

“UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA”



FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**“ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE FRACCIONES DEL EXTRACTO
ETANÓLICO DE LA CORTEZA DE *Byrsonima crassifolia* (Indano) FRENTE A
Candida albicans Y *Trichophyton rubrum*,”**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO

PRESENTADO POR:

Bach. Shapiama Quintanilla, Mijail Anthony

Bach. Bazan Alvan, Ali Praxiteles

ASESORES:

Ing. Alenguer Gerónimo Alva Arévalo. Dr.

Blga. Jessy Patricia Vásquez Chumbe

Q.F. Andres Chonn Chang

CO – ASESOR:

Q.F. Jhesus Jean Pierre López Mesia

IQUITOS – PERÚ

2016

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA

Facultad de Farmacia y Bioquímica

“ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE FRACCIONES DEL EXTRACTO
ETANÓLICO DE LA CORTEZA DE *Byrsonima crassifolia* (Indano) FRENTE A
Candida albicans Y *Trichophyton rubrum*,”

Q.F. Henry Vladimír Delgado Wong.

PRESIDENTE

Ing. Reyna Gladys Cárdenas Cárdenas

MIEMBRO

Blgo. Felipe Ríos Isern

MIEMBRO

Ing. Alenguer Alva Arévalo

ASESOR

Q.F. Andrés Chonn Chang

ASESOR

Blga. Jessy Patricia Vásquez Chumbe

ASESOR

Q.F. Jhesus Jean Pierre López Mesia

CO-ASESOR

“DEDICATORIA”

“A Dios sobre todas las cosas y por cada cosa que nos regala en la vida...”

Mijail Anthony Shapiama Quintanilla:

*Dedico este trabajo a mi **PADRE NOLBERTO SHAPIAMA CENEPO**, por apoyarme y guiarme siempre y a mi otra inspiración, aquella mujer que nunca me ha dejado, luchadora incansable, que es también mi guerrera invencible, y siempre tendrá sus brazos abiertos para mi **MAMÁ JUANA ROSA QUINTANILLA ORBE**, y a mi pequeño **HIJO MIJAIL JUNIOR SHAPIAMA** porque es la razón de mi vivir.*

*A mi gran inspiración, de hacer todo día a día de la mejor manera, el amor más grande que tengo: **KARLA CAROLA PANDURO SAJAMI**, quien es todo para mí, es el regalo más grande que Dios me pudo dar.*

*A mis hermanos, que a pesar de estar muy lejos, es decir en otro ciudad, siempre influenciaron en mí, desde la manera de pensar y actuar, para formar y ser profesional, la cual es y siempre serán una gran inspiración para mi **JUAN DAVIS, JESUS MARTIN, NORBERTO EDUARDO, SEGUNDO LEVY**.*

*A mis amigos **MARCOS ANDRES, FLAVIO ALDO, CESAR REAÑO, JHON KLAUSSEN, OSWALDO MOZOMBITE, SALVADOR RIVERA, CLAUDIA CARDENAS, LINCER DAVILA, GILMAR, DANIEL SUNCION, MARELY, ADRIANA, MELISA RUIZ, ASTRID URIBE, FELIPE ZAGACETA, LINDON LEYTON, ALEXITO IMAN, AMADEO, NILSA, CRISTIAN, CLARITA, EDER, ERICK, ARNULFO, CHARLIE, VALENTINA**, por todas las cosas, la amistad y enseñanzas, que me han transmitido, en el transcurso de mi formación como profesional.*

ALI PRAXITELES BAZAN ALVAN:

*Dedico este trabajo de tesis a mis queridos padres **Genoveva Alvan Aguirre** Y **Willian Bazan Garate**, por el apoyo incondicional que me brindaron a lo largo de toda mi formación profesional, logrando así que uno de mis más grandes sueños se haga realidad.*

*A mis hermanos **Naff** Y **Willi** que son mi motivación y la razón para seguir adelante siendo un ejemplo constante para ellos.*

*A toda mi familia sin excepción; mis queridos tíos **Mari**, **Alexander**, **Roni**, **Mirian**, mis abuelitos que siempre han estado pendiente de mi durante esta etapa de mi vida.*

*A todas la demás personas y verdaderos amigos que siempre me brindaron su apoyo en buenos y malos momentos que se presentan durante esta etapa, en los que ellos supieron estar ahí con los ánimos necesarios. **Cesar Reaño** y **Marcos Andres Mijail Shapiama**.*

“AGRADECIMIENTO”

“Que mejor que escalar la montaña, si te detienes, puedes ver todo, pero a la vez te puedes caer, mejor es llegar a la cima y verlo todo, más tranquilo, sintiendo deleite de un logro más...”

Dedicamos este trabajo de investigación especialmente a todas aquellas personas que de una u otra forma estuvieron compartiendo con nosotros, tanto en el ámbito profesional como en el personal, conocimientos, experiencias, anécdotas e intercambios de opinión.

La culminación de esta presente tesis no habría sido posible sin la ayuda de las siguientes personas:

✚ Al **Ing. ALENGUER GERONIMO, ALVA ARÉVALO DR**, por la ayuda incommensurable. Por ello queremos expresarle nuestra gratitud por habernos aceptado en su sitio de trabajo. Gracias a sus ganas de querer empezar pero siempre con la mira de culminar y su crítica rápida pero acertada nos llenaron de entusiasmo y al querer hacer.

✚ Al **Blga. JESSY PATRICIA. VASQUEZ CHUMBE**, por haber dedicado una importante parte de su tiempo en compartir sus conocimientos, por abrirnos las puertas de su centro laboral.

✚ A la Ingeniera **TANY Y ALEXANDER**, por habernos apoyado de manera desinteresada en la parte microbiológica durante el desarrollo de la tesis.

✚ Al **Q.F. ANDRES CHONN CHANG**, por su apoyo durante la redacción y culminación de la tesis.

✚ Al **Q.F. JEAN PIERRE LOPEZ MESIA**, por su ayuda en puntos muy críticos de la tesis, en la parte experimental y ayudarnos con ello a lograr un objetivo de ser Químico Farmacéutico.

A todas aquellas personas que de una y otra forma colaboraron en la realización de la presente tesis.

....Muchas gracias!!!

“ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE FRACCIONES DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA CORTEZA DE *Byrsonima crassifolia* (Indano) FRENTE A *Candida albicans* Y *Trichophyton rubrum*,”

Shapiama Quintanilla, M.A.¹, Bazan Alvan, A. P.¹

1. Bach. En Farmacia y Bioquímica. FFBQ- UNAP- IQUITOS

Resumen

Objetivo: Determinar la actividad antifúngica de fracciones del extracto etanólico de la corteza de *Byrsonima crassifolia* (Indano) FRENTE A *Candida albicans* Y *Trichophyton rubrum*

Materiales y Métodos: La evaluación se realizó en los Laboratorios de la UNAP, se obtuvieron las fracciones a partir del extracto etanólico de la corteza de *Byrsonima crassifolia* (Indano) y se determinó la actividad antifúngica *in vitro* frente a *Candida albicans* y *Trichophyton rubrum* por el método de macrodilución para lo cual se realizaron diluciones seriadas de 32 – 0 mg/mL utilizando como medio de cultivo RPMI-1640 determinando la CMI.

Resultados: El extracto etanólico de la corteza de *Byrsonima crassifolia*, (Indano), mostró una CMI de 8 mg/mL frente a *Candida albicans*, no mostró actividad frente a *Trichophyton rubrum*.

Conclusión: Las tres fracciones obtenidas mostraron inhibición del crecimiento de los microorganismos en estudio, siendo la fracción B la de mayor importancia frente a *Candida albicans* (1 mg/mL).

Palabras claves: Concentración mínima inhibitoria, *Candida albicans*, *Trichophyton rubrum*, *Byrsonima crassifolia*

“*In Vitro* ANTIFUNGAL ACTIVITY ACTIVIDAD OF THE ETHANOLIC EXTRACT OF THE BARK OF *Byrsonima crassifolia* (Indano) AGAINST *Cándida albicans* AND *Trichophyton rubrum*, BY THE MACRODILUTION METHOD”

Shapiama Quintanilla, M.A.¹, Bazan Alvan, A. P.¹

1. Bach. En Farmacia y Bioquímica. FFBQ- UNAP- IQUITOS

Abstract

Objective: Determine the *in vitro* antifungal activity actividad of the ethanolic extract of the bark of *Byrsonima crassifolia* (Indano) against *Candida albicans* and *Trichophyton rubrum*, by the macrodilution method.

Materials and Method: The evaluation was conducted in the laboratories of the UNAP, the fractions were obtained from the ethanol extract of the bark of *Byrsonima crassifolia* (Indano) and the antifungal activity was determined *in vitro* against *Candida albicans* and *Trichophyton rubrum* by the dilution method for which serial dilutions were made 32-0 mg/mL using as RPMI-1640 by determining the MIC.

Results: The ethanolic extract of *Byrsonima crassifolia* (indane), showed a MIC of 8 mg/mL against *Candida albicans*, was not observed activity against *Trichophyton rubrum*.

Conclusion: The three fractions obtained showed inhibition of growth of the microorganisms under study, fraction B being the most important against *Candida albicans* (1 mg/mL).

Key words: Minimal Inhibitory Concentration , *Candida albicans*, *Trichophyton rubrum*, *nanche*

INDICE

	PÁGINA
DEDICATORIA	2
AGRADECIMIENTO	4
RESUMEN	5
ABSTRACT	6
INDICE GENERAL.	7
INDICE DE TABLAS.	9
INDICE DE FIGURAS.	10
INDICE DE ANEXOS	11
CAPITULO I	12
1.1. INTRODUCCION.	13
1.2. OBJETIVOS.	15
CAPITULO II	16
2.1. MARCO TEORICO.	17
2.1.1. ANTECEDENTES.	17
2.1.2. MARCO CONCEPTUAL.	19
2.1.2.1. <i>Byrsonima crassifolia</i> :	19
2.1.2.2. Sinonimia:	19
2.1.2.3. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA	19
2.1.2.4. DISTRIBUCIÓN Y PRODUCCIÓN	21
2.1.2.5. USO TRADICIONAL	21
2.1.2.6. COMPOSICIÓN QUÍMICA	22
2.1.2.7. FARMACOLOGÍA Y METABOLITOS PRINCIPALES	22
2.1.3. METODOLOGIA DE MACRODILUCIÓN PARA HONGOS	23
2.1.3.1. INTRODUCCIÓN AL MÉTODO	23
2.1.3.2. PRINCIPIO DEL MÉTODO	24
2.1.4. CARACTERÍSTICAS DE LA CEPA EN ESTUDIO	24
2.2. VARIABLES	26
2.2.1. Independiente	26
2.2.2. Dependiente	26

CAPITULO III	29
3.1. METODOLOGIA.	30
3.1.1. METODO DE INVESTIGACION.	30
3.1.1.1. TIPO DE ESTUDIO.	30
3.1.1.2. DISEÑO DE LA INVESTIGACION.	30
3.1.2. POBLACION Y MUESTRA.	30
3.1.3. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS.	31
3.1.3.1. REACTIVOS.	31
3.1.3.2. MATERIALES.	31
3.1.3.2.1. MATERIAL BIOLÓGICO.	31
3.1.3.2.2. MATERIALES DE VIDRIO Y OTROS.	32
3.1.3.3. EQUIPOS .	33
3.1.4. PROCEDIMIENTOS DE RECOLECCION DE DATOS.	33
3.1.4.1. Recolección de la muestra vegetal	33
3.1.4.2. Identificación de la muestra vegetal	34
3.1.4.3. Obtención del extracto etanólico	34
3.1.4.4. Obtención de las fracciones etanólicas	34
3.1.4.5. Evaluación de la actividad antifúngica	34
3.1.4.5.1. El método de macrodilución para hongos	35
3.2. ASPECTOS ETICOS.	36
3.3. PLAN DE ANALISIS E INTERPRETACION.	37
CAPITULO IV	38
4.1. RESULTADOS.	39
4.2. DISCUSION.	49
4.3. CONCLUSION.	52
4.4. RECOMENDACIONES.	53
4.5. BIBLIOGRAFIA.	54
4.6. ANEXOS	60

INDICE DE TABLAS

	PAGINA
<u>Tabla 01.</u> Porcentaje de Rendimiento de las fracciones obtenidas	39
<u>Tabla 02.</u> Concentración Mínima Inhibitoria (expresados en mg/ml) del extracto etanólico frente a los microorganismos en estudio.	39
<u>Tabla 03.</u> Concentración Mínima Inhibitoria (expresados en mg/ml) de la fracción A frente a los microorganismos en estudio	39
<u>Tabla 04.</u> Concentración Mínima Inhibitoria (expresados en mg/ml) de la fracción B frente a los microorganismos en estudio	40
<u>Tabla 05.</u> Concentración Mínima Inhibitoria (expresados en mg/ml) de la fracción C frente a los microorganismos en estudio	40
<u>Tabla 06.</u> Concentración Mínima Inhibitoria (expresados en µg/ml) del fluconazol frente a los microorganismos en estudio	40
<u>Tabla 07.</u> Correlación de Pearson entre Concentración Mínima inhibitoria (µg/mL) y la Concentración Fungicida 50 ((µg/mL)	48
<u>Tabla 08.</u> Estadístico de asociación entre Concentración Mínima inhibitoria (µg/mL) y la Concentración Fungicida 50 (µg/mL)	48

INDICE DE FIGURAS

	PAGINA
<u>Figura N° 01.</u> Concentración Mínima Inhibitoria de los extractos y compuestos frente a <i>Candida albicans</i>	41
<u>Figura N° 02.</u> Concentración del extracto etanólico que mata al 50 % de la población de <i>Candida albicans</i> (CF ₅₀)	42
<u>Figura N° 03.</u> Concentración de la Fracción A que mata al 50 % de la población de <i>Candida albicans</i> (CF ₅₀)	43
<u>Figura N° 04.</u> Concentración de la Fracción B que mata al 50 % de la población de <i>Candida albicans</i> (CF ₅₀)	44
<u>Figura N° 05.</u> Concentración de la Fracción C que mata al 50 % de la población de <i>Candida albicans</i> (CF ₅₀)	45
<u>Figura N° 06.</u> Concentración de los compuestos que matan al 50 % de la población de <i>Candida albicans</i> (CF ₅₀)	46
<u>Figura N° 07.</u> Concentración Mínima inhibitoria (µg/mL) vs Concentración Fungicida 50 ((µg/mL)	47

INDICE DE ANEXOS

	PAGINA
<u>Anexo N° 01.</u> Flujograma de Obtención del extracto de <i>Byrsonima crassifolia</i> (Indano)	60
<u>Anexo N° 02.</u> Obtención del extracto etanólico de la corteza de <i>Byrsonima crassifolia</i> (Indano)	61
<u>Anexo N° 03.</u> Preparación del inóculo (suspensión)	62
<u>Anexo N° 04.</u> Procedimiento evaluación de la actividad antifúngica in vitro de extractos y fracciones.	63
<u>Anexo N° 05.</u> Procedimiento evaluación de la actividad antifúngica in vitro del control positivo.	64
<u>Anexo N° 06.</u> Fracciones obtenidas	65
<u>Anexo N° 07.</u> Realizando el fraccionamiento del extracto etanólico de la corteza de <i>Byrsonima crassifolia</i> (Indano).	66
<u>Anexo N° 08.</u> Resultados de la evaluación in vitro frente a <i>Candida albicans</i> .	67
<u>Anexo N° 08.</u> Constancia de identificación taxonómica	68
<u>Anexo N° 09.</u> Imagen satelital de la ubicación geográfica de la Reserva Natural Allpahuayo – Mishana	69
<u>Anexo N° 10.</u> Datos de pasaporte de colección de especies de las plantas medicinales en estudio	70
<u>Anexo N° 11.</u> Imágenes microscópicas de los microorganismos utilizados en el estudio (Arriba: <i>Candida albicans</i> ; Abajo: <i>T. rubrum</i>)	71
<u>Anexo N° 12.</u> Procedimiento del fraccionamiento.	72
<u>Anexo N° 13:</u> Procedimiento del fraccionamiento	73

