muricata*.

Anexo 3. Fotos del proceso de secado de hojas de *Annona muricata* (Guanábana) al aire libre.



a) Hojas de *Annona muricata* en proceso de secado a temperatura ambiente.



b) Estado de hoja *Annona muricata* después de 15 días de secado.

Anexo 4. Fotos de la selección de las hojas secas de *Annona muricata* (Guanábana).






a) Puesta de hojas secas de *Annona muricata* en mesa.





c) Selección de hojas secas de *Annona muricata*.


Anexo 5. Fotos del proceso de molienda de las hojas secas de *Annona muricata* (Guanábana).

	
a) Moedor mecánico.	b) Proceso de molienda.
	
c) Puesta de las hojas de <i>Annona muricata</i> molidas.	

Anexo 6. Fotos del proceso de maceración de las hojas secas de *Annona muricata* (Guanábana).

	
a) Puesta de alcohol al 70%	b) Forrado de la damajuana con papel aluminio

Anexo 7. Fotos del filtrado del extracto hidroalcohólico de Las hojas secas de *Annona muricata* (Guanábana).

	
a) Puesta del extracto hidroalcohólico	b) Doble filtrado del extracto hidroalcohólico
	
c) Muestra del investigador en el proceso de filtrado	

Anexo 8. Fotos del frasco hermético que se usaron para guardar extracto hidroalcohólico filtrado.



a) Frasco hermético

Anexo 9. Fotos de la activación de *Trichophyton interdigitale* y *Aspergillus brasiliensis*.



a) Esterilizando la zona de la placa antes de la activación



b) Activación del hongo a trabajar

Anexo 10. Fotos de la marcha fitoquímica; determinación cualitativa de los metabolitos secundarios.



- a) **Reacción de Shinoda** → Rojo => [Flavonoides (++)].
- b) **Reacción de FeCl_3** → Verde – azulada => [Compuestos Fenólicos (++)].
- c) **Reacción de Mayer** → Turbidez o precipitado blanco => [Alcaloides (-)].
- d) **Reacción de la espuma** → Espuma => [Saponinas (-)].
- e) **Reacción de Lieberman - Burchardat** → Colores verde, azul, naranja o rojo => [Triterpenos y Esteroides (+)].
- f) **Reacción de la gelatina** → Precipitado denso blanquecino => [Taninos (-)].
- g) **Reacción de Borntrager** → Rojo => [Quinonas (-)].
- h) **La reacción NaOH al 10%** → Coloración amarilla que desaparecía al acidular con 20uL de HCl => [Lactonas y Cumarinas (+)].

Anexo 11. Análisis fitoquímico del extracto hidroalcohólico de *Annona muricata* "Guanábana"



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO
FACULTAD DE CIENCIAS
LABORATORIO DE CROMATOGRAFIA Y ESPECTROMETRIA – Pabellón de Control de Calidad
AV. De la Cultura 733 CUSCO-PERÚ Contacto 973868855

RESULTADOS

Cusco, 05 de Julio del 2022

Solicitante : Luis Alonso Fernandez Clavijo
Tipo de Análisis : Marcha Fitoquímica y Perfil de compuestos Fenolicos
Método de Análisis : Reacciones a la gota y Cromatografía líquida
Tipo de Muestras : Denominado "Extracto etanolico de hojas de Guanabana"
Cantidad de Muestra : 1, tubo de vidrio con 20mL aprox
Almacenamiento : 4 °C.

Ensayo fitoquímico

Metabolito	Extracto Etanolico de hojas de Guanabana
Compuestos Fenólicos	+++
Flavonoides	+++
Alcaloides	-
Triterpenos y Esteroides	+
Saponinas	-
Taninos	-
Quinonas	-
Lactonas y Cumarinas	+

Abundante = +++, Poco = ++, Muy Poco = +, Ausente = -

Nota:

El ensayo fitoquímico realizado al extracto consistió en reacciones de coloración y/o precipitación, en el que se evaluó la presencia o ausencia de metabolitos secundarios

Referencia

- Lock de Ugaz O. 1994. "Investigación Fitoquímica Métodos en el estudio en los productos naturales" Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima.



