



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y
BIOQUÍMICA**

TESIS
**ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE
HOJAS DE *Annona reticulata* L. (CHIRIMOYA ROJA) FRENTE A
Candida albicans ATCC 10231**

**PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO**

AUTORES:

Bachiller. Meysonier Yuimachi Tapullima

Bachiller. Carlos Glen Saavedra Velasquez

ASESOR:

Dr. Q.F. Edgar Robert Tapia Manrique

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

Recursos Naturales: Fitoquímica

Huancayo - Perú

2022

DEDICATORIA

A Dios, por permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida y permitir la culminación de esta tesis.

A mis padres: Samuel y Inés, por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien.

A mi hijo Jackson Matteo que es mi motivo de mi superación, a mi esposa Elizabeth, por su comprensión y apoyo incondicional.

Bach.Meysonier Yuimachi Tapullima

DEDICATORIA

A Dios, por concederme cada una de sus bendiciones y permitirme la culminación de esta tesis.

A mi madre: Marleny, a mi hija Alondra y a la madre de mi hija; quienes han sido mi mayor motivación para nunca rendirme en los estudios y poder llegar a ser un ejemplo para ellos, que a pesar de los obstáculos siempre me brindaron su comprensión, cariño y amor.

Bach. Carlos Glen Saavedra Velasquez

AGRADECIMIENTO

A Dios, por iluminarnos y darnos salud y por permitirnos tener tan buena experiencia dentro de nuestra universidad

A nuestros padres, por ser los principales promotores de nuestros sueños, por confiar y creer en nuestros objetivos, por los consejos, valores y principios que nos han inculcado.

A la universidad por albergarnos en los años de estudios y a nuestros docentes por su enseñanza para desarrollarnos profesionalmente y habernos brindado todos sus conocimientos.

Y para finalizar, también agradecemos a todos los que fueron nuestros compañeros de clase durante todos los niveles de Universidad ya que gracias al compañerismo han aportado un alto porcentaje a las ganas de seguir adelante en nuestra carrera profesional.

Bach. Meysonier Yuimachi Tapullima

Bach. Carlos Glen Saavedra Velasquez

JURADO DE SUSTENTACIÓN

PRESIDENTE

Dr. Q.F. Vicente Manuel Ayala Picoaga

SECRETARIO

Mg. Q.F. Carlos Max Rojas Aire

VOCAL

Dr. Q.F. Edgar Robert Tapia Manrique

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

DECLARACIÓN JURADA SIMPLE

Yo **MEYSONIER YUIMACHI TAPULLIMA** de nacionalidad peruana, identificado con D.N.I N° **73108784**, tesista de la Universidad Privada de Huancayo Franklin Roosevelt, Bachiller en Farmacia y Bioquímica, domiciliado en Mz D lote 7 Asos. De Viv. Via Panamericana, SAN JUAN DE MIRAFLORES. DECLARO BAJO JURAMENTO: QUE TODA LA INFORMACION PRESENTADA ES AUTÉNTICA Y VERAZ Me afirmo y reafirmo en lo expresado en señal de lo cual firmo el presente documento a los 16 días del mes junio del 2022.



.....
Bach. Meysonier Yuimachi Tapullima

D.N.I N° 73108784



Huella digital

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

DECLARACIÓN JURADA SIMPLE

Yo **CARLOS GLEN SAAVEDRA VELASQUEZ** de nacionalidad peruana, identificado con D.N.I N° **43438244**, tesista de la Universidad Privada de Huancayo Franklin Roosevelt, Bachiller en Farmacia y Bioquímica, domiciliado en Mz L Lote 14 2da etapa Urb.Pachacamac VILLA EL SALVADOR. DECLARO BAJO JURAMENTO: QUE TODA LA INFORMACION PRESENTADA ES AUTÉNTICA Y VERAZ Me afirmo y reafirmo en lo expresado en señal de lo cual firmo el presente documento a los 16 días del mes junio del 2022.



.....
Bach. Carlos Glen Saavedra Velasquez

D.N.I N° 43438244



Huella digital

ÍNDICE GENERAL

	Páginas
Resumen	viii
Abstract	ix
I.INTRODUCCIÓN	01
II.METODOLOGÍA	11
2.1 Tipo y nivel de la investigación	11
2.2 Diseño de la investigación	11
2.3 Población, muestra y muestreo	11
2.4 Variables de investigación	11
2.5 Técnicas e instrumentos de recolección de datos	12
2.6 Aspectos éticos	14
2.7 Procesamiento y análisis de datos	14
III.RESULTADOS	15
IV.DISCUSIÓN	19
V. CONCLUSIONES	20
VI. RECOMENDACIONES	21
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22
ANEXOS	25

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue evaluar la actividad antimicótica del extracto etanólico de hojas de *Annona reticulata* L. (chirimoya roja) frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Es un estudio de diseño experimental; la muestra vegetal estuvo constituida por 500 gramos de hojas de *Annona reticulata* L. “chirimoya roja”, procedente de la Comunidad de Perico, distrito de Chirinos, provincia de San Ignacio, departamento de Cajamarca y la muestra microbiológica fue la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231. Se realizaron ensayos de solubilidad, identificación de metabolitos secundarios y la actividad antimicótica del extracto etanólico de hojas de *Annona reticulata* L. (chirimoya roja) a concentraciones del 25 %, 50 %, 75 % y 100 % frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Presento buena solubilidad únicamente en solventes de naturaleza polar, mediante el tamizaje fitoquímico se pudo evidenciar la presencia de compuestos fenólicos, taninos, flavonoides y alcaloides, finalmente no se evidenció actividad antimicótica, reportándose halos de inhibición de 6 mm de igual medida al control negativo de agua destilada. Se concluye que el extracto etanólico de hojas de *Annona reticulata* L. (chirimoya roja) no presentó actividad antimicótica frente a la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231

Palabras claves: *Annona reticulata* L., extracto etanólico, *Candida albicans*

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the antifungal activity of the ethanolic extract of *Annona reticulata* L. (red cherimoya) leaves against *Candida albicans* ATCC 10231. It is an experimental design study; The plant sample consisted of 500 grams of leaves of *Annona reticulata* L. "red cherimoya", from the Perico Community, Chirinos district, San Ignacio province, Cajamarca department, and the microbiological sample was the *Candida albicans* ATCC strain. 10231. Solubility tests, identification of secondary metabolites and antifungal activity of the ethanolic extract of leaves of *Annona reticulata* L. (red custard apple) at concentrations of 25%, 50%, 75% and 100% against *Candida albicans* ATCC 10231 were carried out. I present good solubility only in solvents of a polar nature, through phytochemical screening the presence of phenolic compounds, tannins, flavonoids and alkaloids can be evidenced, finally no antifungal activity was evidenced, reporting inhibition halos of 6 mm of equal measure to the negative control of distilled water. It is concluded that the ethanolic extract of leaves of *Annona reticulata* L. (red custard apple) did not present antifungal activity against the strain of *Candida albicans* ATCC 10231.