CAPITULO

I

1.1. INTRODUCCION.

La micosis superficial provoca a escala mundial entre 300 a 500 millones de casos clínicos cada año. Esto se debe a que la mayoría de la población mundial está distribuida en zonas altamente endémicas correspondientes a zonas subtropicales y tropicales.^{1, 2, 3,4}

La prevalencia de Tiña capitis varía de 0,4% a 30% en las diferentes partes del mundo.^{5, 6} En el Perú, los microorganismos aislados con mayor frecuencia son *Trichophyton tonsurans*, de 54 a 78%, y *Microsporum canis*, de 7 a 26%.^{6, 7,8} Sin embargo en un estudio realizado en la ciudad de Trujillo, Perú, encontraron mayor frecuencia de *Microsporum canis* (84,7%) que de *Trichophyton mentagrophytes* (9,1%) y *Trichophyton rubrum* (3,1%).⁹

En la Región Amazónica, el elevado porcentaje de humedad y las altas temperaturas, condicionan en los lugareños a una alta prevalencia de infecciones fúngicas, sobre todo en poblaciones de alto riesgo debido al grado de hacinamiento, contaminación ambiental, contacto con los animales domésticos (zoonosis); constituyendo una de las causas importantes de consultas en Hospitales.¹⁰

Las plantas medicinales contribuyen al fortalecimiento de los programas de salud, y también a la economía del país, para el año 2020 la población mundial, habrá alcanzado la cifra de 7,5 mil millones de habitantes, de los cuales el 75% vivirá en países de vía de desarrollo que hoy consumen menos de 15% del mercado farmacéutico, lo que hace suponer que esta masa poblacional buscara cada vez más el recurso de las plantas medicinales para satisfacer sus necesidades de salud.^{11, 12,13}

El hombre amazónico a través de toda su historia, ha logrado identificar y utilizar una buena cantidad de especies vegetales, llegando a conocer y usar unas dos a tres mil plantas medicinales.^{14,16} Brako (1993), reporta para el

Perú un total de 17 mil 144 especies conocidas, de las 150 000 que se conocen en el neo trópico y las 450 000 que se han identificado en el mundo, agrupadas en 2 mil 458 géneros y 224 Familias, con 5 mil 354 especies endémicas.¹⁷ Brack (1995), estimo el número total de especies vegetales en el Perú en 25 000 especies; de éstas, se utilizan no menos de 3 140 especies nativas, de las cuales 1005 especies son utilizadas para diversos fines, como la artesanía.^{14,18}

En concordancia al problema ya expuesto, los datos presentados en este trabajo de tesis validan el uso tradicional de esta especie vegetal frente a *Candida albicans*, constituyendo así un valioso aporte al conocimiento científico para la búsqueda de nuevos compuestos con mayor actividad y menor toxicidad que podrían ser obtenidos mediante un fraccionamiento bio guiado a partir de las fracciones estudiadas.

La corteza de *Byrsonima crassifolia* se utiliza en el tratamiento de llagas, vaginitis y tiña. Se ha demostrado que es activa contra entero bacterias¹⁹, levaduras y dermatofitos además de ser astringente, cicatrizante e antiinflamatorio. Los compuestos responsables de la actividad son proanticiadinas y heterosidos.^{20, 21}

Respecto a esto, es importante considerar que en diferentes partes de la Región Loreto, además de la región San Martín, se viene utilizando el Indano (*Byrsonima crassifolia*) como una alternativa terapéutica frente a infecciones baceterianas, por lo cual resulta factible la búsqueda de una posible actividad antifúngica de esta planta frente a *Candida albicans* y *Trichophyton rubrum*.

1.2. OBJETIVOS.

GENERAL.

- ✓ Determinar la actividad antifúngica de fracciones del extracto etanólico de la corteza de *Byrsonima crassifolia* (Indano) frente a *Candida albicans* y *Trichophyton rubrum*,

ESPECIFICOS.

- ✓ Realizar el tamizaje fitoquímico de la corteza de *Byrsonima crassifolia*, (Indano)
- ✓ Obtener fracciones del extracto etanólico de la corteza de *Byrsonima crassifolia* (Indano)
- ✓ Realizar el cultivo de *Candida albicans* y *Trichophyton rubrum* y realizar la identificación microbiológica respectiva.
- ✓ Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) *in vitro* de las fracciones del extracto etanólico obtenido de la corteza de *Byrsonima crassifolia*, (Indano), mediante el método de macrodilución frente a *Candida albicans* y *Trichophyton rubrum*
- ✓ Comparar el efecto antifúngico *in vitro* frente a *Candida albicans* y *Trichophyton rubrum* de la corteza de *Byrsonima crassifolia*, (Indano) con el control positivo (Fluconazol),

CAPITULO

II

2.1. MARCO TEORICO.

2.1.1. ANTECEDENTES.

Scavino R. y Saldaña C. (2015) evaluarón la actividad antifúngica *in vitro* del extracto etanólico de la corteza de *Byrsonima crassifolia* (Indano) mediante el método de macrodilución. El screening fitoquímico evidenció la presencia de taninos, flavonoides, lactonas y azúcares reductores, obtuvieron una concentración mínima inhibitoria de 1,6 mg/mL y 0,4 mg/mL frente a *Candida albicans* y *Trichophyton rubrum* respectivamente.²³

Silva et al (2007) determinaron el contenido de compuestos polifenólicos, en 15 especies de plantas de la Amazonía (hojas, cortezas, tallos, frutos y semillas) utilizados en la medicina popular, mediante dos métodos espectrofotométricos complementarios, concluyendo existe una correlación positiva entre la cantidad de polifenoles y la capacidad protectora frente a diferentes afecciones.⁵⁵

Caceres et al (1996) evaluarón los extractos etanólicos de 13 plantas entre ellos *Byrsonima crassifolia*, utilizadas para el tratamiento de infecciones por protozoos, bacterias y hongos mediante procedimientos de dilución, concluyendo que ninguno de los extractos mostraron actividad frente a los organismos estudiados.⁵¹

Rivero et al (2009) como parte de un proyecto dirigido hacia el descubrimiento de compuestos antimicrobianos orales a partir de plantas, aislaron ocho compuestos conocidos a partir de *Byrsonima crassifolia*, β -amirina(1), la betulina(2), el ácido betulínico(3), ácido oleanólico(4), la quercetina(5), (-)-epicatequina(6), ácido gálico(7) y β -sitosterol que fueron aisladas de una partición soluble en diclorometano de un extracto de metanol de *Byrsonima crassifolia*. Todos los compuestos aislados se evaluarón para su actividad antimicrobiana contra doce bacterias y *Candida*

albicans. Los compuestos 1 y 4-7 inhibieron el crecimiento de las bacterias con concentraciones que van desde 64 hasta 1.088 µg/mL.²²

Monroy (2011) evaluarón la actividad antimicótica de seis plantas entre ellas *Byrsonima crassifolia* mediante el método de dilución; demostraron la actividad de todos los extractos a excepción de *Litsea glaucescens* que no presento actividad contra los hongos y levaduras estudiadas.⁵⁶

Quiñonez et al (2014) evaluarón la actividad antifúngica *in vitro* de cinco plantas nativas de uso popular en Guatemala, entre ellas la corteza de *Byrsonima crassifolia* (Nance) frente a *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton tonsurans*, *Aspergillus flavus* y *Candida albicans*, concluyendo que la concentración mínima inhibitoria de 0.0625 mg/mL y 0.0625 mg/mL frente a *Candida albicans* y *Trichophyton metagrophytes* respectivamente.⁵⁷

Guerra et al (2013) determinaron la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico y acuoso de *Byrsonima crassifolia* mediante el método de Difusión en Agar frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. El screening fitoquímico evidenció la presencia de taninos, flavonoides, lactonas y azúcares reductores, el extracto etanólico evidenció poca actividad antibacteriana frente a las bacterias en estudio mientras que el extracto acuoso no presentó actividad frente a ambas bacterias.⁵⁸

Rodríguez (2014) evaluó la actividad antibacteriana del extracto etanólico fraccionado de la corteza de *Byrsonima crassifolia*, concluyendo que presentó actividad antibacteriana *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus*, la fracción “C” del extracto etanólico fraccionado de *Byrsonima crassifolia* presentó actividad antibacteriana *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus* aunque el extracto etanólico de *Byrsonima crassifolia* no presento actividad antibacteriana *in vitro* sobre *Escherichia coli*.⁵⁹

2.1.2. MARCO CONCEPTUAL

2.1.2.1. *Byrsonima crassifolia*

Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta.</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Polygalales.</i>
Familia	<i>Malpighiaceae</i>
Género	<i>Byrsonima</i>
Especie	<i>Byrsonima crassifolia</i>
N. científico:	<i>Byrsonima crassifolia</i> L

2.1.2.2. Sinonimia:

La sinonimia de *Byrsonima crassifolia* (L) H.B.K es amplia, los que más se emplean son: *Byrsonima cumingana* Juss.; *Byrsonima fendleri* Turcz.; *Byrsonima panamensis* Beurl.; *Byrsonima pulcra* Sesé.; *Malpighia crassifolia* L.; *Malpighia pulcra* Sesé,^{18,19}. *Byrsonima cotinifolia* Kunth, *Byrsonima cubensis* Juss; *Byrsonima Karwinskiana*; *Byrsonima lanceolata* dc., *Byrsonima rufescens* Bertol. *Byrsonima cynerea* Dec., y *Byrsonima ferruginea*, entre otros.^{22,24}

2.1.2.3. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA :

Árbol caducifolio de 2 a 15 metros de altura, con tapa abierta redonda o extendida, a veces irregular; el tronco es cilíndrico con diámetro normal de 30 a 40 cm con ramas ascendentes, la parte externa de la corteza tiene escamas, que se desprende en fracciones rectangulares, es color café oscuro a moreno claro; corteza interna de color crema rosado, que cambia a pardo rosado, fibrosa y amarga; grosor total de la corteza de 12 a 25 mm, y de madera, dura, rojiza, flexible, fuerte y pesada; la albura es de color más claro (crema amarillento) con vasos grandes, radios numerosos y estrechos; no toman un acabado liso y natural.²⁵

Las ramas cuando jóvenes son de color gris pardo, con cicatrices anulares de las hojas y estipulas caídas; lenticelas escasas, pubescentes en las hojas más jóvenes. Las hojas generalmente son alargadas, decusadas,

simples; láminas de 5 por 2 hasta 15 por 7.5 cm, de forma elíptica, margen entero, ápice agudo o redondeado y base aguda, color verde oscuro y casi glabras en el haz y verde amarillento grisáceos con abundantes tricomas en el envés; peciolos pubescentes de 5 a 25 mm de largo; las yemas miden de 3 a 7 mm agudas y cubiertas por dos estipulas ferruginosas.²⁵

Presenta flores en racimos terminales de hasta 12 cm de largo; cáliz con cinco sépalos de forma oval – triangular²⁴, cada uno con dos prominentes glándulas en la base. Son pubescentes; los pedicelos de 7 a 15 mm de largo. Las flores son de 1.5 cm de diámetro con cáliz de 5 mm de largo, cupular en la base, con cinco lóbulos ovados, agudos o redondeados, pubescentes en la superficie externa, con 10 glándulas grandes, oblongas, glabras en la base de la superficie externa. La corola consta de cinco pétalos amarillos anaranjados, libres, alternos respecto a los lóbulos del cáliz, de 1 cm de largo, orbiculares o reniformes, con la parte superior cóncava, con márgenes ondulados o dentados, unguiculados y glabros.²⁶

El limbo circular, cóncavo, con la base unguiculada. Gineceo con ovario súpero, formado por tres carpelos, lóbulos uniovulares, ovoides y glabros. Presenta tres estilos de 3 a 4 mm. El androceo consta de 10 estambres de 5 mm de largo, filamentos amarillos, vilosos en la parte inferior. Anteras pardas, alargadas, basifijas con filamentos glabros, insertados en un torus hirsuto.²⁶

Los frutos presentan infrutescencias péndulas de 10 a 15 cm de largo; son drupas globosas de 1.2 a 2 cm de diámetro, con todas las partes florales persistentes (menos los pétalos), amarillentas a ligeramente anaranjadas, con abundante pulpa agridulce que rodea al endocarpio y que contiene de 1 a 3 semillas blancas rodeadas por una testa delgada. El exocarpio es delgado, de color amarillo, verde o rojizo cuando el fruto está maduro; el mesocarpio (la parte comestible) es de consistencia pastosa, de color

amarillos y de unos 5 mm de espesor; el endocarpio es redondeado u oval, rígido y reticulado.²⁷

La semilla se encuentra encerrada en el endocarpio que es duro y leñoso; de forma ovoide o subglobosa arrugada, gruesa o ligeramente comprimida, de 4 a 4.5 mm de diámetro; la testa es de color café claro, lisa, lustrosa, membranosa, muy delgada. El embrión es curvo, enrollado, color amarillo verdoso y ocupa toda la cavidad de la semilla. Las semillas contienen dos cotiledones grandes, largos, planos, carnosos, frecuentemente desiguales, enrollados a manera de espiral; la radícula es corta, superior, oblonga, endospermo nuclear escaso o ausente.²⁸

2.1.2.4. DISTRIBUCIÓN Y PRODUCCIÓN:

El género *Byrsonima*, se distribuye desde México hasta el Norte de Sudamérica debido a la tolerancia de los arboles a un amplio rango de condiciones ambientales^{29, 30}

La especie se distribuye en altitudes comprendidas entre los cero y 1600 metros, pero preferentemente de los ceros a los 500 metros.³¹

2.1.2.5. USO TRADICIONAL:

Se consume como fruta fresa, en bebidas refrescantes, bebidas alcohólicas embotelladas, helados, paletas y pasteles.³²

El fruto es nutritivo y complementa la dieta de la población local, por su alto contenido de vitamina A y C (más de 369 g/ 100 g y 650 mg.g-1, respectivamente).³³

En medicina tradicional es importante su uso; la infusión de hojas y corteza funciona como eficaz anti diarreico, antipirético, astringente, antiinflamatorio y expectorante; es un excelente antídoto para mordedura de víbora, corrige la dismenorrea, ayuda a expulsar la placenta, atenúa las contracciones durante el parto y es eficaz en casos de colitis aguda ³², además es útil en las afecciones renales y en la diabetes. ³⁴

El cocimiento de corteza y flores se usa por vía oral para tratar afecciones respiratorias (amigdalitis, bronquitis, fiebre, tos), digestivas (cólicos, diarrea, disentería, estreñimiento, indigestión), dolor de muelas, hemorragias, parásitos, y favorece el parto y la expulsión de la placenta.

35

2.1.2.6. COMPOSICIÓN QUÍMICA:

La corteza contiene taninos (20-30%), ácido oxálico (2.7%), glucósidos, flavonoides, saponinas, sesquiterpenlactonas y triterpenos (β -amirina).

El tamizaje fitoquímico de hojas indica la presencia de saponinas, esteroles insaturados, cardenólidos, bufadienólicos, flavonoides, leucoantocianinas, taninos, polifenoles y triterpenoides (birsonimol); contiene terpenos (betulinaldehído, betulina, ácido betulínico, lupeol, ácido oleanólico, ursenaldehído), esteroles (β sosterol y su glucósido).

Las hojas contienen 6% de grasa, β -sisterol, ácido maslínico y elágico, flavonoides (catequina, epicatequina, guayaverina, hiperina, quercetina, y galoilgalactosido), ésteres aromáticos (metil galato), amino ácidos (alanina, ácido aspártico, prolina, valina, ácido pipecolico y 5-hidroxipipecolico) y un sulfonoglicolipido. La raíz contiene flavonoides, glucósidos cardiotónicos, sesquiterpenlactonas, taninos y triterpenos.^{35, 36}

2.1.2.7. FARMACOLOGÍA Y METABOLITOS PRINCIPALES

Estudios antimicrobianos demuestran que el extracto acuoso de hojas, corteza y raíz es activo contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*. La tintura de corteza es activa contra *Shigella flexneri*, *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae*.³⁶

La decocción de la corteza tiene actividad contra *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum*, Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 200 mg/ml .La corteza es la más activa contra

bacterias y el etanol es el mejor disolvente por bioactividad y rendimiento (6.8%); las bacterias más sensibles son *Pseudomona aeuriginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexceri* y *Streptococcus pyogenes*.