Quipnico, Jorge Choquenaira Pari
Analista del Laboratorio de Cromatografía y
Espectrometría – UNSAAC.
CQP - 914

Anexo 12. Análisis por HPLC perfil de compuestos fenolicos del extracto hidroalcohólico de *Annona muricata* “Guanábana”

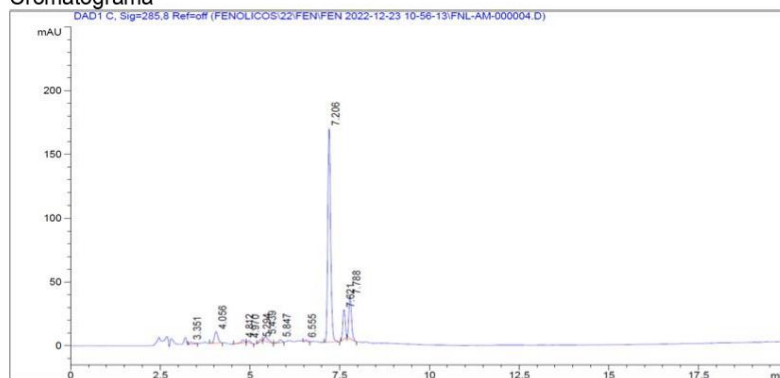


UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO
 FACULTAD DE CIENCIAS
 LABORATORIO DE CROMATOGRAFIA Y ESPECTROMETRIA – Pabellón de Control de Calidad
 AV. De la Cultura 733 CUSCO-PERÚ Contacto 973868855

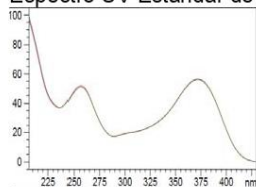
RESULTADOS Análisis por HPLC perfil de compuestos Fenolicos

Muestra	Repeticiones			Promedio
	1	2	3	Compuestos Fenolicos Totales ug/mL de extracto
Extracto Etanolico hojas de Guanabana	906.75269	904.4676	896.7827	902.7

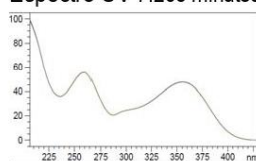
Cromatograma



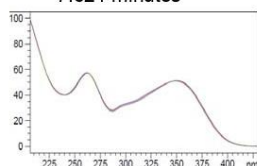
Espectro UV Estandar de Quercetina



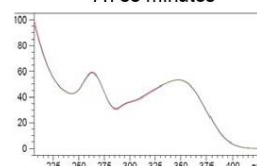
Espectro UV 7.206 minutos



7.621 minutos



7.788 minutos



Nota: Se ha detectado la presencia de 11 compuestos, los picos con tiempo de retención de 7.206, 7.621 y 7.788 minutos (ver cromatograma) son parecido a derivados de la Quercetina (análisis de espectro UV). la cantidad se determino mediante una curva de calibración con un estándar de Quercetina, la suma total de los compuestos hallados es expresado en equivalente de Quercetina en microgramos por mililitro de extracto.



Químico. Jorge Choquenaira Parí
 Analista del Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría – UNSAAC.
 CQP - 914

Anexo 13. Condiciones de análisis por HPLC



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO
FACULTAD DE CIENCIAS
LABORATORIO DE CROMATOGRAFIA Y ESPECTROMETRÍA – Pabellón de Control de Calidad
AV. De la Cultura 733 CUSCO-PERÚ Contacto 973868855


