

**“EFECTO ANTIFÚNGICO *IN VITRO* DEL EXTRACTO
HIDROALCOHÓLICO DE LA NUEZ DE *Anacardium occidentale* L. (marañón)
EN CEPAS DE *Malassezia spp.*”**



FACULTAD DE CIENCIAS DE SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y
BIOQUÍMICA
TESIS
“EFECTO ANTIFÚNGICO *IN VITRO* DEL EXTRACTO
HIDROALCOHÓLICO DE LA NUEZ DE *Anacardium occidentale L.* (marañón)
EN CEPAS DE *Malassezia spp.*”

PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO
FARMACÉUTICO

PRESENTADO POR:
BACH. DIANETH SUCASACA QUISPE
BACH. EDWING FERNANDO VERGARAY SANTANDER

ASESOR
Mg. IVAR LAVADO MORALES

LINEA DE INVESTIGACION:
RECURSOS NATURALES

Huancayo - Perú

2020

JURADOS

PRESIDENTE:

Mg. Q.F Renee Soledad Orrejo Cabanillas

MIEMBRO SECRETARIA:

Mg. Q.F Julia Arteaga Aguilar

MIEMBRO VOCAL:

Mg. Q.F Ivar Jines Lavado Morales

MIEMBRO SUPLENTE:

Mg. Q.F Javier Eduardo Curo Yllaconza

DEDICATORIA

A Dios por ser nuestra fortaleza y guía en nuestro camino, por permanecer junto con nosotros en todo momento, cuando se nos presentaba un camino lleno de dificultades siempre sentíamos tu amor a través de nuestros seres queridos, para poder lograr nuestra meta añorada

A mi madre quien a lo largo de mi vida me ha apoyado y motivado mi formación académica, por ello con mucho amor y cariño le dedico todo mi esfuerzo y trabajo en la realización de la tesis.

A mis hijos quien, con sus hermosas sonrisas, es la inspiración y motor, a ser mejor cada día.

Dianeth

Solo agradecer a la persona que siempre estuvo conmigo que fue el motivo de mi formación a lo largo de mi vida. Y que en los momentos más difíciles nunca me faltó nada. Hoy que ya no estás conmigo y éstas a lado del Señor, te extraño mucho. Gracias, madre mía Justina Hilda Santander Jara.

Edwing V.S

AGRADECIMIENTO

Damos gracias a Dios por brindarnos la fuerza y valor de seguir para culminar este trabajo de investigación para nuestro desarrollo profesional.

A la universidad Franklin Roosevelt por darnos la oportunidad en la formación como profesionales de la salud, en especial a la escuela de Farmacia y Bioquímica.

Al Mg. Ivar, docente y asesor del presente trabajo de investigación por su apoyo, dedicación y brindarnos la oportunidad de sus conocimientos científicos fundamentales para la corrección de esta tesis.

A la Dra. Jeanelly Lobatón, por la amistad incondicional, consejo y enseñanzas nos ha permitido culminar la tesis, apoyándonos en los momentos difíciles.

Al Dr. Bonilla Rivera Pablo, por sus consejos y aportes en la realización de esta tesis, gracias por su tiempo.

A la Dra. Béjar Castillo Vilma Ruth, por su apoyo incondicional. A los profesores donde acudimos en busca de consejos, gracias por su valioso tiempo.

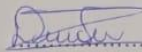
Dianeth - Edwing

DECLARATORIA DE AUTENTICIDAD

DECLARATORIA DE AUTENTICIDAD

DECLARACION JURADA SIMPLE

Yo, **DIANETH SUCASACA QUISPE** de Nacionalidad Peruana, identificado con, DNI N° 44120406, Tesista de la Universidad Privada de Huancayo Franklin Roosevelt, Bachiller en Farmacias y Bioquímica, domiciliado en Mz.F Lt.18 Grup.9 Sect.6., distrito de .Villa el Salvador...**DECLARO BAJO JURAMENTO: QUE TODA LA INFORMACIÓN PRESENTADA ES AUTÉNTICA Y VERAZ.** Me afirmo y me ratifico en lo expresado en señal de lo cual firmo el presente documento a los 28 días del mes de Octubre del 2020.



Firma DNI N° 44120406



DECLARACION JURADA SIMPLE

Yo, **EDWING F. VERGARAY SANTANDER** de Nacionalidad Peruana, identificado con, DNI N.º 10778511, Tesista de la Universidad Privada de Huancayo Franklin Roosevelt, Bachiller en Farmacias y Bioquímica, domiciliado en Mz D Lote 1 La Ensenada, distrito de Puente Piedra. **DECLARO BAJO JURAMENTO: QUE TODA LA INFORMACIÓN PRESENTADA ES AUTÉNTICA Y VERAZ.** Me afirmo y me ratifico en lo expresado en señal de lo cual firmo el presente documento a los 28 días del mes de octubre del 2020.



Firma DNI N°10778511



INDICE GENERAL

Carátula	
Dedicatoria.....	iv
Agradecimiento	v
Página del jurado	iii
Declaratoria de autenticidad	vi
Índice	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
I. INTRODUCCIÓN.....	11
II. MÉTODO	25
2.1. Tipo y diseño de investigación	25
2.2. Operacionalización de variables	25
2.3. Población, muestra y muestreo (incluir criterios de selección)	26
2.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad.....	26
2.5. Procedimiento	26
2.6. Método de análisis de datos.....	32
2.7. Aspectos éticos	32
III. RESULTADOS	33
IV. DISCUSIÓN.....	40
V. CONCLUSIONES.....	42
VI. RECOMENDACIONES	43
REFERENCIAS	44
ANEXOS	52

RESUMEN

En las últimas décadas *Malassezia spp*, siendo hoy consideradas entre los patógenos oportunistas emergentes y participa en diversos procesos patológicos que incluyen desde una serie de afecciones cutáneas hasta infecciones sistémicas en pacientes susceptibles. Las especies del género *Malassezia* son organismos levaduriformes que adquieren una importancia considerable por su asociación a procesos patológicos. Objetivo: Determinar el efecto antifúngico *in vitro* del extracto hidroalcohólico de la nuez de *Anacardium occidentale L.* (marañón) contra cepas de *Malassezia spp*. Las especies del género *Malassezia*. Se obtuvo el extracto mediante el método hidroalcohólico, el estudio experimental se lo realizó *in vitro* sobre cepa de *malassezia spp*. las cuales fueron sembradas con agar Miuller Hilton Modificado, sobre los cuales se colocaron discos impregnados con las sustancias de estudio al 50% y 75% y 100% además de Ketoconazol como control positivo y Suero Fisiológico como control negativo. Los halos de inhibición formados con las sustancias de estudio se los midió, y se pudo observar mayor diámetro del halo de inhibición para el ketoconazol seguido por el extracto de marañón (*Anacardium occidentale*), Método: Tipo de investigación experimental, la muestra fue la nuez de *Anacardium occidentale* (marañón). Resultados: Se obtuvo que el crecimiento de *malassezia*, es inhibido por el extracto hidroalcohólico de la nuez de *Anacardium occidentale L.* (marañón). a partir de una concentración al 100% presentó un halo de inhibición de 11,67 mm en promedio, mientras que en la concentración de 75% presentó un halo de inhibición de 10,11 mm, en promedio finalmente a 50% presento un halo de inhibición de 9mm en promedio. Conclusiones: Al evaluar el extracto hidroalcohólico del marañón de *Anacardium occidentale*, se confirma que tiene efecto antifúngico *in vitro* a las concentraciones del 50%, 75% y 100% sobre *malassezia spp*.

Palabras clave: *Anacardium occidentale L.*, extracto hidroalcohólico, efecto antifúngico, halo de inhibición, *Malassezia spp*

ABSTRACTO

En las últimas décadas *Malassezia spp*, siendo hoy consideradas entre los patógenos oportunistas emergentes y participa en diversos procesos patológicos que incluyen desde una serie de afecciones cutáneas hasta infecciones sistémicas en pacientes susceptibles. Las especies del género *Malassezia* son organismos levaduriformes que adquieren una importancia considerable por su asociación a procesos patológicos. Objetivo: Determinar el efecto antifúngico in vitro del extracto hidroalcohólico de la nuez de *Anacardium occidentale L.* (marañón) contra cepas de *Malassezia spp*. Las especies del género *Malassezia*. Se obtuvo el extracto mediante el método hidroalcohólico, el estudio experimental se lo realizó in vitro sobre cepa de *malassezia spp*. las cuales fueron sembradas con agar Miuller Hilton Modificado, sobre los cuales se colocaron discos impregnados con las sustancias de estudio al 50% y 75% y 100% además de Ketoconazol como control positivo y Suero Fisiológico como control negativo. Los halos de inhibición formados con las sustancias de estudio se los midió, y se pudo observar mayor diámetro del halo de inhibición para el ketoconazol seguido por el extracto de marañón (*Anacardium occidentale*), Método: Tipo de investigación experimental, la muestra fue la nuez de *Anacardium occidentale* (marañón). Resultados: Se obtuvo que el crecimiento de *malassezia*, es inhibido por el extracto hidroalcohólico de la nuez de *Anacardium occidentale L.* (marañón). a partir de una concentración al 100% presentó un halo de inhibición de 11,67 mm en promedio, mientras que en la concentración de 75% presentó un halo de inhibición de 10,11 mm, en promedio finalmente a 50% presento un halo de inhibición de 9mm en promedio. Conclusiones: Al evaluar el extracto hidroalcohólico del marañón de *Anacardium occidentale*, se confirma que tiene efecto antifúngico in vitro a las concentraciones del 50%, 75% y 100% sobre *malassezia spp*.

Palabras clave: *Anacardium occidentale L.*, extracto hidroalcohólico, efecto antifúngico, halo de inhibición, *Malassezia spp*

I. INTRODUCCIÓN

Las especies del género *Malassezia* son organismos levaduriformes lipofílicas ya que son incapaces de sintetizar ácidos grasos requieren de una fuente externa de lípidos para su desarrollo, y que habita normalmente en la piel (microbiana) y se aísla en el 90 a 100% de la población. Presenta una amplia distribución mundial, siendo hoy consideradas entre los patógenos oportunistas emergentes y participa en diversos procesos patológicos que incluyen desde una serie de afecciones cutáneas hasta infecciones sistémicas en pacientes susceptibles. Son importantes algunos factores endógenos y exógenos que pueden influir en su desarrollo, podemos considerar algunos como el calor, humedad, piel grasa, la falta de higiene, la deficiencia nutricional, tratamientos con corticosteroides, disminución de la inmunidad. Su incidencia es 30 a 50% en países con clima tropical, mientras en climas templados oscila entre 1,1% y 3,7%, representando alrededor del 20% de las micosis superficiales y siendo más frecuente en verano y otoño. Se localizan con mayor frecuencia en el tronco, los hombros y el tórax; también puede observarse en el cuello, brazos y abdomen; ocasionalmente en los glúteos y pliegues inguinales, pero se han detectado en la mayoría de las partes del cuerpo excepto en los pies. Se ha encontrado desde recién nacidos hasta ancianos, el promedio de máxima incidencia esta entre 18 y 25 años adultos jóvenes de ambos sexos. Sin embargo, es más frecuente a partir de la adolescencia, cuando las glándulas sebáceas son más activas ¹.

Los tratamientos aplicados hoy en día frente a las afecciones causadas por este género de levaduras no son eficaces para erradicarlas completamente, por lo que en muchos casos se presentan como micosis recurrentes. Estos tratamientos antifúngicos tópicos y sistémicos son compuestos químicos que presentan actividad antimicótica, la misma que se sustenta en la interactividad sobre las distintas sustancias que intervienen en el proceso metabólico y desarrollo del hongo, que causa la inhibición de su crecimiento (fungistáticos) o su muerte (fungicidas). Además, muestra efectividad durante periodos prolongados, pero también un alto índice de efectos adversos ¹.

En el caso para la micosis superficiales es tópico mediante la utilización de imidazoles como el ketoconazol, pero las principales desventajas en su utilización son los efectos sobre el sistema endocrino y reproductor, ya que produce toxicidad hepática y renal,

factores que limitan su uso, además tienen un alto costo y un tiempo prolongado, por lo que se busca identificar nuevos componentes naturales antifúngicos, de mayor potencia y fundamentalmente más seguros que los actualmente utilizados ².

El área de la Amazonía del Perú es considerada una de las regiones con mayor diversidad vegetal de la tierra, donde cohabitan el 8% de la totalidad de las especies vegetales, de las que se estima que solo el 1% o menos se han podido estudiar en sus propiedades fitoquímicas o para uso farmacológico, de modo que su investigación podría encaminarse a la determinación de un conjunto de nuevos y variados compuestos bioactivos que podrían tener posibles aplicaciones terapéuticas¹. Una de estas especies es la *Anacardium occidentale* L. (marañón), cuya nuez crece en gran parte de la selva de nuestro país, cuyos estudios ha encontrado posible, actividad antimicrobiana y antifúngica ².

La presente investigación trata de establecer la efectividad de la nuez de marañón como agente antifúngico, ya que en el Perú como en otras partes del mundo la especie *Anacardium occidentale* L. (marañón) es una planta medicinal utilizada por lo general como alternativa en la cura de diversas enfermedades, debido a sus propiedades medicinales.

La presente investigación ha tomado como referencia los antecedentes nacionales como Vargas K, Zacarías C. (2012). En Lima se realizó el diseño y elaboración de un producto farmacéutico a base del extracto etanólico purificado del fruto *Anacardium occidentale* (marañón) con actividad antifúngica frente a dermatofitos *in vitro*. La loción fue preparada seleccionando excipientes afines con el extracto etanólico al 25% del fruto de *Anacardium occidentale*, que presentó mayor actividad antifúngica y cantidad de compuestos fenólicos frente a los demás extractos etanólicos de 15 y 20%. Se evaluó los ensayos de susceptibilidad antifúngica mediante el método de microdilución en caldo e inhibición del crecimiento micelial, utilizando cepas referenciales del género *Trichophyton* y *Microsporum* del Instituto de Salud. El extracto al 25% mostró un mejor resultado frente al *Microsporum canis* obteniendo un CMI de 625ug/mL y un halo de inhibición de 17.67mm. La loción mostró resultados óptimos y estables en los análisis organolépticos, físicoquímicos y susceptibilidad antifúngica durante un seguimiento de tres meses y no presentó toxicidad aguda en el modelo animal utilizado ³.