Keywords: *Annona reticulata* L, ethanolic extract, *Candida albicans*

I.-INTRODUCCIÓN

La incidencia y la gravedad de las infecciones por hongos han aumentado significativamente en las últimas décadas, con altas tasas de morbilidad y mortalidad, especialmente en pacientes inmunodeprimidos (1,2).

Se estima que las enfermedades fúngicas afectan aproximadamente 1.2 mil millones de personas en todo el mundo con al menos 1.5 millones de muertes cada año (1,2). Además, el uso generalizado de fármacos antimicóticos está trayendo graves consecuencias para la terapia antifúngica, debido a la aparición de cepas resistentes y, por lo tanto, conduce a fracasos del tratamiento (3-4).

Actualmente, se utilizan comúnmente cinco clases principales de agentes antifúngicos: azoles, equinocandinas, polienos, alilaminas y análogos de pirimidina (5). Están disponibles en formas orales, tópicas e intravenosas (6).

Sin embargo, además de los problemas relacionados con la resistencia, los fármacos antimicóticos tienen varias limitaciones debido a problemas con los perfiles de seguridad de los fármacos, las propiedades farmacocinéticas, los efectos secundarios indeseables, el espectro de actividad y una pequeña cantidad de objetivos (7).

Asimismo, la micosis causada por *Candida albicans*, ha experimentado un aumento en las últimas décadas. Las zonas más afectadas son los pliegues cutáneos donde la humedad favorece un hábitat adecuado para su desarrollo.

Además, no se introdujo ninguna clase de antifúngicos en el mercado desde 2006, cuando la Agencia Europea de Medicamentos y la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) aprobaron la anidulafungina. De esta manera, la presente investigación está orientada a evaluar la eficacia antimicótica del extracto etanólico de hojas de *Annona reticulata* L. “chirimoya roja” frente a *Candida albicans* ATCC 10231.

Planteamos el siguiente problema general, según la situación problemática expuesta:

- ¿El extracto etanólico de las hojas de *Annona reticulata* L. (Chirimoya roja) presentará actividad antimicótica frente a la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231?

Asimismo, formulamos las siguientes preguntas específicas:

- ¿El extracto etanólico de las hojas de *Annona reticulata* L. (Chirimoya roja) presentará actividad antimicótica a la concentración de 100 % frente a la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231?
- ¿El extracto etanólico de las hojas de *Annona reticulata* L. (Chirimoya roja) presentará actividad antimicótica a la concentración de 75 % frente a la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231?
- ¿El extracto etanólico de las hojas de *Annona reticulata* L. (Chirimoya roja) presentará actividad antimicótica a la concentración de 50 % frente a la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231?
- ¿El extracto etanólico de las hojas de *Annona reticulata* L. (Chirimoya roja) presentará actividad antimicótica a la concentración de 25 % frente a la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231?

Consideramos los siguientes antecedentes internacionales de nuestra investigación:

Sujata P. (2018). Realizo la investigación que tuvo como objetivo evaluar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de frutos de *Annona reticulata* en conjugación con análisis fitoquímico. El extracto etanólico de frutos de *Annona reticulata*, se preparó mediante extracción Soxhlet y se analizó para constituyentes fitoquímicos utilizando métodos estándar. Se examinó la actividad antimicrobiana del extracto vegetal frente a cepas bacterianas y cepas de hongos mediante el método de difusión por disco. La presente investigación muestra el análisis fitoquímico, actividad antimicrobiana del extracto etanólico de la planta *Annona reticulata*. Varios análisis fitoquímicos revelaron la presencia de alcaloides, saponina, flavonoides, carbohidratos, glucósidos, esteroides, proteínas y aminoácidos y taninos. La actividad antimicrobiana del extracto etanólico de la planta mostró un resultado significativo contra todos los organismos de prueba. El presente estudio

concluyó que el extracto etanólico de frutos de *Annona reticulata* contiene alta presencia de fitoquímicos. Se encontró que el extracto etanólico de la planta posee una actividad antimicrobiana prometedora en comparación con los estándares (8).

De Toledo L. (2020). Desarrollo la investigación que tuvo como objetivo caracterizar la composición química del extracto etanólico de *Cymbopogon nardus* y su fracción activa (FrD). Además, se evaluaron las propiedades citotóxicas y antifúngicas de estos extractos frente a especies de *Candida* con diferentes perfiles de resistencia a fármacos convencionales. Los compuestos identificados en EE fueron mono- C - y di- C-glicosil flavonas y glucósidos fenilpropanoides. Se identificaron glucósidos fenilpropanoides en FrD. EE mostró actividad antifúngica, con valores de concentración mínima inhibitoria (MIC) que oscilan entre 62,5 y 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. FrD fue más eficaz contra *C. glabrata*, como lo demuestra el valor de MIC más bajo (15. 6 $\mu\text{g mL}^{-1}$). EE inhibió el crecimiento de la levadura de forma similar a la anfotericina-B, como lo demuestran las curvas de eliminación del tiempo similares. EE inhibió la formación de hifas de *C. albicans* y la biopelícula madura de *C. albicans*, *C. krusei* y *C. parapsilosis*. Los resultados de los análisis químicos y biológicos de EE y sus fracciones proporcionaron información novedosa y pueden contribuir al control de las infecciones causadas por especies de *Candida* (9).

Lataliza A, Junquera J. (2021) En el trabajo de investigación “Evaluación de diferentes actividades farmacológicas de *Annona Ambotay* (Aubl.)” Tuvo como objetivo realizar un screening fitoquímico del extracto hidroalcohólico de *A. ambotay* (Aubl.) Ladra y evalúa diferentes actividades farmacológicas. La actividad antioxidante se realizó mediante el método de eliminación de radicales libres DPPH; el potencial antifúngico fue evaluado por el método de microdilución en caldo; citotoxicidad celular mediante el ensayo MTT; y ensayo de letalidad en *Artemia salina*. El cribado fitoquímico reveló la presencia de flavonoides, esteroides, triterpenos pentacíclicos y también fue activo para annonaceas acetogeninas en el extracto de *A. ambotay*. Los resultados indicaron una buena actividad antioxidante con CI_{50} de 8,30 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Además, el efecto antifúngico del extracto contra diferentes. Se observaron cepas de *Candida* sp. Acerca de la toxicidad en fibroblastos murinos (L929), un se observó una reducción en la viabilidad celular (43% a 84%); en queratinocitos humanos (HaCat) hubo una reducción en la viabilidad (32% a 72%). Citotoxicidad en células tumorales de cáncer de mama evidenció un alto efecto antiproliferativo, con $\text{IC}_{50} = 116,32 \mu\text{g mL}^{-1}$ (MDA-MB-231), $\text{IC}_{50} = 126,87 \mu\text{g mL}^{-1}$

(MCF7) e $IC_{50} = 11,04 \mu\text{g mL}^{-1}$ (4T1). Se evidenció un efecto tóxico en el ensayo de *Artemia salina* (CL_{50} de $296,78 \mu\text{g mL}^{-1}$). El extracto presentó prometedor actividades biológicas, debido a la buena actividad antioxidante y efecto antiproliferativo en líneas celulares de cáncer humano (10).

