



Universidad Nacional
SAN LUIS GONZAGA



UNIVERSIDAD NACIONAL SAN LUIS GONZAGA
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
EVALUACIÓN DE ORIGINALIDAD



AT 2024-FFBB-038

CONSTANCIA

El que suscribe, deja constancia que se ha realizado el análisis con el software de verificación de similitud al documento cuyo título de **Informe final de tesis** es:

Evaluación de la actividad antifúngica in vitro de la fracción alcaloidal y no alcaloidal del extracto etanólico de las semillas de la especie *Argemone mexicana*

Presentado por:

PEÑA DIAZ ANALI ESTEFANY


Bachiller del nivel **PREGRADO** de la Facultad de **FARMACIA Y BIOQUÍMICA**. El resultado obtenido es **0%** por el cual se otorga el calificativo de:

APROBADO, según Reglamento de Evaluación de la Originalidad.

Con Código de Matricula: 20160394

Se adjunta al presente el reporte de evaluación con el software de verificación de originalidad. Observaciones:

Ica, 10 de diciembre de 2024


.....
Dra. JOSEFA BERTHA PARI OLARTE
DIRECTORA DE LA UNIDAD DE
INVESTIGACION FACULTAD DE FARMACIA
Y BIOQUÍMICA



UNIVERSIDAD NACIONAL "SAN LUIS GONZAGA"
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN

Facultad de Farmacia y Bioquímica



Evaluación de la actividad antifúngica in vitro de la fracción
alcaloidal y no alcaloidal del extracto etanólico de las semillas de la
especie *Argemone mexicana*

Línea de investigación:
Salud Pública y Conservación del Medio Ambiente

INFORME FINAL DE TESIS

Autor:
Bach. PEÑA DÍAZ ANALÍ ESTEFANY

Ica, Perú

2024

DEDICATORIA

A Dios, quien me acompaña cada día.

A mis padres, a quienes, con mucho amor, ofrezco mi más profunda admiración.

A mi pequeño hermano, por ser mi fuente de amor y motivación.

A mi familia, quienes con amor me demostraron que la grandeza cuesta y que la actitud, la determinación y la perseverancia siempre deben ir de la mano para alcanzar el éxito.

AGRADECIMIENTO

Agradezco profundamente a mis asesoras:

La Dra. Santos Haydee Chávez Orellana y la Blga. Aydee Díaz de la Cruz, por su guía y paciencia en todo momento, antes y durante la elaboración de esta tesis.

A la Asociación científica de investigación farmacéutica y sus grandes maestros, por permitirme explorar en la ciencia y entender que el futuro realmente pertenece a quienes creen en la belleza de sus sueños.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Portada	i
Dedicatoria	ii
Agradecimiento	iii
Índice	iv
- Índice de contenidos	iv
- Índice de tablas	v
- Índice de figuras	vi
Resumen	vii
Abstract	viii
I. Introducción	09
1.1. Descripción de la realidad problemática	
1.2. Antecedentes	
1.3. Objetivos del estudio	
1.4. Justificación	
II. Estrategia metodológica	15
2.1. Tipo y diseño de Investigación	
2.2. Población y muestra	
2.3. Técnicas e instrumentos de recolección de datos	
2.4. Técnicas de procesamiento de la información	
III. Resultados	20
IV. Discusión	25
V. Conclusiones	26
VI. Recomendaciones	27
VII. Referencias bibliográficas	28
VIII. Anexos	30

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Diseño de los grupos experimentales en el método de dilución en agar	18
Tabla 2: Metabolitos secundarios evaluados del extracto etanólico de semillas de la especie <i>Argemone mexicana</i> “Cardo santo”	20
Tabla 3: Efectividad de la actividad antifúngica de la fracción alcaloidal del extracto etanólico de semillas de la especie <i>Argemone mexicana</i> frente a <i>Candida albicans</i> .	21
Tabla 4: Efectividad de la actividad antifúngica de la fracción no alcaloidal del extracto etanólico de semillas de la especie <i>Argemone mexicana</i> frente a <i>Candida albicans</i> .	22
Tabla 5: Efectividad de la actividad antifúngica de la fracción alcaloidal del extracto etanólico de semillas de la especie <i>Argemone mexicana</i> frente a <i>Cryptococcus spp.</i>	23
Tabla 6: Efectividad de la actividad antifúngica de la fracción no alcaloidal del extracto etanólico de semillas de la especie <i>Argemone mexicana</i> frente a <i>Cryptococcus spp.</i>	24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de la identificación de metabolitos secundarios por medio del tamizaje fitoquímico	17
Figura 2: Esquema de la extracción de alcaloides de las semillas de la especie <i>Argemone mexicana</i> “cardo santo”	18
Figura 3: Comparación de los resultados obtenidos de los grupos experimentales de la fracción alcaloidal en relación al efecto antifúngico contra <i>Candida albicans</i> , por medio del método de dilución en agar.	21
Figura 4: Comparación de los resultados obtenidos de los grupos experimentales de la fracción no alcaloidal en relación al efecto antifúngico contra <i>Candida albicans</i> , por medio del método de dilución en agar.	22
Figura 5: Comparación de los resultados obtenidos de los grupos experimentales de la fracción alcaloidal en relación al efecto antifúngico contra <i>Cryptococcus spp</i> , por medio del método de dilución en agar.	23
Figura 6: Comparación de los resultados obtenidos de los grupos experimentales de la fracción no alcaloidal en relación al efecto antifúngico contra <i>Cryptococcus spp</i> , por medio del método de dilución en agar.	24
Figura 7: Hábitat de la especie <i>Argemone mexicana</i>	35
Figura 8: Secado de las semillas de la especie <i>Argemone mexicana</i>	35
Figura 9: Reflujo de semillas de la especie <i>Argemone mexicana</i>	36
Figura 10: Producto del reflujo de las semillas de la especie <i>Argemone mexicana</i> seco	36
Figura 11: Identificación de alcaloides en la fracción alcaloidal del extracto etanólico de las semillas de la especie <i>Argemone mexicana</i>	37
Figura 12: Cultivo de hongos en placas petri	37
Figura 13: Extracto de las semillas de la especie <i>Argemone mexicana</i> en distintas concentraciones	38
Figura 14: Ausencia de hongos en placa Petri	38

RESUMEN

A través de los años la especie *Argemone mexicana* “Cardo santo” ha sido utilizada de manera popular por los pobladores del distrito de Colca, provincia de Víctor Fajardo, región de Ayacucho para combatir diferentes enfermedades, siendo una de estas, las infecciones fúngicas en el ser humano, esto sin algún estudio científico previo realizado a la planta, pudiendo a su vez, ser un riesgo para la salud. Nuestra investigación tuvo como objetivo evaluar la actividad antifúngica de la fracción alcaloidal y no alcaloidal del extracto etanólico de semillas de la especie *Argemone mexicana*, haciendo uso de cepas clínicas como material biológico. La identificación de metabolitos secundarios fue realizada mediante el método del tamizaje fitoquímico. Se utilizó una metodología específica para la obtención de la fracción alcaloidal y no alcaloidal. Sobre estas fracciones se evaluó la actividad antifúngica por el método de la dilución en agar, usando Fluconazol (200mg/100 ml), como control positivo. Como resultado del tamizaje fitoquímico se identificaron aminoácidos, flavonoides, triterpenoides y/o esteroides, alcaloides, leucoantocianidinas y/o catequinas. La evaluación del efecto antifúngico de la fracción alcaloidal contra *Candida albicans* obtuvo un menor número de unidades formadoras de colonias (<1ufc/mL) a concentraciones del 50% y 75%, a diferencia de la fracción no alcaloidal, que presentó actividad únicamente a la concentración del 75%. Por otro lado, la fracción alcaloidal resultó ser efectiva contra *Cryptococcus spp* a concentraciones del 50% y 75%, marcando diferencia contra la fracción no alcaloidal, la cual presentó actividad solo al 75% de concentración. Como conclusión, la fracción alcaloidal del extracto etanólico de semillas de la especie *Argemone mexicana* presenta mayor actividad antifúngica a las concentraciones del 50% y 75% frente a la fracción no alcaloidal. Debiéndose posiblemente a la presencia de alcaloides en esta fracción.