Ponce C. (2011). En la presente investigación se evaluó la actividad antibacteriana *in vitro* del Aceite de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale* a partir de distintas concentraciones (al 100 %, al 60 %, al 50 %, al 40 % y al 30 %) sobre dos tipos de cepas de *Streptococcus mutans* (cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y aisladas de muestras de pacientes) La siembra, cultivo y recolección del fruto fue llevada a cabo en la ciudad de Iquitos (Loreto-Perú), la extracción del aceite se realizó mediante la técnica sólido-líquido o Soxhlet, el diluyente del aceite fue el Hidróxido de Sodio al 0.1 N, y el control positivo la Clorhexidina al 0,12 %. El aceite de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale* en todas las concentraciones utilizadas presentó acción antibacteriana mediante el método de difusión in vitro, sobre ambos tipos de cepas de *Streptococcus mutans* y tuvo mejor actividad antibacteriana que la Clorhexidina al 0,12 % ($p > 0,05$). No se pudo encontrar diferencias significativas en la acción antibacteriana del aceite a las diversas concentraciones en ambos tipos de cepa, y las cepas de procedencia clínica fueron estadísticamente más sensibles que las cepas ATCC ²⁹.

Navarro A. (2018), Cuantificación de los compuestos polifenólicos y evaluación de la actividad antioxidante de los extractos hidroalcohólicos de *Anacardium occidentale* L, *Muehlenbeckia volcanica* (Benth.) Endl. y *Gamochaeta purpurea* (L.) Cabrera. Tuvo como objetivos evaluar la cuantificación de los compuestos polifenólicos y la actividad antioxidante *in vitro* de los extractos hidroalcohólicos de *Anacardium occidentale* L (frutos), *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl. (Planta entera) y *Gamochaeta purpurea* (L.) Cabrera (planta entera). La cuantificación de los compuestos polifenólicos se evaluó según el método espectrofotométrico desarrollado por Folin y Ciocalteau, utilizando el ácido gálico como estándar y la actividad antioxidante se determinó por el método de DPPH● y ABTS●+. Las determinaciones para el contenido de compuestos polifenólicos de *A. occidentale* L, *M. volcanica* y *G. purpurea* se encuentran entre $6,369 \pm 0,27$; $53,306 \pm 0,57$ y $68,915 \pm 2,93$ mg EAG/ g ES, respectivamente; mientras que sobre la actividad antioxidante según el IC50 se obtuvieron 19,29; 17,55; 4,11 y 5,83; 5,43; 5,26 $\mu\text{g/mL}$ para los métodos de DPPH● y ABTS●+, respectivamente. El análisis fitoquímico evidenció la presencia de flavonoides y fenoles, taninos, antraquinonas y saponinas en los extractos estudiados. En las tres especies se resalta la presencia de flavonoides y fenoles ³⁰.

Gómez S, Pereira J. (2016). En Lima se estudió la evaluación de la actividad anti-staphylococcus aureus del extracto alcohólico de hojas de *Anacardium occidentale linn.* “casho” mediante el método de difusión en disco (kirby bauer)”. La cepa bacteriana de experimentación fue *Staphylococcus aureus*. Para el método de disco difusión, se utilizó como control Positivo Gentamicina 10 ug, el cual obtuvo un promedio de 17.5mm. En el Diámetro de la zona de inhibición (DZI), encontrándose como resultado SENSIBLE según parámetros del método de Kirby – Bauer (>15 mm = Sensible). El extracto alcohólico de hojas de *Anacardium occidentale Linn* (Casho), se evaluaron a concentraciones de 75, 150 y 300 mg/ml. encontrándose diámetros en la zona de inhibición de 6.0mm., 6.7mm., 8.0 mm. Respectivamente, los cuales obtuvieron como resultados resistente, por encontrarse por debajo del parámetro de comparación según control positivo (<12 mm = Resistente). La actividad antibacteriana fue medida principalmente por el porcentaje de inhibición que demostró el extracto alcohólico a las diversas concentraciones evaluadas, encontrándose 34.29% y 38.29% en las concentraciones de 75mg/ml y 150 mg/ml respectivamente; lo cual demostró ser inactivo frente a *Staphylococcus aureus*. En la concentración de 300 mg/ml, se obtuvo un porcentaje de inhibición de 45.71%, considerándolo como Poco Activo ²⁰.

También se consideró los antecedentes internacionales como Bahare S, Mine G, et. (2020) Se investigó los efectos antioxidantes, antimicrobianos y anticancerígenos de las plantas de anacardo: una perspectiva etnofarmacológica. Las plantas de *Anacardium* han recibido un reconocimiento cada vez mayor debido a sus propiedades nutricionales y biológicas. Varios metabolitos secundarios están presentes en sus hojas, frutos y otras partes de la planta. Entre los efectos bioactivos de las diversas plantas de *Anacardium*, sus actividades antioxidantes, antimicrobianas y anticancerígenas comprenden las que han ganado más atención. Así, el presente artículo tiene como objetivo revisar los efectos biológicos de las plantas de *Anacardium*. También se hace especial hincapié en su eficacia farmacológica y clínica, lo que puede desencadenar más estudios sobre sus propiedades terapéuticas con ensayos clínicos ⁶.

Pallo (2017) En Ecuador se investigó experimental *in vitro* sobre cepas comerciales de *Streptococcus mutans* ATCC 35668 simulando los microorganismos que tienen mayor prevalencia en enfermedades bucodentales, las cuales fueron sembradas en 24 cajas Petri con agar sangre, sobre los cuales se colocaron discos de papel filtro impregnados con las sustancias de estudio; el extracto de la cáscara del marañón (*Anacardium occidentale*) al 40% y 80% además de Gluconato de Clorhexidina 0.12% y Suero Fisiológico como controles positivo y negativo. Para el estudio se consideró las condiciones de anaerobiosis, a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ y CO_2 al 5%; y así lograr una adecuada incubación de los microorganismos. Los halos de inhibición formados alrededor de los discos con las sustancias de estudio se los midió después de transcurridas 48 horas, en los cuales se pudo observar mayor diámetro del halo de inhibición para el Gluconato de clorhexidina seguido por el extracto de marañón (*Anacardium occidentale*), sin descartar el efecto inhibitorio de las diferentes concentraciones del extracto. Los resultados obtenidos fueron analizados por pruebas de normalidad (Mann Whitney, Kruskal Wallis, Wilcoxon) ²⁸.

Rubenice S, Liberio S, et. (2016) En Brasil se analizó la actividad antimicrobiana y antioxidante de *Anacardium occidentale* L. de las flores en comparación con extractos de corteza y hojas. La familia *anacardiaceae*, se utiliza con frecuencia para tratar infecciones. Evaluamos la actividad antimicrobiana y antioxidante de extractos obtenidos de partes aéreas de la planta en comparación con el extracto preparado con las flores. La actividad antimicrobiana fue evaluada por métodos de difusión en agar y dilución en caldo. Se determinaron las concentraciones mínimas bactericidas y fungicidas contra 14 microorganismos. El perfil fitoquímico de la actividad antioxidante se analizó por métodos colorimétricos y por HPLC con detección UV. Todos los extractos exhibieron actividad antioxidante y antimicrobiana. Aunque, el extracto etanol de flores fue el más efectivo ya que inhibió el crecimiento de los 14 microorganismos analizados. En todos los extractos se identificaron compuestos fenólicos, triterpenos, flavonas y xantonas. En conclusión, los extractos obtenidos de las partes aéreas de *A. occidentale*, principalmente el extracto de flores que resultó más eficaz, son ricos en metabolitos bioactivos que ejercen un potente efecto antioxidante y antimicrobiano, ya que indican un importante potencial biotecnológico de *A. occidentale* ⁵.

Martínez Y. et al. (2012). En Cuba se estudió metabolitos secundarios y actividad antibacteriana *in vitro* de extractos de hojas de *Anacardium occidentale* L. (marañón), en el extracto fluido y en la tintura al 20 % de hojas de *Anacardium occidentale* L. se detectaron mayormente cumarinas, su calidad no se afectó durante 6 meses y entre otros metabolitos como saponinas, flavonoides, azúcares reductores, aminoácidos libres, triterpenos/esteroides, fenoles/taninos. En los extractos, clorofórmico y acetato de etilo, se detectaron cumarinas y azúcares reductores y mostraron actividad estafilococica *in vitro* ⁴.

En cuando a las **base teóricas** se ha considerado definir que es un hongo: que constituyen un gran conjunto de microorganismos, diversificado y muy extendido, que comprende a las levaduras, setas y también los mohos. Se han descrito aproximadamente 100 000 especies de hongos y se estima que podrían existir hasta 1.5 millones de especies. Entre los cuales causan dolencias al ser humano y también en animales ⁷.

Los hongos son microorganismos eucariontes y cada célula fúngica posee al menos un núcleo y membrana nuclear, retículo endoplásmico, mitocondrias y aparato secretor. La mayoría son aeróbicos obligados o facultativos⁷. La micosis son las infecciones causadas por los hongos, siendo mayoritariamente exógenos; las afecciones de mayor incidencia se conocen como candidiasis y dermatofitosis, originadas por hongos que son parte de la flora microbiana normal o están muy adaptados para sobrevivir en el huésped humano ^{7,8}

Tabla N° 01. Principales micosis y hongos causantes en el hombre.

TIPOS DE MICOSIS	AGENTES CAUSANTES	MICOSIS
Superficial	Especies de <i>Malassezia</i>	<i>Malassezia furfur</i>
	<i>Hortaea werneckii</i>	Tiña negra
Cutánea	Especies de <i>Trichosporon</i>	Piedra blanca
	<i>Piedraia hortae</i>	Piedra negra
	Especies de <i>Microsporum</i> , <i>Trichophyton</i> y <i>Epidermophyton floccosum</i>	Dermatofitosis
	<i>Candida albicans</i> y otras especies de <i>Candida</i>	Candidiasis de piel, mucosa o uñas.
Subcutánea	<i>Sporothrix schenckii</i>	<i>Esporotricosis</i>
	<i>Phialophora verrucosa</i> , <i>Fonsecaea pedrosoi</i> y otros	<i>Cromoblastomicosis</i>
	<i>Pseudallescheria boydi</i> , <i>Madurella mycetomatis</i> y otros	<i>Micetoma</i>
	<i>Exophiala</i> , <i>bipolar</i> , <i>exserohilum</i> y otros	<i>Faohifomicosis</i>
	Infecciones por hongos patógenos	<i>Coccidioidomycosis</i>
	<i>Coccidioides immitis</i> , <i>C. posadasii</i>	<i>Histoplasmosis</i>
	<i>Histoplasma capsulatum</i>	<i>Blastomicosis</i>
	<i>Blastomyces dermatitidis</i>	<i>Paracoccidioidomycosis</i>
	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	
	Sistémicas	Infecciones por hongos oportunistas
<i>Candida albicans</i> y otras especies de <i>Candida</i>		<i>Candidiasis sistémica</i>
<i>Cryptococcus neoformans</i>		<i>Criptococosis</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i> y otras especies de <i>Aspergillus</i>		<i>Aspergilosis</i>
Especies de <i>Rhizopus</i> , <i>Absidia</i> , <i>Mucor</i> y otros cigomicetos		<i>Mucormicosis</i>
		<i>(cigomicosis)Peniciliosis</i>

Fuente: Tomado del libro de Microbiología de Burrows ⁹.

En las especies del género *Malassezia* son seres levaduriformes, lipofílicos, han sido reconocidos durante más de un siglo como agentes de ciertas enfermedades de la piel o de infecciones sistémicas oportunistas. Las características del género *Malassezia* tienen una morfología distintiva, además de una relación por los lípidos que varían entre las especies ¹⁰.

Se clasifica su taxonomía en:

Reino: Fungi

División: *Basidiomycota*

Clase: *Ustilaginomycetes*

Orden: *Malasseziales*

Género: *Malassezia*

Especie: *Malassezia spp* ⁷.

Además la actividad de las glándulas sebáceas humanas se encuentran en toda la superficie de la piel (excepto en las palmas de las manos y las plantas de los pies), pero la secreción de sebo es mayor en el cuero cabelludo, la cara, el pecho y la espalda. El sebo se produce bajo control hormonal, con glándula sebácea activa al nacer bajo el control de los andrógenos maternos. Reducen rápidamente su tamaño y la producción de sebo hasta el inicio de la pubertad. A medida que comienza la pubertad, la glándula sebácea vuelve a activarse, esta vez bajo el control de andrógenos circulantes ¹⁰.

La tasa de secreción de sebo aumenta a lo largo de los adolescentes, se mantiene estable hasta los 20 y 30 años, y luego disminuye con la edad. A lo largo del período activo de la secreción de sebo, la tasa de secreción es mayor en hombres que en mujeres. En los varones, la tasa permanece más alta por más tiempo, en los años 50 y 60, pero en las mujeres, la tasa de secreción disminuye rápidamente después de la menopausia ¹⁰.

La composición del sebo humano es una mezcla compleja de triglicéridos, ácidos grasos, ésteres de cera, ésteres de esterol, colesterol, ésteres de colesterol y escualeno. A medida que se secreta el sebo, se compone principalmente de triglicéridos y ésteres, que son degradados por los microbios comunes en diglicéridos, monoglicéridos y los ácidos grasos libres constituyentes. El sebo humano contiene ácidos grasos saturados e insaturados, con una preponderancia de insaturados. La longitud de la cadena de ácidos grasos del sebo humano varía considerablemente, pero son predominantemente de 16 y 18 carbonos (esteárico, C18: 0, oleico, C18: 1D9, linoleico, C18: 2D9D12, palmítico, 16: 0, sapiénico, 16: 1D6 y palmitooleico, C16: 1D9). El papel de los ácidos grasos específicos del sebo humano se hace evidente cuando examinamos el metabolismo de *Malassezia* ¹⁰.