El extracto de la planta completo no tiene actividad insecticida. El extracto etanólico tiene buena actividad nematocida. Otros estudios demuestran que el extracto de hojas y corteza tienen efectos espasmo génicos dosis dependiente.^{35, 36, 37}

Los metabolitos principales son los taninos, especialmente en corteza. Los responsables de la actividad farmacológica son los galatos de proantocianidinas β 2, que en este caso se utilizan como antifúngicos, antiinflamatorios y nematocidas.³⁷

Estudios recientes en España han mostrado que los galatos de proantocianidinas β 2, encontrados en otras plantas como ruda y mirtilo, mejoran la irrigación coronaria, aumentan la tolerancia miocárdica a la deficiencia de oxígeno, disminuyen la resistencia vascular periférica y mejoran la función cardiaca en general.^{37,38}

Pueden tener acción contra enfermedades degenerativas cardiacas, como la esclerosis coronaria y angina de pecho y en general todos aquellos estados en los que hay una disminución de la eficiencia cardiaca. Las proantocianidinas B2 también se utilizan en tratamientos de trastornos del ritmo, especialmente extrasístole y taquicardia paroxística.³⁸

2.1.3. METODOLOGIA DE MACRODILUCIÓN PARA HONGOS:

2.1.3.1. INTRODUCCIÓN AL MÉTODO

En 1998 el *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) publicó el Método de macrodilución para hongos filamentosos⁴⁶ donde se describe un método provisional para la realización de pruebas de sensibilidad antifúngica a los hongos filamentosos formadores de conidias.

A pesar de todo, las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos no están tan desarrolladas como las de los antibacterianos. Los puntos de corte y los criterios de sensibilidad y resistencia de las levaduras para los antifúngicos fluconazol, itraconazol y 5-fluorocitosina, sólo están determinados para las micosis orofaríngeas de enfermos con SIDA. Por lo tanto, estos datos pueden variar en el futuro y hay que prestar atención a las nuevas normas que vayan publicando los comités de estandarización de ensayos *in vitro*, tanto europeos (EUCAST) como americanos (NCCLS).^{39,40}

2.1.3.1.1. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Básicamente consisten en cuantificar la inhibición de crecimiento producida por el antifúngico, comparada con el crecimiento del moho en el mismo medio pero sin antifúngico (control).⁴¹

2.1.3. CARACTERÍSTICAS DE LA CEPA EN ESTUDIO

2.1.3.1. Cepa del hongo *Candida albicans*

Candida albicans es considerada un hongo patógeno oportunista en mamíferos, entre ellos el hombre, que puede causar varias formas de candidiasis, desde infecciones superficiales en mucosas hasta enfermedades sistémicas que comprometen la vida, predominantemente, en individuos con el sistema inmune debilitado. *Candida albicans* al igual que otros patógenos tiene la capacidad de adherirse y formar biopelículas en aparatos implantados, especialmente catéteres intravasculares lo que les confiere mayor resistencia a antifúngicos.⁴²

Candida albicans es capaz de sobrevivir como comensal en distintas localizaciones, y por ello está sometido a distintas presiones medioambientales. Esta habilidad amplía el espectro de enfermedades causadas por *Candida albicans* y otras especies de *Candida*, siendo su incidencia mayor que la de otros microorganismos comensales.⁴³

Candida albicans es una levadura comensal, presente en las mucosas de los seres humanos y los animales de sangre caliente.^{57, 58} Siendo habitualmente aislada de la cavidad oral, el tracto gastrointestinal y urogenital, y su conversión en agente patógeno depende principalmente de la alteración del equilibrio entre la microbiota y el sistema inmunitario del hospedador. Es considerada por ello un patógeno oportunista. El estado fisiológico del hospedador es el primer factor que gobierna la etiología de las candidiasis, variaciones de este estado pueden desencadenar que las levaduras comensales se conviertan en patógenas, causando infecciones.⁴³

En estos últimos años en las unidades de cuidados intensivos hospitalarios se ha experimentado un avance considerable en los sistemas de soporte vital, con un incremento en la utilización de antibióticos de amplio espectro, un evidente aumento de edad y gravedad de los enfermos ingresados.⁴⁴

2.1.3.1. Cepa del hongo *Trichophyton rubrum*

Trichophyton rubrum es un hongo dermatofito moniliáceo, hialino, con estructuras de fructificación que infecta a tejidos queratinizados como uñas, pelo y estrato córneo de la piel.^{45, 46, 47, 48}

Macroscópicamente, las colonias son de color blanco algodonoso y de consistencia dura.^{49, 50} La cepa granular se caracteriza por colonias planas que carecen de micelio aéreo, y semejan polvo de azúcar. La cepa aterciopelada es la más común, con micelio aéreo algodonoso, blanco o moreno pálido, como “colas de conejo”. El reverso de la colonia suele tener un color rosado a rojo, pero en ocasiones puede ser amarillo a marrón, rojo a vino o violeta e, incluso, puede carecer de pigmento. Si se realiza un examen del cultivo se observan hifas largas, delgadas, abundantes microconidias de piriformes a redondeadas de 3,0-5,5 x 2,0-3,5 µm, rara vez hay macroconidias, en forma de puro o cigarrillo, de tamaño variable de pared delgada y multiseptadas.^{51,52}

2.2. VARIABLES

2.2.1. Independiente

Fracciones del extracto etanólico de la corteza de *Byrsonima crassifolia*,
(Indano)

2.2.2. Dependiente

Actividad Antifúngica de las fracciones del extracto etanólico de la corteza
de *Byrsonima crassifolia* (Indano)

2.3. Operacionalización de las variables

Variable Independiente	Definición Conceptual	Definición Operacional	Indicador	Índices	Escala de Medición
Fracción etanólica de la corteza de <i>Byrsonima crassifolia</i> . (Indano)	Producto que se obtuvo mediante el método de extracción por maceración con etanol y posterior filtrado y concentrado en rotavapor y secado.	Fracción A: se tomó 20 g. la fracción A se obtuvo mediante HCL al 1% obteniéndose una fase insoluble y una solución ácida. Se disolvió en cloroformo y se obtuvo la Fracción A (insoluble). Fracción B: la solución ácida se neutralizó con Hidróxido de Amonio y extrajo con cloroformo, dando como resultado la fracción B, se obtuvo además una fase clorofórmica y una fase acuosa. Fracción C: Se obtuvo de la fase acuosa mediante cloroformo: etanol (3:2).	Fracciones: A B C	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Concentración baja: 1 mg/mL ▪ Concentración media: 4 mg/mL ▪ Concentración alta: 32 mg/mL 	Nominal

Variable Dependiente	Definición Conceptual	Definición Operacional	Indicador	Índices	Escala de Medición
Actividad antifúngica	Constituida por el cambio en la pared y membrana celular de los hongos <i>Candida albicans</i> y <i>Trichophyton rubrum</i> causado por agentes químicos externos produciendo una inhibición en el crecimiento del mismo.	Consiste en cuantificar la inhibición del crecimiento micótico producido por la fracción del extracto etanólico en estudio, comparada con el crecimiento del hongo en el mismo medio pero sin el extracto.	Grado de turbidez que presentan los medios de cultivos inoculados con <i>Candida albicans</i> y <i>Trichophyton rubrum</i> expuesta a la Fracción etanólico.	Presencia o ausencia de turbidez en los cultivos de las cepas ensayadas	Nominal

CAPITULO

III

3.1. METODOLOGIA.

3.1.1. METODO DE INVESTIGACION.

3.1.1.1. TIPO DE ESTUDIO.

- **Experimental:** porque se manipularon las variables.
- **Prospectivo:** Porque se desarrolló a través del tiempo.
- **Longitudinal:** Porque permite la recolección sistemática (repetición de ensayos) de las variables involucradas en función del tiempo.

3.1.1.2. DISEÑO DE LA INVESTIGACION.

La investigación estuvo definida en las siguientes etapas (Anexo N°01)

- 1: Recolección de muestra e identificación de la misma.
- 2: Obtención del extracto
- 3: Obtención de fracciones
- 4: Cultivo y confirmación microbiológica los microorganismos utilizados en el ensayo
- 5: Evaluación antifúngica *in vitro*.
- 6: Análisis de los resultados

3.1.2. POBLACION Y MUESTRA.

Población:

- La población vegetal en estudio estuvo constituido por la especie vegetal de *Byrsonima crassifolia*, (Indano)

Muestra:

- Corteza de *Byrsonima crassifolia*, (Indano)

CRITERIOS DE INCLUSION:

Material vegetal identificado.

Material vegetal en buen estado de conservación.

CRITERIOS DE EXCLUSION:

Material vegetal sin una correcta identificación taxonómica.

Material vegetal en mal estado de conservación y que presente signos visibles de descomposición microbiana.

3.1.3. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS.

3.1.3.1. Reactivos.

- Ácido clorhídrico 0.5 M REMEL
- Ácido Sulfúrico 0.2M BBL
- Agua destilada MEDIFARMA
- Carbonato de sodio BIOMERIUX
- Etanol 70° ALCOFARMA
- Cloruro de bario QUELAB

3.1.3.2. Materiales.

3.1.3.2.1. Material biológico.

- *Candida albicans* cepa ATCC 14053
- *Trichophyton rubrum* cepa ATCC 28188

Criterios de Inclusión:

- Cultivos que no presentaron contaminantes
- Cultivos de reciente crecimiento.

Criterios de Exclusión:

- Cultivos que presentaron contaminantes.
- Cultivos de crecimiento antiguo.

3.1.3.2.2. Materiales de vidrio y otros.

3.1.3.2.2.1. Medios de cultivo:

- Agar papa dextrosa (PDA)
- Medio RPMI-1640

3.1.3.2.2.2. Material de vidrio:

- Embudos GERMANY
- Matraz Erlenmeyer de 250 y 500 cc. GERMANY
- Frasco ámbar con tapa- rosca GERMANY
- Matraz Erlenmeyer de 1000 cc. GERMANY
- Micropipeta Pasteur. EXIUN
- Pipetas de 1, 2, 5 y 10 cc. GERMANY
- Probetas de 10, 100, 250 y 1000 cc. GERMANY
- Tubos ensayo con tapa-rosca (75 x 120 mm) GERMANY
- Tubos de ensayo de 5 y 7 cc. GERMANY
- Vasos de precipitado de 5, 10, 20, 50 y 100 cc. GERMANY
- Bagueta de vidrio GERMANY
- Placas Petri GERMANY

3.1.3.2.2.3. Material de metal:

- Asa de Kolle para siembra bacteriológica SIGMA
- Escobillas lava tubos NIUX
- Espátulas medianas TUMI
- Gradilla metálica SIGMA

3.1.3.2.2.4. Otros materiales:

- Algodón
- Detergente
- Guantes quirúrgicos
- Hisopos para medios de cultivo
- Mascarillas
- Papel aluminio
- Papel de despacho
- Parafilm 2'x 250'
- Plumón marcador
- Soportes para tubos

3.1.3.3. Equipos .

- Autoclave AUTESTER
- Balanza analítica SARTORIUS
- Baño termostático SELECTA PRECISTERM
- Cámara fotográfica profesional LUMIX
- Centrifuga CHRIST
- Cocina eléctrica FLIX
- Equipo de filtración MED
- Estufa SELECTA
- Microscopio compuesto OLYMPUS
- Potenciómetro - pH meter CORNING PR 15
- Refrigeradora FRIOLUX
- Rotavapor. BÜCHI

3.1.4. PROCEDIMIENTOS DE RECOLECCION DE DATOS.

3.1.4.1. Recolección de la muestra vegetal:

Las muestras de corteza de *Byrsonima crassifolia*. (Indano) fueron recolectadas en la Reservada Natural Allpahuayo - Mishana, Iquitos,

PERÚ. (3°53'S, 73°25'O, 110-180 m.s.n.m.). (Anexo N° 10), las características de la especie vegetal fueron registradas en el Anexo N° 11.

3.1.4.2. Identificación de la muestra vegetal:

Parte de la muestra vegetal de corteza de *Byrsonima crassifolia*, (**Indano**) fue identificada en el herbarium Amazonense de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP).

La constancia de identificación taxonómica de la especie vegetal fue otorgada por el Herbarium Amazonense de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana. (Anexo N° 09).

3.1.4.3. Obtención del extracto etanólico:

La materia prima restante fue transportada al laboratorio de la Facultad de Industrias Alimentarias dentro de la Planta Piloto de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana ubicada Av. Freyre N° 610 – Iquitos.

El extracto etanólico se obtuvo por maceración de la muestra con etanol de 96° durante 21 días a intervalos de 7 días cada uno, una vez obtenido el extracto, se procedió a la concentración por eliminación del disolvente a presión reducida en rotavapor, a una temperatura de 60°C y a una presión de 690 mm Hg., para luego secar a temperatura ambiente por 7 días. (Anexo N° 02)

3.1.4.4. Obtención de las fracciones etanólicas (Anexo N° 12).

3.1.4.4.1. Fracción A: Del extracto etanólico total, se procedió a tomar 20 g. de muestra seca al cual se agregó 200 ml de HCL al 1% dando un pH 2 y luego se filtró obteniéndose una fase insoluble y una solución ácida. A partir de la fase insoluble se lavó con agua destilada y disolvió en cloroformo, luego se filtró y secó con 25 g de sulfato de sodio (NaSO₄) dando como resultado la Fracción A (insoluble).

3.1.4.4.2. Fracción B: De la solución ácida se neutralizó con Hidróxido de Amonio y extrajo con cloroformo (4 lavadas de 100 ml cada una), dando como resultado la fracción B clorofórmica, la que luego fue secada y filtrada con 25 g de sulfato de sodio obteniéndose una fase clorofórmica y una fase acuosa.

3.1.4.4.3. Fracción C: A la fase acuosa se agregó 25 g de sulfato de sodio (0,1 gr. por ml de solución), y luego se extrajo con cloroformo (7 lavadas de 100 ml c/u), dando como resultado la fracción C clorofórmico etanolico y una fase acuosa remanente.

3.1.4.5. Evaluación de la actividad antifúngica:

El procedimiento fue realizado según los protocolos establecidos en el Protocolo M38-P, elaborado por la NCCLS y modificado por Espinoza et al (2005).^{23, 53} En el ensayo se utilizó como control negativo el solvente (Agua destilada estéril) utilizado en la disolución de los extractos y como control positivo se utilizó el Fluconazol (200mg/100mL – Concentración Comercial).⁵⁴

3.1.4.5.1. El método de macrodilución para hongos⁴⁴

3.1.4.5.1.1. Preparación del inóculo (Anexo N° 04)

- a. Se seleccionó cuatro a cinco colonias bien aisladas, del mismo tipo morfológico, de *Candida albicans* y esporas de *Trichophyton rubrum* cultivadas en placas con agar papa dextrosa (Anexo N° 12)
- b. Se ajustó la turbidez del inóculo con solución salina o caldo apropiado hasta el tubo 0.5 de la escala de Mc. Farland, por comparación visual con el estándar.
- c. La suspensión preparada contiene aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.
- d. Se realizó una dilución 1:100 del inóculo, disolviendo 0,1 mL del inóculo en 9,9 mL de medio RPMI-1640.

3.1.4.5.1.2. Preparación de diluciones.

A. Extractos.

- Se pesaron 32 mg del extracto en tubos de microcentrífuga estériles, se diluyó en 0,5 ml de agua estéril para alcanzar una concentración de prueba de 640 mg/ ml (Solución madre o Stock)
- De la solución madre se tomó 0.1 ml y será añadido al tubo N° 01 que contendrá 0.9 ml de medio RPMI-1640.
- Del tubo N° 01 se tomó 0.5 ml para ser añadido al Tubo N° 02 que contiene 0.5 mL de RPMI-1640 y se homogenizó, se realizó diluciones seriadas hasta llegar al tubo N°08
- Del tubo N° 08 se tomó 0.5 ml que fue desechado.
- Después de este proceso se agregó a todos los tubos 0.5 ml de la suspensión de microorganismos (*Candida albicans* y *Trichophyton rubrum*).
- El volumen final mínimo, en cada tubo, será de 1 mL.
- Las concentraciones estuvieron comprendidas entre los rangos de 32 mg/ml a 0.25 mg/mL, teniendo como control de crecimiento el tubo N° 09. (Anexo N° 05)

B. Control.

- El control positivo empleado en la prueba fue el antifúngico fluconazol (200 mg/100mL), del cual se utilizó 512 µL y añadió en 488 µL de medio RPMI-1640 en un tubo de microcentrífuga estéril para obtener una solución madre o stock de 1024 ug/ml (Tubo N° 01).
- Del tubo N° 01 se tomó 0.5 ml para ser añadido al Tubo N° 02 que contiene 0.5 mL de RPMI-1640 y se homogenizó, se realizó diluciones seriadas hasta llegar al tubo N°08
- Del tubo N° 08 se tomó 0.5 ml que fue desechado.
- Después de este proceso se agregó a todos los tubos 0.5 ml de la suspensión 1/100 de microorganismos (*Candida albicans* y *Trichophyton rubrum*).
- El volumen final mínimo, en cada tubo, fue de 1 mL.

- Las concentraciones estuvieron comprendidas entre los rangos de 512 µg/ml a 2 µg/mL, teniendo como control de crecimiento el tubo N° 09. (Anexo N° 06)

3.1.4.5.1.3. Incubación.

El tiempo de incubación para *Candida albicans* es de 24 horas y para *Trichophyton rubrum* es de aproximadamente 5 días.

3.1.4.5.1.4. Lectura e interpretación de la CIM.

La CIM corresponde a la mínima concentración de antifúngico y extracto en donde se observó que el sobrenadante es de color fucsia, lo que indica ausencia de crecimiento debido a la falta de producción de compuestos que realizan el viraje del medio a color naranja. La CIM se expresa en mg/mL en los extractos y fracciones, mientras que el antifúngico es expresado en µg/mL.

3.2. ASPECTOS ETICOS.

El experimento se realizó siguiendo los principios de las 3 R (Reducción, Refinamiento, Reemplazo), en la cual se pudo Reducir a cero el número de animales; se refinaron las pruebas experimentales por un método alternativo de mayor sensibilidad y se reemplazaron por un método alternativo *in vitro*.⁵⁴El área de microbiología donde se realizan los ensayos experimentales, constituye un medio ambiente de trabajo especial que puede presentar riesgos de enfermedades infecciosas para las personas que trabajan en el laboratorio o cerca de él. Por ello se contará con estrictas medidas de bioseguridad.⁵³

3.3. PLAN DE ANALISIS E INTERPRETACION.

Los datos y el análisis estadísticos fueron registrados en los programas Microsoft Excel 2013 y el programa SPSS versión 22 para Windows. Se presentan los resultados en tablas de frecuencias, cuadros y gráficos, la correlación se analizó con tablas de P<0.05 con un grado de confianza del 95%.

CAPITULO

IV

4.1. RESULTADOS

Tabla N° 01: Porcentaje de Rendimiento de las fracciones obtenidas

COMPUESTO	Gramos	Porcentaje de rendimiento (%)
Extracto Etanólico	20.00	----
Fracción A	0.10	0.50
Fracción B	0.12	0.60
Fracción C	0.09	0.45

Leyenda: (---) Sin determinar

En la tabla N° 01 se observa el porcentaje de rendimiento obtenido de cada fracción a partir del extracto etanólico de la corteza de *Byrsonima crassifolia*, observando mayor porcentaje de rendimiento en la fracción B.

Tabla N° 02: Concentración Mínima Inhibitoria (expresados en mg/ml) del extracto etanólico frente a los microorganismos en estudio

COMPUESTO	<i>Candida albicans</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>
	Concentración Mínima Inhibitoria (mg/mL)	
Etanólico	8	---

Leyenda: (---) No presenta actividad antifúngica.

En la tabla N° 02 se observa que la concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico de la corteza de *Byrsonima crassifolia* es de 8 mg/mL frente a *Candida albicans*, el extracto no mostró actividad frente a *Trichophyton rubrum*.

Tabla N° 03: Concentración Mínima Inhibitoria (expresados en mg/ml) de la fracción A frente a los microorganismos en estudio

COMPUESTO	<i>Candida albicans</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>
	Concentración Mínima Inhibitoria (mg/mL)	
Fracción A	2	---

Leyenda: (---) No presenta actividad antifúngica.

En la tabla N° 03 se observa que la concentración mínima inhibitoria de la fracción A del extracto etanólico de la corteza de *Byrsonima crassifolia* es de 2 mg/mL frente a *Candida albicans*, la fracción A no mostró actividad frente a *Trichophyton rubrum*

Tabla N° 04: Concentración Mínima Inhibitoria (expresados en mg/ml) de la fracción B frente a los microorganismos en estudio

COMPUESTO	<i>Candida albicans</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>
	Concentración Mínima Inhibitoria (mg/mL)	
Fracción B	1	---

Leyenda: (---) No presenta actividad antifúngica.

Se observa que la concentración mínima inhibitoria de la fracción B del extracto etanólico de la corteza de *Byrsonima crassifolia* es de 1 mg/mL frente a *Candida albicans*, la fracción B no mostró actividad frente a *Trichophyton rubrum*

Tabla N° 05: Concentración Mínima Inhibitoria (expresados en mg/ml) de la fracción C frente a los microorganismos en estudio

EXTRACTO	<i>Candida albicans</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>
	Concentración Mínima Inhibitoria (mg/mL)	
Fracción C	---	---

Leyenda: (---) No presenta actividad antifúngica.

En la tabla N° 05 se observa que la fracción C del extracto etanólico de la corteza de *Byrsonima crassifolia* no mostró actividad frente a *Candida albicans* y *Trichophyton rubrum*

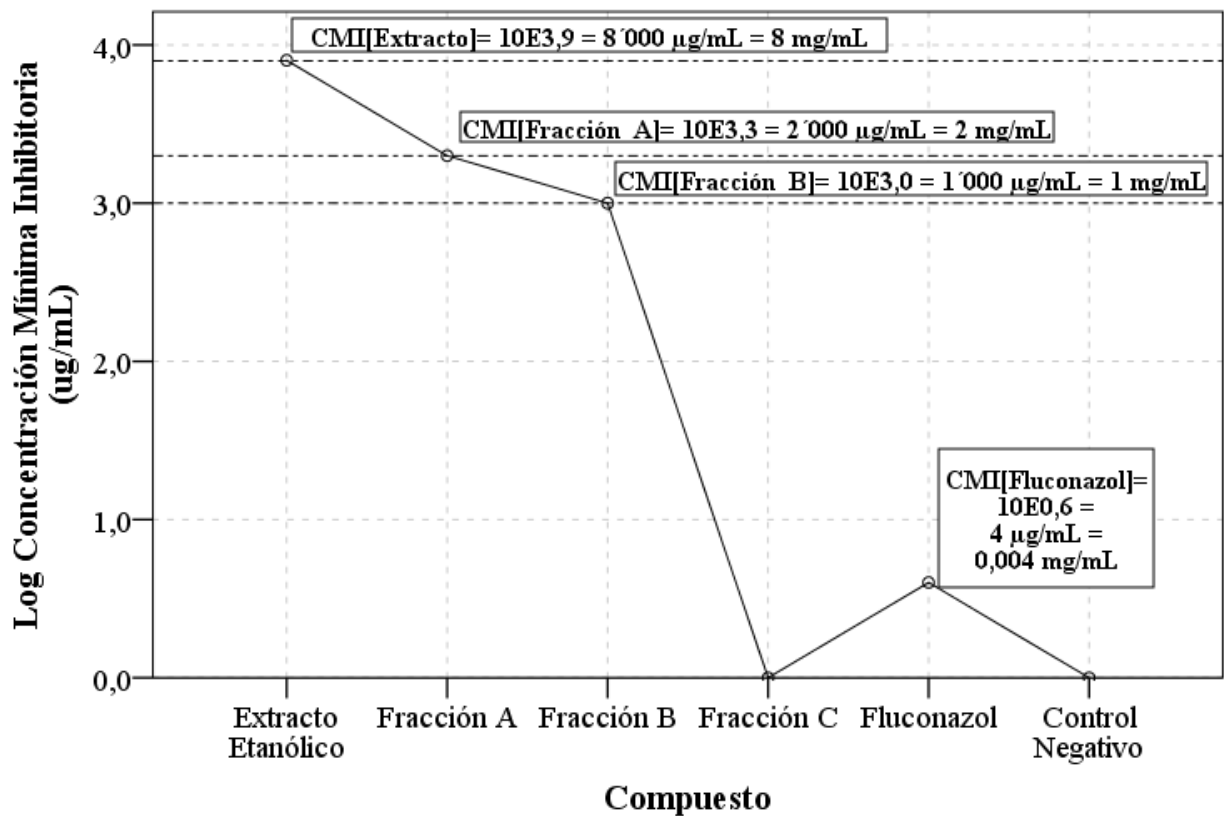
Tabla N° 06: Concentración Mínima Inhibitoria (expresados en µg/ml) del fluconazol frente a los microorganismos en estudio

EXTRACTO	<i>Candida albicans</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>
	Concentración Mínima Inhibitoria (µg/mL)	
Fluconazol	4	8

Leyenda: (---) No presenta actividad antifúngica.

Se observa que la concentración mínima inhibitoria del fluconazol es de 4 µg/mL frente a *Candida albicans*, y de 8 µg/mL frente a *Trichophyton rubrum*.

Figura N° 01: Concentración Mínima Inhibitoria de los extractos y compuestos frente a *Candida albicans*

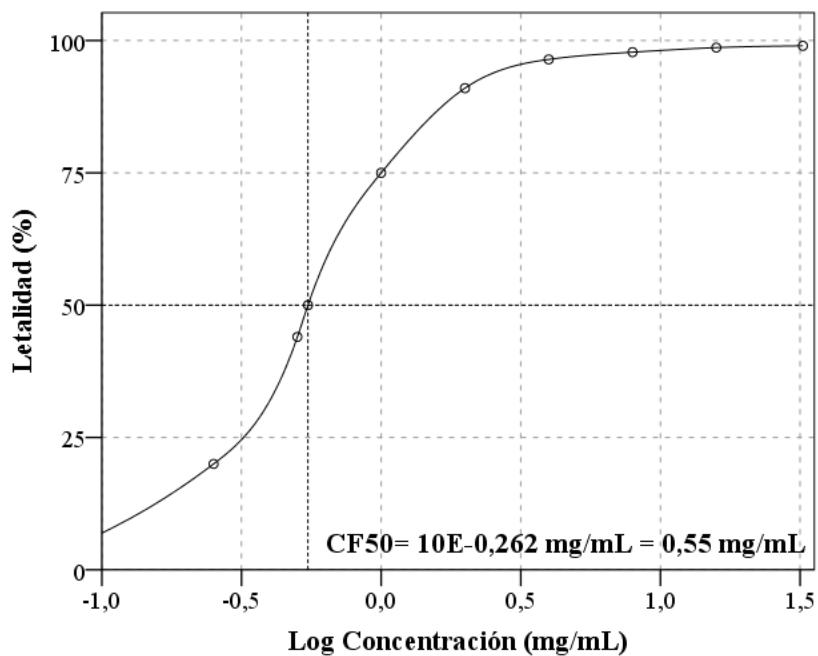


Leyenda: (CMI) Concentración Mínima Inhibitoria

$$CMI[\text{Extracto/Control positivo}] = 10^x = [\mu\text{g/mL}] = [\text{mg/mL}].$$

En la figura N° 01 se observa la concentración mínima inhibitoria de las fracciones obtenidas del extracto etanólico de la corteza de *Byrsonima crassifolia* y se aprecia que la fracción con mejor actividad fue la fracción B con una CMI de 1 mg/mL.

Figura N° 02: Representación gráfica de la concentración del extracto etanólico que mata al 50 % de la población de *Candida albicans* (CF₅₀)

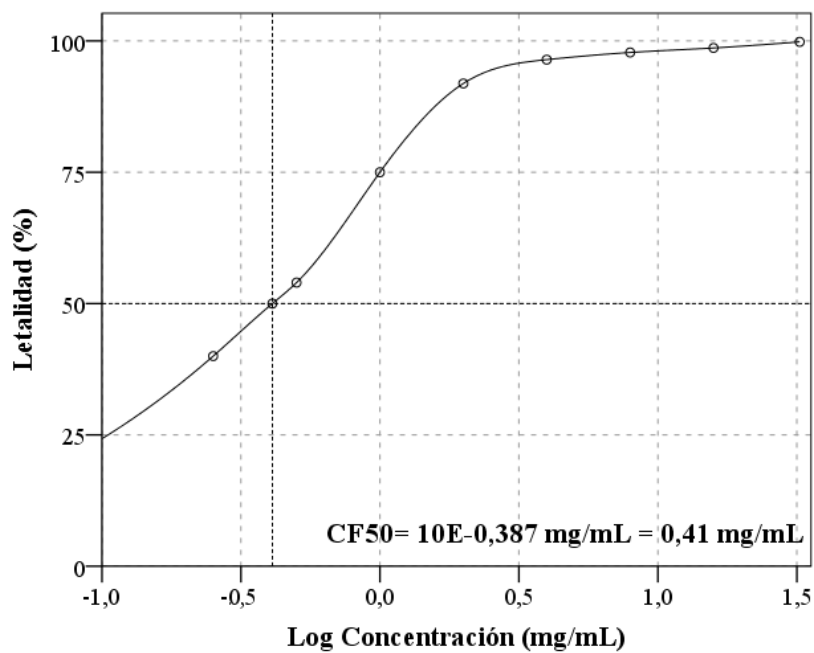


Leyenda: (CF₅₀) Concentración Fungicida 50

$$CF_{50} = 10^X = [\text{mg/mL}].$$

En la figura N° 02 se observa que la concentración fungicida que mata el 50 % de la población de *Candida albicans* del extracto etanólico de la corteza de *Byrsonima crassifolia* es de 0,55 mg/mL.

Figura N° 03: Representación gráfica de la concentración de la Fracción A que mata al 50 % de la población de *Candida albicans* (CF₅₀)

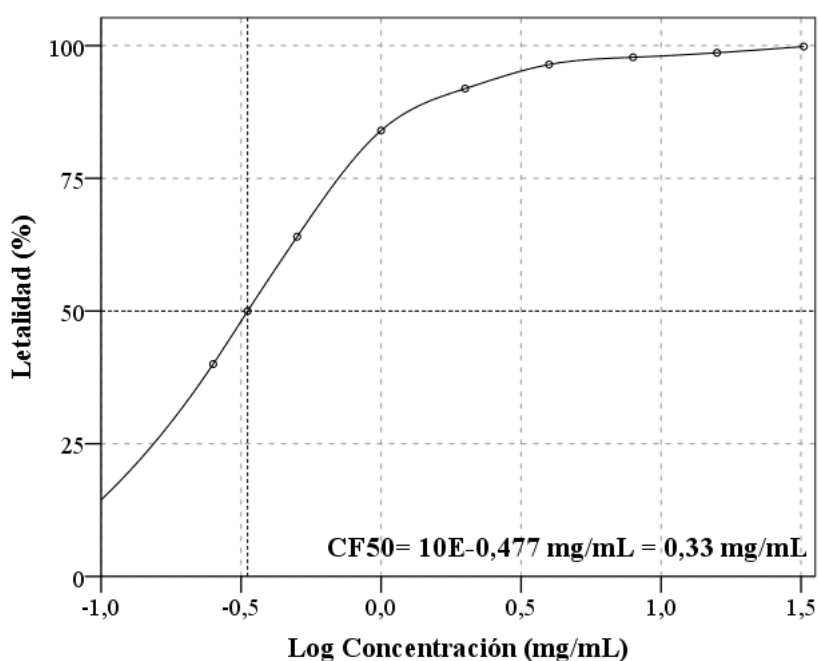


Leyenda: (CF₅₀) Concentración Fungicida 50

$$CF_{50} = 10^X = [\text{mg/mL}].$$

En la figura N° 03 se observa que la concentración fungicida que mata el 50 % de la población de *Candida albicans* de la fracción A obtenida del extracto etanólico de la corteza de *Byrsonima crassifolia* es de 0,41 mg/mL.

Figura N° 04: Representación gráfica de la concentración de la Fracción B que mata al 50 % de la población de *Candida albicans* (CF₅₀)

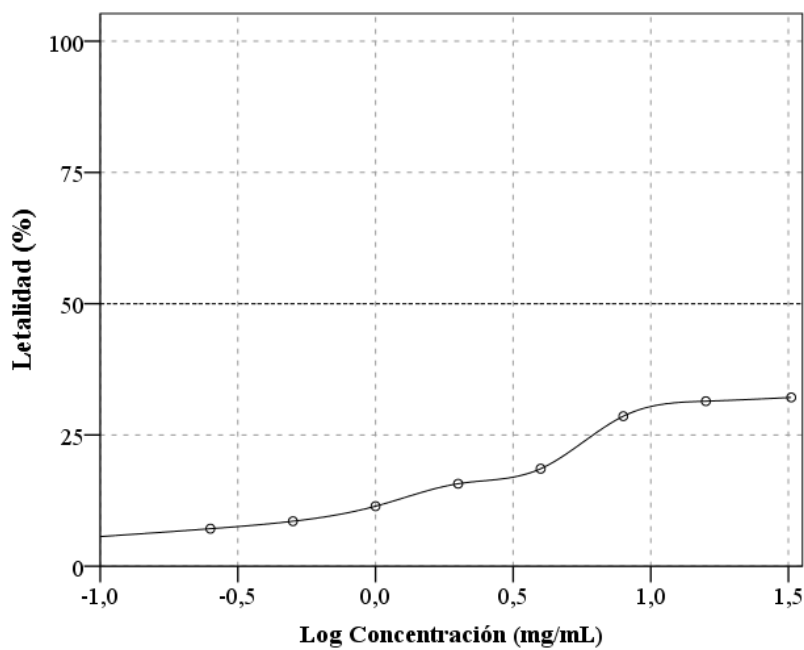


Leyenda: (CF₅₀) Concentración Fungicida 50

$$CF_{50} = 10^X = [\text{mg/mL}].$$

En la figura N° 03 se observa que la concentración fungicida que mata el 50 % de la población de *Candida albicans* de la fracción B obtenida del extracto etanólico de la corteza de *Byrsonima crassifolia* es de 0,41 mg/mL.

Figura N° 05: Representación gráfica de la concentración de la Fracción C que mata al 50 % de la población de *Candida albicans* (CF₅₀)

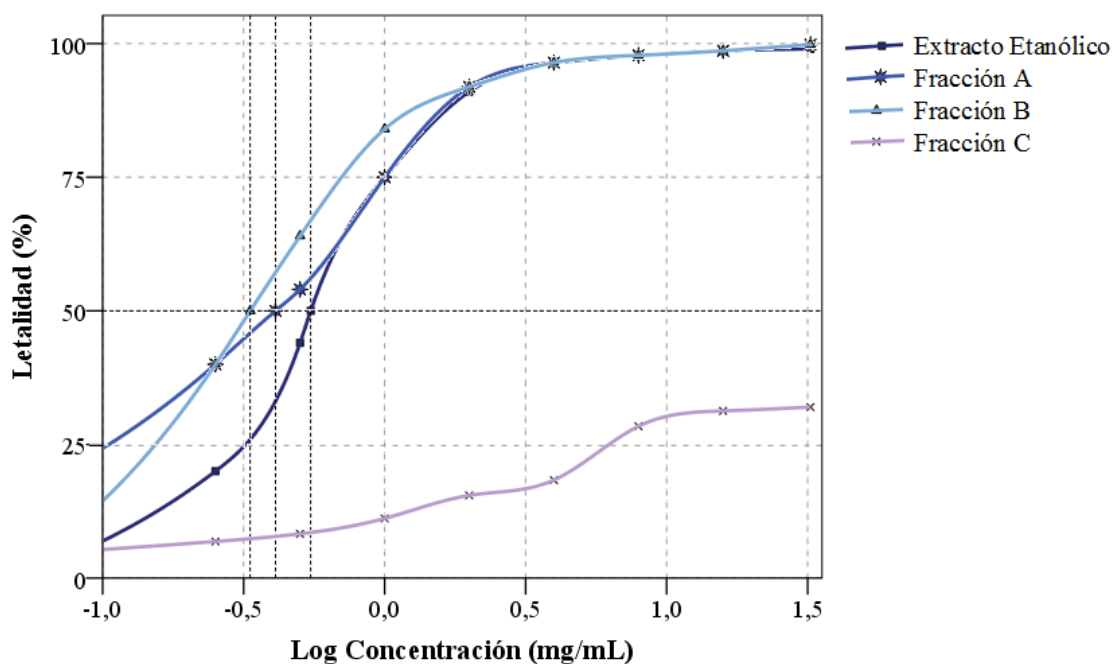


Leyenda: (CF₅₀) Concentración Fungicida 50

CF₅₀ = 10^X = [mg/mL].

En la figura N° 03 se observa que la fracción C obtenida del extracto etanólico de la corteza de *Byrsonima crassifolia* no presenta concentración fungicida.

Figura N° 06: Representación gráfica de la concentración de los compuestos que matan al 50 % de la población de *Candida albicans* (CF₅₀)

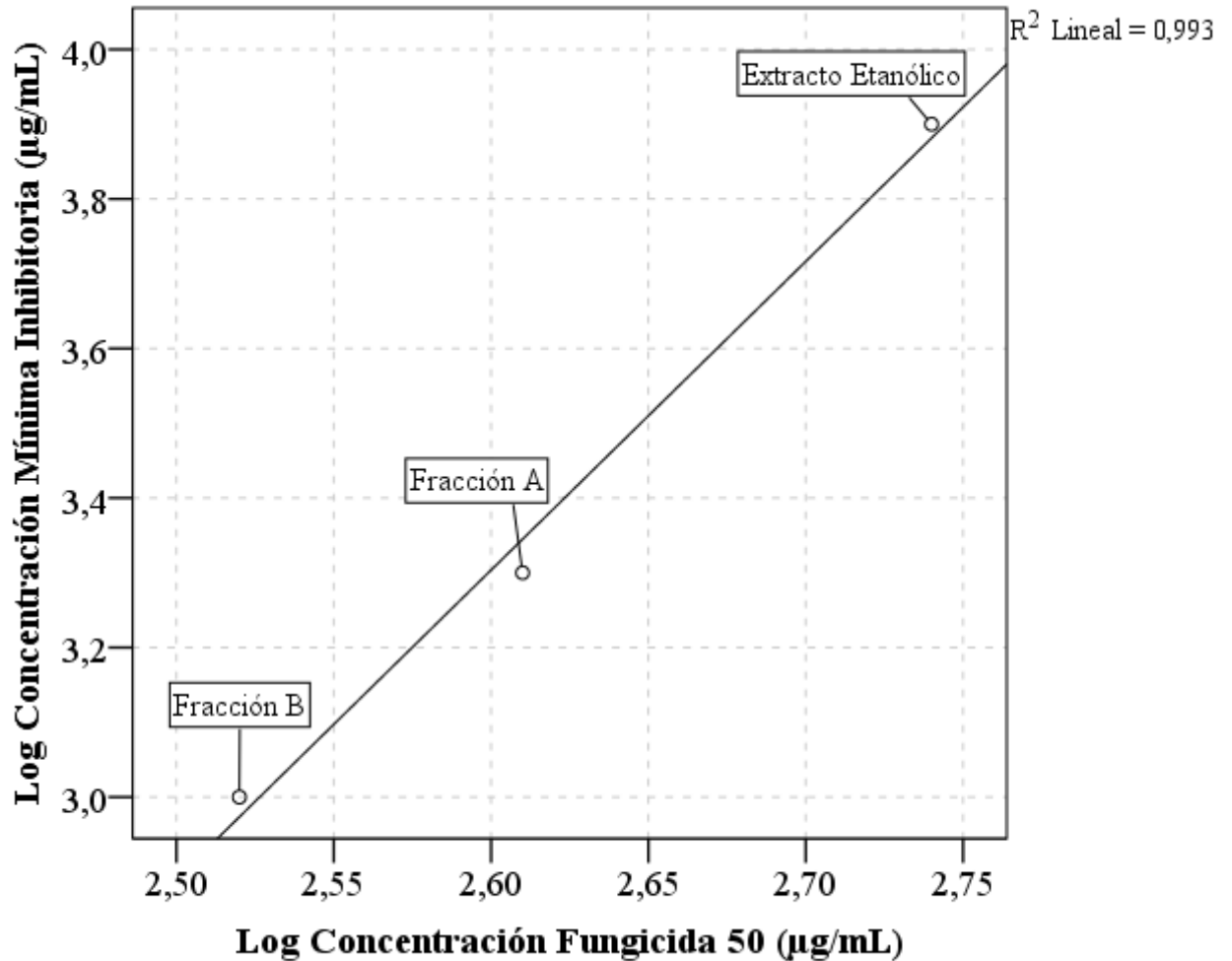


Leyenda: (CF₅₀) Concentración Fungicida 50

$$CF_{50} = 10^X = [\text{mg/mL}].$$

En la figura N° 04 se observa que concentración fungicida que mata el 50 % de la población de *Candida albicans* de las fracciones obtenidas del extracto etanólico de la corteza de *Byrsonima crassifolia*, se observa que la fracción con mejor concentración fungicida es la fracción B

Figura N° 07: Concentración Mínima inhibitoria ($\mu\text{g/mL}$) vs Concentración Fungicida 50 ($\mu\text{g/mL}$)



En la figura N° 07 se observa un gráfico de dispersión entre la concentración mínima inhibitoria y la concentración fungicida 50 de las fracciones y el extracto etanólico obtenida de la corteza de *Byrsonima crassifolia* es de 0,41 mg/mL.

Tabla N° 07: Correlación de Pearson entre Concentración Mínima inhibitoria ($\mu\text{g/mL}$) y la Concentración Fungicida 50 ($\mu\text{g/mL}$)

		Log Concentración Mínima Inhibitoria ($\mu\text{g/mL}$)	Log Concentración Fungicida 50 ($\mu\text{g/mL}$)
Log Concentración Mínima Inhibitoria ($\mu\text{g/mL}$)	Correlación de Pearson	1	0,996
	Sig. (bilateral)		0,054
	N	3	3
Log Concentración Fungicida 50 ($\mu\text{g/mL}$)	Correlación de Pearson	0,996	1
	Sig. (bilateral)	0,054	
	N	3	3

Tabla N° 08: Estadístico de asociación entre Concentración Mínima inhibitoria ($\mu\text{g/mL}$) y la Concentración Fungicida 50 ($\mu\text{g/mL}$)

	t	Sig.
(Constante)	-7,996	0,079
Log Concentración Fungicida 50 ($\mu\text{g/mL}$)	<u>11,662</u>	<u>0,054</u>

a. Variable dependiente: Log Concentración Mínima Inhibitoria ($\mu\text{g/mL}$)

Grados de Libertad = 2

T(crítico)= 4,303

En la tabla N° 07 se observa el coeficiente de Pearson determinando que existe una muy buena relación entre la concentración mínima inhibitoria y la concentración fungicida 50.

4.2. DISCUSION

Para la validación del protocolo de evaluación antifúngica *in vitro* se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) del fluconazol (control positivo), determinando que 4 µg/mL y 8 µg/mL inhibieron el crecimiento de *Candida albicans* y *Trichophyton rubrum* respectivamente. Al respecto “Natonal Clinical and Laboratory Standards Intitute”,⁴⁰ en su manual de referencia para la evaluación de antifúngicos por el método de dilución corrobora la sensibilidad al antifúngico de las cepas utilizadas, coincidiendo con los resultados obtenidos por Scavino et al (2015) quién determinó una CMI de 2,5 µg/mL y 3,12 µg/mL frente a *Candida albicans* y *Trichophyton rubrum* respectivamente.²³ Para ambos microorganismos Quiñónez (2014) determinó que la CMI del fluconazol era de 7,8 µg/mL.⁵⁷

Respecto a la información fitoquímica, se determinó la presencia de Taninos, Flavonoides, Lactonas y Azúcares reductores (Anexo N° 13). Scavino (2015) obtuvo un rendimiento de extracto de 66 % determinando la presencia de metabolitos secundarios como taninos, flavonoides, lactonas y azúcares reductores, lo que coincide por lo encontrado en el presente estudio;²³ como complemento a esta información Silva (2007) determinó la presencia de polifenoles en esta especie y destacó la importancia de estos debido a su potencial antioxidante con capacidad protectora frente a diversas afecciones, encontrado una importante cantidad de ellos en la muestra.⁵⁵

En el estudio de la actividad biológica del extracto etanólico de la corteza de *Byrsonima crassifolia* “Indano”, se observó que el extracto presenta actividad antifúngica contra hongos levaduriformes (*Candida albicans*) a una concentración de 8 mg/mL, que difiere de lo expresado por Scavino (2015) pues este autor refiere que la concentración mínima inhibitoria de esta especie es de 1,5625 mg/mL.²³ Cáceres (1996) determinó que el extracto etanólico de la corteza de *Byrsonima crassifolia* presenta actividad antifúngica frente a aislados clínicos de *Candida albicans*, teniendo como resultado 90% de efectividad,^{51,52} así mismo Quiñónez determinó la actividad antifúngica del extracto etanólico de la corteza de *Byrsonima crassifolia* y coincide en afirmar que esta especie vegetal presenta una buena actividad antifúngica frente a *Candida albicans*, en adición a esto, nuestros resultados coinciden con lo expresado por Quiñónez (2014) en cuanto a la actividad nula frente a *Trichophyton rubrum* pues los resultados obtenidos en este

estudio demuestran que el extracto etanólico de la corteza de *Byrsonima crassifolia* no presenta actividad antifúngica frente a *Trichophyton rubrum*.⁵⁷ En ese sentido nuestros resultados difieren con lo expresado por Scavino (2015) quienes determinaron que la CMI del extracto etanólico de la corteza de esta especie es de 0.39063 mg/mL;²³ de igual manera Monroy R. (2011) y Quiñonez (2014) evaluaron la actividad antimicótica de esta especie vegetal frente a *Trychophyton rubrum* determinando una CMI de 0,5 mg/mL y 0.625 mg/mL respectivamente.^{56,57}

Respecto al estudio de la actividad antifúngica de las fracciones obtenidas se determinó que las fracciones A y B mostraban inhibición del crecimiento y actividad fungicida frente a *Candida albicans*, siendo la fracción B la de mayor importancia frente a *Candida albicans*. Respecto a la actividad antifúngica de fracciones aisladas de esta especie vegetal, Rivero (2009) aisló 8 compuestos de *Byrsonima crassifolia* y determinó que ellos presentaban muy buena actividad antifúngica del extracto etanólico contra *Candida albicans*,²² entonces pues no cabe duda que al obtener las fracciones del extracto etanólico de la corteza de *Byrsonima crassifolia*, también aumenta el grado de pureza del compuesto responsable de la actividad antifúngica *in vitro*, lo que justifica el incremento de la actividad biológica demostrada por una menor cantidad de compuesto necesaria para inhibir el crecimiento de los microorganismos.

Se determinó la concentración fungicida del extracto etanólico y las fracciones A y B obtenidas de la corteza de *Byrsonima crassifolia*, evidenciando que la concentración fungicida 50 (CF₅₀) era de 0,55 mg/mL, 0,41 mg/mL y 0,33 mg/mL respectivamente, así mismo se determinó que la fracción C no presenta actividad fungicida (Figura N° 05).

En adición al estudio se determinó el coeficiente de Pearson para determinar si existía correlación entre la Concentración Mínima inhibitoria (µg/mL) y la Concentración Fungicida 50 (µg/mL) de los compuestos estudiados, obteniendo un $r=0,996$ que indica que existe una muy buena correlación entre ambas variables, así mismo se calculó el estadístico de prueba de Pearson obteniendo un $T_{\text{calculado}}=11,662$ ($T_{\text{crítico}}= 4,303$; $p=0,054$) con lo que se concluye que con un error de 5,4 % la Concentración Mínima inhibitoria de los compuestos estudiados se correlaciona con la Concentración Fungicida₅₀, lo que demuestra que mientras más se purifique el compuesto mediante el

fraccionamiento menor será la concentración fungicida y menor será la Concentración Mínima Inhibitoria.

Queda demostrado que la especie vegetal *Byrsonima crassifolia* puede ser considerada como una importante fuente antimicrobiana pues además del estudio de la actividad antifúngica *in vitro* existen reportes como el de Guerra (2013) en el que indican que la concentración mínima inhibitoria de este extracto para *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, es de 16 mg/ml. Otros reportes como el de Rodríguez (2014) indican que la fracción B y C, obtenida por el mismo procedimiento utilizado en este estudio, mostró una buena actividad frente a *Staphylococcus aureus* (1 mg/mL y 7 mg/ml respectivamente)

En cuanto a los metabolitos secundarios Quiñónez supone una estrecha asociación entre los triterpenos, taninos y flavonoides con la actividad frente a *Candida albicans*, posiblemente por inhibición de la síntesis de ergosterol o de otros esteroides de la pared celular.⁵⁷ Además se han identificado dos triterpenos (α y β Amirina) a los que se atribuye acción antifúngica, Fernández (2004) atribuye diversos mecanismos de acción de la β Amirina que dependen de su naturaleza fisicoquímica como son la densidad electrónica y la propiedad hidrofobia que además tiene una acción depresora sobre la tensión superficial, el cual altera la selectividad de la membrana citoplasmática para intercambio de sustancias provocando la muerte del microorganismo.⁶⁰

Finalmente respecto a la toxicidad de esta especie vegetal Fernández (2012) asegura que el extracto diclorometánico de la corteza no presentó toxicidad; en cuanto al extracto hidroalcohólico la DL₅₀ fue de 1,5 g/kg de peso.⁶¹

4.3. CONCLUSION

- ✓ Se realizó el tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de la corteza de *Byrsonima crassifolia*, (Indano), determinando la presencia de Taninos, Flavonoides, Lactonas y Azúcares reductores.
- ✓ Se obtuvieron las fracciones del extracto etanólico de la corteza de *Byrsonima crassifolia* (Indano).
- ✓ Se realizó el cultivo de *Candida albicans* y *Trichophyton rubrum* y realizó la identificación microbiológica respectiva.
- ✓ Se determinó el efecto antifúngico *in vitro* frente a *Candida albicans* y *Trichophyton rubrum* del control positivo (fluconazol) obteniendo una CMI de 4 µg/mL y 8 µg/mL respectivamente.
- ✓ Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) *in vitro* del extracto etanólico de la corteza de *Byrsonima crassifolia*, (Indano), mediante el método de macrodilución frente a *Candida albicans* obteniendo una CMI de 8 mg/mL y se **determinó que no presenta actividad frente a *Trichophyton rubrum***
- ✓ Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) *in vitro* de las fracciones A, B y C obtenidas del extracto etanólico de la corteza de *Byrsonima crassifolia*, (Indano), mediante el método de macrodilución frente a *Candida albicans* obteniendo una CMI de 2 mg/mL y 1 mg/mL (A y B respectivamente), **la fracción C no presenta actividad antifúngica frente a *Candida albicans***
- ✓ Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) *in vitro* de las fracciones A, B y C obtenidas del extracto etanólico de la corteza de *Byrsonima crassifolia*, (Indano), mediante el método de macrodilución frente a *Trichophyton rubrum* **determinando que ninguna fracción presenta actividad antifúngica frente a este hongo.**
- ✓ Se determinó la Concentración Fungicida₅₀ (CF₅₀) *in vitro* del extracto etanólico y las fracciones A, B y C obtenidas de la corteza de *Byrsonima crassifolia*, (Indano), frente a *Candida albicans* obteniendo una CF₅₀ de 0,55 mg/mL, 0,41 mg/mL y 0,33 mg/mL (Extracto Etanólico, A y B respectivamente), **la fracción C no presenta actividad fungicida frente a *Candida albicans***

4.4. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar el estudio de actividad farmacológica tanto del extracto etanólico como de las fracciones frente a otros microorganismos de importancia clínica.

Continuar el fraccionamiento a partir de las fracciones A, B y C obtenidas del extracto etanólico de la corteza de *Byrsonima crassifolia* (**Indano**) pero con orientación farmacológica (fraccionamiento bioguiado), para lo cual son muy útiles ensayos como bioautografía en el que se pueden estudiar compuestos o grupos de ellos mediante la aplicación de una pequeña cantidad de muestra en un cromatofolio.

4.5. BIBLIOGRAFIA

1. Méndez J., López R., Hernández F. 2004. "Micosis superficiales. Dermatofitos. Micología Médica". México, UNAM, pág. - 5 (2): 109-142.
2. Souza V, Castillo A, Rocha M. 2001. "Ecología evolutiva de *Hongos filamentosos*". INCI; 26(10): 513-17.
3. Amparo H, Patricia C, Ramón F, Roberto A. 2005. "Dermatofitosis por *Trichophyton rubrum*. Experiencia de 10 años (1996-2005) en un servicio de dermatología de un hospital general de la Ciudad de México". Departamento de Micología del Hospital General Dr. Manuel Gea González, México, pág - 5(3): 164 - 169
4. Rinaldi G: Dermatophytosis. 2000. "Epidemiological and microbiological update". J.A. A.D. pág - 43(5):120-124.
5. Al Sogair S, Hay R. 2000. "Fungal infection in children: *Tineacapitis*". C.D. pág – 18(2):679-85
6. Rodríguez J. 2000. "Dermatofitosis: Algunos aspectos epidemiológicos del Hospital Regional Docente de Trujillo de 1994 a 1998". Trujillo. U.N.A.T. pág – 2(3): 68 72
7. Wade K, Ghannoum A, Elewski E. 2002. "Epidemiologic surveillance of cutaneous fungal infection in the United States from 1999 to". J.A.A.D. pág 5(10): 748-752
8. Ostrosk Z. 2003. "New approaches to the risk of *Candida* in the intensive care unit". *O. I. D.* pág, 6 (16): 533-537.
9. Schwinn A, Ebert J, Bröcker B. 1995. "Frequency of *Trichophyton rubrum* in *Tinea capitis*". *Mycoses*; pág - 4 (38): 1-7
10. Weitzman I, Summerbell R. 1995. "The dermatophytes. *Rev. C. Micro*". pág - 4 (8): 240-59.
11. Elgueta E. 2007. "Validacion farmacologica de la actividad diurética de las infusiones de hojas de *Petivera allicea* L. (apacin) hojas de *Ocimum basilicum* L.(albahaca)". Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. *Rev. C. Micro*: pág – 7(13): 186 - 192
12. Gonzales M, Ramirez D. 2007. "Antecedentes y situación reguladora de la medicina herbaria en Cuba". U.A. E. M. pág – 45(3): 36 - 45

13. Balbachas A, Herminio, R. 1999. "Las plantas curan" .E.E.U.U., R. H. P. A. pág – 7(9). 377 – 379.
14. Guánchez, F. 1999. "Plantas Amazónicas de Uso Medicinal y Mágico". Brasil, pág – 4(3): 234- 245
15. Richard E, Robert F. 1992. "The Healing Forest". M. T. P. N. A. pág - 5(2): 645 - 652
16. Farnsworth E, Gonzales A. 1989. "Guide to the Visitor's Natural History Trail, La Selva". O.T.S. ,Costa Rica, pág – 12(9): 456- 467
17. Brako L, Zarucchi J. 1993. "Catalogue of the Flowering Plants and *Gymnosperms* of Perú". Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden. pág - 5(45): 124 - 127
18. Brack E. 1995. "El Oro Verde del Perú – Plantas Naturales". pág – 3(14): 246 - 248
19. Bejar E, Malone H. 1993. "Pharmacological and chemical screening of *Byrsonima crassifolia*, and medical tree of Mexico". Journal of Ethnopharmacology. pág - 39(2): 141 – 158, 1993.
20. Argueta A, Cano A, Rodarte E. 1994. "Atlas de las plantas de la medicina tradicional Mexicana II, I". N. I. pág – 16(9): 1032 – 1033
21. Gentry R.1988. "Changes in plant comunidad y diversity and floristic composition on environmental and geographical gradients". Missouri Bot. Gard., pág - 7(75): 1-34.
22. Fausto J, Benítez G, Casimiro X, Rivero B.2009. "Antibacterial Compounds Isolated From *Byrsonima crassifolia*". Rev. Latino-americana de Química. pág – 4(7): 2003 20111
23. Scavino R, Saldaña C.2015 "Evaluación de la Actividad Antifúngica *In Vitro* del Extracto Etanólico de la Corteza de *Byrsonima crassifolia* (Indano) frente a *Candida albicans* y *Trichophyton rubrum*, por el Método de Macrodilución", Universidad Nacional de la Amazonia Peruana - Facultad de Farmacia y Bioquímica Pág. – 9
24. Avitia E, Castillo G.2011. "Taxonomía y nomenclatura de especies frutícolas. Departamento de Fitotecnia". México. pág – 45(6): 61 - 71.
25. Vásquez Z, Bátiz M, Alcocer S, Sánchez D.1999. "Árboles y Arbustos Potencialmente valiosos para la Restauración Ecológica y la Reforestación". CONABIO México pág – 23(11): 311 - 312.

26. Cordero J, Boshier H.2003. “Árboles de Centroamérica. Un Manual para Extensionistas”. CATIE. San José, Costa Rica. pág – 8(9): 1079 - 1086
27. Cavalante B.1996. “Frutas Comestíveis da Amazônia”. Museu Paraense Emilio Goeldi. Coleção Adolpho Ducke, Brasil. pág – 10(14): 279 - 286.
28. Villachica H.1996. “Frutales y Hortalizas promisorias de la Amazonia. Tratado de Cooperación Amazónica”. Rev. Pro Tempore. Perú. pág – 10(5): 367 -377.
29. Pennington T., Sarukhán J.2005. “Arboles tropicales de México. Manual para la identificación de las principales especies”. U.N.A.M. Instituto de Ecología. México pág – 13(3): 304 -305.
30. Moreno N. 2000. “El nance [(*Byrsonima crassifolia* L) H.B.K.] como recurso natural antimicrobiano en enfermedades gastrointestinales y respiratorias”. Rev. U. C. A. Chiapas, México. pág – 15(7):74 - 85.
31. Oliveira R, Leitao G, Santos S, Bizzo R, Lopes D, Alviano S. “Ethnopharmacological study of two *Lippia species* from Oriximiná, Brazil”. J. Ethnopharmacol. pág – 108(24): 103-108.
32. Ayala F.1984. “Notes on some medicinal and poisonous plants of Amazonian Peru”. Rev. Economy Botany. 1. pág – 4(9).1-8.
33. Juárez C.1998. “La Familia Malpighiaceae en el estado de Morelos2. Facultad de Ciencias Biológicas. Cuernavaca, Morelos. Rev. ASHS PRESS pág – 12(7): 90 - 113
34. Campbell J. 1996. “South American fruits deserving further attention”. Rev. ASHS Press. Arlington, USA. pág – 10(7): 431 – 439, 1996.
35. León J. 2000. “Botánica de los cultivos tropicales”. Rev. Colecciones, Costa Rica. pág -84(3): 523 - 529
36. García R, García M.1992. “Contribución al estudio etnobotánico del Nanche *Byrsonima spp.*, distribución geográfica y alternativas de conservación de su plasma germinal”. Rev. Etnobotanica Mexican, México. pág – 7(9):139 - 146.
37. Medina R, Salazar R, Gómez A.2004. “Fruit quality índices in eight nance [*Byrsonima crassifolia* (L) H.B.K.]”. Rev. Hort Science pág - 39(5): 1070 – 1073
38. Nava K, Uscanga M.1978. “Contribución al estudio de nueve tipos de *Sponddia* sp. Y 17 tipos de *Byrsonima crassifolia* L. en dos regiones del estado de Veracruz”. Rev. CONAFRUT, México. pág – 13(6): 819 – 834

39. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1997. "Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts". Approved standard M27-A. Villanova, National Committee for Clinical Laboratory Standards.
40. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1998. "Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi". Proposed standard M38-P. Villanova, National Committee for Clinical Laboratory Standards.
41. Pedreño Y, Maicas S, Argüelles J, Sentandreu R, Valentin E. 2004. "The *ATC1* Gene Encodes a Cell Wall-linked Acid Trehalase Required for Growth on Trehalose in *Candida albicans*". *Rev. J. Biol. Chem.* pág – 12(27): 4085- 4096.
42. Brown C, Baker C, Barker K. 2007. "Mycotic diseases of the gastrointestinal tract". *Rev. Maxie* pág – 14(6): 229-231.
43. Fidel P, Vazquez A, Sobel D.1999. "*Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*". *Rev. Clin. Microbiol* pág – 12(9): 80-96.
44. Ostrosky L.2003. "New approaches to the risk of *Candida* in the intensive care unit". *Rev. Opin.Infect.* pág – 16(5): 533-537.
45. Bejar E, Malone G.1993. "Pharmacological and chemical screening of *Byrsonima crassifolia*, and medical tree of Mexico". *Rev. Journal of Ethnopharmacology* pág - 39(2): 141 – 158
46. Cáceres A.1996. "Plantas de Uso Medicinal en Guatemala". Colección Monografías. Guatemala. Editorial Universitaria. P (51 – 52, 194 – 197, 280 – 282, 355 – 357).
47. Glasby J.1991. "Dictionary of Plants Containing Secondary Metabolites". London, Tayler y Francis p (57, 264, 314).
48. González J. 1993. "Efecto Terapéutico del Extracto de Nance sobre Candidiasis oral". Tesis. Guatemala, Facultad de Odontología. USAC. Pág. 72.
49. Cañigueral S, Vila R.2003. "Fitoterapia del Sistema Cardiovascular. II Curso Internacional de Fitoterapia Clínica". CONAPLAMED, CONCYT, CYTEC. Guatemala, p (1 – 5), 2003.
50. Emilia C, Estrella M, Ana E. 2001. "Revista Iberoamericana de Micología - ISBN: 84-607-3050-6; Pruebas estandarizadas para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos".

51. Caceres A, Cano O, Jauregui E, Herrera D, Logemann H.1991. "Plants used in Guatemala for the treatment of dermamucosal infection". 1. Screening of 38 plants extracts anticandidal. J. Ethnopharmacol pág - 33: 277 – 283
52. Caceres A, Lopez B, Giron M, Logemann H.1991. "Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infection". 1. Screening for antymicotic of 44 plants extracts anticandidal. J. Ethnopharmacol pág - 31: 263 – 276
53. Gisely H. 2000. "Bioseguridad en el Laboratorio. Bioseguridad. Ministerio de Salud del Perú, Instituto Nacional de Salud-INS". Organismo Público Descentralizado del Sector Salud.
54. Picazo J.2006. "Seguridad en el Laboratorio de Microbiología Clínica". Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, pág - 1016.
55. Silva E, Souza J, Rogez H, Rees J, Larondelle Y. 2007. "Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian región". Food Chem pág - 101, 1012-1018.
56. Monroy R.2011. "Actividad in vitro de seis plantas medicinales nativas contra los principales hongos dermatofitos y levaduriformes que afectan piel y anexos en perros", Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Escuela de Medicina Veterinaria. Guatemala pág - 36 – 37
57. Quiñonez Y.2014. "Evaluación de la actividad antifúngica In Vitro de extractos etanólicos de plantas de uso medicinal en Guatemala - Universidad de San Carlos de Guatemala Facultad de ciencias Químicas y Farmacia". Guatemala, pág - 2(4): 24 – 34
58. Guerra S, Pozo W.2013. "Determinación de la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico y acuoso de *Byrsonima crassifolia* "Indano" mediante el método de difusión en agar". Tesis para optar el grado de químico farmacéutico.
59. Rodríguez N.2014. "Actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico fraccionado de *Byrsonima crassifolia* "Indano" frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* por el método de difusión en agar, Iquitos 2014". Tesis para optar el grado de Químico Farmacéutico.