Palabras clave: Antifúngico, fracción alcaloidal, fluconazol, *Argemone mexicana*

ABSTRACT

Over the years, the species *Argemone mexicana* “Cardo santo” has been popularly used by the inhabitants of the district of Colca, province of Victor Fajardo, region of Ayacucho to combat different diseases, one of these being fungal infections in humans, without any previous scientific study of the plant, which in turn, could be a health risk. The objective of our research was to evaluate the antifungal activity of the alkaloidal and non-alkaloidal fractions of the ethanolic extract of *Argemone mexicana* seeds, using clinical strains as biological material. The identification of secondary metabolites was carried out by the phytochemical screening method. A specific methodology was used to obtain the alkaloidal and non-alkaloidal fractions. The antifungal activity of these fractions was evaluated by the agar dilution method, using Fluconazole (200mg/100 ml) as a positive control. As a result of the phytochemical screening, amino acids, flavonoids, triterpenoids and/or steroids, alkaloids, leucoanthocyanidins and/or catechins were identified. The evaluation of the antifungal effect of the alkaloidal fraction against *Candida albicans* obtained a lower number of colony forming units (<1ufc/mL) at concentrations of 50% and 75%, in contrast to the non-alkaloidal fraction, which presented activity only at the 75% concentration. On the other hand, the alkaloidal fraction proved to be effective against *Cryptococcus spp* at concentrations of 50% and 75%, marking a difference against the non-alkaloidal fraction, which presented activity only at 75% concentration. In conclusion, the alkaloidal fraction of the ethanolic extract of *Argemone mexicana* seeds showed greater antifungal activity at concentrations of 50% and 75% compared to the non-alkaloidal fraction. This is possibly due to the presence of alkaloids in this fraction.

Key words: Antifungal, alkaloidal fraction, fluconazole, *Argemone mexicana*

I. INTRODUCCIÓN

Desde tiempos inmemoriales, las plantas medicinales han sido parte de la historia de la humanidad y su cultura popular, ya que estas eran veneradas por sus virtudes y por lo tanto, su conocimiento era transmitido de generación en generación de manera verbal y escrita (civilizaciones egipcias, griegas, romanas y otras).

Muchas de estas plantas, eran usadas al mismo tiempo como fuentes de veneno, las cuales eran aplicadas en flechas o lanzas, proporcionando una ayuda eficaz en el proceso de la caza. Lo que nos indica que las especies vegetales no solo cuentan con propiedades “curativas”, sino, con una amplia gama de efectos en el ser humano, desde el efecto terapéutico hasta el efecto tóxico. Y según Paracelso, “el fin más importante de la química debía ser producir medicamentos para paliar el sufrimiento humano”.(1)

He ahí la curiosidad de la industria farmacéutica, ciencia que centra su interés en el análisis y estudio de los efectos terapéuticos de las plantas, comparando y clasificando las diversas propiedades de estas, determinando al mismo tiempo sus estructuras químicas y proponiendo modificaciones estructurales mediante la síntesis de moléculas semejantes a las aisladas a partir de las plantas en busca de una mayor actividad.

La misma búsqueda trajo consigo una mayor investigación de las diversas enfermedades, siendo una de ellas, las enfermedades fúngicas, las mismas que en la actualidad, según lo informado por la Organización mundial de la salud (OMS), se han convertido en una gran amenaza para la salud pública, debido a que son causas crecientes de infecciones, siendo cada vez más resistentes a los tratamientos, como por ejemplo *Candida albicans*, cuyo mecanismo de resistencia se basa en la acumulación de mutaciones ERG11, gen que codifica la 14 α -esterol desmetilasa.

Otro ejemplo claro de estas infecciones recae en los pacientes altamente susceptibles a estas enfermedades como personas con VIH y pacientes con quimioterapia.

Aunque en la actualidad disponemos de fármacos que hacen frente a dichas enfermedades fúngicas, es importante tener claro el nivel de toxicidad y resistencia que presentan mencionados fármacos, razón por la cual nos encontramos en la búsqueda de nuevos agentes antifúngicos, que puedan ser mucho más seguros y potentes que los ya existentes.

1.1 Descripción de la realidad problemática

En el año 2022, la Organización Mundial de Salud (OMS) publicó su primera lista de patógenos fúngicos prioritarios, en donde plasmaron los 19 hongos más peligrosos para la salud pública, teniendo como objetivo impulsar nuevas e innovadoras investigaciones a fin de fortalecer nuestra respuesta ante una infección fúngica y la resistencia de estos. (2)

Uno de los hongos de mencionada lista, *Candida albicans*, calificado como patógeno, puede formar parte del microbioma humano sano (boca, garganta, intestino, vagina y piel), es decir, ser inofensivo en el hospedero sano, pero también se sabe que puede causar infecciones de las mucosas (candidiasis orofaríngea, candidiasis esofágica, candidiasis vulvovaginal y candidiasis cutánea) o producir candidiasis invasiva en el hospedero inmunocomprometido (3), como por ejemplo, pacientes que hayan recibido cirugías de trasplante, con nutrición parenteral, pacientes con SIDA, entre otros. Dichos factores, llamados iatrogénicos están directamente relacionados con el deterioro de nuestras defensas inmunes y de la integridad de la superficie de las mucosas y piel. (4)

Por otro lado, tenemos al hongo *Cryptococcus spp*, específicamente el *Cryptococcus neoformans* que, a pesar de no encontrarse en la lista de los hongos más peligrosos para la salud pública, es una especie levaduriforme capsulado capaz de vivir en plantas y animales, estando presente en excrementos de palomas o en suelos que tengan restos orgánicos. Al igual que *Candida albicans*, *Cryptococcus spp* es capaz de causar infección en personas inmunodeprimidas, desencadenando criptococosis pulmonar o meningitis.

Lugareños de la provincia de Víctor Fajardo (Ayacucho) exponen haber hecho uso de la especie cardo santo, llamado comúnmente por ellos, Jarhuancho, para aliviar los dolores, la tos, fiebre u otros malestares que los aquejen.

Estudios recientes describen la presencia de una serie de metabolitos secundarios en cardo santo, siendo uno de ellos, los alcaloides, metabolito secundario con actividad farmacológica antimicrobiana (5) presente en toda la planta. Sin embargo, los antecedentes bibliográficos indican que mencionado metabolito se encuentra acumulado en mayor proporción en tejidos específicos de la especie como, por ejemplo: en las raíces y semillas. (6)

1.2 Antecedentes

No se evidencian estudios sobre la actividad antifúngica de las semillas de la especie *Argemone mexicana* “Cardo santo”. Sin embargo, existen investigaciones de otras partes de la planta, relacionadas a la actividad que se busca demostrar:

1.2.1 Antecedentes Internacionales

- **Curay Yaulema C.S., (2022)** en su investigación “Composición química y actividad antifúngica del látex de *Argemone mexicana* (cardo santo)”.
Identificó las especies químicas presentes en el látex de la mencionada especie. Realizó cortes en la planta y mediante jeringuillas esterilizadas extrajeron el látex para su posterior caracterización por medio de un tamizaje fitoquímico y por medio de CG-EM (cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas). Asimismo, realizó pruebas de bioactividad, mediante la técnica de Kirby Bauer, en dos cepas de hongos *Botrytis cinerea* y *Cladoosporium spp*, y con dos medios de cultivo (agar PDA y Saoubourad). Y comprobó la actividad antifúngica del extracto acuoso del látex a concentraciones de 10 µl y 20 µl del extracto, mediante la visible observación de la formación de halos de inhibición bien definidos. Además de ello, se utilizaron los metabolitos secundarios identificados por cromatografía de gases-detector de masas para realizar una comparación de sus estructuras químicas y bioactividad con trabajos similares reportados en la literatura, lo que permitió atribuirle la actividad antifúngica a los compuestos que podrían ser responsables de la actividad biológica. (7)
- **Hidalgo J.I.L., (2019)** en su investigación “Análisis de la síntesis de alcaloides en fruto y semilla de *Argemone mexicana*”.
Buscó analizar la capacidad de biosíntesis de alcaloides en fruto y semilla de *Argemone mexicana*, estableció a la vez los patrones de distribución de los alcaloides berberina y sanguinarina en los tejidos de los frutos y semilla. Realizó una extracción y cuantificación de los alcaloides berberina y sanguinarina, además de realizar un estudio molecular. Las evidencias sugirieron que la acumulación de la sanguinarina ocurre específicamente en la testa de la semilla y es posible que no se libere al medio durante la germinación. (6)
- **Roy G.B.D.G., (2013)** en su trabajo investigativo “*Argemone mexicana*: Aspectos químicos y farmacológicos”.