Sus principales propiedades de la *Malassezia* es que tiene una nueva fuente de alimento y prolifera, además tiene un gusto muy específico para los ácidos grasos individuales. Las lipasas de *Malassezia* no son específicas y degradan cualquier triglicérido disponible. Los ácidos grasos saturados se consumen y los insaturados abundantes se dejan en la piel ¹⁰.

Características biológicas y fisiología del género *Malassezia* se puede encontrar tanto en forma de levadura como de micelio, y es la levadura la que se asocia a la piel sana y la

que predomina en los medios de cultivo. Las células levaduriformes pueden tener múltiples formas: globosas a subglobosas, ovales o cilíndricas, dependiendo de la especie y del medio. Su pared celular de estas levaduras presenta múltiples capas, la estructura de esta membrana externa es rica en lípidos y su composición varía de acuerdo al medio de cultivo utilizado, resultando así en un mecanismo de modulación variable en el sistema inmune del hospedero frente a estas levaduras. Todas las especies de *Malassezia* son lipofílicas y la mayoría lipodependientes por lo tanto requiere para su crecimiento la suplementación de los medios de cultivos con ácidos grasos de cadena larga, a excepción de *M. pachydermatis* ¹¹.

Benham, en 1939, fue quien por primera vez notó la necesidad de incorporar sustancias grasas al medio de cultivo debido a que estas levaduras presentan una incapacidad para fermentar azúcares y utilizan los lípidos como única fuente de carbono ¹².

Su rol patogénico de las especies de *Malassezia* son parte de la microbiota normal de la piel y las mucosas de los seres humanos y animales. La colonización se inicia en los primeros días de vida y alcanza las concentraciones más elevadas al iniciar la pubertad y en la edad temprana adulta. Debido a sus requerimientos de una fuente de los lípidos, estas levaduras se encuentran más frecuentemente en áreas ricas en glándulas sebáceas, como ser: tronco, espalda, cara y cuero cabelludo y con menor frecuencia en brazos, piernas y genitales ¹¹.

Las especies de *Malassezia* se han asociado a una vasta variedad de afecciones de la piel y sistémicas. El papel patogénico de estas levaduras en enfermedades de la piel siempre ha sido motivo de controversia. Una de las cuestiones clínicas principales que se plantea es determinar cuál es la relación entre las especies y el desorden dermatológico en sí, es decir, si las levaduras de *Malassezia* son causa de la afección o bien si forman parte de un fenómeno secundario que agrava la enfermedad ¹¹.

Actualmente, podemos discriminar distintos estados en la coexistencia de *Malassezia* con la piel del hospedador. Uno es el estado de comensal - simbiosis, en el que la levadura y la piel del hospedero están en equilibrio. El segundo es el estado patógeno, en el que existe un aumento en la carga fúngica sin inflamación, o bien existe enfermedad con un

proceso de inflamación presente en dermatitis seborreica. En ambos casos las levaduras de *Malassezia* que se encontraba como comensal, están implicadas en el proceso de la enfermedad. Las evidencias demuestran que la interacción de las levaduras de *Malassezia* con la piel es multifacética e involucra distintos componentes de la pared celular, enzimas y productos metabólicos del hongo, así como de las células que componen la epidermis¹³.

Numerosas son las investigaciones enfocadas en la identificación de nuevas sustancias con actividades biológicas de origen o procedencia natural, entre las cuales una gran cantidad de estas investigaciones, tuvieron el objetivo de evaluar las actividades antimicrobianas, a partir de extractos y aceites esenciales de diversas plantas de uso medicinal y aromático. Utilizando para esto las técnicas *in vitro*, debido a su sencillez y su posibilidad de reproducibilidad¹¹.

En cuanto a la especie a estudiar es el *Anacardium occidentale* L. (marañón), se describe que el *Anacardium occidentale* L. (marañón), pertenece a la familia *Anacardaceae*, es un árbol pequeño de hasta 15 m de altura. Las hojas son simples, alternas, entera, subcoriácea, glabra, obovada-oblonga, redondeada en el ápice y corta en el tallo. Inflorescencia en cimas terminales grandes. Flores hermafroditas o estaminadas, blanco-amarillentas; rosadas a las antesis, flagrantes; corola con 5 pétalos generalmente blanquecinos y con manchas rojizas, ovario súpero. El fruto consta de dos partes; la nuez y el pseudofruto. La nuez es verde al inicio, pero se torna marrón grisáceo paulatinamente y está conformado por una corteza gruesa (formada por un exocarpo grueso, un endocarpo duro, ambos separados por un mesocarpo resinoso) en donde se aloja la semilla. El pseudofruto es el resultado del desarrollo del pedúnculo en una estructura carnosa, amarilla o roja, de 5 a 10cm de longitud con forma de pera, y madura posteriormente a la nuez. Este pseudofruto es conocido como el "fruto falso" del marañón. Se encuentra en América tropical desde México y las Indias occidentales hasta Brasil y cultivadas en Perú (Cuzco, Huánuco, Junín, Loreto, Pasco, San Martín, Ucayali)^{14,15}.

La clasificación de la taxonomía es:

Reino: *Plantae*

División: *Angiospermae*

Clase: *Magnoliopsida*

Orden: *Sapindale*

Familia: *Anacardiaceae*

Género: *Anacardium*

Especie: *occidentale*

Nombre Científico: *Anacardium occidentale L.*

Nombres Comunes: Marañón, caju, Merey ^{11,14}.

Los usos medicinales del jugo de la corteza de la fruta y el aceite de nuez son remedios caseros para los callos y verrugas, úlceras cancerosas, e incluso elefantiasis. El cocimiento de la corteza astringente se usa para tratar la diarrea severa y candidiasis. Las hojas viejas se aplican a afecciones de la piel. Los Indios Guna utilizan la corteza en los tés de hierbas para el asma, resfriados y congestión. El aceite de la semilla se cree que es amebicida; se utiliza para tratar la gingivitis, la malaria, y las úlceras sifilíticas. En la medicina Ayurveda se recomienda la fruta como antihelmíntica y afrodisíaco. La decocción de las hojas se usa para hacer gárgaras contra el dolor de garganta. Los cubanos usan la resina para tratamientos de frío y retención de líquidos ¹⁰.

Los enfoques conceptuales son: Antifúngico: Sustancias que destruyen hongos al suprimir su capacidad para crecer o reproducirse ⁷.

Cepa: Referida a la característica de un organismo que se distingue por que mantiene sus propiedades bioquímicas y macroscópicas homogéneas y únicas ⁷.

Levadura: Término general para hongos redondos unicelulares que se reproducen por brotes ⁷.

Extracto Hidroalcohólico: denominación de líquidos concentrados, que se obtienen de la extracción de una planta o de una parte de esta, con la utilización de solventes como alcohol y agua ¹⁵.

Difusión en disco: Método que se basa en la determinación de una zona de inhibición del crecimiento que es proporcional a la sensibilidad de la bacteria frente al antimicrobiano presente en el disco ¹¹.

Unidad formadora de colonias (UFC): Unidad de medida utilizada para la cuantificación de microorganismos. Se refiere al número de bacterias o células fúngicas (levaduras) viables en una muestra líquida o sólida ¹¹.

Escala McFarland: Es una técnica de medición de turbidez, su utilidad es destacada para crecimiento de microorganismos como medida de la concentración celular.

Maceración: Se comprende por este proceso como el acercamiento consecutivo durante el lapso de tiempo de la droga con el menstruo, lo cual conforma una agrupación igualitaria mezclado. De esta forma, el menstruo reacciona de igual forma para todos los segmentos de la droga circulando a través en todas las direcciones y sentidos y disolviendo sus principios activos hasta ocasionar una concentración en estabilidad con la del contenido celular ¹⁵.

Leyenda: Son los textos que se ubican dentro de las figuras para explicar lo que se muestra en ellas, es necesario identificar cada una de ellas mediante símbolos y leyendas: - insoluble + ligeramente soluble ++ soluble +++ muy soluble.

In vitro: Referida a la técnica para llevar a cabo un experimento específico en un tubo de ensayo; regularmente en un ambiente controlado fuera de un organismo vivo. Un ejemplo ampliamente conocido es la fecundación in vitro ¹¹.

Halo de inhibición: Zona alrededor de un disco de antibiótico en un antibiograma en el que no se produce crecimiento bacteriano en una placa de agar inoculada con el germen, se mide la potencia del antibiótico frente al germen ¹¹.

De este modo es que se propone determinar si el extracto hidroalcohólico de la nuez de *Anacardium occidentale L.* presenta efecto antifúngico sobre cepas de *Malassezia spp.* Considerando gran importancia la investigación identificamos como el problema y nos formulamos una pregunta: **¿Existe efecto antifúngico *in vitro*** del extracto hidroalcohólico de la nuez de *Anacardium occidentale L.* (marañón) contra cepas de *Malassezia spp.*? Para el cual tenemos como problemas específicos: ¿Qué metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de la nuez de *Anacardium occidentale L.* (marañón) serán los responsables del efecto antifúngico *in vitro* en cepas de *Malassezia spp.*?, ¿A qué concentraciones 50%, 75% y 100% del extracto hidroalcohólico de la nuez de *Anacardium occidentale L.* (marañón) tendrá efecto antifúngico *in vitro* en cepas de *Malassezia spp.*?, ¿El extracto hidroalcohólico de la nuez de *Anacardium occidentale L.* (marañón) presentará a mayor concentración efecto antifúngico *in vitro*, en cepas de *Malassezia spp.*? La justificación para la presente investigación se refiere a el uso de la especie vegetal y una cepa fúngica el cual describimos: Las especies de *Malassezia spp.*, se asocian a una serie de afecciones de la piel, como la pitiriasis versicolor, dermatitis seborreica, caspa, foliculitis, dermatitis atópica, y psoriasis etc. También causa infecciones sistémicas en pacientes inmunocomprometidos¹⁶.

Las afecciones mencionadas, regularmente tienen un tratamiento en base a compuestos químicos, que en muchos casos presentaron efectos secundarios adversos a la salud de los pacientes ¹⁶.

En tal sentido es conveniente y necesaria la búsqueda de mejores alternativas que permitan tratamientos óptimos, para estos tipos de enfermedades, que posibiliten la inhibición de los procesos de resistencia de estos microorganismos ¹⁶.

Así mismo tenemos propuesto como objetivo general: Determinar el efecto antifúngico *in vitro* del extracto hidroalcohólico de la nuez de *Anacardium occidentale L.* (marañón) contra cepas de *Malassezia spp.* y los objetivos Específicos: Identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de la nuez de *Anacardium occidentale L.* (marañón) responsables del efecto antifúngico *in vitro*, en cepas de *Malassezia spp.*

Determinar el efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de la nuez de *Anacardium occidentale* L. (marañón) a diferentes concentraciones 50%, 75% y 100% en cepas de *Malassezia spp.* Comparar el efecto antifúngico *in vitro* del extracto hidroalcohólico de la nuez de *Anacardium occidentale* L. (marañón) a diferentes concentraciones 50%, 75% y 100% en cepas de *Malassezia spp.*

Con la información obtenida llegamos a la hipótesis general que el extracto hidroalcohólico de la nuez de *Anacardium occidentale* L. (marañón) tiene efecto antifúngico contra cepas de *Malassezia spp.* Para la cual tenemos hipótesis específicas: Existen metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de la nuez de *Anacardium occidentale* L. (marañón) responsables del efecto antifúngico *in vitro*, en cepas de *Malassezia spp.* El extracto hidroalcohólico de la nuez de *Anacardium occidentale* L. (marañón) a diferentes concentraciones 50%, 75% y 100%, tiene efecto antifúngico, *in vitro*, en cepas de *Malassezia spp.* A mayor concentración, el extracto hidroalcohólico de la nuez de *Anacardium occidentale* L. (marañón), presenta mayor intensidad de efecto antifúngico *in vitro*, en cepas de *Malassezia spp.*

II. METODO

2.1 Tipo y diseño de investigación

La investigación responde al tipo: experimental por la manipulación de la variable independiente expresada en la introducción y manipulación de los extractos para la determinación del efecto antifúngico, contándose además con un grupo control positivo por Ketoconazol 20mg, un grupo control negativo por suero fisiológico; y grupo experimental extracto hidroalcohólico *Anacardium occidentale L.* (marañón) en diferentes concentraciones 50%, 75% y 100%. Cada grupo debidamente representados por discos de papel filtros embebidos equilibradamente con las diferentes sustancias.²⁴

In vitro: En razón de que el estudio se lleva a cabo en medios de cultivo que sirven para el desarrollo de los hongos y se manipula deliberadamente las condiciones de la investigación.²⁴

Investigación analítica. - Es posible el análisis de los diferentes componentes que tienen el extracto y la manera de su influencia en el efecto antifúngico.²⁴

Investigación descriptiva. - Se describió los resultados obtenidos en el estudio, en todo el proceso y la realización de los diferentes ensayos. En el diseño de investigación es básica, experimental aleatorio, cuyo objetivo principal se orienta a determinar el efecto antifúngico, a través del método de difusión en disco (Kirby-Bauer), representada en halos de inhibición que tuviera el extracto hidroalcohólico elaborado de la nuez de *Anacardium occidentale L.* (marañón) en concentraciones, 50%, 75% y 100% ²⁴.