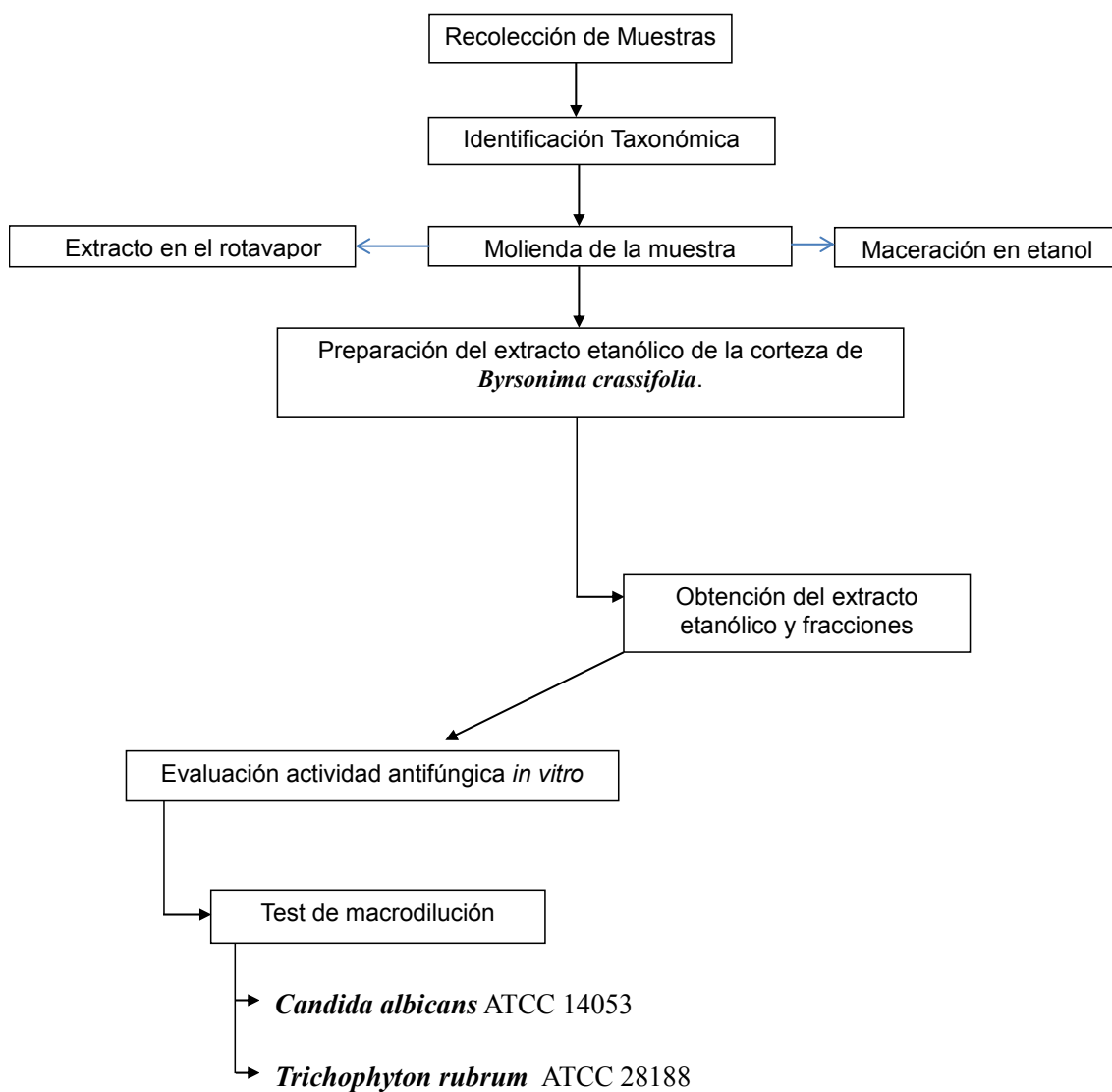
60. Fernández. 2004. "Estudio Fitoquímico del Extracto diclorometánico de *Byrsonima crassifolia* (L) H.B.K.". Revista de Fitoterapia pág - 4, 169-170.
61. Fernández. 2012. "*Byrsonima crassifolia* (L.) H.B.K.: estudio fitoquímico y farmacológico". Tesis para optar el grado de Doctor en Farmacia 2012. Universidad Complutense de Madrid.

ANEXOS

ANEXO N° 01

FLUJOGRAMA DE OBTENCION DEL EXTRACTO ETANOLICO DE BYRSONIMA

CRASSIFOLIA (Indano).



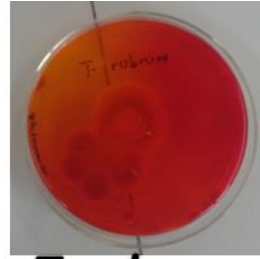
ANEXO N° 02: Obtención del extracto etanólico de la corteza de *Byrsonima crassifolia* (Indano)



ANEXO N° 03: Preparación del inóculo (suspensión)



C. albicans



T. rubrum

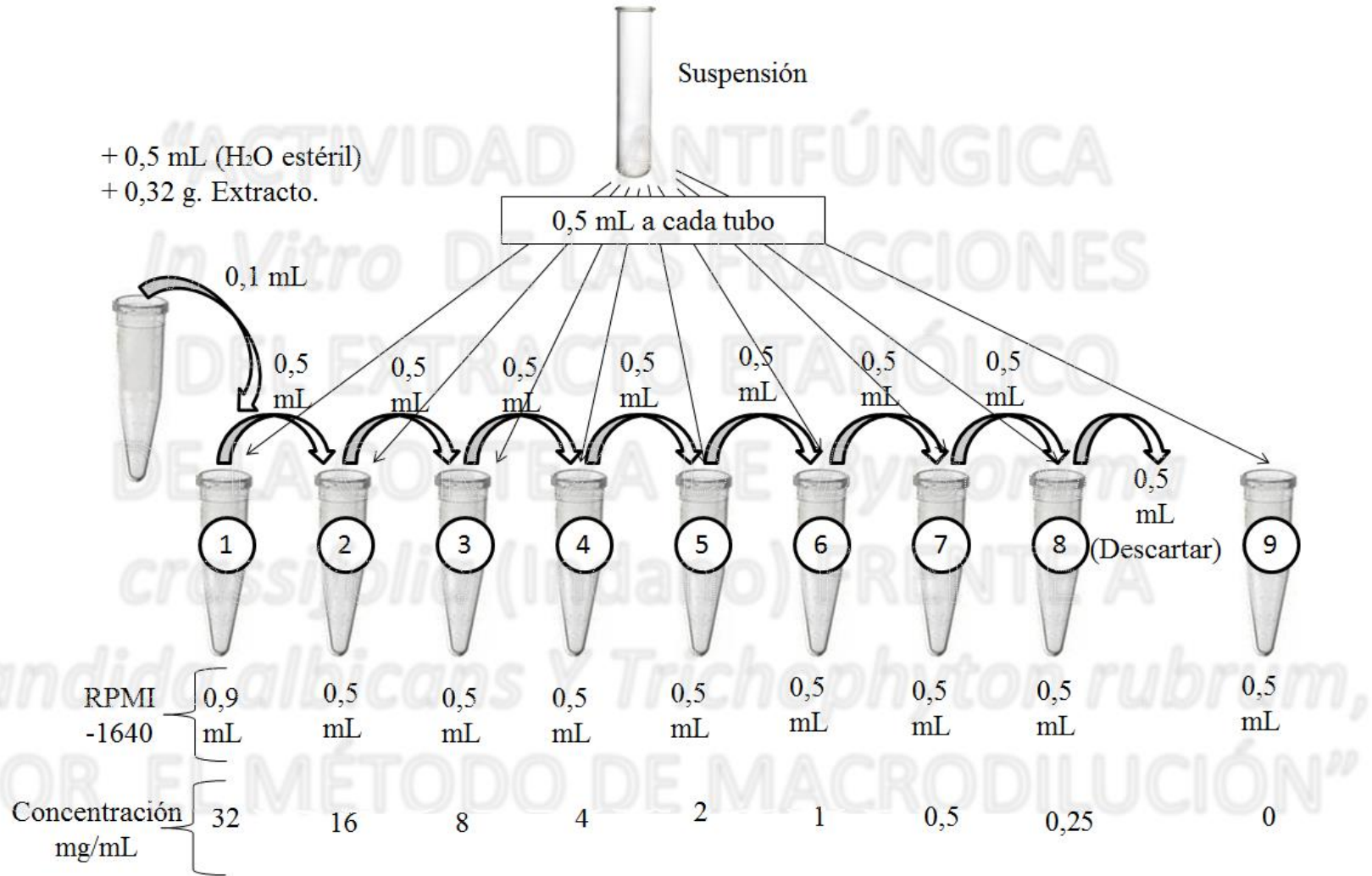


Suspensión

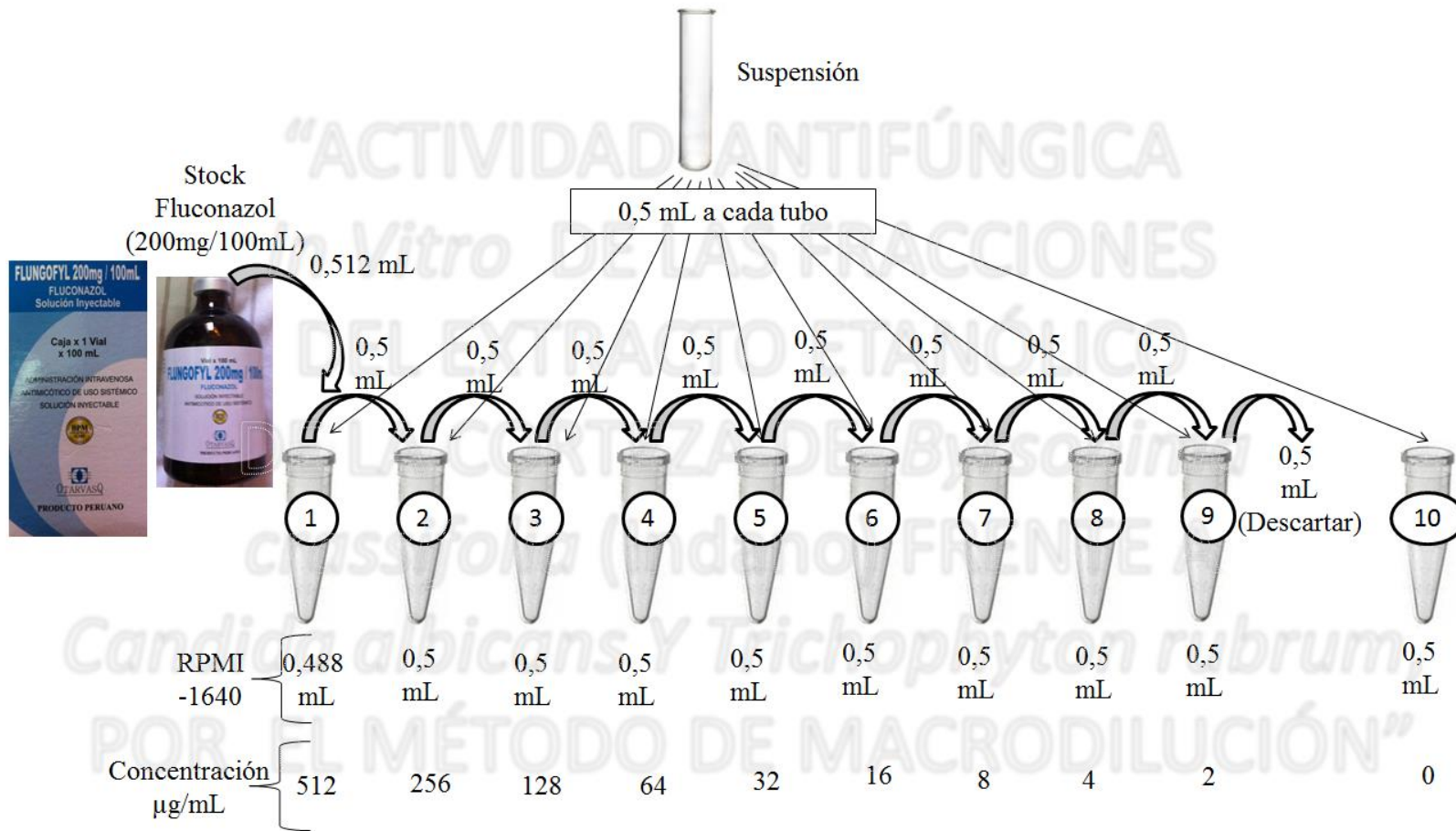


***Tubo 0.5 de la
escala de Mc.
Farland***

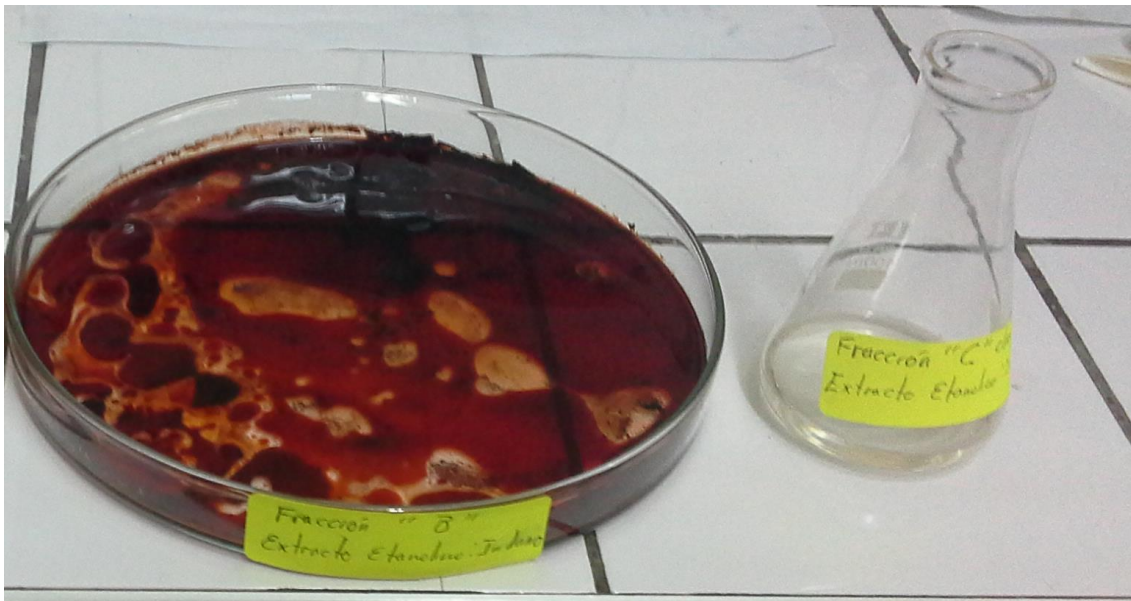
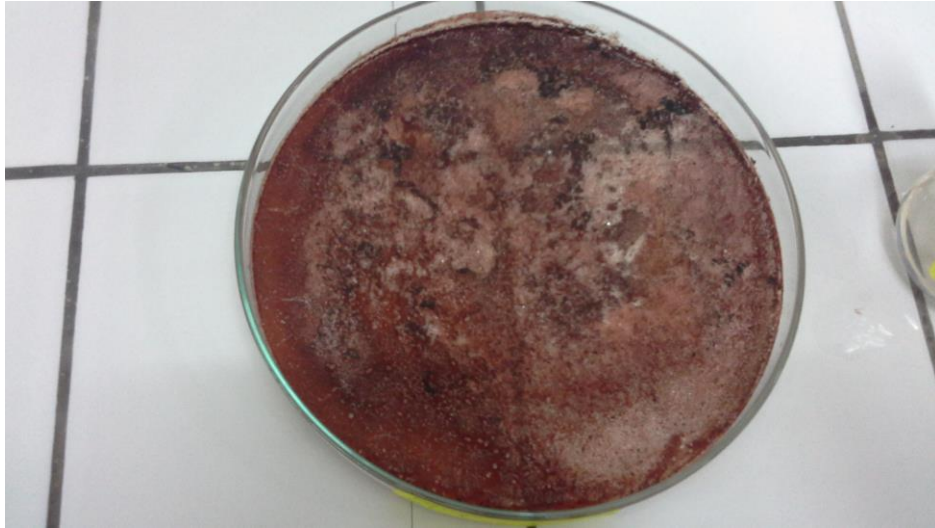
ANEXO N° 04: Procedimiento evaluación de la actividad antifúngica *in vitro* de extractos y fracciones.