Realizó una revisión que abordó la química y farmacología detallada de *Argemone mexicana* considerada como una de las especies de plantas más significativas en el sistema tradicional de medicina. Realizó búsquedas en las bases de datos Medline (National Library of Medicine) y Science Direct sobre los componentes químicos aislados e identificados de *Argemone mexicana*, las actividades farmacológicas que mostró por los compuestos aislados y los extractos crudos de la planta. Indicó que *Argemone mexicana* se utiliza en diferentes partes del mundo para el tratamiento de varias enfermedades de la piel, inflamaciones, reumatismo, ictericia, lepra, infecciones microbianas y paludismo. Además de alcaloides, esta especie vegetal es fuente de otros componentes químicos diversos, como terpenoides, esteroides, carbohidratos, alcoholes alifáticos de cadena larga y ácidos carboxílicos, aminoácidos, flavonoides y otros fenoles. Además de las eficacias farmacéuticas, ciertas partes de la planta también muestran efectos tóxicos. (8)

1.2.2 Antecedentes Nacionales

- **Ruiz Barrueto M.A., (2019)** en su investigación “Caracterización fitoquímica y efecto antibacteriano in vitro de *Argemone mexicana* contra bacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido”.

Determinó el efecto antibacteriano in vitro del extracto hidroalcohólico de la especie *Argemone mexicana* “cardo santo” sobre el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE). El extracto lo obtuvo mediante maceración hidroetanólica. Preparándose 10 concentraciones (de 10 a 100 µg/mL). Realizó la evaluación de la capacidad antibacteriana mediante el método de difusión en disco. El inóculo se estandarizó espectrofotométricamente. Los parámetros utilizados para la incubación microbiológica fueron a 35 °C en el curso de 18 horas en atmósfera aeróbica. Los resultados se expresaron como promedios del diámetro (mm) de halo de inhibición de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* productoras de BLEE. Los discos de antibióticos de amoxicilina/Ácido clavulánico y Cefotaxima/Ácido clavulánico fueron usados como controles positivos y la solución salina fisiológica estéril fue usada como control negativo. Reportó el efecto antibacteriano de tipo bactericida de las diferentes concentraciones del extracto

hidroetanólico de *Argemone mexicana* sobre *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* productoras de betalactamasa de espectro extendido. (9)

- **Condor Y.C.M., (2023)** en su investigación “Actividad antioxidante del extracto etanólico de la especie *Argemone mexicana* “cardo santo”

Evaluó la actividad antioxidante del extracto etanólico de la especie *Argemone mexicana* “cardo santo”, la cual fue recolectada en la Provincia de Churcampá, Huancavelica, debido a que a la presente especie se le atribuye propiedades beneficiosas para la salud de los seres humanos. Preparó un extracto etanólico, mediante el método de maceración por un tiempo de 15 días con alcohol de 96 grados, el cual luego fue llevado a sequedad para posteriormente determinar los metabolitos secundarios mediante la realización de un screening fitoquímico según los métodos propuestos por Olga Lock. Además de ello, para la evaluación de la actividad antioxidante ejecutó los métodos DPPH en el cual determinó el porcentaje de inhibición para hallar el correspondiente IC50; y los métodos de FRAP y ABTS en los cuales se utilizó el trolox como patrón de referencia. El extracto crudo de la planta entera presentó metabolitos secundarios como grupos fenólicos libres, triterpenos y flavonoides. Con respecto al estudio y el análisis para determinar la actividad antioxidante por el método DPPH presentó un IC50 de 3,28 mg, para el método FRAP presenta equivalente de trolox de 0,345 mM así para el método ABTS presenta un resultado equivalente de 0,262 mM.(10)

- **Jurado Anicama Y.J. (2024)**, en su investigación “Evaluación de la actividad antiinflamatoria, analgésica y toxicidad aguda del extracto etanólico de la especie *Argemone Mexicana L.* “Cardo Santo”

Evaluó la actividad antiinflamatoria, analgésica y toxicidad aguda del extracto etanólico de la mencionada especie mediante modelos experimentales “in vivo” en ratones albinos. Utilizó el método de tamizaje fitoquímico para la identificación de metabolitos. Mientras que la actividad antiinflamatoria lo evaluó por medio del método del edema plantar inducido por carragenina, utilizando diclofenaco como droga patrón. Además, la actividad analgésica la evaluó mediante dos métodos: el método del plato caliente y el método de inducción de contorsiones por ácido acético, tomando como referencia los fármacos Tramadol (50 mg/Kg) y Ácido acetilsalicílico (50 mg/Kg) respectivamente. En ambas actividades las dosis que usó fueron de 250, 500 y 750 mg/Kg. Estimó la toxicidad

aguda por el método de las clases, en ratones albinos, utilizando una dosis de 2000 mg/Kg. En el extracto etanólico de la especie que estudió, identificó los metabolitos secundarios: flavonoides, grupo fenólicos libres, grupos aminos libres, triterpenoides y/o esteroides, antraquinonas, alcaloides, leucoantocianidinas. El efecto antiinflamatorio obtuvo un resultado cercano al fármaco de referencia (76,49% / 82,43%) a dosis de 750 mg/Kg, donde evidenció un efecto analgésico periférico superior al fármaco AAS a dosis de 500 mg/Kg, mientras que en el modelo del plato caliente el efecto analgésico mostró ser leve. Además, el extracto etanólico no mostró toxicidad a dosis de 2000 mg/Kg. (11)

1.3 Objetivos del estudio

1.3.1. Objetivo general:

- Evaluar la actividad antifúngica in vitro de la fracción alcaloidal y no alcaloidal del extracto etanólico de semillas de la especie *Argemone mexicana*.

1.3.2. Objetivos específicos:

- Identificar los posibles grupos de metabolitos secundarios del extracto etanólico de semillas de la especie *Argemone mexicana*.
- Demostrar cuál de las fracciones alcaloidal y no alcaloidal del extracto etanólico de las semillas de la especie *Argemone mexicana* presentará mayor actividad antifúngica por el método de la dilución en agar.

1.4 Justificación

El presente trabajo de investigación descrito a continuación busca contribuir al conocimiento de la medicina tradicional, esto mediante la evaluación de la actividad antifúngica de las semillas de la especie *Argemone mexicana*. Ya que a través de los años la mencionada especie ha sido utilizada de manera popular por los pobladores del distrito de Colca, provincia de Víctor Fajardo, región de Ayacucho para combatir diferentes enfermedades, siendo una de estas, la proliferación de hongos, esto sin algún estudio científico previo realizado a la planta, pudiendo a su vez, ser un riesgo para la salud. Motivo por el cual nace el interés por la evaluación de la actividad antifúngica, iniciando de esta manera con la recolección de datos obtenidos de los conocimientos empíricos de los pobladores de dicho distrito y de estudios preliminares de actividades realizadas a la mencionada especie, las cuales se encuentran relacionadas a la actividad de interés en el presente trabajo investigativo.

II. ESTRATEGIA METODOLÓGICA

2.1 Tipo y diseño de investigación

2.1.1 Tipo de investigación

El presente trabajo de investigación es considerado básico.

2.1.2 Diseño de investigación

Experimental, contando con una variable y controla el resto de las variables.

2.1.3 Variables

Variable independiente:

- Fracción alcaloidal del extracto etanólico de las semillas de la especie *Argemone mexicana*.
- Fracción no alcaloidal del extracto etanólico de las semillas de la especie *Argemone mexicana*.

Variable dependiente:

- Actividad antifúngica

2.2 Población y muestra

2.2.1 Población de estudio

- *Candida albicans*
- *Cryptococcus spp*

2.2.2 Muestra

- *Candida albicans*, cepa clínica disuelta en medio de cultivo.
- *Cryptococcus spp*, disuelta en medio de cultivo.

2.3 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

2.3.1 Recolección del material vegetal

Las cápsulas con las semillas de la especie vegetal *Argemone mexicana* “Cardo Santo” fueron recolectadas en el distrito de Colca, provincia de Víctor Fajardo, Departamento de Ayacucho en el mes de diciembre del año 2023 y a primeras horas de la mañana, esto con la finalidad de evitar alguna alteración en la composición de metabolitos secundarios contenidos en la especie, producto de las altas temperaturas. La recolección se llevó a cabo con ayuda de bolsas de papel kraft, tijeras y guantes gruesos, ya que la cápsula que contiene las semillas de la especie en mención

presentan espinas en la zona del carpelo (6).

Una vez que la muestra vegetal fue recolectada, esta fue trasladada al laboratorio de Química Farmacéutica de la facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional “San Luis Gonzaga”.

2.3.2 Tratamiento de la muestra

a) Selección

La selección se llevó a cabo posterior a la recolección del material vegetal, seleccionándose únicamente las semillas con ayuda de las bolsas de papel kraft, esto con la finalidad de evitar contaminación de los 2000g de muestra vegetal.

b) Limpieza

Posterior a la selección, las semillas fueron limpiadas del polvo con ayuda de un cernidor y colocadas sobre papel kraft.

c) Secado y conservación

El proceso de secado se realizó de manera natural, en un espacio ventilado y bajo sombra a una temperatura ambiente, con la finalidad de que los componentes de la muestra vegetal no sufrieran alteración alguna en cuanto a la concentración de sus principios activos.

La muestra fue esparcida sobre el papel kraft y removida de manera constante por un lapso de 15 días, con el objetivo de obtener un secado homogéneo.

Posterior a ello, la muestra vegetal fue conservada en bolsa de papel kraft para su posterior estudio.

2.3.3 Obtención del extracto etanólico por reflujo

La obtención del extracto etanólico de la especie *Argemone mexicana* “cardo santo” por reflujo, se obtuvo de la siguiente manera:

2000 g de muestra de semillas secas de la especie vegetal *Argemone mexicana* “Cardo Santo” fueron maceradas en 8L de alcohol de 96° y en un recipiente de vidrio con tapa hermética por un tiempo de 24h, el cual fue cubierto con papel aluminio, a fin de evitar que los rayos de sol penetraran en el frasco y alteraran la composición de los metabolitos secundarios de la muestra.

Concluida la maceración de 24h, la muestra fue procesada utilizando el equipo de reflujo, con el cual se obtuvo el extracto etanólico mediante el método de la extracción por reflujo, proceso que tomó un lapso de 4h. El producto que se obtuvo

de dicho proceso de reflujo fue filtrado y colocado en recipientes previamente identificados, hasta sequedad.

2.3.4 Extracción de alcaloides e identificación de metabolitos secundarios por medio del tamizaje fitoquímico

A lo largo del tiempo, se ha ido desarrollando una variedad de métodos para la detección de los diferentes metabolitos y/o constituyentes químicos de una planta, basados en la extracción y en la aplicación de pruebas de coloración o tamizaje fitoquímico. Siendo los alcaloides, por ejemplo: la atropina, cocaína y la emetina, uno de los metabolitos secundarios que se encuentran constituyendo el grupo más grande. Pudiéndose encontrar en semillas, hojas o raíces. (12)

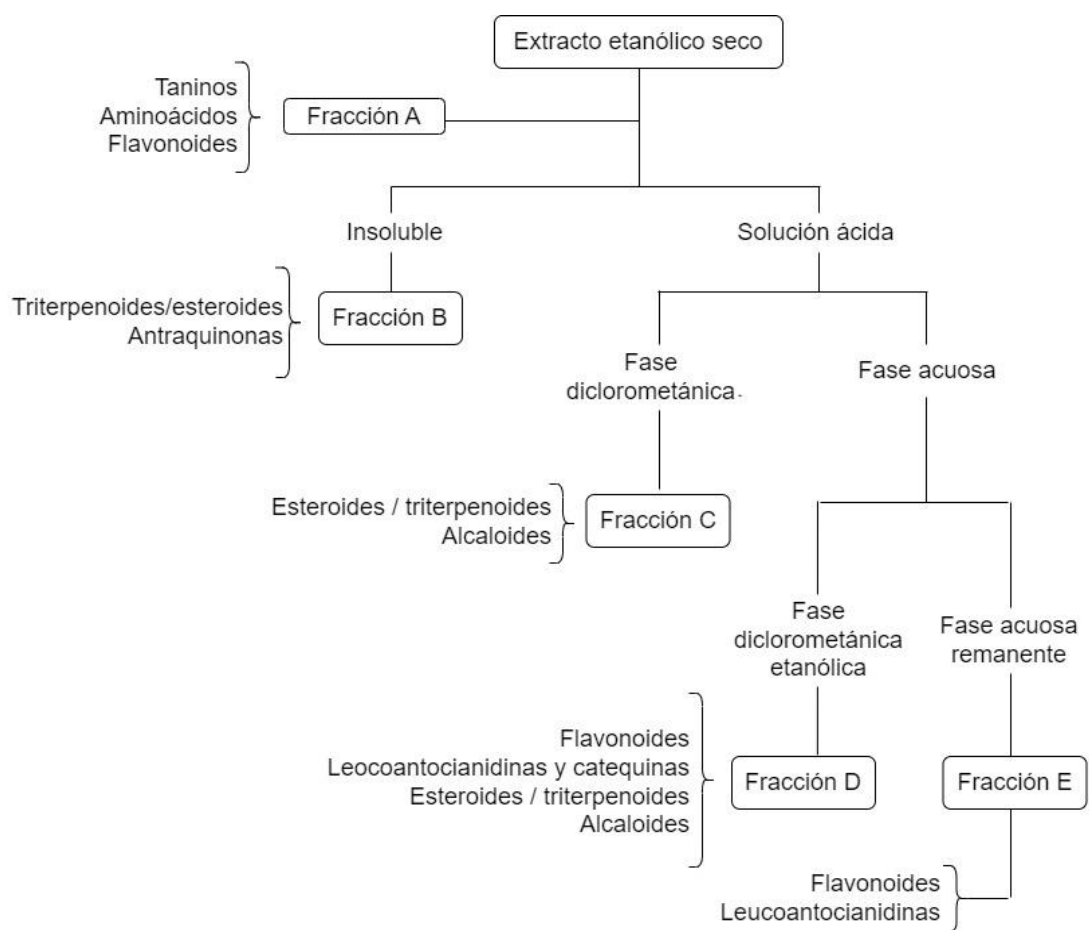


Figura 1: Esquema de la identificación de metabolitos secundarios por medio del tamizaje fitoquímico

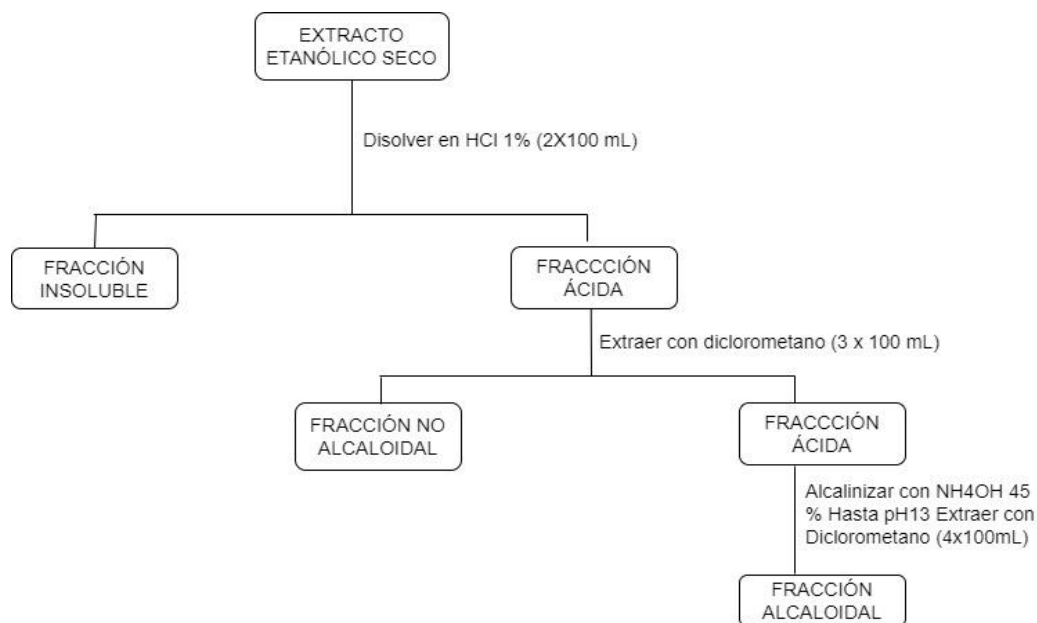


Figura 2: Esquema de la extracción de alcaloides de las semillas de la especie Argemone mexicana “cardo santo”

2.3.5 Estudio microbiológico

2.3.5.1 Material biológico

Se trabajó con $1 - 5 \times 10^6$ ufc/mL de las cepas clínicas *Candida albicans* y *Cryptococcus spp* (13), las cuales fueron incubadas por un tiempo de 24h y 72h, respectivamente en un medio de cultivo compuesto de agar Dextrosa Sabouraud (ADS), manteniéndose a una temperatura entre 28°C y 37°C.

2.3.5.2 Actividad antifúngica por el método de dilución en agar

El método de dilución en agar (14) se basa en inhibir el crecimiento fúngico mediante la dilución de la fracción alcaloidal y no alcaloidal en el agar, para posteriormente evidenciarse por la ausencia de crecimiento en las placas.

Tabla 1: Diseño de los grupos experimentales en el método de dilución en agar

GRUPO CONTROL (-)	GRUPO CONTROL (+)	FRACCIÓN ALCALOIDAL			FRACCIÓN NO ALCALOIDAL		
		GRUPO A1	GRUPO A2	GRUPO A3	GRUPO NA1	GRUPO NA2	GRUPO NA3
Alcohol 96°	Fluconazol 200mg/100 ml	Extracto 25%	Extracto 50%	Extracto 75%	Extracto 25%	Extracto 50%	Extracto 75%

- Preparación de las placas Petri
Se utilizó el agar dextrosa Sabouraud (ADS), el cual deberá encontrarse reconstituido, enfriado y mantenido a una temperatura manipulable. Posterior a ello, se agregó el control positivo, control negativo y el extracto etanólico en sus diferentes concentraciones, en cada grupo estudiado, respectivamente. Para luego ser mezclado asépticamente con el medio de cultivo y dar tiempo a que se solidifique.
- Preparación del inóculo
Se utilizó una pequeña alícuota del inóculo, el cual fue transferido a un tubo de ensayo que contenía solución salina estéril, esto hasta alcanzar un grado de turbidez semejante al tubo 0.5 de la escala de McFarland, que equivale a $1 - 5 \times 10^6$ ufc/mL (inóculo concentrado), para posteriormente ser utilizado en la prueba.
- Inoculación e incubación de las muestras
En la superficie del agar se verterá la suspensión de los respectivos microorganismos, la cual será esparcida por toda la superficie de la placa, esto con ayuda del asa de Kolle. El crecimiento fúngico fue verificado, primero en control de placas preparado sin alguna muestra de prueba, después 24h y 48h, dependiendo del período de incubación requerido para un crecimiento visible.
La efectividad de la especie en estudio fue evaluada mediante el conteo de unidades formadoras de colonias, siguiendo la fórmula:

$$\text{Ufc/mL} = \frac{(\text{colonias contadas}) \times (\text{inverso del factor de dilución})}{(\text{Volumen sembrado en la placa})}$$

2.4 Técnicas de procesamiento de la información

Los datos obtenidos fueron procesados en el programa Minitab18 Statistical Software y la comparación entre los grupos de estudio fueron analizados estadísticamente haciendo uso del análisis de varianza (ANOVA) entre las medias de mencionados grupos.

III. RESULTADOS

1.4. Identificación de metabolitos secundarios de las semillas de *Argemone mexicana* “Cardo santo”

Tabla 2: Metabolitos secundarios evaluados del extracto etanólico de semillas de la especie *Argemone mexicana*. “Cardo santo”

FRACCIÓN	METABOLITO	REACCIÓN	RESULTADO
A	Taninos	-Gelatina-sal -Cloruro férrico	- -
	Aminoácidos	-Ninhidrina	+
	Flavonoides	-Shinoda	+
B	Triterpenoides y/o esteroides	-Liebermann Burchard	+
	Antraquinonas	-Borntrager	-
C	Esteroides y/o Triterpenoides	- Liebermann Burchard	+
	Alcaloides	-Dragendorff -Mayer -Wagner	+ + +
	Flavonoides	-Shinoda	+
D	Leucoantocianidinas y/o catequinas	-Rosenheim	+
	Triterpenoides y/o esteroides	-Liebermann	+
	Alcaloides	-Dragendorff -Mayer -Wagner	+ + +
E	Flavonoides	-Shinoda	+
	Leucoantocianidinas	-Rosenheim	+

(+) Positivo; (-) Negativo.

1.5. Actividad antifúngica

Tabla 3: Efectividad de la actividad antifúngica de la fracción alcaloidal del extracto etanólico de semillas de la especie *Argemone mexicana* frente a *Candida albicans*.

PRESENCIA DE <i>CANDIDA ALBICANS</i> – DILUCIÓN EN AGAR		
FRACCIÓN ALCALOIDAL		
GRUPO EXPERIMENTAL	REPETICIONES	RESULTADO (UFC/mL)
Control negativo	5	31×10^6 ufc/mL
Control positivo	5	< 1 ufc/mL
Extracto a 25%	5	1×10 ufc/mL
Extracto a 50%	5	< 1 ufc/mL
Extracto a 75%	5	< 1 ufc/mL

La menor cantidad de unidades formadoras de colonias es de < 1 ufc/mL a concentraciones de 50% y 75% del extracto en estudio, siendo ambas concentraciones las más próximas al control positivo (Fluconazol).



Figura 3: Comparación de los resultados obtenidos de los grupos experimentales de la fracción alcaloidal en relación al efecto antifúngico contra *Candida albicans*, por medio del método de dilución en agar.

Tabla 4: Efectividad de la actividad antifúngica de la fracción no alcaloidal del extracto etanólico de semillas de la especie *Argemone mexicana* frente a *Candida albicans*.

PRESENCIA DE CANDIDA ALBICANS – DILUCIÓN EN AGAR		
FRACCIÓN NO ALCALOIDAL		
GRUPO	REPETICIONES	RESULTADO (UFC/mL)
EXPERIMENTAL		
Control negativo	5	30 x 10 ⁶ ufc/mL
Control positivo	5	< 1 ufc/mL
Extracto a 25%	5	1 x 10 ufc/mL
Extracto a 50%	5	1 x 10 ufc/mL
Extracto a 75%	5	< 1 ufc/mL

La menor cantidad de unidades formadoras de colonias es de < 1 ufc/mL a concentraciones de 75% del extracto en estudio, siendo la concentración más próxima al control positivo (Fluconazol).

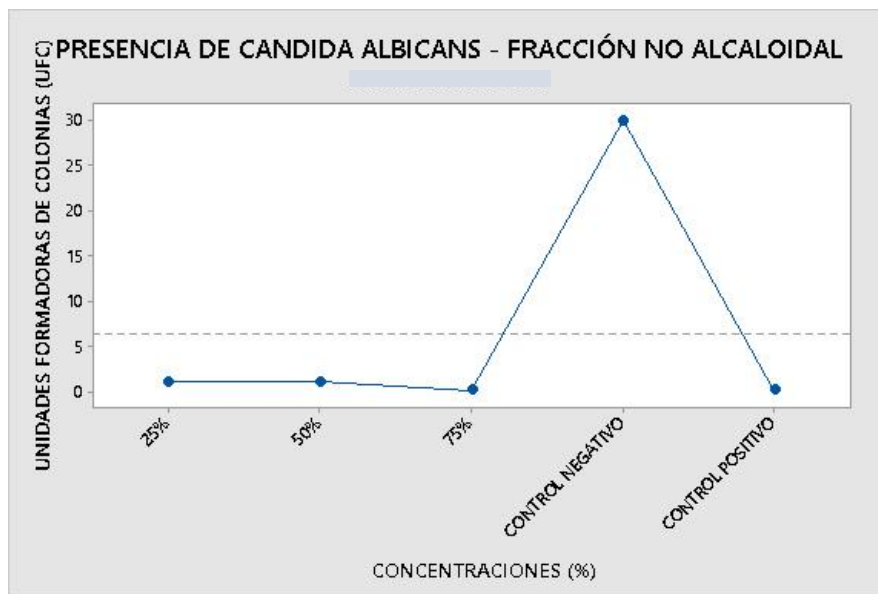


Figura 4: Comparación de los resultados obtenidos de los grupos experimentales de la fracción no alcaloidal en relación al efecto antifúngico contra *Candida albicans*, por medio del método de dilución en agar.

Tabla 5: Efectividad de la actividad antifúngica de la fracción alcaloidal del extracto etanólico de semillas de la especie *Argemone mexicana* frente a *Cryptococcus spp.*

PRESENCIA DE <i>CRYPTOCOCCUS SPP</i> - DILUCIÓN EN AGAR		
FRACCIÓN ALCALOIDAL		
GRUPO EXPERIMENTAL	REPETICIONES	RESULTADO (UFC/mL)
Control negativo	5	31 x 10 ⁶ ufc/mL
Control positivo	5	< 1 ufc/mL
Extracto a 25%	5	1 x 10 ufc/mL
Extracto a 50%	5	< 1 ufc/mL
Extracto a 75%	5	< 1 ufc/mL

La menor cantidad de unidades formadoras de colonias es de < 1 ufc/mL a concentraciones de 50% y 75% del extracto en estudio, siendo ambas concentraciones las más próximas al control positivo (Fluconazol).



Figura 5: Comparación de los resultados obtenidos de los grupos experimentales de la fracción alcaloidal en relación al efecto antifúngico contra *Cryptococcus spp.*, por medio del método de dilución en agar.

Tabla 6: Efectividad de la actividad antifúngica de la fracción no alcaloidal del extracto etanólico de semillas de la especie *Argemone mexicana* frente a *Cryptococcus spp.*

PRESENCIA DE <i>CRYPTOCOCCUS SPP</i> – DILUCIÓN EN AGAR		
FRACCIÓN NO ALCALOIDAL		
GRUPO	REPETICIONES	RESULTADO (UFC/mL)
Control negativo	5	29 x 10 ⁶ ufc/mL
Control positivo	5	< 1 ufc/mL
Extracto a 25%	5	1 x 10 ufc/mL
Extracto a 50%	5	1 x 10 ufc/mL
Extracto a 75%	5	< 1 ufc/mL

La menor cantidad de unidades formadoras de colonias es de < 1ufc/mL a concentración de 75% del extracto en estudio, siendo la concentración más próxima al control positivo (Fluconazol).

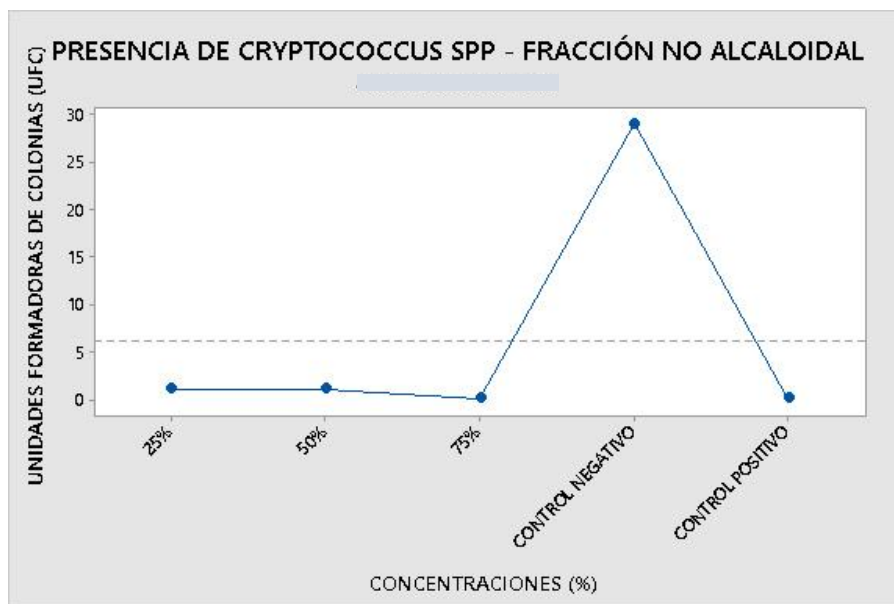


Figura 6: Comparación de los resultados obtenidos de los grupos experimentales de la fracción no alcaloidal en relación al efecto antifúngico contra *Cryptococcus spp.*, por medio del método de dilución en agar.

IV. DISCUSIÓN

Sobre la base de los resultados expuestos, se afirma el objetivo general, el cual establece que la actividad antifúngica in vitro de la fracción alcaloidal y no alcaloidal del extracto etanólico de semillas de la especie *Argemone mexicana*, en el presente trabajo, logra tener relación a lo expuesto por De la Cruz Chacón I., Gonzales Esquinca A.R. y Riley Saldaña C. en su trabajo titulado “Biosíntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos”(5), donde señalan que el alcaloide sanguinarina presenta actividad farmacológica antimicrobiana. Y como es conocido, un microorganismo es capaz de representar cuatro categorías, siendo uno de ellos, los hongos.

Por otro lado, los fármacos antifúngicos también cuentan con una clasificación, sin embargo, en el presente trabajo se ha hecho uso del fluconazol, el cual se encuentra en la clasificación de los azoles/imidazoles, los cuales actúan sobre las formas del citocromo P450 características de los hongos que como consecuencia, inhiben las enzimas oxidativas asociadas al mencionado citocromo, como por ejemplo, la que ocasiona la 14-desmetilación del lanosterol para convertirlo en ergosterol, presentándose acumulación de esteroides 14 α -metilados en el interior de la célula. Asimismo, se logra apreciar una relación directa entre la actividad fungostática y la capacidad de inhibir la síntesis de ergosterol. Y, por consiguiente, esta inhibición conlleva a la alteración de la permeabilidad de la membrana de las células fúngicas, trayendo a su vez, la modificación del ambiente intracelular necesario para el desarrollo y la división celular. Entonces, Los imidazoles alteran los mecanismos enzimáticos intracelulares que intervienen en la síntesis y en la detoxificación del peróxido de hidrógeno (acción de peroxidasas y catalasas), produciendo una acumulación neta de peróxido de hidrógeno capaz de lesionar la estructura de las organelas intracelulares de los hongos. (15)

En lo que respecta al extracto etanólico de las semillas de la especie *Argemone mexicana* este presenta alcaloides, metabolito secundario, que, aunque no cuenta con una nomenclatura esquematizada, está dotado de una gran variedad de acciones fisiológicas debido, posiblemente a que estos alcaloides derivan principalmente de aminoácidos, conteniendo uno o más átomos de nitrógeno como parte de su estructura.(12) La especie vegetal en mención, presenta a su vez la capacidad de acumular un tipo de alcaloides (sanguinarina) en raíz y semillas y otro tipo de alcaloides (berberina) en el resto de la planta (6). Guardando relación con lo sostenido por Mancilla Condor Y. (10) y Jurado Anicama J. (11), quienes ejecutando el proceso del tamizaje fitoquímico, en sus respectivos trabajos de investigación, señalan la presencia de alcaloides en los tallos y hojas de la especie en mención.

V. CONCLUSIONES

1. Los metabolitos secundarios identificados en el extracto etanólico de las semillas de la especie *Argemone mexicana* fueron aminoácidos, flavonoides, triterpenoides y/o esteroides, alcaloides, leucoantocianidinas y/o catequinas.
2. La fracción alcaloidal del extracto etanólico de las semillas de la especie *Argemone mexicana* “Cardo santo” por el método de dilución en agar, a las concentraciones del 50% y 75% presentó un resultado equivalente al control positivo (fluconazol) frente a *Candida albicans*.
3. La fracción no alcaloidal del extracto etanólico de las semillas de la especie *Argemone mexicana* “Cardo santo” por el método de dilución en agar, solo a la concentración del 75% presentó un resultado equivalente al control positivo (fluconazol) frente a *Candida albicans*.
4. La fracción alcaloidal del extracto etanólico de las semillas de la especie *Argemone mexicana* “Cardo santo” por el método de dilución en agar, a las concentraciones del 50% y 75% presentó un resultado equivalente al control positivo (fluconazol) frente a *Cryptococcus spp.*
5. La fracción no alcaloidal del extracto etanólico de las semillas de la especie *Argemone mexicana* “Cardo santo” por el método de dilución en agar, solo a la concentración del 75% presentó un resultado equivalente al control positivo (fluconazol) frente a *Cryptococcus spp.*

VI. RECOMENDACIONES

1. Continuar la evaluación de la actividad antifúngica de la especie *Argemone mexicana* “Cardo santo”, mediante otro método a fin de tener una mejor comprensión del mecanismo del efecto antifúngico de la especie.
2. Determinar las estructuras de los alcaloides responsables de la actividad antifúngica.
3. Evaluar el nivel de toxicidad de las semillas de la especie *Argemone mexicana* “Cardo santo”.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. JRI. De la Alquimia a la Química [Internet]. Unav.edu. [citado el 23 de agosto de 2024]. Disponible en: https://www.unav.edu/documents/1807770/30881957/ExposicionPresencial2012_AlquimiaQuimicaGuia.pdf/a255cff8-b31b-daa8-1a54-362a932bdb32?t=1616602851975
2. WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action [Internet]. Who.int. World Health Organization; 2022 [citado el 23 de agosto de 2024]. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240060241>
3. Who.int. [citado el 23 de agosto de 2024]. Disponible en: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/363682/9789240060241-eng.pdf?sequence=1>
4. Panizo MM, Reviákina V. Candida albicans y su efecto patógeno sobre las mucosas. Bol Soc Venez Microbiol [Internet]. 2001 [citado el 23 de agosto de 2024];21(2):38–45. Disponible en: https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562001000200011
5. Chacón ID-L-C, González-Esquinca AR, Riley-Saldaña CA. Biosíntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos [Internet]. Org.co. [citado el 23 de agosto de 2024]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/unsc/v17n2/v17n2a06.pdf>
6. Hidalgo JIL. Análisis de la síntesis de alcaloides en fruto y semilla de *argemone* mexicana L [Internet]. [Mérida, Yucatán, México]: Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.; 2019. Disponible en: https://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1003/1507/1/PCB_M_Tesis_2019_Jos_e_Ignacio_Laines_Hidalgo.pdf
7. Curay Yaulema CS, Moncayo Molina WE, Tierra Vilema WP, Pulgar Astudillo LJ, D'Armas R H. Composición química y actividad antifúngica del látex de *Argemone mexicana* (Cardo Santo). facsalud [Internet]. 26 de julio de 2023 [citado 15 de agosto de 2023];7(12):19-6. Disponible en: <https://ojs.unemi.edu.ec/index.php/facsalud-unemi/article/view/1824>
8. Roy GBDG, editor. *Argemone mexicana*: chemical and pharmacological aspects [Internet]. Vol. 23. Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy; 2013. Disponible en: <file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/argemone,%20aspectos%20farmacologicos.pdf>
9. Ruiz Barrueto MA. Caracterización fitoquímica y efecto antibacteriano in vitro de *Argemone mexicana* L. contra bacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido [Internet].

- [Trujillo, Perú]: Universidad Nacional de Trujillo; 2019. Disponible en: <http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/15309/Ruiz%20Barrueto%2c%20Miguel%20Angel.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
10. Condor YCM. Actividad antioxidante del extracto etanólico de la especie *Argemone mexicana* “cardo santo”. [Ica, Perú]: San Luis Gonzaga; 2023.
 11. Jesús JAY. Evaluación de la actividad antiinflamatoria, analgésica y toxicidad aguda del extracto etanólico de la especie *Argemone Mexicana* L. “Cardo Santo”. [Ica, Perú]: San Luis Gonzaga ; 2024.
 12. Lock de Ugaz O. "Investigación Fitoquímica, Métodos en el estudio de productos Naturales". Segunda ed. Lima: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú; 1994.
 13. Tapia y Néstor Correa C, editor. Género *Cryptococcus* [Internet]. Vol. 31. Rev Chilena Infectol; 2014. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v31n6/art12.pdf>
 14. Huamaní M. Ruiz J. Determinación de la actividad antifúngica contra *Candida Albicans* y *Aspergillus Niger* de 10 plantas medicinales de 3 departamentos del Perú [Internet]. [Lima, Perú]: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2005. Disponible en: [file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/determinacion-de-la-actividad-antifungica-contra-candida-albica_X89AK3e%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/determinacion-de-la-actividad-antifungica-contra-candida-albica_X89AK3e%20(1).pdf)
 15. Florez J. farmacología humana. Travessera de Gràcia, 17-21. 08021 Barcelona, España: G ea Consultoría Editorial, s.l.; 2014.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1

Clasificación taxonómica

CERTIFICACIÓN BOTÁNICA

"AÑO DE LA UNIDAD, LA PAZ Y EL DESARROLLO"

El Blgo. Que suscribe determina que, la muestra biológica presentada por el bachiller en Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional "San Luis Gonzaga". **ANALI ESTEFANY PEÑA DIAZ con DNI N° 75950813** para su determinación la misma que, pertenece al nombre científico de, *Argemone mexicana L.* "cardosanto", según Sistema de Clasificación de Arthur Cronquist, (1988).

REINO: PLANTAE

DIVISIÓN: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

ORDEN: PAPAVERALES

FAMILIA. PAPAVERACEAE

GÉNERO: *Argemone*

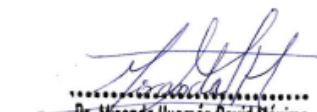

ESPECIE: *Argemone mexicana L.*

N.V. "cardosanto"

Se emite la presente certificación a solicitud del interesado, para fines de estudios



Ica, 28 de noviembre del 2023.




.....
Dr. Miranda Huamán David Máximo
 BIÓLOGO
CBP. 3681

ANEXO 2

PERMISO DE LABORATORIO

 UNIVERSIDAD NACIONAL SAN LUIS GONZAGA
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA 

CONSTANCIA

LA DIRECTORA ACADÉMICA DE LA FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL SAN LUIS GONZAGA.

HACE CONSTAR QUE LA ESTUDIANTE:

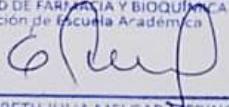
PEÑA DIAZ, ANALI ESTEFANY
Código N° 20160394

Se le autoriza el uso de las instalaciones del laboratorio de **Química Farmacéutica**, para el desarrollo de su proyecto de tesis, el cual lleva como título **Evaluación de la actividad antifúngica in vitro de la fracción alcaloidal del extracto etanólico de las semillas de la especie *Argemone mexicana***. y que aprobado el proyecto deberá presentar un documento con su asesor, indicando los días y horas que hará uso del laboratorio.

Se expide la presente constancia para los fines pertinentes.

Ica, 06 de setiembre 2023

UNIVERSIDAD NACIONAL "SAN LUIS GONZAGA"
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA
Dirección de Escuela Académica


Dra. ELIZABETH JULIA MELGAR MERINO
DIRECTORA (e).



Lima, 4 de septiembre del 2023

Sra:

Lic. Mariela Porta Atencio

DIRECTORA DEL HOSPITAL PROVINCIAL DE ACOBAMBA- HUANCVELICA

Presente.

Ref: SOLICITUD DE USO DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DEL HOSPITAL PROVINCIAL DE ACOBAMBA- HUANCVELICA

Mediante el presente, yo PEÑA DÍAZ ANALÍ ESTEFANY, DNI 75950813, egresada de la universidad SAN LUIS GONZAGA- ICA tengo el agrado de dirigirme a su distinguida persona deseándole éxito en las funciones que desempeña en beneficio de la población.

El motivo de la presente es para solicitarle muy respetuosamente a su distinguida autoridad el uso del LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA para el desarrollo de mi tesis, prácticas que se realizarán desde el 01 de noviembre hasta el 30 de noviembre del año 2023 haciendo uso de los siguientes equipos:

Materiales	Cantidades	Unidad	Observación
Autoclave	1	U	-
Incubadora	1	U	-

Teniendo en cuenta de que los materiales y/o insumos utilizados serán autofinanciados por mi persona y dados como donativos al hospital en mención.

Me despido de su digna persona esperando su gentil aceptación.

Atentamente



(Firma del solicitante)

DNI N° 75950813

Correo electrónico: analipeña497@gmail.com

Celular: 927001564

ANEXO 3

CONSTANCIA DE ASESORAMIENTO

CONSTANCIA DE ASESORAMIENTO

Yo, **Chávez Orellana Santos Haydee**, identificada con DNI 2144923, docente principal a dedicación exclusiva de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional “San Luis Gonzaga”, adscrita al Departamento de Química Farmacéutica; como asesora, dejo constancia que la Bachiller Srta. **PEÑA DÍAZ, ANALÍ ESTEFANY**, ha concluido con el desarrollo de su proyecto de tesis titulado: “**Evaluación de la actividad antifúngica in vitro de la fracción alcaloidal y no alcaloidal del extracto etanólico de las semillas de la especie *Argemone mexicana*”**”, quedando apto para presentarlo a la Unidad de Investigación de la facultad y continuar con su trámite de aprobación de proyecto.

Ica, 12 de octubre del 2023



Dra. Santos Haydee Chávez Orellana
Prof. Principal C.F.
DNI N° 21449243
ASESOR (A)

CONSTANCIA DE ASESORAMIENTO

Yo, **Díaz de la Cruz Aydee**, identificada con DNI 41188154, microbióloga del Centro de salud de Acobamba- Huancavelica; como asesora, dejo constancia que la Bachiller Srta. **PEÑA DÍAZ, ANALÍ ESTEFANY**, ha concluido con el desarrollo de su proyecto de tesis titulado: **“Evaluación de la actividad antifúngica in vitro de la fracción alcaloidal y no alcaloidal del extracto etanólico de semillas de la especie *Argemone mexicana*”**, quedando apto para presentarlo a la Unidad de Investigación de la facultad y continuar con su trámite de aprobación de proyecto.

Ica, 12 de octubre del 2023



Blga. Aydee Díaz de la Cruz
DNI N° 21449243
ASESOR (A)



Figura 7: Hábitat de la especie *Argemone mexicana*



Figura 8: Secado de las semillas de la especie *Argemone mexicana*



Figura 9: Reflujo de semillas de la especie *Argemone mexicana*

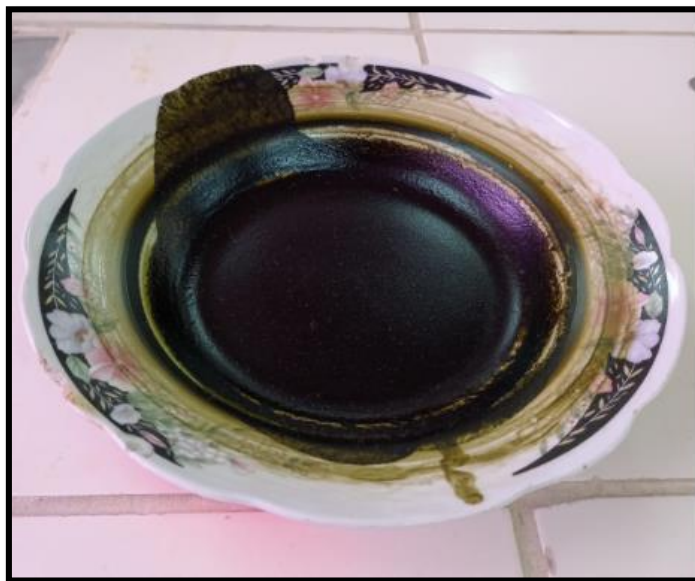


Figura 10: Producto del reflujo de las semillas de la especie *Argemone mexicana* seco

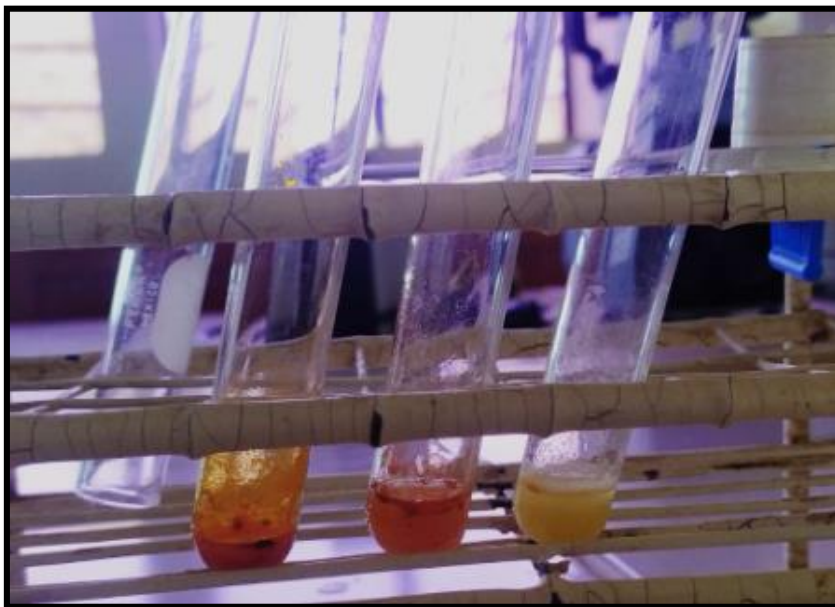


Figura 11: Identificación de alcaloides en la fracción alcaloidal del extracto etanólico de las semillas de la especie *Argemone mexicana*



Figura 12: Cultivo de hongos en placas petri



Figura 13: Extracto de las semillas de la especie *Argemone mexicana* en distintas concentraciones

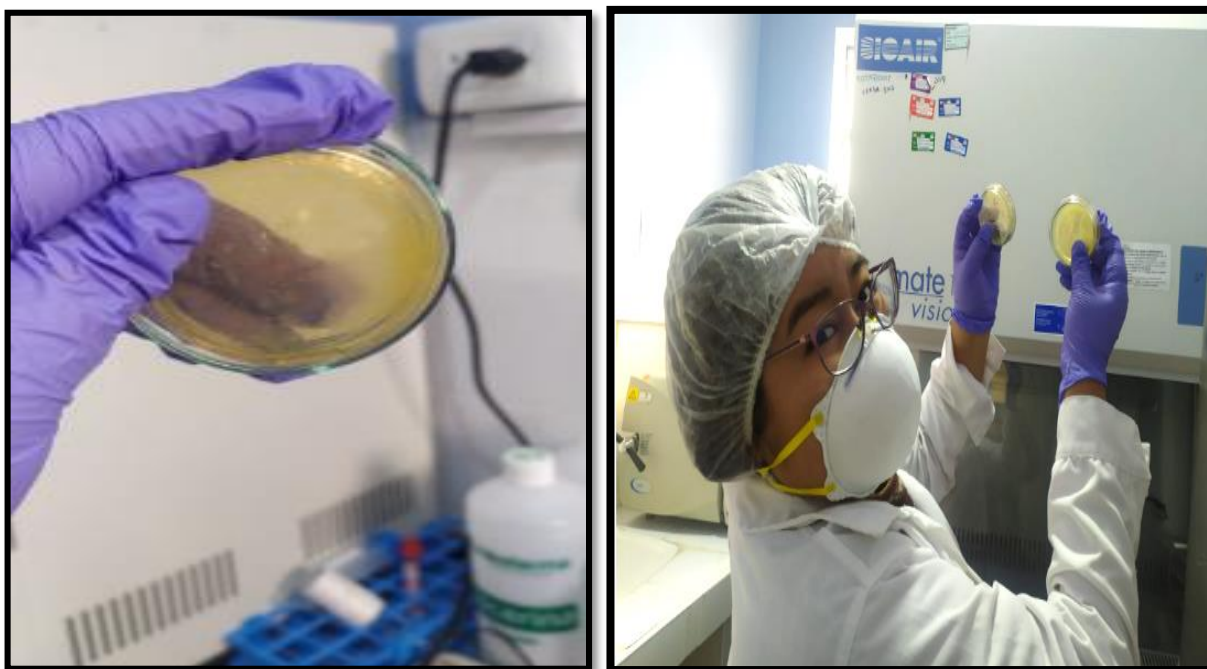


Figura 14: Ausencia de hongos en placa petri