RESULTADOS Condiciones de Análisis por HPLC

Cromatógrafo:	Agilent series 1200
Software:	Chemstation V03.02
Columna:	Zorbax Eclipse XDB C18 4.6d x 150mm, 5µm
Pre Columna:	Zorbax Eclipse XDB-C18 4.6d x 12.5 mm x 5µm
Flujo:	0.600 ml/min.
Solvente A:	85.0 % H ₃ PO ₄ 0.1%
Solvente B:	15.0 % MeCN
Sistema de Análisis:	Inicio 15.0% B, a 8 min 50.0% B, a 15 min 80% B, a 20 min 100% B.
Detección DAD:	285 nm
Temperatura del Horno:	40.0°C
Tiempo de Análisis:	20 min.
Volumen de Inyección:	1.0 µl

Referencia

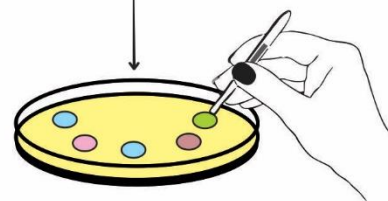
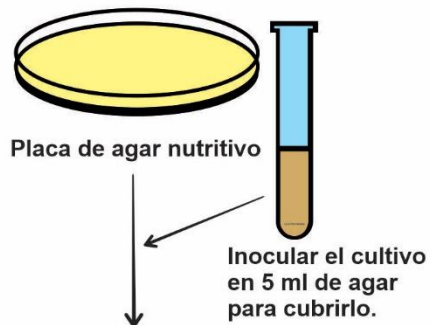
1. Vrchotová, N & Sera, Bozena & Triska, Jan. (2007). The stilbene and catechin content of the spring sprouts of Reynoutria species. ACTA Chromatographica. 19.
2. Cjuno Q., Ligarda K. 2013 Cuantificación de Acido Rosmarínico en Seis Plantas Cusqueñas de la Tribu Methear (Lamiaceae) por HPLC – DAD Tesis UNSAAC.
3. Ivanescu, B., Vlase, L., Corciova, A., & Lazar, M. I. (2010). HPLC-DAD-MS study of polyphenols from Artemisia absinthium, A. annua, and A. vulgaris. Chemistry of Natural Compounds, 46(3), 468-470. <https://doi.org/10.1007/s10600-010-9648-8>




Químico. Jorge Chequenaira Pari
Analista del Laboratorio de Cromatografía y
Espectrometría – UNSAAC.
CQP - 914

Anexo 14. Técnica de Kirby - Bauer

Técnica de Kirby - Bauer


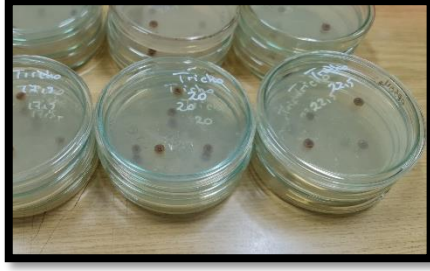
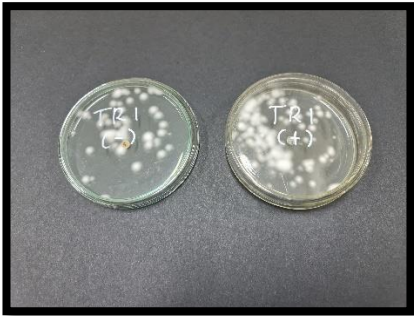



Incubar durante 24 - 48 h.









El organismo de prueba muestra sensibilidad a algunos antibióticos, lo que se indica por la inhibición del crecimiento bacteriano alrededor de los discos (zonas de inhibición) después de la incubación.