Mgbeahuruike A (2021) En el trabajo de investigación “Evaluación del potencial antimicrobiano de extractos de semillas de *Annona Muricata* sobre patógenos bacterianos y fúngicos resistentes de importancia para la salud pública” Tuvo como objetivo evaluar los efectos antimicrobianos de *Annona muricata* sobre *Corynebacterium renale* resistente a múltiples fármacos aislado de aves y un patógeno fúngico *Candida albicans*. El aislado de *C. renale* se caracterizó mediante métodos bioquímicos y morfológicos; y se evaluó la susceptibilidad a los antibióticos mediante un panel de 8 antibióticos. El perfil de resistencia del aislado de *C. renale* se comparó con *C. albicans* utilizando extractos de semillas (hexano, éter etílico y etanol) de *A. muricata* a diferentes concentraciones. Entre los 8 antibióticos probados, solo el ciprofloxacino mostró actividad sobre *C. renale* con una zona de inhibición (ZI) de 25,00 mm frente al estándar que era ≥ 21 mm. Todos los extractos mostraron efectos antimicrobianos apreciables en función de la concentración, registrándose la zona de inhibición más alta a 400 mg / ml. El extracto de hexano no mostró actividad antimicrobiana en *C. renale* en todas las concentraciones probadas. Los extractos de hexano y éter etílico mostraron una actividad casi similar en el aislado de *C. albicans* en todas las concentraciones ensayadas. El extracto de etanol mostró el mayor ZI de $17,60 \pm 1,67$ mm en *C. albicans* a 400 mg / ml y esto fue estadísticamente significativo ($P = 0,05$) en comparación con las otras concentraciones. Los dos antifúngicos de control, voriconazol y fluconazol, presentaron zonas de inhibición más altas de $29,6 \pm 1,34$ mm y $19,00 \pm 2,00$ mm respectivamente que todos los extractos. Los resultados sugieren que los extractos de plantas (etanol y éter etílico) mostraron efectos antimicrobianos apreciables a 400 mg / ml y, por lo tanto, podrían actuar como un fármaco potencial para la terapia antimicrobiana (11).

Una biopelícula en general se puede establecer como una comunidad de células microbianas rodeadas por una matriz polimérica autoproducida, que facilita la adhesión entre células y / o células en interfaces y superficies. Las biopelículas de hongos colonizan las superficies abióticas y contribuyen a las infecciones relacionadas con las biopelículas de los dispositivos médicos implantados, por ejemplo, catéteres, marcapasos, lentes y prótesis, que causan infecciones refractarias, ya que los organismos infectantes se adhieren a estos objetos y

establecen biopelículas que resisten la acción de los fármacos antifúngicos. Además de eso, las biopelículas pueden ser multiespecie y pueden cambiar con el tiempo acumulando microbios 'inmigrantes' y, en consecuencia, alterando la estructura y función de la asociación microbiana (12).

Las biopelículas son una causa importante de morbilidad y mortalidad en la clínica y, además, afectan el sistema de atención de la salud a través de los costos crecientes del tratamiento de las infecciones crónicas asociadas a las biopelículas. Como ejemplo, se estima que 80% de todas las infecciones en los EE.UU. están relacionados con las biopelículas, que son aproximadamente 1000 veces más capaces de limitar los antibióticos que su cultivo de células de flotación libre comparable. De esta manera, la aparición de biopelículas disminuye la susceptibilidad a las defensas del huésped y, quizás lo más importante, conduce a la resistencia contra la mayoría de los agentes antifúngicos convencionales, lo que complica el tratamiento y contribuye a las altas tasas de muerte. Desentrañar los mecanismos moleculares que sustentan el desarrollo y la resistencia de la biopelícula fúngica puede conducir a nuevas estrategias para combatir estas devastadoras infecciones (13).

En las últimas décadas, ha habido una comprensión cada vez mayor del papel que juega el desarrollo de biopelículas en varias infecciones causadas por hongos clínicamente relevantes. *Candida* spp., Y en especial *Candida albicans*, siguen siendo el agente causal más importante de enfermedades fúngicas de biopelículas, pero las infecciones causadas por otras levaduras y hongos filamentosos se asocian comúnmente con una etiología de biopelículas (14).

Acerca de las levaduras, por ejemplo, *Candida* spp. Se reconoce que desarrollan varios mecanismos que confieren resistencia a los fármacos antifúngicos, que están bien caracterizados y descritos para las células de vida libre (o planctónicas). A pesar de esto, las infecciones resistentes se asocian invariablemente con la formación de biopelículas, ya que este tipo de crecimiento exhibe una disminución dramática en la susceptibilidad y respuesta al tratamiento específico. *Candida albicans* junto con especies no *albicans* como *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida dubliniensis* y *Candida krusei* que se encuentra en la superficie de la mucosa humana se denomina como el hongo más importante que es capaz de producir biopelículas clínicamente relacionadas en personas con problemas de

inmunidad. La existencia de este hongo tanto en configuración de levadura como de hifa lo convierte en una biopelícula compleja. Sorprendentemente, una asociación entre la levadura y otras bacterias en la biopelícula oral puede detectarse con mucha frecuencia después de examinar el aumento de la carga de *Candida* en los pacientes de edad avanzada, lo que confirma la indulgencia de los *estreptococos* orales (15).

Se ha establecido que la capacidad de desarrollar biopelículas se correlaciona con aspectos moleculares como la presencia de genes reguladores transcripcionales. Para *C. albicans*, estos genes incluyen TEC1, BCR1 y EFG1. La familia de adhesinas de secuencia similar a aglutinina (ALS), que incluye ocho miembros (ALS1-ALS9), se expresa a partir de genes de ALS que codifican glucoproteínas de superficie celular ancladas con glicosilfosfatidilinositol (GPI). Dentro de este grupo, ALS3 es el gen más importante, ya que colabora activamente con la producción de biofilm y está regulado positivamente (altamente expresado) durante *in vitro* la infección de células epiteliales de la mucosa oral (16).

