



Universidad Nacional
SAN LUIS GONZAGA



[Reconocimiento-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/)

Esta licencia permite a otras combinar, retocar, y crear a partir de su obra, incluso con fines comerciales, siempre y cuando den crédito y licencia a las nuevas creaciones bajo los mismos términos. Esta licencia suele ser comparada con las licencias copyleft de software libre y de código abierto. Todas las nuevas obras basadas en la suya portarán la misma licencia, así que cualesquiera obras derivadas permitirán también uso comercial.

<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>

UNIVERSIDAD NACIONAL

“SAN LUIS GONZAGA”

Facultad de Farmacia y Bioquímica



Tesis para optar el Título profesional de Químico Farmacéutico

Evaluación de la actividad antifúngica de las saponinas obtenidas de
Cucumis dipsaceus "jaboncillo de campo" en *Aspergillus niger*

Autor:

Bach. Renzo Paul Tataje Quesada

Ica-Perú

2019

Dedicatoria

A mi madre Ysabel Quesada y a la memoria de mi abuela Carmen García, quienes fueron la fuente principal de enseñanzas y motivación para convertirme en un profesional

Agradecimientos

-A mis asesores Msc. Juan Angel Palomino Jhong y Msc. Alejandro Ovidio Maravi Villantoy por brindarme su confianza y tiempo, pero sobretodo sus conocimientos teóricos y prácticos, en sus respectivas áreas profesionales obtenidas a lo largo de su trayectoria como docente e investigadores; haciendo posible el desarrollo de este trabajo de investigación con la calidad que los caracteriza.

-A las enfermeras del Hospital Felix Torrealva Gutierrez, del servicio de “Crecimiento y Desarrollo” por su amistad y buen trato en el área de trabajo, y ayudarme con la financiación de mi proyecto de investigación.

Índice

Resumen	6
Abstract.....	8
Introducción	10
1.-Capítulo I “Planteamiento del problema”	
1.1.-Descripción de la problemática.....	12
1.2.-Formulación del problema	13
1.3.-Justificación e importancia	14
1.4.-Objetivos de la investigación	14
1.5.-Hipótesis y variables.....	15
2.-Capítulo II “Bases teóricas”	
2.1.-Antecedentes de la investigación	17
2.2.-Marco teórico	24
2.2.1.-Los hongos	24
2.2.1.1.-Estructura básica de un hongo.....	25
2.2.1.2.-Ciclo de vida y reproducción	26
2.2.2.- <i>Aspergillus niger</i>	28
2.2.2.1.-Taxonomía	29
2.2.2.2.-Morfología	29
2.2.2.3.-Usos.....	30
2.2.2.4.-Patología	30
2.2.2.5.-Diagnóstico	31
2.2.2.6.-Tratamiento	32
2.2.3.-Plantas medicinales	32
2.2.4.- <i>Cucumis dipsaceus</i>	33
2.2.4.1.-Descripción	33
2.2.4.2.-Distribución:	34
2.2.4.3.-Tipo de suelo y medio de desarrollo.....	34
2.2.4.4.-Nombres Comunes	34
2.2.4.5.-Usos	34
2.2.4.6.-Taxonomía	35
2.2.4.7.-Propiedades medicinales	35

2.2.4.8.-Marcha fitoquímica	35
2.2.5.-Las saponinas	36
2.2.5.1.-Estructura química y clasificación	36
2.2.5.2.-Propiedades fisicoquímicas.....	37
2.2.5.3.-Propiedades biológicas	38
2.3.-Marco conceptual	39
Capitulo III. "Metodología"	
3.1.-Extracción de saponinas.....	41
3.2.-Identificación de las saponinas en el extracto butanólico	43
3.2.1.-Prueba Lieberman – Burchard.....	44
3.2.2.-Prueba de Salkowski	44
3.2.3.-Prueba de la formación de espuma	44
3.3.-Aislamiento del hongo <i>Aspergillus niger</i> y evaluación antifúngica	44
3.3.1.-Preparación del medio de cultivo	45
3.3.2.-Sembrado	45
3.3.3.-Identificación en microcultivo.....	46
3.3.4.-Evaluación antifúngica.....	47
Capitulo IV	
4.1.-Resultados.....	49
4.1.1.-Porcentaje de humedad	49
4.1.2.-Porcentaje de extracción	50
4.1.3.-Identificación de saponinas	51
4.1.4.-Identificación de especie de <i>Aspergillus niger</i>	52
4.1.5.-Evaluación Antifúngica	53
4.2.-Discusión	54
Conclusiones	56
Recomendaciones	57
Fuentes de Información	58
ANEXO	64

Resumen

Las saponinas son metabolitos secundarios, que se encuentran en diversas especies de plantas, las cuales pueden ser clasificadas de acuerdo a la estructura esteroidal o triterpénica que estas posean. A lo largo de la historia, varios estudios han demostrado que están estrechamente relacionadas con los mecanismos de defensa de las especies vegetales y que son agentes bioactivos bastante promisorios para futuras investigaciones.

El fruto de la especie *Cucumis dipsaceus* “cojón del diablo” ha sido objeto de este estudio, llegándose a demostrar la presencia de saponinas en su composición fitoquímica. Estos frutos fueron sometidos a tratamiento con solventes orgánicos con la finalidad de extraer en su totalidad el contenido de saponinas, realizándose una primera extracción etanólica y posteriormente una purificación butanólica/acuosa.

Este extracto butanólico se le aplicó 3 ensayos de identificación para determinar la presencia de saponinas, dando como resultado en los 3 ensayos: “Positivo” para saponinas esteroidales.

Con la identificación de las saponinas en el extracto, este fue sometido a una evaluación anti fúngica frente a *Aspergillus niger* con el método de difusión en pozos a diferentes concentraciones de 10%, 25%, 50% y 75% en relación P/V del extracto butanólico en DMSO además de sus controles positivo y negativo, respectivamente.

Se obtuvieron resultados de inhibición completa en el control positivo (Fluconazol 1mg/mL) y crecimiento del *A. niger* en el control negativo y las diferentes muestras a distintas concentraciones, sin formación de halos de inhibición; sin embargo, se observa que el extracto NO inhibió el crecimiento micelial, pero SI inhibió la esporulación del hongo en estudio. Llegando a la conclusión de que las saponinas obtenidas del extracto butanólico del fruto *Cucumis dipsaceus* si presenta una ligera actividad biológica frente *Aspergillus niger*.

Palabras claves: *Cucumis dipsaceus*, Saponinas, *Aspergillus niger*, Evaluación antifúngica.

Abstract

Saponins are secondary metabolites, found in various plant species, which can be classified according to the steroidal or triterpenic structure they possess. Throughout history, several studies have shown that they are closely related to the defense mechanisms of plant species and that they are quite promising bioactive agents for future research.

The fruit of the species *Cucumis dipsaceus* "cojón del diablo" has been the subject of this study, and the presence of saponins in its phytochemical composition has been demonstrated. These fruits were sometimes treated with organic solvents in order to fully extract the saponin content, performing a first ethanolic extraction and subsequently a butanolic / aqueous purification.

This butanolic extract was applied 3 identification tests to determine the presence of saponins, resulting in the 3 tests: "Positive" for steroidal saponins.

With the identification of the saponins in the extract, this was sometimes an anti-fungal evaluation against *Aspergillus niger* with the diffusion method in wells at different variations of 10%, 25%, 50% and 75% in relation P / V of the butanolic extract in DMSO in addition to its positive and negative controls, respectively.

Results of complete inhibition were obtained in the positive control (Fluconazole 1mg / mL) and growth of *A. niger* in the negative control and the different samples at different concentrations, without formation of

inhibition halos; however, it is observed that the extract did NOT inhibit mycelial growth, but it did inhibit sporulation of the fungus under study. Coming to the conclusion that the saponins obtained from the butanolic extract of the *Cucumis dipsaceus* fruit do have a slight biological activity against *Aspergillus niger*.

Keywords: *Cucumis dipsaceus*, Saponinas, *Aspergillus niger*, Evaluación antifúngica.

Introducción

Por mucho tiempo, el hombre, ha buscado la manera de evitar la descomposición de los alimentos obtenidos por la agricultura, es así que este ha llegado a controlar los factores que aceleran este proceso de descomposición (humedad, temperatura, radiación UV, calor, etc); lográndose como resultado, solo el retraso de la descomposición y manteniendo la calidad de sus productos por más tiempo y aprovechar en gran parte sus nutrientes.

Sin embargo, existen enfermedades infecciosas que han afectado la productividad y el desarrollo de estos recursos, conllevando a grandes pérdidas de estas materias primordiales para el hombre; además, de ser una pérdida económica bastante sustancial para un país en crecimiento ⁽¹⁾, muchas de estas enfermedades son causadas por hongos que llegan a parasitar a los vegetales. Son un problema latente, pues son capaces de invadir tejido vegetal y logran expandir su zona de crecimiento debido a su fácil reproducción, complicando la retención de la enfermedad en plantas que no hayan sido afectadas.

Por otra parte, estas mismas infecciones fúngicas que son descomponedoras, también involucra parte de la salud pública, debido a que varios de estos microorganismos pueden infectar a otros seres vivos y llegar hasta al humano quien desarrolla cuadros clínicos invasivos e infecciones externas.

Aspergillus spp es un género de hongos que posee una gran variedad de especies y son uno, de los agentes fitopatógenos más comunes que se encuentra ampliamente distribuido en nuestro ecosistema. Debido a su variedad y distribución no solo llega a afectar a cultivos vegetales, sino que existen especies oportunistas como *A.niger* que llegan a infectar animales e incluso al mismo hombre provocando enfermedades como la aspergilosis; pero también puede infectar plantas o frutos de esta; en la postcosecha, causando pérdidas de dinero en concepto de recursos y antifúngicos sintéticos, en la industria alimentaria. ^(2,3)

Es por esta razón, que se realizó esta investigación con el objetivo de obtener resultados de un agente antifúngico de origen natural a partir del ***Cucumis dipsaceus*** que sea útil en la problemática de la industria alimentaria y salud pública.

Capítulo I

Planteamiento del problema

1.1.-Descripción de la realidad problemática:

En nuestro hábitat, existen muchos microorganismos, que necesitan vivir de otro organismo (Huésped) más grande y con un sistema de metabolismo bastante complejo para poder sobrevivir a las diferentes condiciones de su entorno; algunos son favorables (mutualismo y comensalismo) y otros son oportunistas y dañinos (parasitismo) ⁽⁴⁾.

Los hongos fitopatógenos se incluyen en este último grupo de parásitos, pues muchos de estos llegan a infectar a las frutas y verduras, llegando a dañar al huésped y terminar matándolo. Además, su fácil reproducción y propagación hace difícil controlar la enfermedad, perdiendo estos recursos postcosecha en la industria alimentaria e incluso las plantas de dichos frutos.

Aspergillus niger es uno de los microorganismos causales de dichos males en la industria alimentaria, pues este hongo provoca daños a diferentes especies vegetales como tomate, fresas, lechuga, arándanos, etc. Además, este hongo es también un agente patógeno colonizante en humanos, causante de la otomicosis en pacientes inmunológicamente variable como en la Diabetes mellitus, VIH, hipogammaglobulinemia o tratados con corticoides.⁽⁵⁾ Utilizándose para estos casos antifúngicos capaces de contrarrestar la

enfermedad, sin embargo, con el uso prolongado de estos fármacos se ha llegado a notificar cepas resistentes de *Aspergillus niger* frente a la Anfotericina B e Itraconazol en países como Cuba⁽⁶⁾ e incluso países como Holanda y Portugal se ha alertado de la relación de resistencia de fármacos de uso hospitalario con azoles de uso agrícola^(7,8); conllevando a otro problema, “La resistencia a los fármacos”, siendo una realidad actual en todo el mundo⁽⁹⁾.

1.2.-Formulación del problema:

a) Problema general:

- ¿Tiene actividad antifúngica las saponinas obtenidas del fruto de la especie ***Cucumis dipsaceus*** sobre ***Aspergillus niger***?

b) Problemas específicos:

- ¿Cuál es el contenido de agua en el fruto de la especie ***Cucumis dipsaceus***?

- ¿Cuánto es el rendimiento de extracción de las saponinas de la especie ***Cucumis dipsaceus***?

- ¿Qué tipos de saponinas presenta la especie ***Cucumis dipsaceus***?

- ¿Cuál es la concentración mínima inhibitoria (CMI) de las saponinas para obtener un resultado antimicótico frente ***A. niger***?

1.3.- Justificación e importancia

El estudio de saponinas, en la actualidad, es muy escasa, además de un campo poco explorado en nuestro país, aunque en el pasado existan evidencias de la actividad antifúngica de las saponinas obtenidas de diferentes especies.

Es por eso que, a partir de estos conocimientos básicos e información de actividad biológica, se pretende evaluar la actividad antifúngica de las saponinas extraídas del ***Cucumis dipsaceus*** frente al hongo fitopatógeno ***Aspergillus niger***.

La necesidad de encontrar diferentes alternativas terapéuticas que puedan controlar la enfermedad y reducir el crecimiento de este patógeno, da la pauta para ser oportuno este trabajo de investigación con respecto a su actividad antifúngica del “cojón del diablo” (***Cucumis dipsaceus***).

Dejando evidencia importante, para posteriores estudios; con la finalidad de encontrar un posible resultado favorable.

1.4.- Objetivos de la investigación

a) Objetivo general. -

- Determinar la actividad antifúngica de las saponinas obtenidas del fruto ***Cucumis dipsaceus*** frente ***Aspergillus niger***.

b) Objetivos específicos. -

-Determinar el contenido de agua del fruto de ***Cucumis dipsaceus***.

-Hallar el rendimiento de extracción de las saponinas de la especie ***Cucumis dipsaceus***.

-Determinar el tipo de saponina presente en el fruto ***Cucumis dipsaceus***

-Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de las saponinas del ***Cucumis dipsaceus*** frente ***Aspergillus niger***.

1.5.- Hipótesis y variables

a) Hipótesis general

Las saponinas obtenidas del fruto ***Cucumis dipsaceus*** presenta actividad antifúngica frente el ***Aspergillus niger***.

b) Hipótesis específicas

- El contenido de agua supera el 50% del peso neto del fruto

- El rendimiento de la extracción es aproximadamente del 5% del peso neto de la muestra utilizada.

- El fruto de la especie *Cucumis dipsaceus* presenta saponinas triterpenoidales.

- La concentración mínima inhibitoria (CMI) de las saponinas obtenidas del fruto *Cucumis dipsaceus* frente a *Aspergillus niger* es de 25%

b) Variables y operacionalización

Variables		Indicador	Índice
Independientes	Saponinas	Unidades % P/V	Concentración Porcentual
Dependientes	Actividad antifúngica	Halos de inhibición	Diámetro en cm

Tabla 1.-Operacionalización de las variables

Capítulo II

BASES TEORICAS

2.1.-Antecedentes de la Investigación

Los compuestos fitoquímicos han servido esencialmente para ser el pilar de nuevas generaciones de fármacos y para la elaboración de nuevas e importantes compuestos sintéticos, las cuales hoy en día se usan en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética.

Verastegui M. (Mexico,1995). Evaluó la actividad antifúngica de 20 extractos vegetales sobre hongos filamentosos, levaduriformes y actinomicetos. Hallándose que la planta rica en contenidos de saponinas como el **Agave lechuguilla**, posee una mayor actividad antifúngica sobre la gran mayoría de cepas en estudio con concentraciones de 3.3mg/mL a 12mg/mL. ⁽¹⁰⁾

Gomez J., *et al.* (Mexico,2001). Estudiaron la planta **Dioscorea composita** por su contenido rico en saponinas, con la finalidad de poder encontrar un principio activo capaz de contrarrestar estos agentes infecciosos: **Trichoderma sp**, **F. moniliforme**, **Fusarium sp** y **Mucor sp**. Pusieron a prueba dos fracciones metanólicas obtenidas por cromatografía de columna, en donde resaltaba la presencia de saponinas espirostanólicas (dioscina) y saponinas furostanólicas, respectivamente. Hallándose que ambas fracciones poseen actividad antifúngica y el microorganismo más sensible es **F.moniliforme**, sin

embargo, resaltaba la Dioscina (Fracción 1) que era la más activa como agente antifúngico con una concentración de 200 ug/mL.⁽¹¹⁾

De Lucca A., *et. al.* (USA,2002). Determinó la eficacia antifúngica del CAY1, una saponina extraída de la planta ***Capsicum frutescens***; frente a cepas de ***Candida albicans***, ***Pneumocystis carinii*** y también frente a las especies del genero *Aspergillus*: ***A.flavus***, ***A.fumigatus***, ***A. parasiticus*** y ***A.niger***. Obteniendo resultados para ***A.flavus*** una DL₉₅ de 12.5 uM; para el ***A.fumigatus*** se halló una DL₉₅ de 4 uM siendo la especie más sensible del género ***Aspergillus***; ***A.niger*** y ***A.parasiticus*** obtuvieron la misma DL₉₅ de 15uM. Además mostró para la especie ***C. Albicans*** una CI₅₀ y CI₉₅ de 3.1uM y 6.2uM, respectivamente, y para la especie ***P.Carinii*** una CI₅₀ de 9.5uM.⁽¹²⁾

Zamilpa A., *et al.* (Mexico,2002). Aislaron 5 saponinas (Sc-2, Sc-3, Sc4, Sc-5, Sc-6) a partir de un extracto ***Solanum chrysotrichum*** (SOSA) y midieron su actividad antifúngica sobre ***Trichophyton mentagrophytes*** (ATCC 28185), ***Trichophyton rubrum*** (ATCC 28188), ***Aspergillus niger*** (ATCC 10335) y ***Candida albicans*** (ATCC 10231). Llegando a la conclusión que todos estos compuestos poseen actividad antifúngica; sin embargo, no todas demostraron una alta sensibilidad sobre las cepas en estudio, a excepción de Sc-2, Sc-3, Sc-6 que mostraron actividad frente a todas las cepas; resaltando la saponina Sc-2 con la mayor actividad frente a todos estos

microorganismos, con una CMI de 12.5 ug/mL en cada uno de los ensayos. ⁽¹³⁾

Apablaza G., Diaz M., San Martin R. y Moya E. (Chile,2002) Evaluaron la actividad antifúngica del **Quillaja saponaria** in situ, en parcelas de **Cucumis sativus** y **Cucurbita máxima duch** infectadas con el hongo **Sphaeroteca fuliginea** causante del oídio de cucurbitáceas. La presencia de saponinas en esta especie se la ha relacionado con el efecto favorable de controlar la enfermedad que varía desde 27.8% hasta un máximo 51.8%, a diferencia de los compuestos que se utilizan para tratar esta enfermedad como el Myclobutanil y azufre que obtuvieron resultados de 90% y 59.6%-78%, respectivamente. ⁽¹⁴⁾

Macarena S. y San Martín R. (Chile,2007). Evaluó la actividad antifúngica del extracto de saponinas de la quinoa (**Chenopodium Quinoa WILLD**) contra el hongo **Botrytis cinérea**; haciendo una comparación entre: 1) Extracto no purificado de quinoa 2) Extracto purificado de quinoa 3) Extracto no purificado de quinoa con tratamiento alcalino 4) Extracto purificado con tratamiento alcalino 5) Extracto no purificado de saponinas con tratamiento alcalino sin incubación térmica 6) Extracto purificado de saponinas con tratamiento alcalino sin incubación térmica. Concluyendo que el extracto no purificado de saponinas tratado con un álcali (3) demostró ser 10 veces más activo que el extracto no purificado (1) a la misma concentración de 7mg/mL. Además se halló que a las mismas concentraciones del extracto purificado tratado con un álcali (4) posee

15 veces más actividad antifúngica que el extracto purificado sin tratamiento alcalino (2).⁽¹⁵⁾

Tsuzuki J., et al (Brasil,2007), Investigaron la actividad antifúngica del fruto de ***Sapindus saponaria L.*** frente a las cepas del género ***Candida spp*** que se encuentran en la flora normal de la vagina. Extrajeron los principios activos con distintos solventes hasta la obtención de un crudo butanólico, el cual fue sometido a cromatografía en columna por fraccionamiento. Estas fracciones fueron sometidas a evaluación antifúngica, resaltando la actividad antifúngica de la fracción “F” frente a las cepas en estudio. Posteriormente a esta fracción se le sometió por segunda vez a cromatografía por fraccionamiento y se llegó a identificar dos saponinas que poseía actividad antifúngica frente a la cepa ***Candida parapsilosis.***⁽¹⁶⁾

Paredes H. y Solar M. (Peru,2007). Realizaron un estudio de la especie *Cucumis dipsaceus* para determinar la presencia de saponinas por métodos cromatográficas (HPLC), llegando a la conclusión que el fruto de esta especie contiene una concentración del 67% en saponinas, además que no poseen azúcares como glucosa y fructosa que estén unidas a la sapogenina del saponósido.⁽¹⁷⁾

Regina S., et al (Brasil,2008) realizaron en este ensayo, una elucidación de la estructura química de la saponinas y derivados

triterpénicos obtenidas por fraccionamiento de cromatografía en columna, a partir del extracto etanólico de *Swartzia langsdorffii* y evaluaron su actividad antifúngica frente a *Cladosporium cladosporioides*, *C. sphaerospermum*, *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *Cryptococcus neoformans*. Se identificaron 4 compuestos: 1) ácido-3-O-β-glucopiranosil-(1→2)-β-D-glucopiranosil-oleanólico 2) ácido-3-soforosil-oleanólico 3) ácido oleanólico y 4) Lupeol. Los resultados determinaron que las saponinas 1 y 2 presentaban actividad antifúngica moderada, mientras que el derivado triterpénico 3 poseía una baja actividad y 4 no presentaba actividad frente a los hongos patógenos humanos en estudio. Sin embargo, frente a las cepas fitopatógenas, los compuestos 1,2,3 mostraron actividad moderada a diferencia del lupeol que se mantuvo inactiva. (18)

Santafe G. (2014) detalla en su artículo que un compuesto saponosido aislado, proveniente del pepino de mar (*Holothuria floridana*) el holosta 22,25-epoxi-7,9-dien-17-3β-diol presenta una actividad inhibitoria de crecimiento del 93.98% frente a la cepa *S. sclerotium*, en comparación del control positivo "Colizym" que demostró una inhibición del 99%, haciéndolo un principio activo bastante interesante para futuras investigaciones. (19)

R. Apaza, et al. (Bolivia,2016). Evaluaron la actividad antifúngica del *Chenopodium quinoa Willd* contra *Cercospora beticola Sacc.*

principal infectante de la acelga, mediante dos métodos in situ e In vitro. Obteniéndose resultados favorables del control de la enfermedad a una concentración de 5 mg/mL⁽²⁰⁾

Barrón R.(Mexico,2016) Evaluó la actividad antifúngica de una especie conocida por su alto contenido en saponinas, **Agave Lechuguilla**, frente a varias cepas en estudio, sin embargo, la más resaltante fue la actividad frente al **F. oxysporum** que demostró una inhibición del 48.7 % de inhibición de crecimiento del hongo por el método de difusión en pozo⁽²¹⁾

Ahumada A., et. Al. (Colombia,2016) en su artículo de saponinas de la quinua, refieren que el extracto metanólico derivado de la quinua, poseen compuestos familiarizados a la hederagenina, ácido oleanólico y fitocalgénico; que poseen actividad antifúngica frente al **Candida albicans** a concentraciones de 50ug/mL.⁽²²⁾

Ulloa H., (Ecuador,2018) evaluó la actividad fungicida del extracto etanólico de **Agave americano** frente al hongo **Fusarium sp** obtenido con dos métodos de extracción diferentes: 1) Percolación y 2) Microondas. Obteniendo resultados favorables para las muestras obtenidas por percolación con halos de inhibición de 1.25% y 25% para las muestras obtenidas por microondas.⁽²³⁾

Maccartney N., et al (Chile,2019). Aislaron 8 cepas fitopatógenas y pusieron a prueba el extracto de saponinas obtenidas del

Chenopodium quinoa, obteniéndose una inhibición del crecimiento de algunos hongos como ***B. cinérea***, ***A. arborescens*** y ***Phytophthora cinnamomi*** en aproximadamente un 50%. A diferencia de los otros cinco microorganismos restantes que mostraron una baja actividad anti fúngica. ⁽²⁴⁾

2.2.-Marco Teórico

2.2.1.-Los hongos

Estos microorganismos son seres vivos que poseen un tamaño pequeño que no se logra observar a simple vista y que viven en diferentes circunstancias ambientales. Forman parte del equilibrio que hay entre los seres vivos y compuestos químicos en todo el planeta, siendo uno de los eslabones de la cadena alimenticia. Varias de estas especies que viven en el suelo, agua, aire, entre otros; degradan y descomponen residuos como por ejemplo la materia vegetal, por medio de enzimas extracelulares e incorporan al ecosistema nuevos compuestos para el uso de otras especies, manteniendo en funcionamiento el ciclo de la vida. ⁽²⁵⁾

El ser humano, ha visto en ellos, habilidades que caracterizan a diferentes especies de hongos y que ha aprovechado en utilizarlas para sus propios beneficios, es así que ha llegado a incluirlos en la industria alimentaria, farmacéutica, química, entre otras. Sin embargo, existen pocas especies que son patógenas que llegan a producir enfermedades en otros seres vivos, causando enfermedades que incluso llegarían a producir la muerte, además de pérdidas de recursos agrícolas, productos alimenticios y costos de tratamientos para estas especies. ⁽²⁵⁾

2.2.1.1.-Estructura básica de un hongo

La estructura vegetativa (soma) de un hongo depende del tipo de especie y se le define como el conjunto de células que se encarga del catabolismo y crecimiento de la especie.

a) Tipo hongos filamentosos (Mohos): Estas se encuentran formadas por las unidades básicas del hongo, llamadas hifas, las cuales pueden ser en forma de tabiques (septos) que la dividen en forma de una célula nucleada. Cuando existe un ambiente bastante favorable para su desarrollo, las hifas llegan a formar un micelio el cual se puede observar a simple vista ⁽²⁵⁾.

b) Tipo Levaduras: Son hongos unicelulares no filamentosos que poseen una forma ovalada o circular, y cuando se reproducen la pueden hacer por brotación o fisión. En las levaduras que se reproducen por brotación, a este se le desarrolla una protuberancia alrededor de su estructura, que luego se alarga y con ello también el núcleo hasta su división, migrando hacia el brote hasta que la protuberancia se separa para formar otra célula. Existen algunas especies que producen el brote; sin embargo, esta no se llega a separar para formar una nueva célula, sino que formaría parte de la estructura de la levadura, a esto se le llama pseudohifas ⁽²⁵⁾.

En las levaduras por fisión estas se dividen de manera uniforme de tal forma que su núcleo y la célula parenteral se alargan hasta

partirse en dos células nuevas. Estas levaduras en agares sólidos forman colonias muy parecidas a las bacterianas. ⁽²⁵⁾

2.2.1.2.-Ciclo de vida y reproducción

En la mayoría de hongos su reproducción se realiza mediante las esporas, que son estructuras reproductoras que sirven para la propagación de la especie, poseen una alta resistencia a condiciones ambientales extremas, sin embargo, estas se pueden reproducir de forma sexual o asexual. ^(25,1)

a) Esporas asexuales

Se forman en las estructuras especializadas de los hongos como por ejemplo los conidióforos y esporangióforos, las esporas son de dos tipos llamadas: 1) Conidio y 2) Esporangiospora ⁽²⁵⁾

- Conidios

Es una espora que se encuentra dentro de un conidióforo. Dentro de este grupo de esporas podemos encontrar a: los Arthroconidios que se producen cuando las hifas septadas (tabicadas) llegan a fragmentarse para desarrollar otro hongo. Blastoconidios que se forman en los brotes de las células parenterales. Clamidioconidios es una espora que se forma dentro la hifa. Existen casos especiales como las esporas que se forman en estructuras de pared gruesa llamadas picnidios ^(25,1).

- Esporangiosporas

Son esporas formadas en una estructura llamadas esporangio en una parte de la hifa (esporangióforo). Existen casos especiales que los esporangios poseen flagelos y se le denominan zoosporas y su saco es llamado zoosporangio.

(25,1)

b) Esporas sexuales

Los hongos también pueden formar esporas sexuales, en las que se necesitan de gametos para su desarrollo. Estas esporas sexuales caracterizan a los filos, siendo una estructura diferencial para la identificación de las especies. Como por ejemplo el filo Ascomycetes forman las ascosporas en las células especializadas llamadas aseas, el filo Basidiomycetes forman las basidiosporas en la célula especializada denominada basidio. (25,1)

Las esporas sexuales poseen 3 fases de desarrollo: En primer lugar, la plasmogamia, que consiste en la unión de una célula que posee núcleo haploide (+) con una célula receptora (-); en segunda fase, la cariogamia, en donde la unión de estas dos células (+) (-) permite la formación de un núcleo cigótico diploide; y, por último, la meiosis, en donde este núcleo diploide genera nuevas esporas sexuales.

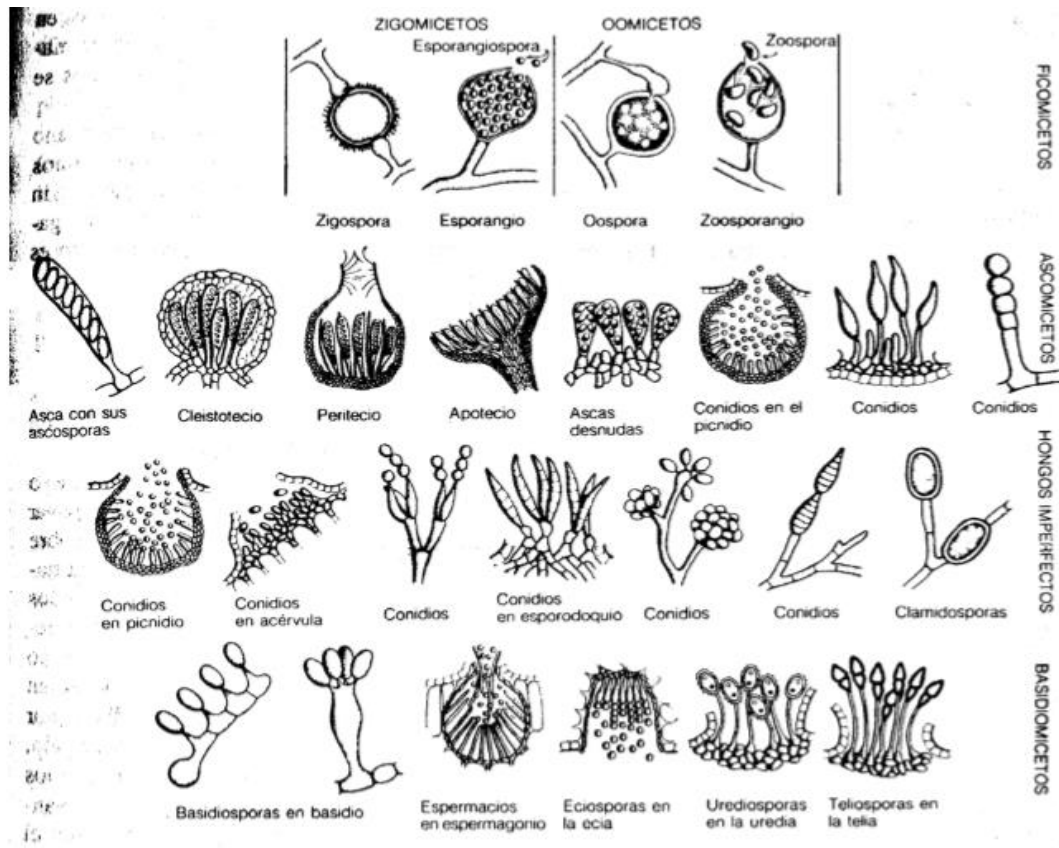


Ilustración 1.-Tipos de estructuras especializadas en reproducción del hongo. Fuente:Agrios

2.2.2. Aspergillus niger

Además de ser un hongo que puede infectar a humanos, también puede infectar plantas, verduras y frutas; las cuales son bastantes susceptibles a este hongo, sobre todo si existe un daño físico, la cual mejora las condiciones de desarrollo de este patógeno, llegándose a esparcir por toda la fruta o parte de la planta, cubriéndose de un micelio con formas circulares negruzcos. En el arándano, se ha encontrado a esta especie creciendo en una forma de cabezales, las cuales tienen una coloración rosa, que con el transcurso del tiempo y desarrollo de la enfermedad esta cambia a un color negruzco paulatinamente. ⁽²⁶⁾

En las cebollas, se le atribuye la enfermedad del moho negro que se desarrolla en el bulbo de la cebolla cuando esta se almacena. Esta provoca una lesión superficial pero severa, al contorno del cuello con un micelio de coloración negruzca. Las cuales ocurren en almacenajes de altas temperaturas ambientales. ⁽²⁷⁾

En el ajo, se han encontrado especies del género *Aspergillus*, sobre todo *A. Niger*, la cual se relaciona mucho con el crecimiento en conjunto de hongos del género *Penicillium*.⁽²⁸⁾

2.2.2.1.-Taxonomía ⁽²⁹⁾

Reino: *Fungi*

Filo: *Ascomycota*

Clase: *Eurotiomycetidae*

Orden: *Eurotiales*

Familia: *Trichocomaceae*

Género: *Aspergillus*

Especie: *Aspergillus niger*

2.2.2.2.-Morfología

a) Macroscópica: Colonias en Agar Sabouraud Dextrosa (ADS) presenta un micelio de color blanquecino amarillento que vira a un color negruzco con el pasar de tiempo en cultivo. Textura granular incolora o crema. ⁽³⁰⁾

b) Microscópica: Posee una vesícula globosa con 50-100 um de diámetro con fiálides biseriadas alrededor de esta. Estas

fiálides constan de una rama principal con un tamaño de 30 um de largo y una secundaria con un tamaño de 10 um de largo en el cual se deposita conidios globosos y rugosos de 4 a 5 um de diámetro, de color castaño o marrón a negro. ⁽³⁰⁾

2.2.2.3.-Usos

En la actualidad, este microorganismo ha tomado un papel muy importante en la biotecnología ya que es usado por diferentes industrias con la finalidad de obtener algunos componentes a gran escala, como la producción de ácido cítrico a partir del suero de leche ⁽³¹⁾, también se le ha utilizado para la extracción de enzimas, como las celulasas, pectinasas, entre otras. ^(32,33)

También se le han hecho estudios sobre biorremediación, que consiste en utilizar este microorganismo para reducir los niveles de contaminantes de metales pesados en el ecosistema obtenidos por la minería, llegando incluso a ser una especie bastante interesante para controlar los niveles Níquel (II) en lugares contaminados. ⁽³⁴⁾

2.2.2.4.-Patología

El ***Aspergillus niger*** es una especie a la que se le considera oportunista, es decir, provoca y desencadena una patología solo en casos en donde el sistema inmunológico esta deficientemente comprometido. Sin embargo, también puede ocasionar malestares locales como alveolitis alérgica (pulmón

del granjero), asma o rinitis alérgica por aspiración de esporas, cuando por ejemplo se está en contacto con material mohoso.⁽³⁵⁾

La infección de ***Aspergillus niger*** puede causar infecciones externas como la otomicosis e incluso llegar a ser invasivo produciendo una masa compacta denominado aspergiloma, en pacientes que han sufrido enfermedades relacionadas con tuberculosis, sarcoidosis, histoplasmosis o bronquiectasia.⁽³⁶⁾

En animales puede causar bloqueo de áreas en donde la circulación de aire está comprometida, en equinos este microorganismo puede infectar las bolsas guturales, causando lesiones muy cerca a los grandes vasos de irrigación⁽³⁵⁾

También se le ha relacionado el desarrollo de sustancias nocivas (micotoxina), específicamente la OTA (ocratoxina A), en donde se ha demostrado principalmente el desarrollo de nefropatías y trastornos hepáticos. Además, está comprobado el efecto carcinógeno, teratógeno, inmunosupresor y neurotóxicos.⁽³⁷⁾

2.2.2.5.-Diagnóstico

En caso de infecciones invasivas se realizan exámenes histológicos con tinciones de metenamina de plata y la de hematoxilina-eosina, estas se complementan con exámenes microbiológicos (crecimiento en medios de cultivos).

También se han desarrollado técnicas inmunológicas para determinar la presencia de este microorganismo como ELISA, BALISA, inmunofluorescencia indirecta, radioinmunoensayo. ⁽³⁵⁾

2.2.2.6.-Tratamiento

Se utilizan antifúngicos que dependen mucho del estado clínico invasivo o externo, además de la actividad inmunológica del paciente. La anfotericina B se ha utilizado con dosis de 0.7-1.5 mg/Kg/día. Sin embargo, el grupo de azoles también ha demostrado muy buena respuesta terapéutica en afecciones cardíacas, pulmonares, óseas, entre otros ⁽³⁶⁾.

2.2.3.-Plantas medicinales

Con el paso del tiempo el hombre ha buscado tratar las enfermedades y patologías causadas por tóxicos, plagas e infecciones; utilizando como fuente de recursos medicinal, la naturaleza; interactuando con esta, y obteniendo conocimientos e información de la ingestión accidental o voluntaria de algunas especies vegetales. Es así que nace la medicina tradicional, la cual se avala en la herbolaria que se conocía en aquellos tiempos con sus propiedades curativas. ⁽³⁸⁾

2.2.4.-*Cucumis dipsaceus*

2.2.4.1.-Descripción

Es una maleza de tallo tendido largo, flexible y rastrero. Hojas alternadas y arriñonadas, de 10 cm de largo y 11 cm de ancho, ápice redondeada, márgenes denticuladas, la base cordada. Los peciolo de 8 cm de largo. Varias flores masculinas agrupadas en las axilas de las hojas, las flores femeninas más grandes, solitarias, naciendo junto a las inflorescencias masculinas. Flores en receptáculo angostamente acampanado; 5 sépalos, angostos, verdes, la corola es un tubo acampanado que hacia el ápice se divide en 5 lóbulos; en las flores masculinas generalmente poseen 3 estambres, inserto en el receptáculo, flores femeninas con ovario ínfero, oblongo, cubierto con abundantes pelos blancos y erectos, el estilo de hasta 2mm de largo y el estigma capitado. Fruto elipsoide, amarillo, jugoso y amargo, de hasta 5 cm de largo, que contienen espinas flexibles.

(39)



Ilustración 2.- *Cucumis dipsaceus* en su hábitat de origen y su fruto. Fuente: Google

2.2.4.2.-Distribución:

Originaria de Europa, sin embargo, esta ha llegado a adaptarse al medio ambiente de Panamá, Texas, América del Sur y las Antillas. ⁽³⁹⁾

En el Perú, esta ha llegado a crecer como maleza en regiones como Cusco, Ancash, Cajamarca, La libertad, Lambayeque, Piura, Lima y entre otras regiones. ⁽⁴⁰⁾

2.2.4.3.-Tipo de suelo y medio de desarrollo:

Se desarrolla en climas cálidos y lluviosos. Con un suelo arenoso y seco. Crecen entre 0 a 1000 m sobre el nivel el mar. ⁽⁴⁰⁾

2.2.4.4.-Nombres Comunes:

Jaboncillo de Campo, Cojon del diablo, Pepinillo del Diablo, y en el norte del Perú lo llaman, Shampoo, Patito de campo, Jaboncillo. ⁽⁴¹⁾

2.2.4.5.-Usos:

Debido a la gran facilidad de formar espuma en el agua, muchas personas lo utilizan para el lavado del cabello, ropa y tratamiento natural contra la caspa.

También lo utilizan para el tratamiento de la caída de cabello y para detener la lactancia del bebé. ⁽⁴¹⁾

2.2.4.6.-Taxonomía ⁽⁴⁰⁾

Reino: *Plantae*

Filo: *Magnoliophyta*

Clase: *Equisetopsida*

Orden: *Cucurbitales*

Familia: *Cucurbitaceae*

Género: *Cucumis*

Especie: *Cucumis dipsaceus*.

2.2.4.7.- Propiedades medicinales

Se le ha realizado ensayos para determinar su actividad antibacteriana, resaltando que el extracto metanólico del fruto de *Cucumis dipsaceus* ha demostrado inhibir el crecimiento de ***E.coli*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus***.⁽⁴²⁾

También se le atribuye propiedades analgésicas y antiinflamatorias al fruto, resaltando por encima de todos los extractos metanólico (analgésico y antiinflamatorio) y diclorometano (antiinflamatorio).⁽⁴³⁾

Se ha evidenciado que el extracto etanólico posee Actividad citotóxica y antitumoral.⁽⁴³⁾

2.2.4.8.-Marcha fitoquímica

Esta especie vegetal ha demostrado poseer diferentes compuestos activos, que son de interés para la ciencia. Pues se ha determinado

la presencia de taninos, alcaloides, saponinas, esteroides, flavonoides y resina en el fruto. ^(42,43)

Mientras que en los extractos de las hojas se ha llegado a determinar la presencia de saponinas, carbohidratos, proteínas, aminoácidos, alcaloides, flavonoides, glucósidos, glucósidos cardiacos, fitosteroles, aceites y lípidos. ⁽⁴³⁾

2.2.5.-Las saponinas

Son compuestos químicos caracterizados por tener 2 estructuras principales que conforman su esqueleto molecular: Azúcar y aglicón.

Este compuesto químico tiene la capacidad de producir espuma cuando se agita una solución acuosa que las contenga, siendo una característica para determinar cualitativamente la presencia de estos compuestos orgánicos. ⁽⁴⁴⁾

2.2.5.1.-Estructura química y clasificación:

Las saponinas poseen una parte glucídica (azúcar) y otra no glucídica (aglicón) también llamada sapogenina. Según el número de azúcar se pueden dividir en 2 grandes grupos: S. Monodesmosídicas y S. Bidesmosídicas. ⁽⁴⁴⁾

Según su tipo de aglicón se puede clasificar en triterpénicas o esteroideas; las cuales además pueden subdivirse en Pentacíclicas y tetracíclicas para las saponinas triterpénicas y

para las saponinas esteroídicas derivados del furostanol y derivados del espirostanol.(44,45)

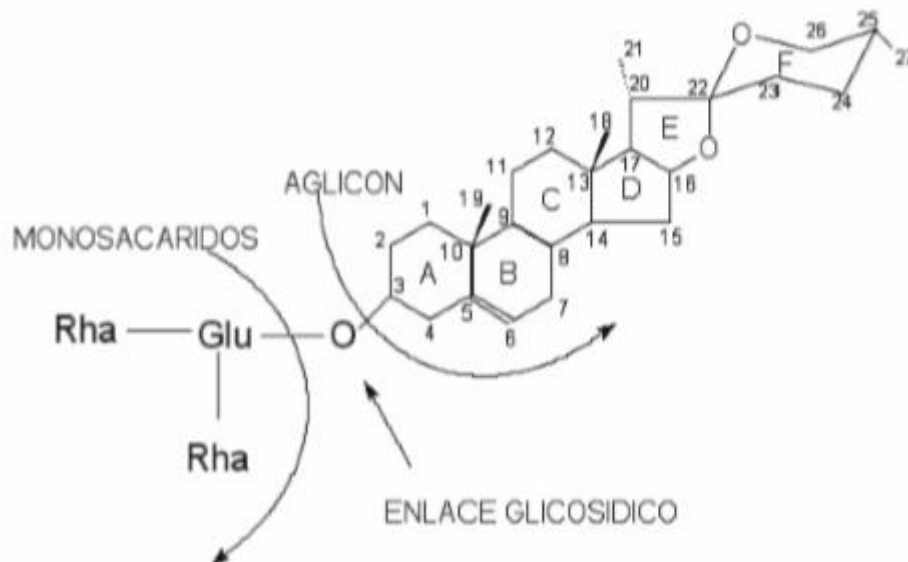


Ilustración 3.- Estructura de saponinas. Fuente: T.Flores

2.2.5.2.-Propiedades fisicoquímicas

Esos compuestos orgánicos poseen una estabilidad térmica realmente alta, pues soportan temperaturas de 150 °C a 400 °C, es en este extremo de temperatura, que la molécula comienza a sufrir un proceso de carbonización; por lo tanto, debido a su termoestabilidad hace factible la extracción convencional que usualmente son favorecidos por el uso de calor.⁽⁴⁶⁾

Solubilidad: Las saponinas son solubles en agua y en disolventes orgánicos polares como (Etanol, Metanol) e insoluble en disolventes orgánicos apolares (Hexano); sin embargo cuando se le retira la molécula de azúcar, la sapogenina

(aglicón) restante, son solubles en disolventes orgánicos apolares e insolubles en agua u otro solvente polar. ⁽⁴⁴⁾

2.2.5.3.-Propiedades biológicas

a) Actividad hemolítica. - Esta se debe a la interacción con los esteroides de la membrana del eritrocito, provocando un intercambio iónico de sodio, con respuesta a la entrada de agua en la célula, llegando a “explotar”. ⁽⁴⁷⁾

b) Actividad antimicrobiana y molusquicida. - Estas actividades son muy importantes para el estudio de nuevos compuestos, para su uso en la industria. Cabe resaltar que es muy tóxico para seres vivos marinos ya que hace estallar los capilares branquiales, interrumpiendo la respiración y el equilibrio osmótico. ⁽⁴⁷⁾

c) Propiedad antiinflamatoria y antiedematoso como las que poseen la raíz de regaliz y la semilla del castaño de indias (**vide infra**). También se han evaluado las saponinas del ***Solidago virgaurea L.*** y ***Camellia sinensis*** obteniendo estos resultados. Aunque se desconoce su mecanismo de acción, se le atribuye hipótesis como la inhibición de la degradación de corticoides, interferencia con el metabolismo de los mediadores de la inflamación. ⁽⁴⁷⁾

2.3. Marco conceptual

Extracto

Son preparaciones líquidas que poseen un conjunto de sustancias químicas obtenidas de diferentes especies, ya sea de origen animal o vegetal. Estas sustancias químicas son “extraídas” con un fin terapéutico, nutricional, microbiológico, estudios científicos, etc.

Extracto de saponósidos (saponinas)

Es un extracto cuyo contenido principal son saponinas, obtenidas de distintas fuentes vegetales ricas en este principio activo, utilizándose diferentes métodos de extracción con la finalidad de obtener un máximo rendimiento de extracción.

Principios activos

Son compuestos químicos de origen sintético o natural que poseen una actividad biológica importante y por esta razón muchos de estos principios activos son útiles en la industria farmacéutica, cosmética, química, alimentaria, etc.

Pruebas de sensibilidad

Son una variedad de ensayos microbiológicos que sirven para determinar la susceptibilidad que posee un microorganismo frente un agente antimicrobiano, es decir, mide la capacidad de un compuesto químico para detener el crecimiento de un microorganismo.

Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Es un factor de las pruebas de sensibilidad, pues permite conocer la concentración mínima que se requiere para inhibir el crecimiento del microorganismo en estudio.

Marcha fitoquímica

Conjunto de técnicas analíticas que sirven para determinar la presencia de principios activos presentes en una especie vegetal basándose en distintos métodos de identificación instrumental y reacciones químicas como HPLC, espectrofotométricas UV e IR, reacción oxido-reducción, etc.

Capítulo III

Metodología

3.1.-Extracción de las saponinas

La materia prima fue obtenida de manera comercial en establecimientos de ventas de productos naturales, ubicadas en el centro de la ciudad. Se compró aproximadamente 1Kg.

a) Fase de secado

Se procedió al retiro de partículas ajenas a la droga y se continuo con el pesaje de la muestra divididas en 2 tandas con pesos de 545 g y 508 g. Estas muestras se abrieron por la mitad para facilitar el secado y se sometieron a temperaturas de 70°C por 48H hasta la obtención de un peso constante.



Ilustración 4.- Fase de secado. Fuente: Autor

b) Fase de molienda

Ambas tandas se mezclaron y se redujeron de tamaño para facilitar el contacto con el solvente. La muestra polvillo se trasvasaron a un recipiente de vidrio limpio.



Ilustración 5.- Fase de Molienda. Fuente: Autor

c) Maceración y filtrado

La maceración se realizó con etanol de 97°(industrial) por 5 días, con agitación constante y cambio de solvente.

La filtración de esta materia prima se realizó a vacío con papel whatman N°40 para obtener el extracto etanólico libre de cualquier residuo sólido.



Ilustración 6.- Fase de Maceración y filtración a vacío. Fuente: Autor

d) Evaporación del solvente

El extracto etanólico fue llevado a baño María a 70°C hasta la obtención de un residuo siruposo color pardo-verdoso.



Ilustración 7.- Fase de evaporación del solvente. Fuente: Autor

e) Extracción líquida-líquida

El extracto etanólico seco se diluyó en 25 mL de agua destilada y se extrajo con N-butanol en 3 fracciones de 25 mL dentro de una pera de bromo para visualizar la separación de la fase acuosa y orgánica. Los 75mL obtenidos fueron sometidos a secado a 80°C hasta la pérdida del solvente.



Ilustración 8.- Extracción butanólica/acuosa. Fuente: Autor

3.2.-Identificación de las saponinas en el extracto butanólico

Se realizaron 3 procedimientos cualitativos en base a lo que refiere Colina:⁽⁴⁸⁾

3.2.1.-Prueba Lieberman – Burchard

Se diluyó una parte del extracto en 5 gotas de ácido acético, luego se agregó 2 mL de anhídrido acético/ácido sulfúrico.⁽⁴⁸⁾

3.2.2.-Prueba de Salkowski

Se diluye una pequeña muestra del extracto en medio de 1mL de ácido sulfúrico concentrado, y se agrega 3 gotas de anhídrido acético. Indica la presencia de saponinas sea triterpenoidal o esteroideal.⁽⁴⁸⁾

3.2.3.-Prueba de la formación de espuma

Se tomó una parte del extracto y se le incorporó 2mL de agua destilada, se sacudió vigorosamente por 30 segundos y se observó.⁽⁴⁸⁾

3.3.-Aislamiento del hongo *Aspergillus niger* y evaluación antifúngica

Para este procedimiento se utilizó los laboratorios de la facultad de biología. Se compraron frutos de arándanos en el mercado Modelo de manera comercial y se dejaron al ambiente bajo sombra.

Con el pasar de 3 semanas exactamente se observaron crecimiento de micelios blanquecinos y verdes.

3.3.1.-Preparación del medio de cultivo

Se pesaron 6.5 g de agar sabouraud para ser disuelto en 100 mL de agua destilada con ayuda de calor, proporcionada por un horno microondas hasta obtener una coloración transparente.

Disuelto nuestro agar se continuó a esterilizarlo en autoclave con una temperatura de 120°C y a presión de 15lb por 20 minutos.



Ilustración 9.- Preparación del agar SBD y esterilización en autoclave. Fuente: Autor

En una cabina de flujo laminar previamente limpiada, se procedió a plaquear nuestro agar en discos Petri, con ayuda de un mechero hasta su enfriamiento y solidificación.

3.3.2.-Sembrado

Las muestras con los micelios fueron sometidas a desinfección con alcohol de 70° dentro de una torunda de algodón.⁽³⁾ Luego de esta desinfección se corto con un bisturí esteril la parte enferma del fruto y se colocó en las placas petri previamente preparadas. Se envolvió en parafina y se esperó el crecimiento del hongo por 1 semana.

Se realizó una segunda vez este procedimiento, a partir del crecimiento fúngico de los agares con muestras de arandanos, con la finalidad de obtener una cepa más pura.

3.3.3.-Identificación en microcultivo

Para este procedimiento se utilizó una placa Petri, varilla de vidrio, una lámina portaobjeto y laminilla esterilizadas en estufas a 180°C por 1 hora. Todos estos materiales esterilizados fueron llevados a la cabina de flujo laminar, para luego cortar una parte de agar en forma de cuadrado con medidas aproximadas de 2x2cm con un bisturí estéril, para luego traspasarlo a la placa estéril previamente armada.

Luego de colocar el agar se procedio a sembrar en cada lado del agar (4 esquinas) la cepa aislada, para culminar colocando la laminilla. Despues de este procedimiento se coloco agua esterilizada suficiente en la base de la placa sin que este llegue a tocar el agar. Se selló con parafina y se esperó una semana para su crecimiento. Después de la semana, se retiró la laminilla y se colocó en otra lamina portaobjeto limpia con la finalidad de observar en microscopio.



Ilustración 10.- Preparación del microcultivo. Fuente: Autor

3.3.4.-Evaluación antifúngica

3.3.4.1.-Preparación de las cepas

Se preparó una solución salina estéril, con el contenido del microorganismo aislado, similar a la turbidez de la solución de la escala de McFarland perteneciente a la concentración 3×10^8 ufc/mL. Para luego extraer 3 mL y diluirlo hasta 9 mL y obtener una solución salina con una concentración de 1×10^8 ufc/mL.

3.3.4.2.-Preparación de soluciones a partir del extracto butanólico

Solución madre: Se pesó 1.038g del extracto butanólico en 1mL de DMSO.

Solución 75%: Se extrajo a partir de la madre 0.375mL y completar con 0.125mL de DMSO.

Solución 50%: Se extrajo a partir de la madre 0.250mL y completar con 0.250mL de DMSO.

Solución 25%: Se extrajo a partir de la madre 0.125mL y completar con 0.375mL de DMSO.

Solución 10%: Se extrajo a partir de la madre 0.05mL y completar con 0.495mL de DMSO.

Solución positiva de fluconazol a una concentración de 1mg/mL.

3.3.4.3.-Preparación del medio del cultivo

Se realizó el mismo procedimiento para la preparación del agar sabouraud, sin embargo, a este, se le agrego 100 uL la solución con el *Aspergillus niger* y se esparció de manera uniforme con la espátula de Drigaslky, posteriormente se le realizó 3 pocillos o pozuelos a cada placa Petri con ayuda de un sacabocado estéril. Para culminar se depositó por triplicado 40uL de las soluciones preparadas en cada placa respectiva a su concentración, control negativo que solo posee DMSO y control positivo que contiene solo Fluconazol.

Capítulo IV

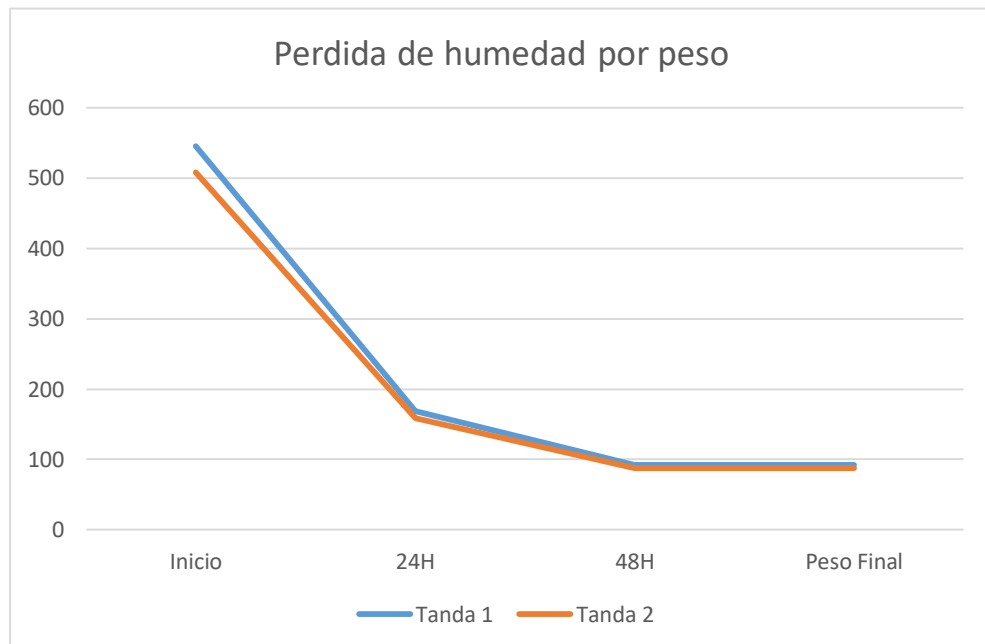
4.1.-Resultados

4.1.1-Porcentaje de humedad

-En la etapa de secado de las muestras de *Cucumis dipsaceus* se realizó un control de la humedad por pérdida en secado para las muestras 1 y 2, obteniéndose 83.00% y 82.82% de humedad en peso, respectivamente.

Pesos/Tiempo de Secado	Inicio	24H	48H	Peso final	Humedad relativa
Tanda 1	545	168	92.6	92.6	83.00%
Tanda 2	508	159	87.8	87.8	82.82%

Tabla 2 Pesos en g de las muestras en fase de secado



Grafica 1.- Humedad relativa por pérdida en secado

4.1.2.- Porcentaje de extracción

-En la extracción por maceración y Fase acuosa/butanólica se obtuvieron:

Pesos	Extracción etanólica	Extracción butanólica
Peso de la muestra (droga)	178.09	16.2
Peso del envase con la muestra	638.9	458.0
Peso del envase vacío	622.7	449.0
Diferencias de pesos (Residuo)	16.2	9.0
% de extracción	9.10%	5.05%

Tabla 3.- Resultados de las extracciones etanólica y butanólica

4.1.3.-Pruebas de identificación de saponinas




Ensayo	Interpretación de los ensayos	Resultados	Imágenes resultados
Lieberman-Burchard	Rosa a púrpura: Saponinas de núcleo triterpenoidal Azul-Verdosa: Saponinas de núcleo esteroideal	+ Positivo	
Salkowski	La coloración vira de amarillo a rojo sangre, indicando la presencia de saponinas	+ Positivo	
Prueba de la Espuma	Espuma persistente mayor a 3 minutos	+ Positivo	

Tabla 4.- Identificación de las saponinas en el crudo butanólico

4.1.4.-Identificación de especie de *Aspergillus niger*

Se obtuvo una muestra muy parecida a *Aspergillus niger* y se comparó con las imágenes obtenidas del INS. ⁽⁴⁸⁾


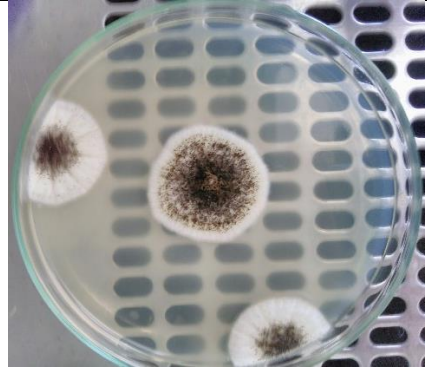


Identificación	Macroscópico		Microscópico	
	<u>Características según INS</u>	<u>Muestra</u>	<u>Características según INS</u>	<u>Muestra</u>
	Color blanco con tonalidad amarillenta que vira a negro	Conforme	Vesícula globosa con fiálides biseriadas alrededor de ellas	Conforme
	Reverso es color crema o incoloro	Conforme	Conidios globosos	Conforme
	Textura granulosa	Conforme	Conidióforos de pared lisa, hialina o pigmentada	Conforme
				

Tabla 5.- Resultados de identificación del *Aspergillus niger*

4.1.5.-Evaluación Anti-fúngica

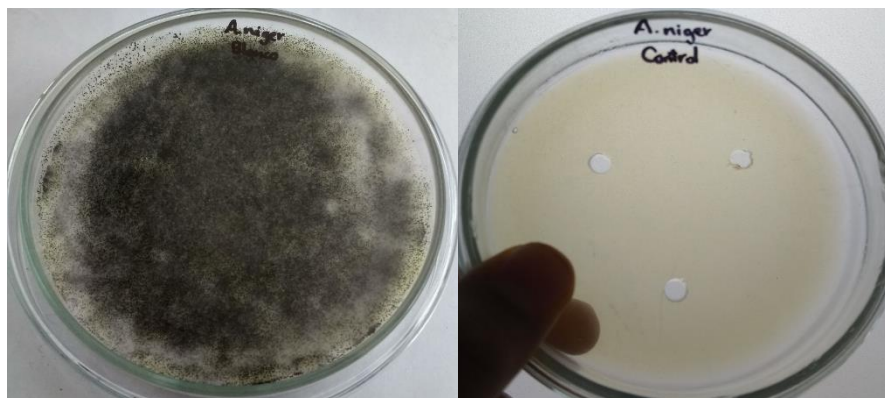


Ilustración 12.- Controles negativo y positivo. Fuente: Autor

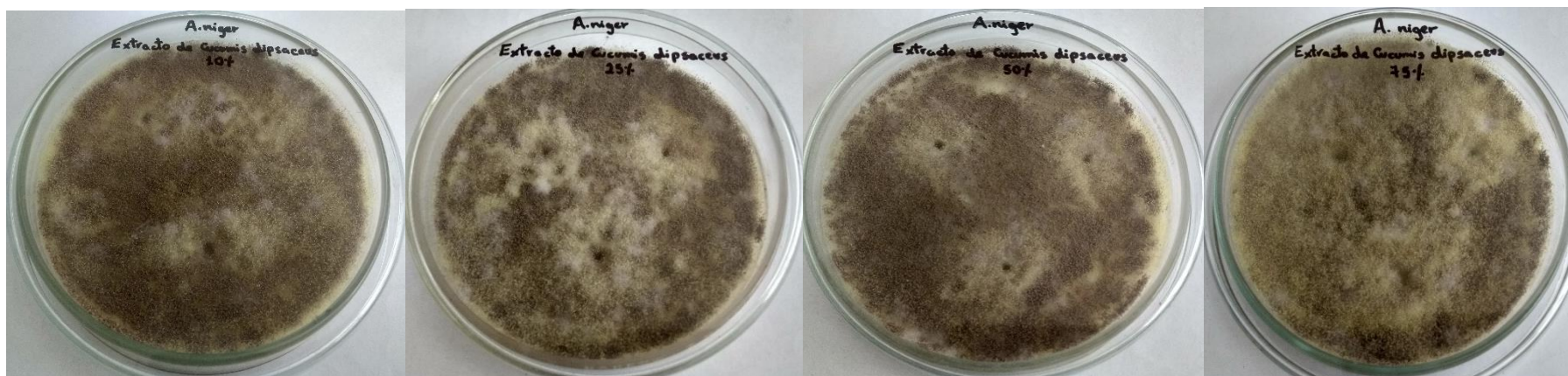


Ilustración 11.-Evaluación antifúngica del extracto a 10%, 25%, 50% y 75% P/V de concentración. Fuente: Autor

Actividad fungicida en <i>Aspergillus niger</i> (Fitocultivo)				
Concentración de los extractos P/V	Repeticiones			Promedio
	N°01	N°02	N°03	
Control Negativo	6	6	6	6
Control Positivo Fluconazol 1mg/mL	Inhibición completa			
10%	6	6	6	6
25%	6	6	6	6
50%	6	6	6	6
75%	6	6	6	6

Tabla 6.- Resultados de la evaluación fungicida

*Se midió la inhibición a partir del tamaño del pocillo que era de 6mm.

4.2.-Discusión

La extracción de saponinas a partir del fruto del *Cucumis dipsaceus* se vió favorecida porque se realizó con solventes orgánicos polares (etanol, n-butanol) y agua; esto se debe a la gran capacidad de solubilidad de estos compuestos fitoquímicos en medios polares ⁽⁴⁴⁾. Sin embargo, al no usarse otros solventes orgánicos apolares demuestra que, en el proceso de extracción de saponinas, se ha facilitado la obtención de otros compuestos fitoquímicos.

Investigaciones como la de Vasanth Kumar⁽⁴²⁾ evidencia la presencia de saponinas, sin embargo, no se llega a determinar si estos frutos poseen saponinas esteroidales o triterpenicos; pero en este estudio realizado a las saponinas obtenidas en el crudo butanólico se llega a determinar la presencia de cuerpos esteroidales como lo confirma la coloración azul-verdosa en la reacción Lieberman-Burchard, posiblemente relacionado al aglicón, es decir, que la saponina que se encuentra en el extracto butanólico posee un núcleo similar a los esteroides. Otro punto a tratar, es

que la identificación de los compuestos fitoquímicos será tan fiable mientras la técnica de extracción permita obtener en lo posible compuestos más puros.

En la evaluación antifúngica, las muestras con extractos de *Cucumis dipsaceus* a diferentes concentraciones, se observa el crecimiento del micelio del hongo en toda la placa, sin embargo, alrededor de los pocillos existen partes del micelio que no han llegado a esporular, como lo ha hecho el control negativo. Quizás este suceso, se deba a que la concentración de algunos principios activos no es la adecuada dentro del extracto butanólico, debido a que existen otros investigadores como Vasanh Kumar que ha comprobado su actividad antibacteriana⁽⁴²⁾ o Sowbaraniga con Chitra, quienes han demostrado la presencia de compuestos fitoquímicos como ácido oleico, ácido undecanoico, pentadecanal y ácido nonanoico que relacionan al *Cucumis dipsaceus* con actividad antibacteriana y antimicótica.⁽⁴⁹⁾

Conclusiones

- 1) Las saponinas obtenidas del fruto *Cucumis dipsaceus* presenta inhibición de la esporulación del hongo en estudio a partir de las concentraciones de 25%, 50% y 75%, sin embargo, no detiene el crecimiento micelial del *Aspergillus niger*.
- 2) El contenido de agua presente en los frutos del *Cucumis dipsaceus* es cercana al 80%.
- 3) Se obtuvo un porcentaje de extracción etanólico de 9.10% en relación a la muestra seca y en la extracción butanólica un 5.05%.
- 4) Se demostró la presencia de saponinas con núcleos esteroidales en el crudo de saponinas.

Recomendaciones

- 1) Estudiar la presencia de otros compuestos fitoquímicos con posible actividad biológica relevante.
- 2) Para la extracción de saponinas es necesario el uso de solventes no polares como Hexano para el desengrase de las muestras y obtener un crudo más puro en saponinas.
- 3) Aplicar en el extracto de saponinas, técnicas de cromatografía como cromatografía en columna por fraccionamiento para la obtención de compuestos fitoquímicos más puros.
- 4) Al obtener fracciones por cromatografía se debería evaluar su actividad biológica frente a distintos microorganismos.
- 5) En la obtención de compuestos fitoquímicos purificados, se debería aplicar distintos ensayos de identificación con la finalidad de elucidar la estructura que posea dicha actividad biológica importante.

FUENTES DE INFORMACIÓN

- 1.-Agrios G. N. Fitopatología. 2da Edición. México. Editorial Limusa S.A; 1995.
- 2.-Abarca Lourdes. Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. Rev. Iberoam. Micol 2000; 17; PP.: S79-S84. Disponible en:
<https://www.fba.org.ar/panelgestion/InformeResultado/MI/mi33.pdf>
- 3.- Agrios G.N. Fitopatología. 2da Edición. Editorial Limusa S.A, 1995.Capitulo 11. Enfermedades de las plantas causadas por hongos. pp:464
- 4.- Atias Antonio. El Parasito En: Parasitología Médica.2da Edición. Chile. Editorial Mediterráneo; 2006. pp. 21-38
- 5.- Guevara Orlando, Rivas P., Gomez Rincon J., Cuervo Maldonado S.. Actualización en aspergilosis con énfasis en Aspergilosis Invasora. Infectio. 2010; 14(S2); PP: S131-S144. Disponible en:
<http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v14s2/v14s2a06.pdf>
- 6.- Javier L. San Juan Galán *et al*. EMERGENCIA EN CUBA DE ESPECIES DE ASPERGILLUS RESISTENTE A ANTIFÚNGICOS. 2017. Boletín epidemiológico BPK.Vol.27.Núm.13.Pág.97. Disponible en:
https://www.researchgate.net/profile/Javier_San_Juan_Galan/publication/316658867_Emergencia_en_cuba_de_especies_de_Aspergillus_resistente_a_antifungicos/links/590a23250f7e9b1d0823cc34/Emergencia-en-cuba-de-especies-de-Aspergillus-resistente-a-antifungicos.pdf
- 7.- Faria Ramos I., *et al*. Development of cross-resistance by *Aspergillus fumigatus* to clinical azoles following exposure to prochloraz, an agricultural azole. 2014. BMC Microbiology. Vol 14. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4061453/pdf/1471-2180-14-155.pdf>
- 8.- Snelders Eveline, *et al*. Triazole Fungicides Can Induce Cross-Resistance to Medical Triazoles in *Aspergillus fumigatus*.2012. Plos one. Vol 7. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3291550/pdf/pone.0031801.pdf>
- 9.- Rivero Menendez O., Alastruey Izquierdo A., Mellado E. y Cuenca Estrella M. Triazole resistance in *Aspergillus* spp.: A worldwide problem?. J. Fungi 2016. 2. 21. pp:1-20. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5753134/pdf/jof-02-00021.pdf>
- 10.-Verastegui M. Análisis del efecto Antifúngico de 20 extractos de plantas

[Trabajo de Grado para Maestro en Ciencias con Especialidad en microbiología] Mexico: Universidad Autónoma Nuevo León. Disponible en: <http://eprints.uanl.mx/386/1/1020091523.PDF>

11.- Gomez J., *et al.* Actividad antifúngica de saponinas esteroidales de Dioscorea contra hongos fitopatógenos.2001. IX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Disponible en: https://smbb.mx/congresos%20smbb/veracruz01/TRABAJOS/AREA_XII/O XII-7.pdf

12.-De Lucca A., *et al.* Cay-1 a fungicidal saponin from *capsicum sp.* Fruit.2002.Mayo. Edicion 40. pp: 131-137 Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/John_Bland/publication/11314985_C AYI_a_fungicidal_saponin_from_Capsicum_sp_fruit/links/5796259608aec 89db7b8_4e35.pdf

13.- Zamilpa A., Tortoriello J., Navarro V., Delgado G. y Álvarez L.. Five new Steroidal saponins from *Solanum chrysotrichum* Leaves and Their Antimycotic Activity. 2002. Diciembre. N°65. pp:1815-1819.

14.- Apablaza G., Diaz M. J., San Martin R., Moya E. Control de oidio de las Cucurbitaceas. 2002. Pontificia Universidad Católica de Chile. Ciencia Investigación agraria. Edicion 29. Disponible: https://www.researchgate.net/profile/Ernesto_Moya/publication/28136212 Control_de_Oidio_de_las_Cucurbitaceas_con_Saponinas_Presentes_en_Extractos_de_Quillay_Quillaja_Saponaria/links/5538fce40cf226723ab758 46/Control-de-Oidio-de-las-Cucurbitaceas-con-Saponinas-Presentes-en-Extractos-de-Quillay-Quillaja-Saponaria.pdf

15.- Stuardo M., San Martin R.. Antifungal properties of quinoa (*Chenopodium quinoa* WILLD) alkali treated saponins against *Botrytis cinerea*.2007. Noviembre. N°27. pp.296-302. Disponible en: [https://repositorio.uc.cl/bitstream/handle/11534/20989/Antifungal%20prope rties%20of%20quinoa%20\(Chenopodium%20quinoa%20Willd\)%20alkali% 20treated%20saponnins%20against%20Botrytis%20cinerea.pdf?sequenc e=1](https://repositorio.uc.cl/bitstream/handle/11534/20989/Antifungal%20prope rties%20of%20quinoa%20(Chenopodium%20quinoa%20Willd)%20alkali% 20treated%20saponnins%20against%20Botrytis%20cinerea.pdf?sequenc e=1)

16.- TSUZUKI JOYCE K., *et al.* Antifungal activity of the extracts and saponins from *Sapindus saponaria* L. Anais da Academia Brasileira de Ciências (2007) 79(4): 577–583.

17.- Solar Armas M., Paredes Mariños H.(2007). Identificación y cuantificación de las saponinas contenidas en el fruto de la especie *Cucumis dipsaceus* por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).[Trabajo de tesis para la obtención del grado de Bachiller en Farmacia y bioquímica]. Universidad Nacional de Trujillo.

- 18.- Regina de Marqui S., *et.al.* Saponinas antifúngicas de *Swartzia langsdorffii*.2008. Brasil. Quim. Nova. Vol 31. Disponible: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v31n4/a23v31n4.pdf>
- 19.- Santafé G., Guzmán M., Torres O. Triterpenos Holostánicos con Actividad Antifúngica Obtenidos del Pepino de Mar *Holothuria floridana*, Recolectado en la Bahía de Cispatá, Córdoba-Colombia. 2014. Colombia. Información tecnológica. Volumen 25. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/infotec/v25n2/art10.pdf>
- 20.- Apazal R., Smeltekopl H., Flores Y., Almanzall G., Salcedo L.. Efecto de saponinas de *Chenopodium quinoa* Willd contra el fitopatógeno *Cercospora beticola* Sacc. 2016. Bolivia. Rev. Protección Veg. Volumen 31. Disponible: <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v31n1/rpv09116.pdf>
- 21.- Barron Hernandez Rosa Lilia. Evaluación de la actividad antimicrobiana y antifúngica de saponinas de la pulpa de *Agave Lechuguilla* Torrey.2016. Mexico. Tesis de Maestría. Disponible en: <https://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1023/533/1/Rosa%20Lilia%20Barron%20Hern%c3%a1ndez.pdf>
- 22.- Ahumada A., Ortega A., Chito D., Benítez R.. Saponinas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.): un subproducto con alto potencial biológico. 2016. Colombia. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rccqf/v45n3/v45n3a06.pdf>
- 23.-Ulloa Heras C. Evaluación in vitro de la capacidad inhibitoria de saponinas presentes en el penco (*Agave americano*) frente a *Fusarium* sp. 2018. Ecuador.Tesis de titulación. Disponible en: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/15743/1/UPS-CT007727.pdf>
- 24.- McCartney N., *et al.* Effects of saponin-rich quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) bran and bran extract in diets of adapted and non-adapted quinoa pests in laboratory bioassays. 2019. Chile.Pontificia Universidad Católica de Chile. Ciencia Investigación Agraria. Vol 46. PP:125-136.
- 25.- Gerard J. Tortora, Berdell R.Funke, Christine L. Case. Introducción a la microbiología.9na Edición..2007.Editorial medica Panamericana S.A.
- 26.- Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. GUÍA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE PATÓGENOS DE POSCOSECHA EN FRUTOS DE ARÁNDANOS. 2014. Pp:18-19 Disponible en: <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/3579/1/bd-107-2014.pdf>
- 27.- J.varga, S. kocsubé, Gy Szigeti, V. Man, B. Tóth, C. Vágvolgyi, *et. Al.* Black aspergilli and fumonisin contamination in onions purchased in Hungary. 2012. Pp: 3 Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/42927586.pdf>

- 28.- F. Vares, J.R. Esteban, P. Del Estal, A.Mijares, L. Vares. Algunas enfermedades y plagas del ajo en la zona productora castellano-manchego de la provincia de Cuenca. 1987. Vol 13. Pp: 27. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_plagas/B_SVP13-01-021-052.pdf
- 29.- Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de plagas. *Aspergillus niger*. [citado:09-03-2019]. Disponible en: <https://www.sinavimo.gov.ar/plaga/aspergillus-niger>
- 30.- Guevara Robles M., Urcia Ausejo F., Casquero Cavero J. Manual de procedimientos y técnicas de laboratorio para la identificación de hongos oportunistas causantes de micosis humanas. 2007. Pp:64-65. Disponible en: <http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/Manual%20Hongos.pdf>
- 31.- Lopez Ríos C., *Et al.* Producción de ácido cítrico con *Aspergillus niger* NRRL2270 a partir de suero de Leche. 2006. Colombia. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/dyna/v73n150/a04v73n150.pdf>
- 32.- Llenque Luis, Muñoz Ríos M., Espejo Vargas E., Moreno Ruíz A. Producción de celulasas por *Aspergillus niger* a partir de caña de azúcar en biorreactor aireado. Peru. 2015. Disponible en: <http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/PGM/article/download/1151/1090>
- 33.- Grebechova R., Prieto Contreras L.. Biosíntesis de las enzimas pectolíticas a partir de los hongos *Aspergillus niger* y *Aspergillus foetidus* para la aplicación de en industria de alimentos. 2006. Colombia. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/952/95260202.pdf>
- 34.- Duca G., Nuñez C., Navarro A., Rubio M. BIORREMEDIACION DE NIQUEL (II) EN SOLUCION ACUOSA POR *Aspergillus niger* GC1. 2012. Boletín Microbiológico. Volumen 27. Disponible en: <https://revistas.uv.cl/index.php/Bolmicol/article/download/889/866>
- 35.-Medina Cruz Dalia. Aislamiento e identificación de *Aspergillus* spp en heces de paloma (*Columba livia*), en la UAAAN UL. Tesis de titulación. 2010. Mexico. Disponible en: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/3047/DALIA%20OLYMPIA%20MEDINA%20CRUZ.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- 36.- Alcalá L., Muñoz P., Pelaez T., Bouza E.. *Aspergillus* y aspergilosis. España. Servicio de microbiología clínica, Hospital general Universitario Gregorio Marañón.

- 37.- Gonzales Salgado A. Diagnostico y control de especies de *Aspergillus* Productoras de Ocratoxina A. 2010. Tesis Doctoral.España. Disponible en : <https://eprints.ucm.es/10545/1/T30977.pdf>
- 38.-Pascual Casamayor D., Pérez Campos Y., Morales Guerrero I., Castellanos Colomal I., González Heredia E. Algunas consideraciones sobre el surgimiento y la evolución de la medicina natural y tradicional. MEDISAN 2014; 18(10) PP:1444-1449 Disponible en: [http://www.bvs.sld.cu/revistas/san/SAN%2018\(10\)/PDF/san191810.pdf](http://www.bvs.sld.cu/revistas/san/SAN%2018(10)/PDF/san191810.pdf)
- 39.- Nee M. Flora de Veracruz. Instituto de Ecología A.C.;Xalapa, University of California.Riverside,CA.1993. pp:21-26.
- 40.-Torres Narvaez H, Castillo Sifuentes A..Estudio de prefectabilidad para la instalación de una planta productora de jabón liquido a base de jaboncillo de campo (*Cucumis dipsaceus*).Tesis de titulación. Perú: Universidad de Lima. Facultad de ingeniería Industria. 2016
- 41.- Bussmann R., Glenn A.. Medicinal plants used in Northern Peru for reproductive problems and female health. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine 2010, 6:30
- 42.- Vasanth Kumar G.Phyto-Chemical investigation and antibacterial activity study of methanolic extract of cucumis dipsaceus fruits. IJPRD, 2013; Vol 4(11): January-2013 (152 – 154)
- 43.- Lata. Pharmacognosy, Phytochemistry and Pharmacology of *Cucumis dipsaceus* Ehrenb.International Journal of Pharmacognosy and phytochemical Research 2015; 7(3); 446-449
- 44.-Kuklinski C. Farmacognosia Estudio de las drogas y sustancias medicamentosa de origen natural. España. 2 Edición.Omega.1999.
- 45.- Villar A.. Farmacognosia General. Editorial Sintesis,1999. Capitulo 12. Triterpenos y Esteroides. Saponósidos. pp: 177-179
- 46.- Ahumada A.. Saponinas de quinoa (*chenopodium quinoa* Willd.): un subproducto con alto potencial biológico. 2016. Vol 45. pp:438-469. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rccqf/v45n3/v45n3a06.pdf>
- 47.-Bruneton J. Farmacognosia Fitoquímica Plantas medicinales. 2ª Edición. Editorial Acribia.1993. Parte 3 Terpenos y esteroides. pp:663-712
- 48.-Colina Ramos A. Analisis fitoquímico, determinación cualitativa y cuantitativa de flavonoides y taninos, actividad antioxidante, antimicrobiana

de las hojas "Muehlenbeckia hastulata (J.E.Sm) I.M.Johnst" de la zona de Yucay(cusco). 2016. Tesis de titulación. Peru.

49.- R Sowbaraniga and Dr. M Chitra. Phytocompounds identification in Cucumis dipsaceus Ehrenb ex. Spach fruits by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 2019; 8(2): 1453-1458

ANEXO

Matriz de consistencia

“Evaluación de la actividad anti-fúngica del *Cucumis dipsaceus* frente al hongo *Aspergillus Niger*”

Autor: Bach. Renzo Paul Tataje Quesada

<u>Problema</u>	<u>Objetivos</u>	<u>Hipótesis</u>	<u>Variables y operacionalización</u>	<u>Metodología</u>
<p><u>Problema general:</u> ¿Tiene actividad antifúngica las saponinas obtenidas de la especie <i>Cucumis dipsaceus</i> sobre <i>Aspergillus niger</i>?</p> <p><u>Problemas específicos:</u> ¿Cuál es el contenido de agua en el fruto? ¿Cuánto es el rendimiento de extracción de la saponina? ¿Qué tipos de saponinas presenta la especie <i>Cucumis dipsaceus</i>? ¿Cuál es la concentración mínima inhibitoria (CMI) de las saponinas para obtener un resultado antimicótico frente <i>A. niger</i>?</p>	<p><u>Objetivo general</u> Determinar la actividad antifúngica de las saponinas obtenidas del fruto <i>Cucumis dipsaceus</i> frente <i>Aspergillus niger</i>.</p> <p><u>Objetivos específicos.</u> - Determinar el contenido de agua del fruto de <i>Cucumis dipsaceus</i>. -Hallar el rendimiento de extracción de las saponinas de la especie <i>Cucumis dipsaceus</i>. -Determinar el tipo de saponina presente en el fruto <i>Cucumis dipsaceus</i> -Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de las saponinas del <i>Cucumis dipsaceus</i> frente <i>Aspergillus niger</i>.</p>	<p>a) Hipótesis general Las saponinas obtenidas del fruto <i>Cucumis dipsaceus</i> presenta actividad antifúngica frente el <i>Aspergillus niger</i>.</p> <p>b) Hipótesis específicas -El contenido de agua supera el 50% del peso neto del fruto -El rendimiento de la extracción es aproximadamente del 5% del peso neto de la muestra utilizada. -El fruto de la especie <i>Cucumis dipsaceus</i> presenta saponinas triterpenoidales. - La concentración mínima inhibitoria (CMI) de las saponinas obtenidas del fruto <i>Cucumis dipsaceus</i> frente a <i>Aspergillus niger</i> es de 25%</p>	<p><u>Variables:</u> *Independiente: Saponinas del fruto <i>Cucumis dipsaceus</i>. *Dependiente: Actividad antimicótica. <u>Operacionalización:</u> Se procederá según el <i>Tabla N°01</i>.</p>	<p><u>Tipo, nivel y diseño de la investigación</u> Tipo: Experimental, Nivel de Investigación: Exploratorio y Diseño de la Investigación: Experimental. <u>Población.</u> -Se utilizará 1kg de del fruto de Jaboncillo de campo (<i>Cucumis dipsaceus</i>) <u>Muestra.</u> - Crudo de saponinas <u>Método.</u> - Se procederá como específica <i>Capítulo III</i> <u>Técnicas de recolección de datos</u> 1.-Procesamiento de la muestra *Secado por estufa *Extracción por solventes *Extracción liquido-liquido simple *Extracción por baño maría 2.-Ensayo microbiológico *Micro-cultivo *Método kirby-Bauer <u>Procedimiento de recolección de datos:</u> Se especifica en el <i>Capítulo IV</i> <u>Técnicas de procesamiento de la información:</u> *Recopilación de datos *Análisis de Contenido *Análisis descriptivo e inferencial</p>

Glosario

Esporas. - Estructuras de reproducción microscópicas de los hongos.

Estambre. - Órgano masculino de plantas portadores de sacos polínicos.

Estigma. - Es una parte del pistilo, que atrapa el polen en época de polinización.

Fiálides. - Es una estructura sobre la cual se forman las esporas

Fitopatógeno. - Agente que causa enfermedades en especies vegetales.

Huésped. - Organismo vivo que sirve de hogar para algunos parasitos

Hemólisis. - Proceso de ruptura de glóbulos rojos

Micelio. - Estructura vegetativa de un hongo formado por hifas.

Pecíolo. - Apéndice de la hoja de una planta por el que se une al tallo.

Sapogenina. - Sinónimo de aglicona y estructura de saponinas

Sépalo. - Hoja que forma el cáliz de una flor

Lista de ilustraciones

Ilustración 1.-Tipos de estructuras especializadas en reproducción del hongo. Fuente:Agrios.....	28
Ilustración 2.- Cucumis dipsaceus en su hábitat de origen y su fruto. Fuente: Google	33
Ilustración 3.- Estructura de saponinas. Fuente: T.Flores.....	37
Ilustración 4.- Fase de secado. Fuente: Autor.....	41
Ilustración 5.- Fase de Molienda. Fuente: Autor.....	42
Ilustración 6.- Fase de Maceración y filtración a vacío. Fuente: Autor	42
Ilustración 7.- Fase de evaporación del solvente. Fuente: Autor.....	42
Ilustración 8.- Extracción butanólica/acuosa. Fuente: Autor	42
Ilustración 9.- Preparación del agar SBD y esterilización en autoclave. Fuente: Autor	42
Ilustración 10.- Preparación del microcultivo. Fuente: Autor	42
Ilustración 11.- Controles negativo y positivo. Fuente: Autor	42
Ilustración 12.-Evaluación antifúngica del extracto a 10%, 25%, 50% y 75% P/V de concentración. Fuente: Autor	42