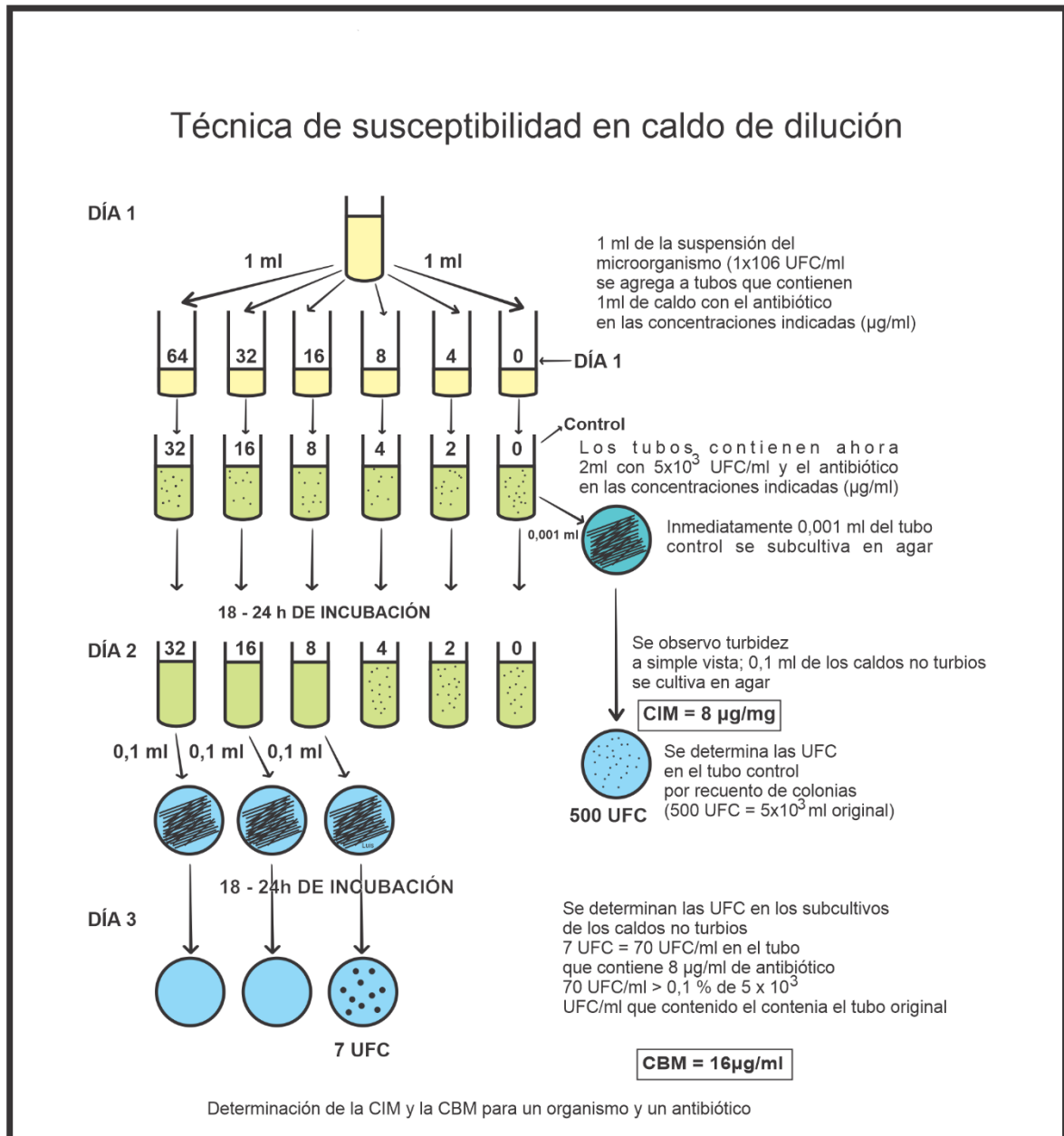
Anexo 15. Fotos de la preparación de la prueba de la actividad antimicótica del extracto hidroalcohólico de *Annona muricata* “Guanábana” frente a *Trichophyton interdigitale* ATCC 9533 por la técnica de Kirby Bauer (método de difusión con discos).