2.2 Operacionalización de variables. Anexo 1.

Variable Independiente:

El extracto hidroalcohólico de la nuez de *Anacardium occidentale L.* (marañón)

Variable Dependiente:

Efecto antifúngico en cepas de *Malassezia spp.*

Indicadores: (VI)

Posibles metabolitos secundarios compuestos fenólicos, flavonoides, taninos, alcaloides

Indicadores: (VD)

Halo de inhibición en medios de cultivo

2.3 Población, muestra y muestreo

Población

2 árboles de marañón en 20m²

La cepa de *Malassezia spp.*, a utilizarse para el estudio de 25 pacientes

Muestra: 250mg de la nuez de *Anacardium occidentale L.* (marañón)

Cepas de *Malassezia spp.* de 9 pacientes

2.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad

Técnica de recolección de datos es observacional donde el investigador realizó una evaluación y registró dichos datos en el instrumento de investigación, observación y registro de los cambios ocurridos en el tamizaje y en las placas para la parte microbiológica. En el instrumento de recolección de datos es una ficha de observación Ad-Hoc, que es validada por el asesor, elaborada con fines de investigación. El presente documento cuenta con ítems acorde a los indicadores de las variables operacionalizadas. La mencionada ficha es registrada únicamente por el investigador. Así mismo la técnica de procesamiento screening fitoquímico o Tamizaje fitoquímico, utilizada en farmacognosia para determinar la presencia de metabolitos secundarios. Que consiste en la extracción de la planta con solventes apropiados y la aplicación de reacción de color y precipitación, que permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés ¹⁹. Para la determinación del halo de inhibición, se usó el método de Kirby-Bauer (difusión en Agar) adaptado y basado en la norma de referencia del documento CSLI M44A-2008 y evaluando el diámetro del halo que generó según la guía de procedimiento validado en el Instituto de Medicina Tropical “Daniel A. Carrión” (UNMSM) ^{17,18}.

2.5 Procedimiento ^{3,43}

El presente trabajo consistió en determinar el efecto antifúngico *in vitro* del extracto hidroalcohólico de la nuez de *Anacardium occidentale L.* (marañón) en cepas de *Malassezia spp.*, mediante el método de Kirby-Bauer (Difusión en agar). Su identificación y recolección de la muestra vegetal se recolectó aproximadamente 250mg de la nuez de *Anacardium occidentale L.* (marañón) fueron colectadas en el distrito Fernando Lores, provincia de Maynas departamento de Loreto, en el mes de setiembre del 2020 a una

altitud de 106 m.s.n.m., Latitud sur: 03° 00' 26" Latitud oeste: 72° 00' 17", las mismas se identificaron con el biólogo-taxónomo Hamilton W. Beltrán S. El transporte de las nueces desde el lugar de recolección se realizó en papel kraf para evitar la contaminación, asegurar la ventilación, evitando la putrefacción, teniendo como destino final al laboratorio de UNMSM (Universidad Nacional Mayor de San Marcos).

Obtención del extracto hidroalcohólico de la nuez de *Anacardium occidentale* L. (marañón) Se procedió a seleccionar las nueces descartando aquellos que se encontraban con rajaduras, y limpiamos las nueces con la ayuda de una brocha, luego se desinfecto con alcohol y se llevó a la estufa a 40°C durante 24 horas, se realizó la trituración de los fragmentos de la nuez hasta obtener el tamaño de partículas pequeñas.

El extracto hidroalcohólico de la nuez de *Anacardium occidentale* L. (marañón), se obtuvieron en los ambientes del laboratorio de Farmacognosia perteneciente a la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Para la extracción hidroalcohólica de la nuez de marañón se realizó por el método de maceración, en un recipiente de vidrio ámbar de boca ancha de 500 mL de capacidad, se colocó 250 gramos de muestra troceada se maceró en 1 litro de etanol 96° hasta 72 horas, diariamente se realizaba la agitación constante del macerado para que la extracción sea homogénea, conservándose a una temperatura de 2 a 8 °C y protegido de la luz, luego se filtró en papel filtro Whatmann N° 40, se obtuvo un extracto purificado libre de residuos.

Los extractos resultantes con el uso de un rotavapor (BUCHI) a 120 mmHg fueron evaporados hasta sequedad, temperatura del baño 40°C, rotación 200rpm, luego de 5 horas se obtuvo 20mLde concentración del extracto seco el cual se conservó de 2 -8 °C, protegido de la luz para su posterior uso ³.

Análisis fisicoquímicos del extracto hidroalcohólico de la nuez de *Anacardium occidentale* L. (marañón)

- Prueba de solubilidad.- Se realizó con los siguientes solventes de polaridad decreciente: Agua destilada, metanol, etanol, butanol, acetato de etilo, diclorometano. De esta forma se podrá saber con exactitud cuál es más soluble con respecto a la muestra ³.

➤ Tamizaje fitoquímico ^{3,47}

El procedimiento es poner de 2 a 3 mL del extracto de la nuez de *Anacardium occidentale* L. (marañón) en los tubos de ensayo para luego agregar de dos a tres gotas de los reactivos para la identificación de los metabolitos ³. Se realizó utilizando los siguientes reactivos: Gelatina, Nihidrina, FeCl₃, Dragendorff, Rvo Mayer, NaOH, Mg, H₂SO₄, Molish, HCl.

➤ Identificación cromatográfica de compuestos fenólicos y alcaloides. Se utilizaron cromatofolios de silicagel G60 F₂₅₄ activados.

En un tubo de ensayo se colocó 1mL del extracto crudo de *Anacardium occidentale* L. (marañón) en 2ml de metanol. Se aplicó 20 veces de muestra problema en los cromatofolios.

Se empleó como sistema Cromatográfica

Fase móvil: acetato de etilo; etanol (4:1)

Fase estacionaria: Placa cromatográfica de Sílica G60 F₂₅₄ (5x20 cm)

Revelador: FeCl₃, Dragendorff solución A y B

Se reveló con FeCl₃ al 5% identificando las manchas de compuestos fenólicos de color marrón oscuro.

Se reveló con Dragendorff identificando las manchas de alcaloides de color amarillo naranjado.

Observar bajo luz UV usando una cámara de cromatografía.

Control de calidad del extracto fluido de la nuez de *Anacardium occidentale* L. (marañón)

➤ Obtención y activación de cepas de *Malassezia spp.* Se trabajó con 5 cepas clínicas referenciales del El Instituto de Medicina Tropical "Daniel A. Carrión" de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Para reactivar el hongo se colocó en la estufa a condiciones ideales de incubación, 35°C por un periodo de 24 horas. Se realizó la activación de las cepas en Agar Dixon, para obtener cultivos frescos y así realizar las pruebas bioquímicas. Se tomó una asada de colonias de cada cepa y se inoculo en la placa con el medio. Las placas fueron colocadas de manera invertidas y se incubaron a temperatura a

37 °C por una semana, diariamente se revisaron verificando un normal crecimiento y que estén libres de contaminación.

- Preparación de las concentraciones del extracto hidroalcohólico de la nuez de *Anacardium occidentale L.* (marañón), la muestra se encontraba en forma de extracto hidroalcohólico del cual se preparó diluciones al 50%, 75% y 100% con dimetilsulfóxido (DMSO). Las muestras fueron diluidas en microviales de 2 mL.

La preparación de las diluciones se realizó de la siguiente manera:

Se vertió en un microvial, 1mL de extracto hidroalcohólico que representa al 100%, en otro microvial se agregó 0.75mL del extracto y 0.25 mL de dimetilsulfóxido para obtener la concentración de 75% y en otro microvial se añadió 0.5mL del extracto y 0.5mL de dimetilsulfóxido para obtener la concentración de 50%. También se agregó suero fisiológico 1mL en un microvial para utilizarlos como control negativo. Además se preparó ketoconazol 200mg como control positivo y se disolvió en 10mL de dimetilsulfóxido.

- Desarrollo del método ^{11,27}
Método de Difusión en Agar.- es el mismo que para las bacterias, está basado en el estudio la sensibilidad de las levaduras a los antifúngicos en función del halo de inhibición producido por la difusión del antifúngico en un medio de cultivo sólido. Los pasos a seguir son los mismos que para las bacterias, pero con algunas modificaciones. Se siguió la metodología descrita en el documento del CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute) M44A-2008 para levaduras modificado. En el desarrollo de este método se necesita considerar ciertas variables como: medida del inóculo, temperatura, tiempo de incubación, medio de cultivo.
- Preparación del Agar Mueller Hinton Modificado.- para el ensayo de susceptibilidad se inóculó en el medio agar Mueller Hilton modificado al cual se le adicionaron suplementos lipídicos (glicerol- 1μL, ácido oleico- 1μL y Tween 40-5 μL para 1L). Autoclavar el agar a 121°C y 15 lb/pg² durante 15 minutos. Inmediatamente después de autoclavar dejar enfriar a temperatura ambiente. Una

vez temperado verter el preparado fresco y tibio a placas Petri de plásticos esterilizadas, para dar un fondo uniforme de aproximadamente 4 mm. Esto corresponde a 25 - 30 mL para placas de 100 mm de diámetro. El pH de agar Mueller Hinton Modificado debe tener un pH entre 6-7. Esta medición puede realizarse sumergiendo el bulbo del electrodo del potenciómetro en el agar antes de autoclavar.

- Preparación y estandarización de los inóculos.- bajo condiciones estériles se tomó 3 a 5 asadas de colonias del cultivo de cada cepa previamente reactivadas. Para llegar a la turbidez deseada de la cepa pura de *Malassezia spp.* Se usó un hisopo estéril para extraer una colonia del cultivo de la cepa previamente reactivada, la cual se sumergió en un tubo de ensayo con 5 ml de suero fisiológico al 9%, luego agitaremos por 5 minutos, llegando a una turbidez de 3×10^6 células/mL, que será comparada a través de un fondo blanco con la solución de sulfato de bario equivalente al tubo 0.5 estándar de McFarland, turbidez establecida por visión directa.
- Inoculación de las placas.- para el ensayo de susceptibilidad, se utilizó 9 placas de Petri de plásticos esterilizadas con el medio agar Mueller Hilton modificado al cual se le adicionaron suplementos lipídicos (glicerol-1uL, ácido oleico- 1uL, tween 4-5uL). Sumergir un hisopo estéril en la suspensión del inóculo de 0.5 McFarland. Retirar el exceso de líquido rozando el hisopo con las paredes del tubo. Sembrar con la técnica del hisopado de superficie completa, la cual utiliza un hisopo estéril para tomar cierta cantidad de hongos y realizar la siembra en las cajas de Agar Mueller Hilton en tres direcciones por agotamiento, todo esto bajo condiciones de la cámara de flujo laminar. Se dejó secar 3 a 5 minutos antes de colocar los discos.
- Inoculación de las sustancias en estudio.- Se aplicó el método de difusión en disco (Kirby-Bauer), la cual se inició embebiendo discos de papel con la micropipeta contenido en los envases microviales individuales de los extractos de marañón (*Anacardium occidentale*) (50%, 75%, 100%). Se colocó con la micropipeta 1 gota (20uL) en cada disco. Además, se realizó el control positivo de ketoconazol

20mg disueltos en DMSO (Dimetilsulfóxido) y como control negativo de suero fisiológico. Las cajas del extracto y su porcentaje fueron rotuladas para una mejor interpretación e evitar equivocaciones. Ya establecidos los tratamientos se procedió a colocar 5 discos de celulosa en cada caja Petri, el primero impregnado del extracto hidroalcohólico de la nuez de *Anacardium occidentale L.* (marañón) al 50%, el segundo impregnado del control positivo (ketoconazol 20mg) y el tercer disco impregnado del control negativo (suero fisiológico). De igual manera se procedió a colocar 5 discos de celulosa en cada caja Petri, el primero impregnado del extracto hidroalcohólico de la nuez de *Anacardium occidentale L.* (marañón) al 75%, el segundo disco impregnado del control positivo (ketoconazol 20mg) y el tercer disco control negativo (suero fisiológico). De igual manera se procedió a colocar 5 discos de celulosa en cada caja Petri, el primero impregnado del extracto hidroalcohólico de la nuez de *Anacardium occidentale L.* (marañón) al 100%, el segundo disco impregnado del control positivo (ketoconazol 20mg) y el tercer disco control negativo (suero fisiológico). Para cada concentración (50%, 75% y 100%) y sus controles positivo y negativo se realizaron 9 repeticiones. Los resultados obtenidos después de las mediciones de los halos de inhibición por triplicado de los extractos (50%, 75% y 100%) y sus controles positivos (ketoconazol 20mg) y control negativo (Suero Fisiológico) en estudio han sido agrupados en tablas y gráficos, para la mejor interpretación de los resultados. Temperatura y tiempo de incubación. Se incubaron las placas a 32°C por siete días.

- Lectura de resultados de diámetro de Halos (mm). Los resultados de las diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de la nuez de *Anacardium occidentale L.* (marañón) fueron leídos e interpretados mediante los halos de inhibición con la ayuda de un calibrador milimétrico marca Tramontina. Los valores de las mediciones por triplicado se promediaron y compararon con las medidas de los halos de inhibición producidos por los antimicóticos.

2.6 Método de análisis de datos

Los datos son tabulados en hoja de cálculo Excel, luego es migrado al programa estadístico SPSS versión 24. Se realizó análisis de la zona de valores de inhibición del extracto vegetal y la especie de *Malassezia spp.* Y fue comparados por medidas repetidas, Prueba de Kruskal Wallis, Pruebas de normalidad diámetro de halo de inhibición mm, Pruebas de homogeneidad de las varianzas, Prueba ANOVA y se trabajará con 95% de significancia ($p < 0.05$). Los resultados fueron presentados mediante tablas y gráficas que ayudó a la comprensión de los objetivos propuestos en el presente estudio.

2.7 Aspectos éticos

El presente trabajo se realizó cumpliendo con la normatividad de las investigaciones científicas.

III. RESULTADOS

Metabolitos Secundarios

Tabla N° 01 Análisis de Tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de la nuez de *Anacardium occidentale L.* (marañón)

Metabolitos	Reactivo	Interpretación	Resultados
Taninos	Gelatina	precipitado	+
Aminoácidos libres	Ninhidrina	Violáceo	-
Fenoles	FeCl ₃	Verde azulado	+++
Alcaloides	Dragendorff	Rojo ladrillo	++
Alcaloides	Mayer	Precipitado lechoso	++
Quinonas	NaOH	Rojizo	++
Flavonoides	HCl y virutas de Mg (shinoda)	Rojo	+++
Glicósidos	Molisch y HSO ₄	Anillo violáceo	+

Tabla 01 Elaboración propia – 2020

En la Tabla 01 se puede observar que la mayor concentración de metabolitos secundarios en el extracto hidroalcohólico del marañón son los fenoles y flavonoides seguido por alcaloides y quinonas por último no se evidencia la presencia de aminoácidos libres.