En la literatura se han descrito otras proteínas importantes implicadas en las fases de adhesión e invasión, como EAP1, SSA1, HWP1 y SAPS. Otros genes de *C. albicans* incluyen proteasas (SAP), lipasas (LIP) y fosfolipasas (PLB), que contribuyen a la colonización e infección mediante la degradación de componentes esenciales de la membrana de la célula huésped (17).

Con respecto a los hongos filamentosos, a saber, *Aspergillus fumigatus*, se ha demostrado que forman conjuntos tridimensionales, de 10 a 200 μm de espesor y con características típicas de biopelícula. *Aspergillus fumigatus* se aísla de forma recurrente en pacientes con fibrosis quística (FQ) y las biopelículas de *Aspergillus* contribuyen a la virulencia en la FQ y la aspergilosis pulmonar invasiva. Las biopelículas de *Aspergillus fumigatus* son de creciente atención biomédica debido a su asociación con infecciones crónicas y letales, considerablemente en pacientes inmunodeprimidos, y su menor susceptibilidad a los agentes antifúngicos convencionales (18).

En cuanto a las formas de tratamiento, se ha demostrado que la biopelícula en etapa temprana puede simplemente controlarse y eliminarse con la aplicación del agente antimicrobiano apropiado. Sin embargo, el caso no es sencillo. En efecto, el fracaso de la terapia antimicótica puede provocar infecciones crónicas y persistentes que solo pueden tratarse mediante cirugía y / o extracción de los dispositivos médicos, por ejemplo, observaron que

el fluconazol (FLZ) era ineficaz para las biopelículas no *albicans* . La mayoría de las infecciones clínicas causadas por biofilm se encuentran en su etapa posterior o madurado cuando se diagnostica y también la sentencia inicial de la infección biofilm está actualmente un reto. Con esta suma de problemas de tratamiento debido a la resistencia a múltiples fármacos y el diagnóstico difícil, la biopelícula fúngica se ha convertido en un factor de infección importante y las complicaciones asociadas que con frecuencia llevan a muchos pacientes a la muerte (14).

La falta de respuesta a la terapia antifúngica es compleja y depende de factores asociados con los microorganismos (resistencia microbiológica) y el huésped (resistencia clínica) (15). La resistencia microbiológica es la falta de susceptibilidad del microorganismo a un antimicrobiano. Esta evaluación se realiza a través de *in vitro* pruebas y el microorganismo se define como resistente cuando la Concentración Inhibitoria Mínima (CMI) del fármaco excede los límites de susceptibilidad para ese organismo. La resistencia microbiológica se puede definir como intrínseca o extrínseca. La primera se produce cuando un microorganismo es inherentemente menos susceptible a un agente antifúngico dado, mientras que la segunda es el desarrollo de resistencia en respuesta a la exposición a un agente antimicrobiano y depende de la expresión de genes alterados (15).

La resistencia clínica es una infección persistente a pesar de que el paciente recibe la terapia antifúngica adecuada. La respuesta clínica favorable depende no solo de la susceptibilidad del microorganismo, sino también del sistema inmunológico del huésped, la penetración y distribución del fármaco y la adherencia del paciente al tratamiento correcto. Además, durante el uso generalizado de agentes antifúngicos, los microorganismos pueden permanecer expuestos a los medicamentos a niveles subóptimos, lo que da como resultado células que persisten durante la terapia y pueden causar una nueva infección. Por tanto, una mejor comprensión de los mecanismos de resistencia y la adaptación de los hongos a los fármacos es fundamental para el desarrollo de nuevas terapias, ya que la aparición de resistencias antifúngicas entre patógenos comunes restringe las opciones de tratamiento, enfatizando la búsqueda de nuevos agentes antifúngicos .

Mecanismos de resistencia a los antifúngicos.

Los antifúngicos a base de azoles, a pesar de ser una de las clases más utilizadas en el tratamiento antifúngico, suelen presentar casos de resistencia en la bibliografía. Se han

descrito cuatro mecanismos principales de resistencia a los azoles como: (i) aumento del flujo de fármaco, (ii) mutación diana, (iii) desregulación de la expresión diana y (iv) alteración de la vía de biosíntesis de ergosterol (20).

Terapia de combinación

La eficacia limitada de la monoterapia y la dificultad para introducir nuevos fármacos antimicóticos en el mercado hacen que la combinación de fármacos antifúngicos sea una estrategia terapéutica importante. En ausencia de una monoterapia eficaz, las terapias combinadas se utilizan clínicamente para tratar las infecciones fúngicas invasivas potencialmente mortales.

Los beneficios potenciales de la terapia de combinación incluyen: (i) diferentes mecanismos que actúan juntos permiten una dirección complementaria dentro de las células fúngicas; (ii) ampliación del espectro de acción; (iii) posible actividad fungicida asociando dos agentes fungistáticos; (iv) la reducción de la toxicidad debido a un menor uso de dosis y (v) menor número de organismos resistentes.

Combinación de medicamentos antimicóticos.

La combinación de flucitosina (FLT) y anfotericina B (AmB), para el tratamiento de la meningitis criptocócica, presentó una mayor tasa de curación y menos recaídas que la monoterapia con AmB. Además, este régimen de combinación mostró menor nefrotoxicidad que la monoterapia; sin embargo, un aumento de la hepatotoxicidad se produce debido a la reducción de la filtración glomerular inducida por la AmB, la disminución de la eliminación flucitosina. Además, FLT no está disponible actualmente en la mayoría de los países en desarrollo donde la meningitis criptocócica es más prevalente. La combinación de AmB más FLZ puede mejorar algunas de estas dificultades una vez que esta asociación antifúngica tenga un efecto sorprendente sobre el efecto antifúngico y el perfil de seguridad del fluconazol sea muy superior al de FLT (21-22).

Cuando se asoció con equinocandinas presentó actividad sinérgica *in vitro* contra *Aspergillus* spp. El tratamiento de pacientes con aspergilosis invasiva con esta última mejoró la supervivencia en comparación con el tratamiento con voriconazol en monoterapia. En pacientes con coccidioidomicosis refractaria, el tratamiento con voriconazol y caspofungina (CAF) mejora el cuadro clínico en comparación con la

monoterapia previa con VOZ. CAF más posaconazol (POZ) también ha presentado un efecto sinérgico contra *A. fumigatus* y *Candida* spp. (*C. albicans*), incluidos los aislados resistentes a equinocandinas (23).

Se han propuesto muchos mecanismos sinérgicos de asociación entre antifúngicos, por ejemplo, la terbinafina (TEF) y los azoles inhiben la biosíntesis de ergosterol de levaduras y dermatofitos a través de la misma vía bioquímica de la membrana celular; La AmB y los azoles dañan la membrana celular y aumentan la penetración de otros fármacos como FLT. La acción simultánea sobre la pared celular y la membrana plasmática de hongos es también otro mecanismo de sinergismo, lo que explica los resultados correctos se encuentran en la combinación entre equinocandinas y la AmB. Además, la profilaxis combinada podría conferir una mejor protección, ya que disminuye el desarrollo de resistencia a los medicamentos. La combinación de micafungina (MIF) y FLZ en pacientes inmunodeprimidos y trasplantados fue bien tolerada y tenía menos sospecha de infección por hongos. La combinación de POZ y MIF administrada a sujetos sanos fue bien tolerada y la farmacocinética no se alteró (24).

Asimismo, los mecanismos antagonistas son diversos, por ejemplo, en las asociaciones de AmB y azoles se produce un efecto antagonista ya que AmB interactúa fuertemente con el ergosterol para formar una esponja de esterol mientras que los azoles inhiben la biosíntesis de ergosterol y, en consecuencia, hay menos ergosterol disponible para que AmB se una (25).

El objetivo general del estudio fue:

- Evaluar la actividad antimicótica del extracto etanólico de hojas de *Annona reticulata* L. (chirimoya roja) frente a *Candida albicans* ATCC 10231.

Asimismo, los objetivos específicos del estudio fueron:

- Evaluar la actividad antimicótica del extracto etanólico de hojas de *Annona reticulata* L. (Chirimoya roja) a la concentración de 100 % frente a *Candida albicans* ATCC 10231.

- Evaluar la actividad antimicótica del extracto etanólico de hojas de *Annona reticulata* L. (Chirimoya roja) a la concentración de 75 % frente a *Candida albicans* ATCC 10231.
- Evaluar la actividad antimicótica del extracto etanólico de hojas de *Annona reticulata* L. (Chirimoya roja) a la concentración de 50 % frente a *Candida albicans* ATCC 10231.
- Evaluar la actividad antimicótica del extracto etanólico de hojas de *Annona reticulata* L. (Chirimoya roja) a la concentración de 25 % frente a *Candida albicans* ATCC 10231.

II. METODOLOGIA

2.1 Tipo y nivel de investigación²⁴

El tipo de investigación fue básica y de nivel exploratorio.

2.2 Diseño de investigación

Es un estudio de diseño experimental, prospectivo y transversal.

2.3 Población y muestra

2.3.1 Población de estudio

La población estuvo conformada por plantas de *Annona reticulata* L. “chirimoya roja” procedente de la comunidad de Perico, distrito de Chirinos, provincia de San Ignacio, departamento de Cajamarca.

2.3.2 Muestra de estudio

La muestra estuvo conformada por 500 gramos de hojas de *Annona reticulata* L. “chirimoya roja”, procedente de la Comunidad de perico, distrito de Chirinos, provincia de San Ignacio, departamento de Cajamarca.

2.4 Variable y operacionalización de variable:

2.4.1 Variable independiente

Extracto etanólico de las hojas de *Annona reticulata* L. “chirimoya roja”

2.4.2 Variable dependiente

Actividad antimicótica frente a la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231

2.4.2 Operacionalización de variable

Variable	Dimensión	Indicador	Instrumento
Independiente Extracto etanólico de las hojas de <i>Annona reticulata</i> L. “chirimoya roja”	Concentración	Porcentaje (W/V) mg/mL	Ficha de recolección de datos.
Dependiente actividad antimicótica frente a la cepa de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Reducción del halo de inhibición	milímetros	

2.5 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

2.5.1 Técnicas

a) Muestreo

La recolección de la especie vegetal se realizó según las buenas prácticas de recolección. Se recolectarán las hojas de *Annona reticulata* L. “chirimoya roja” teniendo en cuenta características uniformes entre todas las hojas recolectadas, posteriormente se realizó la clasificación botánica.

b) Ensayo de solubilidad del extracto

Del extracto seco obtenido, con la ayuda de una varilla de vidrio se utilizó una pequeña muestra y se colocó en el fondo de cada tubo de prueba, luego se adicionó 1 mL de los siguientes solventes: agua, etanol, metanol, éter de petróleo, acetona, cloroformo, hexano.

c) Ensayo de la marcha fitoquímica

Del extracto obtenido se realizó distintas pruebas de identificación de diversos compuestos químicos por medio de variaciones de coloración o aparición de precipitados, donde se determinó la existencia de los principales metabolitos secundarios.

d) Determinación de la actividad antimicótica

La evaluación de la actividad antifúngica se realizó en el centro de control analítico de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM por el método de difusión en agar, con este método nos permitió evaluar la actividad antifúngica del extracto etanólico de las hojas de *Annona reticulata* L. “chirimoya roja” frente a la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231.

El ensayo se fundamenta en la inhibición del desarrollo fúngico, mediante la expansión de los elementos activos en un medio sólido y se comprueba en función al desarrollo de halos de inhibición cerca de las colonias.

Para la elaboración de la supresión del inóculo, se utilizó el microorganismo *Candida albicans* en el medio de agar glucosa Sabouraud por 48 h. Después de suspender al microorganismo en solución salina 0,85 % y se ajustó la turbiedad al semejante al tubo 0,5 de la escala de McFarland.

Se utilizó el agar glucosa Sabouraud al inocular 1 mL de suspensión de inoculación (1×10^8 ufc / mL) por 100 mL de promedio, homogeneizar y distribuir en láminas Petri de vidrio de diámetro medio de 90 mm, fueron rotulados con el apelativo del microorganismo. Por último, se realizaron agujeros con un punzón de acero con un diámetro exterior de 11 mm, haciendo 2 o 3 agujeros equidistantes en cada placa. La inoculación e incubación de la muestra poner 100 μ L del extracto de la concentración anterior en el pocillo, se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos y luego incubo a 37 ° C durante 24 horas. Se observó que las áreas luminosas de inhibición del aumento (halos) y se midieron los diámetros en mm. Se utilizó las siguientes estimaciones para garantizar una actividad antifúngica sustancial a un halo de inhibición superior a 18 mm según Rojas²⁶, mientras que Duraffourd y Lapraz²⁷ plantean la siguiente interpretación:

- (-) Nula: Diámetro (< 8 mm);
- (+) Sensible bajo: Diámetro (8 - 14 mm);
- (++) Medio (muy sensible): Diámetro (14 - 20 mm)
- (+++): Sumamente sensible: Diámetro (> 20 mm)

Se utilizó como:

Control positivo: fluconazol 0,2 mg/mL

Control negativo: agua destilada

2.6 Aspecto ético

No aplica

2.7 Procesamiento y análisis de datos

Luego de la obtención de los datos se procedió a la clasificación de la información, tomando como referencias las dimensiones de la variable de estudio. Para la presentación de los resultados la investigación, se utilizó tablas y gráficos mediante el programa de Microsoft Excel, los cuales nos permitió interpretar en forma adecuada la información y posteriormente nos facilitó redactar las discusiones del estudio.

III. RESULTADOS

3.1. Ensayo de solubilidad del extracto etanólico de de las hojas de *Annona reticulata* L. “chirimoya roja”

Tabla 1. Solubilidad del extracto etanólico de de las hojas de *Annona reticulata* L. “chirimoya roja”

Solventes	Resultados
Agua destilada	+
Etanol	+
Metanol	+
Cloroformo	-
Benceno	-
Acetona	-
Éter etílico	-

Leyenda: (+): soluble (-): insoluble

Fuente: Elaboración propia

Interpretación: En la tabla N°1, se evidencia que el extracto etanólico de de las hojas de *Annona reticulata* L. “chirimoya roja”, presentó buena solubilidad con solventes polares como agua destilada, metanol, etanol,. Sin embargo, no presentó solubilidad en solventes como el cloroformo, acetona, benceno, éter etílico.

3.2 Marcha fitoquímica del extracto etanólico de de las hojas de *Annona reticulata* L. “chirimoya roja”

Tabla 2. Marcha fitoquímica del extracto etanólico de de las hojas de *Annona reticulata* L. “chirimoya roja”

METABOLITOS SECUNDARIOS	ENSAYO	RESULTADO
Compuestos fenólicos	Rvo. FeCl ₃ 5%	+
Taninos	Rvo. Gelatina 1%	+
Flavonoides	Rvo. Shinoda	+
Alcaloides	Rvo. Dragendorff	+
	Rvo. Mayer	+
Antraquinonas	Rvo. Borntranger	-
Saponinas	Espuma persistente	-

Leyenda:

(+) Presencia de metabolito secundario

(-) Ausencia de metabolito secundario

Fuente: Elaboración propia

Interpretación: En la tabla N°2, se evidencian los resultados de la marcha fitoquímica determinada a través de reacciones de coloración y precipitación, se realizaron los ensayos de cloruro de hierro, gelatina, Shinoda, Dragendorff, Mayer, Borntranger, espuma persistente. Se identificó la presencia de metabolitos como los compuestos fenólicos, taninos, flavonoides, alcaloides. Se evidenció la ausencia preliminar de metabolitos como antraquinonas y saponinas.

3.3.Evaluación de la actividad antimicótica

Tabla 3. Actividad antimicótica del extracto etanólico de de las hojas de *Annona reticulata* L. “chirimoya roja” frente a *Candida albicans* ATCC 10231

Microorganismo	Longitud de halos de inhibición (mm) -24 horas					
	Control negativo	25% del Extracto	50% del Extracto	75% del Extracto	100% del Extracto	Control positivo
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231						
c1	6	6	6	6	6	19.28
c2	6	6	6	6	6	19.72
c3	6	6	6	6	6	18.81
Promedio	6	6	6	6	6	19.27

*Control positivo: Fluconazol 0.2 mg/mL

*Control negativo: Agua destilada

Fuente: Elaboración propia

Interpretación: En la tabla 3, se muestran los resultados de la actividad antimicótica del extracto etanólico de las hojas de *Annona reticulata* L. “chirimoya roja” frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Se observa que los halos de inhibición del control negativo y del extracto a las diferentes concentraciones fueron 6 mm; mientras que el control positivo presento un halo de inhibición promedio de 19.27 mm.

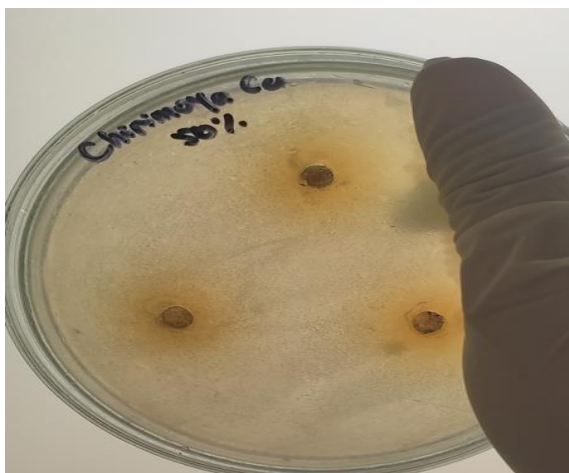


Figura 1. Halos de inhibición

IV. DISCUSIONES

Conforme con los análisis realizados como se indica en la tabla 1, se puede apreciar que el extracto etanólico de las hojas de *Annona reticulata* L. “Chirimoya roja”, presenta buena solubilidad en solventes de naturales polares como el agua destilada, etanol, metanol. Por el contrario, fue insoluble frente a solventes apolares como la cloroformo, acetona, benceno, éter etílico; esto se debe a que los diversos componentes que conforman el extracto etanólico de las hojas de *Annona reticulata* L. “Chirimoya roja”, como compuestos fenólicos, taninos, flavonoides y alcaloides, tiene afinidad a los compuestos polares.

En la tabla 2, se evidencia los resultados de la marcha fitoquímica del extracto etanólico de las hojas de *Annona reticulata* L. “Chirimoya roja”, Se identificó la presencia de metabolitos como los compuestos fenólicos, taninos, flavonoides, alcaloides. El contenido descrito de metabolitos secundarios es similar a los reportados por Sujata⁸ en el año 2018, quien reportó en el extracto etanólico de frutos de *Annona reticulata*, la presencia de alcaloides, saponina, flavonoides y taninos.

En la tabla 3, se describen los resultados de la actividad antimicótica del extracto etanólico de las hojas de *Annona reticulata* L. “Chirimoya roja” frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Se observa que los halos de inhibición para todas las concentraciones del extracto y el control negativo fueron de 6 mm. mientras que el control positivo reportó un halo de inhibición promedio de 19.27 mm. En la investigación realizada por Lataliza y Junquera¹⁰, en una especie que pertenece al género *Annona*, pero diferente especie: cuyo objetivo fue evaluar la actividad antifúngica del extracto hidroalcohólico de *Annona ambotay* frente a *Candida albicans*, reportó poca actividad frente a *Candida albicans*.

Al evidenciar que en nuestro ensayo los resultados fueron negativos podrían explicarse que la ausencia de actividad es debido al antagonismo de utilizar un extracto no refinado, por ello el extracto no pudo actuar sobre la membrana nuclear, que rodea el material de ácido nucleico; por lo tanto, no se evidenció el ensayo antimicótico.

A pesar de que nuestros resultados muestran valores no favorables, es importante destacar seguir realizando ensayos y pruebas más específicas debido a que las infecciones causadas por especies de *Candida albicans* han aumentado significativamente en los últimos 30 años, especialmente en pacientes inmunocomprometidos.

V. CONCLUSIONES

1. El extracto etanólico de las hojas de *Annona reticulata* L. “Chirimoya roja” a la concentración del 100% no presenta actividad antimicótica frente a *Candida albicans* ATCC 10231.
2. El extracto etanólico de las hojas de *Annona reticulata* L. “Chirimoya roja” a la concentración del 75% no presenta actividad antimicótica frente a *Candida albicans* ATCC 10231.
3. El extracto etanólico de las hojas de *Annona reticulata* L. “Chirimoya roja” a la concentración del 50% no presenta actividad antimicótica frente a *Candida albicans* ATCC 10231.
4. El extracto etanólico de las hojas de *Annona reticulata* L. “Chirimoya roja” a la concentración del 25% no presenta actividad antimicótica frente a *Candida albicans* ATCC 10231.

VI. RECOMENDACIONES

- Realizar las extracciones por diferentes métodos a fin de garantizar un mayor rendimiento del extracto.
- Realizar la separación de los metabolitos secundarios del extracto etanólico de las hojas de *Annona reticulata* L. “Chirimoya roja”.
- Realizar ensayos de toxicidad para las diversas fracciones del extracto etanólico de las hojas de *Annona reticulata* L. “Chirimoya roja” a fin de garantizar su seguridad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Vandeputte, P. , Ferrari, S. y Coste, AT (2012) Resistencia a los antifúngicos y nuevas estrategias para controlar las infecciones por hongos . Int J Microbiol 2012, 1-26.
2. Chang, Y. , Yu, S. , Heitman, J. , Wellington, M. y Chen, Y. (2017) Nuevas facetas de la terapia antifúngica . Virulencia 8 , 222 – 236.
3. Pfaller, MA , Messer, SA , Motyl, MR , Jones, RN y Castanheira, M. (2013b) Actividad de MK-3118, un nuevo inhibidor de glucano sintasa oral, probado contra Candida spp. por dos métodos internacionales (CLSI y EUCAST) . J Antimicrob Chemother 68, 858 – 863.
4. Tobudic, S. , Kratzer, C. y Presterl, E. (2012) Candida spp resistente a los azólicos . -patógenos emergentes? Micosis 5 , 24 – 32.
5. Flevari, A. , Theodorakopoulos, M. , Velegraki A. , Armaganidis, A. y Dimopoulos, G. (2013) Tratamiento de la candidiasis invasiva en los ancianos: una revisión . Clin Interv Aging 8, 1199 – 1208.
6. Campoy, S. y Adrio, JL (2017) Antifungals . Biochem Pharmacol 133 , 86 – 96.
7. Pianalto, KM y Alspaugh, JA (2016) Nuevos horizontes en la terapia antifúngica . J Hongos 2 , 1 - 24
8. Paul S, Dash B, Bora A, Gupta B. Screening fitoquímico preliminar y actividad antimicrobiana in vitro de extractos etanólicos de frutos de Annona Reticulata contra estándar de cepas patogénicas. International Journal of Current Pharmaceutical — Research 2018 Jul 16:10(4)59. Disponible en <https://doi.org/10.22159/ijcpr.2018v10i4.28466>.
9. Toledo L, Ramos M, Spósito L, Castilho E, Pavan F, Lopes É, et al. Profiling the Cymbopogon nardus Ethanol Extract and Its Antifungal Potential against Candida

Species with Different Patterns of Resistance. Journal of the Brazilian Chemical Society 2020:31(9), Disponible en: <https://www.scielo.br/jjbchs/a/rJe9ymKPXGWPxyDVytMKY0g?lang=enscformat=pdf>

10. Lataliza A, Junquera J, et al “Evaluación de diferentes actividades farmacológicas de Annona Ambotay (Aubl.) Biomedical journal of scientific y technical research. 2021:34). Disponible en: [https://biomedres.us/pdfs BISTR.MS.1D.005746 pdf](https://biomedres.us/pdfs/BISTR.MS.1D.005746.pdf)
11. Mgeahuruike A, Hubert A, et al. Evaluación del potencial antimicrobiano de extractos de semillas de Annona Muricata sobre patógenos bacterianos y fúngicos resistentes de importancia para la salud pública 2021:18(1). Disponible en: <https://www.ajol.info/index.php/jophas/article/view/204514>
12. Sardi, JCO , Pitanguí, NS , Rodríguez-Arellanes, G. , Taylor, ML , Fusco- Almeida, AM y Mendes-Giamnini, MIS (2014) Aspectos destacados en biopelículas de hongos patógenos . Rev Iberoam Micol 31 , 22 de – 29.
13. Kumar, P. , Mishra, S. y Singh, S. (2017) Agudeza avanzada en la génesis, el desarrollo, las infecciones clínicas asociadas y el control de la biopelícula microbiana . Journal des Anti-Infectieux 19 , 20 – 31.
14. Gulati, M. y Nobile, CJ (2016) Biofilms de Candida albicans : desarrollo, regulación y mecanismo molecular . Los microbios infectan 18 , 310 – 321.
15. Benakanakere, M. y Kinane, DF (2012) Respuestas celulares innatas a la biopelícula periodontal . Biol oral frontal 15 , 41 – 55.
16. Murciano, C. , Moyes, DL , Runglall, M. , Tobouti, P. , Islam, A. , Hoyer, LL y Naglik, JR (2012) Evaluación del papel de las proteínas de secuencia de tipo

aglutinina (Als) de *Candida albicans* en Interacciones de células epiteliales orales humanas . PLoS ONE 7.

17. Mayer, FL , Wilson, D. y Hube, B. (2013) Mecanismo de patogenicidad de *Candida albicans* . La virulencia 4 , 119 – 128.
18. Speirs, JJ , Van der Enta, CK y Beekman, JM (2012) Efectos de la colonización por *Aspergillus fumigatus* sobre la función pulmonar en la fibrosis quística . Curr Opin Pulm Med 18, 632 – 638.
19. Cowen, LE , Sanglard, D. , Howard, SJ , Rogers, PD y Perlin, DS (2014) Mecanismos de resistencia a los fármacos antimicóticos . Cold Spring Harb Perspect Med.
20. Pfaller, M. (2012) Resistencia a los fármacos antifúngicos: mecanismos, epidemiología y consecuencias para el tratamiento . Soy J Med 125 , S3 - S13.
21. Campitelli, M. , Zeineddine, N. , Samaha, G. y Maslak, S. (2017) Terapia antifúngica combinada: una revisión de los datos actuales . J Clin Med Res 9, 451 – 456.
22. Loyse, A. , Wilson, D. , Meintjes, G. , Jarvis, JN , Bicanic, T. , Bishop. L. , Rebe, E. , Williams, A. et al . (2012) Comparación de la actividad fungicida temprana de fluconazol, voriconazol y flucitosina en dosis altas como medicamentos de segunda

línea administrados en combinación con anfotericina B para el tratamiento de la meningitis criptocócica asociada al VIH . Clin Infect Dis 54, 121 - 128.

