



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA

**Actividad antifúngica *in vitro* del extracto etanólico de las cortezas de
Iryanthera juruensis Warb., *Virola calophylla* Warb. y *Vismia
amazonica* Ewan, contra *Malassezia furfur* ATCC 14521**

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en Biología

Autor

Gudy Diamela Scott Almonacid

Asesor

MSc. Leon Faustino Villegas Vilchez

Co-Asesor

MSc. Camilo Diaz Santibañez

Lima, Perú

2025

Jurado Calificador

Presidente: MSc. Luis Alberto Rossi Mayo


Vocal: Dra. Susana Rosa Zurita Macalupu

Secretaria: MSc. Adelina Maximina Castillo Morales

Feedback Studio - Google Chrome
ev.turnitin.com/app/carta/es/?ro=1038s=1&o=2736483015&u=1165482885&lang=es

1 de 1: Uigict FACI FAVEZ
Actividad antifúngica in vitro del extracto etanólico de la...

Similitud 16% Marcas de alerta



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA

Actividad antifúngica in vitro del extracto etanólico de las cortezas de
Dryadorea juramento Warb., *Pithecellobium Warb.* y *Pithecia*
amazonica Ewan, contra *Malessezia furfur* ATCC 14521

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en Biología

Autor
Gaby Diamela Scott Almonacid

Aseor
MSc. Leon Fuentes Villegas Vichos

Co-Aseor
MSc. Camilo Diaz Sautheira

Lima, Perú
2025

Página 1 de 186 35215 palabras 81%

Informe estándar
Informe en inglés no disponible Más información

16% Similitud estándar 106 Exclusiones Filtros

Fuentes
Mostrar las fuentes solapadas

- 1 Internet hdl.handle.net 2%
74 bloques de texto 785 palabras coincidentes
- 2 Internet repositorio.unapiquitos.edu.pe <1%
27 bloques de texto 302 palabras coincidentes
- 3 Internet archive.org <1%
11 bloques de texto 165 palabras coincidentes

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer profundamente a **Dios** y a la **Virgen de Copacabana** por ser mi fuente de fe y esperanza en los momentos más difíciles y cruciales de mi carrera.

Agradezco a mi asesor el **Dr. Leon Villegas**, quien me brindo su respaldo en el transcurso de toda la elaboración de mi tesis de principio a fin y por abrirme las puertas de su Laboratorio de Control de Calidad de la UPCH para la realización y culminación del procedimiento experimental de mi investigación.

También quiero agradecer al **Mag. Camilo Diaz** por brindarme las bases e ideas para la ejecución de mi tesis y su apoyo en todo el estudio botánico de mi investigación.

Un agradecimiento especial a la **Dra. Susana Zurita**, **Blga. Flor Urcia** y **Tec. Alida Navarro**, equipo del Laboratorio de Micología del Instituto Nacional de Salud del MINSA, por dedicarme su tiempo y ayuda incondicional durante el desarrollo experimental del estudio microbiológico de mi tesis.

Finalmente agradezco a la **Dra. Magdalena Pavlich** por su apoyo en el transcurso de mi tesis y en mi camino como egresada de la UPCH.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT.....	2
I.- INTRODUCCIÓN	3
1.1 Pitiriasis Versicolor.....	4
1.1.1 Historia de <i>Malassezia furfur</i>	4
1.1.2 Epidemiología	4
1.1.3 Agente Etiológico	4
1.1.4 Lipodependencia	5
1.1.5 Características Clínicas.....	6
1.1.6 Histopatología	6
1.1.7 Diagnóstico Médico.....	7
1.1.8 Pruebas Bioquímicas y Fisiológicas	8
1.1.9 Análisis Molecular.....	9
1.1.10 Tratamiento	9
1.1.11 Agente Patógeno: <i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521.....	10
1.2 Especies Botánicas Usadas Contra <i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521	11
1.2.1 <i>Iryanthera juruensis</i> Warb.	11
1.2.2 <i>Virola calophylla</i> Warb.	13
1.2.3 <i>Vismia amazonica</i> Ewan.....	14
1.3 Antecedentes.....	16
1.4 Justificación.....	17
II.- HIPÓTESIS / PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	18
2.1 Hipótesis.....	18
2.2 Pregunta de Investigación	18

III.- OBJETIVOS	18
3.1. Objetivo General.....	18
3.2. Objetivos Específicos	18
IV.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
4.1 Variables	19
4.1.1 Variable Independiente:	19
4.1.2 Variable Dependiente:	19
4.1.3 Escala de Medición.....	19
4.2 Materiales.....	22
4.2.1 Equipos requeridos	22
4.2.2 Materiales requeridos.....	22
4.2.3 Reactivos requeridos.....	23
4.2.4 Medios de cultivo requeridos	23
4.2.5 Voriconazol diluido en DMSO al 2 % como antimicótico de referencia y control de calidad positivo del método.....	23
4.2.6 Cepa ATCC requerida	23
4.3 Metodología	24
4.3.1 Flujograma de la metodología.....	24
4.3.2 Estudio Botánico	25
4.3.3 Elaboración del extracto etanólico de las cortezas vegetales.....	33
4.3.4 Preparación del extracto etanólico de las cortezas vegetales a diferentes concentraciones	35
4.3.5 Evaluación Microbiológica	38
V.- RESULTADOS.....	50
5.1 Secado de las cortezas vegetales de las especies botánicas	50
5.2 Macerado de las cortezas vegetales de las especies botánicas	51
5.3 Obtención de los pesos del extracto etanólico de las cortezas vegetales.....	52

5.4 Medición de los halos de inhibición de los extractos etanólicos y del voriconazol por el método de difusión en pozos contra <i>M. furfur</i> ATCC 14521	53
5.5 Enfrentamiento del extracto etanólico de las cortezas vegetales y del voriconazol para hallar la CMI por el método de microdilución contra <i>M. furfur</i> ATCC 1452155	
VI.- DISCUSIÓN	58
VII.- CONCLUSIONES	62
VIII.- RECOMENDACIONES.....	63
IX.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
ANEXOS	79

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Casos de la pitiriasis versicolor en el Perú por departamentos de los últimos cinco años (2020 -2024), otorgados por el MINSA.....	80
Anexo 2. Preparación de la solución salina estéril NaCl al 0. 85 %	91
Anexo 3. Medio de cultivo agar Sabouraud dextrosa suplementado con aceite de oliva al 0.5% y Tween 40 al 0.5% (SDAO T40).....	92
Anexo 4. Medio de cultivo agar Sabouraud dextrosa (SDA)	93
Anexo 5. Medio de cultivo caldo Sabouraud dextrosa suplementado con aceite de oliva al 0.5% y Tween 40 al 0.5% (SDBO T40)	94
Anexo 6. Preparación del voriconazol diluido en DMSO al 2 %	95
Anexo 7. Memorándum de autorización de ingreso y acceso al Centro de Investigación y Enseñanza Forestal (CIEFOR) Puerto Almendra de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana en Loreto – Perú.....	98
Anexo 8. Toma de datos en el campo	99
Anexo 9. Herborizado de las muestras botánicas	101
Anexo 10. Constancia de identificación taxonómica y autenticidad de las muestras botánicas	104
Anexo 11. Constancia de depósito de las muestras botánicas herborizadas de en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos	105
Anexo 12. Secado de las cortezas vegetales	106
Anexo 13. Maceración y filtración de las cortezas vegetales en etanol	107
Anexo 14. Evaporación del solvente y obtención del extracto crudo de las cortezas vegetales	109
Anexo 15. Preparación del extracto etanólico de las cortezas vegetales en DMSO al 100%	110
Anexo 16. Preparación del extracto etanólico de las cortezas vegetales en DMSO al 10%	112
Anexo 17. Certificado de la cepa liofilizada <i>M. furfur</i> ATCC 14521 otorgado por el proveedor Microbiologics.....	114
Anexo 18. Activación de la cepa <i>M. furfur</i> ATCC 14521 en agar Sabouraud dextrosa suplementado con aceite de oliva al 0.5% y Tween 40 al 0.5%	116

Anexo 19. Formulario N°1 Crecimiento de la cepa <i>M. furfur</i> ATCC 14521 activa en agar Sabouraud dextrosa suplementado con aceite de oliva al 0.5% y Tween 40 al 0.5 % ..	120
Anexo 20. Formulario N°2 Cepa activada <i>M. furfur</i> ATCC 14521 cultivada en caldo Sabouraud dextrosa suplementado con aceite de oliva al 0.5% y Tween 40 al 0.5% ...	123
Anexo 21. Formulario N°3 Cosecha del cultivo de <i>M. furfur</i> ATCC 14521 por el método de centrifugación	125
Anexo 22. Formulario N°4 Preparación del inóculo para medir las zonas de inhibición de los extractos etanólicos y del voriconazol por el método de difusión en pozos a partir de la cepa cosechada de <i>M. furfur</i> ATCC 14521	127
Anexo 23. Secuencia para realizar la medición de los halos de inhibición del extracto etanólico de las cortezas vegetales y del voriconazol por el método de difusión en pozos frente a <i>M. furfur</i> ATCC 14521	129
Anexo 24. Formulario N°5 Difusión en pozos para determinar los halos de inhibición de los extractos etanólicos frente a <i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521	131
Anexo 25. Formulario N°6 Difusión en pozos para determinar los halos de inhibición del voriconazol como control de calidad positivo del método frente a <i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521	140
Anexo 26. Formulario N°7 Prueba de sensibilidad antifúngica de difusión en pozos para <i>Virola calophylla</i> y voriconazol frente a <i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521	147
Anexo 27. Formulario N°8 Preparación del inóculo para determinar la CMI de los extractos etanólicos y del voriconazol a partir de la cepa cosechada de <i>M. furfur</i> ATCC 14521	148
Anexo 28. Formulario N°9 Microdilución en caldo para determinar la CMI de <i>Iryanthera juruensis</i> sobre <i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521	150
Anexo 29. Formulario N°10 Microdilución en caldo para determinar la CMI de <i>Virola calophylla</i> sobre <i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521	154

Anexo 30. Formulario N°11 Microdilución en caldo para determinar la CMI de <i>Vismia amazonica</i> sobre <i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521.....	158
Anexo 31. Formulario N°12 Microdilución en caldo para determinar la CMI del voriconazol como control de calidad positivo del método sobre <i>M. furfur</i> ATCC 14521	162

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distintos tipos de lesiones causadas por la pitiriasis versicolor: (A) mixtas, (B) hipocrómicas y (C) hiperocrómicas	6
Figura 2. Hifas y esporas presentes en la capa córnea de la epidermis	7
Figura 3. Mapa del área de estudio ubicado en el Centro de Investigación y Enseñanza Forestal (CIEFOR) en Puerto Almendra, de la facultad de Ciencias Forestales de la UNAP (Loreto, Perú).....	26
Figura 4. <i>Iryanthera juruensis</i> ubicada dentro del bosque húmedo tropical del CIEFOR de la UNAP en Puerto Almendra; Loreto – Perú.....	28
Figura 5. <i>Virola calophylla</i> ubicada dentro del bosque húmedo tropical del CIEFOR de la UNAP en Puerto Almendra; Loreto – Perú	29
Figura 6. <i>Vismia amazónica</i> ubicada dentro del bosque húmedo tropical del CIEFOR de la UNAP en Puerto Almendra; Loreto – Perú	30
Figura 7. Secuencia para cada espécimen dentro de la prensa	31
Figura 8. Prensa armada dentro de la secadora eléctrica para plantas.....	31
Figura 9. Etiqueta con las descripciones de una muestra botánica	32
Figura 10. Preparación de los extractos etanólicos de las cortezas vegetales a distintas concentraciones mediante diluciones seriadas en DMSO al 100 %	36
Figura 11. Preparación de los extractos etanólicos de las cortezas vegetales a distintas concentraciones mediante diluciones seriadas en DMSO al 10 %	38
Figura 12. Ilustración del pozo en medio de la placa con SDAO T40.....	43
Figura 13. Diseño de la placa para la microdilución en caldo del extracto etanólico de las cortezas vegetales en mililitros (mg/ml). Las columnas de la 1 a la 10 de las filas A y B pocillos con las diluciones seriadas de <i>V. amazonica</i> (VA). Las columnas de la 1 a la 10 de las filas C y D pocillos con las diluciones seriadas de <i>V. calophylla</i> (VC). Las columnas de la 1 a la 10 de las filas E y F pocillos con las diluciones seriadas de <i>I. juruensis</i> (IJ). La columna 11 desde la fila A hasta la F pocillos con control de crecimiento (CC). La columna 12 desde la fila A hasta la F pocillos con control de esterilidad (CE)	46
Figura 14. Diseño de la placa de microdilución en caldo del fármaco en microlitros (µg/ml). Las columnas de la 1 a la 10 de las filas A y B pocillos con las diluciones seriadas de voriconazol (VZ), la columna 11 de las filas A y B pocillos con control de crecimiento (CC), la columna 12 de las filas A y B pocillos con control de esterilidad (CE)	48

Figura 15. Cortezas vegetales de las especies botánicas. (1) Cortezas frescas. (2) Cortezas secas. (A) <i>Iryanthera juruensis</i> . (B) <i>Virola calophylla</i> . (C) <i>Vismia amazonica</i>	51
Figura 16. Macerado de las cortezas vegetales de las especies botánicas. (A) <i>Iryanthera juruensis</i> . (B) <i>Virola calophylla</i> . (C) <i>Vismia amazonica</i>	52
Figura 17. Cápsulas con el extracto etanólico de las cortezas vegetales. (A) <i>Vismia amazonica</i> (B) <i>Iryanthera juruensis</i> (C) <i>Virola calophylla</i>	53
Figura 18. Formación de halos de inhibición de los extractos etanólicos por el método de difusión en pozos sobre <i>M. furfur</i> ATCC 14521. (A) Presencia de halo de inhibición de <i>V. calophylla</i> a 500 mg/ml. (B) Presencia de halo de inhibición de <i>V. calophylla</i> a 62.5 mg/ml. (C) Ausencia de halo de inhibición de <i>V. calophylla</i> a 31.25 mg/ml. (D) Presencia de halo de inhibición de <i>V. amazonica</i> a 500 mg/ml. (E) Ausencia de halo de inhibición de <i>V. amazonica</i> a 250 mg/ml. (F) Ausencia de halo de inhibición de <i>I. juruensis</i> a 500 mg/mL	54
Figura 19. Formación de halos de inhibición del voriconazol por el método de difusión en pozos sobre <i>M. furfur</i> ATCC 14521. (A) Presencia de halo de inhibición del voriconazol a 32 µg/ml. (B) Presencia de halo de inhibición del voriconazol a 2 µg/ml. (C) Ausencia de halo de inhibición del voriconazol a 1 µg/ml	55
Figura 20. Concentración Mínima Inhibitoria del extracto etanólico de las cortezas vegetales por el método de microdilución en caldo frente a <i>M. furfur</i> ATCC 14521. La columna 2 de las filas A y B marcada en rojo corresponde a la CMI de <i>V. amazonica</i> a 62.5 mg/ml. La columna 2 de las filas C y D marcada en verde corresponde a la CMI de <i>V. calophylla</i> a 62.5 mg/ml. En las filas E y F no se observa la CMI de <i>I. juruensis</i>	56
Figura 21. Concentración Mínima Inhibitoria del voriconazol frente a <i>M. furfur</i> ATCC 14521 por el método de microdilución en caldo. La columna 9 de las filas A y B marcada en rojo corresponde a la CMI a 0.12 µg/ml del voriconazol	57
Figura 22. Voriconazol diluido en DMSO a distintas concentraciones	96
Figura 23. Concentración final del voriconazol en DMSO al 2 %	97

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Operacionalización de la Variable Independiente	20
Tabla 2. Operacionalización de la Variable Dependiente	21
Tabla 3. Pesos de las cortezas vegetales de las especies botánicas.....	50
Tabla 4. Porcentaje de los pesos de las cortezas vegetales de las especies botánicas.....	50
Tabla 5. Propiedades organolépticas del macerado de las cortezas vegetales.....	51
Tabla 6. Pesos del extracto etanólico de las cortezas vegetales.....	52
Tabla 7. Porcentaje de rendimiento del extracto etanólico de las cortezas vegetales	52
Tabla 8. Halos de inhibición formados por las distintas concentraciones del extracto etanólico de las cortezas vegetales sobre <i>M. furfur</i> ATCC 14521	54
Tabla 9. Halos de inhibición formados por las distintas concentraciones del voriconazol sobre <i>M. furfur</i> ATCC 14521.....	55
Tabla 10. Concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de las cortezas vegetales frente a <i>M. furfur</i> ATCC 14521	56
Tabla 11. Concentración mínima inhibitoria (CMI) del voriconazol como control de calidad positivo del método frente a <i>M. furfur</i> ATCC 14521.....	57
Tabla 12 Casos de pitiriasis versicolor registrados en el Perú por meses y departamentos durante el año 2020	81
Tabla 13 Casos de pitiriasis versicolor registrados en el Perú por meses y departamentos durante el año 2021	83
Tabla 14 Casos de pitiriasis versicolor registrados en el Perú por meses y departamentos durante el año 2022	85
Tabla 15 Casos de pitiriasis versicolor registrados en el Perú por meses y departamentos durante el año 2023	87
Tabla 16 Casos de pitiriasis versicolor registrados en el Perú por meses y departamentos durante el año 2024	89

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1. <i>Iryanthera juruensis</i> A) Cortezas frescas B) Cortezas secas	106
Fotografía 2. <i>Virola calophylla</i> A) Cortezas frescas B) Cortezas secas.....	106
Fotografía 3. <i>Vismia amazonica</i> A) Cortezas frescas B) Cortezas secas	106
Fotografía 4. Macerado de las cortezas vegetales en etanol. A) <i>I. juruensis</i> B) <i>V. calophylla</i> C) <i>V. amazonica</i>	107
Fotografía 5. Proceso de filtración del macerado de las cortezas vegetales A) <i>I. juruensis</i> B) <i>V. calophylla</i> C) <i>V. amazonica</i>	107
Fotografía 6. <i>Iryanthera juruensis</i> A) Filtrado de las 2 primeras semanas B) Filtrado de la tercera semana C) Filtrado de la cuarta semana	108
Fotografía 7. <i>Virola calophylla</i> A) Filtrado de las 2 primeras semanas B) Filtrado de la tercera semana C) Filtrado de la cuarta semana.....	108
Fotografía 8. <i>Vismia amazonica</i> A) Filtrado de las 2 primeras semanas B) Filtrado de la tercera semana C) Filtrado de la cuarta semana.....	108
Fotografía 9. Evaporación del solvente en el rotavapor	109
Fotografía 10. Soluciones concentradas de los extractos crudos A) <i>V. amazonica</i> B) <i>I. juruensis</i> C) <i>V. calophylla</i>	109
Fotografía 11. Secado de los extractos crudos de las cortezas vegetales en la estufa A) <i>V. amazonica</i> B) <i>I. juruensis</i> C) <i>V. calophylla</i>	109
Fotografía 12. Dilución del extracto etanólico en DMSO al 100%	110
Fotografía 13. <i>Iryanthera juruensis</i> en DMSO al 100%	110
Fotografía 14. <i>Virola calophylla</i> en DMSO al 100%.....	111
Fotografía 15. <i>Vismia amazonica</i> en DMSO al 100%	111
Fotografía 16. Dilución del extracto etanólico en DMSO al 10%	112
Fotografía 17. <i>Iryanthera juruensis</i> en DMSO al 10%	112
Fotografía 18. <i>Virola calophylla</i> en DMSO al 10%.....	113
Fotografía 19. <i>Vismia amazonica</i> en DMSO al 10%	113
Fotografía 20. A) Abrir la bolsa de la cepa KWIK-STIK <i>M. furfur</i> ATCC 14521 liofilizada a la altura de la muesca y retirar la ampolla.....	116

Fotografía 21. B) Apretar la ampolla en la parte superior de la tapa para liberar el líquido hidratante y mantenerla en posición vertical para que el líquido fluya hasta la parte inferior e hidrate el gránulo	116
Fotografía 22. C) Apretar la parte inferior para que el gránulo se diluya junto con el líquido.....	117
Fotografía 23. D) Retirar la etiqueta y pegarla en la placa de cultivo principal	118
Fotografía 24. E) Saturar el hisopo con el material hidratado e hisopar sobre el tercio de una placa Petri con SDAO T40.....	118
Fotografía 25. F) Hacer estrías con un asa de siembra para tener colonias aisladas.....	119
Fotografía 26. Crecimiento de <i>M. furfur</i> ATCC 14521 en agar Sabouraud dextrosa suplementado con aceite de oliva al 0.5% y Tween 40 al 0.5% (SDAO T40).....	121
Fotografía 27. Ausencia de crecimiento de <i>M. furfur</i> ATCC 14521 en agar Sabouraud dextrosa (SDA)	121
Fotografía 28. Observación de levaduras de <i>M. furfur</i> ATCC 14521 en el microscopio	122
Fotografía 29. Colonias inoculadas y sedimentadas de <i>M. furfur</i> ATCC 14521 cultivadas en SDBO T40 a las 02 horas.....	124
Fotografía 30. Aumento significativo de la biomasa sedimentada de <i>M. furfur</i> ATCC 14521 cultivadas en SDBO T40 a las 48 horas.....	124
Fotografía 31. Observación en el microscopio del cultivo no contaminado de <i>M. furfur</i> ATCC 14521 en SDBO T40.....	126
Fotografía 32. Sedimento (pellet) de la biomasa cosechada de <i>M. furfur</i> ATCC 14521 en el fondo de cada tubo de Eppendorf.....	126
Fotografía 33. Turbidez en NaCl al 0.85 % a 0.5 de Mc. Farland igual a $1-5 \times 10^6$ UFC/mL de <i>M. furfur</i> ATCC 14521	128
Fotografía 34. A) Inocular 100 μ L de la suspensión $1 - 5 \times 10^6$ UFC/mL de <i>M. furfur</i> ATCC 14521 en cada placa Petri con SDAO al 0.5% y Tween 40 al 0.5%.....	129
Fotografía 35. B) Sembrar el inóculo en toda la superficie del medio de cultivo de SDAO T40 usando hisopos de algodón estériles	129
Fotografía 36. C) Hacer un pozo de 6 mm de diámetro en medio de cada placa de SDAO T40 con un sacabocado de acero.....	130
Fotografía 37. D) Agregar 80 μ L del antifúngico diluido a una determinada concentración en el pozo de cada placa de SDAO T40	130

Fotografía 38. Ausencia de halo de inhibición de <i>I. juruensis</i> a 500 mg/mL por duplicado frente a <i>M. furfur</i> ATCC 14521 en SDAO T40	132
Fotografía 39. Ausencia de halo de inhibición de <i>I. juruensis</i> a 250 mg/mL por duplicado frente a <i>M. furfur</i> ATCC 14521 en SDAO T40	132
Fotografía 40. Ausencia de halo de inhibición de <i>I. juruensis</i> a 125 mg/mL por duplicado frente a <i>M. furfur</i> ATCC 14521 en SDAO T40	133
Fotografía 41. Ausencia de halo de inhibición de <i>I. juruensis</i> a 62.5 mg/mL por duplicado frente a <i>M. furfur</i> ATCC 14521 en SDAO T40	133
Fotografía 42. Ausencia de halo de inhibición de <i>I. juruensis</i> a 31.25 mg/mL por duplicado frente a <i>M. furfur</i> ATCC 1452 en SDAO T40.....	134
Fotografía 43. Presencia de halo de inhibición de <i>V. calophylla</i> a 500 mg/mL por duplicado frente a <i>M. furfur</i> ATCC 14521 en SDAO T40.....	134
Fotografía 44. Presencia de halo de inhibición de <i>V. calophylla</i> a 250 mg/mL por duplicado frente a <i>M. furfur</i> ATCC 14521 en SDAO T40.....	135
Fotografía 45. Presencia de halo de inhibición de <i>V. calophylla</i> a 125 mg/mL por duplicado frente a <i>M. furfur</i> ATCC 14521 en SDAO T40.....	135
Fotografía 46. Presencia de halo de inhibición de <i>V. calophylla</i> a 62.5 mg/mL por duplicado frente a <i>M. furfur</i> ATCC 14521 en SDAO T40.....	136
Fotografía 47. Ausencia de halo de inhibición de <i>V. calophylla</i> a 31.25 mg/mL por duplicado frente a <i>M. furfur</i> ATCC 14521 en SDAO T40.....	136
Fotografía 48. Presencia de halo de inhibición de <i>V. amazonica</i> a 500 mg/mL por duplicado frente a <i>M. furfur</i> ATCC 14521 en SDAO T40.....	137
Fotografía 49. Ausencia de halo de inhibición de <i>V. amazonica</i> a 250 mg/mL por duplicado frente a <i>M. furfur</i> ATCC 14521 en SDAO T40.....	137
Fotografía 50. Ausencia de halo de inhibición de <i>V. amazonica</i> a 125 mg/mL por duplicado frente a <i>M. furfur</i> ATCC 14521 en SDAO T40.....	138
Fotografía 51. Ausencia de halo de inhibición de <i>V. amazonica</i> a 62.5 mg/mL por duplicado frente a <i>M. furfur</i> ATCC 14521 en SDAO T40.....	138
Fotografía 52. Ausencia de halo de inhibición de <i>V. amazonica</i> a 31.25 mg/mL por duplicado frente a <i>M. furfur</i> ATCC 14521 en SDAO T40.....	139
Fotografía 53. Ausencia de halo de inhibición de DMSO al 100 % por duplicado como control negativo frente a <i>M. furfur</i> ATCC 14521 en SDAO T40.....	139

Fotografía 54. Presencia de halo de inhibición de Voriconazol a 32 µg/mL por duplicado como control de calidad positivo del método frente a <i>M. furfur</i> ATCC 14521 por el método de difusión en pozos en SDAO T40	141
Fotografía 55. Presencia de halo de inhibición de Voriconazol a 16 µg/mL por duplicado como control de calidad positivo del método frente a <i>M. furfur</i> ATCC 14521 por el método de difusión en pozos en SDAO T40	141
Fotografía 56. Presencia de halo de inhibición de Voriconazol a 8 µg/mL por duplicado como control de calidad positivo del método frente a <i>M. furfur</i> ATCC 14521 por el método de difusión en pozos en SDAO T40	142
Fotografía 57. Presencia de halo de inhibición de Voriconazol a 4 µg/mL por duplicado como control de calidad positivo del método frente a <i>M. furfur</i> ATCC 14521 por el método de difusión en pozos en SDAO T40	142
Fotografía 58. Presencia de halo de inhibición de Voriconazol a 2 µg/mL por duplicado como control de calidad positivo del método frente a <i>M. furfur</i> ATCC 14521 por el método de difusión en pozos en SDAO T40	143
Fotografía 59. Ausencia de halo de inhibición de Voriconazol a 1 µg/mL por duplicado como control de calidad positivo del método frente a <i>M. furfur</i> ATCC 14521 por el método de difusión en pozos en SDAO T40	143
Fotografía 60. Ausencia de halo de inhibición de Voriconazol a 0.5 µg/mL por duplicado como control de calidad positivo del método frente a <i>M. furfur</i> ATCC 14521 por el método de difusión en pozos en SDAO T40	144
Fotografía 61. Ausencia de halo de inhibición de Voriconazol a 0.25 µg/mL por duplicado como control de calidad positivo del método frente a <i>M. furfur</i> ATCC 14521 por el método de difusión en pozos en SDAO T40	144
Fotografía 62. Ausencia de halo de inhibición de Voriconazol a 0.12 µg/mL por duplicado como control de calidad positivo del método frente a <i>M. furfur</i> ATCC 14521 por el método de difusión en pozos en SDAO T40	145
Fotografía 63. Ausencia de halo de inhibición de Voriconazol a 0.06 µg/mL por duplicado como control de calidad positivo del método frente a <i>M. furfur</i> ATCC 14521 por el método de difusión en pozos en SDAO T40	145
Fotografía 64. Ausencia de halo de inhibición del DMSO al 2 % en RPMI por duplicado como control negativo frente a <i>M. furfur</i> ATCC 14521 por el método de difusión en pozos en SDAO T40	146

Fotografía 65. Diluciones seriadas del inóculo de <i>M. furfur</i> ATCC 14521 a las concentraciones de $1-5 \times 10^5$ UFC/mL (MF 5), $1-5 \times 10^4$ UFC/mL (MF 4) y $1-5 \times 10^3$ UFC/mL (MF 3) en el medio de cultivo de SDBO T40.....	149
Fotografía 66. Concentración Mínima Inhibitoria del extracto etanólico de <i>I. juruensis</i> por duplicado contra <i>M. furfur</i> ATCC 14521 por el método de microdilución en SDBO T40. En las filas E y F no se observa la CMI	151
Fotografía 67. Subcultivo en SDAO T40 a partir del enfrentamiento del extracto etanólico de <i>I. juruensis</i> para hallar la CMI por el método de microdilución contra <i>M. furfur</i> ATCC 14521 A) Resistencia a 125 mg/ml B) Resistencia a 62.5 mg/ml.....	151
Fotografía 68. Subcultivo en SDAO T40 a partir del enfrentamiento del extracto etanólico de <i>I. juruensis</i> para hallar la CMI por el método de microdilución contra <i>M. furfur</i> ATCC 14521 A) Resistencia a 31.25 mg/ml B) Resistencia a 15.62 mg/ml.....	152
Fotografía 69. Subcultivo en SDAO T40 a partir del enfrentamiento del extracto etanólico de <i>I. juruensis</i> para hallar la CMI por el método de microdilución contra <i>M. furfur</i> ATCC 14521 A) Resistencia a 7.81 mg/ml B) Resistencia a 3.9 mg/ml.....	152
Fotografía 70. Subcultivo en SDAO T40 a partir del enfrentamiento del extracto etanólico de <i>I. juruensis</i> para hallar la CMI por el método de microdilución contra <i>M. furfur</i> ATCC 14521 A) Resistencia a 1.95 mg/ml B) Resistencia a 0.97 mg/ml	153
Fotografía 71. Subcultivo en SDAO T40 a partir de los controles en DMSO al 10% para hallar la CMI por el método de microdilución contra <i>M. furfur</i> ATCC 14521 A) Control de crecimiento B) Control de esterilidad	153
Fotografía 72. Concentración Mínima Inhibitoria del extracto etanólico de <i>V. calophylla</i> por duplicado contra <i>M. furfur</i> ATCC 14521 por el método de microdilución en SDBO T40. La columna 2 de las filas C y D marcada en verde corresponde a la CMI a 62.5 mg/ml.....	155
Fotografía 73. Subcultivo en SDAO T40 a partir del enfrentamiento del extracto etanólico de <i>V. calophylla</i> para hallar la CMI por el método de microdilución contra <i>M. furfur</i> ATCC 14521 A) Sensibilidad a 125 mg/ml B) Sensibilidad a 62.5 mg/ml	155
Fotografía 74. Subcultivo en SDAO T40 a partir del enfrentamiento del extracto etanólico de <i>V. calophylla</i> para hallar la CMI por el método de microdilución contra <i>M. furfur</i> ATCC 14521 A) Resistencia a 31.25 mg/ml B) Resistencia a 15.62 mg/ml.....	156

Fotografía 75. Subcultivo en SDAO T40 a partir del enfrentamiento del extracto etanólico de <i>V. calophylla</i> para hallar la CMI por el método de microdilución contra <i>M. furfur</i> ATCC 14521 A) Resistencia a 7.81 mg/ml B) Resistencia a 3.9 mg/ml	156
Fotografía 76. Subcultivo en SDAO T40 a partir del enfrentamiento del extracto etanólico de <i>V. calophylla</i> para hallar la CMI por el método de microdilución contra <i>M. furfur</i> ATCC 14521 A) Resistencia a 1.95 mg/ml B) Resistencia a 0.97 mg/ml	157
Fotografía 77. Subcultivo en SDAO T40 a partir del enfrentamiento del extracto etanólico de <i>V. calophylla</i> para hallar la CMI por el método de microdilución contra <i>M. furfur</i> ATCC 14521 A) Resistencia a 0.48 mg/ml B) Resistencia a 0.24 mg/ml	157
Fotografía 78. Concentración Mínima Inhibitoria del extracto etanólico de <i>V. amazonica</i> por duplicado contra <i>M. furfur</i> ATCC 14521 por el método de microdilución en SDBO T40. La columna 2 de las filas A y B marcada en rojo corresponde a la CMI a 62.5 mg/ml	159
Fotografía 79. Subcultivo en SDAO T40 a partir del enfrentamiento del extracto etanólico de <i>V. amazonica</i> para hallar la CMI por el método de microdilución contra <i>M. furfur</i> ATCC 14521 A) Sensibilidad a 125 mg/ml B) Sensibilidad a 62.5 mg/ml	159
Fotografía 80. Subcultivo en SDAO T40 a partir del enfrentamiento del extracto etanólico de <i>V. amazonica</i> para hallar la CMI por el método de microdilución contra <i>M. furfur</i> ATCC 14521 A) Resistencia a 31.25 mg/ml B) Resistencia a 15.62 mg/ml.....	160
Fotografía 81. Subcultivo en SDAO T40 a partir del enfrentamiento del extracto etanólico de <i>V. amazonica</i> para hallar la CMI por el método de microdilución contra <i>M. furfur</i> ATCC 14521 A) Resistencia a 7.81 mg/ml B) Resistencia a 3.9 mg/ml	160
Fotografía 82. Subcultivo en SDAO T40 a partir del enfrentamiento del extracto etanólico de <i>V. amazonica</i> para hallar la CMI por el método de microdilución contra <i>M. furfur</i> ATCC 14521 A) Resistencia a 1.95 mg/ml B) Resistencia a 0.97 mg/ml	161
Fotografía 83. Subcultivo en SDAO T40 a partir del enfrentamiento del extracto etanólico de <i>V. amazonica</i> para hallar la CMI por el método de microdilución contra <i>M. furfur</i> ATCC 14521 A) Resistencia a 0.48 mg/ml B) Resistencia a 0.24 mg/ml	161
Fotografía 84. Concentración Mínima Inhibitoria del voriconazol por duplicado contra <i>M. furfur</i> ATCC 14521 por el método de microdilución en SDBO T40. La columna 9 de las filas A y B marcada en rojo corresponde a la CMI del voriconazol a 0.12 µg/ml ..	163

RELACIÓN DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AFLP: Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados

cm: centímetros

CIEFOR: Centro de Investigación y Enseñanza Forestal

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

DMSO: Dimetilsulfóxido

g: gramo

L: litro

mg: miligramo

ml: mililitro

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

PFGE: Electroforesis en gel en campo pulsado

RAPD: Amplificación aleatoria de ADN polimórfico

rRNA: Ácido ribonucleico ribosómico

SDA: Agar Sabouraud dextrosa

SDAO T40: Agar Sabouraud dextrosa suplementado con aceite de oliva al 0.5% y Tween 40 al 0.5%

SDBO T40: Caldo Sabouraud dextrosa suplementado con aceite de oliva al 0.5% y Tween 40 al 0.5%

µg: microgramo

µl: microlitro

UNAP: Universidad Nacional de la Amazonía Peruana

UNMSM: Universidad Nacional Mayor de San Marcos

UFC: Unidad formadora de colonias

UTM: Universal transversal de Mercator

VZ: Voriconazol

GLOSARIO

- Ácidos carboxílicos:** Compuestos orgánicos que poseen un grupo funcional carboxilo.
- Ácidos grasos:** Es una biomolécula de naturaleza lipídica formada por una larga cadena hidrocarbonada lineal, de diferente longitud en cuyo extremo hay un grupo carboxilo.
- Actividad citotóxica:** Es la capacidad que tienen algunas células para ser tóxicas.
- Actividad queratolítica:** Es la capacidad que tiene un fármaco para tratar lesiones de exceso de células producidas por la epidermis.
- Agente etiológico:** Organismo biológico capaz de producir enfermedad.
- Anfotericina B:** Es un antifúngico constituido por grupos aminos y carboxílicos.
- Azoles:** Son antifúngicos que están formados por un anillo imidazólico libre unido mediante enlace carbono-nitrógeno a otros anillos aromáticos
- β -glucosidasa:** Es una enzima glucosidasa que posee actividad hidrolítica y transferasa (cataliza la transferencia de un grupo funcional)
- Basidiomiceto:** Es una división del reino Fungi que incluye los hongos que producen basidios con basidiosporas.
- Blastoconidios:** Son esporas formadas por gemación como resultado de la reproducción asexual de origen blástico en varios hongos.
- Catalasa:** Es una enzima que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua.
- Capa córnea:** Es la capa más externa de la epidermis
- Concentración Mínima Inhibitoria:** Es la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento de un microorganismo.
- Dermatofito:** Son hongos filamentosos que invaden las capas superficiales queratinizadas de la piel, pelos y uñas.
- Enlace glucosídico:** Es el enlace por el cual un glúcido se une con otra molécula.
- Epidermis:** Es la capa exterior de la piel.
- Ergosterol:** Es el principal componente de las membranas celulares de hongos.
- Esculetina:** Es un antioxidante que modula el balance redox en diferentes células con propiedades antiinflamatorias y antitumorales.
- Esculina:** Reacciona con los iones de hierro para formar un compuesto negro.

Esporas: Es una célula haploide unicelular o pluricelular que se forma para la dispersión y supervivencia por largo tiempo en condiciones adversas.

Esteroles: Componente de la membrana celular de hongos y levaduras

Eucariota: Son organismos que poseen células con pared celular, orgánulos y núcleo verdadero

Exógenos: Sustancia, órgano, agente o estímulo que se origina o forma fuera del organismo.

Extracto etanólico: Preparado que se obtiene macerando una planta en etanol.

Filamentos: Son células cilíndricas rodeadas por una pared celular tubular que forman las unidades estructurales de los hongos, también conocidos como hifas.

Floema: Tejido conductor que transporta nutrientes producidos en la parte aérea fotosintética y autótrofa hacia la parte subterránea, no fotosintética y heterótrofas de las plantas vasculares.

Folículos pilosos: Son cavidades en la piel que dan origen al crecimiento de los vellos

Glándulas sebáceas: Se encuentran en la piel, formadas por células llenas de lípidos cuya función es lubricar y proteger la piel

Hepatocito: Células que realizan las funciones metabólicas del hígado.

Hidrolasa: Es una enzima que cataliza la hidrólisis (reacción entre el agua y otra molécula).

Hifas: Son filamentos fúngicos que se originan a partir de las esporas que conforman los cuerpos fructíferos de los hongos macroscópicos y hongos unicelulares o pluricelulares.

Hospedero: Es un organismo que alberga a otro en su interior o lo porta sobre sí, en una simbiosis de parasitismo, mutualismo o comensalismo.

Levaduras: Son hongos microscópicos unicelulares que se reproducen asexualmente por gemación o bipartición.

Lípido: Molécula biológica insoluble en agua y rica en energías

Lipodependiente: Necesidad de lípidos exógenos para crecer.

Lipofilico: Afinidad por los lípidos.

Melanina: Es una sustancia natural que le da color a los ojos, al cabello y a la piel.

Melanocitos: Células de la piel que producen melanina

Melanosoma: Es un orgánulo o compartimiento donde se sintetiza, almacena y transporta la melanina.

Micelio: Conjunto de hifas que forman el cuerpo de un hongo.

Micosis: Enfermedad producida por hongos.

Patógeno: Microorganismo que puede causar enfermedad a su huésped.

Permeabilidad: Es la capacidad que tiene un material de permitirle a un fluido que lo atraviese sin alterar su composición

Procariota: Son organismos que carecen de núcleo verdadero y su ADN se encuentra disperso en el citoplasma

Saprobio: Organismo que se nutre de los residuos de otros organismos.

Sintasa: Es una enzima que cataliza la unión de dos sustratos sin la presencia de ATP.

Tirosina: Es un aminoácido precursor de neurotransmisores, de hormonas y melanina.

Tubos cribosos: Células vivas anucleadas que son el principal conductor del floema.

Vástago: Es la unidad formada por tallo, hojas y flores

Zoofilico: Contagio o transmisión a los humanos a través del contacto con los animales

RESUMEN

La pitiriasis versicolor es una enfermedad infecciosa de distribución mundial que afecta a la piel, la cual es originada por hongos del género *Malassezia* y en los últimos años se ha reportado en nuestro país una prevalencia de casos principalmente en los departamentos de Lima y Loreto.

En la presente tesis se tuvo como objetivo evaluar la actividad antifúngica *in vitro* del extracto etanólico de las cortezas de *Virola calophylla* Warb., *Vismia amazonica* Ewan e *Iryanthera juruensis* Warb. a través de pruebas de sensibilidad antifúngica contra *Malassezia furfur* ATCC 14521. Para ello se realizó la colecta de las muestras y cortezas vegetales en el CIEFOR (Centro de Investigación y Enseñanza Forestal) en Puerto Almendra de la Facultad de Ciencias Forestales de la UNAP en Loreto, Perú. La identificación y autenticidad de las muestras botánicas herborizadas se realizaron en el laboratorio de Botánica Aplicada de la UPCH, luego fueron acreditadas y depositadas en el herbario del Museo de Historia Natural de la UNMSM.

En nuestros resultados se demostró que los extractos etanólicos de *Virola calophylla* y *Vismia amazonica* presentaron actividad frente a *M. furfur* ATCC 14521 en los métodos de sensibilidad antifúngica evaluados, mientras que *Iryanthera juruensis* no tuvo efecto en ninguno de los ensayos. Con respecto a los valores obtenidos por el método de difusión en pozos en SDAO T40, se observó que *Virola calophylla* posee más actividad sobre *Malassezia furfur* al formar halos de inhibición de mayor medida desde las diluciones de 500 mg/ml hasta 62.5 mg/ml en DMSO al 100%, en comparación a *Vismia amazonica* que solo formó halos de inhibición a la concentración de 500 mg/ml en DMSO al 100% y de menor tamaño. Por otro lado, al determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) por el método de microdilución en SDBO T40 ante *Malassezia furfur*, se obtuvo una CMI de 62.5 mg/ml en DMSO al 10% para *V. calophylla* y *V. amazonica*. Por lo tanto, se concluye que el extracto etanólico de las cortezas de *Virola calophylla* y *Vismia amazonica* poseen actividad antifúngica *in vitro* contra *M. furfur* ATCC 14521.

PALABRAS CLAVE

Actividad antifúngica *Iryanthera juruensis* *Malassezia furfur* ATCC 14521
Virola calophylla *Vismia amazonica*

ABSTRACT

Pityriasis versicolor is a worldwide infectious skin disease caused by fungi of the genus *Malassezia*. In recent years, a prevalence of cases has been reported in our country, mainly in the departments of Lima and Loreto.

The objective of this thesis was to evaluate the *in vitro* antifungal activity of the ethanolic extract of the bark of *Virola calophylla* Warb., *Vismia amazonica* Ewan and *Iryanthera juruensis* Warb. through antifungal sensitivity tests against *Malassezia furfur* ATCC 14521. To this end, plant samples and barks were collected at the CIEFOR (Forestry Research and Teaching Center) in Puerto Almendra, located at the Faculty of Forestry Sciences of the UNAP in Loreto, Peru. The botanical samples were identified and authenticated in the Applied Botany Laboratory of the UPCH. They were then certified and deposited in the herbarium of the Natural History Museum of the UNMSM. Our results showed that ethanolic extracts of *Virola calophylla* and *Vismia amazonica* showed activity against *M. furfur* ATCC 14521 in the antifungal susceptibility methods evaluated, while *Iryanthera juruensis* had no effect in any of the assays. Regarding the values obtained by the well diffusion method in SDAO T40, it was observed that *Virola calophylla* has more activity on *Malassezia furfur* by forming inhibition halos of greater extent from dilutions of 500 mg/ml to 62.5 mg/ml in 100% DMSO, compared to *Vismia amazonica* which only formed inhibition halos at the concentration of 500 mg/ml in 100% DMSO and of smaller size. Furthermore, when determining the minimum inhibitory concentration (MIC) by the microdilution method in SDBO T40 against *Malassezia furfur*, an MIC of 62.5 mg/ml in 10% DMSO was obtained for *V. calophylla* and *V. amazonica*. Therefore, it is concluded that the ethanolic extract of the barks of *Virola calophylla* and *Vismia amazonica* possess *in vitro* antifungal activity against *M. furfur* ATCC 14521.

KEYWORDS

Antifungal activity *Iryanthera juruensis* Pityriasis versicolor *Virola calophylla*
Vismia amazonica

I.- INTRODUCCIÓN

Los hongos fueron uno de los primeros organismos que surgieron en nuestro planeta, los cuales están constituidos por células eucariotas, a diferencia de las bacterias que están formadas por células procariotas. Los hongos pueden ser unicelulares como las levaduras o multicelulares como las hifas que forman la unidad fundamental de los hongos filamentosos y el conjunto de las mismas se denomina micelio y el agrupamiento de este último forma la colonia del hongo (1). En términos de micosis se habla de enfermedades infecciosas, las cuales son ocasionadas por hongos patógenos que se caracterizan por sobrevivir como microorganismos en un hospedero como humanos, animales y vegetales (2) (3).

Hoy en día, se ha reportado más de 300 especies de hongos con potencial patógeno en seres humanos y aproximadamente el 90 % de las infecciones micóticas humanas son ocasionadas en su mayoría por los géneros *Candida*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Trichophyton*, *Cladosporium*, *Sporothrix*, *Cryptococcus*, *Microsporum*, *Malassezia*, *Epidermophyton* y *Pneumocystis spp*, entre otros; los cuales han sido combatidos con fármacos antifúngicos de amplio espectro como los azoles y la anfotericina B que principalmente inhiben la biosíntesis del ergosterol y en consecuencia dañan la membrana celular de los hongos, ocasionando la muerte de los mismos (4) (5). Sin embargo, la alta toxicidad y el desarrollo de resistencia asociados al uso clínico de azoles y anfotericina B, han generado la búsqueda de nuevos agentes antimicóticos para tratar enfermedades originadas por hongos patógenos (6). Por lo cual se han buscado nuevos compuestos químicos presentes en las plantas para controlar las infecciones provocadas por hongos, puesto que las plantas son una fuente rica de una gran diversidad de metabolitos secundarios con principios bioactivos como alcaloides, saponinas, taninos, terpenoides, flavonoides y otros que poseen actividad antifúngica (7).

1.1 Pitiriasis Versicolor

1.1.1 Historia de *Malassezia furfur*

Las primeras descripciones fueron reportadas por Robert William, pero en 1846 Eichstedt reconoció la existencia de filamentos y levaduras en la piel de pacientes con pitiriasis versicolor (8). En 1853 Robin aisló el hongo y lo consideró un dermatofito, nombró al agente *Microsporon furfur* y a la afección, tinea versicolor. En 1889 Baillon propuso el género *Malassezia* en honor a Malassez y a *M. furfur* como agente etiológico (9) (10). En los siguientes años se reconocieron los nombres *Malassezia furfur*, *Pityrosporum ovale* y *Pityrosporum orbiculare*, de los cuales los dos últimos han dejado de utilizarse (11). En 1930 Beham argumentó los impedimentos para cultivar *Malassezia furfur*, puesto que el medio de cultivo necesitaba tener una sustancia que favoreciera el crecimiento del hongo (12). En 1969 Sternberg y Keddie detectaron los mismos componentes antigénicos en *Pityrosporum orbiculare* y *Malassezia furfur* mediante la técnica de anticuerpos fluorescentes (13). Actualmente el género *Malassezia* incluye 14 especies de hongos basidiomicetos, 13 lipofílicas entre las cuales se encuentra *M. furfur* y una no lipodependiente conocida como *M. Pachydermatis* (14).

1.1.2 Epidemiología

Es una enfermedad distribuida a nivel mundial que afecta a sujetos sanos de ambos sexos, principalmente adultos jóvenes; es predominante en regiones tropicales y subtropicales con incidencia del 32 % en estas áreas (9) (15). Comprende el 5 % de las micosis en general y el 20 % de las superficiales; se observa en cualquier raza, estado socioeconómico y en pacientes inmunosuprimidos (10). La mayoría de los casos de pitiriasis versicolor han sido reportados en zonas de Centro y Sudamérica, África, en el Mediterráneo, India y la Polinesia (15). Por otro lado, las especies de *Malassezia spp* se han identificado en la piel de animales como osos, puercos, rinocerontes, elefantes, pájaros, monos y perros (10).

1.1.3 Agente Etiológico

Actualmente, existe mucha controversia científica sobre el agente causal de esta enfermedad, ya que se ha encontrado que distintas especies de *Malassezia spp* pueden

generar pitiriasis versicolor. Por muchos años, *Malassezia furfur* fue considerado como el organismo más importante que causaba pitiriasis versicolor (16). Aunque, en la literatura y en la mayoría de las recientes investigaciones señalan a *Malassezia globosa* como el principal agente etiológico de la pitiriasis versicolor, puesto que en gran parte de los casos clínicos han aislado específicamente a *M. globosa* dentro de un alto porcentaje de pacientes con pitiriasis versicolor alrededor del mundo (17) (18).

En un estudio realizado en Chile, se identificó a *Malassezia pachydermatis* como agente causal de la pitiriasis versicolor en humanos y como posible fuente de transmisión hacia animales domésticos, debido a que *M. pachydermatis* es zoofílica (19). Por otro lado, hay algunos estudios que indican cómo la especie más importante causante de esta enfermedad a *Malassezia sympodialis* en zonas de la India, Argentina y Canadá y a *Malassezia furfur* en Panamá, Indonesia y Brasil (8) (20) (18) (21). En Lima (Perú) señalan a *M. obtusa* *M. slooffiae* como patógenos de la pitiriasis versicolor (22).

Debido a múltiples investigaciones realizadas, sigue siendo un debate científico saber si hay más de una especie de *Malassezia spp* implicada en la pitiriasis versicolor. Hay hipótesis que sugieren a *M. globosa* como el agente predominante en zonas templadas y a *M. furfur* prevaleciente en zonas tropicales, lo cual indica que la pitiriasis versicolor es una micosis ocasionada por más de un agente patógeno de un mismo género, según la distribución geográfica y las características climáticas (18) (23).

1.1.4 Lipodependencia

La pitiriasis versicolor es una micosis causada por hongos patógenos lipodependientes del género *Malassezia spp* (11). La lipofilia es una de las principales características de estas especies, debido a un defecto que tienen en sintetizar ácidos grasos y requieren de ácidos grasos exógenos para sobrevivir. Por lo cual, la mayoría de estos hongos son aislados de zonas del cuerpo que presentan muchas glándulas sebáceas (19). Sin embargo, *Malassezia pachydermatis* es considerada como la única especie lipofílica pero no es lipodependiente causante de pitiriasis versicolor, ya que requiere de mínimas cantidades de lípidos exógenos para crecer (24).

A nivel genómico, se ha comprobado la ausencia de un gen codificante para la sintasa de ácidos grasos en todas las especies de *Malassezia*, pero esta deficiencia enzimática es compensada por la presencia de muchos genes codificantes para hidrolasas y así poder hidrolizar los lípidos externos para obtener ácidos grasos (25).

1.1.5 Características Clínicas

La pitiriasis versicolor es una enfermedad asintomática que causa cambios desiguales en el color de la piel y provoca problemas estéticos en los pacientes (8). Las lesiones que aparecen en la piel suelen ser hipocrómicas (hipopigmentadas o blancas) que son las más comunes, hipercrómicas (hiperpigmentadas o marrón claro) y mixtas (hipocrómicas e hipercrómicas) como se observa en la Fig. 1 (18). Las lesiones hipocrómicas son más frecuentes en piel morena y las hipercrómicas en piel blanca, aunque se han registrado casos inversos o mixtos independientemente del color de la piel (11). Los lugares más afectados del cuerpo son donde predominan las glándulas sebáceas, debido a la lipodependencia del hongo. En adultos, las zonas más afectadas son el abdomen, cuello, la parte anterior y posterior del tronco, mientras que las zonas menos afectadas son la cara, el cuero cabelludo y los genitales. En niños y neonatos las zonas más frecuentes son la cara, las extremidades, el cuero cabelludo, las nalgas, la parte anterior y posterior del tronco (9) (10).



Figura 1. Distintos tipos de lesiones causadas por la pitiriasis versicolor: (A) mixtas, (B) hipocrómicas y (C) hipercrómicas

1.1.6 Histopatología

El género *Malassezia spp* infecta la parte superficial de la capa córnea de la epidermis, localizándose entre las células córneas y penetrando dentro de las mismas (8). En las muestras de biopsias de pacientes con pitiriasis versicolor se ve la presencia de hifas y

esporas en la superficie del estrato córneo, las cuales se evidencian fácilmente con la tinción de hematoxilina-eosina como se observa en la Fig. 2 (26) (27).

En su fase de levadura, *Malassezia spp* vive como saprofito en la piel seborreica y en los folículos pilosos; para producir pitiriasis versicolor es necesaria su transformación a la fase micelial (patógena) (9). Una vez que los micelios se localizan en la capa córnea, estos producen ácidos dicarboxílicos como el ácido azelaico que inhibe a la tirosinasa (enzima que cataliza la producción de melanina) y un posible efecto citotóxico sobre los melanocitos, lo cual explica la característica hipocrómica de la pitiriasis versicolor (27). Sin embargo, Gotham y sus colaboradores demostraron que *Malassezia furfur* “*in vitro*” no actúa desintegrando o aprovechando la tirosina y creen que la hipocromía es causada por algún bloqueo durante la síntesis de la melanina por productos originados en el metabolismo del hongo, sin el uso de la tirosina (8). Por otro lado, en las lesiones hiperpigmentadas se observan grandes melanosomas y la descamación parece ser consecuencia de la actividad queratolítica del hongo (9).

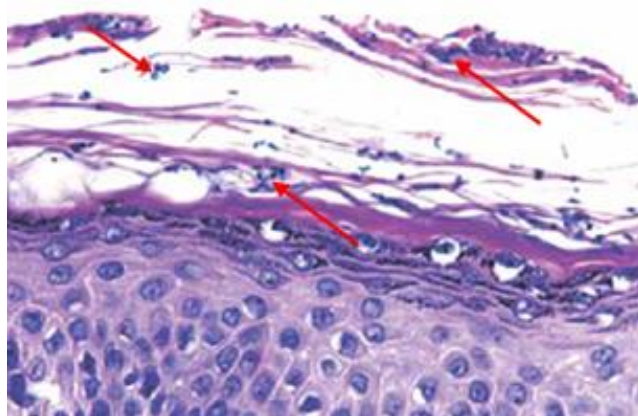


Figura 2. Hifas y esporas (señaladas) presentes en la capa córnea de la epidermis

1.1.7 Diagnóstico Médico

Las pruebas de laboratorio como los análisis microscópicos de muestras con distintos tipos de tinciones son las más usadas para el diagnóstico médico de la pitiriasis versicolor. El examen con KOH se efectúa a través de la visualización microscópica directa de los elementos fúngicos como blastoconidios y filamentos cortos en muestras de escamas epidérmicas tratadas con hidróxido de potasio (KOH) al 10 % con o sin blanco calcoflúor y adicionando tinta azul de Parker o solución de Albert (11) (15).

En la biopsia se extrae una muestra de piel lesionada, la cual es teñida con ácido peryódico – Schiff (PAS) y se observan al microscopio las estructuras fúngicas como filamentos y blastoconidios que se encuentran en la capa córnea del tejido epitelial. Por otro lado, la técnica de Luz de Wood es utilizada en consultorios o en casos poco extensos y se realiza en un cuarto oscuro con una lámpara de Wood que emite luz ultravioleta de baja intensidad y las lesiones dan una fluorescencia amarillo-verdosa característica, la cual también es útil para comprobar la eficacia del tratamiento, la cual se corrobora con la ausencia de fluorescencia (11) (12).

1.1.8 Pruebas Bioquímicas y Fisiológicas

1.1.8.1 Test de la catalasa

En un portaobjeto se coloca una gota de agua oxigenada (peróxido de hidrógeno) en contacto con una colonia de levadura. *Malassezia spp* al poseer actividad catalasa, presenta un resultado positivo con liberación de gas, puesto que esta enzima descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno (28).

1.1.8.2 Actividad β -glucosidasa

Algunas especies de *Malassezia spp* tienen la enzima β -glucosidasa, la cual hidroliza el enlace glucosídico de la esculina para liberar glucosa y esculetina. Se inoculan las levaduras de *Malassezia spp* en picadura en agar esculina en tubo y se cultivan a 32°C por cinco días. Si la reacción es positiva, se observa un ennegrecimiento del medio por la reacción del grupo fenólico de la esculetina con el hierro (25).

1.1.8.3 Termotolerancia

Los hongos del género *Malassezia spp* se caracterizan por crecer a diferentes temperaturas, lo cual permite identificarlos a nivel de especie. Se consideran los valores de crecimiento a las temperaturas de 32°C, 37°C y 40°C (25) (29).

1.1.8.4 Asimilación de Tween y Cremophor EL

En esta prueba se determina la capacidad que tienen las distintas especies de *Malassezia spp* para desarrollarse en un medio de cultivo suplementado individualmente con Cremophor EL, Tween 20, 40, 60 y 80. Los resultados se ven mediante la asimilación de cada Tween y del Cremophor luego de cultivar a 32°C y observar patrones de crecimiento microbiano cada 24 horas hasta diez días de incubación (25) (29).

1.1.9 Análisis Molecular

Las distintas técnicas de PCR son las más utilizadas para detectar especies de *Malassezia sp* amplificando genes ribosomales en varios estudios clínicos (30). Por ejemplo, la RAPD-PCR realiza la caracterización genética e investiga la identidad de las cepas a nivel molecular y el ADN genómico de algunas especies de *Malassezia sp* como *Malassezia furfur* (31). La qPCR permite identificar y cuantificar el DNA amplificado permitiendo estimar la población de especies de *Malassezia sp* (32). La PCRs múltiplex detecta simultáneamente diversas especies de *Malassezia sp* en humanos y la PCR-fingerpriting es un análisis que ayuda a investigar las asociaciones filogeográficas de cepas de *Malassezia furfur* (33).

El método de AFLP es útil para la identificación de distintos tipos genéticos dentro de las especies de *Malassezia sp*. Este procedimiento tiene el potencial de analizar una mayor cantidad de loci para polimorfismos e ilustran un amplio rango de la submuestra de todo el genoma, también permite encontrar importantes patrones epidemiológicos dentro de las especies de *Malassezia sp* y diferenciar entre sus cepas cuando no se puede identificar con pruebas fisiológicas (34).

El procedimiento de PFGE ha sido empleado para determinar el cariotipo y la variabilidad genética intraespecífica del género *Malassezia sp*. Sin embargo, esta técnica es limitada, debido a la costosa instrumentación requerida, el tiempo y la dificultad que implica la interpretación de los resultados (12) (25).

1.1.10 Tratamiento

1.1.10.1 Vía Tópica

Los tratamientos tópicos efectivos para combatir la pitiriasis versicolor es mediante el uso de lociones, cremas, champús, jabones y soluciones acuosas, los cuales se recomiendan aplicar una o dos veces al día por distintos periodos de tiempo hasta mejorar los síntomas clínicos (10). Se sugiere utilizar champús y cremas con azufre, derivados del alquitrán de hulla, ketoconazol al 2 %, climbazol al 2 %, ciclopiroxolamina al 1.5 % por 10 a 20 días (11).

También se recomienda emplear soluciones acuosas de propilenglicol, hiposulfito de sodio al 20 %, tintura de yodo; jabones y lociones con ácido salicílico y derivados azólicos

como sustancias antimicóticas; champús con piritionato de zinc o disulfuro de selenio (27).

Durante el tratamiento se advierte no usar vehículos aceitosos debido a la naturaleza lipofílica del hongo y cambiarse de prendas constantemente. Además, se debe evitar la exposición a factores desencadenantes como sudoración excesiva, altas temperaturas y abundante humedad que aumentan el crecimiento del hongo (35).

1.1.10.2 Vía Oral

Los tratamientos orales para tratar la pitiriasis versicolor son recomendados cuando la infección es grave o persistente, ya que pueden causar efectos adversos en el organismo. Se utiliza 200 mg de itraconazol diario por 7 días, 600 mg de fluconazol por día durante dos semanas, 200 mg de pramiconazol por 3 días, 200 mg ketoconazol durante 10 días y 200 mg de voriconazol cada 12 horas por 5 días (9) (36).

1.1.11 Agente Patógeno: *Malassezia furfur* ATCC 14521

1.1.11.1 Clasificación Taxonómica

Reino: Fungi

División: Basidiomycota

Subdivisión: Ustilaginomycotina

Clase: Ustilaginomyceto

Orden: Malasseziales

Familia : Malasseziaceae

Género : *Malassezia spp.*

Especie : *Malassezia furfur* (37)

1.1.11.2 Secuencia Genética

Malassezia furfur strain ATCC 14521 28S large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence (38):

1	atatcattaa	gcgaggaaa	agaaactaac	aaggattccc	ctagtaacgg	cgagtgaaga
61	gggaagagct	caaatttgaa	agctggtacc	ttcggtatcc	gcgttgtaac	ctcgagacac
121	gtttccctg	cggcgcctatg	gacaagttcc	ttggaacagg	acatcgtaga	gggtgaaaat
181	cccgtacttg	ccatggatgt	accgtgcttt	gcgatacgtg	ctctaagagt	cgagttgttt
241	gggattgcag	ctcaaatgg	gtggtagact	ccatctaaag	ctaaatcgc	gggagagacc
301	gatagcgaac	aagtaccgtg	agggaaagat	gaaaagcact	ttggaaagag	agttaaaagt
361	acgtgaaatt	gtcgaaaggg	aagcgcttga	agtcagccat	gccgctcagg	actcagcctg
421	gcttttgctt	ggtgtatttc	ctgggtagca	agtcagcatt	ggtttggatc	gtcggagaag

481 catagtcgga atgtggcgcc ctctggcggtg ttatagcctt ctattggata cgacgatcta
 541 gaccaaggaa cgcagcgcgc cttatggcgg gtcttcggac accttcgcgc ttaggatgct
 601 ggcgtaatgg cttaaagtgg c

1.1.11.3 Medios de Cultivo

Los medios de cultivo para *Malassezia furfur* ATCC 14521 deben contener suplementos lipídicos en su composición, debido al defecto que tiene en sintetizar ácidos grasos y requieren de ácidos grasos exógenos para sobrevivir (24). Es por ello que los medios de cultivo más usados y específicos para el crecimiento *in vitro* de *Malassezia furfur* ATCC 14521 son en estado sólido (agar) o líquido como el medio Dixon modificado (mDixon), medio Leeming y Notman modificado (MLN), agar y/o caldo Sabouraud dextrosa suplementado con aceite de oliva (39) (40).

1.1.11.4 Características Morfológicas

Las colonias de *Malassezia furfur* ATCC 14521 en agar mDixon son de color crema opaco, lisas y con elevación convexa. A nivel microscópico las células son ovaladas, cilíndricas o esféricas, simples o en pares y en gemación, formando ocasionalmente cadenas cortas (40).

1.2 Especies Botánicas Usadas Contra *Malassezia furfur* ATCC 14521

1.2.1 *Iryanthera juruensis* Warb.

1.2.1.1 Clasificación Taxonómica

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Magnoliidae

Orden: Magnoliales

Familia: Myristicaceae (41)

Género: *Iryanthera* Warb.

Especie: *Iryanthera juruensis* Warb. (42)

Nombre Vulgar: Cumala

1.2.1.2 Descripción Botánica

Árboles hasta 20 metros, ramitas y glabras. Sus hojas son elípticas-obovadas u obovado-oblongas, 10-20 x 3-8 cm, ápice acuminado, base atenuada, glabras, vena media emergente en ambas caras, las secundarias ligeramente impresas o planas en el haz, emergentes en el envés, 10-17 pares, en broquidódromo arqueado, incospicuo, venación terciaria, inconspicua; peciolos 6-15 mm de largo.

Sus inflorescencias estaminadas 2-9 cm, diminutamente estrigosas, flores 2-7 por fascículo, pedicelos ca. 6 mm de largo, perianto cupuliforme, 2-3.5 (4) mm de largo, partido más que la mitad de su largo; androceo 0.8-1.5 mm de largo, anteras unidas dorsalmente o divergentes, 0.3-0.5 mm de largo; inflorescencias pistiladas caulógenas o rameales, 4-9 cm de largo, flores 15-40 por fascículo, pedicelos 3-5 mm de largo; pistilo subgloboso o elipsoide. Sus frutos son cápsulas carinadas, 13-20 x 15 – 25 mm (42)

1.2.1.3 Hábitat

En tierra firme, bosque primario (ALL-M, SUC, YAN) (42)

1.2.1.4 Floración y Fructificación

La floración se produce en los meses de noviembre y marzo, mientras que la fructificación se da entre los meses de noviembre y febrero (43)

1.2.1.5 Composición Fitoquímica

En estudios previos se aisló e identificó la presencia de ariltetralina, tetrahidrofurano, 3-metil-sargacromenol, sargacromenol, ácido 3-metil-sargaquinóico, otobafenol, cagayanina, otobaina e hidroxiotobaina (44) (45) (46)

1.2.1.6 Usos Tradicionales

Según la medicina popular, se emplea el exudado del vástago para tratar heridas, llagas en la boca y contra la candidiasis (47)

1.2.1.7 Distribución Geográfica en el Perú

En los departamentos de Loreto, Huánuco, Madre de Dios, Amazonas, San Martín y Pasco (48)

1.2.2 *Virola calophylla* Warb.

1.2.2.1 Clasificación Taxonómica

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Magnoliidae

Orden: Magnoliales

Familia: Myristicaceae (41)

Género: *Virola* Aubl.

Especie: *Virola calophylla* Warb. (42)

Nombre Vulgar: Cumala

1.2.2.2 Descripción Botánica

Árboles hasta 20 metros, ramitas ferrugíneo-tomentosas. Sus hojas son ovado-oblongas o elíptico-oblongas, 12-45 x 4.5-16 cm, venas secundarias ligeramente emergentes en ambas caras, 8-27 pares, camptódromas a ligeramente en broquidódromo festoneado, ápice agudo o acuminado, base redondeada o cordada, venación terciaria subparalela, inconspicua, haz glabra, envés pubescente marrón amarillento con tricomas estrellado, sésiles, multiramificados; pecíolos 5-20 mm de largo.

Panículas estaminadas ferrugíneo-tomentosas, ca. 20 x 18 cm, flores 2-5 por fascículo, pedicelos gruesos, 1-1.5 mm de largo; perianto infundibuliforme, 1-1.5 mm de largo, androceo 0.6-0.9 mm de largo, lóbulos obtusos, anteras 3-6, unidas, 0.2-0.4 mm de largo; inflorescencias pistiladas más pequeñas que las estaminadas, flores 2-13 por fascículo, pedicelos 0.5-1 mm de largo; estigma 13 apónica, pistilo subgloboso o elipsoide. Cápsulas elipsoides u subglobosas, ferrugíneo-tomentosas, ca. 23x12 mm (42)

1.2.2.3 Hábitat

En tierra firme, bosque primario (ALL-M, SUC, YAN) (42)

1.2.2.4 Floración y Fructificación

La floración se produce entre los meses de agosto y septiembre, mientras que la fructificación se da entre los meses de octubre y marzo (43)

1.2.2.5 Composición Fitoquímica

En estudios previos se aisló e identificó la presencia de sitosterol, hidroxiotobaina, otobaeno, vainillina, dihidrochalcona, safrol y metilparabeno (49)

1.2.2.6 Usos Tradicionales

Según la medicina popular, se emplea como alucinógeno, antifúngico, contra males estomacales, paludismo y sarna (50)

1.2.2.7 Distribución Geográfica en el Perú

En los departamentos de Amazonas, Ucayali, Madre de Dios, Loreto y Pasco. (48)

1.2.3 *Vismia amazonica* Ewan

1.2.3.1 Clasificación Taxonómica

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Dilleniidae

Orden: Theales

Familia: Hypericaceae (48)

Género: *Vismia* Vand.

Especie: *Vismia amazonica* Ewan (42)

Sinónimos: *Vismia gracilis* Hieron (nombre científico aceptado), *Vismia buchtienii* Ewan, *Vismia glaziovii* Ruhland, *Vismia urceolata* Ewan (48)

Nombre Vulgar: Pichirina

1.2.3.2 Descripción Botánica

Árboles o arbustos hasta 15 metros, ramas tomentulosas. Sus hojas son lanceoladas u ovaladas, 12-15 x 5-8 cm, ápice agudo o acuminado, base obtusa o redondeada, cartáceas; peciolo 12-14mm de largo. Sus flores son panículas 8-10 cm de largo, tomentulosas, brácteas caducas, sépalos de 5-6 mm de largo, adpreso-tomentulosos o pubérulos, con margen membranáceas; pétalos de 5-8 mm de largo.

Sus frutos son bayas ovoides, ca. 8 mm de largo (42)

1.2.3.3 Hábitat

Bosque húmedo secundario (ALL-M) (48)

1.2.3.4 Floración y Fructificación

La floración se produce en noviembre (43)

1.2.3.5 Composición Fitoquímica

En estudios previos se aisló e identificó la presencia de quinonas, flavonoides, taninos, aminoácidos y esteroides (51)

1.2.3.6 Usos Tradicionales

Según la medicina popular, se emplea como anticonceptivo y para tratamientos contra micosis de la piel (50)

1.2.3.7 Distribución Geográfica en el Perú

En los departamentos de Loreto y San Martín (48)

1.3 Antecedentes

Son muy escasos los estudios que demuestren la capacidad que presentan *Vismia amazónica* “pichirina”, *Virola calophylla* “cumala” e *Iryanthera juruensis* “cumala” para combatir agentes patógenos causantes de múltiples enfermedades en el hombre.

Nué, J (51), reportó la actividad leishmanicida de *Vismia amazonica*, presentando mayor actividad la fracción hexánica del extracto crudo.

Ruge et al (49), revelaron que el extracto etanólico de la corteza de *Virola calophylla* posee mayor actividad antimicrobiana que del extracto etanólico de las hojas. También probaron que el extracto etanólico de la corteza de *V. calophylla* tiene mayor potencial antibacteriano que antifúngico.

Roumy et al (52), indicaron que la extracción con diclorometano de *Virola calophylla* tiene un gran efecto citotóxico contra *Plasmodium falciparum* que genera la enfermedad de malaria en humanos.

Morais et al (44), señalaron que *Iryanthera juruensis* tiene una alta capacidad contra *Leishmania amazonensis*, debido a la presencia de lignoides identificados a partir de la extracción etanólica de sus semillas.

Aponte et al (53), demostraron la actividad citotóxica *in vitro* de *Iryanthera juruensis* frente a las células K562 causantes de la leucemia mielógena crónica en humanos, la cual se debió a la existencia de dos dihidrochalconas dentro de sus compuestos.

Además, en el Departamento de Loreto, el exudado de las cortezas vegetales de *Vismia amazonica*, *Iryanthera juruensis* y *Virola calophylla* son usadas tradicionalmente como antimicóticos (47) (50)

1.4 Justificación

El aumento y el mal uso de antifúngicos sintéticos para tratar la pitiriasis versicolor han provocado problemas de resistencia microbiana y toxicidad de fármacos como los azoles. Nijima et al (54), señalaron la resistencia *in vitro* de *Malassezia pachydermatis* al ketoconazol e itraconazol.

Sharma et al (55) demostraron en estudios *in vitro* que *M. furfur* y *M. globosa* son menos susceptibles al ketoconazol y al fluconazol en comparación a *M. japonica* y *M. slooffiae*. Khoza et al (56), indicaron que el consumo de ketoconazol en roedores causa un alto riesgo de daño hepático, mientras que el de fluconazol provoca mayor hepatotoxicidad. Doß et al (57), comprobaron en cultivos *in vitro* con células hepáticas humanas que el fluconazol tiene un gran potencial hepatotóxico que causa daños en la función, vitalidad y viabilidad de los hepatocitos.

Por otro lado, según los datos estadísticos proporcionados por el MINSA, en los últimos cinco años (2020-2024) la prevalencia de la pitiriasis versicolor en el Perú ha sido predominante en el departamento de Loreto, seguido por la ciudad de Lima (Anexo 1), lo cual se debe a la frecuencia de esta infección en zonas tropicales con altas temperaturas y humedad, principales características del clima de Loreto (10) (58). A su vez, los altos índices de pobreza que engloban a la mayoría de la población de Loreto (59); no permiten que muchas personas puedan comprar medicamentos para tratar enfermedades como la pitiriasis versicolor, puesto que algunos son de alto costo y no son otorgados gratuitamente por el Gobierno. Dadas estas características, es importante buscar otras opciones farmacológicas contra *Malassezia spp* que puedan servir como nuevas drogas.

Una de ellas, es a través del aprovechamiento de plantas medicinales distribuidas geográficamente en el departamento de Loreto como *Vismia amazonica*, *Virola calophylla* e *Iryanthera juruensis*, las cuales son usadas tradicionalmente como antimicóticos y todavía no han sido comprobadas científicamente para tratar la pitiriasis versicolor. Motivo por el cual, en nuestro presente trabajo se busca comprobar el potencial antimicótico *in vitro* del extracto etanólico de las cortezas de *V. calophylla*, *V. amazonica* e *I. juruensis* sobre *M. furfur* ATCC 14521.

II.- HIPÓTESIS / PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

2.1 Hipótesis

Si el extracto etanólico de las cortezas de *Virola calophylla* Warb., *Iryanthera juruensis* Warb. y *Vismia amazonica* Ewan poseen actividad antimicótica, entonces podrían ejercer efecto *in vitro* sobre *M. furfur* ATCC 14521.

2.2 Pregunta de Investigación

¿El crecimiento de *M. furfur* ATCC 14521 es inhibido por el extracto etanólico de las cortezas de *V. amazonica*, *I. juruensis* y *V. calophylla*?

III.- OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

- Determinar la actividad antifúngica *in vitro* del extracto etanólico de las cortezas de *Virola calophylla* Warb., *Iryanthera juruensis* Warb. y *Vismia amazonica* Ewan mediante pruebas de sensibilidad antifúngica contra *Malassezia furfur* ATCC 14521.

3.2. Objetivos Específicos

- Realizar la identificación botánica y el herborizado de las muestras de *Virola calophylla* Warb., *Vismia amazonica* Ewan e *Iryanthera juruensis* Warb.
- Evaluar mediante el método de difusión en pozos la actividad antimicótica *in vitro* del extracto etanólico de las cortezas de *I. juruensis*, *V. calophylla* y *V. amazónica* frente a *M. furfur* ATCC 14521.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) por el método de microdilución en caldo del extracto etanólico de las cortezas de *I. juruensis*, *V. calophylla* y *V. amazonica* sobre *M. furfur* ATCC 14521.

IV.- MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Variables

4.1.1 Variable Independiente:

Extracto etanólico de las cortezas vegetales de *Virola calophylla*, *Vismia amazonica* e *Iryanthera juruensis*.

4.1.2 Variable Dependiente:

Actividad antifúngica del extracto etanólico de las cortezas *Virola calophylla*, *Vismia amazonica* e *Iryanthera juruensis* sobre *M. furfur* ATCC 14521.

4.1.3 Escala de Medición

4.1.3.1 Cualitativa – Nominal

Presentan valores categóricos sin ningún orden

4.1.3.2 Cualitativa – Ordinal

Presentan valores categóricos con criterio de orden

4.1.3.3 Cuantitativa – Discreta

Presenta valores numéricos enteros (Ejemplo: 1, 2, 3, 4, etc.)

4.1.3.4 Cuantitativa – Continua

Presentan valores numéricos infinitos entre dos valores (Ejemplo: 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, etc.)

Tabla 1. Operacionalización de la Variable Independiente

VARIABLE INDEPENDIENTE	CONCEPTO	ESCALA DE MEDICIÓN	INDICADORES
Extracto etanólico de las cortezas vegetales de <i>Virola calophylla</i> , <i>Vismia amazonica</i> e <i>Iryanthera juruensis</i> .	Material vegetal obtenido a partir de los procesos de secado, macerado y evaporación, con la finalidad de extraer sus compuestos químicos sin la alteración de los mismos.	Cualitativa – Nominal	Propiedades organolépticas del macerado de las cortezas vegetales
		Cuantitativa – Continua	Pesos de las cortezas vegetales de las especies botánicas
			Porcentaje de los pesos de las cortezas vegetales de las especies botánicas
			Porcentaje de rendimiento y pesos del extracto etanólico de las cortezas vegetales
			Extractos etanólicos de las cortezas vegetales diluidas en DMSO al 100 % y 10 % a distintas concentraciones

Tabla 2. Operacionalización de la Variable Dependiente

VARIABLE DEPENDIENTE	CONCEPTO	ESCALA DE MEDICIÓN	INDICADORES	
Actividad antifúngica del extracto etanólico de las cortezas <i>Virola calophylla</i> , <i>Vismia amazonica</i> e <i>Iryanthera juruensis</i> sobre <i>M. furfur</i> ATCC 14521.	Es la capacidad que posee el extracto etanólico de <i>Virola calophylla</i> , <i>Vismia amazonica</i> e <i>Iryanthera juruensis</i> en inhibir el crecimiento de <i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521	Cualitativa – Nominal	Cepa <i>M. furfur</i> activada en SDAO T40	
			Cultivo de la cepa activada <i>M. furfur</i> en SDBO T40	
			Cosecha del cultivo del pellet de la cepa <i>M. furfur</i>	
			Determinar la sensibilidad antifúngica por el método de difusión en pozos	
			Cuantitativa – Continua	Subcultivo en SDAO T40 para determinar la CMI
				Medición de los halos de inhibición
		Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)		

4.2 Materiales

4.2.1 Equipos requeridos

Cámara fotográfica (Marca Huawei, China), GPS (Marca Garmin, Estados Unidos), secadora eléctrica para plantas, Rotavapor (Marca Büchi R-114, Suiza), Estufa (Thermolyne Series 9000 Oven, USA), Cabina de Bioseguridad Clase II Tipo A2 (Marca LABCONCO Modelo 36204, USA), Propipeta Automática (Marca VITLAB, Alemania), Agitador Magnético (Marca Thermolyne Modelo M65820-26, USA), Balanza Analítica (Marca OHAUS Modelo Pioneer, USA), Micropipeta de 100 μ L – 1000 μ L (Marca LABMATE, Reino Unido), Incubadora (Marca SOLFARMA Modelo INC-105, Perú), Cabina de Bioseguridad Clase II Tipo A2 (Marca LABCONCO, USA), Microscopio Óptico (Marca Carl Zeiss Modelo Axiosar *plus*, USA), Agitador a Baño María (Marca LabLine, India), Propipeta Automática (Marca VITLAB, Alemania), Centrífuga refrigerada (Marca Boeco Modelo U-32R, Alemania), Micropipeta de 20 μ L -200 μ L (Marca LABMATE, Reino Unido), Agitador Magnético (Marca Thermolyne Modelo M65820-26, USA), Micropipeta Multicanal Autoclavable de 50 μ L – 300 μ L (Marca Axypet, USA).

4.2.2 Materiales requeridos

Tijera telescópica, tijera podadora, machete mediano, balanza de mano, libreta de campo, cuchilla, papel periódico, hilo pabilo, 3 bolsas de sacos harineros limpios, correas de nylon, láminas de cartón secante de 30 x 43.5 cm, láminas de aluminio corrugada de 30 x 43.5 cm, papel periódico, 2 rejillas de madera para prensa compuestas por 4 reglas de 45 x 2.5 cm, hilo pabilo, tijera, barras de silicona, pistola para silicona, etiquetas para herborizado, cinta adhesiva, cartulina Folcote finlandés N°14 (41 x 29 cm), bolsas plásticas grandes y gruesas, balanza de mano, papel filtro Whatman N°40, tres baldes de plásticos con tapa, botellas descartables de un litro, tres cápsulas de porcelana, 25 tubos cónicos de 15 ml con tapa rosca descartables y estériles, tips estériles de 100 μ L – 1000 μ L, gradilla para tubos de ensayo, 16 pipetas descartables y estériles de 1 mL, asas de siembras descartables y estériles, 100 placas Petri descartables y estériles de 90 x 15 mm, láminas portaobjetos y cubreobjetos, 8 tubos cónicos de 50 ml con tapa rosca descartables y estériles, gradilla para tubos cónicos de 50 ml, mechero de bunsen, 12 tubos de

Eppendorf de 2 mL estériles, vaso precipitado de 100 ml, gradilla para tubos de Eppendorf, 5 pipetas Pasteur estériles, 10 pipetas descartables y estériles de 5 mL, gradilla para tubos de ensayo, sacabocado de acero de 6 mm de diámetro estéril, 6 tubos de vidrio estériles de 13 x 100 con tapa rosca, Tips de 200 µl (marca Axygen), 54 hisopos de algodón estériles, 6 tubos de vidrio estériles de 18 x 150 con tapa rosca, 3 placas de poliestireno estéril de 96 pocillos de fondo plano, 25 reservorios estériles para micropipeta de 12 canales.

4.2.3 Reactivos requeridos

Agua destilada estéril, etanol al 96%, dimetil sulfóxido (DMSO), azul de metileno, solución salina estéril NaCl al 0.85 % (Anexo 2), CaCl₂ (Escala de Mc Farland 0.5)

4.2.4 Medios de cultivo requeridos

Agar Sabouraud dextrosa suplementado con aceite de oliva al 0.5% y Tween 40 al 0.5% (SDAO T40) (Anexo 3), agar Sabouraud dextrosa (SDA) (Anexo 4), caldo Sabouraud dextrosa suplementado con aceite de oliva al 0.5% y Tween 40 al 0.5% (SDBO T40) (Anexo 5).

4.2.5 Voriconazol diluido en DMSO al 2 % como antimicótico de referencia y control de calidad positivo del método

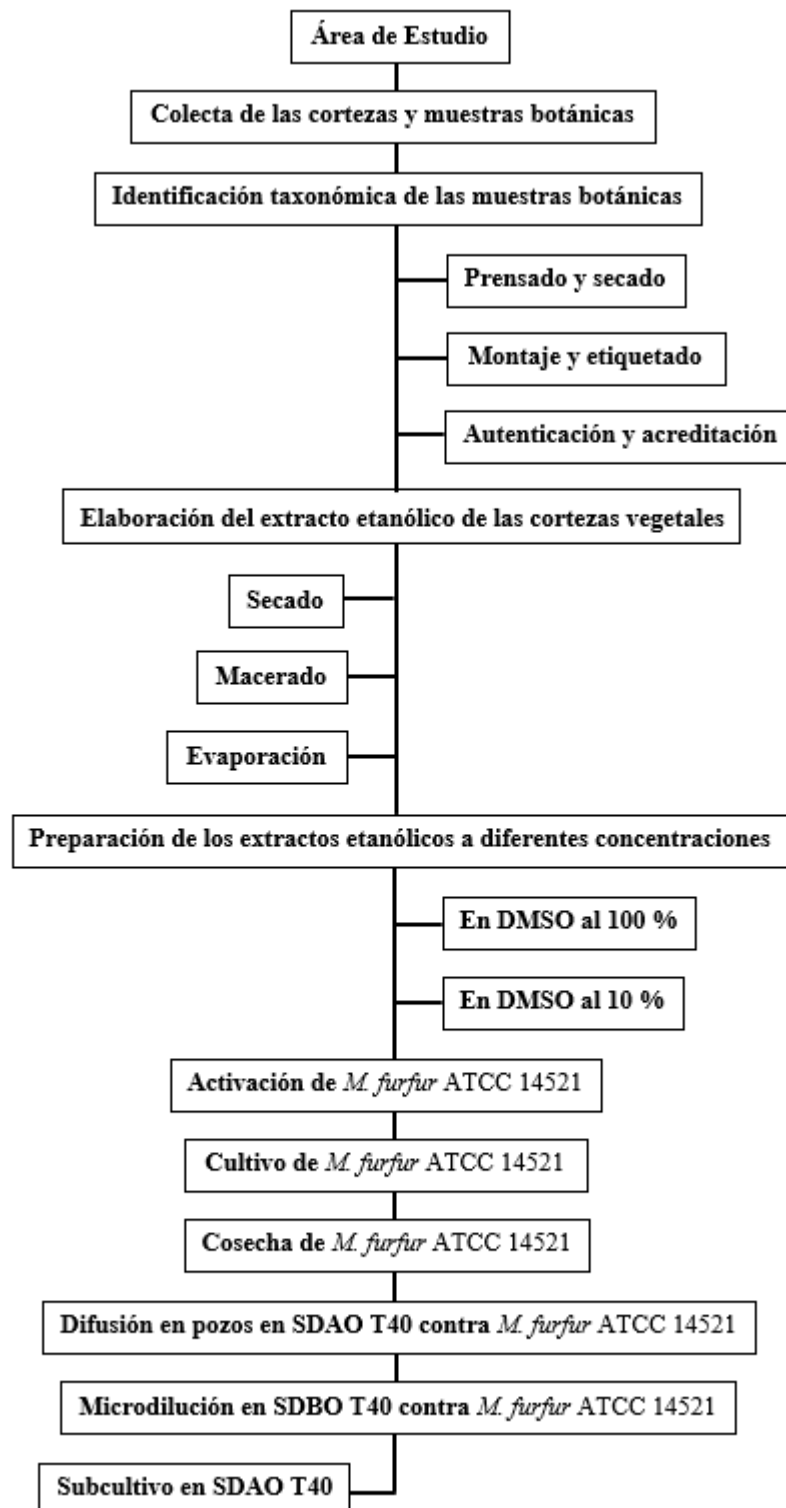
Voriconazol como droga pura (Marca Pfizer) diluido en DMSO al 2 % y en RPMI al 98 % a las concentraciones de 32 µg/mL, 16 µg/mL, 8 µg/mL, 4 µg/mL, 2 µg/mL, 1 µg/mL, 0.5 µg/mL, 0.25 µg/mL, 0.12 µg/mL y 0.06 µg/mL (Anexo 6)

4.2.6 Cepa ATCC requerida

Cepa liofilizada *Malassezia furfur* ATCC 14521

4.3 Metodología

4.3.1 Flujograma de la metodología



4.3.2 Estudio Botánico

4.3.2.1 Área de estudio

La colecta e identificación de las muestras y cortezas botánicas se realizó en el bosque húmedo tropical del CIEFOR (Centro de Investigación y Enseñanza Forestal) en Puerto Almendra, mediante un memorándum de ingreso a dichas instalaciones (Anexo 7); el cual se encuentra en el distrito de San Juan, provincia de Maynas, región de Loreto y pertenece a la Facultad de Ciencias Forestales de la UNAP que está ubicado al margen derecho del río Nanay, afluente izquierdo del río Amazonas y a una altitud promedio de 122 msnm (60). Geográficamente se encuentra en las coordenadas 3° 49' 30" latitud sur y 73° 22' 30" longitud oeste y en UTM a 18 M 680446 9577046, como se observa en la Fig.3 (61).

Las muestras y cortezas de las tres especies botánicas fueron colectadas en las siguientes coordenadas geográficas:

- *Iryanthera juruensis* Warb. Se ubicó en las coordenadas 3° 49' 47.2" latitud sur y 73° 22' 23.1" longitud oeste y en UTM a 18 M 680658 9576517.
- *Virola calophylla* Warb. Se ubicó en las coordenadas 3° 49' 47.2" latitud sur y 73° 22' 23.1" longitud oeste y en UTM a 18 M 680488 9576278.
- *Vismia amazonica* Ewan se ubicó en las coordenadas 3° 49' 51.4" latitud sur y 73° 22' 17.7" longitud oeste y en UTM a 18 M 680824 9576387.

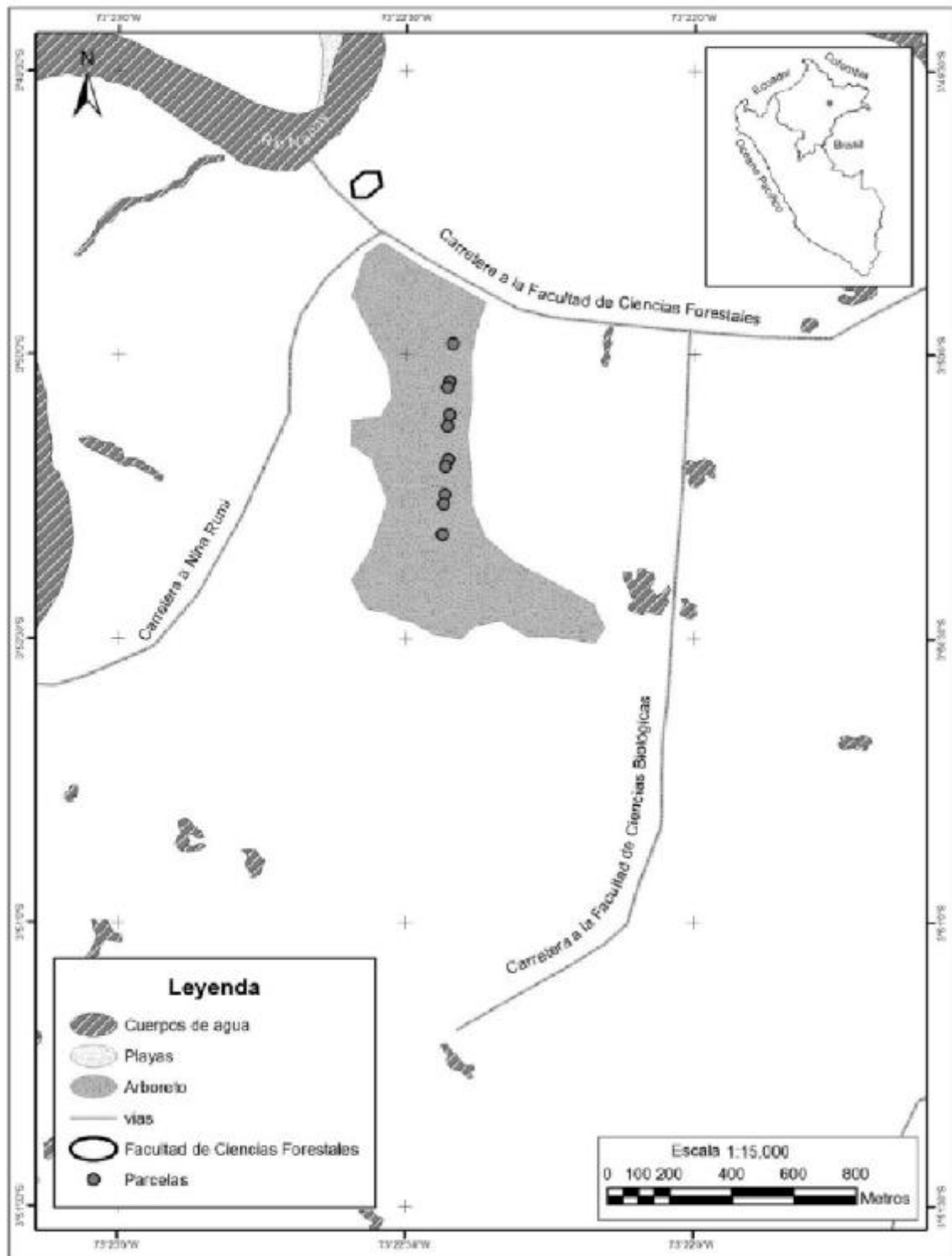


Figura 3. Mapa del área de estudio ubicado en el Centro de Investigación y Enseñanza Forestal (CIEFOR) en Puerto Almendra, de la Facultad de Ciencias Forestales de la UNAP (Loreto, Perú)

4.3.2.2 Colecta e identificación de las muestras y cortezas botánicas en el campo

La colecta de las muestras y cortezas botánicas se inició a las primeras horas de la mañana con la guía del Ing. Juan Ruíz que identificó las especies de árboles dentro del bosque y anotar los datos más representativos en un cuaderno de campo que se encuentran descritas como Toma de datos en el campo (Anexo 8), mientras se realiza la identificación y la colecta de los especímenes (62).

Es importante cortar longitudinalmente las cortezas por árbol y conservar la mayor cantidad de los mismos alrededor del diámetro de los troncos, puesto que las cortezas contienen a los tubos cribosos del floema que transporta los productos de la fotosíntesis a toda la planta y le permite vivir (63). A su vez, las cortezas colectadas deben ser empaquetadas en bolsas de sacos harineros limpios para prevenir la contaminación y asegurar la ventilación (64).

Por otro lado, las muestras botánicas colectadas deben tener hojas con flores y/o inflorescencias en buen estado (62) y arreglarlas en las hojas de periódico de forma que las hojas muestran el haz y el envés, las flores e inflorescencias con varias vistas para obtener un buen herborizado de las mismas (65).

Procedimiento

- a) Tomar fotografías de los árboles de *I. juruensis*, *V. calophylla* y *V. amazonica* y anotar las coordenadas geográficas de sus ubicaciones obtenidas con el GPS.
- b) Extraer dos kilos de corteza de cada especie con un machete mediano.
- c) Clasificar y empaquetar las cortezas por especie en bolsas de sacos harineros.
- d) Recolectar ramas de cada árbol que tengan flores con la ayuda de la tijera telescópica.
- e) Cortar 3 muestras botánicas por especie que tengan hojas con flores en buen estado.
- f) Colocar cada ejemplar en una hoja de periódico codificada y arreglar de forma que las hojas muestran el haz y el envés, las flores e inflorescencias.
- g) Armar un paquete con toda la colecta de los ejemplares y amarrar con hilo pabilo en cruz, evitando que sobresalga el material vegetal.

Lectura de los resultados

1. Obtener los datos de campo (Anexo 8)
2. Obtener las muestras y cortezas frescas de las especies botánicas

ESPECIE BOTÁNICA *Iryanthera juruensis* Warb.



Figura 4. *Iryanthera juruensis* ubicada dentro del bosque húmedo tropical del CIEFOR de la UNAP en Puerto Almendra; Loreto – Perú

ESPECIE BOTÁNICA *Virola calophylla* Warb.



Figura 5. *Virola calophylla* ubicada dentro del bosque húmedo tropical del CIEFOR de la UNAP en Puerto Almendra; Loreto – Perú

ESPECIE BOTÁNICA *Vismia amazonica* Ewan



Figura 6. *Vismia amazonica* ubicada dentro del bosque húmedo tropical del CIEFOR de la UNAP en Puerto Almendra; Loreto – Perú

4.3.2.3 Prensado y secado de las muestras en el herbario

Es importante emplear la combinación de papel secante y láminas de aluminio, puesto que ayuda a facilitar el secado de especímenes con mucha humedad y se ahorra más energía cuando usamos la secadora eléctrica para plantas como se observa en la Fig. 8 (66). Por otro lado, el proceso de secado de plantas sirve para preservar muestras botánicas y evitar el deterioro de las mismas.

Procedimiento

- a) Individualizar cada espécimen dentro de la prensa con la siguiente secuencia: Rejilla de madera + lámina de aluminio corrugada + cartón secante + espécimen + cartón secante + lámina de aluminio corrugada y así sucesivamente hasta finalizar con otra rejilla de madera.
- b) Amarrar fuertemente con correas de nylon a los costados de la prensa.
- c) Trasladar la prensa armada a la secadora eléctrica para plantas a 70°C por 3 días.

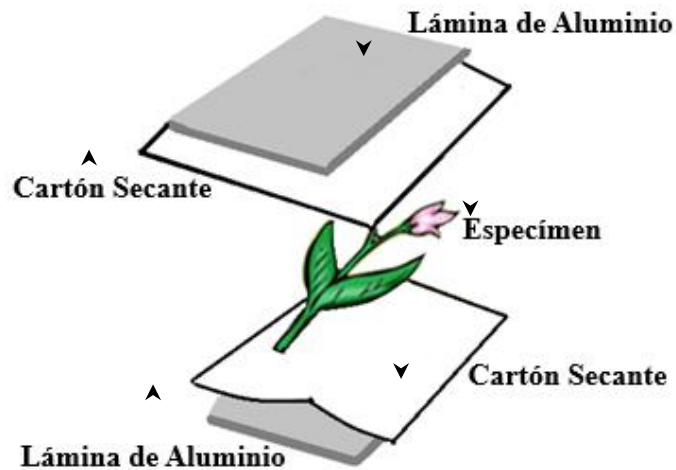


Figura 7. Secuencia para cada espécimen dentro de la prensa



Figura 8. Prensa armada dentro de la secadora eléctrica para plantas

4.3.2.4 Montaje y etiquetado de los ejemplares en el herbario

El proceso de etiquetado es fundamental, puesto que contiene las características e identificación de la planta y de su colector. El montaje del espécimen y de su etiqueta sobre una cartulina ayuda a preservarlas en óptimas condiciones en el herbario (66).

Las muestras botánicas del herbario desecadas, preservadas, montadas sobre una cartulina y etiquetadas pueden conservarse inalterados por siglos, constituyéndose en un material de referencia para cualquier investigación (67).

Procedimiento

- a) Colocar una muestra botánica sobre la cartulina folcote. Realizar el proceso por triplicado para cada especie.
- b) Arreglar cada muestra botánica de manera que se muestran el haz y el envés de las hojas, las flores e inflorescencias con varias vistas.
- c) Dejar un espacio libre en el lado inferior derecho de cada cartulina para pegar la etiqueta que describe cada muestra botánica.
- d) Fijar las muestras botánicas en las cartulinas folcote con silicona caliente evitando que queden manchados o sueltos.
- e) Pegar con goma en barra las etiquetas con la descripción de cada muestra botánica en el lado derecho de las cartulinas folcote.

	
UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS	
MUSEO DE HISTORIA NATURAL	
N.C: <i>Iryanthera juruensis</i> Warb.	
N.V: cumala	
FAMILIA: Myristicaceae	
FLORES: blancas	FRUTO: sin presencia
HABITAT: bosque primario	
HÁBITO: árbol	
LOCALIDAD: CIEFOR Puerto Almendra	ALTITUD: 120 msnm
DEPARTAMENTO: Loreto	PROV: Maynas
USOS: contra la candidiasis	
COLECTOR: Gudy Scott	Nº DE COLECCIÓN: 02
DET.POR: Camilo Díaz	FECHA: 11/10/2018

Figura 9. Etiqueta con las descripciones de una muestra botánica

Lectura de los resultados

1. Obtener las muestras botánicas herborizadas de *Vismia amazonica*, *Iryanthera juruensis* y *Virola calophylla* (Anexo 9)

4.3.2.5 Identificación y autenticación de los ejemplares

Las muestras botánicas herborizadas de *I. juruensis*, *V. calophylla* y *V. amazonica* fueron identificadas y autenticadas por el Biólogo Camilo Díaz Santibáñez en el laboratorio de Botánica Aplicada de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (Anexo 10). Posteriormente fueron acreditadas y depositadas en el herbario del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Anexo 11).

4.3.3 Elaboración del extracto etanólico de las cortezas vegetales

4.3.3.1 Secado de las cortezas vegetales frescas

El secado de las cortezas vegetales frescas a temperatura ambiente permite erradicar a los microorganismos que puedan infectar y perjudicar la maceración de las mismas y el proceso de preparación de los extractos etanólicos (68).

Procedimiento

- a) Procesar las cortezas vegetales frescas al día siguiente de su colecta.
- b) Secar los trozos pequeños de las cortezas vegetales frescas de *I. juruensis*, *V. calophylla* y *V. amazonica* en sombra y a temperatura ambiente por el lapso de una semana.
- c) Pesar las cortezas vegetales secas de *I. juruensis*, *V. calophylla* y *V. amazonica*

Lectura de los resultados

1. Obtener las cortezas vegetales secas de las especies botánicas (Anexo 12)
2. Obtener los pesos de las cortezas vegetales (Tabla 3)
3. Obtener el porcentaje del peso seco y perdido de las cortezas vegetales (Tabla 4)

4.3.3.2 Macerado de las cortezas vegetales secas en etanol

La maceración es un tipo de extracción que consiste en remojar el material vegetal en un determinado solvente para extraer sus compuestos químicos (69). Las cortezas vegetales al macerarse en etanol a temperatura ambiente, se logra extraer todas sus propiedades sin alterar su composición (70) (71). A su vez, se escogió como solvente el etanol de 96°C y no el de 70°C, puesto que se recomienda macerar cortezas vegetales que contengan resinas como parte de su composición (72). Por otra parte, la maceración se realiza en la

proporción soluto-solvente de 1:4 de tal manera que el diluyente cubra por completo toda la masa del material vegetal (70).

Procedimiento

- a) Macerar las cortezas vegetales secas de *I. juruensis* (649 gramos), *V. calophylla* (1034 gramos) y *V. amazonica* (936 gramos) en etanol al 96% con la proporción soluto-solvente de 1:4 a temperatura ambiente en baldes de plástico y herméticos.
- b) Realizar la primera maceración por el lapso de 2 semanas y obtener 3 litros de cada macerado. Hacer las filtraciones con papel filtro Whatman N°40 para separar lo soluble e insoluble.
- c) Realizar la segunda y tercera maceración por el lapso de una semana para cada proceso. Obtener 4 litros de los macerados de *V. calophylla* y *V. amazonica* y 3 litros del macerado de *I. juruensis*, después de cada maceración. Hacer el proceso de filtrado con papel filtro Whatman N°40.
- d) Describir las propiedades organolépticas como color, olor y viscosidad de los macerados de *V. calophylla*, *V. amazonica* e *I. juruensis*.

Lectura de los resultados

1. Obtener el macerado de las cortezas vegetales de *V. calophylla*, *V. amazonica* e *I. juruensis* (Anexo 13)
2. Obtener las propiedades organolépticas del macerado de las cortezas vegetales de las especies botánicas (Tabla 5)

4.3.3.3 Evaporación del solvente

Las soluciones filtradas de los macerados son condensadas bajo presión reducida en el rotavapor para obtener los extractos crudos de las cortezas vegetales (44) (70). En el rotavapor se realiza el proceso de evaporación del solvente de los macerados, el cual permite conseguir la mayor concentración posible de los extractos crudos y posteriormente secarlos en la estufa para terminar de evaporar todo el solvente (64) (71).

Procedimiento

- a) Evaporar el solvente de las soluciones filtradas bajo presión reducida en el rotavapor a una temperatura de 65°C, a una presión de 400 atm y a 4 revoluciones hasta obtener la mayor concentración posible.
- b) Pesar las cápsulas de porcelana vacías.
- c) Agregar cada extracto crudo en las cápsulas de porcelana.
- d) Secar a 40°C por 48 horas.

- e) Pesar las cápsulas de porcelana con el extracto etanólico de las cortezas vegetales

Lectura de los resultados

1. Obtener el extracto etanólico de las cortezas vegetales (Anexo 14)
2. Obtener los pesos del extracto etanólico de las cortezas vegetales (Tabla 6)
3. Obtener el porcentaje de rendimiento de extracción de las cortezas vegetales (Tabla 7)

4.3.4 Preparación del extracto etanólico de las cortezas vegetales a diferentes concentraciones

4.3.4.1 Extracto etanólico de las cortezas vegetales diluidas en DMSO al 100% a distintas concentraciones

El DMSO es uno de los solventes polares más fuertes para muchos compuestos orgánicos y polímeros, por lo cual se usa para diluir el extracto etanólico de las cortezas vegetales (73). Estas diluciones se realizan en DMSO al 100% para determinar su potencial antimicótico en un medio de cultivo con agar en estado sólido poco polar e insoluble en agua a temperatura ambiente, por lo cual el DMSO no será permeable al agar y no tendrá un efecto tóxico *Malassezia furfur* ATCC 14521 (74).

Procedimiento

El proceso se realiza para cada extracto etanólico

- a) En el tubo 1 suspender 1 g de extracto etanólico en 2 mL de DMSO al 100 % para obtener la concentración de 500 mg/mL.
- b) En el tubo 2 mezclar 1 ml de la dilución 500 mg/mL en 1 ml de DMSO al 100 % para obtener la concentración de 250 mg/mL.
- c) En el tubo 3 mezclar 1 ml de la dilución 250 mg/mL en 1 ml de DMSO al 100 % para obtener la concentración de 125 mg/mL.
- d) En el tubo 4 mezclar 1 ml de la dilución 125 mg/mL en 1 ml de DMSO al 100 % para obtener la concentración de 62.5 mg/mL.
- e) En el tubo 5 mezclar 1 ml de la dilución 62.5 mg/mL en 1 ml de DMSO al 100 % para obtener la concentración de 31.25 mg/mL.

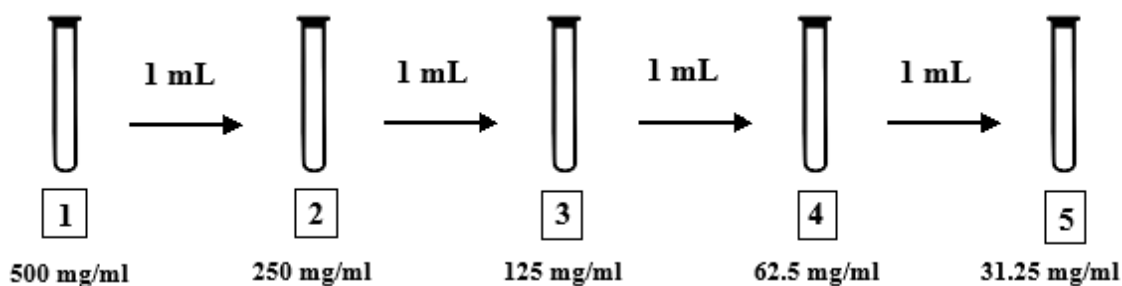


Figura 10. Preparación de los extractos etanólicos de las cortezas vegetales a distintas concentraciones mediante diluciones seriadas en DMSO al 100 %

Lectura de los resultados

1. Obtener el extracto etanólico de las cortezas vegetales diluidas en DMSO al 100 % a las concentraciones de 500 mg/mL, 250 mg/mL, 125 mg/mL, 62.5 mg/mL y 31.25 mg/mL (Anexo 15)

4.3.4.2 Extracto etanólico de las cortezas vegetales diluidas en DMSO al 10% a distintas concentraciones

El DMSO es un solvente polar de los más efectivos para muchos compuestos orgánicos y polímeros que también se mezcla en agua (73). Las diluciones del extracto etanólico de las cortezas vegetales se realizan en DMSO al 10% para determinar su potencial antimicótico sobre *Malassezia furfur* ATCC 14521 en caldo, puesto que el DMSO a mayor concentración denatura el ADN de muchos microorganismos en medios de cultivo líquidos (39) (75).

Procedimiento

El proceso se realiza para cada extracto etanólico

- a) En el tubo 1 suspender 125 mg de extracto etanólico en 900 μ L de agua destilada y 100 μ L de DMSO para obtener la concentración de 125 mg/mL en DMSO al 10%.
- b) En el tubo 2 mezclar $\frac{1}{2}$ ml de la dilución 125 mg/mL en 450 μ L de agua destilada y 50 μ L de DMSO para obtener la concentración de 62.5 mg/mL en DMSO al 10%.
- c) En el tubo 3 mezclar $\frac{1}{2}$ ml de la dilución 62.5 mg/mL en 450 μ L de agua destilada y 50 μ L de DMSO para obtener la concentración de 31.25 mg/mL en DMSO al 10%.

- d) En el tubo 4 mezclar $\frac{1}{2}$ ml de la dilución 31.25 mg/mL en 450 μ L de agua destilada y 50 μ L de DMSO para obtener la concentración de 15.62 mg/mL en DMSO al 10%.
- e) En el tubo 5 mezclar $\frac{1}{2}$ ml de la dilución 15.62 mg/mL en 450 μ L de agua destilada y 50 μ L de DMSO para obtener la concentración de 7.81 mg/mL en DMSO al 10%.
- f) En el tubo 6 mezclar $\frac{1}{2}$ ml de la dilución 7.81 mg/mL en 450 μ L de agua destilada y 50 μ L de DMSO para obtener la concentración de 3.9 mg/mL en DMSO al 10%.
- g) En el tubo 7 mezclar $\frac{1}{2}$ ml de la dilución 3.9 mg/mL en 450 μ L de agua destilada y 50 μ L de DMSO para obtener la concentración de 1.95 mg/mL en DMSO al 10%.
- h) En el tubo 8 mezclar $\frac{1}{2}$ ml de la dilución 1.95 mg/mL en 450 μ L de agua destilada y 50 μ L de DMSO para obtener la concentración de 0.97 mg/mL en DMSO al 10%.
- i) En el tubo 9 mezclar $\frac{1}{2}$ ml de la dilución 0.97 mg/mL en 450 μ L de agua destilada y 50 μ L de DMSO para obtener la concentración de 0.48 mg/mL en DMSO al 10%.
- j) En el tubo 10 mezclar $\frac{1}{2}$ ml de la dilución 0.48 mg/mL en 450 μ L de agua destilada y 50 μ L de DMSO para obtener la concentración de 0.24 mg/mL en DMSO al 10%.

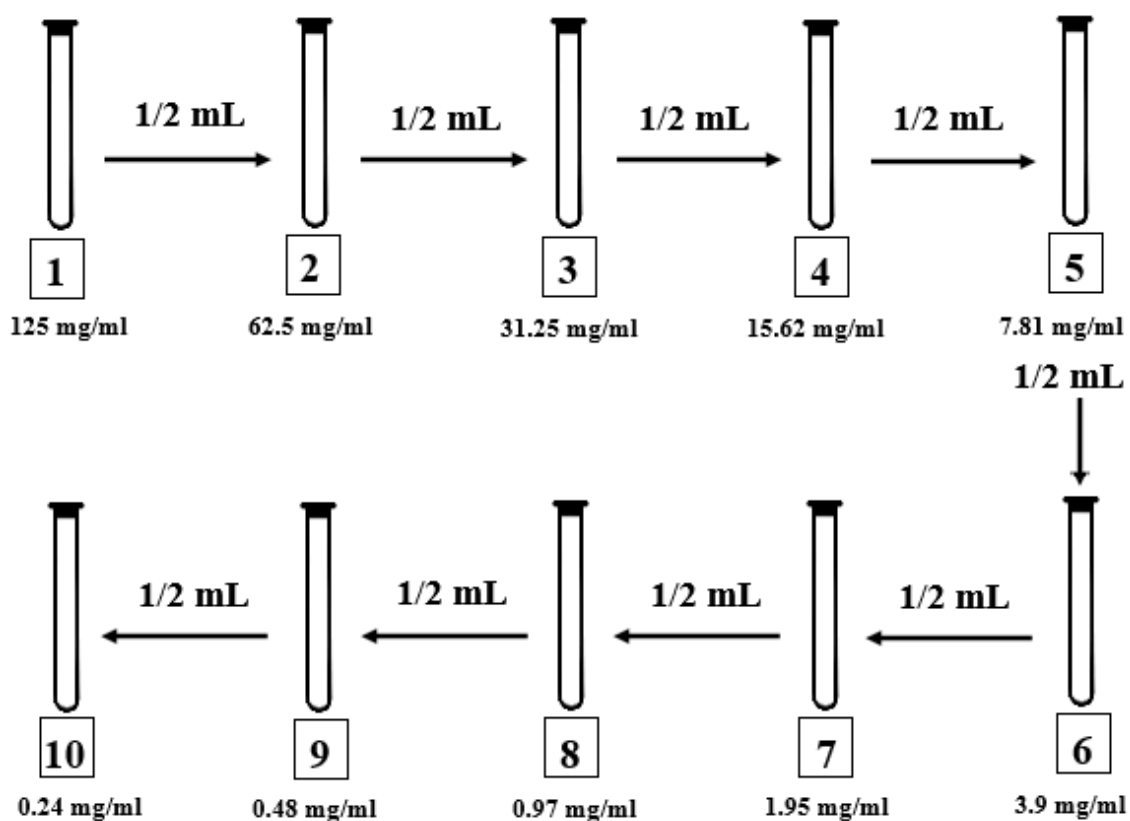


Figura 11. Preparación de los extractos etanólicos de las cortezas vegetales a distintas concentraciones mediante diluciones seriadas en DMSO al 10 %

Lectura de los resultados

1. Obtener el extracto etanólico de las cortezas vegetales diluidas en DMSO al 10 % a las concentraciones de 125 mg/mL, 62.5 mg/mL, 31.25 mg/mL, 15.62 mg/mL, 7.81 mg/mL, 3.90 mg/mL, 1.95 mg/mL, 0.97 mg/mL, 0.48 mg/mL y 0.24 mg/mL (Anexo 16)

4.3.5 Evaluación Microbiológica

4.3.5.1 Activación de la cepa *M. furfur* ATCC 14521 en agar Sabouraud dextrosa suplementado con aceite de oliva al 0.5% y Tween 40 al 0.5%

El cultivo y la activación de esta cepa liofilizada en agar Sabouraud dextrosa suplementado con aceite de oliva al 0.5% y Tween 40 al 0.5% es debido a la lipodependencia de los hongos del género *Malassezia spp* que requieren de ácidos grasos exógenos como el aceite de oliva para su desarrollo *in vitro* y el Tween 40 es asimilado por distintas especies de *Malassezia spp* en pruebas bioquímicas (25) (39). Por otro lado, el uso de cepas de referencia como *Malassezia furfur* ATCC 14521 es debido a que proceden de una colección certificada de tipo ATCC (American Type Culture Collection),

las cuales son recomendadas por el CLSI porque han sido seleccionadas en base a pruebas de susceptibilidad antimicrobiana y presentan estabilidad genética (76).

Procedimiento

- a) Abrir la bolsa de la cepa KWIK-STIK *Malassezia furfur* ATCC 14521 liofilizada (Anexo 17) a la altura de la muesca y retirar la ampolla.
- b) Apretar la ampolla en la parte superior de la tapa para liberar el líquido hidratante y mantenerla en posición vertical para que el líquido fluya hasta la parte inferior e hidrate el gránulo.
- c) Apretar la parte inferior para que el gránulo se diluya junto con el líquido.
- d) Retirar la etiqueta y pegarla en la placa de cultivo principal
- e) Saturar el hisopo con el material hidratado e hisopar sobre el tercio de una placa Petri con SDAO T40.
- f) Hacer estrías con un asa de siembra para tener colonias aisladas.
- g) Realizar el cultivo del material hidratado por cuadruplicado en SDAO T40.
- h) Volver a saturar el hisopo con el material hidratado e hisopar sobre el tercio de una placa Petri con SDA.
- i) Incubar a 32°C por 72 horas.
- j) Tomar una asada de dos colonias del cultivo en SDAO T40 en una lámina portaobjeto – cubreobjetos y teñirlas con azul de Metileno y ver en el microscopio.

Secuencia utilizada para el procedimiento

Ver Anexo 18

Lectura de los resultados

1. Observar el crecimiento de la cepa en SDAO T40 (Anexo 19 – Formulario N°1)
2. Observar la ausencia de crecimiento en SDA (Anexo 19 – Formulario N°1)
3. Observar las colonias formadas de en SDAO T40 (Anexo 19 – Formulario N°1)
4. Observar las levaduras formadas de la cepa en el microscopio (Anexo 19 – Formulario N°1)

4.3.5.2 Cultivo de la cepa activada *M. furfur* ATCC 14521 en caldo Sabouraud dextrosa suplementado con aceite de oliva al 0.5% y Tween 40 al 0.5%

Una vez activada la cepa, cultivarla por agitación en un medio líquido que permite incrementar la biomasa microbiana (77).

Procedimiento

- a) Agregar 10 ml de SDBO T40 en un tubo cónico de 50 ml. Realizar el proceso por cuadruplicado.
- b) Tomar una asada de cuatro colonias de la cepa activada de *M. furfur* ATCC 14521 e inocular en 10 ml de SDBO T40. Realizar el proceso por cuadruplicado.
- c) Incubar en baño María a 32°C durante 48 horas con 200 rev/min de agitación.

Lectura de los resultados

1. Observar el crecimiento e incremento de las colonias inoculadas de *M. furfur* ATCC 14521 en SDBO T40 a las 2 horas (Anexo 20, Formulario N°2)
2. Observar el aumento significativo de la biomasa de *M. furfur* ATCC 14521 en SDBO T40 a las 48 horas de su cultivo (Anexo 20 – Formulario N°2)

4.3.5.3 Cosecha del cultivo de *M. furfur* ATCC 14521 por el método de centrifugación

La centrifugación es un método que se usa para cosechar microorganismos compactando la biomasa microbiana en un sedimento (pellet) separándolo del medio de cultivo líquido por fuerza giratoria (78). Por otra parte, la centrifugación entre 5000 a 10000 g y el lavado de la biomasa fúngica con solución salina al 0.85% no causa daño celular en el microorganismo (79) (80).

Procedimiento

- a) Tomar una muestra de cada cultivo de *Malassezia furfur* ATCC 14521 en SDBO T40 en una lámina portaobjeto y cubreobjeto y observar al microscopio.
- b) Recolectar 1 ml de cada medio de cultivo líquido de *M. furfur* ATCC 14521 en SDBO T40 no contaminado y agregarlo a un tubo de Eppendorf. Realizar el proceso por 12 veces.
- c) Centrifugar a 5000 g a 4°C por 5 min y luego desechar el sobrenadante de cada tubo de Eppendorf.
- d) Agregar 1 ml de solución salina estéril al 0.85 % a cada tubo de Eppendorf que contenga sedimento (pellet) de *Malassezia furfur* ATCC 14521.
- e) Volver a centrifugar a 5000 g a 4°C por 5 min y desechar el sobrenadante de cada tubo de Eppendorf, dejando el sedimento (pellet) en el fondo de cada tubo.

Lectura de los resultados

1. Observar en el microscopio la presencia de cultivo no contaminado de *Malassezia furfur* ATCC 14521 en SDBO T40 de cada tubo de Eppendorf (Anexo 21 – Formulario N°3)
2. Observar el sedimento (pellet) de la biomasa de *M. furfur* ATCC 14521 en el fondo de cada tubo de Eppendorf (Anexo 21 – Formulario N°3)

4.3.5.4 Evaluación del potencial antimicótico del extracto etanólico de las cortezas vegetales y del voriconazol como control de calidad positivo del método a través de la medición de los halos de inhibición por el método de difusión en pozos frente a *M. furfur* ATCC 14521

4.3.5.4.1 Preparación del inóculo para determinar el potencial antimicótico de los extractos etanólicos y del voriconazol a través del método de difusión en pozos a partir de la cepa cosechada

El método de difusión en disco M44-A del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI), se usa para determinar la sensibilidad antifúngica midiendo los halos de inhibición producidos por los antimicóticos frente a una concentración de $1-5 \times 10^6$ UFC/mL del inóculo (530 nm de longitud de onda en el espectrofotómetro), el cual equivale a 0.5 de Mc. Farland (81).

Procedimiento

- a) Tomar una asada del pellet de la cepa cosechada de *M. furfur* ATCC 14521 y suspenderla en solución salina estéril al 0.85 %.
- b) Mediante diluciones seriadas en solución salina al 0.85 % alcanzar una turbidez de 0.5 de la escala Mc. Farland, la cual equivale a la concentración de $1-5 \times 10^6$ UFC/mL de *Malassezia furfur* ATCC 14521.

Lectura de los resultados

1. Observar la turbidez de *M. furfur* ATCC 14521 en NaCl al 0.85 % a 0.5 de Mc. Farland (Anexo 22 – Formulario N°4)

4.3.5.4.2 Medición de los halos de inhibición de los extractos etanólicos y del voriconazol por el método de difusión en pozos frente a *Malassezia furfur* ATCC 14521

El método de difusión en disco M44-A del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) se usa para determinar la sensibilidad de hongos y levaduras a los compuestos químicos a través de la medición de los halos de inhibición producidos por la difusión del antifúngico en el agar (81). La medición de los halos de inhibición se hizo con algunas modificaciones del CLSI, utilizando el método de difusión en pozos para evaluar la actividad antimicótica del extracto etanólico de las cortezas vegetales y del voriconazol como control de calidad positivo del método, puesto que este último se encuentra estandarizado en las referencias clínicas del CLSI (80) (82). Para ello, se usó agar Sabouraud dextrosa suplementado con aceite de oliva al 0.5% y Tween 40 al 0.5% para obtener un buen desarrollo de *Malassezia furfur* ATCC 14521 (39) (83).

Procedimiento

- a) Inocular 100 μ L de la suspensión $1 - 5 \times 10^6$ UFC/mL de *Malassezia furfur* ATCC 14521 en cada placa Petri con SDAO T40.
- b) Sembrar el inóculo en toda la superficie del medio de cultivo usando hisopos de algodón estériles. (1)
- c) Hacer un pozo de 6 mm de diámetro en medio de cada placa con la ayuda del sacabocado de acero.
- d) Agregar 80 μ L de cada dilución de *Iryanthera juruensis* en DMSO al 100 % a las concentraciones de 500 mg/mL, 250 mg/mL, 125 mg/mL, 62.5 mg/mL y 31.25 mg/mL en el pozo de cada placa Realizar el proceso por duplicado.
- e) Agregar 80 μ L de cada dilución de *Virola calophylla* en DMSO al 100 % a las concentraciones de 500 mg/mL, 250 mg/mL, 125 mg/mL, 62.5 mg/mL y 31.25 mg/mL en el pozo de cada placa. Realizar el proceso por duplicado.
- f) Agregar 80 μ L de cada dilución de *Vismia amazonica* en DMSO al 100 % a las concentraciones de 500 mg/mL, 250 mg/mL, 125 mg/mL, 62.5 mg/mL y 31.25 mg/mL en el pozo de cada placa. Realizar el proceso por duplicado.
- g) Agregar 80 μ L de DMSO al 100 % en el pozo de una placa como control negativo. Realizar el proceso por duplicado.
- h) Agregar 80 μ L de cada dilución de Voriconazol en DMSO al 2 % como control de calidad positivo del método a las concentraciones de 32 μ g/mL, 16 μ g/mL, 8

$\mu\text{g/mL}$, $4\mu\text{g/mL}$, $2\mu\text{g/mL}$, $1\mu\text{g/mL}$, $0.5\mu\text{g/mL}$, $0.25\mu\text{g/mL}$, $0.12\mu\text{g/mL}$, $0.06\mu\text{g/mL}$ en el pozo de cada placa. Realizar el proceso por duplicado.

- i) Agregar $80\mu\text{L}$ de DMSO al 2 % en el pozo de una placa como control negativo. Realizar el proceso por duplicado.
- j) Incubar a 32°C por 48 horas

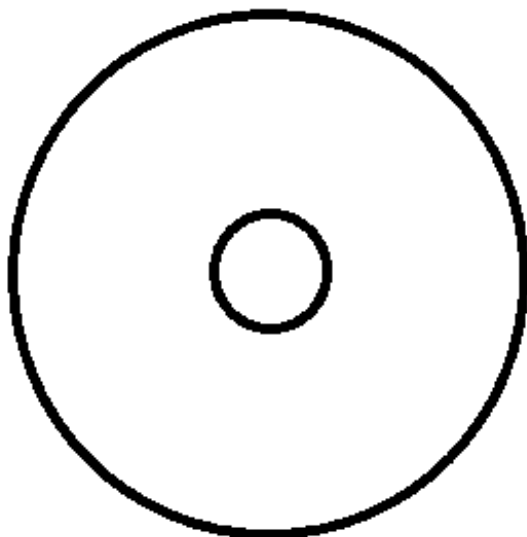


Figura 12. Ilustración del pozo en medio de la placa con SDAO T40

Secuencia utilizada para el procedimiento

Ver Anexo 23

Lectura de los resultados de los extractos etanólicos de las cortezas vegetales

1. Determinar la presencia o ausencia de halos de inhibición de cada concentración del extracto etanólico de las cortezas vegetales por duplicado (Anexo 24 – Formulario N°5)
2. Determinar la medición de halos de inhibición del extracto etanólico de las cortezas vegetales por duplicado (Tablas 8)
3. Determinar la presencia o ausencia de halos de inhibición de cada concentración de voriconazol como control de calidad positivo del método por duplicado (Anexo 25 – Formulario N°6)
4. Determinar la sensibilidad antifúngica por el método de difusión en pozos para *Virola calophylla*, *Vismia amazonica* y el voriconazol como control de calidad positivo del método (Anexo 26 – Formulario N°7)
5. Determinar la medición de halos de inhibición del extracto etanólico de las cortezas vegetales y del voriconazol como control de calidad positivo del método por duplicado (Tabla 9)

4.3.5.5 Evaluación de la sensibilidad antifúngica del extracto etanólico de las cortezas vegetales y del voriconazol como control de calidad positivo del método para hallar la CMI por el método de microdilución en caldo contra *M. furfur* ATCC 14521

4.3.5.5.1 Preparación del inóculo para determinar la CMI de los extractos etanólicos y del voriconazol por el método de microdilución en caldo a partir de la cepa cosechada

El método de microdilución en caldo M27-A3 del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI), se usa para determinar la sensibilidad antifúngica de algunos compuestos químicos insolubles en agua como el voriconazol diluido en DMSO al 2 %, el cual se enfrenta a una concentración de $1-5 \times 10^3$ UFC/mL del inóculo en caldo (81). Para el caso del extracto etanólico de las cortezas vegetales diluidas en DMSO al 10 % no tienen efecto tóxico sobre *Malassezia furfur* ATCC 14521 a la concentración de $1-5 \times 10^5$ UFC/mL en medios de cultivo líquidos (39).

Procedimiento

- a) Realizar el procedimiento del punto 4.3.5.4.1 para conseguir la concentración de $1-5 \times 10^6$ UFC/mL (530 nm) a partir de la cepa cosechada de *M. furfur* ATCC 14521.
- b) Mediante 3 diluciones seriadas diluir 1 mL del inóculo $1-5 \times 10^6$ UFC/mL en 10 mL de SDBO T40 para obtener las concentraciones de $1-5 \times 10^5$ UFC/mL, $1-5 \times 10^4$ UFC/mL y $1-5 \times 10^3$ UFC/mL de *Malassezia furfur* ATCC 14521.
- c) Diluir 0.9 mL de $1-5 \times 10^5$ UFC/mL de *Malassezia furfur* ATCC 14521 en 100 μ l de DMSO para obtener una concentración del mismo inóculo al 10 % en DMSO.
- d) Diluir 4.9 mL de $1-5 \times 10^3$ UFC/mL de *Malassezia furfur* ATCC 14521 en 100 μ l de DMSO para obtener una concentración del mismo inóculo al 2 % en DMSO.

Lectura de los resultados

1. Obtener el inóculo de *Malassezia furfur* ATCC 14521 a las concentraciones de $1-5 \times 10^5$ UFC/mL, $1-5 \times 10^4$ UFC/mL y $1-5 \times 10^3$ UFC/mL en SDBO T40. (Anexo 27, Formulario N°8)

4.3.5.5.2 Enfrentamiento del extracto etanólico de las cortezas vegetales y del voriconazol para hallar la CMI por el método de microdilución en caldo contra *Malassezia furfur* ATCC 14521

El método de microdilución en caldo M27-A3 del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) es utilizado para cuantificar la inhibición del aumento de levaduras u hongos producido por antifúngicos (81). La microdilución en caldo se realiza con algunas modificaciones del CLSI para brindar los requerimientos nutricionales a *Malassezia furfur* ATCC 14521, usando caldo Sabouraud dextrosa suplementado con aceite de oliva al 0.5 % y Tween 40 al 0.5 %, puesto que no se obtiene un óptimo crecimiento de este hongo en el medio RPMI con suplementos lipídicos (83) (84).

Procedimiento para determinar la CMI del extracto etanólico de las cortezas vegetales

- a) Agregar 100 μ L de cada extracto por duplicado a la concentración de 125 mg/ml en los pocillos de la columna 1 de las filas A, B, C, D, E y F.
- b) Agregar 100 μ L de cada extracto por duplicado a la concentración de 62.5 mg/ml en los pocillos de la columna 2 de las filas A, B, C, D, E y F.
- c) Agregar 100 μ L de cada extracto por duplicado a la concentración de 31.25 mg/ml en los pocillos de la columna 3 de las filas A, B, C, D, E y F.
- d) Agregar 100 μ L de cada extracto por duplicado a la concentración de 15.62 mg/ml en los pocillos de la columna 4 de las filas A, B, C, D, E y F.
- e) Agregar 100 μ L de cada extracto por duplicado a la concentración de 7.81 mg/ml en los pocillos de la columna 5 de las filas A, B, C, D, E y F.
- f) Agregar 100 μ L de cada extracto por duplicado a la concentración de 3.90 mg/ml en los pocillos de la columna 6 de las filas A, B, C, D, E y F.
- g) Agregar 100 μ L de cada extracto por duplicado a la concentración de 1.95 mg/ml en los pocillos de la columna 7 de las filas A, B, C, D, E y F.
- h) Agregar 100 μ L de cada extracto por duplicado a la concentración de 0.97 mg/ml en los pocillos de la columna 8 de las filas A, B, C, D, E y F.
- i) Agregar 100 μ L de cada extracto por duplicado a la concentración de 0.48 mg/ml en los pocillos de la columna 9 de las filas A, B, C, D, E y F.
- j) Agregar 100 μ L de cada extracto por duplicado a la concentración de 0.24 mg/ml en los pocillos de la columna 10 de las filas A, B, C, D, E y F.

- k) Inocular 100 μ L de la suspensión $1-5 \times 10^5$ UFC/mL de *M. furfur* ATCC 14521 desde los pocillos de la columna 1 hasta los pocillos de la columna 10 de las filas A, B, C, D, E y F.
- l) Agregar 100 μ L de SDBO T40 en los pocillos de la columna 11 y 12 de las filas A, B, C, D, E y F.
- m) Inocular 100 μ L de la suspensión $1-5 \times 10^5$ UFC/mL en DMSO al 10% de *M. furfur* ATCC 14521 en los pocillos de la columna 11 de las filas A, B, C, D, E y F.
- n) Agregar 100 μ L de SDBO T40 adicionales en los pocillos de la columna 12 de las filas A, B, C, D, E y F.
- o) Incubar a 32°C por 48 horas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.9	1.95	0.97	0.48	0.24	CC	CE	VA
B	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.9	1.95	0.97	0.48	0.24	CC	CE	VA
C	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.9	1.95	0.97	0.48	0.24	CC	CE	VC
D	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.9	1.95	0.97	0.48	0.24	CC	CE	VC
E	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.9	1.95	0.97	0.48	0.24	CC	CE	IJ
F	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.9	1.95	0.97	0.48	0.24	CC	CE	IJ
G													
H													

Figura 13. Diseño de la placa para la microdilución en caldo del extracto etanólico de las cortezas vegetales en mililitros (mg/ml). Las columnas de la 1 a la 10 de las filas A y B pocillos con las diluciones seriadas de *V. amazonica* (VA). Las columnas de la 1 a la 10 de las filas C y D pocillos con las diluciones seriadas de *V. calophylla* (VC). Las columnas de la 1 a la 10 de las filas E y F pocillos con las diluciones seriadas de *I. juruensis* (IJ). La columna 11 desde la fila A hasta la F pocillos con control de crecimiento (CC). La columna 12 desde la fila A hasta la F pocillos con control de esterilidad (CE)

Procedimiento para determinar la CMI del voriconazol como control de calidad positivo del método

- a) Agregar 100 μL de voriconazol a la concentración de 32 $\mu\text{g/ml}$ en los pocillos de la columna 1 de las filas A y B.
- b) Agregar 100 μL de voriconazol a la concentración de 16 $\mu\text{g/ml}$ en los pocillos de la columna 2 de las filas A y B.
- c) Agregar 100 μL de voriconazol a la concentración de 8 $\mu\text{g/ml}$ en los pocillos de la columna 3 de las filas A y B.
- d) Agregar 100 μL de voriconazol a la concentración de 4 $\mu\text{g/ml}$ en los pocillos de la columna 4 de las filas A y B.
- e) Agregar 100 μL de voriconazol a la concentración de 2 $\mu\text{g/ml}$ en los pocillos de la columna 5 de las filas A y B.
- f) Agregar 100 μL de voriconazol a la concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ en los pocillos de la columna 6 de las filas A y B.
- g) Agregar 100 μL de voriconazol a la concentración de 0.5 $\mu\text{g/ml}$ en los pocillos de la columna 7 de las filas A y B.
- h) Agregar 100 μL de voriconazol a la concentración de 0.25 $\mu\text{g/ml}$ en los pocillos de la columna 8 de las filas A y B.
- i) Agregar 100 μL de voriconazol a la concentración de 0.12 $\mu\text{g/ml}$ en los pocillos de la columna 9 de las filas A y B.
- j) Agregar 100 μL de voriconazol a la concentración de 0.06 $\mu\text{g/ml}$ en los pocillos de la columna 10 de las filas A y B.
- k) Inocular 100 μL de la suspensión $1-5 \times 10^3$ UFC/mL de *M. furfur* ATCC 14521 desde los pocillos de la columna 1 hasta los pocillos de la columna 10 de las filas A y B.
- l) Agregar 100 μL de RPMI en los pocillos de las columnas 11 y 12 de las filas A y B.
- m) Inocular 100 μL de la suspensión $1-5 \times 10^3$ UFC/mL de *Malassezia furfur* ATCC 14521 en DMSO al 2 % en el pocillo de la columna 11 de las filas A y B.
- n) Agregar 100 μL de SDBO T40 en los pocillos de las columnas 12 de las filas A y B.
- o) Incubar a 32°C por 48 horas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	CC	CE	VZ
B	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	CC	CE	VZ
C													
D													
E													
F													
G													
H													

Figura 14. Diseño de la placa de microdilución en caldo del fármaco en microlitros ($\mu\text{g/ml}$). Las columnas de la 1 a la 10 de las filas A y B pocillos con las diluciones seriadas de voriconazol (VZ), la columna 11 de las filas A y B pocillos con control de crecimiento (CC), la columna 12 de las filas A y B pocillos con control de esterilidad (CE).

Lectura de los resultados

1. Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos etanólicos diluidos en DMSO al 10% frente a *Malassezia furfur* ATCC 14521 a $1-5 \times 10^5$ UFC/mL por el método de microdilución en caldo por duplicado. (Anexo 28 – Formulario N°9), (Anexo 29 – Formulario N°10) (Anexo 30 – Formulario N°11) (Tabla 10)
2. Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del voriconazol diluido en DMSO al 2% como control de calidad positivo del método frente a *Malassezia furfur* ATCC 14521 a $1-5 \times 10^3$ UFC/mL por el método de microdilución en caldo por duplicado. (Anexo 31 – Formulario N°12) (Tabla 11)

4.3.5.5.3 Subcultivo en agar Sabouraud dextrosa suplementado con aceite de oliva al 0.5% y Tween 40 al 0.5% para determinar la CMI del enfrentamiento de los extractos etanólicos por el método de microdilución en caldo sobre *M. furfur* ATCC 14521

El subcultivo de cada enfrentamiento del extracto etanólico de las cortezas vegetales a distintas diluciones contra *Malassezia furfur* ATCC 14521 en SDAO T40 se realiza como control de calidad para determinar la CMI a través de la presencia o ausencia de crecimiento microbiano en cada medio de cultivo sólido, puesto que las altas concentraciones de pigmentos presentes en los extractos vegetales no permiten visualizar la inhibición fúngica (85).

Procedimiento

- a) Agregar 100 µL en cada placa Petri con SDAO T40 cada dilución del enfrentamiento de *Iryanthera juruensis* en DMSO al 10 % a las concentraciones de 125 mg/mL, 62.5 mg/mL, 31.25 mg/mL, 15.62 mg/mL, 7.81 mg/mL, 3.90 mg/mL, 1.95, 0.97 mg/mL, 0.48 mg/mL y 0.24 mg/mL contra *Malassezia furfur*.
- b) Agregar 100 µL en cada placa Petri con SDAO T40 cada dilución del enfrentamiento de *Virola calophylla* en DMSO al 10 % a las concentraciones de 125 mg/mL, 62.5 mg/mL, 31.25 mg/mL, 15.62 mg/mL, 7.81 mg/mL, 3.90 mg/mL, 1.95, 0.97 mg/mL, 0.48 mg/mL y 0.24 mg/mL contra *Malassezia furfur*.
- c) Agregar 100 µL en cada placa Petri con SDAO T40 cada dilución del enfrentamiento de *Vismia amazonica* en DMSO al 10 % a las concentraciones de 125 mg/mL, 62.5 mg/mL, 31.25 mg/mL, 15.62 mg/mL, 7.81 mg/mL, 3.90 mg/mL, 1.95, 0.97 mg/mL, 0.48 mg/mL y 0.24 mg/mL contra *Malassezia furfur*.
- d) Agregar 100 µL de la suspensión $1-5 \times 10^5$ UFC/mL de *Malassezia furfur* ATCC 14521 en DMSO al 10 % en cada placa Petri con SDAO T40.
- e) Agregar 100 µL de SDBO T40 en cada placa Petri con SDAO T40.
- f) Sembrar en toda la superficie del medio de cultivo usando hisopos de algodón estériles.
- g) Incubar a 32°C por 48 horas.

Lectura de los resultados

1. Determinar la presencia o ausencia de crecimiento de *Malassezia furfur* ATCC 14521 en el subcultivo en SDAO T40 de la microdilución en caldo del extracto etanólico de las cortezas vegetales. (Anexo 28 – Formulario N°9), (Anexo 29 – Formulario N°10) (Anexo 30 – Formulario N°11)

V.- RESULTADOS

5.1 Secado de las cortezas vegetales de las especies botánicas

En la Figura 15 se observa las cortezas vegetales frescas y secas a temperatura ambiente de *V. amazonica*, *V. calophylla* e *I. juruensis*. En relación a las Tablas 3 y 4, se tiene las cantidades y porcentajes de los pesos secos y perdidos de las especies botánicas, las cuales señalan que *Virola calophylla* presentó mayor cantidad y porcentaje de peso seco, mientras que *Iryanthera juruensis* obtuvo más cantidad y porcentaje de peso perdido después del secado de su corteza vegetal.

Tabla 3. Pesos de las cortezas vegetales de las especies botánicas

Especie Botánica	Peso Fresco (g)	Peso Seco (g)	Peso Perdido (g)
<i>Iryanthera juruensis</i>	2000	649	1351
<i>Virola calophylla</i>	2000	1034	966
<i>Vismia amazonica</i>	2000	936	1064

* El peso perdido o pérdida de agua de las cortezas vegetales es producto de la resta del peso fresco menos el peso seco.

Tabla 4. Porcentaje de los pesos de las cortezas vegetales de las especies botánicas

Especie Botánica	Porcentaje del Peso Seco (%)	Porcentaje del Peso Perdido (%)	Porcentaje del Peso Total (%)
<i>Iryanthera juruensis</i>	32.45	67.55	100%
<i>Virola calophylla</i>	51.70	48.30	100%
<i>Vismia amazonica</i>	46.80	53.20	100%

*El porcentaje del peso seco y perdido de las cortezas vegetales se calcula con una regla de tres simple, en la cual se multiplica el peso seco y/o perdido por el 100 % y luego se divide dicho resultado entre el peso fresco.



Figura 15. Cortezas vegetales de las especies botánicas. (1) Cortezas frescas. (2) Cortezas secas. (A) *Iryanthera juruensis*. (B) *Virola calophylla*. (C) *Vismia amazonica*.

5.2 Macerado de las cortezas vegetales de las especies botánicas

Las propiedades organolépticas del macerado de las cortezas vegetales de las especies botánicas se encuentran descritas en la Tabla 6 y se visualizan en la Figura 16, las cuales nos permiten identificar las características propias del macerado de cada corteza vegetal.

Tabla 5. Propiedades organolépticas del macerado de las cortezas vegetales

Especie Botánica	Color	Olor	Consistencia
<i>Iryanthera juruensis</i>	Anaranjado – ámbar	Leñoso	Líquido
<i>Virola calophylla</i>	Marrón oscuro – anaranjado	Resinoso	Líquido
<i>Vismia amazonica</i>	Verde oscuro	Resinoso	Semi viscoso



Figura 16. Macerado de las cortezas vegetales de las especies botánicas. (A) *Iryanthera juruensis*. (B) *Virola calophylla*. (C) *Vismia amazonica*

5.3 Obtención de los pesos del extracto etanólico de las cortezas vegetales

En la Figura 17 se contemplan las cápsulas que contienen el extracto etanólico de las cortezas vegetales, en lo que se refiere a la Tabla 6 se tiene el peso del extracto etanólico de *V. amazonica*, *V. calophylla* e *I. juruensis* y en la Tabla 7 se muestra el porcentaje de rendimiento de los extractos etanólicos indicando que *Vismia amazonica* posee el más alto porcentaje de rendimiento y mayor cantidad de compuestos solubles en etanol.

Tabla 6. Pesos del extracto etanólico de las cortezas vegetales

Especie Botánica	Peso de la cápsula con extracto etanólico (g)	Peso de la cápsula vacía (g)	Peso del extracto etanólico (g)
<i>Iryanthera juruensis</i>	124.15	94.97	29.18
<i>Virola calophylla</i>	126.83	93.28	33.55
<i>Vismia amazonica</i>	166.33	86.81	79.52

* El peso del extracto etanólico de las cortezas vegetales es producto de la resta del peso de la cápsula con el extracto etanólico menos el peso de la cápsula vacía

Tabla 7. Porcentaje de rendimiento del extracto etanólico de las cortezas vegetales

Especie Botánica	Peso seco (g)	Peso del extracto etanólico (g)	Porcentaje de rendimiento (%)
<i>Iryanthera juruensis</i>	649	29.18	4.49
<i>Virola calophylla</i>	1034	33.55	3.24
<i>Vismia amazonica</i>	936	79.52	8.49

* El porcentaje de rendimiento se calcula dividiendo el peso del extracto etanólico entre el peso seco de la corteza vegetal y luego se multiplica dicho resultado por el 100%



Figura 17. Cápsulas con el extracto etanólico de las cortezas vegetales. (A) *Vismia amazonica* (B) *Iryanthera juruensis* (C) *Virola calophylla*

5.4 Medición de los halos de inhibición de los extractos etanólicos y del voriconazol por el método de difusión en pozos contra *M. furfur* ATCC 14521

En las Figuras 18 y 19 se visualiza los principales halos de inhibición obtenidos de los extractos etanólicos y del voriconazol a través del método de difusión en pozos en SDAO T40 contra *Malassezia furfur*, mientras que en los Anexos 24 y 25 se puede ver todos los halos de inhibición formados a partir de cada concentración de antifúngico difundido a través el agar. En referencia a la Tabla 8 se observa que *Virola calophylla* posee más actividad biológica, puesto que presentó halos de inhibición desde la concentración de 500 mg/ml hasta 62.5 mg/ml y de mayor medida en comparación a *Vismia amazonica* que solo formó halos de inhibición en la dilución de 500 mg/ml e *Iryanthera juruensis* no generó ningún halo de inhibición. Con relación a la Tabla 9 se puede ver que el voriconazol como control de calidad positivo del método, formó halos de inhibición mucho más grandes en comparación a los que generó *V. calophylla*, indicando que *M. furfur* ATCC 14521 es más sensible al voriconazol que a los extractos etanólicos estudiados. En cuanto al análisis estadístico de las mediciones de los halos de inhibición para los extractos etanólicos y el voriconazol se tiene que no hubo diferencias significativas para ambos resultados, puesto que la media de los halos de inhibición de cada concentración presenta una tendencia central y los valores bajos de la desviación estándar establecen que los datos de las mediciones tienden a estar unidos a la media.

Tabla 8. Halos de inhibición formados por las distintas concentraciones del extracto etanólico de las cortezas vegetales sobre *M. furfur* ATCC 14521

Concentraciones	Halo de Inhibición (mm)					
	<i>Virola calophylla</i>			<i>Vismia amazonica</i>		
	Medición 1	Medición 2	Media ± DE	Medición 1	Medición 2	Media ± DE
500 mg/ml	16	15	15.5 ± 0.5	8	8	8 ± 0
250 mg/ml	14	12	13 ± 1	-	-	-
125 mg/ml	10	8	9 ± 1	-	-	-
62.5 mg/ml	9	9	9 ± 0	-	-	-

*La media es el promedio que se obtiene al sumar las mediciones 1 y 2 de los halos de inhibición de una determinada concentración de extracto etanólico y luego dividirlo entre dos. DE: desviación estándar

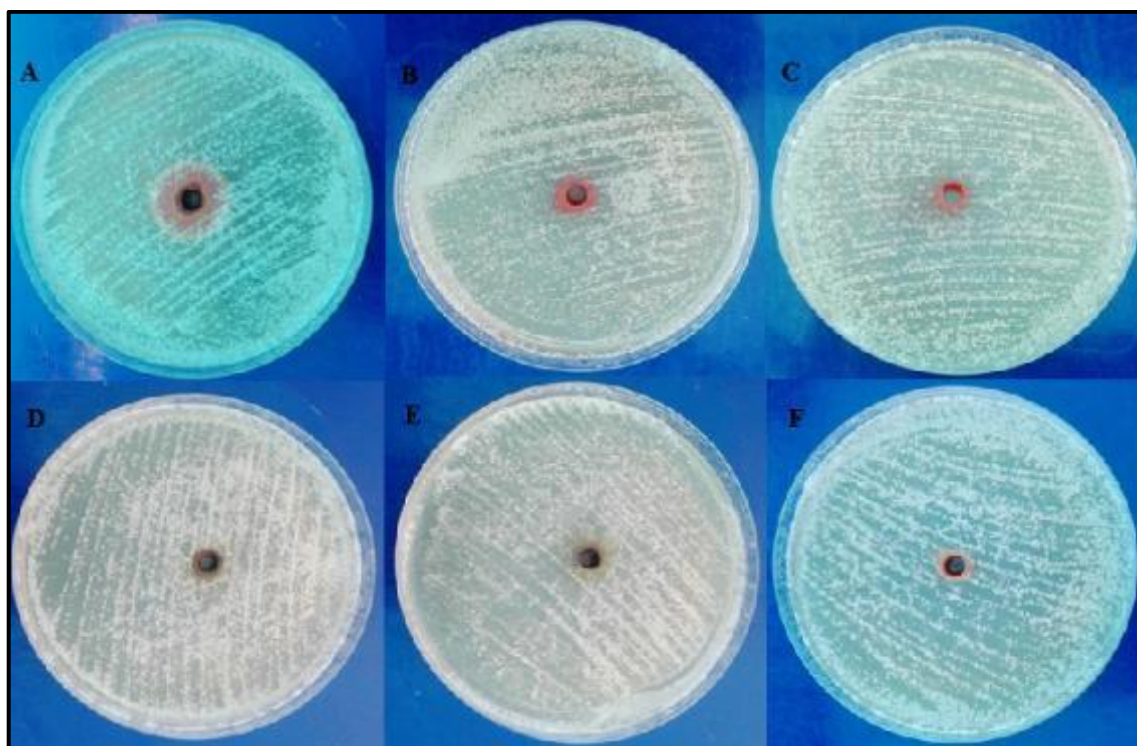


Figura 18. Formación de halos de inhibición de los extractos etanólicos por el método de difusión en pozos sobre *M. furfur* ATCC 14521. (A) Presencia de halo de inhibición de *V. calophylla* a 500 mg/ml. (B) Presencia de halo de inhibición de *V. calophylla* a 62.5 mg/ml. (C) Ausencia de halo de inhibición de *V. calophylla* a 31.25 mg/ml. (D) Presencia de halo de inhibición de *V. amazonica* a 500 mg/ml. (E) Ausencia de halo de inhibición de *V. amazonica* a 250 mg/ml. (F) Ausencia de halo de inhibición de *I. juruensis* a 500 mg/mL

Tabla 9. Halos de inhibición formados por las distintas concentraciones del voriconazol sobre *M. furfur* ATCC 14521

Concentraciones	Halo de Inhibición (mm)		
	Voriconazol		
	Medición 1	Medición 2	Media \pm DE
32 μ g/ml	43	41	42 \pm 1
16 μ g/ml	36	37	36.5 \pm 0.5
8 μ g/ml	30	27	28.5 \pm 1.5
4 μ g/ml	20	23	21.5 \pm 1.5
2 μ g/ml	12	13	12.5 \pm 0.5

*La media es el promedio que se obtiene al sumar las mediciones 1 y 2 de los halos de inhibición de una determinada concentración de voriconazol y luego dividirlo entre dos. DE: desviación estándar

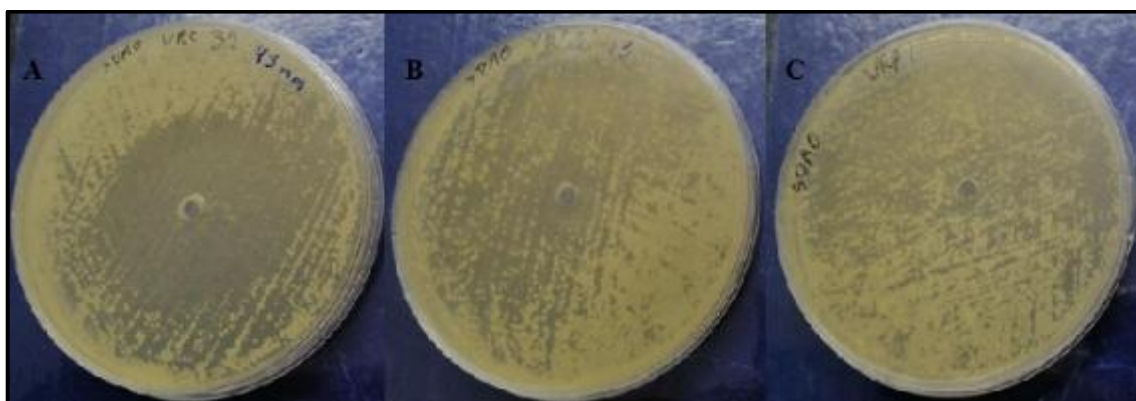


Figura 19. Formación de halos de inhibición del voriconazol por el método de difusión en pozos sobre *M. furfur* ATCC 14521. (A) Presencia de halo de inhibición del voriconazol a 32 μ g/ml. (B) Presencia de halo de inhibición del voriconazol a 2 μ g/ml. (C) Ausencia de halo de inhibición del voriconazol a 1 μ g/ml.

5.5 Enfrentamiento del extracto etanólico de las cortezas vegetales y del voriconazol para hallar la CMI por el método de microdilución contra *M. furfur* ATCC 14521

En las Figuras 20 y 21 se muestran los resultados conseguidos mediante el método de microdilución en SDBO T40 para hallar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de las cortezas vegetales y del voriconazol contra *Malassezia furfur*. Con respecto a la determinación de la CMI para los extractos etanólicos de las cortezas vegetales, en la Tabla 10 se indica la CMI de 62.5 mg/ml para *Virola calophylla* y *Vismia amazonica*, mientras que *Iryanthera juruensis* no exhibió actividad antifúngica.

A su vez, en los Anexos 28, 29 y 30 se puede ver el subcultivo en SDAO T40 de cada enfrentamiento de los extractos etanólicos para ver su respectiva CMI, puesto que los pigmentos vegetales no permitieron visualizar la inhibición fúngica en la microdilución en caldo. Por otro lado, en la Tabla 11 se observa la CMI del voriconazol como control de calidad positivo del método, la cual corresponde a un valor de 0.12 $\mu\text{g/ml}$ que es mucho menor en comparación a la CMI de *V. calophylla* y *V. amazonica*, demostrando que *M. furfur* ATCC 14521 es mucho más susceptible al voriconazol que a los extractos etanólicos.

Tabla 10. Concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de las cortezas vegetales frente a *M. furfur* ATCC 14521

Especie Botánica	Concentración Mínima Inhibitoria
<i>Vismia amazonica</i>	62.5 mg/ml
<i>Virola calophylla</i>	62.5 mg/ml
<i>Iryanthera juruensis</i>	-

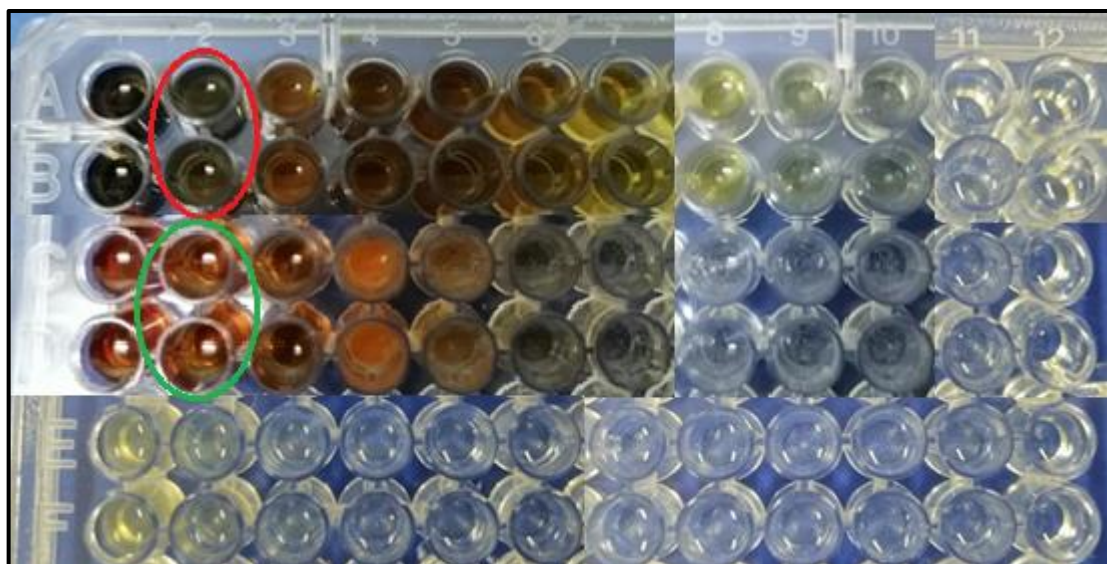


Figura 20. Concentración Mínima Inhibitoria del extracto etanólico de las cortezas vegetales por el método de microdilución en caldo frente a *M. furfur* ATCC 14521. La columna 2 de las filas A y B marcada en rojo corresponde a la CMI de *V. amazonica* a 62.5 mg/ml. La columna 2 de las filas C y D marcada en verde corresponde a la CMI de *V. calophylla* a 62.5 mg/ml. En las filas E y F no se observa la CMI de *I. juruensis*.

Tabla 11. Concentración mínima inhibitoria (CMI) del voriconazol como control de calidad positivo del método frente a *M. furfur* ATCC 14521

Fármaco	Concentración Mínima Inhibitoria
Voriconazol	0.12 µg/ml



Figura 21. Concentración Mínima Inhibitoria del voriconazol frente a *M. furfur* ATCC 14521 por el método de microdilución en caldo. La columna 9 de las filas A y B marcada en rojo corresponde a la CMI a 0.12 µg/ml del voriconazol

VI.- DISCUSIÓN

El presente trabajo tuvo como objetivo principal determinar la actividad antifúngica *in vitro* del extracto etanólico de las cortezas de *Iryanthera juruensis*, *Virola calophylla* y *Vismia amazónica* contra *Malassezia furfur* ATCC 14521.

Para ello, se realizó el análisis microbiológico, eligiendo el uso de levaduras *M. furfur* ATCC 14521 y no de filamentos, porque Mendoza M (86) indicó que es importante realizar las investigaciones en levaduras, puesto que son más sensibles para el aislamiento e identificación taxonómica a nivel molecular y son más susceptibles a los antifúngicos. No obstante, para estudios con estructuras miceliales, se emplea el método M38-A2 del CLSI, pero los micelios pueden presentar resistencia a los antifúngicos en las pruebas de sensibilidad y fallas en su tratamiento (87). También es importante mencionar que el dimorfismo de las especies de *Malassezia spp* hacen complicado su estudio en fase micelial y su cultivo *in vitro*, excepto por Saadatzaheh, et al (88) que hicieron crecer micelios *in vitro* de diferentes especies de *Malassezia spp* obtenidos de muestras clínicas en el medio agaroso de cultivo micelial, pero sin realizar pruebas de sensibilidad. Aunque, en un estudio demostraron que el ketoconazol inhibe las levaduras y las células miceliales de *Malassezia furfur* en un medio de cultivo sólido (89). Por otro lado, hay investigadores que están examinando muchas especies botánicas usadas en la medicina tradicional como tratamiento alternativo para combatir diferentes tipos de enfermedades infecciosas, puesto que se ha descubierto que muchos hongos patógenos como los del género *Malassezia sp* son resistentes a los azoles y estos últimos han ocasionado efectos adversos en los seres humanos. En este sentido, se encontró que los compuestos químicos que tiene el extracto etanólico de *Citrullus colocynthis*, son los responsables de su efecto tóxico en *Malassezia furfur* y otras especies infecciosas del mismo género (90). Asimismo, se halló que *Malassezia furfur* es altamente susceptible al extracto etanólico de *Quisqualis indica* y al extracto acuoso de *Eugenia jambolana* (91). En nuestros resultados obtenidos, los extractos etanólicos de *Virola calophylla* y *Vismia amazonica* mostraron actividad biológica sobre *M. furfur* ATCC 14521 en los métodos de sensibilidad antifúngica analizados, mientras que *Iryanthera juruensis* no tuvo efecto en ninguno de los ensayos (Figura 18 y 20). Al medirse los halos de inhibición que formaron el extracto etanólico de las cortezas de *Virola calophylla* y *Vismia amazonica* (Tabla 8) diluidas a diferentes

concentraciones en DMSO al 100 % por el método de difusión en pozo en SDAO T40, se observó que fueron de menor tamaño en comparación a los que formó el voriconazol DMSO al 2 % (Tabla 9), debido a que en la naturaleza estas cortezas vegetales poseen varios compuestos químicos en distintas proporciones y no necesariamente atraviesan el agar (70). También se demostró que *Virola calophylla* presentó mayor actividad contra *M. furfur* ATCC 14521 en SDAO T40, formando halos de inhibición desde la concentración de 500 mg/ml hasta 62.5 mg/ml (Tabla 8), lo cual indica que el extracto etanólico de la corteza de *Virola calophylla* posee compuestos con propiedades antifúngicas sobre *Malassezia furfur* ATCC 14521 son permeables al agar a diferencia de *Vismia amazonica* que solo formó halo de inhibición a la concentración de 500 mg/ml (Tabla 8). Respecto a los resultados obtenidos del voriconazol frente a *M. furfur* ATCC 14521 como control de calidad positivo del método de difusión en pozo en SDAO T40, los halos de inhibición fueron mucho grandes y de bajas concentraciones desde 32 µg/mL hasta 2 µg/mL (Figura 19) en comparación con los que formaron los extractos de *Virola calophylla* y *Vismia amazonica* (Figura 18); puesto que el voriconazol es una droga pura y contiene una alta capacidad fungicida ante *Malassezia furfur* (84). A su vez, se mencionó los términos de sensible (S), intermedio (I) y resistente (R) para los halos de inhibición formados por el voriconazol (Anexo 26), debido a que existen parámetros establecidos por el CLSI para el estudio de sensibilidad a los antifúngicos como el voriconazol que es un derivado triazólico fluorado que inhibe la síntesis del ergosterol y otros esteroides, ejerciendo un efecto letal sobre hongos y levaduras (81) (92) (93). Por otro lado, el valor de la CMI obtenido del enfrentamiento del extracto etanólico de *Virola calophylla* y *Vismia amazonica* diluidas a diferentes concentraciones en DMSO al 10 % por el método de microdilución en caldo SDBO T40 contra *Malassezia furfur* ATCC 14521 fue de 62.5 mg/ml para los dos casos (Tabla 10 y Figura 20). Al comparar la CMI de ambos extractos etanólicos con el voriconazol en DMSO al 2 %, vemos que este último tuvo una CMI de 0.12 µg/ml (Tabla 11 y Figura 21), la cual es mucho menor que la CMI de *Virola calophylla* y *Vismia amazonica*, puesto que el voriconazol es una droga pura. Asimismo, el método de microdilución en caldo es mucho más sensible que la difusión en agar, porque en SDBO T40 muchos compuestos forman puentes de hidrógeno con el agua permitiéndoles actuar de manera directa sobre los microorganismos que se encuentran dispersos en el medio de cultivo líquido, mientras que en SDAO T40 el agar no permite que los compuestos difunden con facilidad y enfrenten a los microorganismos

que se encuentran en la superficie del medio de cultivo sólido (81) (94). Por otra parte, los extractos etanólicos de las cortezas vegetales fueron diluidos en DMSO al 10%, puesto que en nuestro trabajo y en otras investigaciones se observó que el DMSO al 10% no inhibe el crecimiento en caldo de *M. furfur* ATCC 14521 a la concentración de $1-5 \times 10^5$ UFC/mL (39) (95). Sin embargo, no se han encontrado estudios que demuestren el rol que juega el DMSO en la inhibición de *Malassezia furfur* y tampoco en otras especies del mismo género en medios de cultivo líquido. Aun así, se ha comprobado que el DMSO al 10% puede desnaturalizar fragmentos de ADN (96), puesto que los grupos metilo del DMSO se unen con la citosina e interrumpe su apareamiento con la guanina, ocasionando la rotura de las hebras del ADN y causar muerte celular (94). En cuanto a la comparación de los resultados obtenidos en ambos métodos para cada extracto, estos fueron distintos para *Vismia amazonica*, la cual posee mayor capacidad inhibitoria en la microdilución en caldo con una CMI de 62.5 mg/ml en DMSO al 10 % y menor actividad en la difusión en agar formando únicamente halos de inhibición en la concentración de 500 mg/ml en DMSO al 100 %, evidenciando que los compuestos biológicamente activos contra *Malassezia furfur* ATCC 14521 presentes en *Vismia amazonica* tienen una escasa permeabilidad al agar. Mientras que *Virola calophylla* tiene una CMI de 62.5 mg/ml en DMSO al 10 % en la microdilución en caldo y también forma halos de inhibición hasta la concentración de 62.5 mg/ml en DMSO al 100 % demostrando una vez más que posee compuestos antifúngicos sobre *M. furfur* ATCC 14521 permeables al agar. Es importante tener en cuenta que la difusión en agar forma parte de los métodos estandarizados para evaluar la sensibilidad *in vitro* de microorganismos patógenos como *Malassezia furfur* a los antifúngicos, mediante la formación de halos de inhibición (97). Sin embargo, hay que considerar que la permeabilidad al agar también es un factor limitante al evaluar los resultados obtenidos, puesto que no hay investigaciones sobre los compuestos presentes en la corteza de *Vismia amazonica* con propiedades fungicidas y no tendrían el potencial de formar enlaces químicos con el agar o podrían ser de gran tamaño que les impiden difundir a través del mismo (98). Por el contrario, Ruge et al (49) demostró que el safrol y el metilparabeno son compuestos antimicóticos presentes en las cortezas de *Virola calophylla*, los cuales tienen la capacidad de ser permeables al agar.

De acuerdo a otros estudios realizados, se encontró que el extracto etanólico de la corteza de *Virola calophylla* tiene propiedades antimicrobianas, debido a la presencia de compuestos biológicamente activos como el metilparabeno y el safrol (49). En una

investigación se descubrió que el metilparabeno de origen comercial inhibe el crecimiento de hongos como *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* y *Candida albicans* en medios de cultivo sólidos (99). En la investigación realizada por Vizcaino S (100), comprobó el potencial fungicida del safrol aislado de los extractos vegetales de *Piper auritum* y *Piper holtonii* frente al micelio del hongo fitopatógeno *Botryodiplodia theobromae* en agar papa dextrosa a través de la formación de halos de inhibición. A su vez, se ha demostrado que el safrol de origen comercial presenta actividad antifúngica moderada por métodos de microdilución en caldo sobre *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pityrosporum ovale* (*Malassezia furfur*), *Penicillium chrysogenum* y *Candida utilis* con CMI's entre 100 a 800 µg/ml, siendo *Pityrosporum ovale* el hongo más sensible al safrol (101). Al comparar los estudios anteriormente mencionados con nuestros resultados obtenidos, podemos indicar que las propiedades antifúngicas de *Virola calophylla* contra *Malassezia furfur* ATCC 14521, se debe a la presencia de compuestos biológicamente activos como el metilparabeno y principalmente el safrol, del cual se ha comprobado su efecto tóxico frente a *Malassezia furfur* (101). Sin embargo, no podemos descartar la existencia de otros compuestos químicos con actividad antimicótica presentes en *Virola calophylla*, puesto que no se han realizado más investigaciones en relación a ello.

Con respecto a *Vismia amazonica*, no se encontraron estudios que demuestran las propiedades antimicóticas de sus extractos etanólicos; aunque Nué J (51), reportó una mayor actividad leishmanicida de quinonas, flavonoides, taninos en la fracción hexánica del extracto crudo de las raíces de *Vismia amazonica*. Magalhaes et al (102), hallaron que el extracto hexánico de *Vismia gracilis* (*Vismia amazonica*) posee benzofenonas y antraquinonas con efecto tóxico en las larvas de *Aedes aegypti* (transmisor de enfermedades tropicales); quedando por demostrar qué tipo de compuestos presentes en *Vismia amazonica* son biológicamente activos contra hongos y levaduras. No obstante, se han hecho estudios con otras especies del género *Vismia sp* como *Vismia guianensis*, de la cual se comprobó que el extracto etanólico de sus hojas tiene un gran potencial antifúngico contra los hongos dimórficos de *Sporothrix schenckii* (103). También, Costa RI et al (104) han indicado que el extracto etanólico y metanólico de las hojas de *Vismia guianensis* posee actividad inhibitoria sobre *Malassezia furfur*, *Candida albicans* y *Trichophyton rubrum*; por lo cual, al relacionar este último estudio con nuestros resultados obtenidos, se demuestra que el género *Vismia sp* presenta compuestos biológicamente activos frente a *Malassezia furfur*.

VII.- CONCLUSIONES

- Se demostró la actividad biológica *in vitro* del extracto etanólico de las cortezas de *Virola calophylla* y *Vismia amazonica* sobre *Malassezia furfur* ATCC 14521 en las pruebas de sensibilidad antifúngica analizadas.
- Se observó que el extracto etanólico de *Iryanthera juruensis* no tuvo efecto *in vitro* ante *M. furfur* ATCC 14521 en ninguno de los métodos realizados.
- Se comprobó mediante de la medición de los halos de inhibición que *Virola calophylla* posee mayor permeabilidad al agar contra *M. furfur* ATCC 14521.
- Se determinó a través del método de microdilución en caldo el valor de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de 62.5 mg/ml del extracto etanólico de las cortezas de *Virola calophylla* y *Vismia amazonica* frente a *M. furfur* ATCC 14521.

VIII.- RECOMENDACIONES

- Realizar un estudio fitoquímico del extracto etanólico de las cortezas vegetales de *Virola calophylla* y *Vismia amazonica* e identificar los compuestos que presentan actividad contra *Malassezia furfur* ATCC 14521.
- Demostrar la actividad biológica *in vitro* del extracto hexánico de la corteza de *Virola calophylla* y *Vismia amazonica* frente a *Malassezia furfur* ATCC 14521 por distintos métodos de sensibilidad antifúngica.
- Determinar la actividad antimicótica *in vitro* del extracto etanólico de las cortezas de *Virola calophylla* y *Vismia amazonica* a través de pruebas de sensibilidad antifúngica sobre las estructuras miceliales (fase patógena) de *Malassezia furfur*.

IX.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gómez Daza F. Características generales de los hongos e infecciones sistémicas y oportunistas de las micosis tropicales [Internet]. España: Editorial Médica Panamericana; [citado el 10 de octubre del 2024]. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/510724144/Hongos-e-Infecciones-y-Micosis>
2. Breeze RG, Budowle B, Schutzer SE. Microbial Forensics [Internet]. Estados Unidos: Elsevier Science & Technology; 2005 [citado el 10 de octubre del 2024]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/book/9780120884834/microbial-forensics>
3. Carroll KC, Hobden JA, Miller S, Morse SA, Mietzner TA, Detrick B, Mitchell TG, McKerrow JH, Sakanari JA. Microbiología médica [Internet]. 27ª ed. México: McGraw-Hill Education; 2016 [citado el 10 de octubre del 2024]. Disponible en: <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1837§ionid=128961958>
4. Huamaní M, Ruiz J. Determinación de la actividad antifúngica contra *Candida albicans* y *Aspergillus niger* de 10 plantas medicinales de 3 departamentos del Perú. [Tesis de Licenciatura]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2005. [citado el 10 de octubre del 2024]. Disponible en: https://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/03/880033/determinacion-de-la-actividad-antifungica-contra-candida-albica_X89AK3e.pdf
5. Bellmann R, Smuszkiewicz P. Pharmacokinetics of antifungal drugs: practical implications for optimized treatment of patients. Infection [Internet]. 2017 [citado el 10 de octubre del 2024]; 45(6):737-779. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5696449/>
6. Singulani JL, Galeane MC, Ramos MD, Gomes PC, Dos Santos CT, de Souza BM, Palma MS, Fusco Almeida AM, Mendes Giannini MJS. Antifungal Activity, Toxicity, and Membranolytic Action of a Mastoparan Analog Peptide. Front Cell Infect Microbiol [Internet]. 2019 [citado el 10 de octubre del 2024]; 9:419. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31867293/>
7. Arif T, Bhosale JD, Kumar N, Mandal TK, Bendre RS, Lavekar GS, Dabur R. Natural products--antifungal agents derived from plants. J Asian Nat Prod Res.

- [Internet]. 2009 [citado el 10 de octubre del 2024]; 11(7):621-38. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10286020902942350>
8. Ochoa M. Estudio de las especies de *Malassezia* relacionadas con la patología cutánea, pitiriasis versicolor en Panamá. [Tesis de Doctorado]. Panamá: Universidad de Panamá; 2006. [citado el 10 de octubre del 2024]. Disponible en: <https://digibug.ugr.es/bitstream/handle/10481/1327/1645778x.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
 9. Padilla-Desgarenes MC. Pitiriasis versicolor. *Dermatol Rev Mex*. 2005; 49(4): 157-67.
 10. Arenas R. *Micología médica ilustrada*. 3ª ed. México: Mc Graw Hill; 2008.
 11. Bonifaz A. *Micología médica básica*. 3ª ed. México: Mc Graw Hill; 2010.
 12. Sánchez AL, Fernández RF, Moreno G, Arenas R. Pitiriasis versicolor y *Malassezia spp*: una revisión. *Dermatología CMQ* [Internet]. 2014 [citado el 10 de octubre del 2024]; 12(1): 52-57. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2014/dcm141k.pdf>
 13. Inamadhar AC, Palit A. The genus *Malassezia* and human disease. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* [Internet]. 2003 [citado el 10 de octubre del 2024]; 69(4):265-70. Disponible en: <https://ijdv.com/the-genus-malassezia-and-human-disease/>
 14. Harada K, Saito M, Sugita T, Tsuboi R. *Malassezia* species and their associated skin diseases. *J Dermatol* [Internet]. 2015 [citado el 10 de octubre del 2024]; 42(3):250-7. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1346-8138.12700>
 15. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. *Microbiología Médica*. 6ª ed. España: Elsevier; 2009.
 16. Galvis JM. Evaluación de la susceptibilidad *in vitro* de aislamientos de *Malassezia spp*. de origen humano y canino frente a antifúngicos de uso clínico. [Tesis de Maestría]. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana; 2014 [citado el 10 de octubre del 2024]. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/15455/GalvisMarinJuanCamilo2014.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
 17. Crespo V, Ojeda A, Vera A, Crespo A, Sánchez F. Aislamiento e identificación de *Malassezia spp* en pitiriasis versicolor, dermatitis seborreica y piel sana. *Rev*

- Iberoam Micol [Internet]. 1999 [citado el 10 de octubre del 2024]; 16: 16-21. Disponible en: <https://www.reviberoammicol.com/1999-16/S16S21.pdf>
18. Romano C, Mancianti F, Nardoni S, Ariti G, Caposciutti P, Fimiani M. Identification of *Malassezia* species isolated from patients with extensive forms of pityriasis versicolor in Siena, Italy. Rev Iberoam Micol [Internet]. 2013 [citado el 10 de octubre del 2024]; 30(4):231-4. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23434513/>
19. Cruz R, Vieille P, Carvajal L. *Malassezia pachydermatis* en lesiones de piel en pacientes de la Quinta región de Chile. Rev Argent Dermatol [Internet]. 2014 [citado el 10 de octubre del 2024]; 95(4): 1-5. Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-300X2014000400001&lng=es
20. Sosa MA, Giusiano G, Mangiaterra M, Bustillo S. Agentes etiológicos de la pitiriasis versicolor. [Internet]. Argentina; 2005 [citado el 10 de octubre del 2024]. Disponible en: <https://studylib.es/doc/5449608/agentes-etiol%C3%B3gicos-de-pitiriasis-versicolor>
21. Miranda KC, de Araujo CR, Soares AJ, de Aquino Lemos J, Souza LK, do Rosário Rodrigues Silva M. Identificação de espécies de *Malassezia* em pacientes com pitiríase versicolor em Goiânia-GO. Rev Soc Bras Med Trop [Internet]. 2006 [citado el 10 octubre del 2024]; 39(6):582-3. Disponible en: <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/zdQjSDsTm4kgdN4BFp3kHLt/?lang=pt>
22. Bejar V, Rojas C, Guevara JM, Pareja E, Huaman A, Sevilla R, et al. Identificación de especies de *Malassezia* aisladas de piel sana en pobladores de Lima, Perú. An Fac Med. [Internet] 2014 [citado el 10 de octubre del 2024]; 75(2): 173-6. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832014000200014
23. Crespo-Erchiga V, Gómez-Moyano E, Crespo M. La pitiriasis versicolor y las levaduras del género *Malassezia*. Actas Dermo-Sifiliográficas. [Intenet] 2008 [citado el 10 de octubre del 2024]; 99: 764-71. Disponible en: <file:///C:/Users/canch/Downloads/S0001731008749561.pdf>
24. Sosa MA, Rojas F, Toma Vanacore S, Mangiaterra M, Giusano G. Actividad lipasa de especies de *Malassezia* aisladas en pacientes sanos y con lesiones

- dérmicas. Boletín Micológico. [Internet] 2008 [citado el 10 de octubre del 2024];
23. Disponible en: <https://revistas.uv.cl/index.php/Bolmicol/article/view/117>
25. Puig L. Estudio fenotípico y molecular de *Malassezia pachydermatis* y *Malassezia furfur* aisladas de animales. [Tesis de Doctorado]. España: Universidad Autónoma de Barcelona; 2017 [citado el 10 de octubre del 2024]. Disponible en: <https://www.tesisenred.net/handle/10803/456307#page=4>
26. Herrera E, Moreno A, Requena L, Rodríguez JL. Dermatología: Correlación clínico – patológica [Internet]. España: Grupo Menarini; 2007 [citado el 10 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/170407591/Dermatopatologia-Correlacion-Clinico-Patologica>
27. Sánchez-Saldaña L, Matos-Sánchez R, Kumakawa H. Infecciones micóticas superficiales. Dermatología Peruana [Internet]. 2009 [citado el 10 de octubre del 2024]; 19(3): 226-66. Disponible en: https://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/dermatologia/v19_n3/pdf/a09v19n3.pdf
28. Boekhout T, Mayser P, Guého-Kellermann E, Velegraki A. *Malassezia* and the skin [Internet]. Alemania: Springer Nature; 2010 [citado el 10 de octubre del 2024]. Disponible en: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-03616-3_2
29. Rodríguez D. Caracterización de especies de *Malassezia* como microbiota comensal en la piel de equinos. [Tesis de Licenciatura]. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana; 2014 [citado el 10 de octubre del 2024]. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/16674/RodriguezSandovalDianaMilena2014%20%281%29.pdf?sequence=3&isAllowed=y>
30. Sugita T, Suto H, Unno T, Tsuboi R, Ogawa H, Shinoda T, Nishikawa A. Molecular analysis of *Malassezia* microflora on the skin of atopic dermatitis patients and healthy subjects. J Clin Microbiol [Internet]. 2001 [citado el 10 de octubre del 2024]; 39(10):3486-90. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/jcm.39.10.3486-3490.2001>
31. Gandra RF, Simão RC, Matsumoto FE, da Silva BC, Ruiz LS, da Silva EG, Gambale W, Paula CR. Genotyping by RAPD-PCR analyses of *Malassezia furfur* strains from pityriasis versicolor and seborrhoeic dermatitis patients.

- Mycopathologia [Internet]. 2006 [citado el 10 de octubre del 2024]; 162(4):273-80. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17039273/>
32. Vuran E, Karaarslan A, Karasartova D, Turegun B, Sahin F. Identification of *Malassezia* species from pityriasis versicolor lesions with a new multiplex PCR method. Mycopathologia [Internet]. 2014 [citado el 10 de octubre del 2024]; 177(1-2):41-9. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24190515/>
33. Gaitanis G, Velegraki A, Alexopoulos EC, Kapsanaki-Gotsi E, Zisova L, Ran Y, Zhang H, Arsenis G, Bassukas ID, Faergemann J. *Malassezia furfur* fingerprints as possible markers for human phylogeography. ISME J [Internet]. 2009 [citado el 10 de octubre del 2024]; 3(4):498-502. Disponible en: <https://academic.oup.com/ismej/article/3/4/498/7588210>
34. Gupta AK, Boekhout T, Theelen B, Summerbell R, Batra R. Identification and typing of *Malassezia* species by amplified fragment length polymorphism and sequence analyses of the internal transcribed spacer and large-subunit regions of ribosomal DNA. J Clin Microbiol [Internet]. 2004 [citado el 10 de octubre del 2024]; 42(9):4253-60. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jcm.42.9.4253-4260.2004>
35. Pérez B, García J, Romero FJP. Pityriasis versicolor en paciente de raza negra. Med Gen y Fam (digital) [Internet]. 2012 [citado 10 de octubre del 2024]; 1(4): 198. Disponible en: https://mgyf.org/wp-content/uploads/2017/revistas_antes/V1N4/V1N4_198.pdf
36. Gupta AK, Foley KA. Antifungal treatment for pityriasis versicolor. J Fungi (Basel) [Internet]. 2015 [citado el 10 de octubre del 2024]; 1(1):13-29. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5770013/>
37. Wang QM, Theelen B, Groenewald M, Bai FY, Boekhout T. Moniliellomycetes and Malasseziomycetes, two new classes in Ustilaginomycotina. Persoonia [Internet]. 2014 [citado el 10 de octubre del 2024]; 33:41-7. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25737592/>
38. National Library of Medicine – National Center of Biotechnology Information. *Malassezia furfur* strain ATCC 14521 28S large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence [Internet]. Estados Unidos: NLM-NCBI; 2016 [citado el 10 de octubre del 2024]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/1035523725>

39. Rukayadi Y, Diantini A, Lestari K. Antifungal activity of methanolic extract of *Usnea sp.* against *Malassezia furfur*. *Bionatura-Jurnal Ilmu-ilmu Hayati dan Fisik* [Internet]. 2012 [citado el 10 de octubre del 2024]; 14(1): 31-37. Disponible en: <https://media.neliti.com/media/publications/217870-none.pdf>
40. American Type Culture Collection [Internet]. Manassas, Virginia; 2024 [citado el 10 de octubre del 2024]. Disponible en: <https://www.atcc.org/products/14521>
41. Cronquist A. The evolution and classification of flowering plants. 2^a ed. USA: The New York Botanical Garden; 1988.
42. Vásquez R. Flórmula de las reservas biológicas de Iquitos, Perú. [Internet] USA: Missouri Botanical Garden; 1997 [citado el 10 de octubre del 2024]. Disponible en: <https://www.biodiversitylibrary.org/item/316134#page/9/mode/1up>
43. Zárate R, Amasifuen C, Flores M. Floración y fructificación de plantas leñosas en bosques de arena blanca y de suelo arcilloso en la Amazonía peruana. *Revista peruana de biología* [Internet]. 2006 [citado el 10 de octubre del 2024]; 13(1): 95-102. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rpb/v13n1/a05v13n01.pdf>
44. Morais S, Teixeira AF, Dos Santos Z, Nunomura S, Yamashiro-Kanashiro E, Lindoso JA, Yoshida M. Biological activities of lignoids from Amazon Myristicaceae species: *Virola michelii*, *V. mollissima*, *V. pavonis* and *Iryanthera juruensis*. *J Braz Chem Soc* [Internet]. 2009 [citado el 10 de octubre del 2024]; 20(6): 1110-18. Disponible en: <https://www.scielo.br/j/jbchs/a/JzrtzCRnQLVDVXtzTSy65tf/>
45. Silva DHS, Pereira FC, Yoshida M, Zanoni MVB. Electrochemical evaluation of lipophilic antioxidants from *Iryanthera juruensis* fruits (Myristicaceae). *Eclet Quim* [Internet]. 2005 [citado el 10 de octubre del 2024]; 30(3): 15-21. Disponible en: <https://www.scielo.br/j/eq/a/JP3PQTrNRbtrJsybdTMZMFd/?lang=en>
46. Bascope M, Sterner O. Lignans from *Iryanthera juruensis* Warb. *Revista boliviana de química* [Internet]. 2006 [citado el 10 de octubre del 2024]; 23(1): 44-47. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/4263/426339668009.pdf>
47. DeFilipps RA, Maina SL, Crepin J. Medicinal Plants of Guianas (Guyana, Surinam, French Guiana) [Internet]. USA: Department of Botany National, Museum of Natural History, Smithsonian Institution; 2004 [citado el 10 de octubre del 2024]. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/231363889/bota-1>

48. Brako L, Zarucchi JL. Catalogue of the flowering plants and gymnosperms of Peru [Internet]. USA: Missouri Botanical Garden; 1993 [citado el 10 de octubre del 2024]. Disponible en: <https://www.biodiversitylibrary.org/page/62031348#page/7/mode/1up>
49. Ruge C, Cuca L, Martínez J. Estudio químico y microbiológico del extracto etanólico de las hojas y corteza de *Virola calophylla* (Myristicaceae). Rev Col Cienc Quim Farm [Internet]. 1998 [citado el 10 de octubre del 2024]; 27: 25-29. Disponible en: <file:///C:/Users/canch/Downloads/faaristizabalg,+V27P25-29+-4.pdf>
50. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana. Base de datos de plantas medicinales [Internet]. Perú: IIAP; 2010 [citado el 10 de octubre del 2024]. Disponible en: http://www.iiap.org.pe/Archivos/publicaciones/Publicacion_1586.pdf
51. Nué J. Estudio fitoquímico biodirigido de los extractos de *Vismia amazonica* Ewan “Pichirina Blanca”. [Tesis de Licenciatura]. Ica: Universidad Nacional San Luis de Gonzaga; 2011.
52. Roumy V, Garcia-Pizango G, Gutierrez-Choquevilca AL, Ruiz L, Jullian V, Winterton P, Fabre N, Moulis C, Valentin A. Amazonian plants from Peru used by quechua and mestizo to treat malaria with evaluation of their activity. J Ethnopharmacol [Internet]. 2007 [citado el 10 de octubre del 2024]; 112(3):482-9. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17573216/>
53. Aponte JC, Vaisberg AJ, Rojas R, Caviedes L, Lewis WH, Lamas G, Sarasara C, Gilman RH, Hammond GB. Isolation of cytotoxic metabolites from targeted peruvian amazonian medicinal plants. J Nat Prod [Internet]. 2008 [citado el 10 de octubre del 2024]; 71(1):102-5. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/np070560c>
54. Nijima M, Kano R, Nagata M, Hasegawa A, Kamata H. An azole-resistant isolate of *Malassezia pachydermatis*. Veterinary Microbiology [Internet]. 2011 [citado el 10 de octubre del 2024]; 149(1-2): 288-90. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378113510004979>
55. Sharma A, Rabha D, Ahmed G. *In vitro* antifungal susceptibility of *Malassezia* isolates from pityriasis versicolor lesions. Indian J Dermatol Venereol Leprol [Internet]. 2017 [citado el 10 de octubre del 2024]; 83(2):249-251. Disponible en:

<https://ijdv.com/in-vitro-antifungal-susceptibility-of-malassezia-isolates-from-pityriasis-versicolor-lesions/>

56. Khoza S, Moyo I, Ncube D. Comparative hepatotoxicity of fluconazole, ketoconazole, itraconazole, terbinafine, and griseofulvin in rats. *J Toxicol* [Internet]. 2017; [citado el 10 de octubre del 2024]; 2017. Disponible en: <https://www.semanticscholar.org/reader/e42228818192bfb552005aadf7c28b6a95114674>
57. Doß S, Potschka H, Doß F, Mitzner S, Sauer M. Hepatotoxicity of antimycotics used for invasive fungal infections: *In vitro* results. *Biomed Res Int* [Internet]. 2017 [citado el 10 de octubre del 2024]; 2017. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28473992/#:~:text=Results.,of%20hepatocyte%20viability%20and%20function.>
58. Dourojeanni M. Loreto sostenible al 2021 [Internet]. Perú: Derecho ambiente y recursos naturales (DAR); 2013 [citado el 10 de octubre del 2024]. Disponible en: https://www.dar.org.pe/archivos/publicacion/loreto2021_final_re.pdf.
59. Instituto Nacional de Estadística e Informática. Compendio estadístico Perú 2023 [Internet]. Perú: INEI; 2023 [citado el 10 de octubre del 2024]. Disponible en: <https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/5547449/4932612-tomo-1-compendio-estadistico-peru-2023.pdf?v=1702563212>
60. Tello R, Rojas A, Macedo LA, Alegría W. Eficacia del método de cuadrante, sextante y el método de parcela cuadrada en la evaluación cuantitativa de un bosque tropical, Iquitos-Perú. [Trabajo de Investigación]. Iquitos: Universidad Nacional de la Amazonía Peruana; 2006 [citado el 10 de octubre del 2024]. Disponible en: <https://www.yumpu.com/es/document/read/14547070/eficiencia-del-metodo-de-cuadrante-sextante-y-el->
61. Flores M, Alarcón EJ, Zárate R, Rengifo AM, Flores JL, Ruíz JC, Mozombite LF. Floración y fructificación de diez especies de plantas del centro de investigación y enseñanza forestal (CIEFOR), Puerto Almendra, Loreto, Perú. *Folia amazónica* [Internet]. 2015 [citado el 10 de octubre del 2024]; 24(2): 101-114. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/316711104_FLORACION_Y_FRUCTIFICACION_DE_DIEZ_ESPECIES_DE_PLANTAS_DEL_CENTRO_DE_INVESTIGACION_Y_ENSEANANZA_FORESTAL_CIEFOR_PUERTO_ALMENDRA_LORETO_PERU

62. Organismo de Supervisión de los Recursos Forestales y de Fauna Silvestre. Protocolo para la herborización: Colección y preservado de ejemplares botánicos en procesos de supervisión forestal [Internet]. Perú: OSINFOR; 2013 [citado el 10 de octubre del 2024]. Disponible en: https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/1016322/protocolo_herborizacion_julio201320200716-31706-1vksox0.pdf?v=1597783650
63. Krommenhoek W, Sebus J, van Esch G.J. Atlas de histología vegetal. España: Editorial Marbán; 1986 [citado el 10 de octubre del 2024]. Disponible en: <https://www.studocu.com/es-mx/document/universidad-autonoma-de-baja-california-sur/fisiologia-vegetal/botanica-atlas-de-histologia-vegetal-w-krommenhoek-j-sebus-gj-van-esch/70301623>
64. Pimentel E, Castillo D, Quintana M, Maurtua D, Villegas L, Díaz C. Efecto antibacteriano de los extractos etanólicos de plantas utilizadas en las tradiciones culinarias andinas sobre microorganismos de la cavidad bucal. Rev Estomatol Herediana [Internet]. 2015 [citado el 10 de octubre del 2024]; 25(4): 268-77. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1019-4352015000400004
65. Radford AE, Dickinson WC, Massey JR, Bell CR. Vascular plant systematics [Internet]. New York: Harper and Row; 1974 [citado el 10 de octubre del 2024]. Disponible en: <https://archive.org/details/vascularplantsys00radf/page/n1/mode/2up>
66. Instituto Nacional de Biodiversidad. Protocolo de manejo de colecciones de plantas vasculares. Proyecto “Desarrollando capacidades compartiendo tecnología para la gestión de biodiversidad en Centroamérica” [Internet]. Costa Rica: INBio; 2008 [citado el 10 de octubre del 2024]. Disponible en: <https://es.slideshare.net/slideshow/protocolo-vasculares/65949644#1>
67. Giberti GC. Herborización y herbarios como referencia en estudios técnico-científicos. Herbarios de la Argentina. Dominguezia [Internet]. 1998 [citado el 10 de octubre del 2024]; 14(1): 19-39. Disponible en: <https://ojs.dominguezia.org/index.php/Dominguezia/article/view/1998%2014%281%29-3>

68. Saravia J, Cano T, Chávez B, Cano E, Cerezo O. Extracción y caracterización de taninos en corteza de 3 especies forestales cultivadas en Guatemala, pino ocote (*Pinus oocarpa* Schiede), encino negro (*Quercus brachystachys* Benth) y aliso común (*Alnus jorulensis* HBK.). Una alternativa de desarrollo agroindustrial para el uso de taninos naturales. [Trabajo de Investigación]. Guatemala: Universidad San Carlos de Guatemala; 2002 [citado el 10 de octubre del 2024]. Disponible en: <https://digi.usac.edu.gt/bvirtual/informes/puidi/INF-2002-039.pdf>
69. González A. Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas del Amazonas. [Tesis de Licenciatura]. Manizales: Universidad Nacional de Colombia sede Manizales; 2004 [citado el 10 de octubre del 2024]. Disponible en: <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/2800/angelaandreaconzalezvilla.2004.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
70. Baquero E, Benavides J, Sepulveda L, Quiñones W, Torres F, Cardona D, et al. Actividad antimicrobacteriana de algunas plantas de la flora colombiana. *Scientia Et Technica* [Internet]. 2007 [citado el 10 de octubre del 2024]; XIII (33):133-136. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/849/84903331.pdf>
71. Champion M, Vásquez GR. Actividad antibacteriana *in vitro* del extracto acuoso de hojas y corteza de *Vismia angusta* “pichirina” sobre agentes patógenos. Iquitos-Perú, 2013. [Tesis de Licenciatura]. Iquitos: Universidad Nacional de la Amazonía Peruana; 2013 [citado el 10 de octubre del 2024]. Disponible en: <https://repositorio.unapiquitos.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12737/3612/M%203%b3nica%20Tesis%20Titulo%202013.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
72. Alba MA, Saucedo Y, Sotolongo L, Norman O, Gómez ML, Jorge ME. Optimización de la tecnología de elaboración de la tintura de propóleo. *Centro Azúcar* [Internet]. 2022 [citado el 30 de junio del 2025]; 49(3): 69-77. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2223-48612022000300069
73. Gaylord Chemical Company, L.L.C. Solubility data [Internet]. Estados Unidos: Gaylord Chemical Company, L.L.C.; 2025 [citado el 08 de febrero del 2025]. Disponible en: <https://www.gaylordchemical.com/products/product-grades/dmso/solubility-data/>

74. Aranda L. Modelado de tejido biológico con maniquí de gel en agar para dosimetría de ^{99m}Tc . [Tesis de Maestría]. Toluca: Universidad Autónoma del Estado de México; 2013 [citado el 10 de octubre del 2024]. Disponible en: <http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/14420/409333.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
75. Wang X, Lim HJ, Son A. Characterization of denaturation and renaturation of DNA for DNA hybridization. *Environ Health Toxicol* [Internet]. 2014 [citado el 10 de octubre del 2024]; 29 e2014007. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4168728/>
76. Araya I, Prat S, Ramírez V. Recomendaciones para el control de calidad en bacteriología: Estudio de susceptibilidad antimicrobiana mediante difusión por disco [Internet]. Santiago: Instituto de Salud Pública de Chile; 2015 [citado el 10 de octubre del 2024]. Disponible en: https://www.ispch.cl/sites/default/files/Recomendacion_Contro_Calidad_Bacteriologia.pdf
77. Fernández-Larrea O, Cejas A, Márquez ME. Influencia del medio de cultivo, el tipo de inóculo y las condiciones de agitación-aireación en la reproducción de dos cepas de *Bacillus thuringiensis* (Berl.) en fermentadores de diferentes volúmenes. *Fitosanidad* [Internet]. 2009 [citado el 10 de octubre del 2024]; 13(3): 201-209. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=209114855008>
78. Peterson BW, Sharma PK, van der Mei HC, Busscher HJ. Bacterial cell surface damage due to centrifugal compaction. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2012 [citado el 10 de octubre del 2024]; 78(1):120-5. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aem.06780-11>
79. Gilbert P, Coplan F, Brown MR. Centrifugation injury of gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 1991 [citado el 10 de octubre del 2024]; 27(4):550-1. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1856133/>
80. Mbakwem-Aniebo C, Onianwa O, Okonko IO. Effects of *Ficus exasperata* Wahl on common dermatophytes and causative agent of pityriasis versicolor in Rivers State, Nigeria. *American Journal of Dermatology and Venereology* [Internet]. 2012 [citado el 10 de octubre del 2024]; 1(1): 1-5. Disponible en: <http://article.sapub.org/10.5923.j.ajdv.20120101.01.html>

81. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. Third edition. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa, 2008.
82. Balouiri M, Sadiki M, Koraichi Ibsouda S. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of Pharmaceutical Analysis [Internet]. 2016 [citado el 10 de octubre del 2024]; 6(2): 71-79. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2095177915300150>
83. Vélez Y. Dermatitis facial por *Malassezia pachydermatis*. Bol Micol [Internet]. 2018; [citado el 10 de octubre del 2024]; 33(1):21-25. Disponible en: https://revistas.uv.cl/index.php/Bolmicol/article/view/1165/pdf_26
84. Galvis Marín JC, Rodríguez-Bocanegra MX, Pulido-Villamarín ADP, Castañeda-Salazar R, Celis-Ramírez AM, Linares-Linares MY. Actividad antifúngica *in vitro* de azoles y anfotericina B frente a *Malassezia furfur* por el método de microdilución M27-A3 del CLSI y Etest. Rev Iberoam Micol [Internet]. 2017 [citado el 10 de octubre del 2024]; 34(2): 89-93. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-iberoamericana-micologia-290-articulo-actividad-antifungica-in-vitro-azoles-S1130140616300560>
85. Kang CG, Hah DS, Kim CH, Kim YH, Kim E, Kim JS. Evaluation of antimicrobial activity of the methanol extracts from 8 traditional medicinal plants. Toxicol Res [Internet]. 2011 [citado el 10 de octubre del 2024]; 27(1):31-6. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3834511/>
86. Mendoza M. Importancia de la identificación de levaduras. Rev Soc Ven Microbiol [Internet]. 2005 [citado el 10 de octubre del 2024]; 25 (1): 15-23. Disponible en: https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562005000100004
87. Chávez J, Rivas P, Cortés, Cuervo S, Sánchez R, Parra C. Sensibilidad *in vitro* de hongos miceliales de aislamientos clínicos en pacientes con cáncer en el Instituto Nacional de Cancerología ESE. Infectio [Internet]. 2010 [citado el 30 de junio del 2025]; 14(S2): S116-S126. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-93922010000600004
88. Saadatzadeh MR, Ashbee HR, Holland KT, Ingham E. Production of the mycelial phase of *Malassezia in vitro*. Med Mycol [Internet]. 2001 [citado el 10 de octubre

- del 2024]; 39(6):487-93. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11798054/>
89. Youngchim S, Nosanchuk JD, Chongkae S, Vanittanokom N. Ketoconazole inhibits *Malassezia furfur* morphogenesis *in vitro* under filamentation optimized conditions. Arch Dermatol Res [Internet]. 2017 [citado el 10 de octubre del 2024]; 309(1):47-53. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27885419/>
90. Nazeri M, Ata-Bakhshian R, Taghizadeh M, Talaei R, Mahboubi M. Antifungal activity of herbal extracts against *Malassezia* species. Iranian Journal of Dermatology [Internet]. 2015 [citado el 10 de octubre del 2024]; 18(1): 10-15. Disponible en: https://www.iranjd.ir/article_98246_d267d2b6041f129df15495400d6507d3.pdf
91. Sarika K.M., Aparajita V., Bindu Rani Bindu Rani, Soosamma M. Herbal extracts and their antifungal activity against *Malassezia furfur*. International Journal of Pharma and Bio Sciences [Internet]. 2013 [citado el 10 de octubre del 2024]; 4 (3): B969-B974. Disponible en: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20133392258>
92. Saravolatz LD, Johnson LB, Kauffman CA, Voriconazole: A new triazole antifungal agent. Clin Infect Dis [Internet]. 2003 [citado el 10 de octubre del 2024]; 36(5) 630–37. Disponible en: <https://academic.oup.com/cid/article-abstract/36/5/630/454409?redirectedFrom=fulltext>
93. Sanati H, Belanger P, Fratti R, Ghannoum M. A new triazole, voriconazole (UK-109,496), blocks sterol biosynthesis in *Candida albicans* and *Candida krusei*. Antimicrob Agents Chemother [Internet]. 1997 [citado el 10 de octubre del 2024]; 41(11): 2492-6. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9371355/>
94. Nelson DL, Cox MM. Lehninger Principios de Bioquímica. 5ª ed. España: Ediciones Omega, 2009.
95. Rukayadi Y, Hwang JK. *In vitro* anti-*Malassezia* activity of xanthorrhizol isolated from *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. Lett Appl Microbiol [Internet]. 2007 [citado el 30 de junio del 2025]; 44(2):126-30. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17257249/>
96. Xu M, Dai T, Wang Y, Yang G. The incipient denaturation mechanism of DNA. RSC Adv [Internet]. 2022 [citado el 30 de junio del 2025]; 12(36):23356-23365. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9383117/>

97. Cona E. Condiciones para un buen estudio de susceptibilidad mediante test de difusión en agar. *Rev Chil Infect* [Internet]. 2002 [citado el 10 de octubre del 2024]; 19(2): 77-81. Disponible en: <https://www.scielo.cl/pdf/rci/v19s2/art01.pdf>
98. Delgado O. Cálculo de la permeabilidad de un modelo de membrana celular hacia dos agentes antifímicos. [Tesis de Maestría]. Monterrey: Universidad Autónoma de Nuevo León; 2014 [citado el 10 de octubre del 2024]. Disponible en: <http://eprints.uanl.mx/4116/1/1080253748.pdf>
99. Rismanbaf A, Tajfar F, Esmaceli Z, Khodaveisi M, Shams-Ghahfarokhi M, Razzaghi-Abyaneh M. Antifungal activity of methylparaben (-hydroxybenzoic acid methyl ester) against human pathogenic fungi. Conference: The 16th International and Iranian Congress of Microbiology [Actas de conferencia en línea] Teherán, Irán. Agosto del 2015. [citado el 10 de octubre del 2024]. Disponible en: <file:///C:/Users/canch/Downloads/347e2015161110.pdf>
100. Vizcaíno S. Safrol y Apiol: metabolismo, preparación de derivados y actividad antifúngica contra el hongo fitopatógeno *Botryodiplodia theobromae*. [Tesis de Maestría]. Medellín: Universidad Nacional de Colombia; 2013 [citado el 10 de octubre del 2024]. Disponible en: <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/21076/1050005007.2014.pdf?sequence=1>
101. Carrasco H, Raimondi M, Svetaz L, Di Liberto M, Rodriguez MV, Espinoza L, Madrid A, Zacchino S. Antifungal activity of eugenol analogues. Influence of different substituents and studies on mechanism of action. *Molecules* [Internet]. 2012 [citado el 10 de octubre del 2024]; 17(1):1002-24. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1420-3049/17/1/1002>
102. Magalhaes NMG, Sousa JPB, Demarque DP, Salvador CEM, Albernaz LC, Achee NL, Grieco JP, Espindola LS. Combining chemometric and phytochemical tools to isolate and characterize activity of *Vismia gracilis* compounds against *Aedes aegypti*. *Nat Prod Res* [Internet]. 2022 [citado el 10 de octubre del 2024]; 36(10):2620-2624. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33858269/>
103. Oliveira AH, de Oliveira GG, Carnevale Neto F, Portuondo DF, Batista-Duharte A, Carlos IZ. Anti-inflammatory activity of *Vismia guianensis* (Aubl.) Pers. extracts and antifungal activity against *Sporothrix schenckii*. *J*

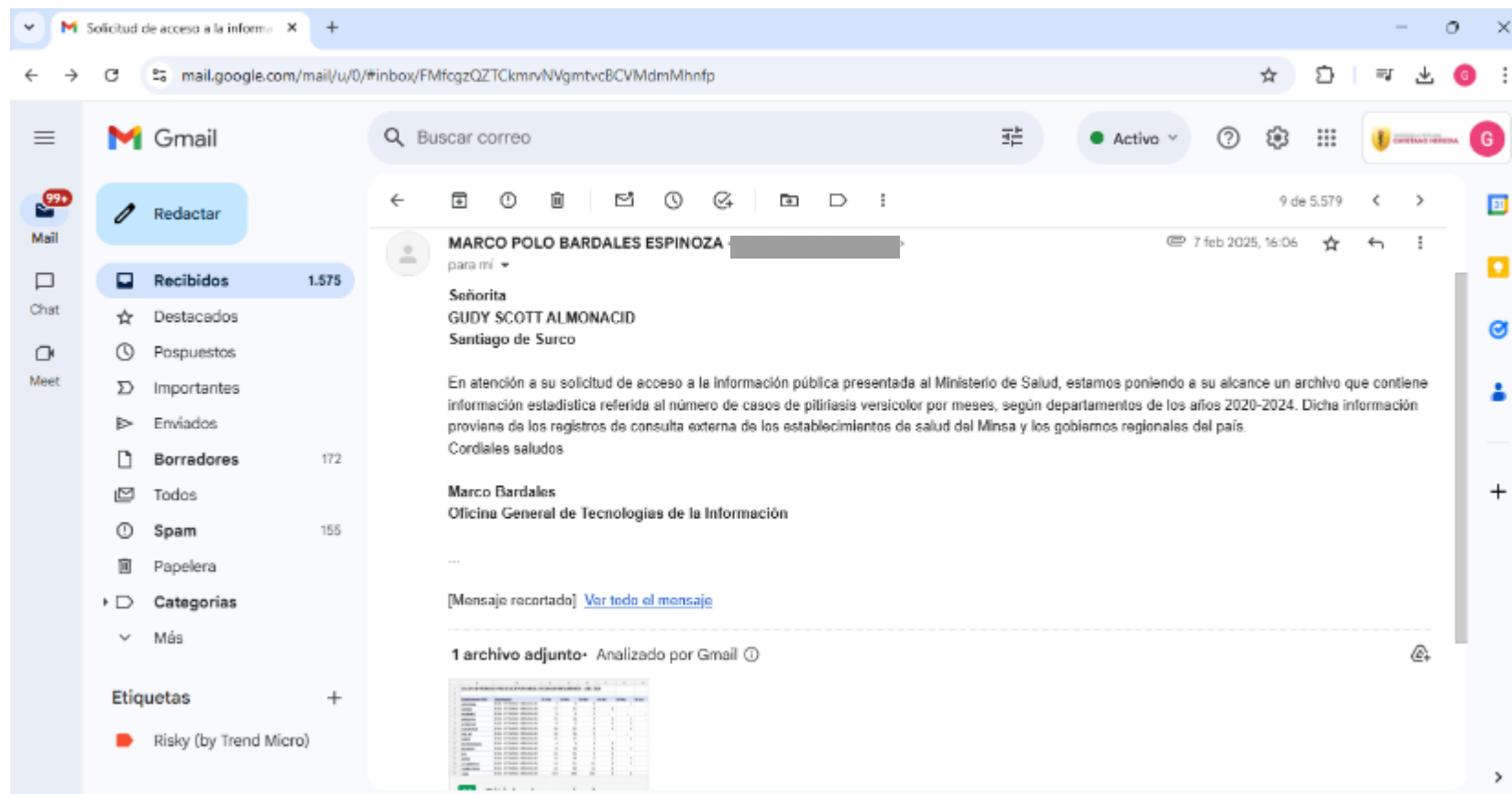
Ethnopharmacol [Internet]. 2017 [citado el 10 de octubre del 2024]; 195:266-274.
Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378874116318979>

104. Costa RI, Prodorutti AP, Maia Chaves FC, Mendoca KA, Alves Cortez AC, Braga de Sousa JV, Pereira ST. Investigation of antifungal activity from *Vismia guianensis* (Aubl.) standardized extract. Concilium [Internet]. 2024 [citado el 10 de octubre del 2024]; 24 (14): 566-578. Disponible en: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1167388/1/clm24p55-clm24p55-2.pdf>

ANEXOS

Anexo 1. Casos de la pitiriasis versicolor en el Perú por departamentos de los últimos cinco años (2020 -2024), otorgados por el MINSA



*Captura de pantalla del correo electrónico respondido por el MINSA, adjuntando el archivo que contiene los casos de pitiriasis versicolor en el Perú por departamentos de los últimos cinco años (2020 – 2024)

Tabla 12

Casos de pitiriasis versicolor registrados en el Perú por meses y departamentos durante el año 2020

CASOS DE PITIRIASIS VERSICOLOR POR MESES, SEGÚN DEPARTAMENTOS - AÑO 2020														
Departamento EESS	Subcategoría	01 Ene	02 Feb	03 Mar	04 Abr	05 May	06 Jun	07 Jul	08 Ago	09 Set	10 Oct	11 Nov	12 Dic	Total, general
AMAZONAS	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	7	9	9	-	1	-	-	3	6	2	6	1	44
ANCASH	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	17	25	9	2	-	1	-	1	2	7	2	4	70
APURIMAC	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	9	6	5	-	-	-	1	-	1	-	9	1	32
AREQUIPA	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	15	14	3	1	1	-	1	1	3	1	3	7	50
AYACUCHO	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	8	6	3	1	3	1	5	3	2	1	9	1	43
CAJAMARCA	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	28	26	9	1	4	2	3	4	5	4	5	8	99
CALLAO	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	16	15	9	-	-	1	3	1	-	3	3	9	60
CUSCO	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	15	17	7	-	4	1	8	-	9	6	9	4	80
HUANCAVELICA	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	4	2	4	2	-	1	1	1	6	1	3	5	30
HUANUCO	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	8	13	5	3	1	1	-	1	2	6	2	5	47
ICA	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	32	25	6	2	-	1	-	-	-	4	3	3	76
JUNIN	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	12	19	2	1	5	2	1	1	3	5	13	17	81
LA LIBERTAD	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	24	21	21	3	2	2	-	5	5	5	3	3	94
LAMBAYEQUE	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	34	38	12	1	-	7	2	5	6	9	11	7	132
LIMA	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	193	188	102	3	8	8	9	9	21	25	25	19	610
LORETO	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	37	39	31	-	4	8	9	18	19	19	4	12	200

MADRE DE DIOS	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	5	7	8	-	4	3	-	1	1	2	4	-	35
MOQUEGUA	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	2	2	-	-	-	1	1	-	-	1	-	2	9
PASCO	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	2	1	2	-	-	-	-	-	-	1	1	-	7
PIURA	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	53	50	18	1	-	5	14	8	17	19	14	22	221
PUNO	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	8	6	4	-	-	-	2	1	-	1	2	5	29
SAN MARTIN	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	20	52	23	-	2	4	7	15	17	13	26	17	196
TACNA	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	-	3	2	-	-	-	-	1	2	4	1	1	14
TUMBES	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	16	15	6	-	-	-	1	1	2	4	4	2	51
UCAYALI	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	27	22	10	2	4	-	5	2	7	5	4	2	90
Total, general		592	621	310	23	43	49	73	82	136	148	166	157	2,400

Fuente: Oficina General de Tecnologías de la Información - MINSa

* La fila resaltada en amarillo corresponde a los casos de pitiriasis versicolor registrados en Loreto por meses durante el año 2020

Tabla 13

Casos de pitiriasis versicolor registrados en el Perú por meses y departamentos durante el año 2021

CASOS DE PITIRIASIS VERSICOLOR POR MESES, SEGÚN DEPARTAMENTOS - AÑO 2021														
Departamento EESS	Subcategoría	01 Ene	02 Feb	03 Mar	04 Abr	05 May	06 Jun	07 Jul	08 Ago	09 Set	10 Oct	11 Nov	12 Dic	Total, general
AMAZONAS	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	3	5	9	6	4	-	3	6	6	6	12	2	62
ANCASH	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	3	6	1	4	5	10	4	3	12	12	11	5	76
APURIMAC	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	2	2	1	2	-	1	1	4	1	3	1	1	19
AREQUIPA	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	5	7	5	1	5	6	1	11	5	8	5	3	62
AYACUCHO	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	3	2	7	5	5	3	1	6	5	3	3	6	49
CAJAMARCA	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	10	10	13	10	3	1	8	13	9	11	18	16	122
CALLAO	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	5	4	2	3	-	1	2	1	3	3	5	4	33
CUSCO	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	14	8	5	8	9	4	9	4	15	9	13	11	109
HUANCAVELICA	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	2	1	3	3	2	-	3	2	1	2	4	5	28
HUANUCO	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	5	2	8	2	1	8	15	6	10	7	10	11	85
ICA	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	2	1	1	4	-	3	1	2	6	9	7	3	39
JUNIN	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	4	12	6	10	-	16	4	4	10	9	5	14	94
LA LIBERTAD	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	6	7	6	4	11	5	11	12	6	11	9	12	100
LAMBAYEQUE	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	7	6	5	6	10	12	8	6	17	4	19	11	111
LIMA	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	24	16	33	34	32	35	44	49	50	57	49	41	464
LORETO	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	11	9	9	19	15	16	15	20	39	40	35	16	244

MADRE DE DIOS	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	1	2	3	3	5	2	3	6	2	3	-	2	32
MOQUEGUA	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	-	-	1	-	-	1	-	2	3	2	1	-	10
PASCO	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	3	-	2	1	1	-	3	2	-	1	2	3	18
PIURA	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	13	3	13	11	12	25	25	37	25	21	21	7	213
PUNO	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	3	1	3	4	3	2	2	5	2	8	7	4	44
SAN MARTIN	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	17	18	16	15	3	5	5	18	14	25	22	20	178
TACNA	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	-	-	1	2	-	2	2	10	-	2	4	2	25
TUMBES	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	1	1	6	5	4	2	3	6	12	8	10	4	62
UCAYALI	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	7	7	14	3	11	10	6	6	8	9	9	4	94
Total, general		151	130	173	165	141	170	179	241	261	273	282	207	2,373

Fuente: Oficina General de Tecnologías de la Información - MINSA

* La fila resaltada en amarillo corresponde a los casos de pitiriasis versicolor registrados en Loreto por meses durante el año 2021

Tabla 14

Casos de pitiriasis versicolor registrados en el Perú por meses y departamentos durante el año 2022

CASOS DE PITIRIASIS VERSICOLOR POR MESES, SEGÚN DEPARTAMENTOS - AÑO 2022														
Departamento EESS	Subcategoría	01 Ene	02 Feb	03 Mar	04 Abr	05 May	06 Jun	07 Jul	08 Ago	09 Set	10 Oct	11 Nov	12 Dic	Total, general
AMAZONAS	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	9	7	4	16	12	5	4	10	3	12	7	12	101
ANCASH	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	5	5	17	12	17	17	15	12	14	14	14	5	147
APURIMAC	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	5	2	3	4	1	2	3	4	2	4	5	5	40
AREQUIPA	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	5	3	7	9	5	2	5	4	4	4	3	5	56
AYACUCHO	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	7	4	3	4	5	4	6	1	1	10	4	5	54
CAJAMARCA	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	10	7	13	10	7	4	19	10	12	26	21	7	146
CALLAO	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	3	2	4	11	1	15	2	4	6	5	10	10	73
CUSCO	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	14	8	14	9	14	10	5	6	9	15	6	8	118
HUANCAVELICA	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	4	2	3	-	3	1	2	1	5	-	1	5	27
HUANUCO	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	5	5	11	8	3	5	4	15	4	9	15	5	89
ICA	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	3	4	7	5	6	5	3	6	4	12	8	6	69
JUNIN	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	8	2	12	5	5	2	9	3	2	5	9	7	69
LA LIBERTAD	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	12	11	23	21	19	17	26	15	15	19	14	9	201
LAMBAYEQUE	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	7	12	18	8	13	14	10	16	10	11	12	9	140
LIMA	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	56	78	90	106	98	85	73	81	80	87	91	86	1,011
LORETO	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	20	30	58	38	47	25	42	28	35	26	52	22	423

MADRE DE DIOS	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	6	1	5	4	6	2	5	4	1	1	6	6	47
MOQUEGUA	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	1	2	3	2	2	2	-	2	3	-	1	3	21
PASCO	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	-	1	-	4	2	-	-	1	2	1	2	-	13
PIURA	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	15	35	11	24	21	17	19	29	34	25	27	16	273
PUNO	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	4	6	2	2	9	8	11	5	7	7	9	9	79
SAN MARTIN	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	19	18	32	26	22	19	24	28	31	31	37	22	309
TACNA	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	1	2	5	2	1	2	1	1	-	2	-	-	17
TUMBES	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	7	3	8	5	9	12	9	4	2	9	4	3	75
UCAYALI	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	4	9	2	14	14	12	12	11	12	12	13	8	123
Total, general		230	259	355	349	342	287	309	301	298	347	371	273	3,721

Fuente: Oficina General de Tecnologías de la Información - MINSA

* La fila resaltada en amarillo corresponde a los casos de pitiriasis versicolor registrados en Loreto por meses durante el año 2022

Tabla 15

Casos de pitiriasis versicolor registrados en el Perú por meses y departamentos durante el año 2023

CASOS DE PITIRIASIS VERSICOLOR POR MESES, SEGÚN DEPARTAMENTOS - AÑO 2023														
Departamento EESS	Subcategoría	01 Ene	02 Feb	03 Mar	04 Abr	05 May	06 Jun	07 Jul	08 Ago	09 Set	10 Oct	11 Nov	12 Dic	Total, general
AMAZONAS	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	10	10	13	15	3	3	8	9	18	14	12	12	127
ANCASH	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	13	17	24	24	20	23	20	18	26	27	30	23	265
APURIMAC	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	4	9	1	3	3	1	3	6	5	1	9	10	55
AREQUIPA	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	5	4	11	8	4	9	6	12	7	17	14	12	109
AYACUCHO	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	5	2	12	11	3	6	3	12	10	11	10	13	98
CAJAMARCA	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	17	15	23	26	11	16	21	25	27	31	24	23	259
CALLAO	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	12	9	9	19	31	18	26	15	18	18	8	13	196
CUSCO	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	19	26	18	22	12	13	11	24	31	24	27	12	239
HUANCAVELICA	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	4	3	2	5	1	8	2	9	5	7	7	9	62
HUANUCO	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	7	8	5	7	10	7	17	3	10	13	11	13	111
ICA	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	17	11	15	20	11	23	16	20	23	26	17	16	215
JUNIN	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	8	11	10	7	8	8	20	9	15	12	12	17	137
LA LIBERTAD	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	20	24	16	38	26	26	24	30	24	29	40	28	325
LAMBAYEQUE	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	12	24	24	20	12	19	20	44	25	20	20	29	269
LIMA	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	116	136	179	196	219	194	164	154	148	175	174	140	1,995
LORETO	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	28	45	46	35	63	36	52	53	47	53	43	29	530

MADRE DE DIOS	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	5	18	18	7	10	15	6	6	17	9	8	11	130
MOQUEGUA	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	4	9	1	4	3	3	2	2	3	1	2	5	39
PASCO	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	3	4	10	5	4	5	4	4	5	1	7	1	53
PIURA	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	32	42	48	52	42	55	24	34	44	38	28	27	466
PUNO	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	8	12	10	11	4	10	13	7	8	2	10	8	103
SAN MARTIN	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	27	55	39	28	25	25	39	38	29	53	36	41	435
TACNA	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	5	3	2	-	5	3	9	1	5	8	5	4	50
TUMBES	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	5	10	10	18	13	17	22	20	28	22	16	8	189
UCAYALI	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	17	17	20	26	17	23	20	26	22	32	26	13	259
Total, general		403	524	566	607	560	566	552	581	600	644	596	517	6,716

Fuente: Oficina General de Tecnologías de la Información - MINSa

* La fila resaltada en amarillo corresponde a los casos de pitiriasis versicolor registrados en Loreto por meses durante el año 2023

Tabla 16

Casos de pitiriasis versicolor registrados en el Perú por meses y departamentos durante el año 2024

CASOS DE PITIRIASIS VERSICOLOR POR MESES, SEGÚN DEPARTAMENTOS - AÑO 2024														
Departamento EESS	Subcategoría	01 Ene	02 Feb	03 Mar	04 Abr	05 May	06 Jun	07 Jul	08 Ago	09 Set	10 Oct	11 Nov	12 Dic	Total, general
AMAZONAS	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	8	19	8	9	7	10	13	9	13	15	13	10	134
ANCASH	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	38	34	22	29	29	24	16	19	37	29	13	28	318
APURIMAC	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	7	8	20	17	3	14	7	8	7	3	5	7	106
AREQUIPA	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	18	10	10	25	17	13	10	16	13	18	8	11	169
AYACUCHO	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	17	15	7	11	12	21	7	12	14	26	17	18	177
CAJAMARCA	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	36	35	16	27	27	30	24	25	30	35	41	30	356
CALLAO	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	22	28	21	30	25	18	22	22	24	10	29	29	280
CUSCO	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	17	23	24	27	19	24	29	30	26	24	31	32	306
HUANCAVELICA	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	8	7	8	7	9	12	3	11	15	17	6	7	110
HUANUCO	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	22	15	24	29	27	9	20	20	11	25	21	24	247
ICA	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	29	22	29	24	22	17	18	24	20	19	12	19	255
JUNIN	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	15	18	23	23	27	17	18	12	18	29	24	18	242
LA LIBERTAD	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	53	79	48	57	46	38	40	35	31	51	45	38	561
LAMBAYEQUE	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	46	57	52	60	35	61	37	39	44	52	53	32	568
LIMA	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	248	288	243	253	264	203	161	173	165	147	162	131	2,438

LORETO	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	56	49	56	51	63	56	49	44	45	55	54	23	601
MADRE DE DIOS	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	9	10	7	9	4	6	9	5	4	8	7	8	86
MOQUEGUA	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	3	7	6	5	4	4	3	4	1	2	-	2	41
PASCO	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	4	6	5	10	10	1	10	11	8	7	11	8	91
PIURA	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	63	57	43	58	67	63	54	46	53	50	39	21	614
PUNO	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	17	8	12	14	12	6	6	10	16	12	9	21	143
SAN MARTIN	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	35	53	48	51	48	41	40	46	41	49	35	20	507
TACNA	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	3	6	2	7	5	2	5	3	2	3	7	5	50
TUMBES	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	11	14	18	12	5	11	8	9	21	23	7	10	149
UCAYALI	B360 - PITIRIASIS VERSICOLOR	25	15	25	21	24	23	21	31	31	16	10	15	257
Total, general		810	883	777	866	811	724	630	664	690	725	659	567	8,806

Fuente: Oficina General de Tecnologías de la Información - MINSA

* La fila resaltada en amarillo corresponde a los casos de pitiriasis versicolor registrados en Loreto por meses durante el año 2024

Anexo 2. Preparación de la solución salina estéril NaCl al 0.85 %

Composición

Cloruro de Sodio (NaCl) 0.85 g

Agua destilada 100 mL

Equipos requeridos

Cabina de Bioseguridad Clase II Tipo A2 (Marca LABCONCO, USA), Autoclave (Marca Yamato Modelo SM510, Japón) Balanza (Marca Denver Modelo XL-410, USA)

Materiales requeridos

Botella de vidrio de 250 mL con tapa rosca para medios de cultivos, probeta graduada de 500 mL, 4 tubos de vidrio estériles de 10 mL con tapa rosca.

Preparación

- a) Suspender 0.85 g de NaCl en 100 mL de agua destilada.
- b) Esterilizar en la autoclave a 121°C por 15 minutos.
- c) Dejar enfriar y dispersar en tubos estériles.

Anexo 3. Medio de cultivo agar Sabouraud dextrosa suplementado con aceite de oliva al 0.5% y Tween 40 al 0.5% (SDAO T40)

Composición

Digerido enzimático de caseína 10 g

Dextrosa 40 g

Agar 15 g

Agua destilada 1 L

Aceite de oliva 5 mL

Tween 40 (Sigma-Aldrich®) 5 mL

Solución de cloranfenicol 2 mL

Equipos requeridos

Cabina de Bioseguridad Clase II Tipo A2 (Marca LABCONCO, USA), Propipeta Automática (Marca VITLAB, Alemania), Autoclave (Marca Yamato Modelo SM510, Japón) Balanza (Marca Denver Modelo XL-410, USA)

Materiales requeridos

Botellas de vidrio de 1 litro con tapa rosca para medios de cultivos, probeta graduada de 500 mL, 2 pipetas descartables y estériles de 5 mL, placas Petri descartables y estériles de 90 x 15 mm.

Preparación

- a) Suspender 65 g del producto en 1 litro de agua destilada hirviendo, adicionar 5 mL de aceite de oliva y 5 mL de Tween 40.
- b) Esterilizar en la autoclave a 121°C por 15 minutos.
- c) Dejar enfriar evitando que se solidifique el medio y agregar 2 mL de solución de cloranfenicol.
- d) Dispersar 25 mL de medio de cultivo en cada placa Petri estéril

Anexo 4. Medio de cultivo agar Sabouraud dextrosa (SDA)

Composición

Digerido enzimático de caseína 10 g

Dextrosa 40 g

Agar 15 g

Agua destilada 250 mL

Solución de cloranfenicol 0.5 mL

Equipos requeridos

Cabina de Bioseguridad Clase II Tipo A2 (Marca LABCONCO, USA), Propipeta Automática (Marca VITLAB, Alemania), Autoclave (Marca Yamato Modelo SM510, Japón) Balanza (Marca Denver Modelo XL-410, USA)

Materiales requeridos

Botella de vidrio de 250 mL con tapa rosca para medios de cultivos, probeta graduada de 500 mL, placas Petri descartables y estériles de 90 x 15 mm.

Preparación

- a) Suspender 16.25 g del producto en 250 mL de agua destilada hirviendo.
- b) Esterilizar en la autoclave a 121°C por 15 minutos.
- c) Dejar enfriar evitando que se solidifique el medio y agregar 0.5 mL de solución de cloranfenicol.
- d) Dispersar 25 mL de medio de cultivo en una placa Petri estéril.

Anexo 5. Medio de cultivo caldo Sabouraud dextrosa suplementado con aceite de oliva al 0.5% y Tween 40 al 0.5% (SDBO T40)

Composición

Digerido enzimático de caseína 10 g

Dextrosa 20 g

Agua destilada 500 mL

Aceite de oliva 2.5 mL

Tween (Sigma-Aldrich®) 40 2.5 mL

Equipos requeridos

Cabina de Bioseguridad Clase II Tipo A2 (Marca LABCONCO, USA), Propipeta Automática (Marca VITLAB, Alemania), Autoclave (Marca Yamato Modelo SM510, Japón) Balanza (Marca Denver Modelo XL-410, USA)

Materiales requeridos

Botellas de vidrio de 500 mL con tapa rosca para medios de cultivos, 2 pipetas descartables y estériles de 5 mL, probeta graduada de 500 mL, 7 tubos cónicos de 50 mL con tapa rosca descartables y estériles.

Preparación

- a) Suspender 15 g del producto en 500 mL de agua destilada hirviendo, adicionar 2.5 ml de aceite de oliva y 2.5 ml de Tween 40.
- b) Esterilizar en la autoclave a 121°C por 15 minutos.
- c) Dejar enfriar y dispersar en tubos estériles.

Anexo 6. Preparación del voriconazol diluido en DMSO al 2 %

Composición

Voriconazol (VZ) 16 mg (Droga Pura de la marca Pfizer)

Dimetilsulfóxido (DMSO) 25 mL

Medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 50 mL

Equipos requeridos

Cabina de Bioseguridad Clase II Tipo A2 (Marca LABCONCO, USA), Propipeta Automática (Marca VITLAB, Alemania), Micropipeta de 20 µL -200 µL (Marca LABMATE, Reino Unido)

Materiales requeridos

Gradilla para tubos de ensayo, tips de 200 µl Marca Axygen, 2 pipetas descartables y estériles de 5 mL, 4 pipetas descartables y estériles de 1 mL, 20 tubos cónicos de 10 ml con tapa rosca descartables y estériles.

Preparación

Primera dilución

- a) En el tubo 2 suspender 16 mg de voriconazol en 10 mL de DMSO para obtener la concentración de 1600 µg/ml (Solución Madre)
- b) En el tubo 3 mezclar 0.5 ml de la dilución 1600 µg/ml con 0.5 ml de DMSO para obtener la concentración de 800 µg/ml.
- c) En el tubo 4 mezclar 0.25 ml de la dilución 1600 µg/ml con 0.75 ml de DMSO para obtener la concentración de 400 µg/ml.
- d) En el tubo 5 mezclar 0.25 ml de la dilución 1600 µg/ml con 1.75 ml de DMSO para obtener la concentración de 200 µg/ml.
- e) En el tubo 6 mezclar 0.5 ml de la dilución 200 µg/ml con 0.5 ml de DMSO para obtener la concentración de 100 µg/ml.
- f) En el tubo 7 mezclar 0.25 ml de la dilución 200 µg/ml con 0.75 ml de DMSO para obtener la concentración de 50 µg/ml.

- g) En el tubo 8 mezclar 0.25 ml de la dilución 200 $\mu\text{g/ml}$ con 1.75 ml de DMSO para obtener la concentración de 25 $\mu\text{g/ml}$.
- h) En el tubo 9 mezclar 0.5 ml de la dilución 25 $\mu\text{g/ml}$ con 0.5 ml de DMSO para obtener la concentración de 12.5 $\mu\text{g/ml}$.
- i) En el tubo 10 mezclar 0.25 ml de la dilución 25 $\mu\text{g/ml}$ con 0.75 ml de DMSO para obtener la concentración de 6.25 $\mu\text{g/ml}$.
- j) En el tubo 11 mezclar 0.25 ml de la dilución 25 $\mu\text{g/ml}$ con 1.75 ml de DMSO para obtener la concentración de 3.12 $\mu\text{g/ml}$.

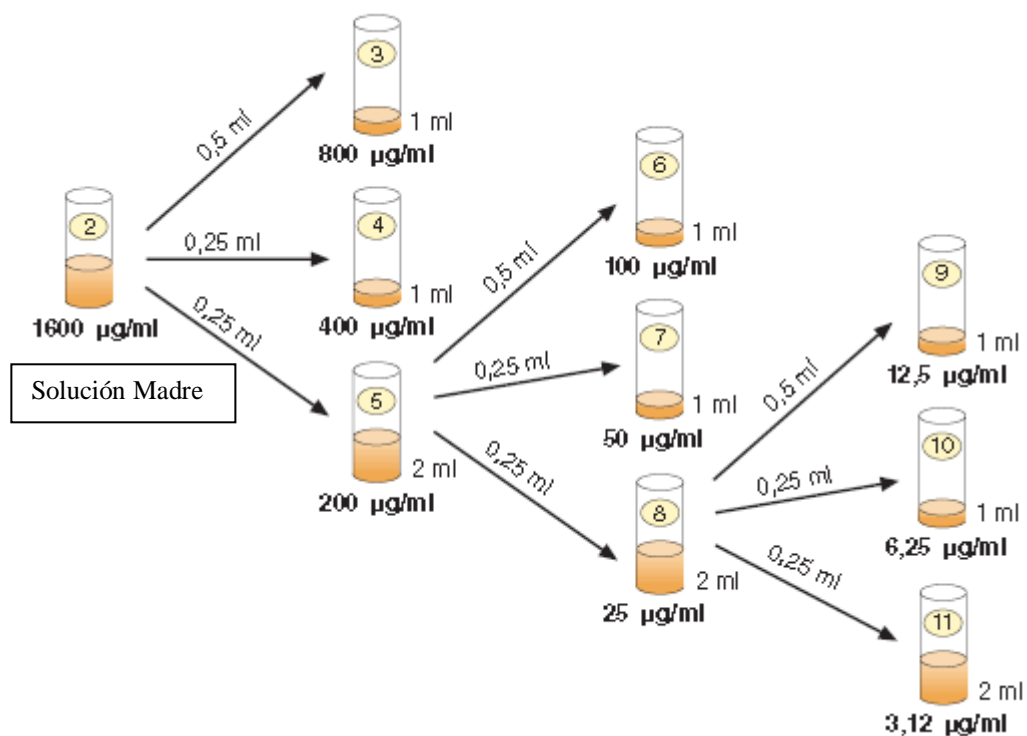


Figura 22. Voriconazol diluido en DMSO a distintas concentraciones

Segunda Dilución

- a) En el tubo 2 mezclar 100 μl de la dilución 1600 $\mu\text{g/ml}$ en 4.9 ml de RPMI para obtener la concentración de 32 $\mu\text{g/ml}$ de voriconazol en DMSO al 2 %.
- b) En el tubo 3 mezclar 100 μl de la dilución 800 $\mu\text{g/ml}$ en 4.9 ml de RPMI para obtener la concentración de 16 $\mu\text{g/ml}$ de voriconazol en DMSO al 2 %.
- c) En el tubo 4 mezclar 100 μl de la dilución 400 $\mu\text{g/ml}$ en 4.9 ml de RPMI para obtener la concentración de 8 $\mu\text{g/ml}$ de voriconazol en DMSO al 2 %.

- d) En el tubo 5 mezclar 100 μ l de la dilución 200 μ g/ml en 4.9 ml de RPMI para obtener la concentración de 4 μ g/ml de voriconazol en DMSO al 2 %.
- e) En el tubo 6 mezclar 100 μ l de la dilución 100 μ g/ml en 4.9 ml de RPMI para obtener la concentración de 2 μ g/ml de voriconazol en DMSO al 2 %.
- f) En el tubo 7 mezclar 100 μ l de la dilución 50 μ g/ml en 4.9 ml de RPMI para obtener la concentración de 1 μ g/ml de voriconazol en DMSO al 2 %.
- g) En el tubo 8 mezclar 100 μ l de la dilución 25 μ g/ml en 4.9 ml de RPMI para obtener la concentración de 0.5 μ g/ml de voriconazol en DMSO al 2 %.
- h) En el tubo 9 mezclar 100 μ l de la dilución 12.5 μ g/ml en 4.9 ml de RPMI para obtener la concentración de 0.25 μ g/ml de voriconazol en DMSO al 2 %.
- i) En el tubo 10 mezclar 100 μ l de la dilución 6.25 μ g/ml en 4.9 ml de RPMI para obtener la concentración de 0.125 μ g/ml de voriconazol en DMSO al 2 %.
- j) En el tubo 11 mezclar 100 μ l de la dilución 3.125 μ g/ml en 4.9 ml de RPMI para obtener la concentración de 0.0625 μ g/ml de voriconazol en DMSO al 2 %.

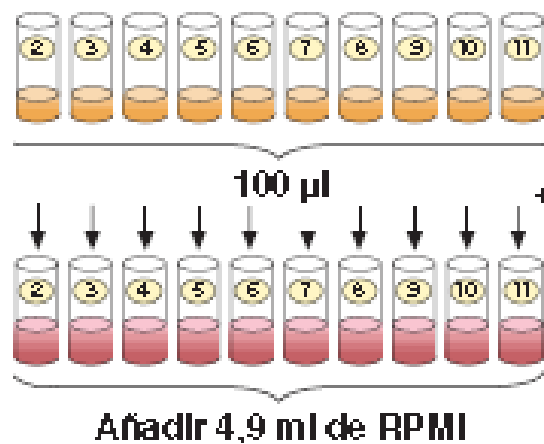



Figura 23. Concentración final del voriconazol en DMSO al 2 %

Anexo 7. Memorandum de autorización de ingreso y acceso al Centro de Investigación y Enseñanza Forestal (CIEFOR) Puerto Almendra de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana en Loreto – Perú

 **UNAP** Facultad de Ciencias Forestales

MEMORANDUM N° 019-2018-D-FCF-UNAP

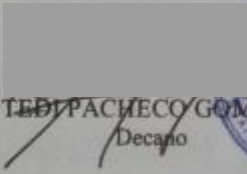

A : Ing. SEGUNDO CORDOVA HORNA
Director CIEFOR- Puerto Almendra – UNAP.

ASUNTO : Autoriza Permiso Ingreso CIEFOR.

FECHA : Iquitos, 02 de mayo 2018

Tenga a bien permitirle el acceso a las instalaciones del Centro de Investigación y Enseñanza Forestal (CIEFOR) – Puerto Almendra, a la Srta. **GUDY DIAMELA SCOTT ALMONACID**, DNI N° 43972354, exalumna de la carrera profesional de Biología de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, para realizar parte de su proyecto de tesis: "Actividad antifúngica *in vitro* del extracto etanólico de las cortezas de *Iryanthera juruensis* Warb., *Virola calophylla* Warb. y *Vismia amazonica* Ewan contra *Malassezia furfur* y *Malassezia globosa*".

Atentamente,


ING. **LEYDIPACHECO GOMEZ**, M.Sc.
Decano 

c.c.
Srta. Scott,
Archivo

Ciudad Universitaria-Caserío "Puerto Almendra"-Rio Nanay
Pevas 584-Iquitos-Teléfono: 065125303
www.unapiquitos.edu.pe

Anexo 8. Toma de datos en el campo

- Nombre de los colectores:
 - Bach. Gudy Diamela Scott Almonacid
 - Ing. Juan Celidonio Ruíz Macedo
- Fecha de colecta:
 - El 11 de octubre del 2018
- Información del lugar donde se hizo la colecta:
 - La colecta se realizó en el bosque húmedo tropical del Centro de Investigación y Enseñanza Forestal (CIEFOR) Puerto Almendra ubicado en la provincia de Maynas de la región Loreto; el cual pertenece a la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana.
- Número de muestras por especie:
 - 4 muestras por especie
 - 2 kilos de corteza por especie
- Interpretación de los códigos asignados a cada ejemplar:
 - GS-001: Gudy Scott (nombre de la colectora) - *Virola calophylla* Warb. (nombre científico de la especie botánica).
 - GS-002: Gudy Scott (nombre de la colectora) - *Iryanthera juruensis* Warb. (nombre científico de la especie botánica).
 - GS-003: Gudy Scott (nombre de la colectora) - *Vismia amazonica* Ewan (nombre científico de la especie botánica).
- Características bióticas y abióticas del bosque:
 - Características Bióticas:
 - Seres descomponedores como hongos y bacterias.
 - Seres heterótrofos como aves, monos, roedores e insectos.
 - Seres autótrofos como árboles de hasta 30 m. de altura, lianas, arbustos, musgos y helechos.
 - Características Abióticas:
 - Los suelos son limosos de alturas variadas e inundables en algunas zonas.
 - Es un clima húmedo tropical con una temperatura aproximada de 28°C.

- Coordenadas geográficas y altura del lugar a nivel del mar:
 - *Iryanthera juruensis* Warb. se ubicó entre las coordenadas 3° 49' 47.2" latitud sur y 73° 22' 23.1" longitud oeste y en UTM a 18 M 680658 9576517 a 120 msnm.
 - *Virola calophylla* Warb. se ubicó entre las coordenadas 3° 49' 47.2" latitud sur y 73° 22' 23.1" longitud oeste y en UTM a 18 M 680488 9576278 a 120 msnm.
 - *Vismia amazonica* Ewan se ubicó entre las coordenadas 3° 49' 51.4" latitud sur y 73° 22' 17.7" longitud oeste y en UTM a 18 M 680824 9576387 a 120 msnm.

- Características de las especies botánicas:
 - *Iryanthera juruensis* Warb. es un árbol que tenía inflorescencias blancas, el estado del tronco y su corteza no presentaba pudrición ni daños por nidos o impacto humano, algunas de sus hojas algunos tenían agujeros y/o grieta por daños de insectos o larvas.
 - *Virola calophylla* Warb. es un árbol que tenía inflorescencias blancas, el estado del tronco y su corteza no presentaba pudrición ni daños por nidos o impacto humano, algunas de sus hojas tenían pocos agujeros por daños de insectos o larvas.
 - *Vismia amazonica* Ewan es un arbusto que tenía flores amarillas, el estado del tronco y su corteza no presentaba pudrición ni daños por nidos o impacto humano, sus hojas presentaban daños de insectos o larvas.

Anexo 9. Herborizado de las muestras botánicas

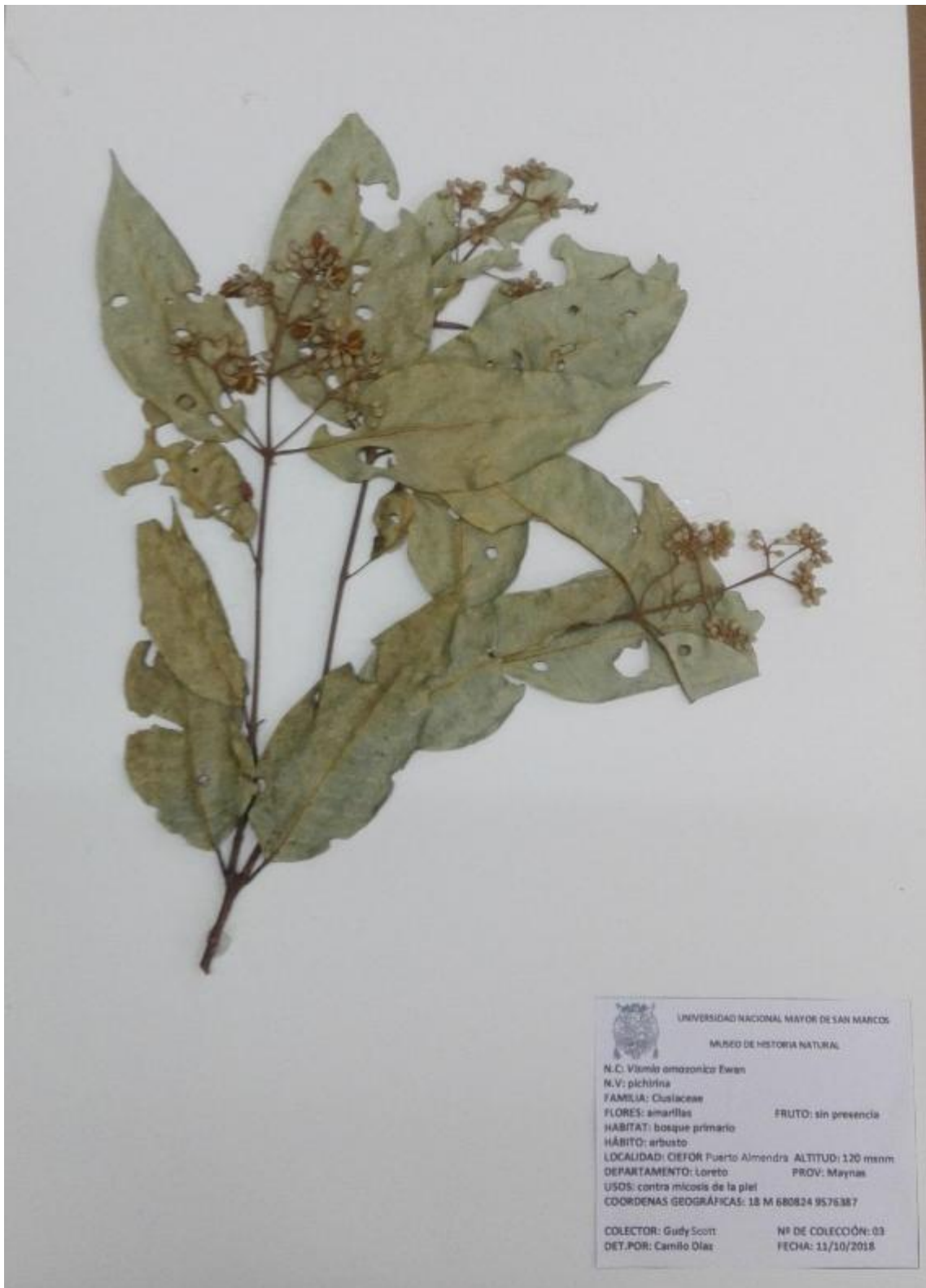
Muestra Botánica Herborizada de *Iryanthera juruensis* Warb.



Muestra Botánica Herborizada de *Virola calophylla* Warb.



Muestra Botánica Herborizada de *Vismia amazonica* Ewan



Anexo 10. Constancia de identificación taxonómica y autenticidad de las muestras botánicas



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA "ALBERTO CAZORLA TALLERÍ"
CONSTANCIA

A QUIEN CONCIERNA:

El que Certifica,

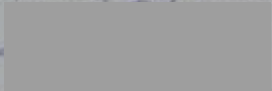
Biólogo-Botánico, Profesor de la Sección Ciencias Farmacéuticas, Departamento de Ciencias Celulares y Moleculares, Facultad de Ciencias y Filosofía de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, encargado del HERBARIO DE PLANTAS MEDICINALES (HEPLAME), deja constancia de haber recibido, procesado y determinado taxonómicamente las muestras vegetales detalladas a continuación:

- 1). Nombre vulgar: "cumala".
Nombre científico: *Iryanthera juruensis* Warb. FAMILIA: MYRISTICACEAE.
- 2). Nombre vulgar: "cumala".
Nombre científico: *Viola calophylla* Warb. FAMILIA: MYRISTICACEAE.
- 3). Nombre vulgar: "pichirina".
Nombre científico: *Vismia amazónica* Ewan. FAMILIA: CLUSIACEAE.




Las muestras recibidas provienen del Centro de Investigación de Enseñanza Forestal (CIEFOR) – Puerto Almendras – Maynas – Loreto.

Se expide la siguiente constancia para los fines que la Señorita Gudy Scott Almonacid, identificada con DNI N°43972354, considere necesarios.

Lima, 15 de Octubre del 2018.


Blgo. Camilo Díaz Santibañez.
C. B. P. 3795.

Anexo 11. Constancia de depósito de las muestras botánicas herborizadas de en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos

  **UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
MUSEO DE HISTORIA NATURAL 

"Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional"

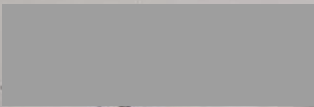
CONSTANCIA DE DEPOSITO N° 038-2018-USM-MHN

EL JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:


La Bachiller Gudy Diamela SCOTT ALMONACID, identificada con DNI No. 43972354, ha depositado en el Herbario San Marcos del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos **03 muestras botánicas** debidamente montadas y etiquetadas de ***Iryanthera juruensis* Warb., *Virola calophylla* Warb y *Vismia amazónica* Ewan**, (tres muestras de cada una), colectadas en el marco del Proyecto denominado "**Actividad antifúngica *in vitro* del extracto etanólico de las cortezas de *Iryanthera juruensis* Warb., *Virola calophylla* Warb y *Vismia amazónica* Ewan, contra *Malassezia furfur* y *Malassezia globosa***" con permiso de investigación y colecta otorgado según la Resolución de Dirección General N° 259-2018-MINAGRI-SERFOR-DGGPFFS y con el Código de Autorización **AUTIFIL-N°2018-045-SERFOR** y por la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Se expide la presente, a solicitud de la interesada para los fines que estime conveniente y para el conocimiento de la Dirección de Gestión Forestal y de Fauna Silvestre de la Dirección General y de Fauna Silvestre del Ministerio de Agricultura.

Lima, 12 de diciembre de 2018



M^{ca}. ASUNCIÓN A. CANO ECHEVARRIA
JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)



ACE/ddb

Av. Arenales 1256, Jesús María
Apdo. 14-0434, Lima 14, Perú

Teléfono: 619-7000 exts 5703

E-mail: museh@unsm.edu.pe
<http://museh.unsm.edu.pe>

Anexo 12. Secado de las cortezas vegetales

CORTEZA VEGETAL DE *Iryanthera juruensis*



Fotografía 1. *Iryanthera juruensis* **A)** Cortezas frescas **B)** Cortezas secas

CORTEZA VEGETAL DE *Virola calophylla*



Fotografía 2. *Virola calophylla* **A)** Cortezas frescas **B)** Cortezas secas

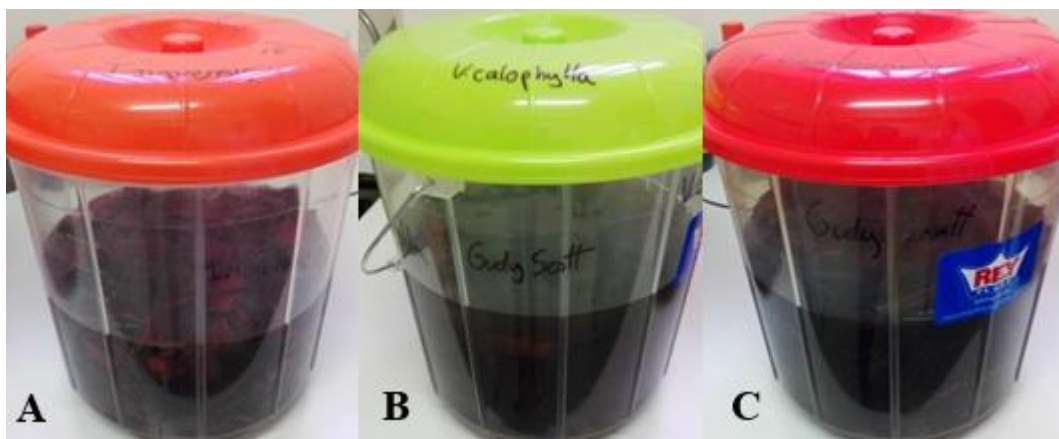
CORTEZA VEGETAL DE *Vismia amazonica*



Fotografía 3. *Vismia amazonica* **A)** Cortezas frescas **B)** Cortezas secas

Anexo 13. Maceración y filtración de las cortezas vegetales en etanol

MACERADO DE LAS CORTEZAS VEGETALES EN ETANOL



Fotografía 4. Macerado de las cortezas vegetales en etanol. A) *I. juruensis*
B) *V. calophylla* C) *V. amazonica*

FILTRACIÓN DEL MACERADO DE LAS CORTEZAS VEGETALES



Fotografía 5. Proceso de filtración del macerado de las cortezas vegetales A) *I. juruensis*
B) *V. calophylla* C) *V. amazonica*

SOLUCIONES FILTRADAS DE *Iryanthera juruensis*



Fotografía 6. *Iryanthera juruensis* **A)** Filtrado de las 2 primeras semanas **B)** Filtrado de la tercera semana **C)** Filtrado de la cuarta semana

SOLUCIONES FILTRADAS DE *Virola calophylla*



Fotografía 7. *Virola calophylla* **A)** Filtrado de las 2 primeras semanas **B)** Filtrado de la tercera semana **C)** Filtrado de la cuarta semana

SOLUCIONES FILTRADAS DE *Vismia amazonica*



Fotografía 8. *Vismia amazonica* **A)** Filtrado de las 2 primeras semanas **B)** Filtrado de la tercera semana **C)** Filtrado de la cuarta semana

Anexo 14. Evaporación del solvente y obtención del extracto crudo de las cortezas vegetales

EVAPORACIÓN DEL SOLVENTE



Fotografía 9. Evaporación del solvente en el rotavapor

SOLUCIONES CONCENTRADAS DE LOS EXTRACTOS CRUDOS



Fotografía 10. Soluciones concentradas de los extractos crudos A) *V. amazonica* B) *I. juruensis* C) *V. calophylla*

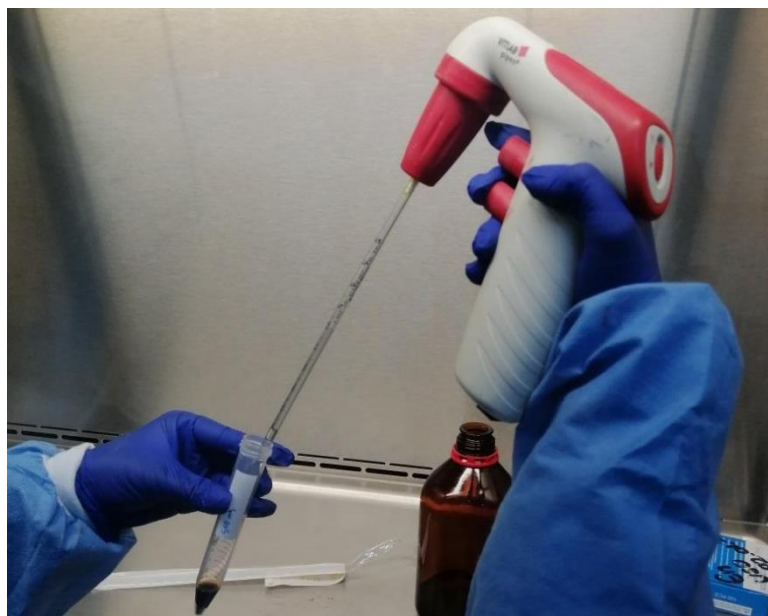
SECADO DE LOS EXTRACTOS CRUDOS EN LA ESTUFA



Fotografía 11. Secado de los extractos crudos de las cortezas vegetales en la estufa A) *V. amazonica* B) *I. juruensis* C) *V. calophylla*

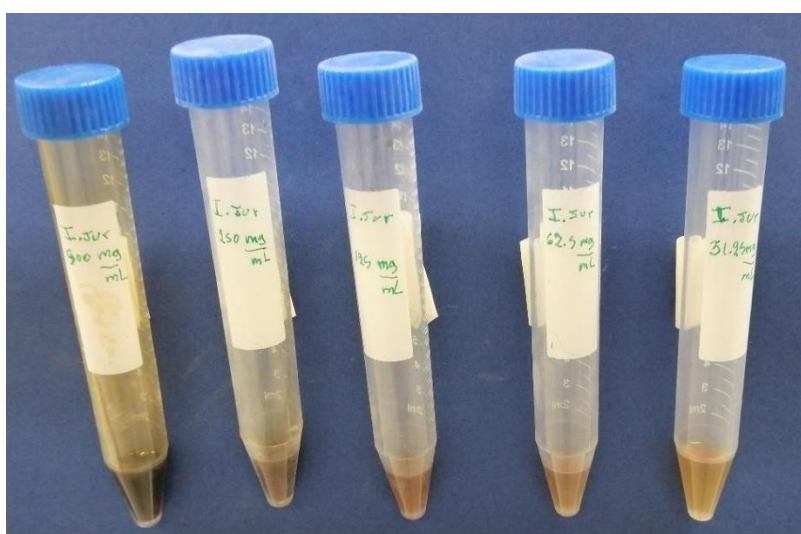
Anexo 15. Preparación del extracto etanólico de las cortezas vegetales en DMSO al 100%

DILUCIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO EN DMSO AL 100%



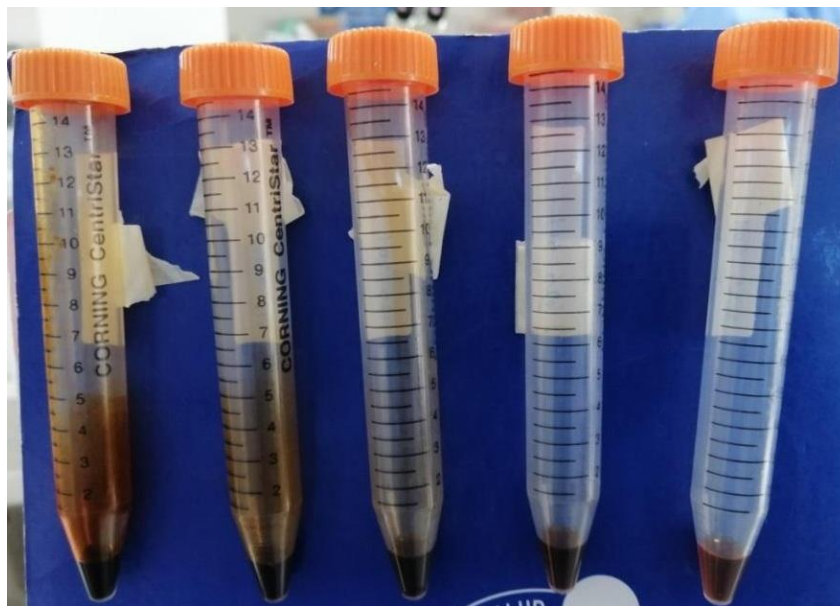
Fotografía 12. Dilución del extracto etanólico en DMSO al 100%

EXTRACTO ETANÓLICO DE *Iryanthera juruensis* DILUIDO EN DMSO AL 100%



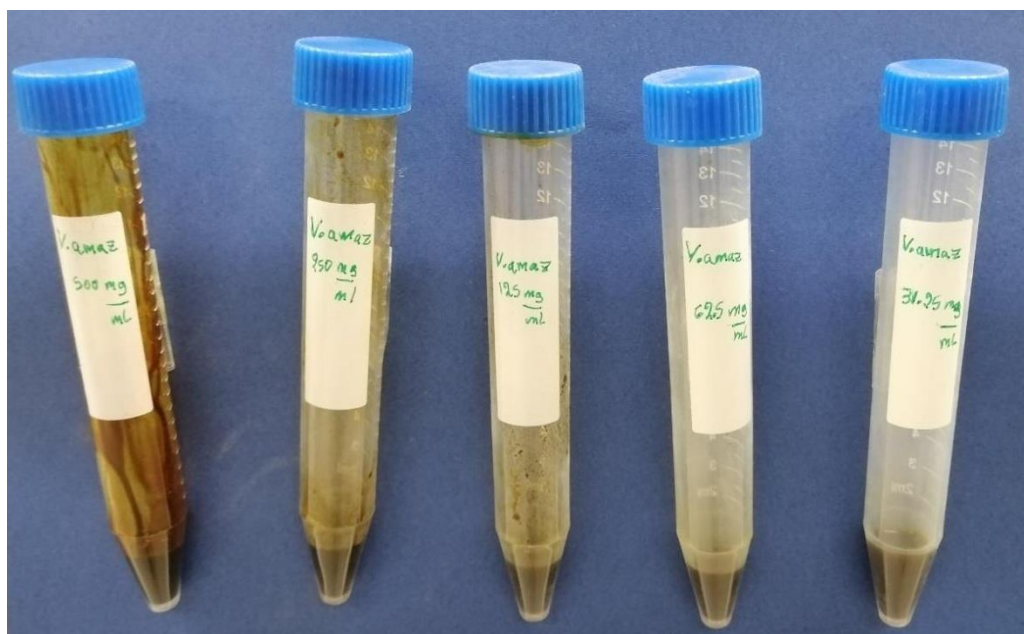
Fotografía 13. *Iryanthera juruensis* en DMSO al 100%

EXTRACTO ETANÓLICO DE *Virola calophylla* DILUIDO EN DMSO AL 100%



Fotografía 14. *Virola calophylla* en DMSO al 100%

EXTRACTO ETANÓLICO DE *Vismia amazonica* DILUIDO EN DMSO AL 100%



Fotografía 15. *Vismia amazonica* en DMSO al 100%

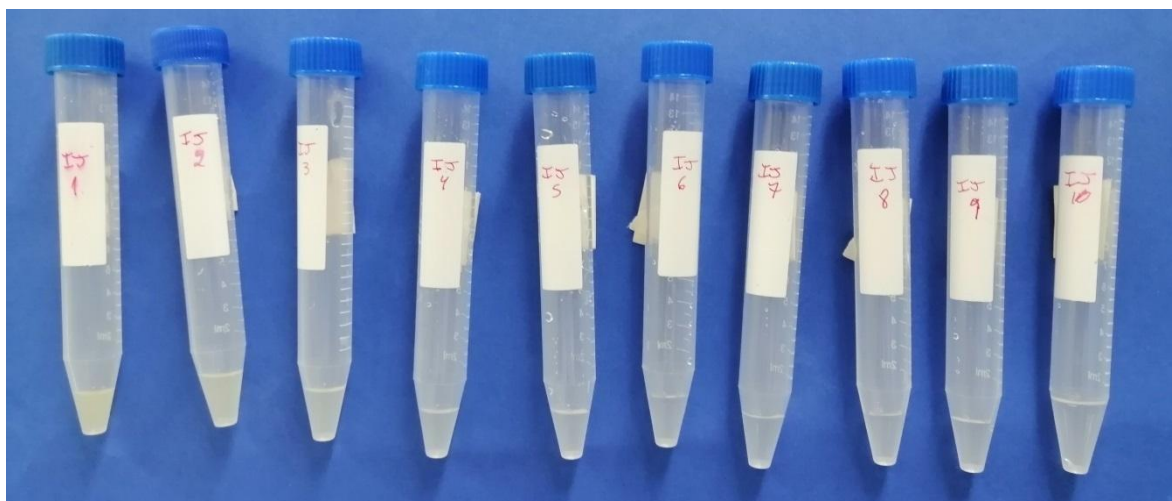
Anexo 16. Preparación del extracto etanólico de las cortezas vegetales en DMSO al 10%

DILUCIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO EN DMSO AL 10%



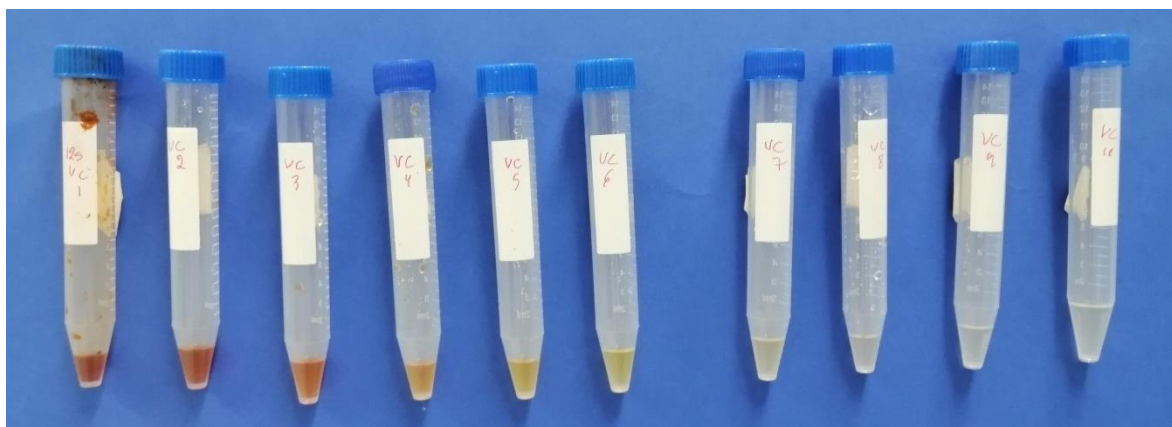
Fotografía 16. Dilución del extracto etanólico en DMSO al 10%

EXTRACTO ETANÓLICO DE *Iryanthera juruensis* DILUIDO EN DMSO AL 10%



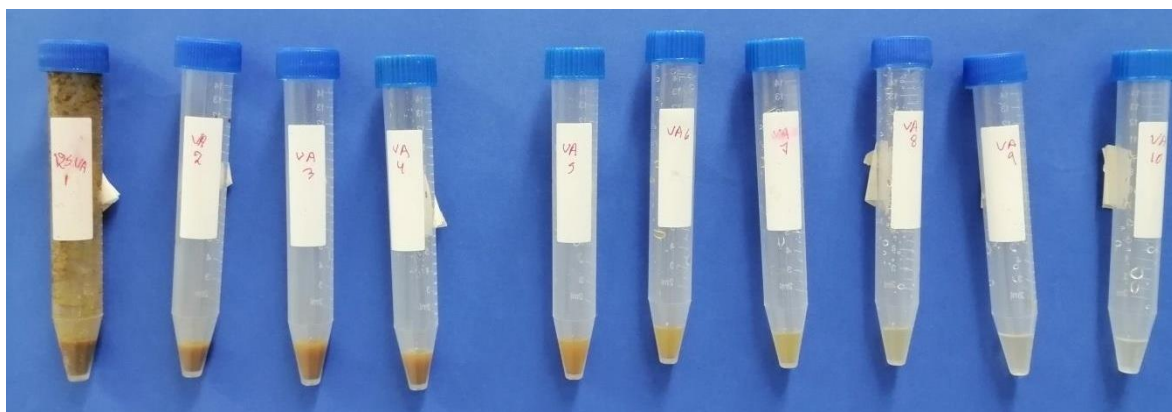
Fotografía 17. *Iryanthera juruensis* en DMSO al 10%

EXTRACTO ETANÓLICO DE *Virola calophylla* DILUIDO EN DMSO AL 10%



Fotografía 18. *Virola calophylla* en DMSO al 10%

EXTRACTO ETANÓLICO DE *Vismia amazonica* DILUIDO EN DMSO AL 10%



Fotografía 19. *Vismia amazonica* en DMSO al 10%

Anexo 17. Certificado de la cepa liofilizada *M. furfur* ATCC 14521 otorgado por el proveedor Microbiologics



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

<p>Specifications Microorganism Name: Malassezia furfur Catalog Number: 0701 Lot Number: 701-14** Reference Number: ATCC® 14521™** Purity: Pure Passage from Reference: 2</p>	<p>Expiration Date: 2020/5/31 Release Information: Quality Control Technologist: Tracy A Blenker Release Date: 2018/6/25</p>
--	---

<p>Macroscopic Features: Medium: circular, convex, entire edge, cream, and smooth.</p> <p>Microscopic Features: Gram positive, ovoid to cylindrical, budding yeast cells; rare spherical forms may be present. Buds are nearly as wide as the mother cell.</p>	<p>Performance</p> <p>Medium: Leeming Nalman</p> <p>Method: Gram Stain (1)</p>
--	---

ID System: Vitek YST (1)
See attached ID System results document.



Amanda Kuperus
Quality Control Manager
AUTHORIZED SIGNATURE

**Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.

Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC, Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.

(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.



35935

Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications

Microorganism Name: Malassezia furfur
Catalog Number: 0701
Lot Number: 701-16**
Reference Number: ATCC® 14521™*
Purity: Pure
Passage from Reference: 3

Expiration Date: 2021/6/30

Release Information:

Quality Control Technologist: Megan C Wipper
Release Date: 2019/8/26

Performance

Macroscopic Features:

Medium, circular, convex, entire edge, cream, and smooth.

Microscopic Features:

Gram positive, ovoidal to cylindrical, budding yeast cells; rare spherical forms may be present. Buds are nearly as wide as the mother cell.

Medium:

Leeming Nolman

Method:

Gram Stain (1)

ID System: Vitek YST (1)

See attached ID System results document.



Amanda Kuperus

Quality Control Manager

AUTHORIZED SIGNATURE

**Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.

▲ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC, Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.

(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.



Anexo 18. Activación de la cepa *M. furfur* ATCC 14521 en agar Sabouraud dextrosa suplementado con aceite de oliva al 0.5% y Tween 40 al 0.5%

PROCEDIMIENTO:

CEPA KWIK-STIK *Malassezia furfur* ATCC 14521 LIOFILIZADA



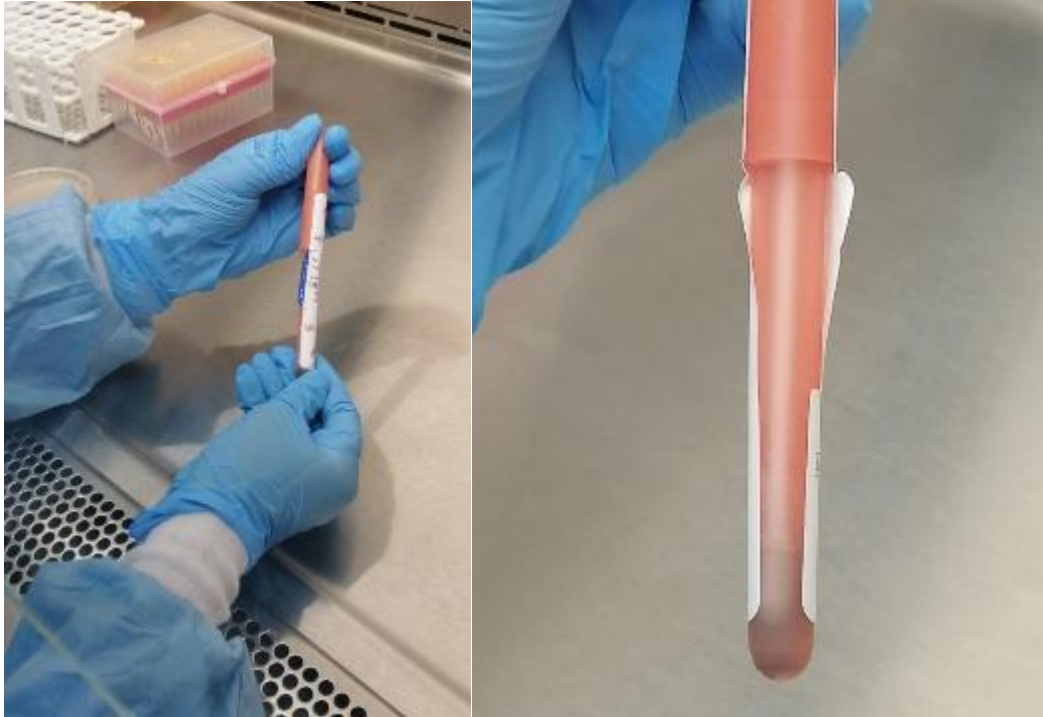
Fotografía 20. A) Abrir la bolsa de la cepa KWIK-STIK *M. furfur* ATCC 14521 liofilizada a la altura de la muesca y retirar la ampolla

AMPOLLA CON LA CEPA LIOFILIZADA DE *Malassezia furfur* ATCC 14521



Fotografía 21. B) Apretar la ampolla en la parte superior de la tapa para liberar el líquido hidratante y mantenerla en posición vertical para que el líquido fluya hasta la parte inferior e hidrate el gránulo

DILUCIÓN DE LA CEPA LIOFILIZADA DE *Malassezia furfur* ATCC 14521



Fotografía 22. C) Apretar la parte inferior para que el gránulo se diluya junto con el líquido

ETIQUETADO DE LA PLACA DE CULTIVO PRINCIPAL DE SDAO T40



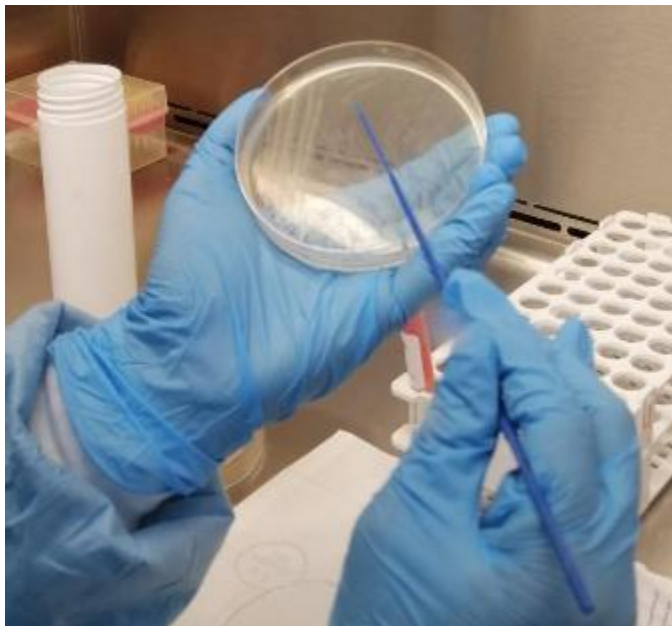
Fotografía 23. D) Retirar la etiqueta y pegarla en la placa de cultivo principal

HISOPADO DE LA CEPA *Malassezia furfur* ATCC 14521 EN SDAO T40



Fotografía 24. E) Saturar el hisopo con el material hidratado e hisopar sobre el tercio de una placa Petri con SDAO T40

ESTRIADO CEPA *Malassezia furfur* ATCC 14521 EN SDAO T40



Fotografía 25. F) Hacer estrías con un asa de siembra para tener colonias aisladas

Anexo 19. Formulario N°1 Crecimiento de la cepa *M. furfur* ATCC 14521 activa en agar Sabouraud dextrosa suplementado con aceite de oliva al 0.5% y Tween 40 al 0.5 %

FORMULARIO N°1 CONTROL DE LECTURA
CRECIMIENTO DE LA CEPA <i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521 ACTIVA EN AGAR SABOURAUD DEXTROSA SUPLEMENTADO CON ACEITE DE OLIVA AL 0.5 % Y TWEEN 40 AL 0.5 %

Laboratorio: Micología
Material de referencia – Resultados esperados:

CEPA	SDAO T40 32°C	SDA 32°C	SDAO T40 32°C			ACEITE DE OLIVA AL 0.5%	TWEEN 40 AL 0.5%
			24 HRS	48 HRS	72 HRS		
<i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)

Año: 2019

Periodicidad y/o frecuencia: Cada vez que se utiliza

SDAO T40: Agar Sabouraud dextrosa suplementado con aceite de oliva al 0.5% y Tween 40 al 0.5%
SDA: Agar Sabouraud dextrosa
 (+): Presencia del crecimiento de *Malassezia furfur* ATCC 14521
 (-): Ausencia del crecimiento de *Malassezia furfur* ATCC 14521

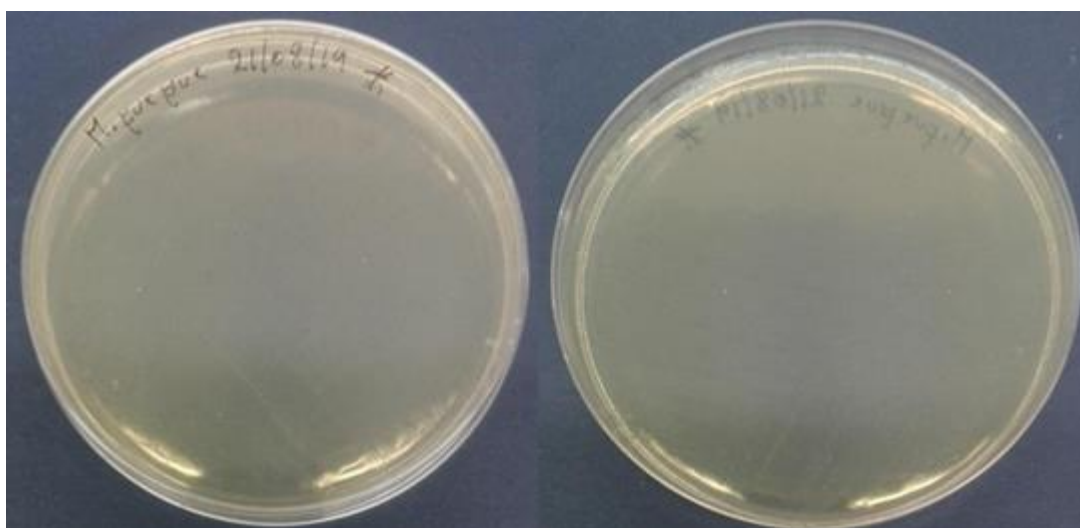
CÓDIGO	ACEITE DE OLIVA 0.5%	TWEEN 40 0.5%	SDAO T40 32°C			SDA 32°C			SDAO T40 32°C	SDA 32°C	RESULTADO	RESPONSABLE
			24 HR S	48 HR S	72 HR S	24 HR S	48 HR S	72 HR S				
<i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	<i>Malassezia furfur</i>	Gudy Scott
Fecha de cierre del registro						Firma y V° B° del supervisor (a)						
16/08/2019 Analista: Gudy Scott						Med. Susana Zurita						

ACTIVACIÓN DE LA CEPA *Malassezia furfur* ATCC 14521 EN SDAO T40



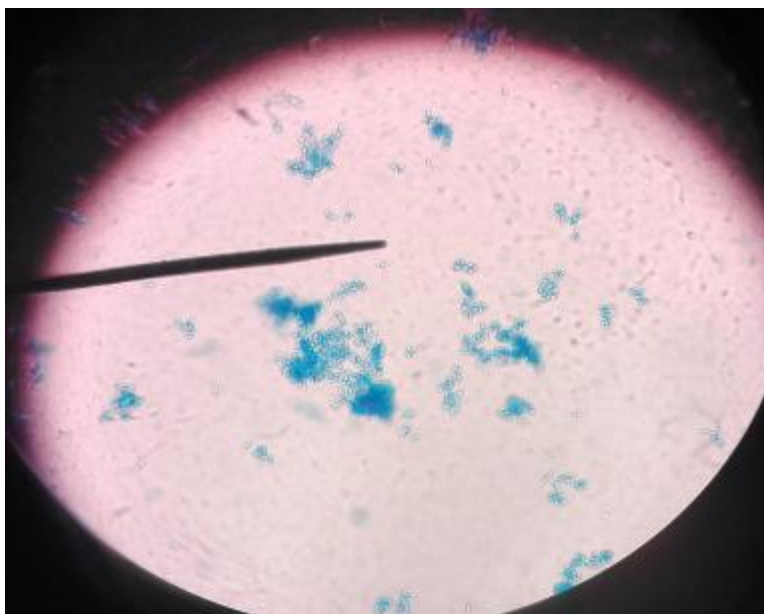
Fotografía 26. Crecimiento de *M. furfur* ATCC 14521 en agar Sabouraud dextrosa suplementado con aceite de oliva al 0.5% y Tween 40 al 0.5% (SDAO T40)

ACTIVACIÓN DE LA CEPA *Malassezia furfur* ATCC 14521 EN SDA



Fotografía 27. Ausencia de crecimiento de *M. furfur* ATCC 14521 en agar Sabouraud dextrosa (SDA)

LEVADURAS DE *Malassezia furfur* ATCC 14521 EN EL MICROSCOPIO



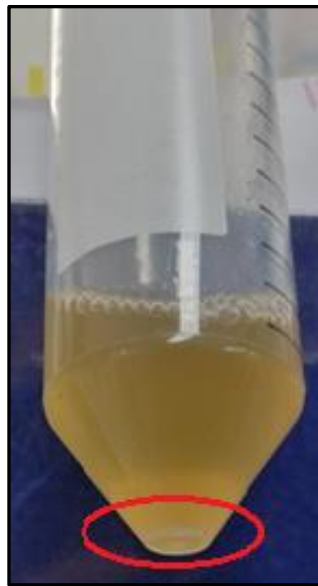
Fotografía 28. Observación de levaduras de *M. furfur* ATCC 14521 en el microscopio

Anexo 20. Formulario N°2 Cepa activada *M. furfur* ATCC 14521 cultivada en caldo Sabouraud dextrosa suplementado con aceite de oliva al 0.5% y Tween 40 al 0.5%

FORMULARIO N°2 CONTROL DE LECTURA
CEPA ACTIVADA <i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521 CULTIVADA <u>EN CALDO</u> SABOURAUD DEXTROSA SUPLEMENTADO CON ACEITE DE OLIVA AL 0.5 % Y TWEEN 40 AL 0.5 %

Laboratorio: Micología																												
Material de referencia – Resultados esperados:																												
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th rowspan="3" style="width: 15%;">CEPA</th> <th colspan="3" style="text-align: center;">SDBO T40 32°C 200 REV / MIN</th> <th rowspan="3" style="width: 15%;">ACEITE DE OLIVA AL 0.5%</th> <th rowspan="3" style="width: 15%;">TWEEN 40 AL 0.5%</th> </tr> <tr> <th style="width: 10%;">02</th> <th style="width: 10%;">24</th> <th style="width: 10%;">48</th> </tr> <tr> <th style="text-align: center;">HRS</th> <th style="text-align: center;">HRS</th> <th style="text-align: center;">HRS</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;"><i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521</td> <td style="text-align: center;">(-)</td> <td style="text-align: center;">(+)</td> <td style="text-align: center;">(+)</td> <td style="text-align: center;">(+)</td> <td style="text-align: center;">(+)</td> </tr> </tbody> </table> <p style="font-size: small;">SDBO T40: Caldo Sabouraud dextrosa suplementado con aceite de oliva al 0.5% y Tween 40 al 0.5% 200 REV / MIN: 200 revoluciones por minuto de agitación (+): Presencia del crecimiento de <i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521 (-): Ausencia del crecimiento de <i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521</p>									CEPA	SDBO T40 32°C 200 REV / MIN			ACEITE DE OLIVA AL 0.5%	TWEEN 40 AL 0.5%	02	24	48	HRS	HRS	HRS	<i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	<p>Año: 2019</p> <p>Periodicidad y/o frecuencia: Cada vez que se utiliza</p>	
CEPA	SDBO T40 32°C 200 REV / MIN			ACEITE DE OLIVA AL 0.5%	TWEEN 40 AL 0.5%																							
	02	24	48																									
	HRS	HRS	HRS																									
<i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)																							
CÓDIGO	ACEITE DE OLIVA 0.5%	TWEEN 40 0.5%	SDBO T40 32°C 200 REV / MIN			SDBO T40 32°C 200 REV / MIN			RESULTADO	RESPONSABLE																		
			02 HRS	24 HRS	48 HRS	02 HRS	24 HRS	48 HRS																				
<i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	Presencia de colonias	Aumento de biomasa	Aumento de biomasa	<i>Malassezia furfur</i>	Gudy Scott																		
Fecha de cierre del registro						Firma y V° B° del supervisor (a)																						
16/08/2019 Analista: Gudy Scott						Med. Susana Zurita																						

BIOMASA DE *Malassezia furfur* ATCC 14521 A LAS 02 HRS



Fotografía 29. Colonias inoculadas y sedimentadas de *M. furfur* ATCC 14521 cultivadas en SDBO T40 a las 02 horas

BIOMASA DE *Malassezia furfur* ATCC 14521 A LAS 48 HRS



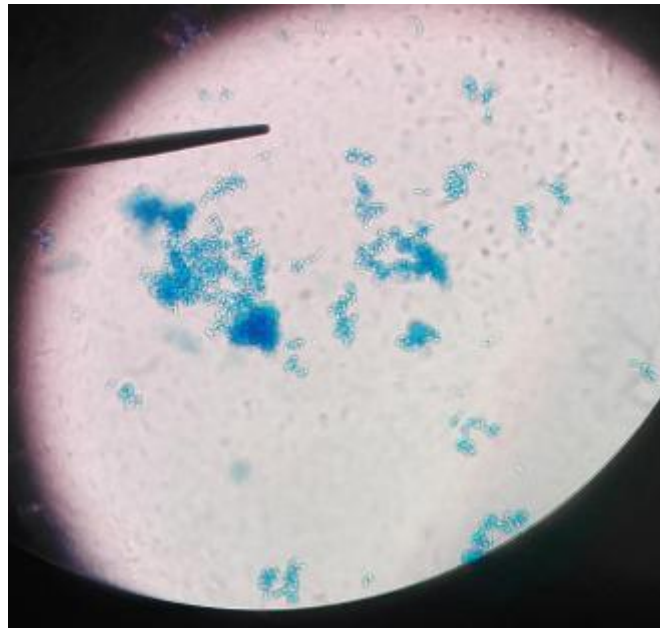
Fotografía 30. Aumento significativo de la biomasa sedimentada de *M. furfur* ATCC 14521 cultivadas en SDBO T40 a las 48 horas

Anexo 21. Formulario N°3 Cosecha del cultivo de *M. furfur* ATCC 14521 por el método de centrifugación

FORMULARIO N°3 CONTROL DE CALIDAD
COSECHA DEL CULTIVO DE LA CEPA <i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521 POR EL MÉTODO DE CENTRIFUGACIÓN

Laboratorio: Micología					
Material de referencia – Resultados esperados:					
CEPA	CULTIVO NO CONTAMINADO EN SDBO T40	COSECHA POR CENTRIFUGACIÓN		Año: 2019 Periodicidad y/o frecuencia: Cada vez que se utiliza	
		COLECTA 5 MIN	LAVADO 5 MIN		
<i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521	LIBRE DE BACTERIAS	1 mL DE CULTIVO	LAVAR PELETT EN 1 mL DE NaCl 0.85 %		
SDBO T40: Caldo Sabouraud dextrosa suplementado con aceite de oliva al 0.5% y Tween 40 al 0.5% NaCl 0.85 %: Solución salina estéril al 0.85 %					
CÓDIGO	CULTIVO NO CONTAMINADO EN SDBO T40	COSECHA POR CENTRIFUGACIÓN		RESULTADO	RESPONSABLE
		COLECTA 5 MIN	LAVADO 5 MIN		
<i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521	LIBRE DE BACTERIAS	PELETT DEL CULTIVO DE <i>M. furfur</i> ATCC 14521	PELETT DE <i>M. furfur</i> ATCC 14521 LIBRE DE SDBO T40	<i>Malassezia furfur</i>	Gudy Scott
Fecha de cierre del registro			Firma y V° B° del supervisor (a)		
16/08/2019 Analista: Gudy Scott			Med. Susana Zurita		

LEVADURAS NO CONTAMINADAS DE *Malassezia furfur* ATCC 14521 EN EL MICROSCOPIO



Fotografía 31. Observación en el microscopio del cultivo no contaminado de *M. furfur* ATCC 14521 en SDBO T40

COSECHA DE LA BIOMASA DE *Malassezia furfur* ATCC 14521



Fotografía 32. Sedimento (pellet) de la biomasa cosechada de *M. furfur* ATCC 14521 en el fondo de cada tubo de Eppendorf

Anexo 22. Formulario N°4 Preparación del inóculo para medir las zonas de inhibición de los extractos etanólicos y del voriconazol por el método de difusión en pozos a partir de la cepa cosechada de *M. furfur* ATCC 14521

FORMULARIO N°4 CONTROL DE LECTURA
PREPARACIÓN DEL INÓCULO PARA DETERMINAR LOS HALOS DE INHIBICIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS CORTEZAS VEGETALES Y DEL VORICONAZOL POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN POZOS A PARTIR DE LA CEPA COSECHADA <i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521

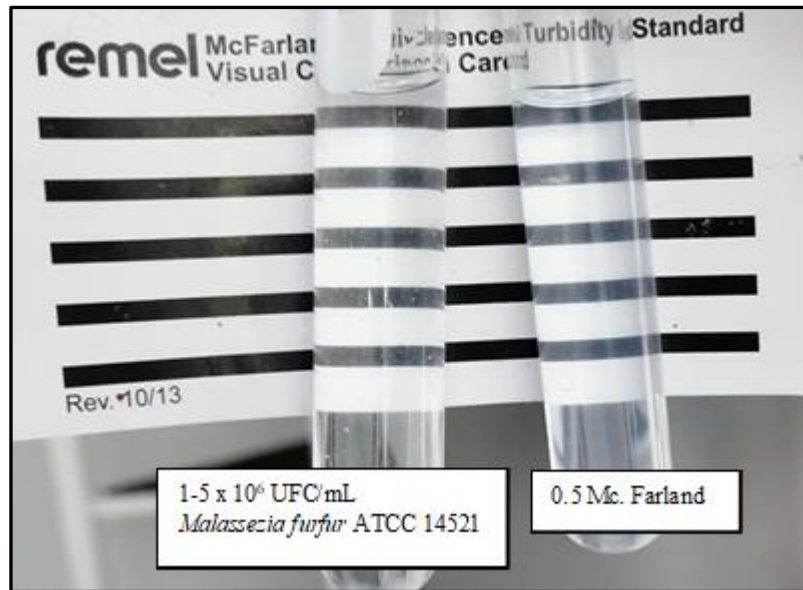
Laboratorio: Micología
Material de referencia – Resultados esperados:

CEPA	COSECHA DE LA CEPA	INÓCULO		Año: 2019 Periodicidad y/o frecuencia: Cada vez que se utiliza
<i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521	PELETT SIN IMPUREZAS	SUSPENDER PELETT EN NaCl 0.85 %	TURBIDEZ A 0.5 DE ESCALA MC. FARLAND	

NaCl 0.85 %: Solución salina estéril al 0.85 %

CÓDIGO	COSECHA DE LA CEPA	INÓCULO A 1-5 x 10 ⁶ UFC/mL		RESULTADO	RESPONSABLE
<i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521	PELETT SIN IMPUREZAS	SUSPENDER PELETT EN NaCl AL 0.85 %	TURBIDEZ A 0.5 DE LA ESCALA MC. FARLAND	<i>Malassezia furfur</i>	Gudy Scott
Fecha de cierre del registro			Firma y V° B° del supervisor (a)		
16/08/2019 Analista: Gudy Scott			Med. Susana Zurita		

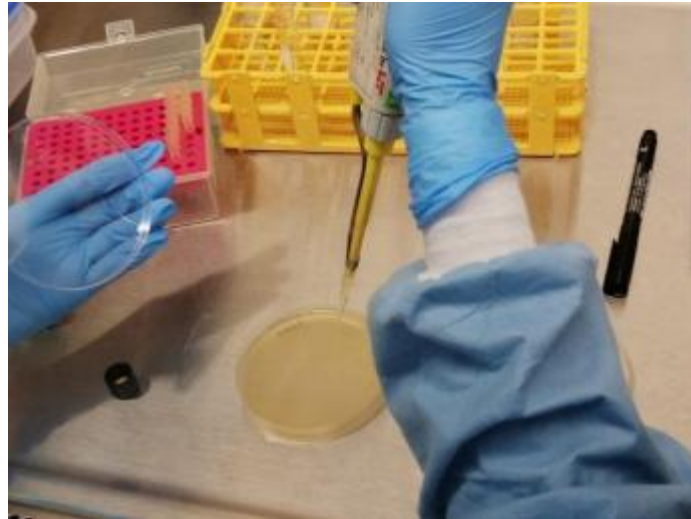
TURBIDEZ A 0.5 DE LA ESCALA MC. FARLAND



Fotografía 33. Turbidez en NaCl al 0.85 % a 0.5 de Mc. Farland igual a $1-5 \times 10^6$ UFC/mL de *M. furfur* ATCC 14521

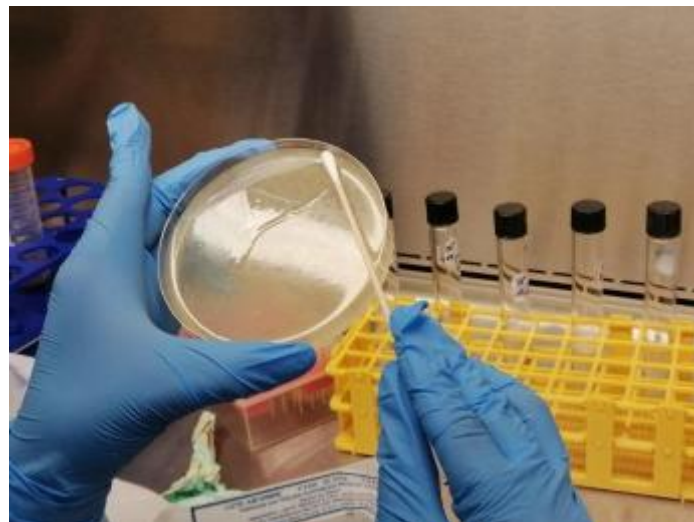
Anexo 23. Secuencia para realizar la medición de los halos de inhibición del extracto etanólico de las cortezas vegetales y del voriconazol por el método de difusión en pozos frente a *M. furfur* ATCC 14521

INOCULACIÓN DE LA CEPA DE *Malassezia furfur* ATCC 14521 EN SDAO T40



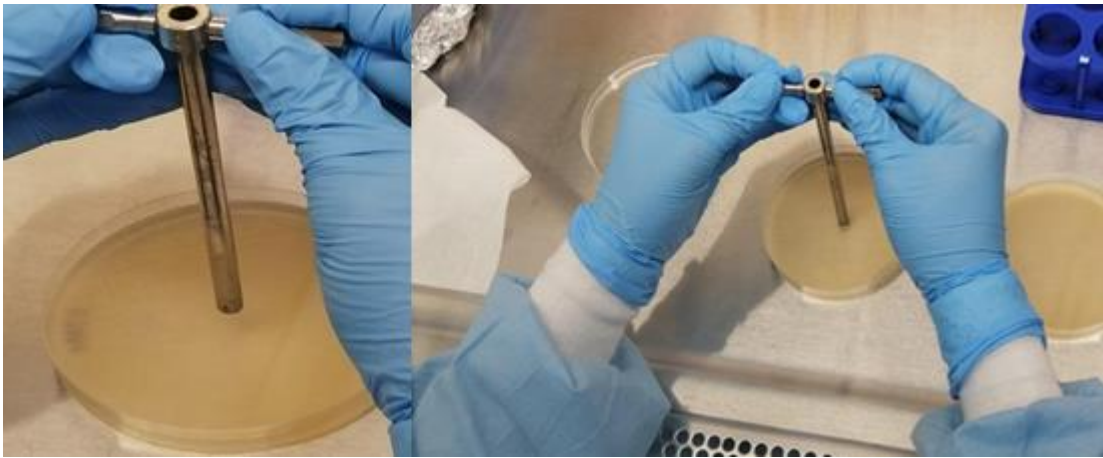
Fotografía 34. A) Inocular 100 μ L de la suspensión $1 - 5 \times 10^6$ UFC/mL de *M. furfur* ATCC 14521 en cada placa Petri con SDAO al 0.5% y Tween 40 al 0.5%

HISOPADO DE LA CEPA DE *Malassezia furfur* ATCC 14521 EN SDAO T40



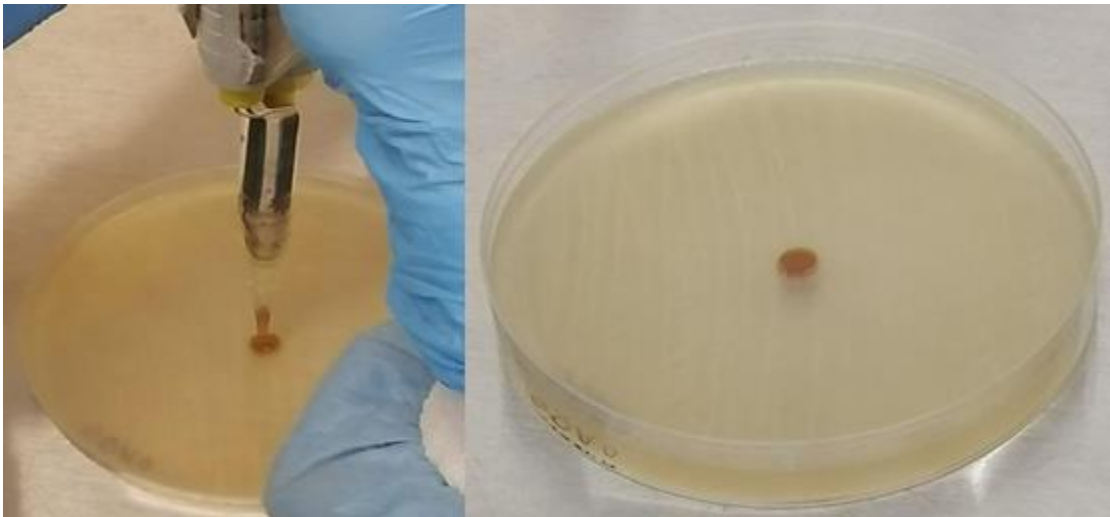
Fotografía 35. B) Sembrar el inóculo en toda la superficie del medio de cultivo de SDAO T40 usando hisopos de algodón estériles

POZO EN MEDIO DE LA PLACA CON SDAO T40



Fotografía 36. C) Hacer un pozo de 6 mm de diámetro en medio de cada placa de SDAO T40 con un sacabocado de acero.

ANTIFÚNGICO DILUIDO DENTRO DEL POZO DE LA PLACA CON SDAO T40

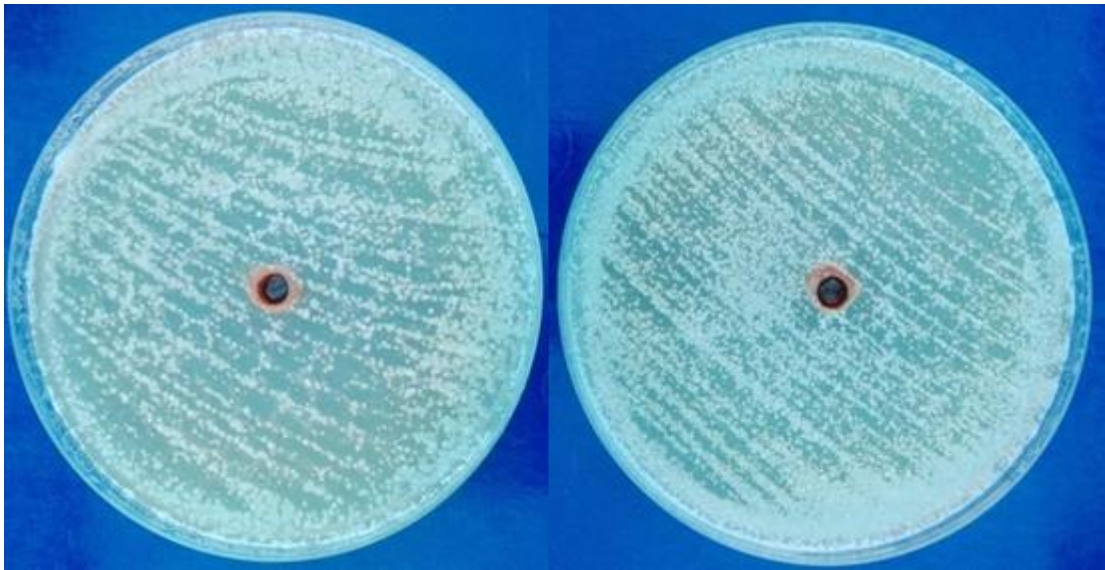


Fotografía 37. D) Agregar 80 μ L del antifúngico diluido a una determinada concentración en el pozo de cada placa de SDAO T40

Anexo 24. Formulario N°5 Difusión en pozos para determinar los halos de inhibición de los extractos etanólicos frente a *Malassezia furfur* ATCC 14521

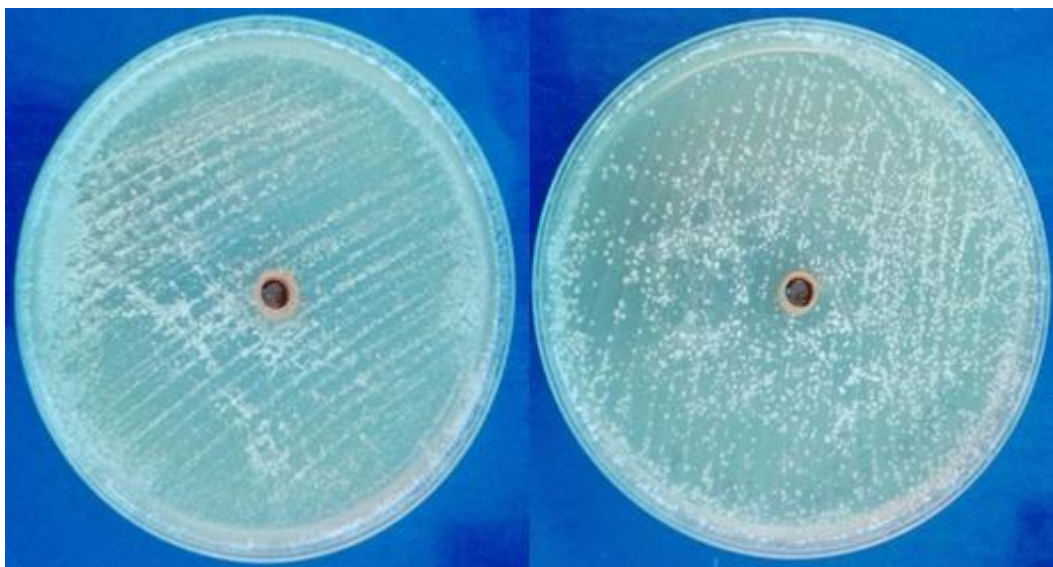
FORMULARIO N°5 CONTROL DE LECTURA														
DIFUSIÓN EN POZOS PARA DETERMINAR LOS HALOS DE INHIBICIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS CORTEZAS VEGETALES FRENTE A <i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521														
Laboratorio: Micología														
LECTURA VISUAL M27-A3 (CLSI)														
ANTIFÚNGICOS / TIEMPO DE INCUBACIÓN											EXTRACTO			
ETANÓLICO DE LAS CORTEZAS VEGETALES (IJ, VC, VA) / 48 HORAS														
INHIBICIÓN (mg/MI)														
N° PLACA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
CONCENTRACIÓN	500	500	250	250	125	125	62,5	62,5	31,25	31,25	C	C		
LECTURA VISUAL (48 HORAS) (DIFUSIÓN EN POZOS)											O	O		
<i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521											N	N		
											E	E		
IJ	<i>Iryanthera juruensis</i>	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	G	G
VC	<i>Virola calophylla</i>	P	P	P	P	P	P	P	P	A	A	A	A	T
VA	<i>Vismia amazonica</i>	P	P	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	T
CN	DMSO 100%												A	A
LECTURA VISUAL (DIFUSIÓN EN POZOS)											P: Presencia de Halo de Inhibición ; A: Ausencia de Halo de Inhibición			
											ANTIFÚNGICOS:			
<i>Iryanthera juruensis</i> (IJ), <i>Virola calophylla</i> (VC), <i>Vismia 131amazonica</i> (VA)											CONTROL NEGATIVO (CN): DMSO 100%			
La inhibición se define como la difusión del antifúngico en agar que no produce crecimiento microbiano														
Inhibición de la Concentración Más Baja de Antifúngico (Verde)														

A 500 mg/ml DE *Iryanthera juruensis*



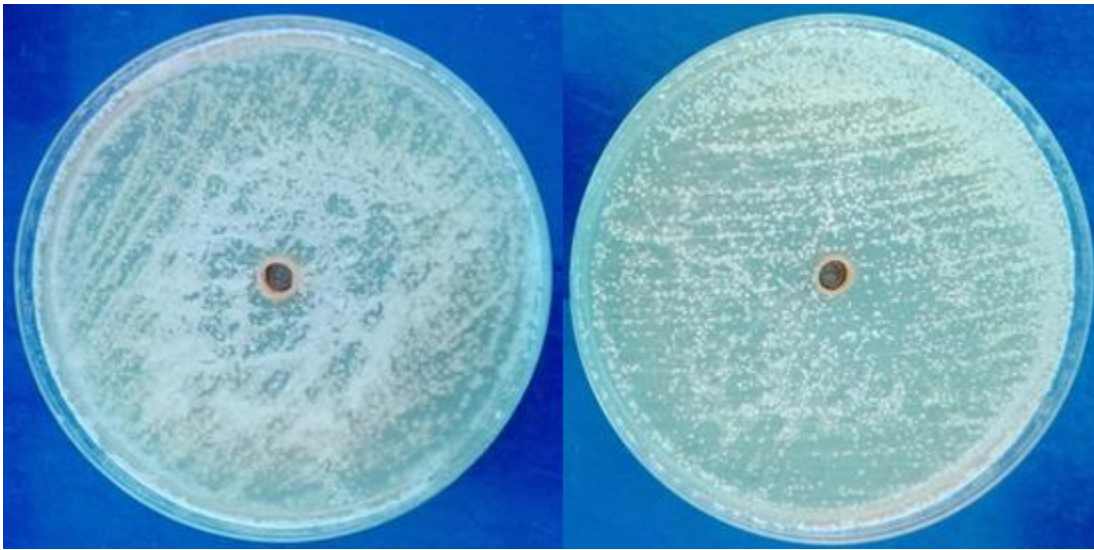
Fotografía 38. Ausencia de halo de inhibición de *I. juruensis* a 500 mg/mL por duplicado frente a *M. furfur* ATCC 14521 en SDAO T40

A 250 mg/ml DE *Iryanthera juruensis*



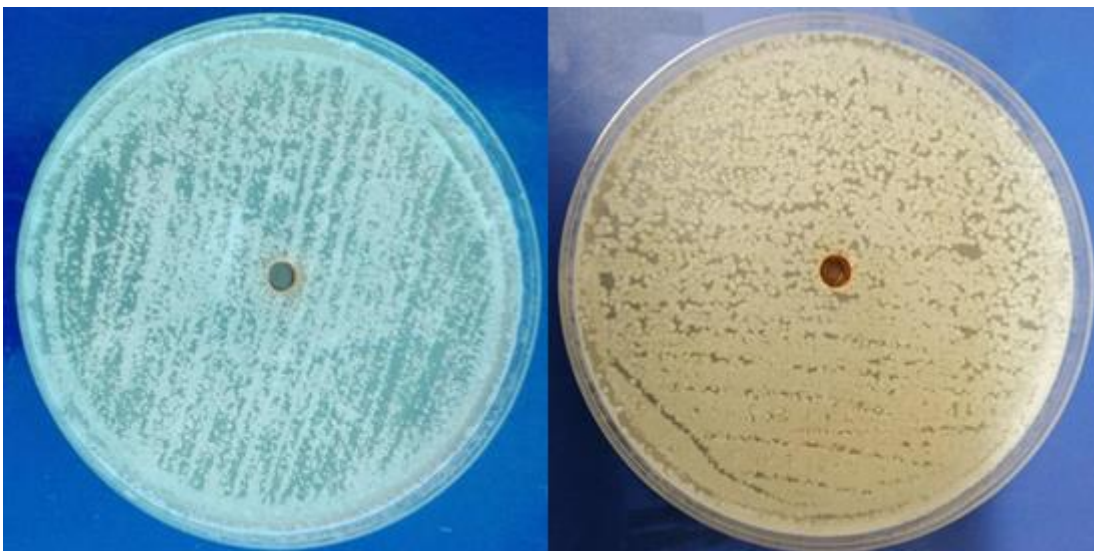
Fotografía 39. Ausencia de halo de inhibición de *I. juruensis* a 250 mg/mL por duplicado frente a *M. furfur* ATCC 14521 en SDAO T40

A 125 mg/ml DE *Iryanthera juruensis*



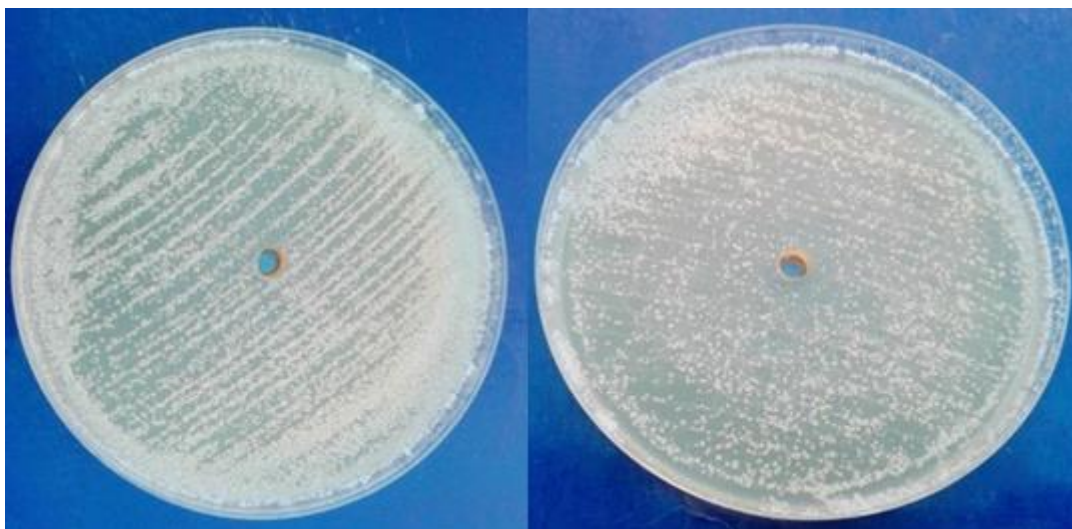
Fotografía 40. Ausencia de halo de inhibición de *I. juruensis* a 125 mg/mL por duplicado frente a *M. furfur* ATCC 14521 en SDAO T40

A 62.5 mg/ml DE *Iryanthera juruensis*



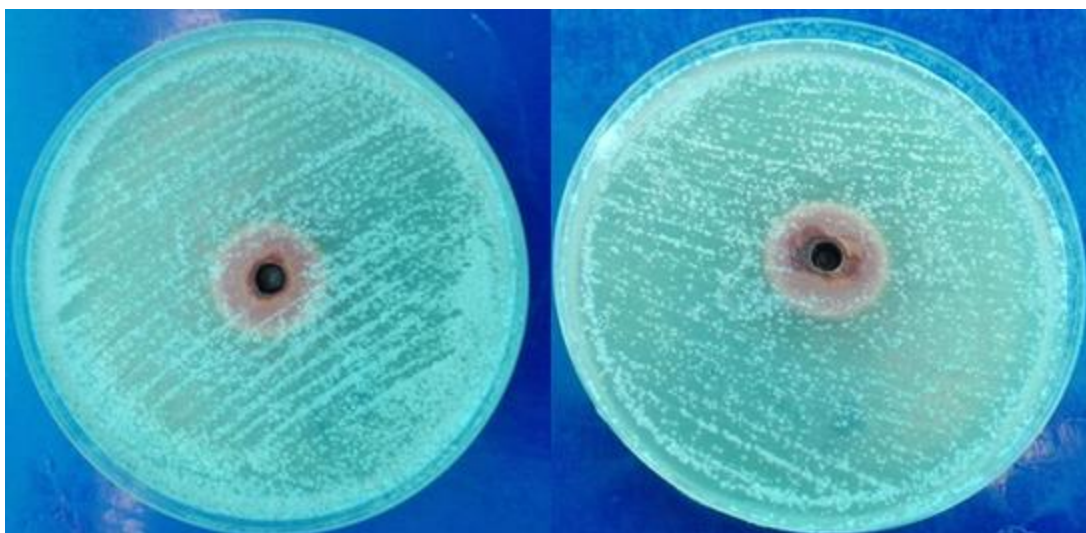
Fotografía 41. Ausencia de halo de inhibición de *I. juruensis* a 62.5 mg/mL por duplicado frente a *M. furfur* ATCC 14521 en SDAO T40

A 31.25 mg/ml DE *Iryanthera juruensis*



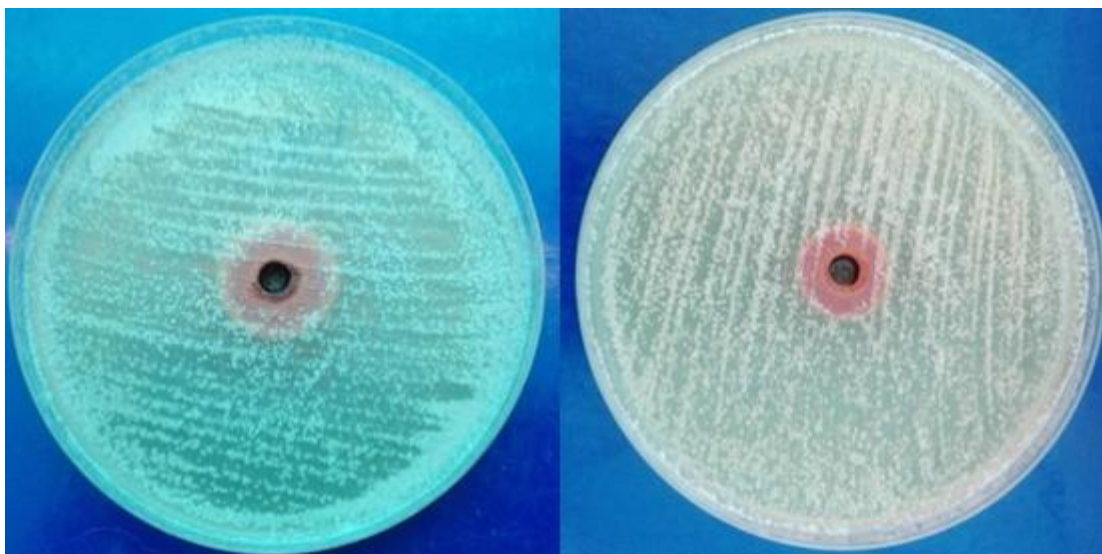
Fotografía 42. Ausencia de halo de inhibición de *I. juruensis* a 31.25 mg/mL por duplicado frente a *M. furfur* ATCC 1452 en SDAO T40

A 500 mg/ml DE *Virola calophylla*



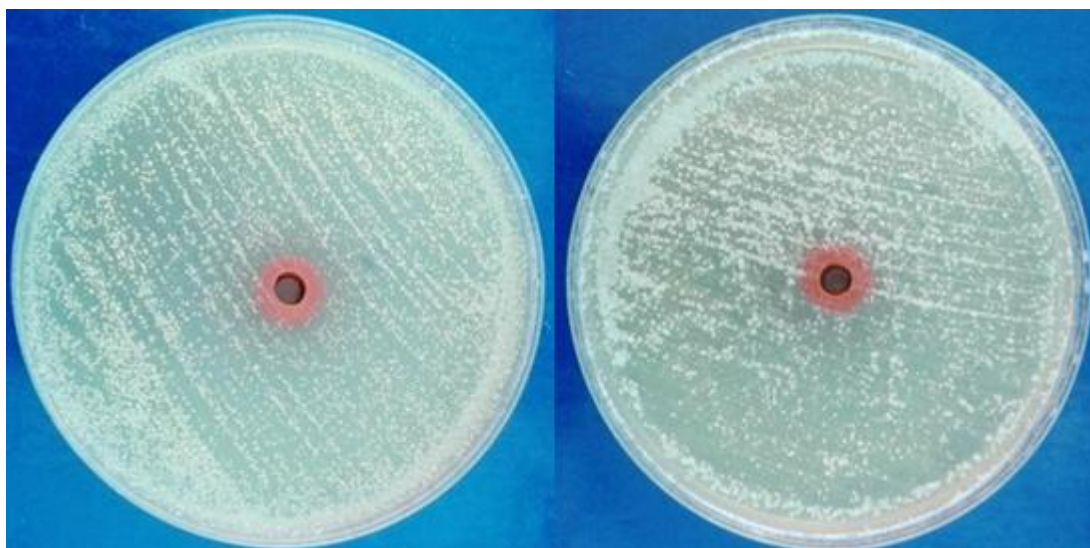
Fotografía 43. Presencia de halo de inhibición de *V. calophylla* a 500 mg/mL por duplicado frente a *M. furfur* ATCC 14521 en SDAO T40

A 250 mg/ml DE *Virola calophylla*



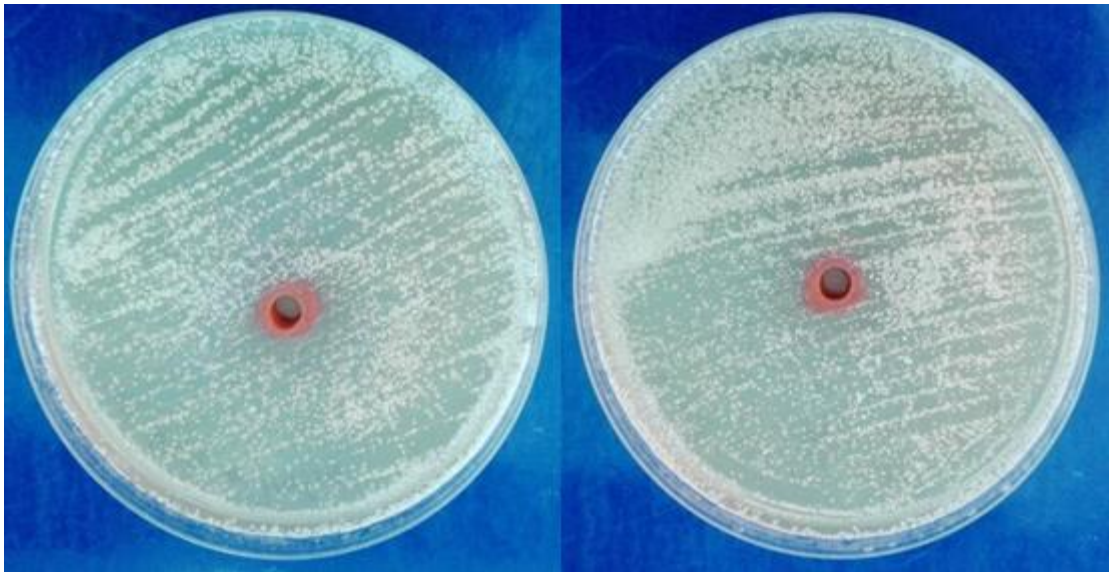
Fotografía 44. Presencia de halo de inhibición de *V. calophylla* a 250 mg/mL por duplicado frente a *M. furfur* ATCC 14521 en SDAO T40

A 125 mg/ml DE *Virola calophylla*



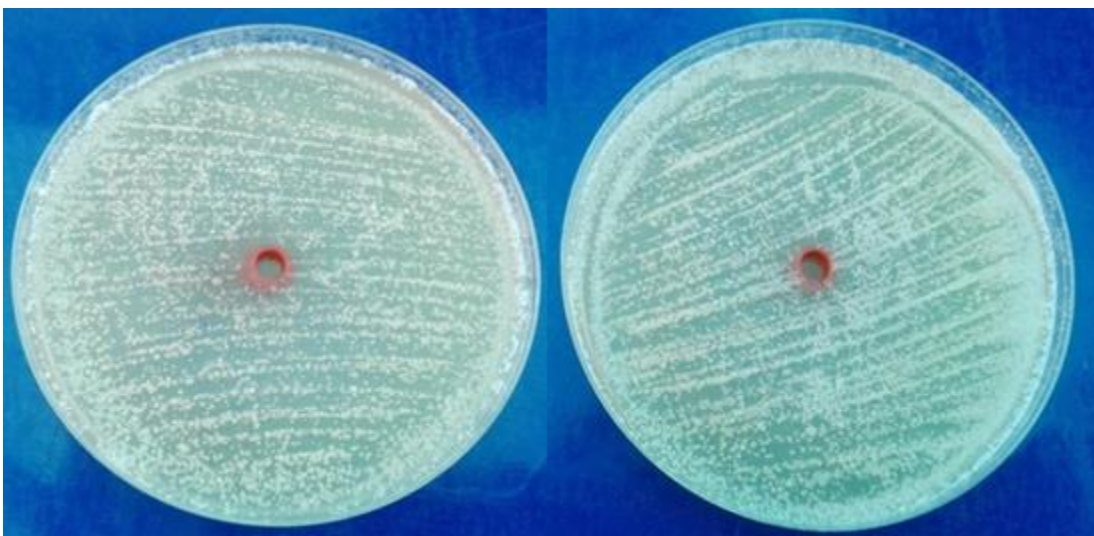
Fotografía 45. Presencia de halo de inhibición de *V. calophylla* a 125 mg/mL por duplicado frente a *M. furfur* ATCC 14521 en SDAO T40

A 62.5 mg/ml DE *Virola calophylla*



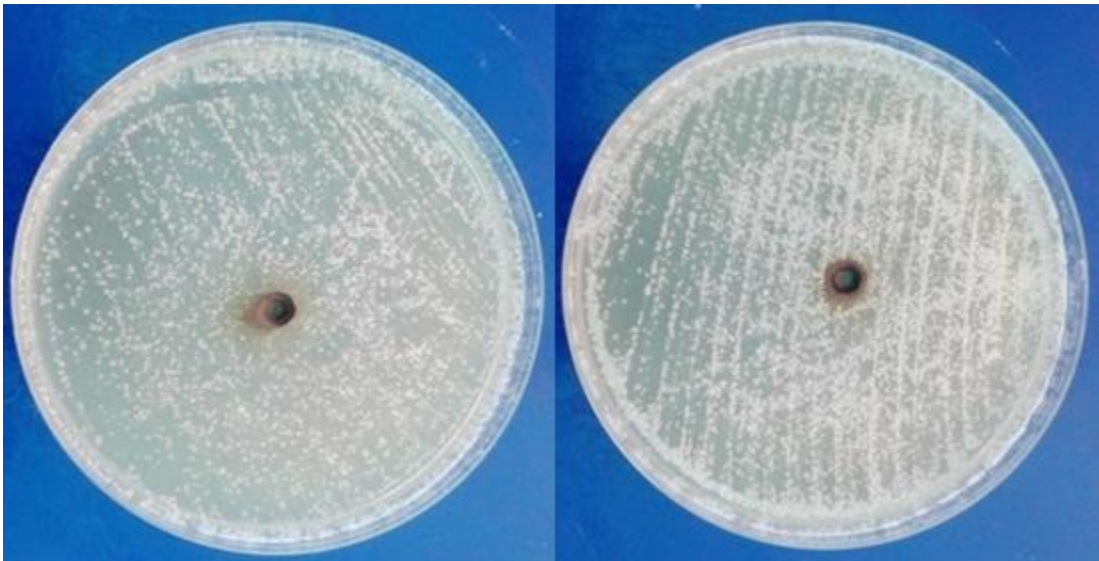
Fotografía 46. Presencia de halo de inhibición de *V. calophylla* a 62.5 mg/mL por duplicado frente a *M. furfur* ATCC 14521 en SDAO T40

A 31.25 mg/ml DE *Virola calophylla*



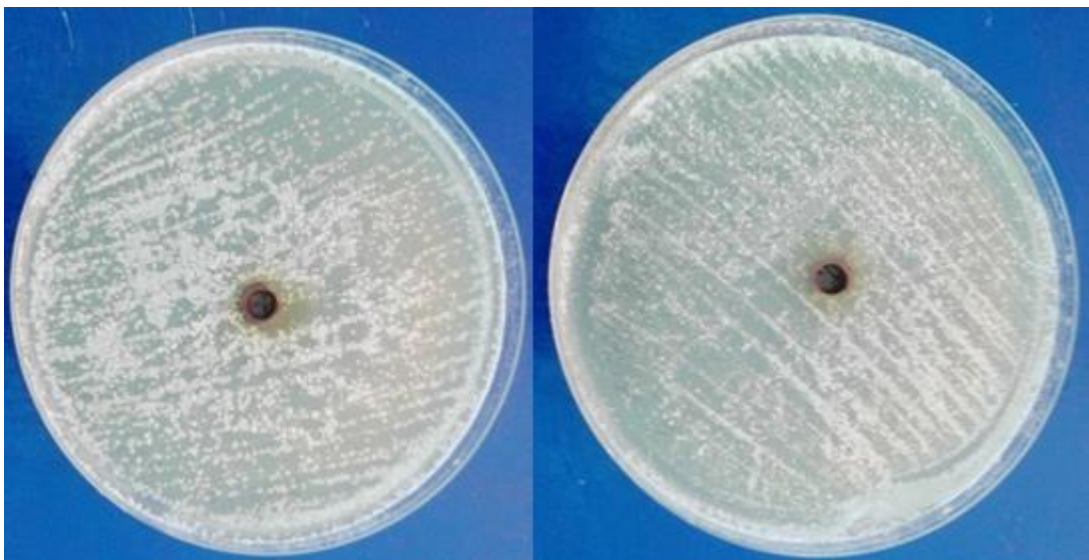
Fotografía 47. Ausencia de halo de inhibición de *V. calophylla* a 31.25 mg/mL por duplicado frente a *M. furfur* ATCC 14521 en SDAO T40

A 500 mg/ml DE *Vismia amazonica*



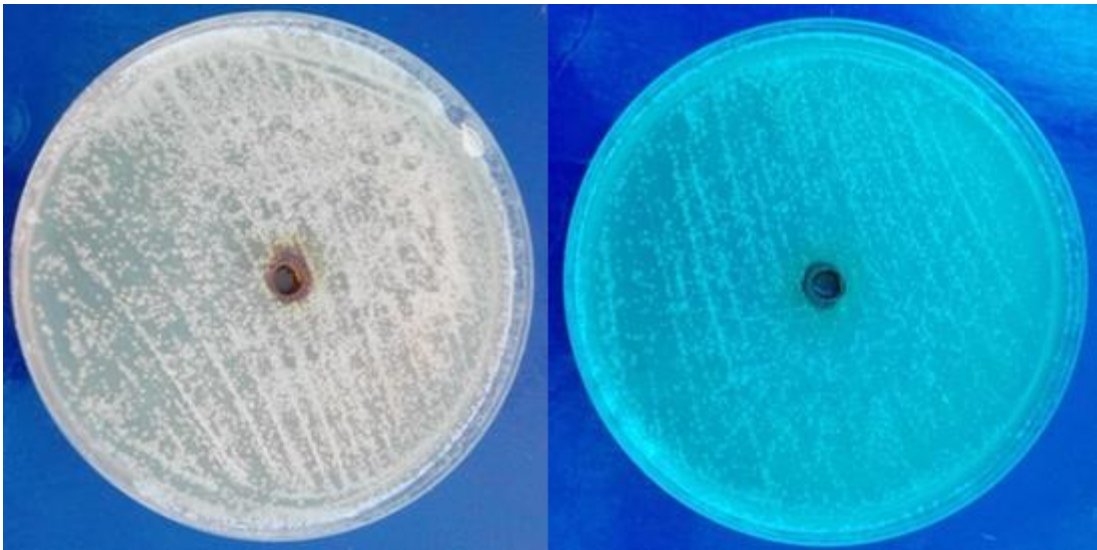
Fotografía 48. Presencia de halo de inhibición de *V. amazonica* a 500 mg/mL por duplicado frente a *M. furfur* ATCC 14521 en SDAO T40

A 250 mg/ml DE *Vismia amazonica*



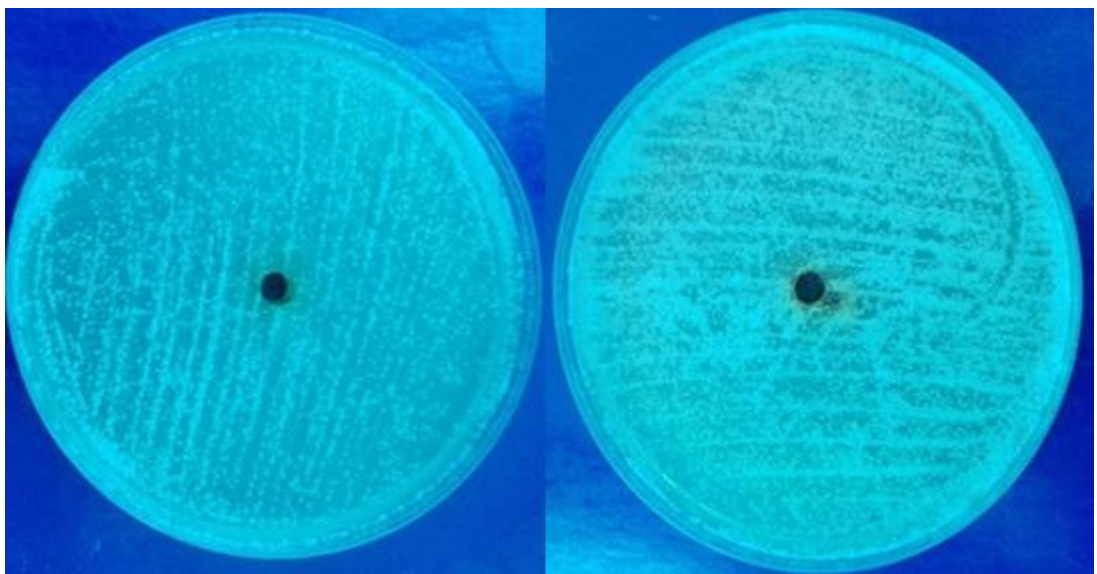
Fotografía 49. Ausencia de halo de inhibición de *V. amazonica* a 250 mg/mL por duplicado frente a *M. furfur* ATCC 14521 en SDAO T40

A 125 mg/ml DE *Vismia amazonica*



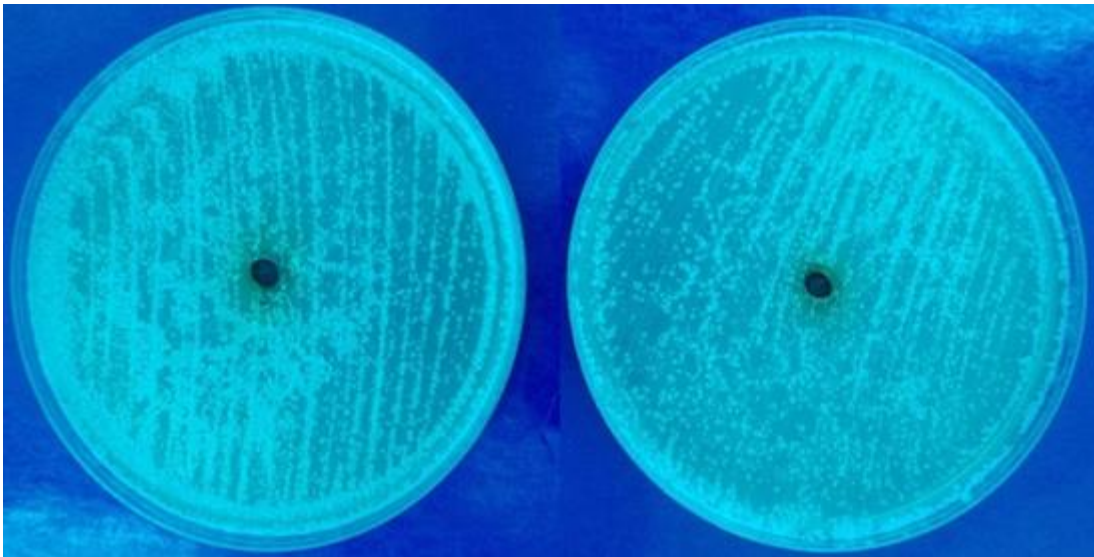
Fotografía 50. Ausencia de halo de inhibición de *V. amazonica* a 125 mg/mL por duplicado frente a *M. furfur* ATCC 14521 en SDAO T40

A 62.5 mg/ml DE *Vismia amazonica*



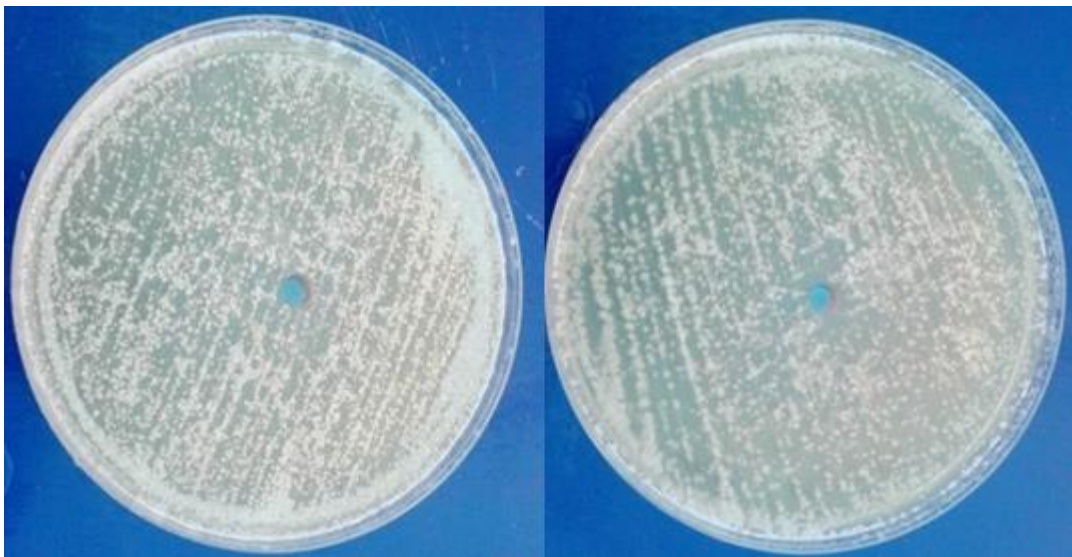
Fotografía 51. Ausencia de halo de inhibición de *V. amazonica* a 62.5 mg/mL por duplicado frente a *M. furfur* ATCC 14521 en SDAO T40

A 31.25 mg/ml DE *Vismia amazonica*



Fotografía 52. Ausencia de halo de inhibición de *V. amazonica* a 31.25 mg/mL por duplicado frente a *M. furfur* ATCC 14521 en SDAO T40

EN DMSO AL 100 %



Fotografía 53. Ausencia de halo de inhibición de DMSO al 100 % por duplicado como control negativo frente a *M. furfur* ATCC 14521 en SDAO T40

Anexo 25. Formulario N°6 Difusión en pozos para determinar los halos de inhibición del voriconazol como control de calidad positivo del método frente a *Malassezia furfur* ATCC 14521

FORMULARIO N°6 CONTROL DE LECTURA														
DIFUSIÓN EN POZOS PARA DETERMINAR LOS HALOS DE INHIBICIÓN DEL VORICONAZOL COMO CONTROL DE CALIDAD POSITIVO DEL MÉTODO FRENTE A <i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521														
Laboratorio: Micología														
LECTURA VISUAL M27-A3 (CLSI)														
ANTIFÚNGICO (VORICONAZOL) / TIEMPO DE INCUBACIÓN (48 HORAS)														
N° POCILLO	INHIBICIÓN (µg/mL)											11	12	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10				
CONCENTRACIÓN	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,12	0,06				
LECTURA VISUAL (48 HORAS) (SUSCEPTIBILIDAD ASIGNADA)											C O N T R O L N E G A T I V O	C O N T R O L N E G A T I V O		
A	<i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521	P	P	P	P	P	A	A	A	A			A	
B	<i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521	P	P	P	P	P	A	A	A	A			A	
C	<i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521													
D	<i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521													
E	<i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521													
F	<i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521													
G	<i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521													
H	<i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521													

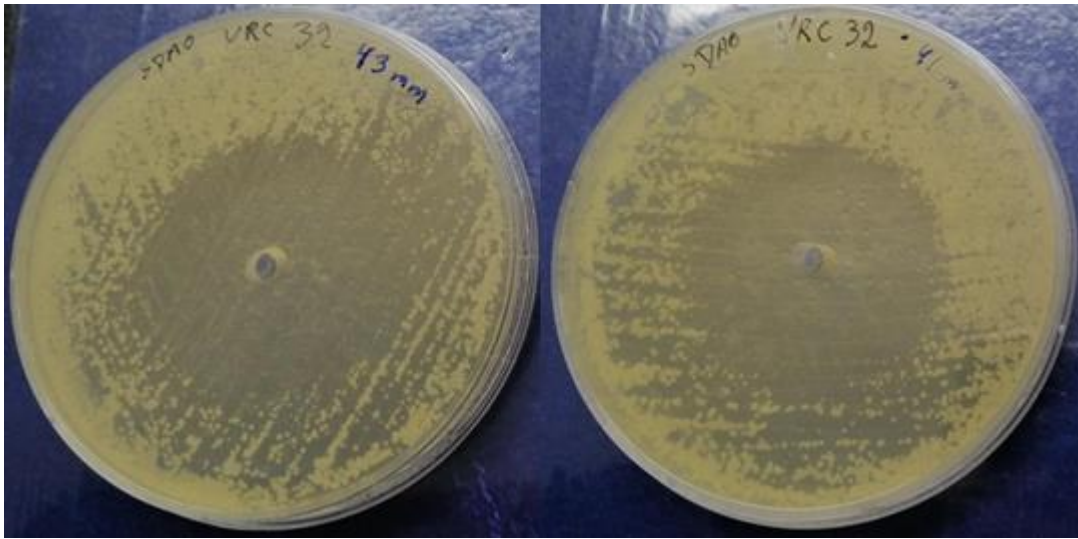
LECTURA VISUAL (DIFUSIÓN EN POZOS) P: Presencia; A: Ausencia

CONTROL NEGATIVO: DMSO 2% La inhibición se define como

la difusión del antifúngico en agar que no produce crecimiento microbiano

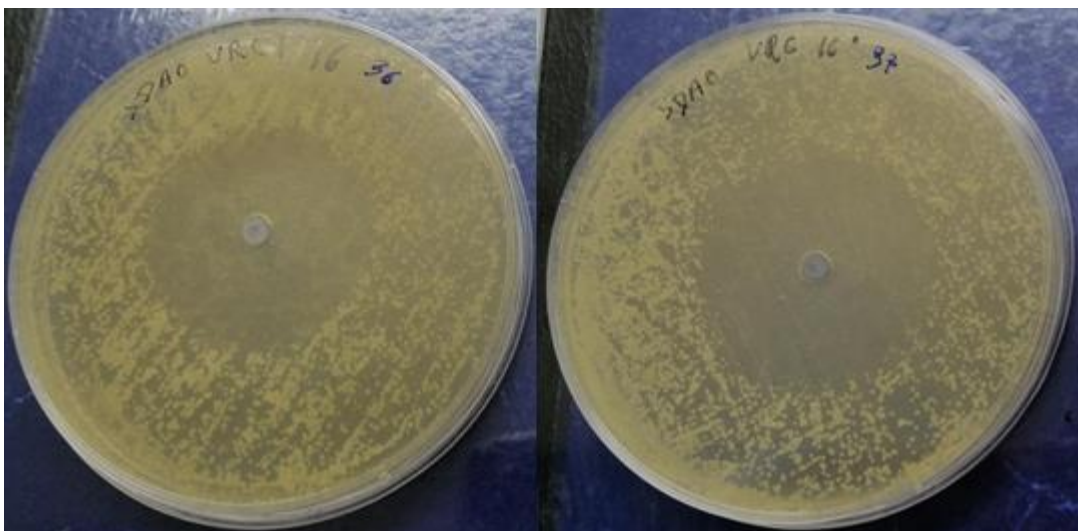
Inhibición de la Concentración Más Baja de Antifúngico (Verde)

A 32 µg /ml DE VORICONAZOL



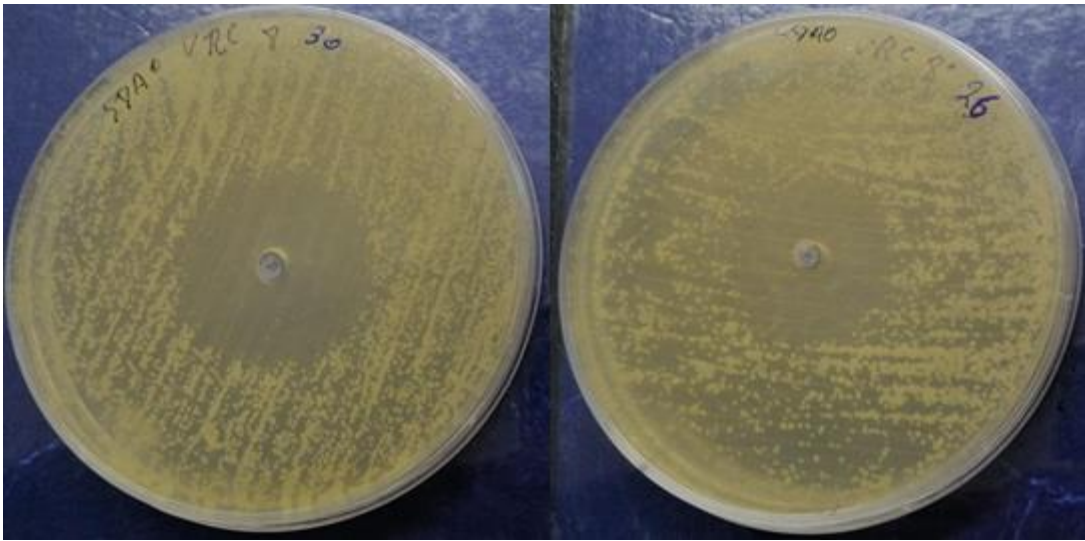
Fotografía 54. Presencia de halo de inhibición de Voriconazol a 32 µg/mL por duplicado como control de calidad positivo del método frente a *M. furfur* ATCC 14521 por el método de difusión en pozos en SDAO T40

A 16 µg /ml DE VORICONAZOL



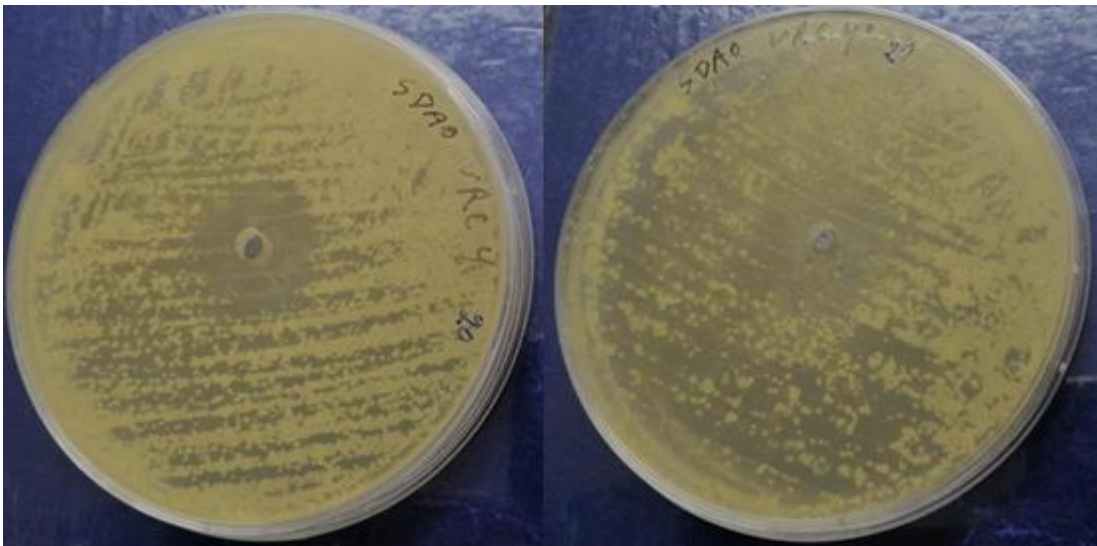
Fotografía 55. Presencia de halo de inhibición de Voriconazol a 16 µg/mL por duplicado como control de calidad positivo del método frente a *M. furfur* ATCC 14521 por el método de difusión en pozos en SDAO T40

A 8 μg /ml DE VORICONAZOL



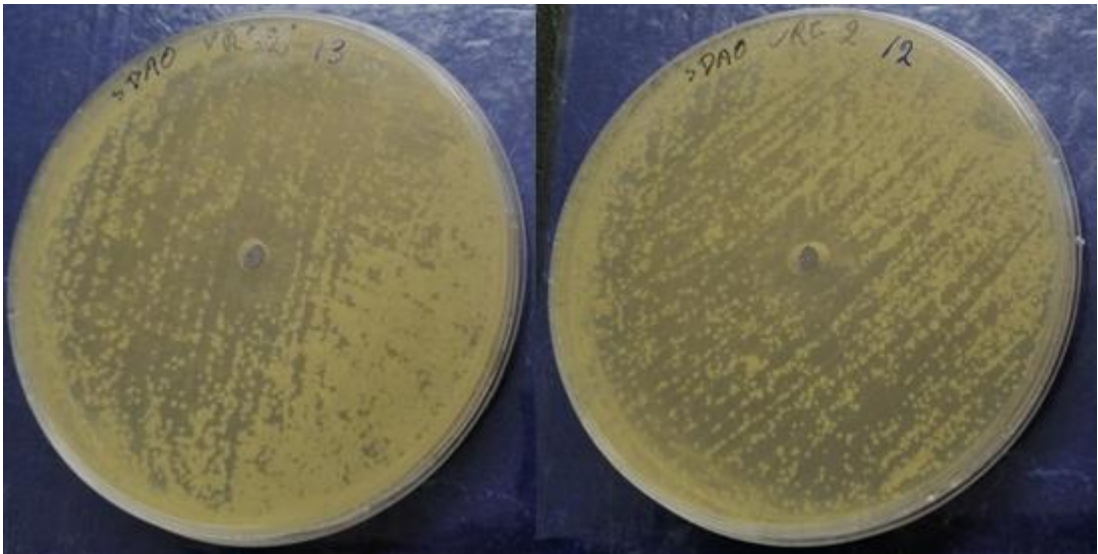
Fotografía 56. Presencia de halo de inhibición de Voriconazol a 8 μg /mL por duplicado como control de calidad positivo del método frente a *M. furfur* ATCC 14521 por el método de difusión en pozos en SDAO T40

A 4 μg /ml DE VORICONAZOL



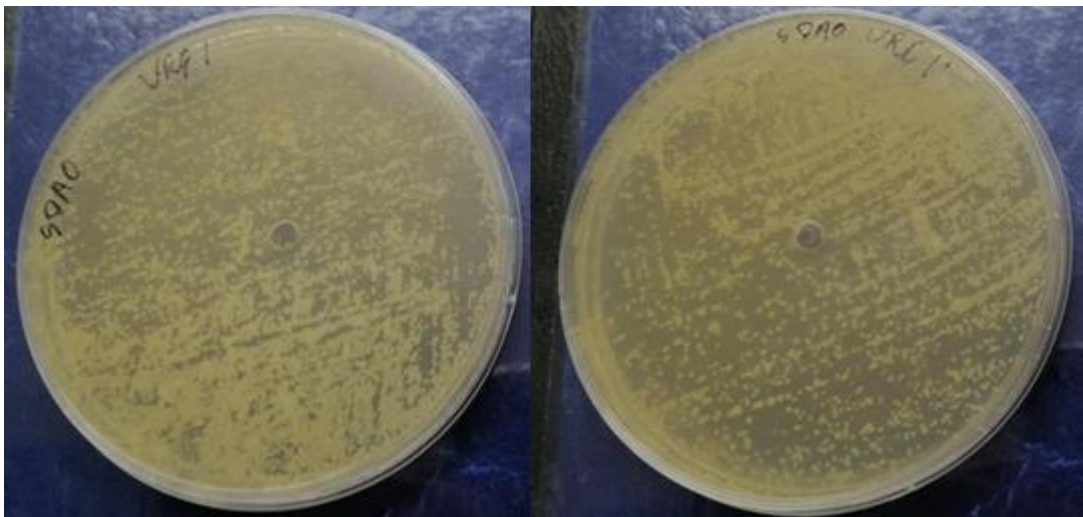
Fotografía 57. Presencia de halo de inhibición de Voriconazol a 4 μg /mL por duplicado como control de calidad positivo del método frente a *M. furfur* ATCC 14521 por el método de difusión en pozos en SDAO T40

A 2 µg /ml DE VORICONAZOL



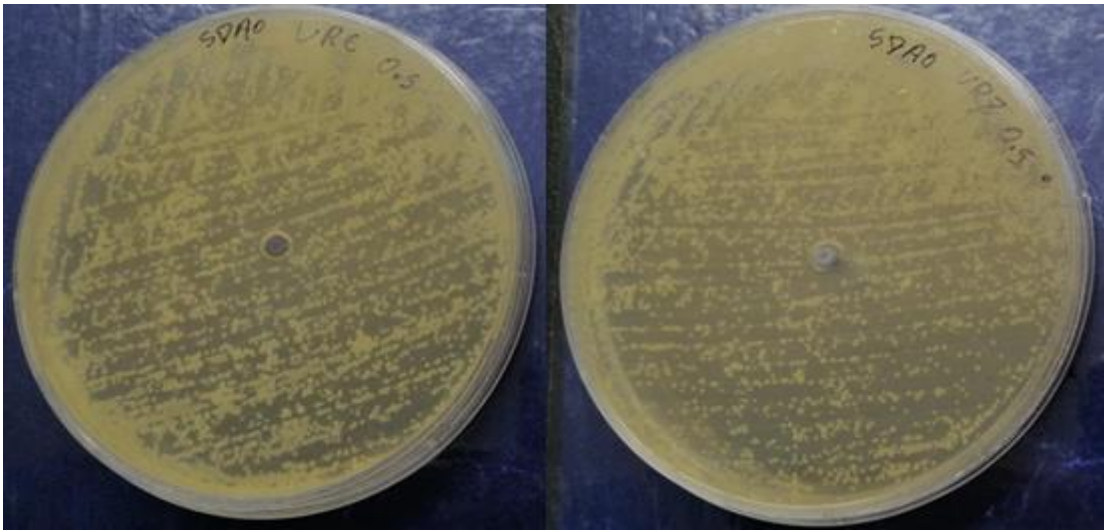
Fotografía 58. Presencia de halo de inhibición de Voriconazol a 2 µg/mL por duplicado como control de calidad positivo del método frente a *M. furfur* ATCC 14521 por el método de difusión en pozos en SDAO T40

A 1 µg /ml DE VORICONAZOL



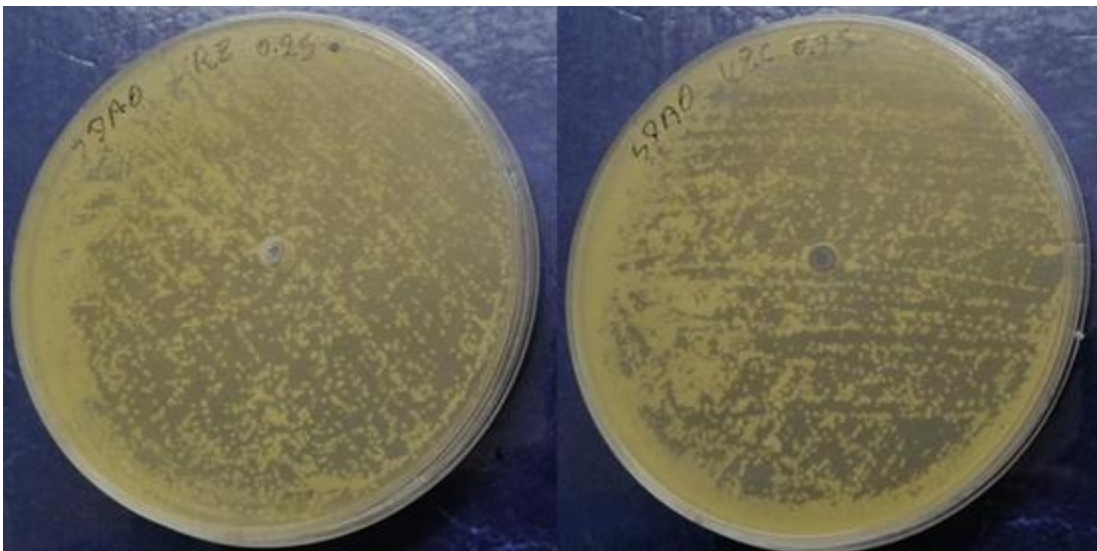
Fotografía 59. Ausencia de halo de inhibición de Voriconazol a 1 µg/mL por duplicado como control de calidad positivo del método frente a *M. furfur* ATCC 14521 por el método de difusión en pozos en SDAO T40

A 0.5 μg /ml DE VORICONAZOL



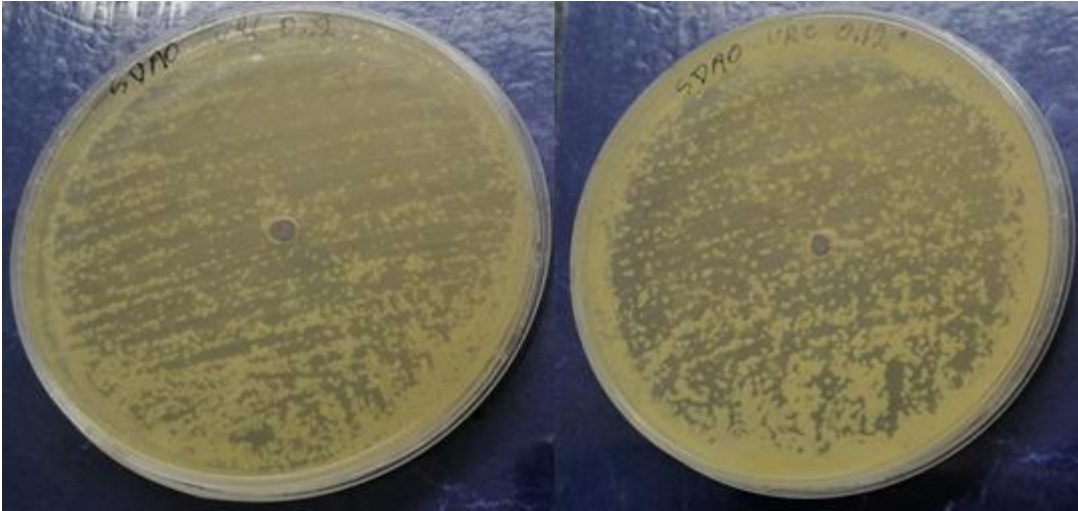
Fotografía 60. Ausencia de halo de inhibición de Voriconazol a 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por duplicado como control de calidad positivo del método frente a *M. furfur* ATCC 14521 por el método de difusión en pozos en SDAO T40

A 0.25 μg /ml DE VORICONAZOL



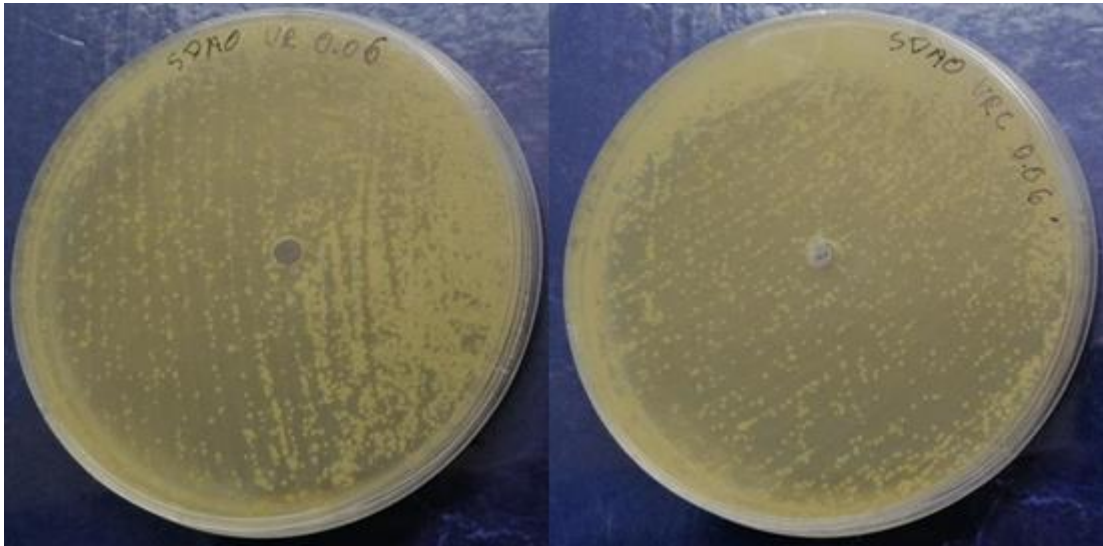
Fotografía 61. Ausencia de halo de inhibición de Voriconazol a 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por duplicado como control de calidad positivo del método frente a *M. furfur* ATCC 14521 por el método de difusión en pozos en SDAO T40

A 0.12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DE VORICONAZOL



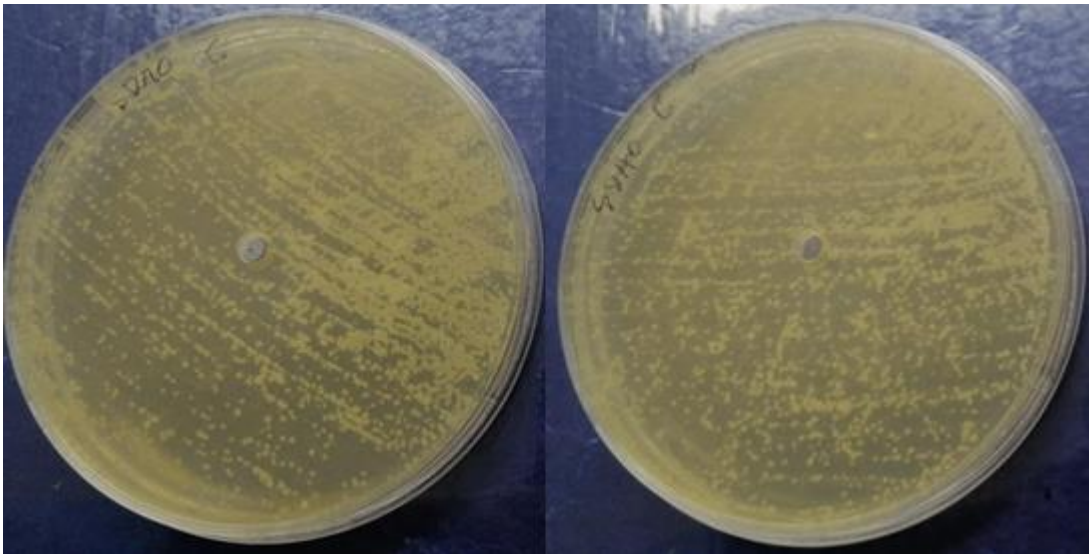
Fotografía 62. Ausencia de halo de inhibición de Voriconazol a 0.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por duplicado como control de calidad positivo del método frente a *M. furfur* ATCC 14521 por el método de difusión en pozos en SDAO T40

A 0.06 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DE VORICONAZOL



Fotografía 63. Ausencia de halo de inhibición de Voriconazol a 0.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por duplicado como control de calidad positivo del método frente a *M. furfur* ATCC 14521 por el método de difusión en pozos en SDAO T40

EN DMSO AL 2 %



Fotografía 64. Ausencia de halo de inhibición del DMSO al 2 % en RPMI por duplicado como control negativo frente a *M. furfur* ATCC 14521 por el método de difusión en pozos en SDAO T40

Anexo 26. Formulario N°7 Prueba de sensibilidad antifúngica de difusión en pozos para *Virola calophylla* y voriconazol frente a *Malassezia furfur* ATCC 14521

FORMULARIO N°7 CONTROL DE LECTURA
PRUEBA DE SENSIBILIDAD ANTIFÚNGICA DE DIFUSIÓN EN POZOS PARA <i>Virola calophylla</i> Y VORICONAZOL FRENTE A <i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521

Laboratorio: Micología

<p>Resultados esperados: Ver halo formado</p> <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <th style="width: 50%;">Antifúngico CMI</th> <th style="width: 50%;"><i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521</th> </tr> <tr> <td><i>Virola calophylla</i> 31.25 mg/mL - 500 mg/mL</td> <td>62.5 mg/mL - 500 mg/mL</td> </tr> <tr> <td><i>Vismia amazonica</i> 31.25 mg/mL - 500 mg/mL</td> <td>500 mg/mL</td> </tr> <tr> <td>Voriconazol 0.06 µg/mL – 32 µg/mL</td> <td>2 µg/mL – 32 µg/mL</td> </tr> </table> <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <th>POZO</th> <th>ESPECIE</th> <th>SENSIBLE</th> <th>INTERMEDIO</th> <th>RESISTENTE</th> </tr> <tr> <td>Voriconazol</td> <td><i>M. furfur</i> ATCC 14521</td> <td>≤ 4 µg/mL</td> <td>2 µg/mL</td> <td>≥ 1 µg/mL</td> </tr> </table> <p>*Sensible (formación de halo de inhibición), Intermedio (formación de halo de inhibición, pero se requiere aumentar la dosis), (Resistente (ausencia de halo de inhibición))</p>	Antifúngico CMI	<i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521	<i>Virola calophylla</i> 31.25 mg/mL - 500 mg/mL	62.5 mg/mL - 500 mg/mL	<i>Vismia amazonica</i> 31.25 mg/mL - 500 mg/mL	500 mg/mL	Voriconazol 0.06 µg/mL – 32 µg/mL	2 µg/mL – 32 µg/mL	POZO	ESPECIE	SENSIBLE	INTERMEDIO	RESISTENTE	Voriconazol	<i>M. furfur</i> ATCC 14521	≤ 4 µg/mL	2 µg/mL	≥ 1 µg/mL	<p>Año: 2020 Periodicidad y/o frecuencia: Cada vez que se utiliza</p>
Antifúngico CMI	<i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521																		
<i>Virola calophylla</i> 31.25 mg/mL - 500 mg/mL	62.5 mg/mL - 500 mg/mL																		
<i>Vismia amazonica</i> 31.25 mg/mL - 500 mg/mL	500 mg/mL																		
Voriconazol 0.06 µg/mL – 32 µg/mL	2 µg/mL – 32 µg/mL																		
POZO	ESPECIE	SENSIBLE	INTERMEDIO	RESISTENTE															
Voriconazol	<i>M. furfur</i> ATCC 14521	≤ 4 µg/mL	2 µg/mL	≥ 1 µg/mL															

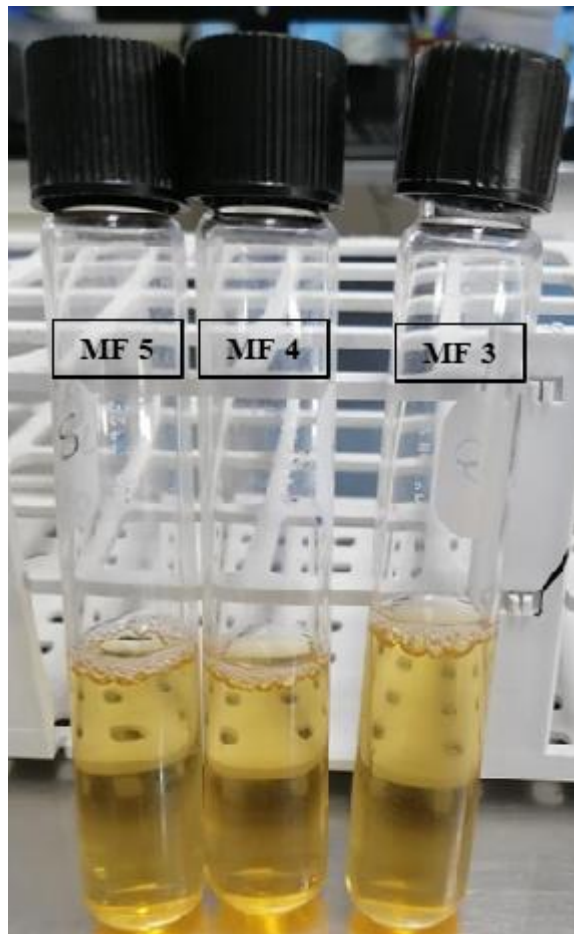
Fecha	Responsable	CÓDIGO	RESULTADO: halo de inhibición		INTERPRETACIÓN	
			<i>V. calophylla</i> (mg/mL)	Voriconazol (µg/mL)	<i>Virola calophylla</i>	Voriconazol
26/08/2020	Gudy Scott	<i>M. furfur</i> ATCC 14521	500	32	Cumple (SI)	Cumple (SI)
26/08/2020	Gudy Scott	<i>M. furfur</i> ATCC 14521	250	16	Cumple (SI)	Cumple (SI)
26/08/2020	Gudy Scott	<i>M. furfur</i> ATCC 14521	125	8	Cumple (SI)	Cumple (SI)
26/08/2020	Gudy Scott	<i>M. furfur</i> ATCC 14521	62.5	4	Cumple (SI)	Cumple (SI)
26/08/2020	Gudy Scott	<i>M. furfur</i> ATCC 14521	31.25	2	Cumple (NO)	Cumple (SI)
26/08/2020	Gudy Scott	<i>M. furfur</i> ATCC 14521	-	1	Cumple (NO)	Cumple (NO)
Fecha de cierre del registro		Firma y V°B° del supervisor (a)				
27/08/2020		Med. Susana Zurita				

Anexo 27. Formulario N°8 Preparación del inóculo para determinar la CMI de los extractos etanólicos y del voriconazol a partir de la cepa cosechada de *M. furfur* ATCC 14521

FORMULARIO N°8 CONTROL DE LECTURA
PREPARACIÓN DEL INÓCULO PARA DETERMINAR LA CMI DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS CORTEZAS VEGETALES Y DEL VORICONAZOL POR EL MÉTODO DE MICRODILUCIÓN EN CALDO A PARTIR DE LA CEPA COSECHADA <i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521

Laboratorio: Micología					
Material de referencia – Resultados esperados:					
CEPA	TURBIDEZ 0.5 ESCALA MC. FARLAND	PREPARACIÓN DEL INÓCULO		Año: 2019	
<i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521	INÓCULO 1-5 x 10⁶ UFC/mL	3 DILUCIONES SERIADAS DEL INÓCULO EN SDBO T40	DISTINTAS CONCENTRACIONES DEL INÓCULO	Periodicidad y/o frecuencia: Cada vez que se utiliza	
SDBO T40: Caldo Sabouraud dextrosa suplementado con aceite de oliva al 0.5% y Tween 40 al 0.5%					
CÓDIGO	TURBIDEZ 0.5 ESCALA MC. FARLAND	PREPARACIÓN DEL INÓCULO A DISTINTAS CONCENTRACIONES		RESULTADO	RESPONSA BLE
<i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521	INÓCULO 1-5 x 10⁶ UFC/mL	3 DILUCIONES SERIADAS DEL INÓCULO EN SDBO T40	1-5 x 10⁵ UFC/mL en DMSO al 10% 1-5 x 10³ UFC/mL en DMSO al 2%	<i>Malassezia furfur</i>	Gudy Scott
Fecha de cierre del registro			Firma y V° B° del supervisor (a)		
16/08/2019 Analista: Gudy Scott					

DILUCIONES SERIADAS DEL INÓCULO DE *Malassezia furfur* ATCC 14521



Fotografía 65. Diluciones seriadas del inóculo de *M. furfur* ATCC 14521 a las concentraciones de $1-5 \times 10^5$ UFC/mL (MF 5), $1-5 \times 10^4$ UFC/mL (MF 4) y $1-5 \times 10^3$ UFC/mL (MF 3) en el medio de cultivo de SDBO T40

Anexo 28. Formulario N°9 Microdilución en caldo para determinar la CMI de *Iryanthera juruensis* sobre *Malassezia furfur* ATCC 14521

FORMULARIO N°9 CONTROL DE LECTURA
MICRODILUCIÓN EN CALDO PARA DETERMINAR LA CMI DEL EXTRACTO ETANÓLICO
DE <i>Iryanthera juruensis</i> FRENTE A <i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521

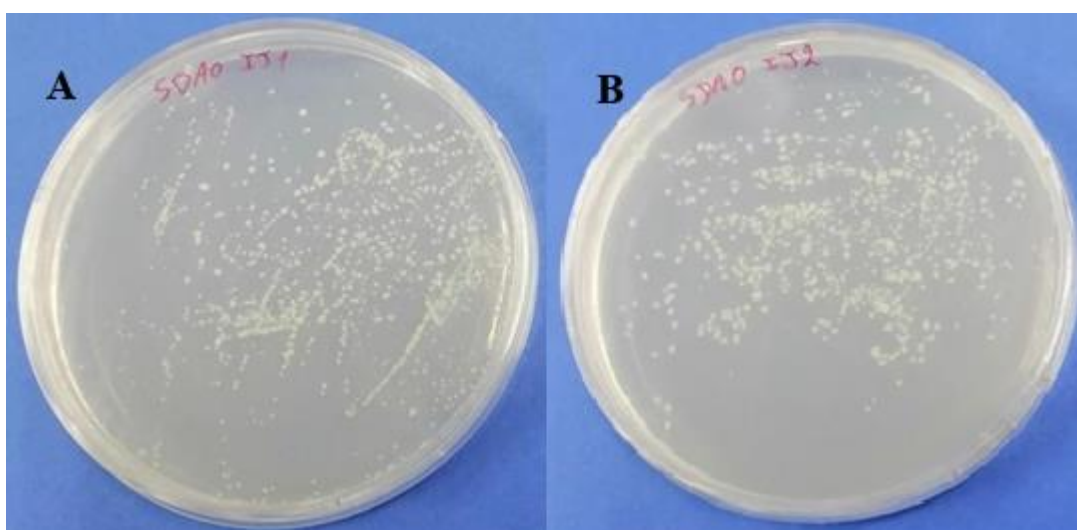
Laboratorio: Micología													
LECTURA VISUAL M27-A3 (CLSI)													
ANTIFÚNGICO (<i>Iryanthera juruensis</i>) / TIEMPO DE INCUBACIÓN (48 HORAS)													
	CMI (mg/mL)											11	12
	N° POCILLO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
CONCENTRACIÓN	125	62.5	31.2	15.6	7.8	3.9	1.9	0.9	0.48	0.24			
LECTURA VISUAL (48 HORAS) (SUSCEPTIBILIDAD ASIGNADA)													
A	<i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521											CO NT RO L DE CR EC IM IE NT O	C O NT R O L DE ES TE RI LI DA D
B	<i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521												
C	<i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521												
D	<i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521												
E	<i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		
F	<i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		
G	<i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521												
H	<i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521												
LECTURA VISUAL (SUSCEPTIBILIDAD ASIGNADA)											S: Sensible; R: Resistente		
Resistente											La CMI se define como la concentración más		
baja en la que se observa la inhibición del crecimiento fúngico											ANTIFÚNGICO: <i>Iryanthera juruensis</i>		
CMI: Concentración Mínima Inhibitoria (Verde)													

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE *Iryanthera juruensis*



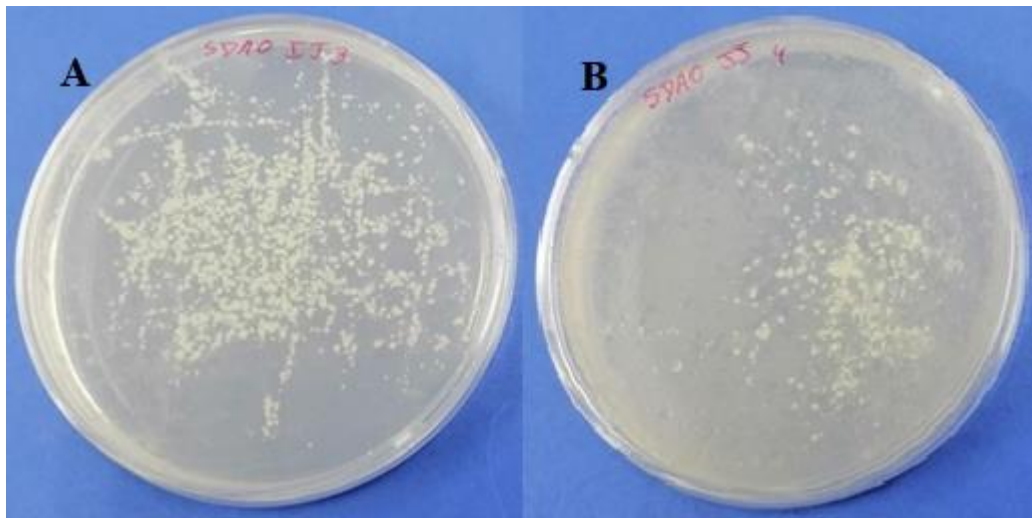
Fotografía 66. Concentración Mínima Inhibitoria del extracto etanólico de *I. juruensis* por duplicado contra *M. furfur* ATCC 14521 por el método de microdilución en SDBO T40. En las filas E y F no se observa la CMI

SUBCULTIVO DE *Iryanthera juruensis* a 125 mg/ml y 62.5 mg/ml



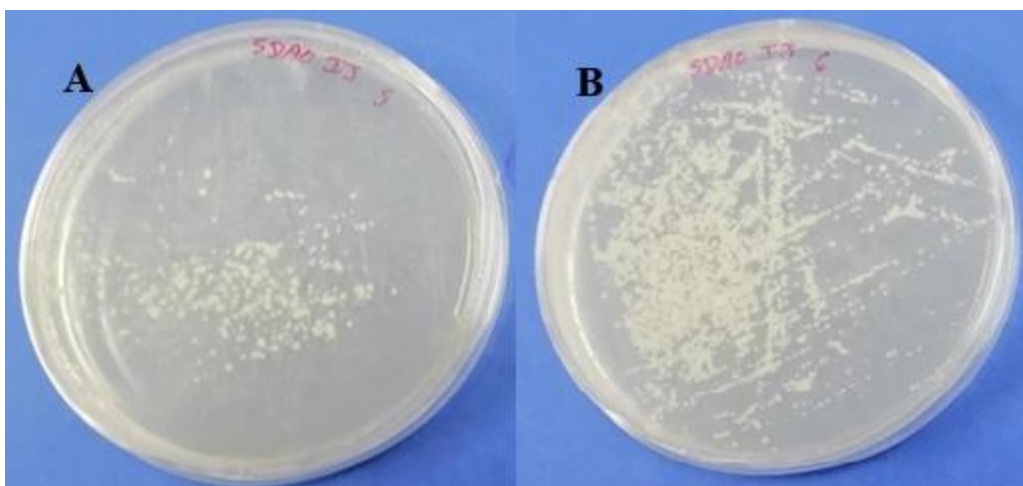
Fotografía 67. Subcultivo en SDAO T40 a partir del enfrentamiento del extracto etanólico de *I. juruensis* para hallar la CMI por el método de microdilución contra *M. furfur* ATCC 14521 **A)** Resistencia a 125 mg/ml **B)** Resistencia a 62.5 mg/ml

SUBCULTIVO DE *Iryanthera juruensis* a 31.25 mg/ml y 15.62 mg/ml



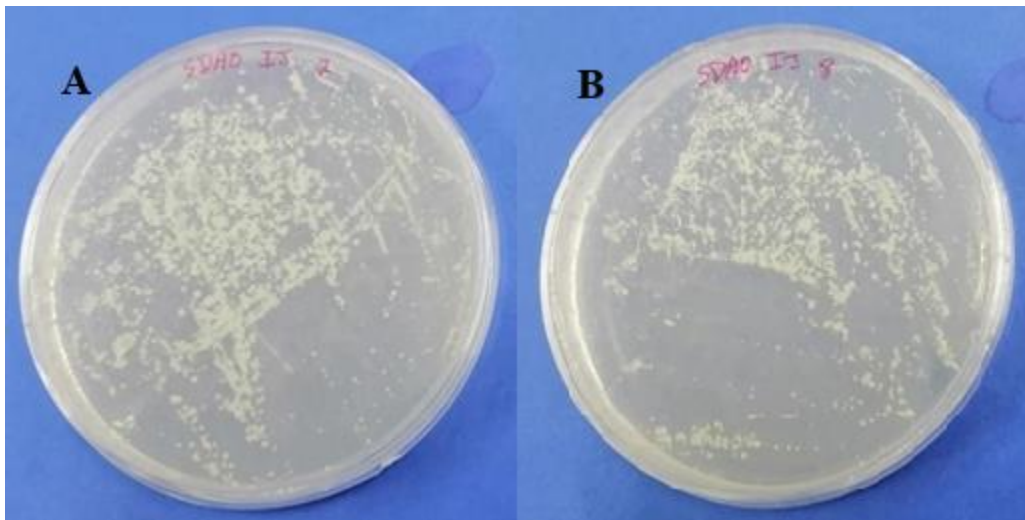
Fotografía 68. Subcultivo en SDAO T40 a partir del enfrentamiento del extracto etanólico de *I. juruensis* para hallar la CMI por el método de microdilución contra *M. furfur* ATCC 14521 **A)** Resistencia a 31.25 mg/ml **B)** Resistencia a 15.62 mg/ml

SUBCULTIVO DE *Iryanthera juruensis* a 7.81 mg/ml y 3.9 mg/ml



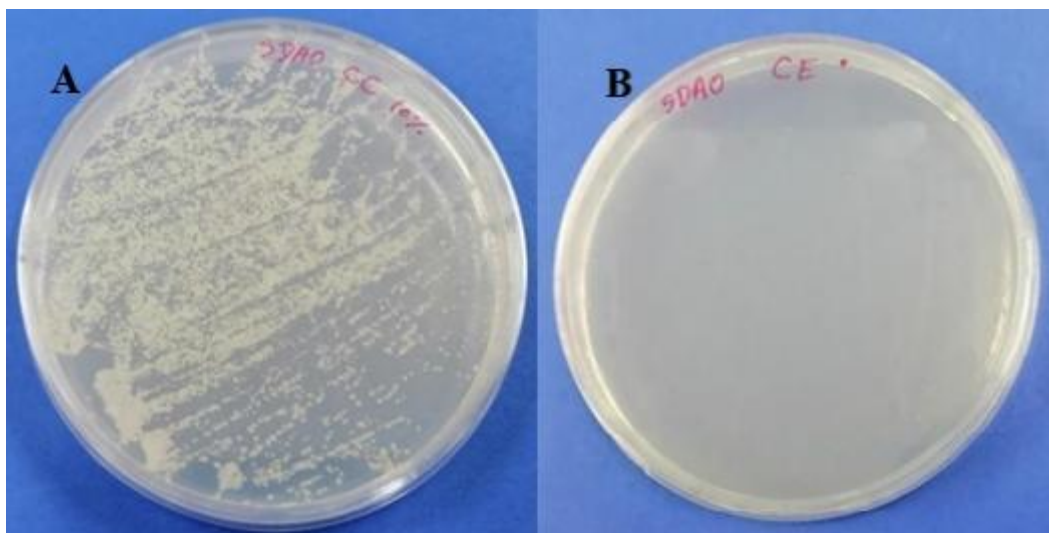
Fotografía 69. Subcultivo en SDAO T40 a partir del enfrentamiento del extracto etanólico de *I. juruensis* para hallar la CMI por el método de microdilución contra *M. furfur* ATCC 14521 **A)** Resistencia a 7.81 mg/ml **B)** Resistencia a 3.9 mg/ml

SUBCULTIVO DE *Iryanthera juruensis* a 1.95 mg/ml y 0.97 mg/ml



Fotografía 70. Subcultivo en SDAO T40 a partir del enfrentamiento del extracto etanólico de *I. juruensis* para hallar la CMI por el método de microdilución contra *M. furfur* ATCC 14521 **A)** Resistencia a 1.95 mg/ml **B)** Resistencia a 0.97 mg/ml

SUBCULTIVO EN DMSO AL 10%



Fotografía 71. Subcultivo en SDAO T40 a partir de los controles en DMSO al 10% para hallar la CMI por el método de microdilución contra *M. furfur* ATCC 14521 **A)** Control de crecimiento **B)** Control de esterilidad

Anexo 29. Formulario N°10 Microdilución en caldo para determinar la CMI de *Virola calophylla* sobre *Malassezia furfur* ATCC 14521

FORMULARIO N°10 CONTROL DE LECTURA
MICRODILUCIÓN EN CALDO PARA DETERMINAR LA CMI DEL EXTRACTO ETANÓLICO
DE <i>Virola calophylla</i> FRENTE A <i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521

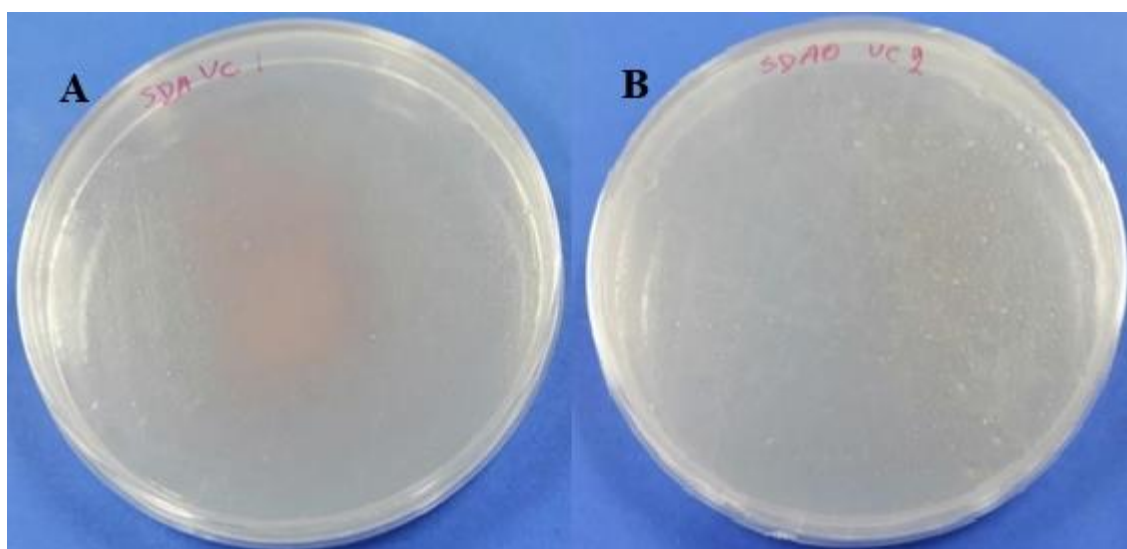
Laboratorio: Micología														
LECTURA VISUAL M27-A3 (CLSI)														
ANTIFÚNGICO (<i>Virola calophylla</i>) / TIEMPO DE INCUBACIÓN (48 HORAS)														
CMI (mg/mL)														
N° POCILLO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
CONCENTRACIÓN	125	62.5	31.2	15.6	7.8	3.9	1.9	0.9	0.48	0.24				
LECTURA VISUAL (48 HORAS) (SUSCEPTIBILIDAD ASIGNADA)											CONTROL DE CRECIMIENTO	DE ESTERILIDAD		
A	<i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521													
B	<i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521													
C	<i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521	S	S	R	R	R	R	R	R	R				
D	<i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521	S	S	R	R	R	R	R	R	R				
E	<i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521													
F	<i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521													
G	<i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521													
H	<i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521													
LECTURA VISUAL (SUSCEPTIBILIDAD ASIGNADA)											S: Sensible; R: Resistente			
Resistente											La CMI se define como la concentración más			
baja en la que se observa la inhibición del crecimiento fúngico											ANTIFÚNGICO: <i>Virola calophylla</i>			
CMI: Concentración Mínima Inhibitoria (Verde)														

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE *Virola calophylla*



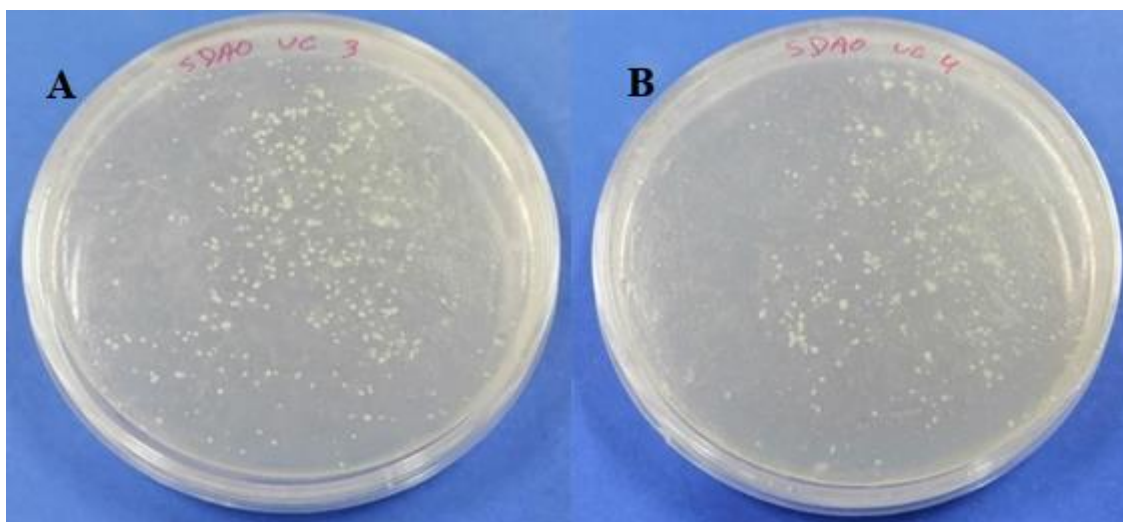
Fotografía 72. Concentración Mínima Inhibitoria del extracto etanólico de *V. calophylla* por duplicado contra *M. furfur* ATCC 14521 por el método de microdilución en SDBO T40. La columna 2 de las filas C y D marcada en verde corresponde a la CMI a 62.5 mg/ml

SUBCULTIVO DE *Virola calophylla* a 125 mg/ml y 62.5 mg/ml



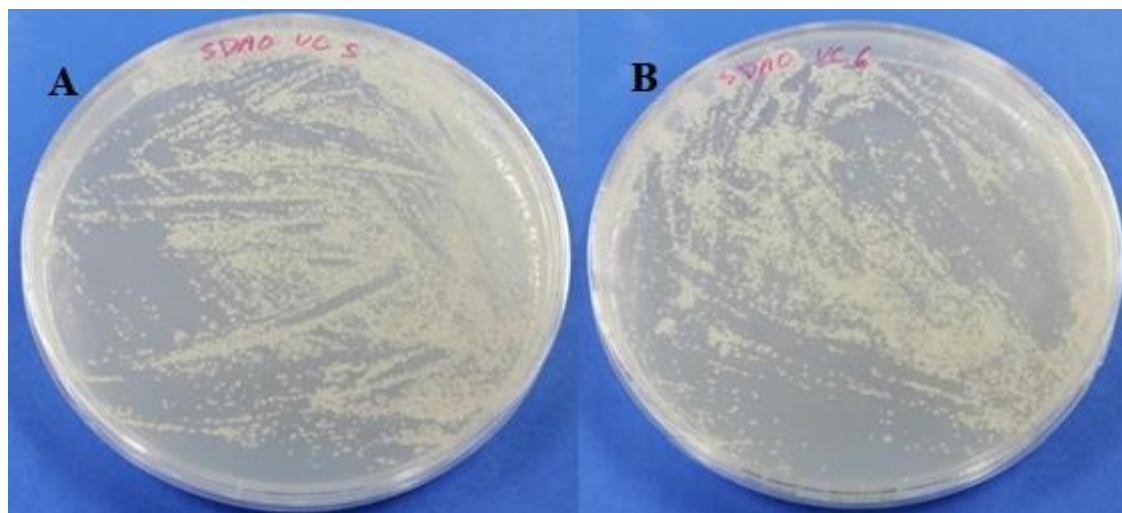
Fotografía 73. Subcultivo en SDAO T40 a partir del enfrentamiento del extracto etanólico de *V. calophylla* para hallar la CMI por el método de microdilución contra *M. furfur* ATCC 14521 **A)** Sensibilidad a 125 mg/ml **B)** Sensibilidad a 62.5 mg/ml

SUBCULTIVO DE *Virola calophylla* a 31.25 mg/ml y 15.62 mg/ml



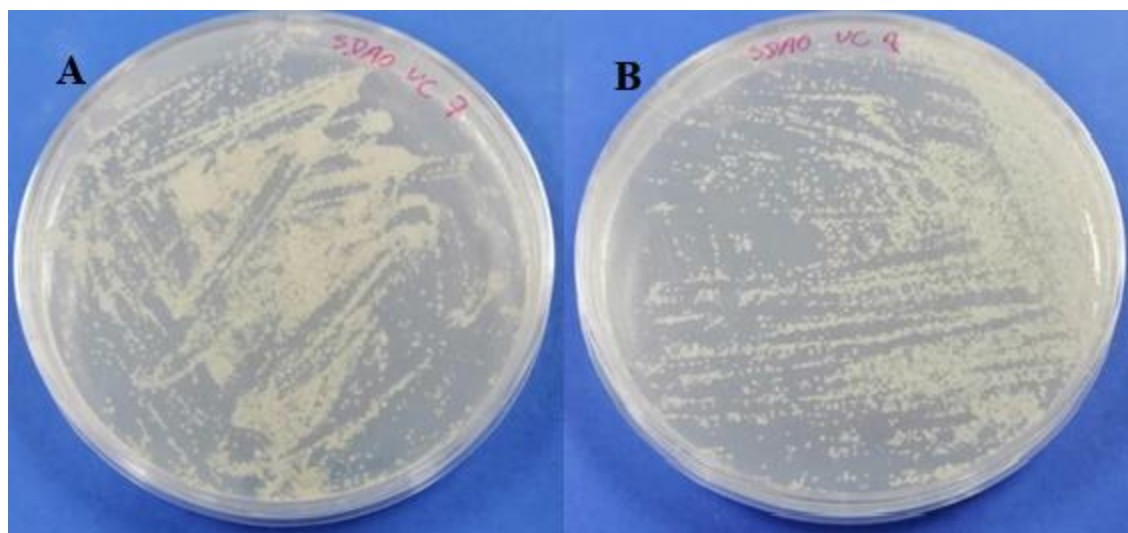
Fotografía 74. Subcultivo en SDAO T40 a partir del enfrentamiento del extracto etanólico de *V. calophylla* para hallar la CMI por el método de microdilución contra *M. furfur* ATCC 14521 **A)** Resistencia a 31.25 mg/ml **B)** Resistencia a 15.62 mg/ml

SUBCULTIVO DE *Virola calophylla* a 7.81 mg/ml y 3.9 mg/ml



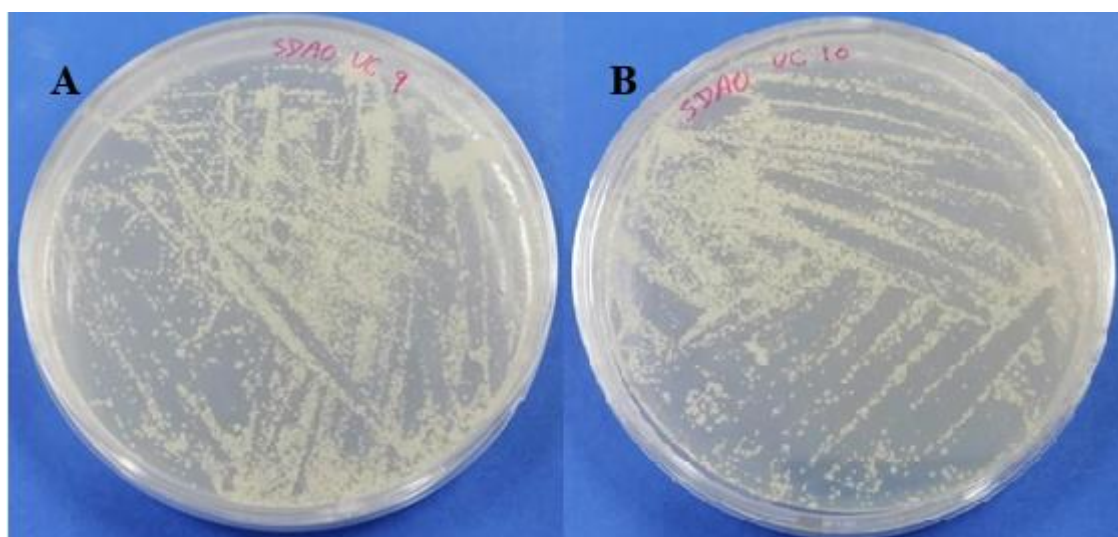
Fotografía 75. Subcultivo en SDAO T40 a partir del enfrentamiento del extracto etanólico de *V. calophylla* para hallar la CMI por el método de microdilución contra *M. furfur* ATCC 14521 **A)** Resistencia a 7.81 mg/ml **B)** Resistencia a 3.9 mg/ml

SUBCULTIVO DE *Virola calophylla* a 1.95 mg/ml y 0.97 mg/ml



Fotografía 76. Subcultivo en SDAO T40 a partir del enfrentamiento del extracto etanólico de *V. calophylla* para hallar la CMI por el método de microdilución contra *M. furfur* ATCC 14521 **A)** Resistencia a 1.95 mg/ml **B)** Resistencia a 0.97 mg/ml

SUBCULTIVO DE *Virola calophylla* a 0.48 mg/ml y 0.24 mg/ml



Fotografía 77. Subcultivo en SDAO T40 a partir del enfrentamiento del extracto etanólico de *V. calophylla* para hallar la CMI por el método de microdilución contra *M. furfur* ATCC 14521 **A)** Resistencia a 0.48 mg/ml **B)** Resistencia a 0.24 mg/ml

Anexo 30. Formulario N°11 Microdilución en caldo para determinar la CMI de *Vismia amazonica* sobre *Malassezia furfur* ATCC 14521

FORMULARIO N°11 CONTROL DE LECTURA
MICRODILUCIÓN EN CALDO PARA DETERMINAR LA CMI DEL EXTRACTO ETANÓLICO
DE <i>Vismia amazonica</i> FRENTE A <i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521

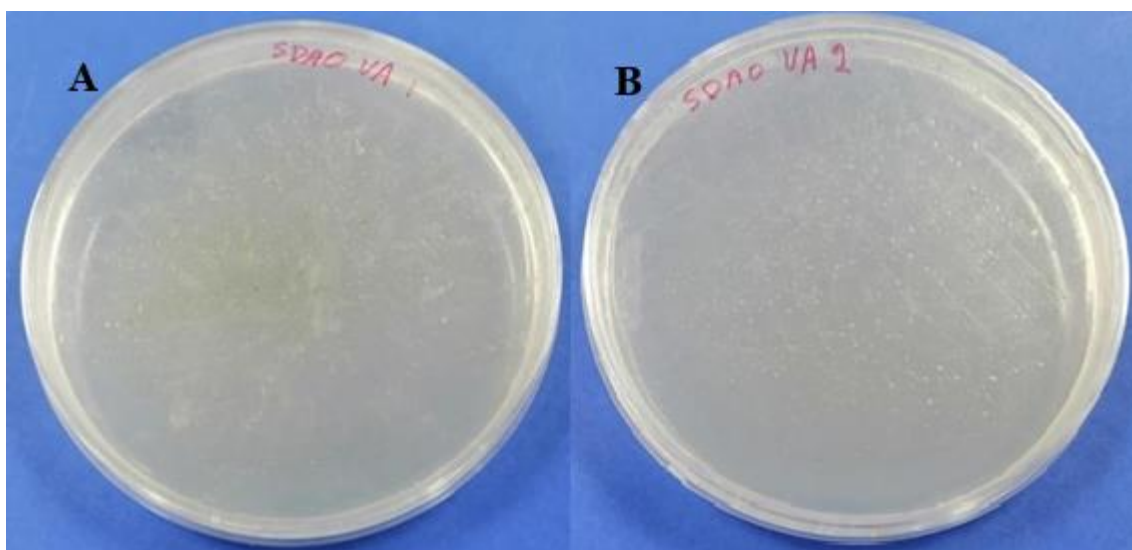
Laboratorio: Micología														
LECTURA VISUAL M27-A3 (CLSI)														
ANTIFÚNGICO (<i>Vismia amazonica</i>) / TIEMPO DE INCUBACIÓN (48 HORAS)														
CMI (mg/mL)														
N° POCILLO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
CONCENTRACION	125	62.5	31.2	15.6	7.8	3.9	1.9	0.9	0.48	0.24				
LECTURA VISUAL (48 HORAS) (SUSCEPTIBILIDAD ASIGNADA)											C O N T R O L D E C R E C I M I E N T O D E E S T E R I L I D A D			
A	<i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521	S	S	R	R	R	R	R	R	R				
B	<i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521	S	S	R	R	R	R	R	R	R				
C	<i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521													
D	<i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521													
E	<i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521													
F	<i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521													
G	<i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521													
H	<i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521													
LECTURA VISUAL (SUSCEPTIBILIDAD ASIGNADA)											S: Sensible; R: Resistente			
Resistente											La CMI se define como la concentración más			
baja en la que se observa la inhibición del crecimiento fúngico											ANTIFÚNGICO: <i>Vismia amazonica</i>			
CMI: Concentración Mínima Inhibitoria (Verde)														

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE *Vismia amazonica*



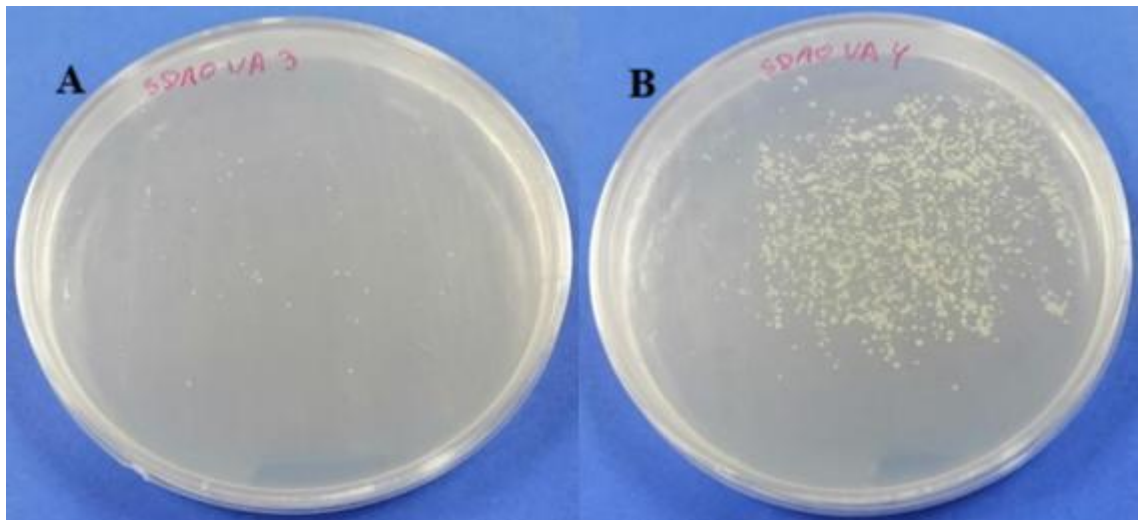
Fotografía 78. Concentración Mínima Inhibitoria del extracto etanólico de *V. amazonica* por duplicado contra *M. furfur* ATCC 14521 por el método de microdilución en SDBO T40. La columna 2 de las filas A y B marcada en rojo corresponde a la CMI a 62.5 mg/ml

SUBCULTIVO DE *Vismia amazonica* a 125 mg/ml y 62.5 mg/ml



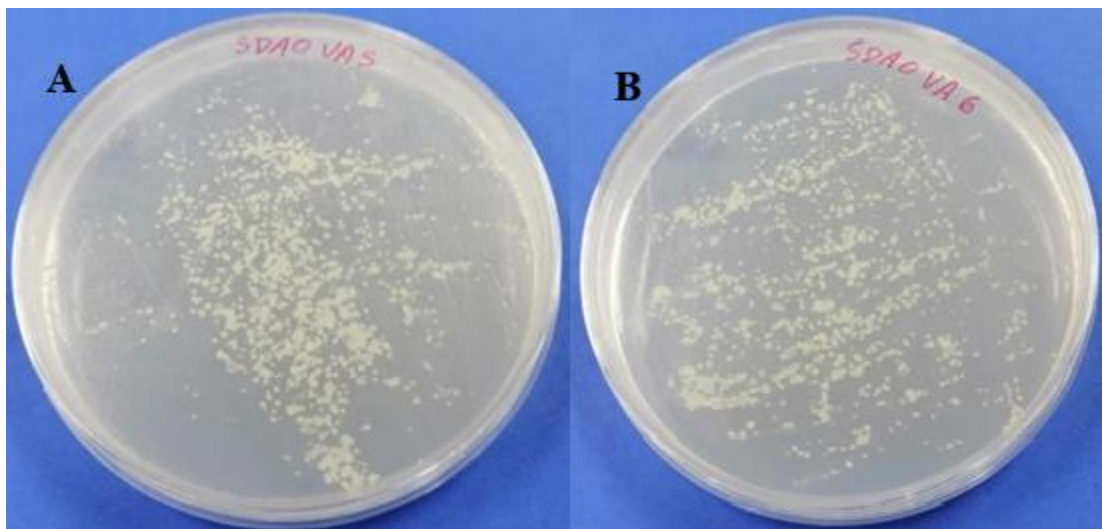
Fotografía 79. Subcultivo en SDAO T40 a partir del enfrentamiento del extracto etanólico de *V. amazonica* para hallar la CMI por el método de microdilución contra *M. furfur* ATCC 14521 **A)** Sensibilidad a 125 mg/ml **B)** Sensibilidad a 62.5 mg/ml

SUBCULTIVO DE *Vismia amazonica* a 31.25 mg/ml y 15.62 mg/ml



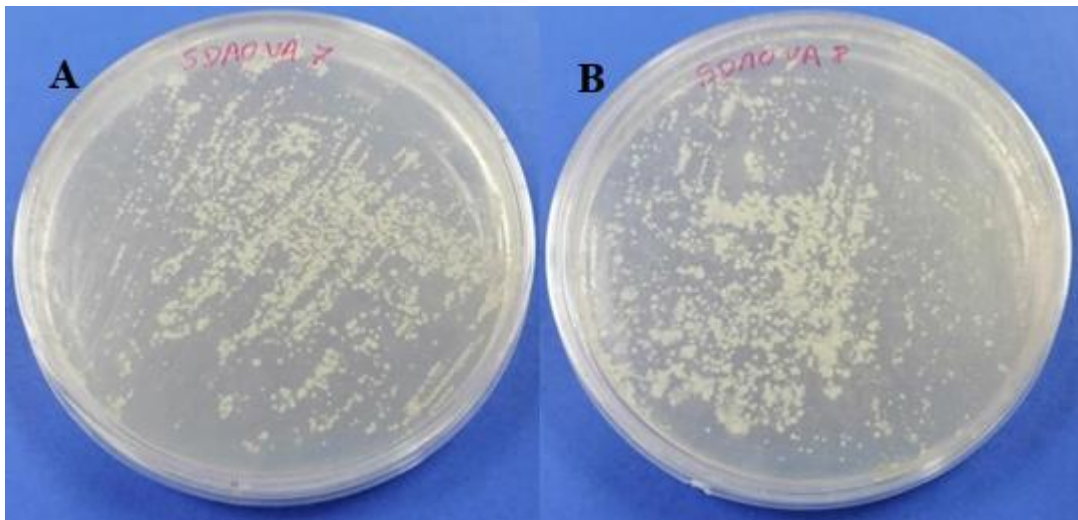
Fotografía 80. Subcultivo en SDAO T40 a partir del enfrentamiento del extracto etanólico de *V. amazonica* para hallar la CMI por el método de microdilución contra *M. furfur* ATCC 14521 **A)** Resistencia a 31.25 mg/ml **B)** Resistencia a 15.62 mg/ml

SUBCULTIVO DE *Vismia amazonica* a 7.81 mg/ml y 3.9 mg/ml



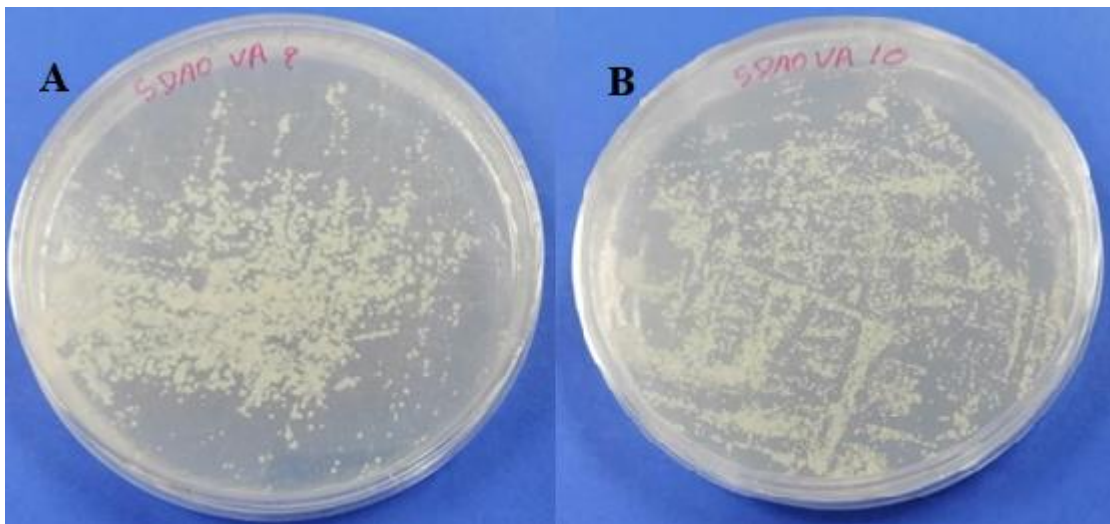
Fotografía 81. Subcultivo en SDAO T40 a partir del enfrentamiento del extracto etanólico de *V. amazonica* para hallar la CMI por el método de microdilución contra *M. furfur* ATCC 14521 **A)** Resistencia a 7.81 mg/ml **B)** Resistencia a 3.9 mg/ml

SUBCULTIVO DE *Vismia amazonica* a 1.95 mg/ml y 0.97 mg/ml



Fotografía 82. Subcultivo en SDAO T40 a partir del enfrentamiento del extracto etanólico de *V. amazonica* para hallar la CMI por el método de microdilución contra *M. furfur* ATCC 14521 **A)** Resistencia a 1.95 mg/ml **B)** Resistencia a 0.97 mg/ml

SUBCULTIVO DE *Vismia amazonica* a 0.48 mg/ml y 0.24 mg/ml



Fotografía 83. Subcultivo en SDAO T40 a partir del enfrentamiento del extracto etanólico de *V. amazonica* para hallar la CMI por el método de microdilución contra *M. furfur* ATCC 14521 **A)** Resistencia a 0.48 mg/ml **B)** Resistencia a 0.24 mg/ml

Anexo 31. Formulario N°12 Microdilución en caldo para determinar la CMI del voriconazol como control de calidad positivo del método sobre *M. furfur* ATCC 14521

FORMULARIO N°12 CONTROL DE LECTURA
MICRODILUCIÓN EN CALDO PARA DETERMINAR LA CMI DEL VORICONAZOL COMO CONTROL DE CALIDAD POSITIVO DEL MÉTODO FRENTE A <i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521

Laboratorio: Micología														
LECTURA VISUAL M27-A3 (CLSI)														
ANTIFÚNGICO (VORICONAZOL) / TIEMPO DE INCUBACIÓN (48 HORAS)														
	CMI (µg/mL)												C O N T R O L L O R O D E E S T E R I L I Z A D O	
	N° POCILLO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		12
	CONCENTRACION	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,12	0,06			
LECTURA VISUAL (48 HORAS) (SUSCEPTIBILIDAD ASIGNADA)														
A	<i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R			
B	<i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R			
C	<i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521													
D	<i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521													
E	<i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521													
F	<i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521													
G	<i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521													
H	<i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521													

LECTURA VISUAL (SUSCEPTIBILIDAD ASIGNADA) S: Sensible; R: Resistente
 La CMI se define como la concentración más baja en la que se observa la inhibición del crecimiento fúngico **ANTIFÚNGICO: Voriconazol (VRZ)**
CMI: Concentración Mínima Inhibitoria (Verde)

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DEL VORICONAZOL



Fotografía 84. Concentración Mínima Inhibitoria del voriconazol por duplicado contra *M. furfur* ATCC 14521 por el método de microdilución en SDBO T40. La columna 9 de las filas A y B marcada en rojo corresponde a la CMI del voriconazol a 0.12 $\mu\text{g/ml}$