Efecto antifúngico del extracto de la nuez de *Anacardium occidentale L.* (marañón)

Lectura de Resultados de la medición de halos de inhibición (mm)

Tabla N° 02: Distribución del diámetro de halo de inhibición mm

Tratamiento	N	Media	Desviación estándar (s)	Mínimo	Máximo
Suero Fisiológico	9	6,00	0,00	6	6
Extracto Hidroalcohólico 50%	9	9,00	0,71	8	10
Extracto Hidroalcohólico 75%	9	10,11	0,78	9	11
Extracto Hidroalcohólico 100%	9	11,67	1,00	10	13
Ketoconazol 20mg	9	26,22	1,56	25	29

Tabla 02 Elaboración propia – 2020

Figura N°01: Medidas resumen del diámetro de halo de inhibición mm

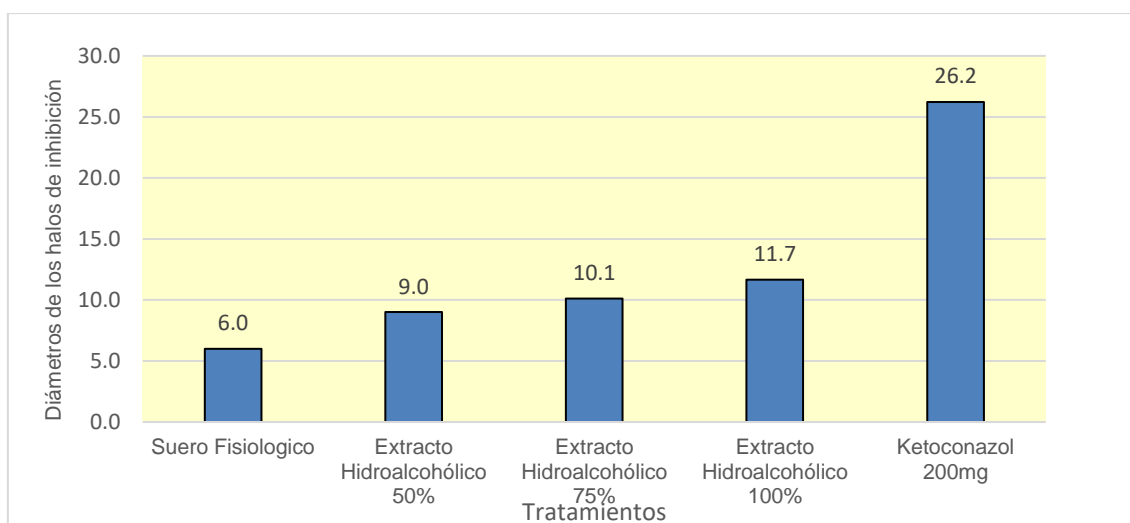


Figura 01 Elaboración propia – 2020

La tabla N°02 y figura N°01 presenta un resumen del diámetro del halo de inhibición sobre cepas de *Malassezia spp*, se observa que el extracto hidroalcohólico de la nuez de *Anacardium occidentale L.* (marañón) en la concentración de 100% presenta un diámetro promedio de 11,67 mm seguido del extracto al 75% con 10,11 mm y el extracto al 50% con 9,0 mm.

Tabla N° 03: Escala de Duraffourd

Promedio de diámetro del halo de inhibición (D)	Sensibilidad	Muestra
$D \leq 8$ mm	Nula (-)	
$8 \text{ mm} \leq D < 14$ mm	Baja (sensible +)	Ext. Hd 50% 75%, 100%
$14\text{mm} \leq D \leq 20$ mm	Media (Muy sensible ++)	
$D \geq 20$ mm	Alta (Sumamente sensible+++)	

Tabla 03 Elaboración propia – 2020

Estos resultados se evaluaron mediante la “Escala de Duraffourd”; la cual es empleada para la determinación cualitativa del efecto *in vitro*. La Escala de Duraffourd categoriza los niveles de sensibilidad de acuerdo con el tamaño del diámetro de los halos de inhibición. Tal como se muestra en la siguiente tabla 03 que la inhibición del extracto hidroalcohólico de la nuez de *Anacardium occidentale L.* (marañón) en la Escala de Duraffourd con $8\text{mm} \leq D < 14\text{mm}$ tiene una sensibilidad baja (sensible +) con respecto a las concentraciones de 50, 75 y 100% sobre cepas de *Malassezia spp*

Contrastación de Hipótesis

Hipótesis General de Investigación:

Tabla N°04: Prueba de Kruskal Wallis

	Diámetro de halo de inhibición mm
Chi-cuadrado	40,698
Gl	4
p valor	.000

Tabla 04 Elaboración propia-2020

El extracto hidroalcohólico de la nuez de *Anacardium occidentale L.* (marañón) tiene efecto antifúngico contra cepas de *Malassezia spp*. De acuerdo con la contratación de hipótesis se ha encontrado que el p valor es menor a 0.05 (p valor =0,000), se concluye que existe un efecto inhibitorio. Para determinar el grupo o la concentración que presenta dicho efecto inhibitorio usaremos el método de comparaciones múltiples de Games-Howell el cual no requiere homogeneidad de varianzas.

Hipótesis específica de investigación 01:

Algunos metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de la nuez de *Anacardium occidentale L.* (marañón) tienen efecto antifúngico en las cepas de *Malassezia spp*. El tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de la nuez de *Anacardium occidentale L.* (marañón) evidenciamos que existen diferentes metabolitos secundarios quienes son los responsables del efecto antifúngico.

Hipótesis específica de investigación 02:

Tabla N°05: Comparaciones múltiples Games-Howell. Extractos versus Suero Fisiológico.

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	p valor
	Extracto Hidroalcohólico 50%	-3,000*	0,000
Suero Fisiológico	Extracto Hidroalcohólico 75%	-4,111*	0,000
	Extracto Hidroalcohólico 100%	-5,667*	0,000

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

La tabla 05 presenta la diferencia observada entre los diámetros de inhibición promedio del suero fisiológico versus cada uno de los tres extractos hidroalcohólico de la nuez de *Anacardium occidentale* L. como los promedios obtenidos en los extractos fueron todos superiores al suero fisiológico, las diferencias son negativas. Dado que en los tres casos el p valor asociado a cada una de estas diferencias es menor a 0.05 se concluye que estas diferencias son significativamente diferente de cero, es decir los tres extractos presentan un efecto antifúngico.

Figura N°02: Nivel medio y dispersión del diámetro de halo de inhibición mm extractos versus suero fisiológico.

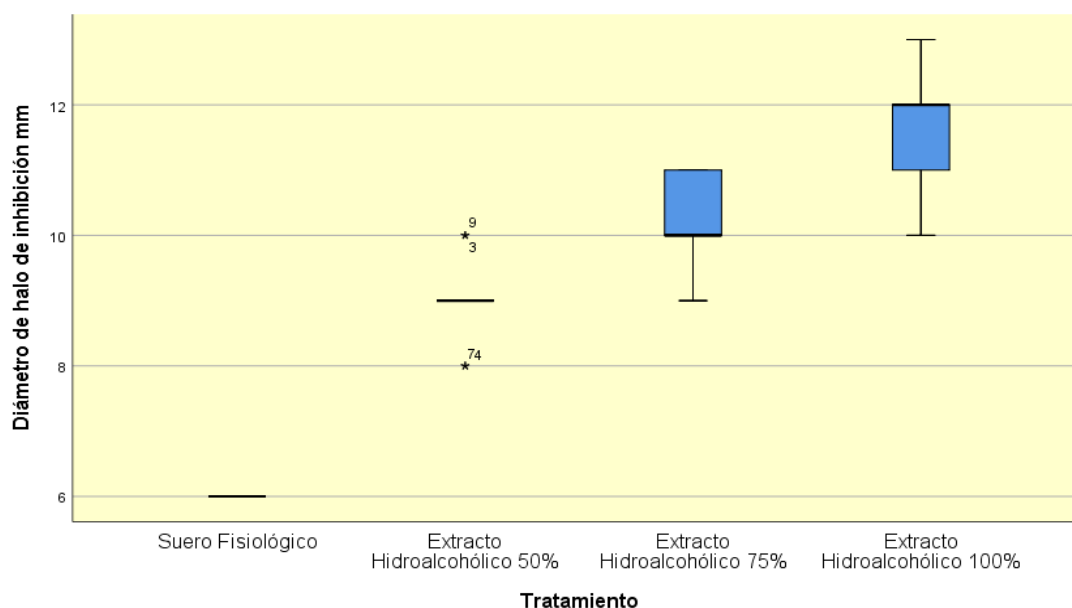


Figura N° 02 Elaboración propia – 2020

La Figura 02 muestra mediante los diagramas de caja, que a medida que aumenta la concentración de los extractos también aumenta el nivel medio de los diámetros de inhibición; del mismo modo se observa un aumento en la variabilidad de los diámetros dentro de cada caja (mayor amplitud).

Tabla N°06: Comparaciones múltiples Games-Howell Extractos versus Ketoconazol

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	p valor
Ketoconazol 200mg	Extracto Hidroalcohólico 50%	17,222*	0,000
	Extracto Hidroalcohólico 75%	16,111*	0,000
	Extracto Hidroalcohólico 100%	14,556*	0,000

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Tabla 06 al realizar la comparación del Ketoconazol 20mg con cada uno de nuestros tres extractos, el p valor en cada comparación es menor a 0.05, por tanto, se concluye que el efecto inhibitorio de los tres extractos es diferente (inferior) al efecto del Ketoconazol 20mg.

Figura N°03: Nivel medio y dispersión del diámetro de halo de inhibición mm extractos versus Ketoconazol

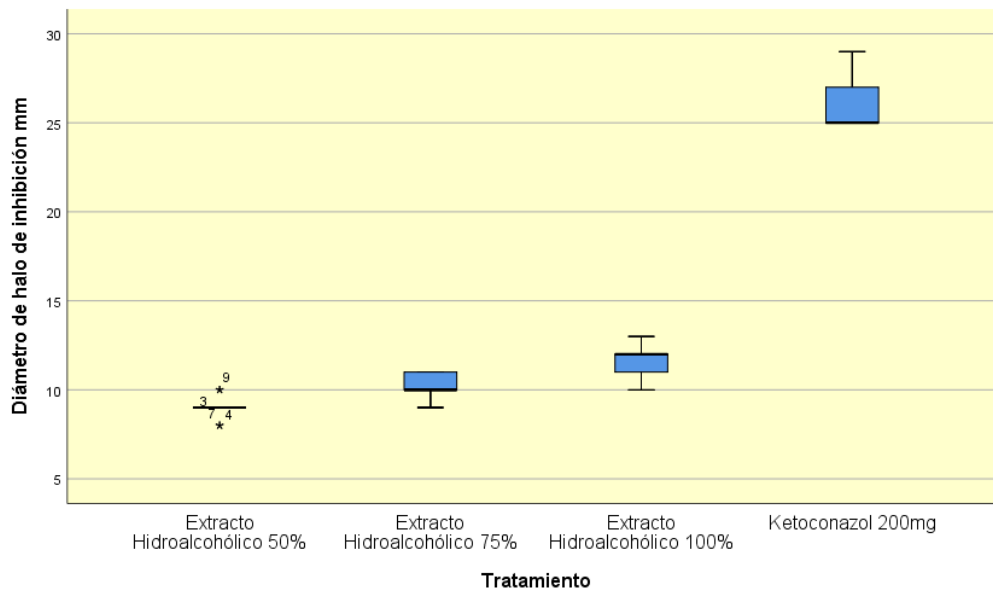


Figura N° 03 Elaboración propia – 2020

La Figura 03 muestra mediante los diagramas de caja, que el nivel medio de los tres extractos está por debajo del ketoconazol; además observamos un mayor rendimiento en los diámetros de inhibición del ketoconazol.

Hipótesis específica de investigación 03: A mayor concentración, el extracto hidroalcohólico de la nuez de *Anacardium occidentale L.* (marañón), presenta mayor intensidad de efecto antifúngico *in vitro*, en cepas de *Malassezia spp.*

Tabla N°07: Comparaciones múltiples Games-Howell entre extractos

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	p valor
Extracto Hidroalcohólico 100%	Extracto Hidroalcohólico 50%	2,667*	0,000
	Extracto Hidroalcohólico 75%	1,556*	0,016

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

La tabla 07 compara el extracto a 100% de concentración versus los extractos a 50 y 75%, como el p valor en cada comparación es menor 0.05. Se concluye que el extracto al 100% presenta un efecto diferente, al observar que las diferencias son positivas (+2,667 y + 1,556) agregamos que el efecto es superior.

Figura 04: Efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de la nuez de *Anacardium occidentale L.* (marañón)

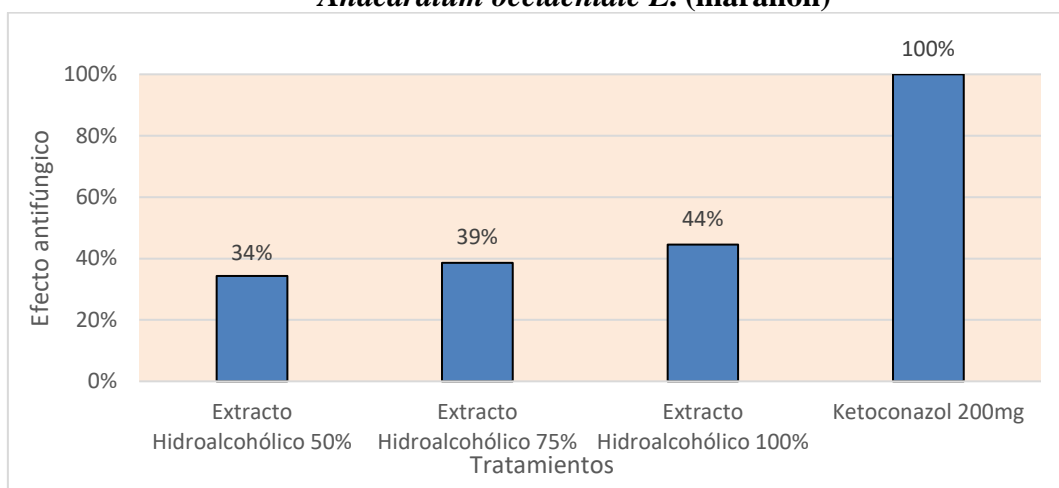


Figura 04 Elaboración propia – 2020

En la figura 04 observamos el porcentaje del efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de la nuez de *Anacardium occidentale L.* (Marañón), en concentración de 50% Tuvo un rendimiento del 34%, en segundo lugar, tenemos al de 75% con un 39% de rendimiento y en tercer lugar tenemos al 100 % con un 44% de rendimiento y finalmente a nuestro control positivo al ketoconazol con un 100% de rendimiento.