23. Chen, YL , Lehman, VN , Averette, AF , Perfect JR y Heitman, J. (2013) El posaconazol exhibe actividad antifúngica sinérgica in vitro e in vivo con caspofungina o FK506 contra *Candida albicans* . PLoS ONE 8.
24. Krishna, G. , Vickery, D. , Ma, L., Yu, X., Noren, C. , Power, E. , Beresford, E. y Medlock, M. (2011) Falta de interacción farmacocinética entre posaconazol oral y caspofungina o micafungina . J Clin Pharmacol 51 , 84 - 92.
25. Kumar, P. , Mishra, S. y Singh, S. (2017) Agudeza avanzada en la génesis, el desarrollo, las infecciones clínicas asociadas y el control de la biopelícula microbiana . Journal des Anti-Infectieux 19, 20 - 31.
26. Rojas R, Bustamante B, Bauer J, Fernández I, Albán J, Lock O. Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. J Ethnopharmacol, 2003; 88(2): 199-204.
27. Duraffourd C, Lapraz J, d' Hervicourt L. Cuadernos de fitoterapia clínica. Primera ed. Duraffourd C, editor. Barcelona: MASSON S.A.; 1987.

Anexo 01: Clasificación taxonómica de la especie vegetal

JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA CRUZ
CONSULTOR BOTÁNICO
Email: jocamde@gmail.com
Cel: 963689079



CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACION BOTÁNICA

JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA CRUZ, BIÓLOGO COLEGIADO - CBP N° 3796 - INSCRITO EN EL REGISTRO DE PROFESIONALES QUE REALIZAN CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE ESPECÍMENES Y PRODUCTOS DE FLORA - RESOLUCIÓN DIRECTORAL N° 0311-2013- MINAGRI-DGFFS-DGEFFS.

CERTIFICA:

Que, MEYSONIER YUIMACHI TAPULLIMA y CARLOS GLEN SAAVEDRA VELASQUEZ, tesis de la Universidad Privada de Huancayo Franklin Roosevelt, con fines de investigación han solicitado la identificación y certificación botánica una la planta procedente de la Comunidad de perico, distrito de Chirinos, provincia de San Ignacio departamento de Cajamarca, donde es cultivada con el nombre vulgar de "chirimoya roja", la muestra ha sido, identificada como *Annona reticulata* L. Según la base de Trópicos que sigue el Sistema moderno de clasificación de las angiospermas (APG), publicado en 1998 por el Grupo para la Filogenia de las Angiospermas, revisado por APG II (2003), APG III (2009) y APG IV (2016), el sistema APG, evita el uso de la nomenclatura taxonómica clásica por arriba de orden y según Mark W. Chase & James L. Reveal (2009) consideran a todas las plantas verdes en la Clase Equisetopsida, la especie estudiada ocupa la siguiente posesión taxonómica:

Reino: Plantae
Clase: Equisetopsida
Subclase: Magnoliidae
Superorden: Magnolianae
Orden: Magnoliales
Familia: Annonaceae
Género: *Annona*
Especie: *Annona reticulata* L.

Nombres vulgares: "chirimoya roja", "nona"

Se expide la presente certificación con fines de investigación científica.

Lima, 05 de abril del 2022



José Ricardo Campos de la Cruz
José R. Campos De La Cruz
BIÓLOGO
C.B.P. 3796

Jr. Sánchez Silva N° 156- piso 2. Urb. Santa Luzmila, Lima 07
Email: jocamde@gmail.com; joricampos@yahoo.es

Anexo 02: Certificado de la evaluación antimicótica del extracto etanólico de hojas de *Annona reticulata* L. (Chirimoya roja) frente a *Candida albicans* ATCC 10231.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
CENPROFARMA
CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA



PROTOCOLO DE ANÁLISIS N° 00196 -CPF-2022

ORDEN DE ANÁLISIS : 0197-2022
SOLICITADO POR : MEYSONIER YUIMACHI TAPULLIMA
DIRECCIÓN : -
MUESTRA : EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE HOJAS DE *Annona reticulata* L. (CHIRIMOYA ROJA)
CANTIDAD : 1 frasco por 3.83 g aprox.
FECHA DE RECEPCIÓN : 13 de mayo de 2022
FECHA DE FABRICACIÓN : -
FECHA DE VENCIMIENTO : -

MICROORGANISMO	EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE HOJAS DE <i>Annona reticulata</i> L. (CHIRIMOYA ROJA)					
	Longitud de halos de inhibición (mm)					
	Control positivo	Control negativo	100%	75%	50%	25%
<i>Candida albicans</i>	19.28	6	6	6	6	6
	19.72	6	6	6	6	6
	18.81	6	6	6	6	6

- * El tamaño de los pocillos es de 6 mm, por lo tanto, cuando se reporta esta medida indica que no hay formación de halos de inhibición.
- * Dilución de la muestra: 100%, 75%, 50% y 25% del extracto hidroalcohólico de las hojas *Annona reticulata* L. (Chirimoya roja).
- * Volumen inoculado: 40 µL
- * Concentración del inóculo: 1×10^8 UFC/mL
- * Control positivo: Fluconazol 0.2 mg/mL
- * Control negativo: agua destilada
- * 100%, 75%, 50% y 25%: diluciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Annona reticulata* L. (Chirimoya roja)

Lima, 02 de Junio del 2022


Q.F. Paul Ivan Gutierrez Elescano
Director del Centro de Control Analítico



Anexo 03: Certificado de la cepa *Candida albicans* ATCC 10231



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: <i>Candida albicans</i> Catalog Number: 0443 Lot Number: 443-1258** Reference Number: ATCC® 10231™ ¹ Passage from Reference: 3	Expiration Date: 2023/4/30 Release Information: Quality Control Technologist: Jackie L. Mackedanz Release Date: 2021/5/12
--	--

Performance	
Macroscopic Features: Small to medium, white, circular, convex, dull colonies. Microscopic Features: Gram positive, ovoidal, budding yeast cells.	Medium: Nutrient Method: Gram Stain (1)
ID System: MALDI-TOF (1) See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results (1) Germ Tube Test: positive (1) Chlamydospore production: positive  Amanda Kuperus Quality Control Manager 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 04: Evidencias fotográficas de la preparación del extracto etanólico de hojas de *Annona reticulata* L. (Chirimoya roja)