	
<p>a) Colocando los discos de sensibilidad.</p>	<p>b) Placa con los discos sensibilidad.</p>
	
<p>c) Usando micropipeta para agregar la solución del principio activo.</p>	<p>d) Placas con los discos de sensibilidad embebidas con la solución del principio activo.</p>
	
<p>e) Placas mostrando el control (-) y (+).</p>	<p>f) Midiendo los halos con el vernier.</p>

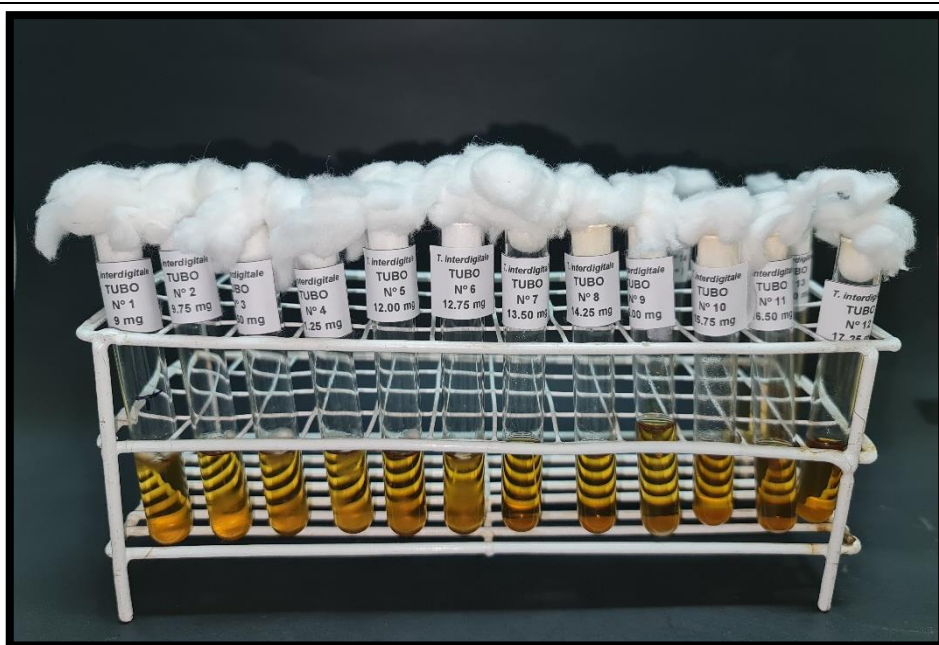
Anexo 16. Fotos de la preparación de la prueba de la Actividad antimicótica del extracto hidroalcohólico de *Annona muricata* “Guanábana” frente a *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 por la técnica de Kirby Bauer (método de difusión con discos).

	
<p>a) Colocando los discos de sensibilidad en las placas.</p>	<p>b) Agregando el principio activo en solución a los discos de sensibilidad.</p>
	
<p>c) Discos de sensibilidad ya embebidos.</p>	<p>d) Placas mostrando el control (-) y (+).</p>
	
<p>e) Midiendo los halos con el vernier.</p>	<p>f) Presencia de halos de inhibición.</p>

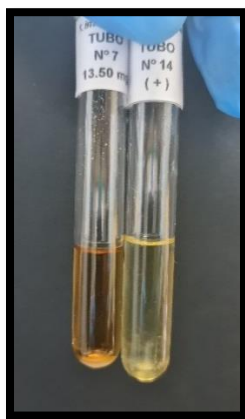
Anexo 17. Técnica de susceptibilidad en caldo de dilución.



Anexo 18. Fotos de la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto hidroalcohólico de la Guanábana frente a *Trichophyton interdigitale*.



a) Tubos de ensayo en proceso de determinación de la CMI.



b) Tubo N°07 que vendría ser el CMI con una concentración 13,50 mg/ml.

Anexo 19. Fotos de la determinación de la concentración mínima fungicida (CMF) del extracto hidroalcohólico de la Guanábana frente a *Trichophyton interdigitale*.



a) El Tubo 7, Tubo 8 y Tubo 09.

b) Preparación de los tubos para determinar la CMF.