IV. DISCUSION

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se establece que el extracto hidroalcohólico de la nuez de *Anacardium occidentale L.* “marañón”, en sus diferentes concentraciones presenta halos de inhibición de 9 mm hasta un diámetro de 11,67 mm, que representan los efectos antifúngicos, en cepas de *malassezia spp*, resultados que guardan relación con los obtenidos por Vargas K, Zacarías C. (2012), cuyo estudio tuvo el objetivo del desarrollo y formulación de una loción con actividad antifúngica frente a dermatofitos a partir del extracto etanólico del fruto de *Anacardium occidentale L.* (marañón). La loción fue preparada seleccionando excipientes afines con el extracto etanólico al 25% del fruto de *Anacardium occidentale*, que presento mayor actividad antifúngica y cantidad de compuestos fenólicos frente a los demás extractos etanólicos de 15 y 20%. La loción mostró resultados óptimos y estables en los análisis organolépticos, fisicoquímicos y susceptibilidad antifúngica durante un seguimiento de tres meses ³.

El tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico del *Anacardium occidentale L.* “marañón” reveló la presencia de metabolitos secundarios, como compuestos fenólicos, taninos, flavonoides, alcaloides, quinonas, siendo los de mayor presencia los fenoles y flavonoides (+++), metabolitos a los que se les atribuye la responsabilidad del efecto antifúngico. Estos datos son corroborados por Navarro A. (2018), que en su investigación tuvo como objetivo evaluar la cuantificación de los compuestos polifenólicos y la actividad antioxidante *in vitro* de los extractos hidroalcohólicos de *Anacardium occidentale L* (Nuez), *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl. (Planta entera) y *Gamochaeta purpurea* (L.) Cabrera (planta entera). La cuantificación de los compuestos polifenólicos se evaluó según el método espectrofotométrico desarrollado por Folin y Ciocalteau, El análisis fitoquímico evidenció la presencia de flavonoides y fenoles, taninos, antraquinonas y saponinas en los extractos estudiados. Estos datos también son corroborados por Martínez Y. et al. (2012), estudio que tuvo como objetivo determinar los metabolitos secundarios y la actividad antimicrobiana *in vitro* de extractos de hojas de *Anacardium occidentale L.* Se realizó tamizaje fitoquímico y pruebas de calidad de las preparaciones farmacéuticas. Cuyos resultados fueron que en el extracto fluido y en la tintura al 20 % se detectaron cumarinas y otros metabolitos como saponinas, flavonoides, azúcares reductores, aminoácidos libres, triterpenos/esteroides, fenoles/taninos. Resultados que responden a los objetivos y que estarían corroborando el estudio propuesto ^{4,30}.

Según los resultados obtenidos, respecto a la determinación del efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de la nuez de *Anacardium occidentale L.* frente a *malassezia spp.*, se obtuvo desde 9.0 mm hasta 11.67 mm de diámetro de zona de inhibición, el cual nos indicó como resultado sensible cuando el halo de inhibición se encuentra <14mm; Corroborada también de por Gómez S. (2016) respecto a la evaluación de la actividad antibacteriana del extracto alcohólico de hojas de *Anacardium occidentale L.* frente a *Staphylococcus aureus*, se obtuvo desde 6.0 mm hasta 8.0 mm de diámetro de zona de inhibición (DZI), el cual nos indicó como resultado resistente en comparación con los criterios de categorización del Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión, frente a su control positivo; donde indica que cuando se utiliza como antibiótico de control positivo sulfato de Gentamicina 10 ug; se categoriza como Resistente cuando el halo de inhibición se encuentra <12mm; Intermedio cuando el halo de inhibición es de 13 – 14 mm y Sensible si es >15mm. Según la clasificación de la actividad antibacteriana por porcentaje de inhibición, se considera Inactivo si el porcentaje de inhibición es <40%, Poco activo (40 – 50%), Moderadamente activo (51 – 75%) y con Buena actividad >76%; lo cual solo al grupo tratado con concentración de 300mg/ml obtuvo poca actividad antibacteriana (<76%).

El trabajo microbiológico de inhibición de hongos en placas petri los resultados obtenidos después de las mediciones de los halos de inhibición por triplicado de los extractos (al 50%, 75% y 100%), se evidencia que a medida que aumenta la concentración del extracto hidroalcohólico de la nuez de *Anacardium occidentale L.* (marañón) hay mayor efecto antifúngico *in vitro*, determinándose que la concentración al 100% (11,67 mm) presenta mayor efecto antifúngico, por lo tanto, a concentraciones mayores el efecto antibacteriano aumenta resultados que son similares a los encontrados por Vargas K, Zacarías C. (2012). Diseño y elaboración de un producto farmacéutico a base del extracto etanólico purificado del fruto *Anacardium occidentale* (marañón) con actividad antifúngica frente a dermatofitos *in vitro*.

V. CONCLUSIONES

1. El extracto hidroalcohólico de la nuez de *Anacardium occidentale L.* (marañón), después de la formación de halos de inhibición en cepas de *Malassezia spp.*, presenta efecto antifúngico en todos los tratamientos.
2. Los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de la nuez de *Anacardium occidentale L.* (marañón), determino la presencia compuestos fenólicos (+++), flavonoides (+++) a quienes se les atribuye estos compuestos químicos bioactivos con mayor presencia y ser responsables del efecto antifúngico.
3. El crecimiento de *malassezia spp.* puede ser inhibido de manera sensible, a las concentraciones de 50% obtuvo una media de 9mm, 75% obtuvo una media de 10.11mm y 100% presento halos de inhibición 11.67mm.
4. EL extracto hidroalcohólico de la nuez de *Anacardium occidentale L.* (marañón) al 100% presento un mejor efecto antifúngico *in vitro* superior en comparación a los extractos 50 y 75% en cepas de *Malassezia spp.*

VI. RECOMENDACIONES

1. Debido a su composición de compuestos fenólicos cuya propiedad es de antifúngico puede ser de importancia y apoyo para aplicación y/o estudios posteriores para la formulación de productos antifúngicos.
2. Buscar efectos sinérgicos con otras especies para incrementar el efecto antifúngico.
3. Trabajar con mayor número de concentraciones para aumentar la efectividad antifúngica.
4. Desarrollar otros ensayos para observar la sensibilidad antifúngica de la nuez de *Anacardium occidentale L.* (marañón) y corrobora los resultados obtenidos en el estudio así.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Tello J. Acción antimicrobiana del *Anacardium occidentale* sobre *Cándida albicans* y *Staphylococcus aureus*. Estudio *in vitro*. Tesis. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima. 2011. Disponible en la URL: http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/2760/Tello_vj.pdf?sequence=1&isAllowed=y
2. Alulema A. Determinación de la sensibilidad *in vitro* de *Malassezia globosa* frente a los hidrodestilados de *Caléndula officinalis*, *Rosmarinus officinalis* y *Salix alba*. Tesis. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Ecuador. 2010. Disponible en la URL: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/734>
3. Vargas K., Zacarias C. “Diseño y elaboración de un producto farmacéuticos a base del extracto etanólico purificado del fruto *Anacardium occidentale* (marañón) con actividad antifúngica frente a dermatofitos *in vitro*. Tesis. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; Lima. 2012.
4. Martínez Y. et al. “Metabolitos secundarios y actividad antibacteriana *in vitro* de extractos de hojas de *Anacardium occidentale L.* (marañón). Universidad de Granma. Bayamo, Granma, Cuba. II Laboratorio Provincial de Criminalista. Ministerio del Interior. Bayamo, Granma, Cuba. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 2012; 17(4): 320-32
5. Rubenice A, Amado S., et. la actividad antimicrobiana y antioxidante de *Anacardium occidentale L.* Flores en comparación con extractos de corteza y hojas. Universidad Federal Maranhao.2016. Brasil.
6. Bahare S, Mine G, et. Se investigó los efectos antioxidantes, antimicrobianos y anticancerígenos de las plantas de anacardo: una perspectiva etnofarmacológica. Brasil. 2020

7. Rivas C., Oranda, M., Verde M., Investigación en plantas de importancia médica. [internet]. México; 2016. Citado: 2016 junio. Capítulo 4. Actividad antifúngica. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/316555184> ACTIVIDAD ANTIFUNGICA
8. Cordova E., Bazan E., Hernández F. Enfermedades causadas por el Género *Malassezia*. [Internet] 2011. Citada: 2016 octubre 09. Disponible en: https://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/file.php/118/MATERIAL_2012/TEORIA_S_APUNTE/MALASSEZIA-2012-apunte_Micologia.pdf
9. Freeman, B. Microbiología de Burrows. 22^a ed. México: McGraw-Hill Interamericana, 1989.
10. Thomas L. Dawson. Byung In Ro. The Role of Sebaceous Gland Activity and Scalp Microfloral Metabolism in the Etiology of Seborrheic Dermatitis and Dandruff. [Internet] 2005. Citada: 2006 enero; 10(3): 4 p. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/7388035> The Role of Sebaceous Gland Activity and Scalp Microfloral Metabolism in the Etiology of Seborrheic Dermatitis and Dandruff
11. Dinorah F. Evaluación *in vitro* de la sensibilidad de *Malassezia spp.* frente a antifúngicos de uso clínico. Tesis. Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires Argentina; 2015. Disponible en: http://repositorioubi.sisbi.uba.ar/gsd/collect/posgrauba/index/assoc/HWA_1781.dir/1781.PDF
12. Benham R. The cultural characteristics of *Pityrosporum ovale*. A lipophilic fungus. *J Invest Dermatol* 1939; 2: 187–203
13. Gupta AK, Batra R, Bluhm R, Boekhout T, Dawson TL. Skin diseases associated with *Malassezia* species. *J Am Acad Dermatol* 2004; 51: 785–798.

14. Cabrera I. Las plantas y sus usos en las islas de Providencia y Santa Catalina [en línea]. Colombia: Universidad del Valle; 2005. Citado: 2009 febrero 17. Pág. 22. Familia *Anacardiceae*. Disponible en: [https://books.google.com.pe/books/about/Las plantas y sus usos en las islas de P.html?id=-yo5hgMVWvIC&redir_esc=y](https://books.google.com.pe/books/about/Las_plantas_y_sus_usos_en_las_islas_de_P.html?id=-yo5hgMVWvIC&redir_esc=y)
15. Mejía K., Rengifo E. Plantas Medicinales de Uso Popular en la Amazonía Peruana. [en línea]. 2. ed. Iquitos: 1995. Citado: 01 setiembre 2000. Capítulo 24. Casho. Disponible en: <http://www.iiap.org.pe/Upload/Publicacion/L017.pdf>
16. Ochoa M. Estudios de las especies de la *malassezia*, relacionadas con la patología, pitiriasis versicolor en Panamá. Tesis. Panamá: Universidad Panamá; 2006. Disponible en: <https://hera.ugr.es/tesisugr/1645778x.pdf>
17. Ruiz J. Actividad Antifúngica *In vitro* y Concentración Mínima Inhibitoria mediante Microdilución del ocho plantas medicinales. Tesis. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2013. Disponible en: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/2590>
18. Hernández J. Caracterización molecular de especies del género *Malassezia*. España: Universidad Autónoma de Barcelona; 2005. Disponible en: <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/5600/jjhe1de1.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
19. Rojas L., Jaramillo C., Lemus B. Métodos Analíticos para la determinación de metabolitos secundarios de plantas. [En línea] 2015. 1° Ed. Universidad Técnica de Machala. Disponible en: <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:EJnr1IRVqRgJ:repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/6653/1/20%2520METODOS%2520ANALITICOS%2520PARA%2520LA%2520DETERMINACION%2520DE%2520METABOLITOS%2520SECUNDARIOS%2520DE%2520PLANTAS.pdf+&cd=1&hl=es-419&ct=clnk&gl=pe>

20. Gómez S, Pereira John. La evaluación de la actividad anti-*staphylococcus aureus* del extracto alcohólico de hojas de *Anacardium occidentale linn.* “casho” mediante el método de difusión en disco (kirby bauer)”. Tesis. Universidad Nacional de la Amazonia Peruana. Lima. 2016.
21. Torres A. Determinación de parámetros de cultivo para la evaluación del perfil de susceptibilidad in vitro en *Malassezia spp.* Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana; 2012. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/11783/TorresDunqueAnaVictoria2012.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
22. Agostini T. Determinación Espectrofotométrica de ácido anacardico en almendras de castañas de caju. Comunicado Técnico Brasil; 2005 [En línea] Consultado 23.05.2009. Disponible en: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/186370/1/cot122.pdf>
23. Giusuano G. *Malassezia*, estado del conocimiento y perspectiva en su estudio. 2005. Octubre. Citada: 20 marzo 2006, 38[1]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/262616344_Malassezia_Estado_del_conocimiento_y_perspectivas_en_su_estudio
24. Sacsquispe R., Velásquez J. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, 2002. Serie de Normas Técnicas N° 30. Disponible en: <http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/manual%20sensibilidad%2002.pdf>
25. Peman J., Mazuelos M., Rubio M. Guía Práctica de identificación y diagnóstico en Micología Clínica. [Publicación periódica en línea].España. [Citado: enero 2007]. Capítulo 11. Identificación de levaduras. Disponible en:

- <http://www.guia.reviberoammicol.com/http://www.guia.reviberoammicol.com/Capitulo11.pdf>
26. Béjar V., Rojas., Guevara J. et col. Identificación de especies de *Malassezia* aisladas de piel sana en pobladores de Lima, Perú. Lima 2014. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S102555832014000200014
 27. Portilla Y., Fernández C., Illnait T. Susceptibilidad antifúngica de aislamientos de especies del género *malassezia*. [Publicación periódica en línea]. [Citada: 01 marzo 2013], [Aproximadamente 6pp.]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/279961873_SUSCEPTIBILIDAD_ANTIFUNGICA_DE_AISLAMIENTOS_DE_ESPECIES_DEL_GENERO_MALASSEZIA
 28. Pallo J. Efecto inhibitorio *in vitro* del extracto de la cáscara del marañón (*Anacardium occidentale*) sobre cepas de *Streptococcus mutans*. Tesis. Quito: Universidad Central de Ecuador; 2017. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/9593/1/T-UCE-0015-586.pdf>
 29. Ponce C. (2011). Actividad antibacteriana del aceite de la cascara de la nuez del *Anacardium occidentale* sobre *Streptococcus mutans*. Estudio *in vitro*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima.
 30. Navarro A. “Cuantificación de los compuestos polifenólicos y evaluación de la actividad antioxidante de los extractos hidroalcohólicos de *Anacardium occidentale* L, *Muehlenbeckia volcanica* (Benth.) Endl. y *Gamochaeta purpurea* (L.) Cabrera” TESIS: Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico Universidad Nacional Mayor de San Marcos autor Arnaldo Joseph Navarro soto, Lima, Perú 2018.
 31. Ali N., Mehdi N., Hojjatollah S. Efecto inhibitorio de los aceites esenciales de plantas en las cepas de *Malassezia* de pacientes con dermatitis iraní. 2017 diciembre. 7(1): [4pp.]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/322399457_Inhibitory_effect_of_plant_essential_oils_on_Malassezia_strains_from_Iranian_dermatitis_patients
 32. Harada K., Saito Mami., Sugita T., Tsuboi Ryoji. *Malassezia* species and associated skin. 42(3). Disponible en: <https://doi.org/10.1111/1346-8138.12700>

33. Stephen J., Harbeck R., et al. Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana. Disponible en: <https://www.paho.org/hq/.../susceptibilidad-antimicrobiana-manual-pruebas-2005.pdf>
34. Suzimone de J C., Juceni D., Jorge D. Metabolitos Secundarios de especies de Anacardiaceae. 29(6). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422006000600026>
35. Donayre M., Lao Rosa. Actividad antibacteriana del extracto etanólico de hojas y tallo de *Clibadium surinamense* L. (huaca) mediante el método de difusión en disco (Kirby-Bauer). Tesis. Iquitos: Universidad Nacional de la Amazonia Peruana; 2013. Disponible en: <http://repositorio.unapiquitos.edu.pe/handle/UNAP/4286>
36. Domingo D., López M. Plantas con acción antimicrobiana. 2003. Enero.. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=786844>
37. Guía de lectura. EUCAST: método de difusión con discos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. Junio 2014. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Disponible en : http://coesant-seimc.org/documents/EUCAST-Guiadelecturadifusioncondiscos_v4.pdf
38. Lafont J., Paez M., Portacio A. Extracción y caracterización fisicoquímica del aceite de la semilla (Almendra) del Marañón (*Anacardium occidentale*). Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0718-07642011000100007&lng=es&nrm=iso
39. Rojas J., García A., López A. Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales. Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/26604488_Evaluacion_de_dos_metodologias_para_determinar_la_actividad_antimicrobiana_de_plantas_medicinales
40. Hernández D., Riaño P. Evaluación de la actividad antibacterial del marañón. 2005. Disponible en: <http://avalon.utadeo.edu.co/dependencias/publicaciones/alimentica5.pdf>
41. Carrasco E. Estudio de los aceites y determinación de la actividad antimicrobiana del fruto de *Schinus Molle* L. "Molle" Tesis. Lima; Universidad Nacional Mayor

- de San Marcos. 1998. Disponible en: http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/6309/1/Carrasco_re.pdf
42. Weerasena O. Fungicidal activity of synthetically modified cashew nut shell liquid. *Naturally Science Country Sri Lanka* 1993; 21(2):253-8. Disponible en : https://www.researchgate.net/publication/316056623_FUNGICIDAL_ACTIVIT_Y_OF_SYNTHEMICALLY_MODIFIED_CASHEW_NUT_SHELL_LIQUID
43. Kuklinski C. *Farmacognosia Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. Barcelona Editorial Omega, 2000:475.90
44. Murillo J. Aislamiento e identificación de los componentes activos del líquido de la cáscara de la nuez de marañón (LCNM) *Anacardium occidentale* L. *Memorias Comunidad Europea San Salvador* 2008. Consultado 01 junio 2011 Disponible en : ri.ues.edu.sv/8794/1/19200892.pdf
45. Machado A. Estudio del Secado de Anacardo (*Anacardium occidentale* L.) mediante Secador Solar de Radiación Directa. *Información tecnológica Brasil* 2010, (21). Consultado 01 diciembre 2009. Disponible en : https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-07642010000100006
46. Vallejos E. Efecto antifúngico in vitro del extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis*” Romero” contra *Cándida albicans*. Tesis. Pimentel, Universidad del Señor de Sipán; 2017. Disponible en: repositorio.uss.edu.pe/bitstream/handle/uss/.../Vallejos%20Campos.pdf?sequence=1...
47. Marcos J., Meregildo S. Efecto antibacteriano in vitro del extracto hidroetanólico de la semilla de *Persea americana* frente a *Sthaphylococcus epidermis*. Tesis Trujillo, Universidad Nacional de Trujillo; 2018. Disponible en: dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/10107
48. Jawetz, Melnick, Adelberg. *Microbiología médica*. 25°, ed. México: 2004. Capítulo 45. *Micología Médica*. Disponible en: http://redlagrey.com/files/Microbiologia_Medica_Jawetz_25_www.rinconmedico.smffy.com.pdf
49. Guevara M., Urcia F., Casquero J. *Manual de procedimientos y técnicas de laboratorio para la identificación de los principales hongos oportunistas causantes*. Serie de Normas Técnicas N°44. Lima. Ministerio de Salud, Instituto Nacional de

- Salud, 2007. Disponible en:
<http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/Manual%20Hongos.pdf>
50. Linares M., Solís F. Identificación de levaduras. Iberoamericana de Micología 2001. Disponible en: <http://www.guia.reviberoammicol.com/Capitulo11.pdf>
51. Medina D. Dermatitis seborreica. Educación Médica Continua. Universidad Autónoma del Estado de México 2014. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2014/dcm142l.pdf>
52. Abad M., Ansuategui M., Bermejo Paulina. Active antifungal substances from natural sources. 2007. Department of Pharmacology. University Complutense. Madrid, España. 2006-09-11 Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/239592659_Active_antifungal_substances_from_natural_sources
53. Matos J., Araujo F., Batista P. Solventes para extracao do liquido da castanha de caju (LCC) e compatibilidade ambiental. Junio 2008. Disponible en: <https://periodicos.unifor.br/tec/article/view/49>
54. Domingo D., López M. Plantas con acción antimicrobiana. Revista Española de Quimioterapia. Servicio de Microbiología, Hospital Universitario de la Princesa, Madrid. Diciembre 2013. Disponible en: <https://books.google.com.pe/books?isbn=8494467379>
55. Oliveira F. (2011). Actividades Biológicas De Anacardio Occidentale (Linn). Universidad Federal De Campina Grande Centro De Saúde E Tecnologia Rural. Brasil.

ANEXOS

Universidad Privada de Huancayo Franklin Roosevelt
 Programa de elaboración de trabajos de investigación **PET**
Formato de matriz de consistencia

Autor (es): Dianeth Sucasaca Quispe y Edwing Fernando Vergaray Santander
Tema: “EFECTO ANTIFÚNGICO <i>in vitro</i> DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LA NUEZ DE <i>Anacardium occidentale L.</i> (marañón) EN CEPAS DE <i>Malassezia spp.</i> ”

Problema general	Objetivo general	Hipótesis general	Variables y dimensiones	Metodología
¿Existe efecto antifúngico <i>in vitro</i> del extracto hidroalcohólico de la nuez de <i>Anacardium occidentale L.</i> (marañón) contra cepas de <i>Malassezia spp.</i> ?	Determinar el efecto antifúngico <i>in vitro</i> del extracto hidroalcohólico de la nuez de <i>Anacardium occidentale L.</i> (marañón) contra cepas de <i>Malassezia spp.</i>	GENERAL El extracto hidroalcohólico de la nuez de <i>Anacardium occidentale L.</i> (marañón) tiene efecto antifúngico contra cepas de <i>Malassezia spp.</i>	Variables VI El extracto hidroalcohólico de la nuez de <i>Anacardium occidentale L.</i> (marañón)	Alcance de la investigación: Explicativo- Descriptivo Método de la investigación: Cuantitativo-Comparativo Diseño de la investigación: Experimental
Problemas específicos	Objetivos específicos	Hipótesis específicas	VD	

<p>1. ¿Qué metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de la nuez de <i>Anacardium occidentale L.</i> (marañón) serán los responsables del efecto antifúngico <i>in vitro</i> en cepas de <i>Malassezia spp</i>?</p> <p>2. ¿A qué concentraciones 50%, 75% y 100% del extracto hidroalcohólico de la nuez de <i>Anacardium occidentale L.</i> (marañón) tendrá efecto antifúngico <i>in vitro</i> en cepas de <i>Malassezia spp</i>?</p> <p>3. ¿El extracto hidroalcohólico de la nuez de <i>Anacardium occidentale L.</i> (marañón) presentará a mayor concentración efecto antifúngico <i>in vitro</i>, en cepas de <i>Malassezia spp</i>?</p>	<p>1. Identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de la nuez de <i>Anacardium occidentale L.</i> (marañón) responsables del efecto antifúngico <i>in vitro</i>, en cepas de <i>Malassezia spp.</i></p> <p>2. Determinar el efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de la nuez de <i>Anacardium occidentale L.</i> (marañón) a diferentes concentraciones 50%, 75% y 100% en cepas de <i>Malassezia spp.</i></p> <p>3. Comparar el efecto antifúngico <i>in vitro</i> del extracto hidroalcohólico de la nuez de <i>Anacardium occidentale L.</i> (marañón) a diferentes concentraciones 50%, 75% y 100% en cepas de <i>Malassezia spp.</i></p>	<p>1. Existen metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de la nuez de <i>Anacardium occidentale L.</i> (marañón) responsables del efecto antifúngico <i>in vitro</i>, en cepas de <i>Malassezia spp.</i></p> <p>2. El extracto hidroalcohólico de la nuez de <i>Anacardium occidentale L.</i> (marañón) a diferentes concentraciones 50%, 75% y 100%, tiene efecto antifúngico, <i>in vitro</i>, en cepas de <i>Malassezia spp.</i></p> <p>3. A mayor concentración, el extracto hidroalcohólico de la nuez de <i>Anacardium occidentale L.</i> (marañón), presenta mayor intensidad de efecto antifúngico <i>in vitro</i>, en cepas de <i>Malassezia spp.</i></p>	<p>Efecto antifúngico en cepas de <i>Malassezia spp.</i></p> <p>Dimensiones</p> <p>Fitoquímico.</p>	<p>Población:</p> <p>5 árboles de Marañón en 20m². La cepa de <i>Malassezia spp.</i> Utilizada para el estudio de 25 pacientes.</p> <p>Muestra:</p> <p>1 Kg de la nuez de <i>Anacardium occidentale L.</i> (marañón). Cepa de <i>Malassezia spp</i> de 9 pacientes.</p> <p>Técnicas de recopilación de información:</p> <p>Observacional.</p> <p>Técnicas de procesamiento de información:</p> <p>-Screening Fitoquímico o Tamizaje fitoquímico. -Método de Kirby-Bauer.</p>
---	---	---	--	---

ANEXO 2: Certificación Botánica de la nuez de "*Anacardium occidentale L.*" (marañón)

Hamilton W. Beltrán S.
Consultor Botánico
Calle Natalio Sánchez 251- Jesús María
hamiltonbeltran@yahoo.com


CERTIFICACION BOTANICA

El Biólogo colegiado y autorizado por el Inrena según RD. N° 334-2013-MINAGRI-DGFFS/DGEFFS, con Registro N° 37, certifica que la planta conocida como "MARAÑÓN" proporcionada por, SUCASACA QUISPE DIANETH y VERGARAY SANTANDER EDWING FERNANDO, ha sido estudiada científicamente y determinada como *Anacardium occidentale* y de acuerdo al Sistema de Clasificación de Cronquist 1981, se ubica en las siguientes categorías:


Reino: Plantae
División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Subclase: Rosidae
Orden: Sapindales
Familia: Anacardiaceae
Género: *Anacardium*
Especie: *Anacardium occidentale L.*

Se expide la presente certificación a solicitud de los interesados para los fines que estime conveniente.


Lima, 14 setiembre 2020


Blgo. Hamilton Beltrán
Hamilton Wilmer Beltrán Santiago
Biólogo - Botánico
CBP 2719

ANEXO 3: Constancia autenticidad de cepas de *Malassezia spp.*



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "Daniel Alcides Carrión"
"Año de la Universalización de la salud"



La que suscribe directora del Instituto de Medicina Tropical "Daniel A. Carrión" de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, expide la presente


CONSTANCIA

Autenticidad de cepas de Malassezia spp.

A los bachilleres, Dianeth Sucasaca Quispe y Edwing F. Vergaray Santander que para la realización del trabajo de tesis "Efecto antifúngico in vitro del extracto hidroalcohólico de la nuez de Anacardium occidentale L. (marañón) en cepas de Malassezia spp", utilizaron cepas de la Micoteca de la Sección de Micología del Instituto de Medicina Tropical "Daniel A. Carrión". UNMSM

Se expide la presente a solicitud de los interesados para los fines que consideren convenientes.