ANEXO N° 05: Procedimiento evaluación de la actividad antifúngica *in vitro* del control positivo.



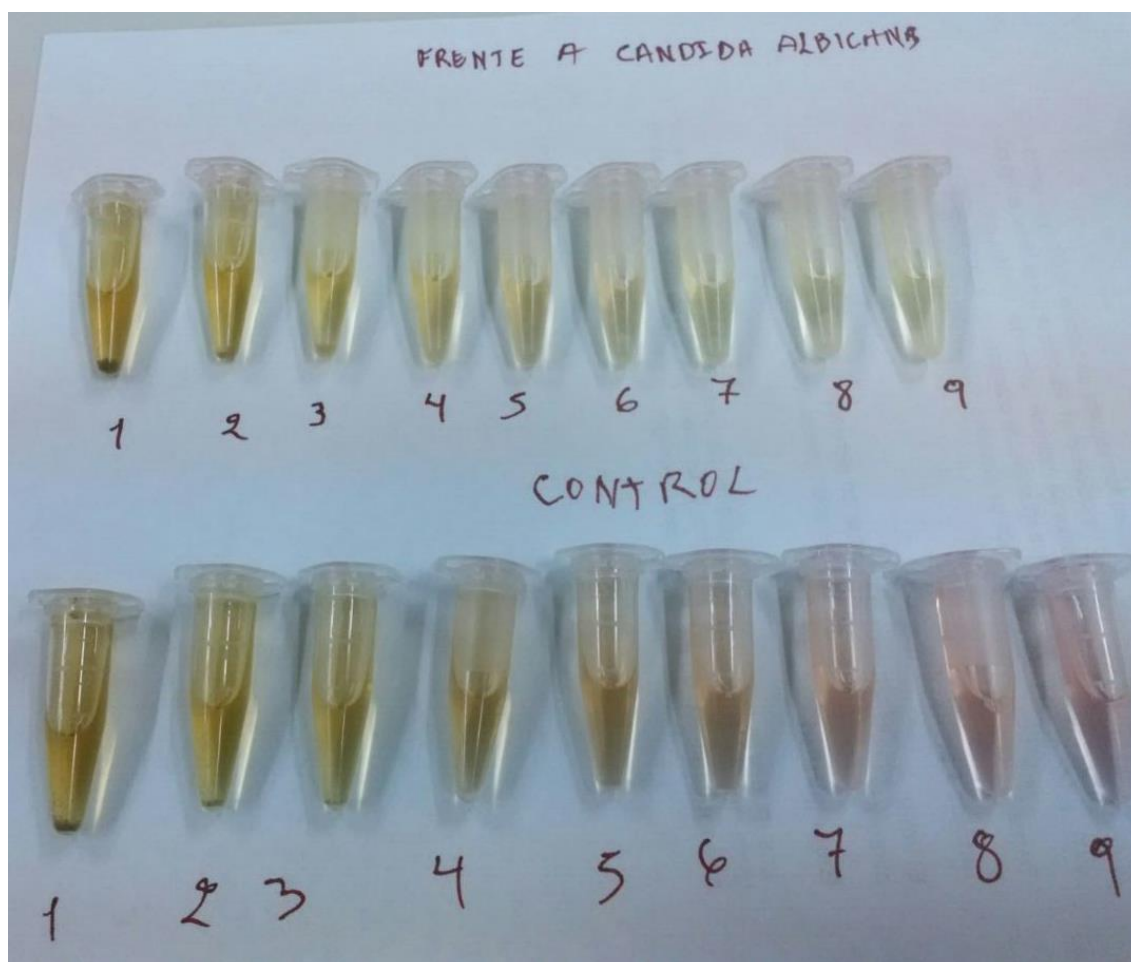
ANEXO N° 06: Fracciones obtenidas



ANEXO N° 07: Realizando el fraccionamiento del extracto etanólico de la corteza de *Byrsonima crassifolia* (Indano)



ANEXO N° 08: Resultados de la evaluación *in vitro* frente a *Candida albicans*





UNAP

Herbarium Amazonense – AMAZ
Centro de Investigación de
Recursos Naturales

CONSTANCIA N° 24

EL COORDINADOR DEL HERBARIUM AMAZONENSE, AMAZ-CIRNA, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA

HACE CONSTAR:

Que, la muestra botánica presentada por los Bachilleres: **BAZAN ALVAN, ALI PRAXITELES; SHAPIAMA QUINTANILLA, MIJAIL ANTHONY;** de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana; es parte de la tesis titulada: **“Actividad Antifúngica *in vitro* de las Fracciones del Extracto Etanólico de la Corteza de *Byrsonima crassifolia* (Indano) frente a *Candida albicans* y *Trichophyton rubrum*, por el Método de Macrodilución”;** La cual fue verificada e identificado en este Herbarium Amazonense - AMAZ, CIRNA-UNAP, que continuación se indican:

Familia	Nombre Científico	Nombre Vulgar
Malpighiaceae	<i>Byrsonima crassifolia</i> L.	Indano

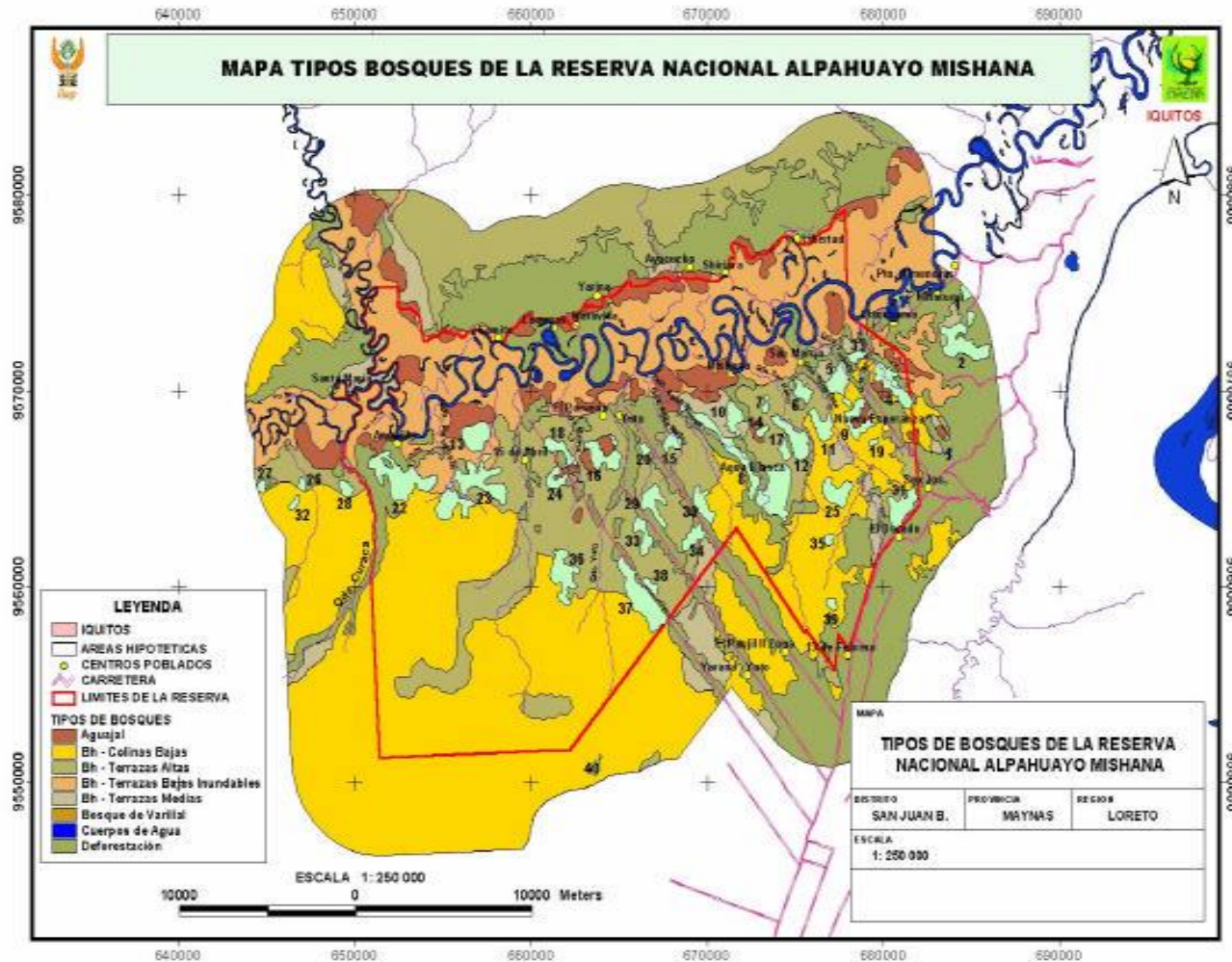
Se expide la presente constancia al interesado para los fines que se estime conveniente.

Iquitos, 16 de Noviembre del 2015


Bigo. RICHARD HUARANCA ACOSTURA M.S.
Coordinador, AMAZ-CIRNA-UNAP



ANEXO N° 10: IMAGEN SATELITAL DE LA UBICACIÓN GEOGRÁFICA DE LA RESERVA NATURAL ALLPAHUAYO – MISHANA.



ANEXO N° 11:

**DATOS DE PASAPORTE DE COLECCIÓN DE ESPECIES DE LAS
PLANTAS MEDICINALES EN ESTUDIO**

N° de Ficha:

FICHA DE CAMPO

DATOS GENERALES:

Lugar de colección:.....Distrito:.....Provincia:.....
Fecha:.....Tipo de Bosque:.....
Coordenadas UTM: (X).....(Y).....
Tipo de Suelo:.....Otras características:.....
Nombre del Colector:.....N° Colección:.....

TAXONOMÍA:

Familia Vegetal:.....Nombre Científico:.....
Nombre Vulgar:.....

CARACTERÍSTICAS VEGETALES:

Habitat:.....Estadío Productivo.....
Posición de Hojas:.....Presencia de Órganos Accesorios en Hojas:.....
Forma del Tallo:.....Órganos Accesorios en Tallo:.....
Características de la Corteza:.....Látex:.....Color de Látex:.....
Tipo de Inflorescencia:.....Posición de Inflorescencia:.....
Tipo de Flor por Sexo:.....N° de Pétalos:.....Unión de Sépalos:.....
N de Estambres:.....Posición de Estambres:.....
Posición de Ovarios:.....N° de Carpelos:.....
Tipo de Fruto:.....Consistencia:.....Dehiscencia:.....

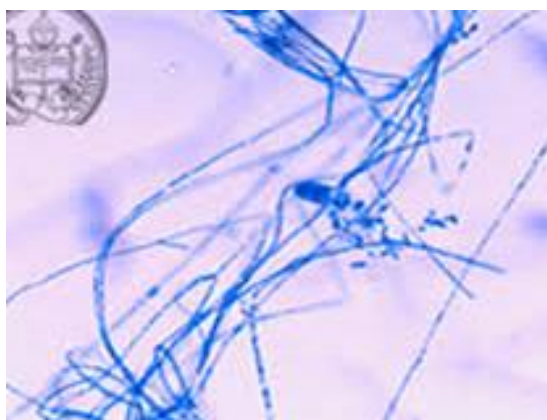
DATOS ETNOFARMACOLÓGICOS:

Uso Medicinal 1:.....Parte Usada:.....
Cantidad Usada :.....Forma de Preparación:.....
Uso Medicinal 2:.....Parte Usada:.....
Cantidad Usada :.....Forma de Preparación:.....
Uso Medicinal 3:.....Parte Usada:.....
Cantidad Usada :.....Forma de Preparación:.....

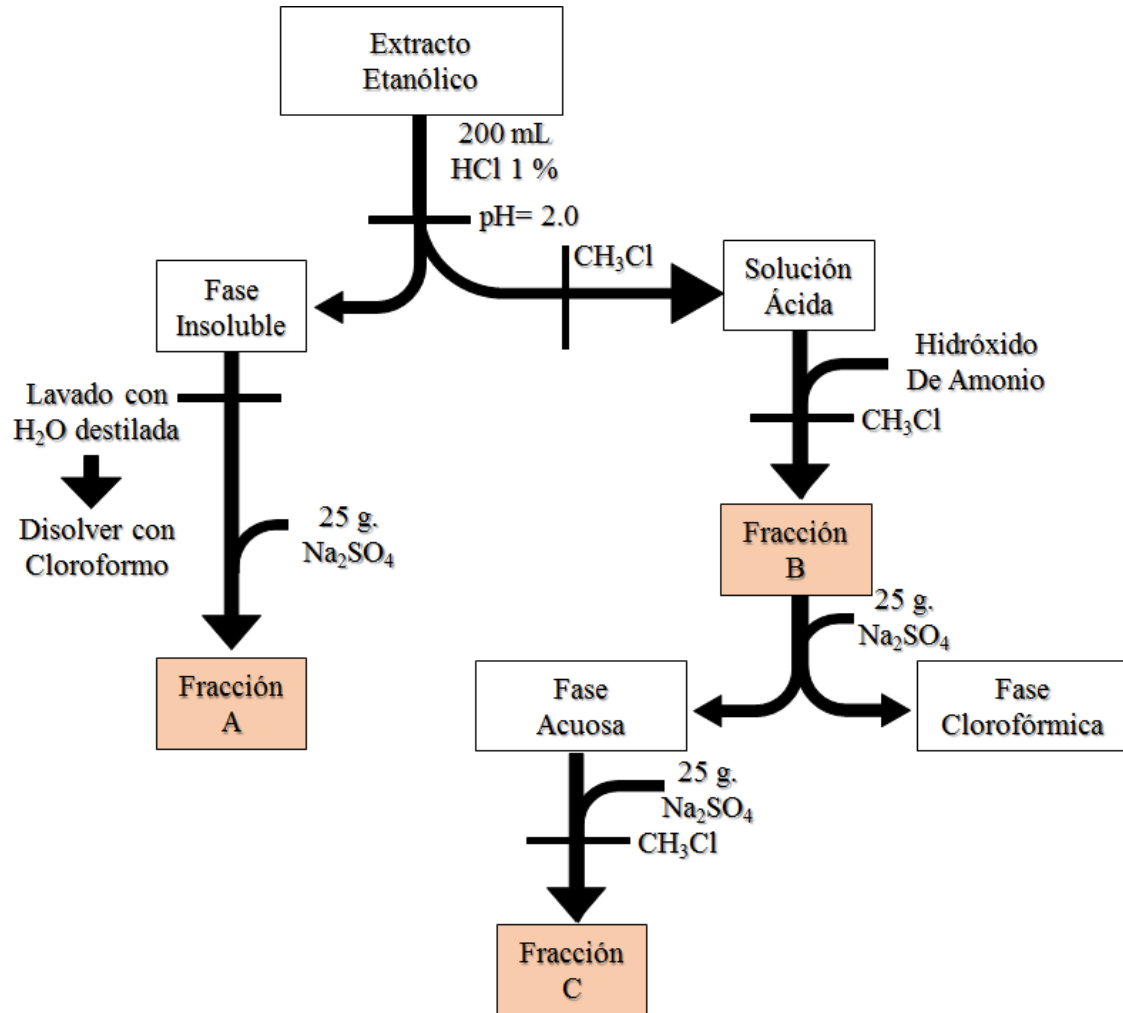
COLECTA DE MATERIAL BIOLÓGICO:

Peso:.....
Parte Colectada:.....
Observaciones:.....
.....
.....

ANEXO N° 12: Imágenes microscópicas de los microorganismos utilizados en el estudio (Arriba: *Candida albicans*; Abajo: *T. rubrum*)



ANEXO N° 12: Procedimiento del fraccionamiento



ANEXO N° 13: Procedimiento del fraccionamiento

Byrsonima crassifolia " INDANO "	
PRUEBAS PARA	RESULTADOS
Alcaloides	-
Saponinas	-
Esteroides	-
Triterpenos	-
Taninos	+++
Fenoles	-
Flavonoides	+++
Quinonas	-
Lactonas	+++
Aminas y Aminoácidos	-
Cumarinas fijas	-
Azúcares Reductores	+++