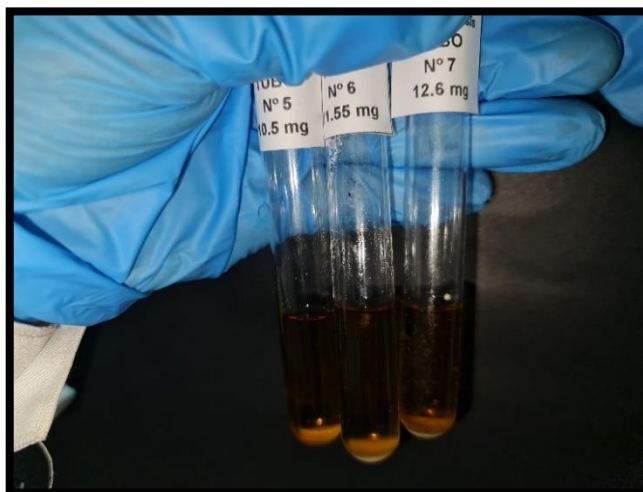


c) Placas que se usaran para el sembrado del tubo 7, 8 y 9.

Anexo 20. Fotos de la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto hidroalcohólico de la Guanábana frente a *Aspergillus brasiliensis*.



a) Tubos de ensayo en proceso de determinación de la CMI.



b) Tubo 05 que vendría ser el CMI con una concentración 10,50 mg/ml.

Anexo 21. Fotos de la determinación de la concentración mínima fungicida (CMF) del extracto hidroalcohólico de la Guanábana frente a *Aspergillus brasiliensis*.



a) Preparación de los tubos para determinar la CMF.



b) Placas que se usaran para el sembrado del tubo 5, 6 y 7.


Anexo 22. Certificado de análisis de *Trichophyton interdigitale* ATCC 9533



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: Trichophyton interdigitale Catalog Number: 0442 Lot Number: 442-88** Reference Number: ATCC® 9533™* Passage from Reference: 3	Expiration Date: 2023/7/31 Release Information: Quality Control Technologist: Christine Condon Release Date: 2021/9/30
---	---

Macroscopic Features: Large, white colonies with "fuzzy" appearance.	Performance	Medium: Malt Extract Agar
Microscopic Features: Many microconidia (very small and clavate-borne in clusters from laterally projecting conidiophores). Spirals, nodular bodies, chlamydospores, and racquet hyphae may be present. Macroconidia sparse, if present-enlongated, pencil shaped, 6-9 septations.		Method: Lactophenol Blue (1)

ID System: MALDI-TOF (1) See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results Urea Agar Slant: positive Dermatophyte Test Medium: positive (good growth at 7 days with agar turning deep pink)
	 Amanda Kuperus Director of Quality Control AUTHORIZED SIGNATURE

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

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.

(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025.



Anexo 23. Resultados de la clasificación

Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results



Meaning of Score Values

Range	Interpretation	Symbols	Color
2.00 – 3.00	High-confidence identification	(+++)	green
1.70 – 1.99	Low-confidence identification	(+)	yellow
0.00 – 1.69	No Organism Identification Possible	(-)	red

Meaning of Consistency Categories (A - C)

Category	Interpretation
(A)	High consistency: The best match is a high-confidence identification. The second-best match is (1) a high-confidence identification in which the species is identical to the best match, (2) a low-confidence identification in which the species or genus is identical to the best match, or (3) a non-identification.
(B)	Low consistency: The requirements for high consistency are not met. The best match is a high- or low-confidence identification. The second-best match is (1) a high- or low-confidence identification in which genus is identical to the best match or (2) a non-identification.
(C)	No consistency: The requirements for high or low consistency are not met.

Run Creation Date/Time: 2021-09-29T16:35:45.774 mcv

Applied MSP Library(ies): BDAL, Mycobacteria Library (bead method), Filamentous Fungi Library

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value
A4 (+++) (B)	442-88	Trichophyton interdigitale	2.62

Comments:

Species benhamiae / equinum / interdigitale and tonsurans of the genus Trichophyton have very similar patterns: Therefore distinguishing their species is difficult.

Anexo 24. Certificado de análisis de *Aspergillus Brasiliensis* ATCC 16404



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: Aspergillus brasiliensis Catalog Number: 0392 Lot Number: 392-1271** Reference Number: ATCC® 16404™* Passage from Reference: 3	Expiration Date: 2023/9/30 Release Information: Quality Control Technologist: Christine Condon Release Date: 2021/11/10
--	--

Macroscopic Features: Rapidly growing colonies which are initially white or pale yellow, quickly become black with conidia (spore) production. Reverse is pale yellow.	Performance Medium: PDA
Microscopic Features: Chains of small conidia which arise from short sterigmata arranged radially over the surface of the vesicle	Method: Lactophenol Blue (1)

ID System: MALDI-TOF (1)
 See attached ID System results document.

Amanda Kuperus
 Director of Quality Control
 AUTHORIZED SIGNATURE

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

⚠ 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.

(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025.



Anexo 25. Resultados de la clasificación

Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results



Meaning of Score Values

Range	Interpretation	Symbols	Color
2.00 – 3.00	High-confidence identification	(+++)	green
1.70 – 1.99	Low-confidence identification	(+)	yellow
0.00 – 1.69	No Organism Identification Possible	(-)	red

Meaning of Consistency Categories (A - C)

Category	Interpretation
(A)	High consistency: The best match is a high-confidence identification. The second-best match is (1) a high-confidence identification in which the species is identical to the best match, (2) a low-confidence identification in which the species or genus is identical to the best match, or (3) a non-identification.
(B)	Low consistency: The requirements for high consistency are not met. The best match is a high- or low-confidence identification. The second-best match is (1) a high- or low-confidence identification in which genus is identical to the best match or (2) a non-identification.
(C)	No consistency: The requirements for high or low consistency are not met.

Run Creation Date/Time: 2021-11-04T17:43:26.488 cmc

Applied MSP Library(ies): BDAL, Mycobacteria Library (bead method), Filamentous Fungi Library

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value
B1 (+++) (A)	392-1271	Aspergillus brasiliensis	2.00

Comments:

N/A

Anexo 26. Constancia de identificación botánica



HERBARIO TAKANA (TKA)

Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann
Facultad de Ciencias
Ciudad Universitaria - Av. Miraflores s/n, Tacna - Perú



“Año del Fortalecimiento de la Soberanía Nacional”

Constancia N° 001 – TKA- 2022

EL DIRECTOR DEL HERBARIO TAKANA (TKA) DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra alcanzada a este despacho por **Luis Alonso Fernández Clavijo**, identificado con DNI N° 44980006, con domicilio legal en Asoc. Viv. Fortunato Zora Carbajal Mz D Lte 09; estudiante de la Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, cuya determinación taxonómica servirá para la realización del proyecto de Tesis: Efecto antifúngico “in vitro” del extracto hidroalcohólico de *Annona muricata* sobre *Trichophyton interdigitale* y *Aspergillus brasiliensis*, 2022, ha sido estudiada y clasificada como: *Annona muricata* y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

DIVISION MAGNOLIOPHYTA

CLASE MAGNOLIOPSIDA

ORDEN MAGNOLIALES

FAMILIA ANNONACEAE

GENERO *Annona*

ESPECIE *Annona muricata* L., 1753

Nombre vulgar: Guanábana

Determinado por: Bach. Cs. Biol. Javier Máximo Ignacio Apaza

Se expide la presente Constancia a solicitud de la parte interesada para los fines que hubiera lugar.

Tacna, 11 de octubre del 2022


Dr. PABLO JUAN FRANCO LEON
Director del Herbario TKA

cc: Herbario TKA