Dado en Lima, a los veintiséis días del mes de setiembre de 2020.

 Firmado digitalmente por: BEJAR CASTILLO Vilma Ruth FAU
20148092282.ssh
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 28.09.2020 12:52:36 -05:00

Dra. Vilma Ruth Béjar Castillo
Directora

Calle: José Santos Chocano N°199-Bellavista Callao - 6197000- Anexo 4401 - 4402 - Ingreso Pta. N° 8 (Av.Colonial)
Email: jmtcarrión.medicina@unmsm.edu.pe

Anexo 4: Testimonios fotográficos



Figura N°5: Selección de la nuez de *Anacardium occidentale L.* (marañón).



Figura N°6: Secado de los frutos de *Anacardium occidentale L.* (marañón) a la estufa a 40 °C.

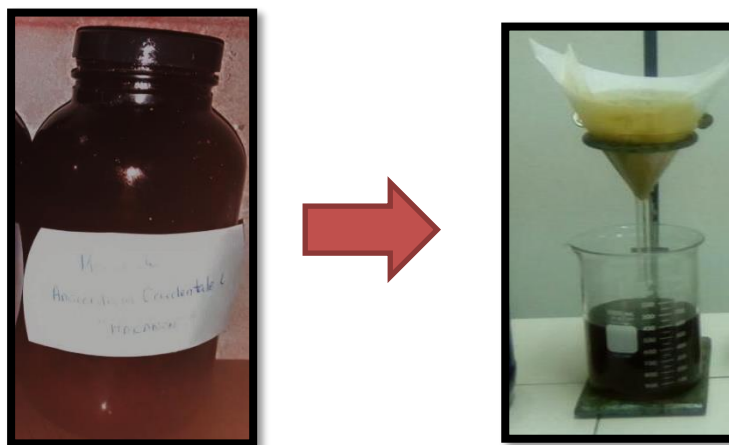


Figura N°7: Maceración y filtración del extracto hidroalcohólico de la nuez de *Anacardium occidentale L.* (marañón).



Figura N°8: Proceso de extracción hidroalcohólico de *Anacardium occidentale L.* (marañón) mediante la extracción en rotavapor.

Procedimiento experimental para la obtención de metabolitos secundarios

Prueba de Solubilidad



Figura N°9: Secado del extracto hidroalcohólico de la nuez de *Anacardium occidentale L.* (marañón) en Pyrex de vidrio durante 24 horas en la estufa a 40°C.

Screening Fitoquímico del extracto de la nuez de *Anacardium occidentale L.* (marañón)

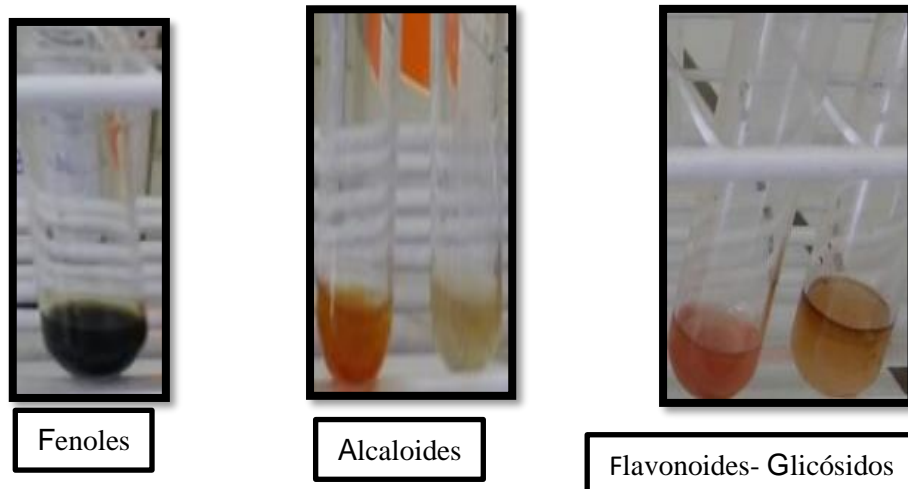


Figura N°10: Solubilidad de los extractos de *Anacardium occidentale L.* (marañón) con diferentes solventes

Cromatografía en capa fina del extracto de la nuez de *Anacardium occidentale L.* (marañón) (compuestos fenólicos)



Figura N°11: Identificación de metabolitos secundarios del extracto hidroalcohólico de la nuez de *Anacardium occidentale L.* (marañón)

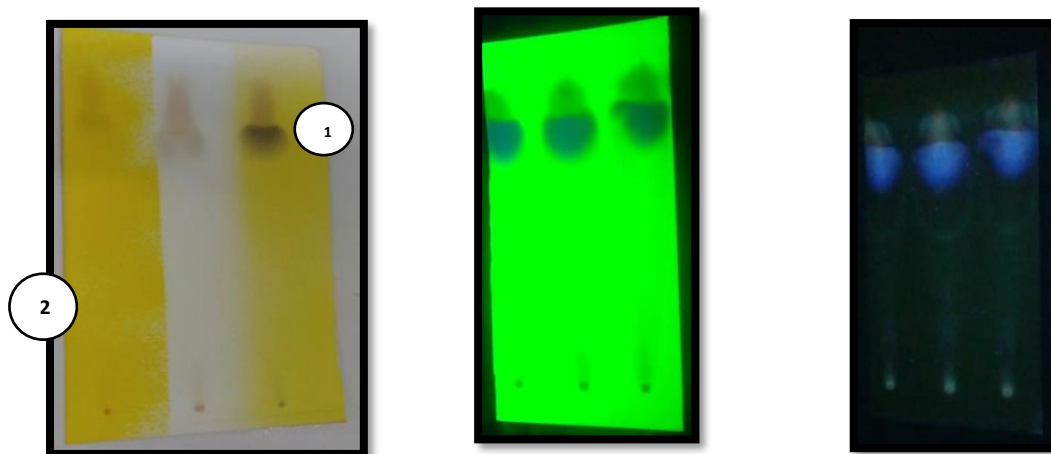
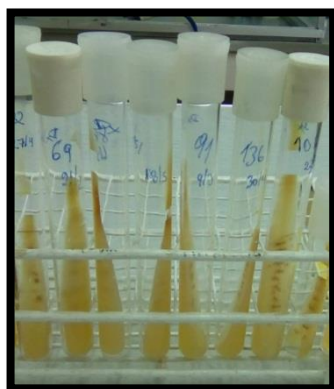


Figura N°12: Preparación del solvente, corrida de la muestra.

Figura N°13: Manchas de desplazamiento en la luz UV 254 y 365 nm.

1. Compuestos fenólicos
2. Flavonoides

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL PARA LA OBTENCION DE LA CEPAS DE *Malassezia spp.*



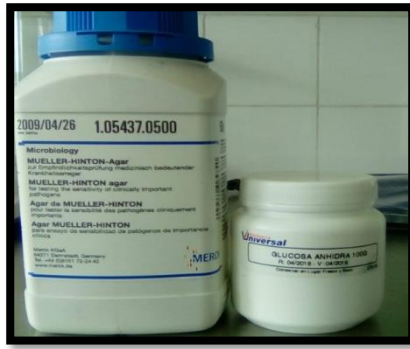


Figura N°14: Materiales y muestras de los pacientes afectados.

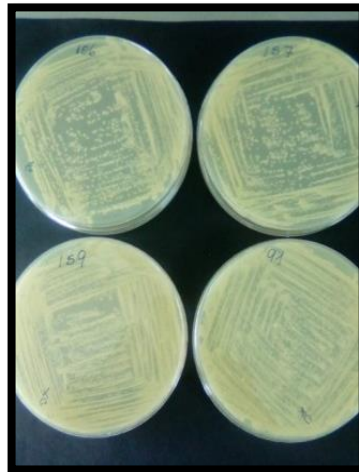


Figura N°15: Cepas de *Malassezia spp.* En medio Agar Dixon por 7 días a 37 °C

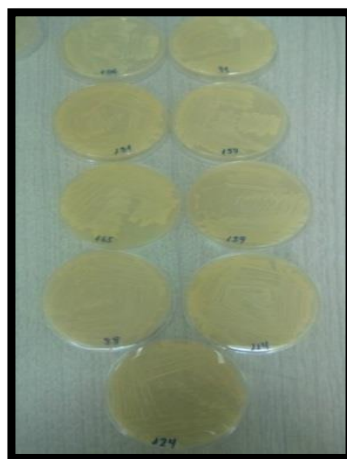


Figura N°16: Cepas reactivadas del primer aislamiento.



Figura N°17: Medio de agar Mueller Hinton Modificado

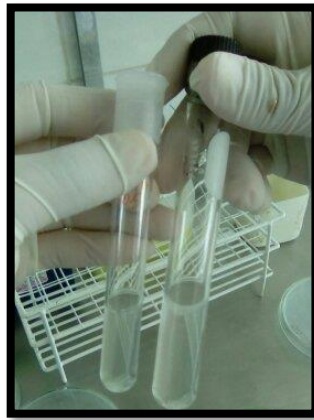


Figura N°18: Estandarización con la escala de turbidez del tubo N° 0.5 del Nefelómetro de McFarland.

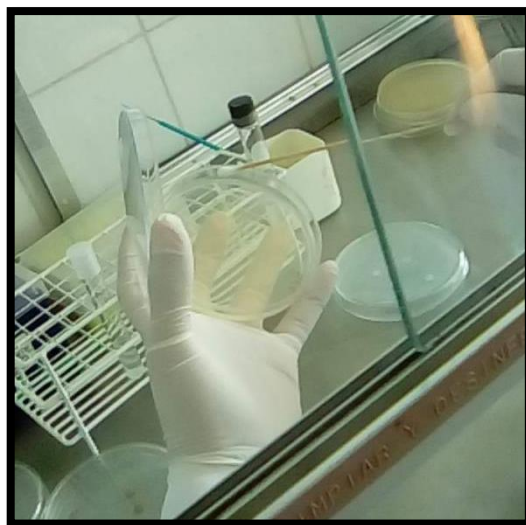


Figura N°19: Sembrado de la cepa de *Malassezia spp* en agar Mueller Hinton Modificado

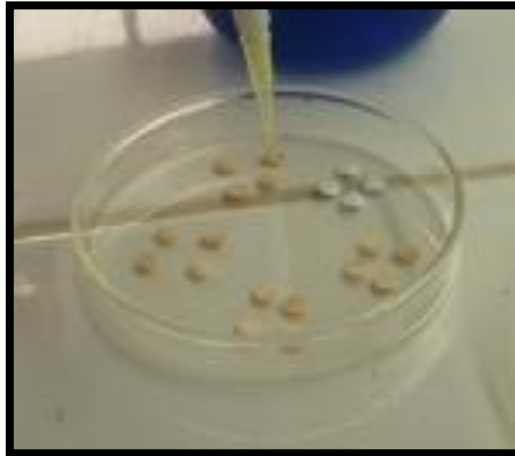


Figura N°20: Preparación de discos con extracto de *Anarcardium occidentale* L. (marañón) al 100 %, 75 % y 50%, ketoconazol y suero fisiológico.

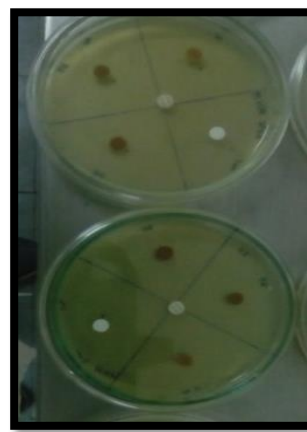


Figura N°21: Colocación de discos con extracto de *Anarcardium occidentale* L. (marañón) al 100 %, 75 % y 50%, ketoconazol y suero fisiológico en agar Mueller Hinton modificado con cepas de *Malassezia spp* reactivadas



Figura N°22: Colocación de placas petri en la incubadora

LECTURA DE RESULTADOS

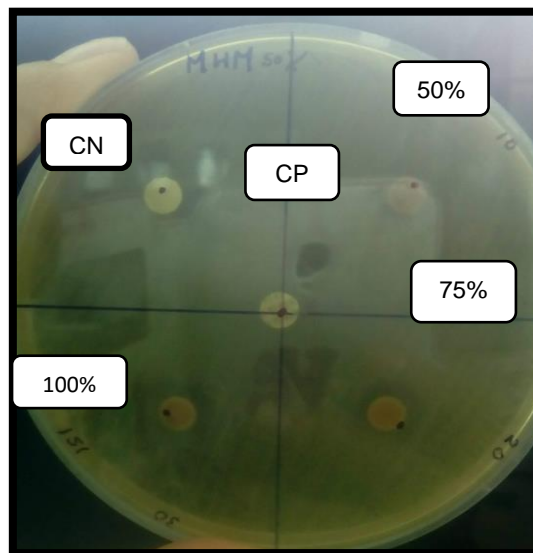
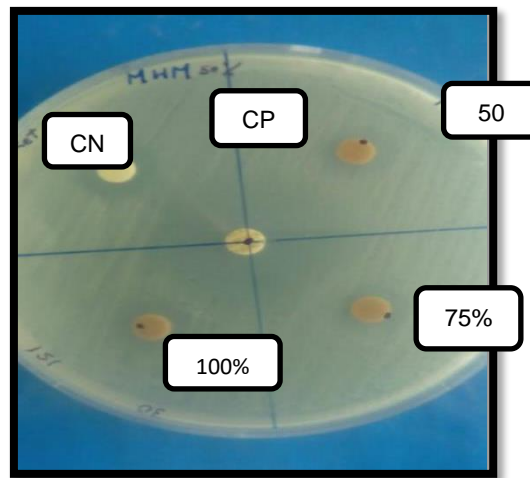


Figura N° 23: Halos de inhibición discos con extracto de *Anarcardium occidentale* L. (marañón) al 100%, 75%, 50%, ketoconazol (Control Positivo) y suero fisiológico (Control Negativo).



Figura N° 24: Laboratorio de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM