

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTONOR ORREGO
FACULTAD DE MEDICINA HUMANA
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA HUMANA



TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE MÉDICO CIRUJANO
EFFECTO ANTIFÚNGICO IN VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Fragaria*
ananassa* “fresa” SOBRE *Microsporium gypseum

AUTOR

JOSEPHLIN GERALDINE RODRÍGUEZ ZAPATA

ASESORA

Dra. ELVA MANUELA MEJÍA DELGADO

TRUJILLO-PERÚ

2019

JURADO

PRESIDENTE

SECRETARIO

VOCAL

DEDICATORIA

Agradezco a Dios por todas sus bendiciones,
por mantenerme en pie y no dejarme caer.

A mis queridos padres Leonor y Pablo,
mi hermana Nathy, sobrinos Camila y Matías
, Adrián, Sashi por ser mi fortaleza todo este
tiempo y enseñarme a nunca rendirme.

A mi querida tía Melda, abuelito Chago, tía
Rosa que anhelaron verme como Doctora, ya
no estarán físicamente conmigo pero los llevó
siempre en mi mente y corazón.

A mis amigos que siempre me apoyaron en
todo momento.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi asesora Dra. Elvita, docente de nuestra Facultad de Medicina, por su apoyo en todo momento, por la confianza, la paciencia con mi trabajo de investigación.

Agradezco a mis familiares por siempre apoyarme en días grises y cálidos.

RESUMEN

Objetivo: Evaluar el efecto antifúngico in vitro del extracto etanólico de *Fragaria ananassa* (“fresa”) sobre *Microsporum gypseum*.

Método: Se realizó un estudio experimental in vitro, donde se preparó el extracto etanólico de *F. ananassa* (“fresa”) en cuatro concentraciones. Se utilizó el método de Kirby Bauer y de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para evaluar la actividad antifúngica del extracto etanólico de *F. ananassa* sobre *M. gypseum*. Se establecieron 2 grupos: 1 grupo experimental (tratados con extracto etanólico de *F. Ananassa* a las concentraciones de 75%, 50%, 25% y 5%) y 1 grupo control positivo (Fluconazol), se realizaron 13 repeticiones en cada caso.

Resultados: La concentración al 75% tuvo mayor efecto antifúngico con un halo de inhibición de 28,1 mm a diferencia de la concentración al 5% del extracto con un halo de inhibición de 11,2 mm. Se encontró diferencia entre el fluconazol (14,7 mm) y la concentración al 75% del extracto etanólico de *F.ananassa* (28,1 mm).

Se observó un incremento significativo de la absorbancia por espectrofotometría en todas las concentraciones del extracto etanólico de *F. ananassa* al 5%, 25%, 50 % y 75% comparadas con el control positivo tras 48 horas de incubación siendo estadísticamente significativo.

Conclusión: El extracto etanólico de *F. ananassa* (“fresa”) impide el crecimiento in vitro de *M. gypseum*.

PALABRAS CLAVE: *Microsporum gypseum*, *Fragaria ananassa*, extracto etanólico, in vitro.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the in vitro antifungal effect of the ethanolic extract of *Fragaria ananassa* (“strawberry”) on *Microsporum gypseum*.

Method: An in vitro experimental study was conducted, where the ethanolic extract of *F. ananassa* (“strawberry”) was prepared in four concentrations. The method of Kirby Bauer and the minimum inhibitory concentration (MIC) was used to evaluate the antifungal activity of the ethanolic extract of *F. ananassa* on *M. gypseum*. Two groups were established: 1 experimental group (treated with ethanolic extract of *F. Ananassa* at the concentrations of 75%, 50%, 25% and 5%) and 1 positive control group (Fluconazole), 13 repetitions were performed in each case.

Results: The 75% concentration had a greater antifungal effect with an inhibition halo of 28.1 mm as opposed to the 5% concentration of the extract with an inhibition halo of 11.2 mm. A difference was found between fluconazole (14.7 mm) and the 75% concentration of the ethanolic extract of *F. ananassa* (28.1 mm).

A significant increase in absorbance by spectrophotometry was observed in all the concentrations of the 5%, 25%, 50% and 75% ethanolic extract of *F. ananassa* compared to the positive control after 48 hours of incubation being statistically significant.

Conclusion: The ethanolic extract of *F. ananassa* (“strawberry”) prevents the in vitro growth of *M. gypseum*

ÍNDICE

PÁGINAS PRELIMINARES	PÁGINA
JURADO	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
ÍNDICE	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MATERIALES Y MÉTODOS	6
III. RESULTADOS	14
IV. DISCUSIÓN	17
V. CONCLUSIONES	20
VI. RECOMENDACIONES	21
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22
VIII. ANEXOS	27

I. INTRODUCCIÓN

1.1. MARCO TEÓRICO

Microsporum spp. pertenece a la agrupación de dermatofitos, causante de la micosis superficial de la piel, son hongos queratinolíticos filamentosos que se han acondicionado a través de un extenso proceso evolutivo para invadir diversos sustratos queratinosos ¹. Este dermatofito es importante porque compromete la salud pública y la economía, se presenta en formas esporádicas y epidémicas en más de 145 países del mundo ². Perjudica a aproximadamente el 40% de la población en todo el mundo y simboliza el 30% de todas las infecciones micóticas cutáneas ³. Los dermatofitos muchas veces son complicadas de manejar, su terapia es compleja y está asociada con altos costos ⁴. Es por ello, en los últimos años, ha habido una demanda cada vez mayor de tener nuevos compuestos antifúngicos debido al déficit de eficacia, los efectos secundarios y la resistencia asociada con los fármacos existentes ⁵.

Una importante especie de *Microsporum spp.* es el *Microsporum gypseum*, estos son dermatofitos geofílicos, llamados así porque adquieren sus recursos nutricionales en el suelo a partir de pelos, plumas, pezuñas y cuernos de animales⁶. Su prevalencia abarca del 0,2% al 20,9% del total de dermatofitos y su distribución varía con el área geográfica siendo Brasil el país más afectado en el continente Americano⁷⁻⁸. Los pobladores susceptibles son los huéspedes inmunocomprometidos, los niños y ancianos; sin embargo existen factores que predisponen adquirir esta dermatofitosis como son el cambio climático y el desarrollo económico ⁹. Las lesiones causadas por este hongo inducen fuertes reacciones inflamatorias produciendo tiña en cuero cabelludo y cuerpo ¹⁰.

Se sabe que los dermatofitos colonizan la capa externa de la epidermis, que es rica en material queratinoso como la piel, el cabello y las uñas. La adhesión del material infeccioso de los dermatofitos al tejido del huésped queratinizado es el paso principal de iniciación en la infección por dermatofitos. Después de la adhesión, las esporas germinan y acceden en las células del estrato córneo para los sitios de unión y nutrientes fuertes, durante los cuales los dermatofitos producen una variedad de factores de virulencia como la queratinasa, proteasa,

fosfolipasa, lipasa y elastasa, que colaboran en la patogenicidad de los tejidos del huésped¹¹.

Actualmente hay varias técnicas para realizar en forma sistemática la determinación de los hongos. Uno de los métodos en uso clínico es el examen microscópico directo de muestras clínicas extraídas de una lesión, que es un método de diagnóstico rápido. Otro método de diagnóstico son los cultivos in vitro combinados con exámenes microscópicos pero requieren mucho tiempo y pueden llevar hasta 8 semanas obtener los resultados. La lámpara de Wood es otra modalidad común de primer paso utilizada para diagnosticar infecciones de la piel. Este método constituye una aplicación clínica de la luz UV de onda larga que se emite en el rango de 365-400 nm y es comúnmente utilizada por los dermatólogos para diagnosticar diversos trastornos pigmentados e infecciosos¹².

Los tratamientos actuales incluyen medicamentos antimicóticos sintéticos, que pueden dar lugar a reacciones adversas y cepas resistentes¹³. Debido a que los dermatofitos se extienden dentro de las capas superficiales de la piel, son objetivos elegibles las intervenciones tópicas¹⁴. A pesar de la investigación dedicada al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas, hay un número limitado de medicamentos disponibles para tratar estas infecciones por hongos. Sólo cuatro clases de fármacos que interfieren con las vías metabólicas de los hongos se utilizan en la práctica clínica: análogos de fluoropirimidina, polienos, azoles y equinocandinas¹⁵. Es por ello que surge una necesidad imperativa de investigar productos antifúngicos innovadores, naturales, que combinen la seguridad con la eficacia antifúngica contra el patógeno *M. gypseum*.

Plumed Ferrer et al¹⁶, refiere que la fresa es una de las frutas promotoras de la salud que ha llamado la atención por sus probables efectos antimicrobianos sobre patógenos como bacterias, hongos y virus.

La *F. ananassa* es el nombre científico de la fresa y esta se originó en el siglo XVIII en Europa de la hibridación entre dos especies importadas del norte y Sudamérica. La red filogenética muestra su hipótesis novedosa de que *F.*

ananassa se originó como un híbrido entre *Fragaria chiloensis* y *Fragaria virginiana* ¹⁷.

Los humanos han consumido los frutos de la naturaleza especies de *Fragaria* desde hace unos 300 años. La producción de fresas en todo el mundo es alta, con la cantidad anual duplicándose en los últimos 25 años a más de 4,6 millones de toneladas ¹⁸.

La fresa presenta una gran cantidad de compuestos fenólicos con un amplio grupo de metabolitos secundarios, uno o más anillos aromáticos con grados variables de hidroxilación, metoxilación y glicosilación ¹⁹. Las principales categorías de los compuestos fenólicos que se encuentran son ácidos fenólicos, flavonoides, taninos y estilbenos ²⁰⁻²¹. Los polifenoles son importantes componentes para la salud que se encuentran en la fresa. Los antioxidantes que se encuentran en los polifenoles equilibran nuestro sistema inmunitario protegiendo contra los daños oxidativos ²².

Las propiedades antioxidantes de la fresa mejoran la funcionalidad mitocondrial eliminando los radicales libres, inhibe el daño en el ADN y la peroxidación lipídica. Así mismo, su mecanismo antimicrobiano es de gran importancia en tratamientos terapéuticos y este puede incluir en la inhibición de enzimas extracelulares, privación de los sustratos requerido para el crecimiento microbiano ²³.

Jahan ²⁴, en su investigación denominada Determination of Antimicrobial Activity of Some Commercial Fruit (Apple, Papaya, Lemon and Strawberry) against Bacteria Causing Urinary Tract Infection , en el año 2018 ,utilizó extractos etanólicos y metanólicos de la *F. ananassa*(“fresa”), demostrando actividad antifúngica contra cepas fúngicas de *Candida albicans* y *Aspergillus niger* mediante el método de difusión en placa de copa, concluyendo que existe actividad antimicrobiana contra esas dos cepas .

Sarkar et al²⁵, en su investigación denominada Evaluation of nutritive, antioxidant and mineral composition of two newly developed varieties of strawberry (*Fragaria ananassa*) and their antimicrobial activity and brine shrimp toxicity study, en el año 2011, empleó el extracto acuoso de *F.ananassa*,

contra tres patógenos bacterianos *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Salmonella typhi* causantes de enfermedades alimentarias. Se realizó también el método de difusión en disco observando el aumento semejante de halos de inhibición contra *Bacillus subtilis* y *Salmonella typhi*, teniendo resultados adecuados contra estas bacterias.

1.2. JUSTIFICACION

La investigación planteada contribuye a generar nuevo conocimiento sobre el descubrimiento de nuevos tratamientos terapéuticos en base al uso de *F. ananassa* (“fresa”) contra el hongo *M. gypseum*. Este estudio es relevante porque el extracto etanólico de *F. ananassa* presenta efecto inhibitorio contra *M. gypseum*; debido a ello es que se considera esta investigación como una probable opción de tratamiento antimicótico a partir de este producto natural.

1.3. PROBLEMA

¿Tiene efecto antifúngico in vitro el extracto etanólico de *F. ananassa* (“fresa”) sobre el *M. gypseum*?

1.4. HIPÓTESIS

H₁: El extracto etanólico *F. ananassa* (“fresa”) tiene efecto antifúngico in vitro sobre el *M. gypseum*

H₀: El extracto etanólico de *F. ananassa* (“fresa”) no tiene efecto antifúngica in vitro sobre el *M. gypseum*

1.5. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

- Evaluar el efecto antifúngico in vitro del extracto etanólico de *F. ananassa* (“fresa”) sobre *M. gypseum*.

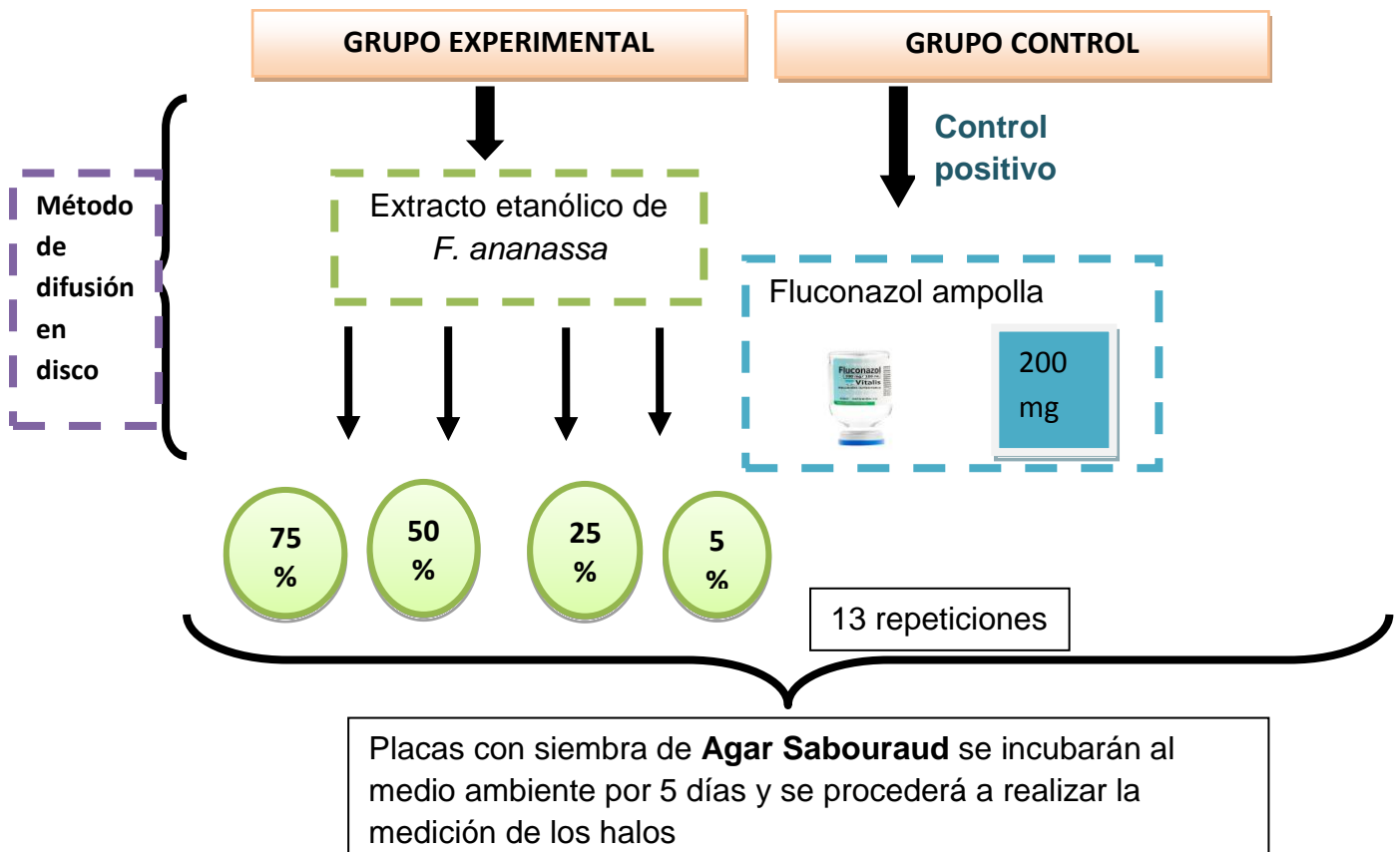
OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar la susceptibilidad in vitro del *M. gypseum* frente al extracto etanólico de *F. ananassa* (“fresa”) a las concentraciones de 5%, 25%, 50% y 75%.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico de *F. ananassa* (“fresa”) a las concentraciones de 5 %, 25%, 50% y 75% sobre *M. gypseum*.
- Comparar el efecto antifúngico in vitro del extracto etanólico de *F. ananassa* con el control fluconazol.

II. MATERIALES Y METODOS

2.1 DISEÑO DEL ESTUDIO ²⁶:

- ✓ Según la interferencia del investigador en el fenómeno que se analiza:
Experimental.



CMI

Extracto etanólico
de *Fragaria*
Ananassa: 0,8mL



Caldo
Sabouraud
: 0,2mL

5 % 25% 50% 75% Fluconazol Inóculo

Más 10 uL del inóculo *Microsporium gypseum*

Se incubará al medio ambiente por 48 horas y
posteriormente se leerá en el espectrofotómetro

2.2 POBLACIÓN MUESTRA Y MUESTREO:

- **Población de estudio.** - Constituida por *Microsporium gypseum* ATCC24102 fue adquirido del laboratorio Microbiologics donde fue conservado.
- **Muestra y muestreo:**
 - **UNIDAD DE ANÁLISIS**

La unidad de análisis estuvo compuesta por cada placa petri que contenía el agar Saboraud con *M. gypseum* a temperatura ambiente por 5 días.

- **UNIDAD DE MUESTREO**

La unidad de muestreo estuvo constituida por las colonias de *M. gypseum*.

- **Fórmula para hallar el número de repeticiones:**

Para establecer el tamaño de muestra se empleó la fórmula para comparación de grupos:

$$N = \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 2 S^2}{(X_1 - X_2)^2}$$

Donde:

$$Z_{\alpha/2} = 1,96 \text{ para una } \alpha = 0,05$$

$$Z_{\beta} = 0,84 \text{ para una } \beta = 0,20$$

$S = 0.9 (X_1 - X_2)$ valor adjudicado por no haber estudios similares

Reemplazando:

$$N = \frac{(1,96 + 0.84)^2 2 \times 0.9 (X_1 - X_2)^2}{(X_1 - X_2)^2} = \mathbf{13 \text{ repeticiones}}$$

Luego, la muestra estuvo conformada por 13 repeticiones para cada grupo.

- **CRITERIO DE EXCLUSIÓN:**

Dentro de la ejecución se excluyeron los cultivos donde hubo contaminación con otros hongos o dermatofitos.

2.3 VARIABLES Y OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Variable Independiente: Extracto etanólico de *Fragaria ananassa* (“fresa”)

Variable Dependiente: Efecto antifúngico in vitro.

VARIABLE	TIPO DE VARIABLE	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADOR	NIVEL DE MEDICIÓN	UNIDAD DE MEDIDA
Extracto etanólico de la <i>F. ananassa</i> (“fresa”) (Variable independiente)	Variable cuantitativa	Sustancia natural con efecto antifúngico sobre <i>M. gypseum</i> obtenido por maceración en contacto con etanol.	Concentración utilizada de extracto de fresa sobre cultivos de <i>Microsporum gypseum</i>	Discreta	Porcentaje 75% 50% 25% 5%
Efecto antifúngico in vitro (Variable dependiente)	Variable cualitativa	Capacidad para evitar la formación de esporas, en condiciones experimentales	-Halo de inhibición -Concentración inhibitoria mínima	Ordinal De razón	-Milímetros de diámetro - Absorbancia 0.1 a 0.8.

-Extracto etanólico de la *F. ananassa* (“fresa”).- Sustancia con aroma característico, conseguido por maceración en contacto con etanol²⁷.

-Efecto antifúngico in vitro. - Es la interferencia del crecimiento y capacidad para inhibir la formación de esporas, en condiciones experimentales ²⁸.

2.4PROCEDIMIENTO

Obtención de la muestra. -Se compró 1 Kg de frutos de fresa en el “Mercado Mayorista” (distrito de Trujillo, Región la Libertad).

Las fresas compradas se transportaron al laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo.

Se utilizó una balanza para pesar las fresas seleccionando 850 gr de este fruto.

Las fresas se lavaron con agua destilada estéril seguido de una desinfección, empleando hipoclorito de sodio al 0.5%. Después, se realizó otro lavado con agua estéril con el fin de apartar los residuos de hipoclorito.

Luego se procedió a mezclar en una licuadora 850 g de fresas más 850 mL de etanol al 96 % durante cinco minutos. Posteriormente, se maceró con etanol en un frasco de vidrio ámbar guardándose a temperatura ambiente en oscuridad durante 7 días, se agitó el frasco cada día por 5 minutos para ayudar a la extracción.

Completado el tiempo de maceración, se filtró el líquido mediante una bomba de vacío, con papel de filtro Whatman N°1. A lo que se obtuvo se le denominó extracto etanólico.

El extracto etanólico se concentró en un rotavapor (Heidolph WB 2000) a presión reducida y temperatura controlada, no mayor a 40 °C. Al finalizar, se realizó el secado en estufa a 40 °C. Al producto resultante se le denominó extracto seco.

Las cuatro concentraciones del extracto etanólico al 5%, 25%, 50 % y 75 % se colocaron en viales ámbar de 10 ml, las cuales fueron almacenadas a 4 °C ²⁹.

(Anexo 01)

Reactivación de *M. gypseum*:

La reactivación de *Microsporium gypseum* ATCC24102 se realizó utilizando el Agar Sabouraud (compuesto de agar 2%, peptona 1%, sacarosa 4% y agua 100cc) de 100 ml comprado en DIALAB, incubándolo a temperatura ambiente durante cinco días hasta la observación de sus colonias.

Preparación del inóculo. - Se añadió al cultivo de *M. gypseum* 20 ml de NaCl 0.9%, se dejó actuar por 20 minutos y posteriormente se separaron las colonias completas y se colocaron en un matraz estéril, para luego agitar con el objetivo de desprender las esporas. Se colocaron las esporas en un balón estéril de 100ml y se procedió a realizar el cálculo de estas mediante la cámara de Neubauer en microscopio a 40x de aumento. Se preparó una dilución de 18,000 e/ml con caldo glucosado estéril.³⁰

Procedimiento:

Siembra de las placas con Agar Sabouraud.- Se agregó en cada placa Petri, 20 ml del medio Sabouraud. Luego, mediante una micro pipeta se tomó 100ul del inóculo y se procedió al sembrado de las placas en toda la superficie del agar con la ayuda de un hisopo estéril ³¹.

Preparación de discos de sensibilidad con extracto de *F. ananassa*.-Se utilizó papel filtro nº1 de whatman para obtener discos de sensibilidad, para lo cual, se perforó el papel de filtro y posteriormente se esterilizaron los discos en el horno por 30 minutos a 180°C.

Usando una micropipeta, se colocó 8 uL de cada dilución de extracto etanólico y del fluconazol a cada disco de sensibilidad.

Luego, con una pinza estéril se colocaron los discos sobre la superficie de las placas con agar Sabouraud recién sembradas.

Las placas se mantuvieron a una temperatura ambiente (25°C aproximadamente), por un tiempo de 5 días; pasado este tiempo se midió el diámetro del halo de inhibición con una regla de vernier ³². **(Anexo 02)**

Concentración mínima inhibitoria. -

Se utilizó 100 ml de caldo Sabouraud, colocando en los tubos de ensayo de 13x100mm, 0. 2ml de este medio de cultivo en cada tubo y agregando 0.8 ml de extracto etanólico de *Fragaria ananassa* al 75%, 50%, 25% y 5% respectivamente. A cada tubo se le adicionó 10ul/ml del inóculo con esporas de *Microsporium gypseum*. ³³⁻³⁴.

Transcurrido ese tiempo, se midió la concentración mínima inhibitoria de cada tubo después de 48 horas de incubación empleando el espectrofotómetro con una longitud de onda de 350 nm, se utilizaron microtubos con BHI estéril como blanco³⁵. **(Anexo 03)**

2.5 PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos recolectados se ingresaron a una matriz de datos en el Microsoft Excel 2016, luego importados al Paquete Estadístico IBM SPSS STATISTICS 25 para su respectivo procesamiento. Para estudiar la información se construyeron tablas de frecuencia de una entrada con sus valores absolutos, promedios, desviación estándar y gráficos.

Para determinar el efecto antifúngico in vitro del extracto etanólico de la *F. ananassa* se aplicó un análisis de varianza de un diseño completamente al azar. Luego, se empleó una prueba de comparaciones múltiples, aplicando la prueba de Duncan. Ambas pruebas con un nivel de significancia del 5 %.

2.6 CONSIDERACIONES ETICAS

Al realizar esta investigación se tuvo en cuenta lo estipulado en el artículo 96 de la Ley General de Salud; se tomó las medidas y precauciones necesarias para prevenir daños en nuestra salud o al medio ambiente; asimismo se tuvo presente el tema de la higiene y seguridad con nuestros equipos, materiales y todo lo relacionado con nuestras actividades en los ambientes de trabajo, según el artículo 100, 101 y 102 ³⁶.

III. RESULTADOS

-Tabla 01

Efecto antifúngico in vitro del extracto etanólico de *Fragaria Ananassa* sobre *Microsporium gypseum*. UPAO, Trujillo - 2019

Grupo de tratamiento	n	Promedio	Desv. Estándar	
75%	13	28.1 mm	2.87	
50%	13	22.5 mm	2.50	
25%	13	18.2 mm	1.48	P
5%	13	11.2 mm	2.30	0.0000
Fluconazol	13	14.7 mm	1.25	

Datos obtenidos por el investigador. **(Anexo 04)**

En la tabla 01, se determinó la sensibilidad de *M.gypseum* frente al extracto etanólico de *F.ananassa* en todas sus concentraciones al 5%, 25%, 50 % y 75%, siendo el de mejor efecto de inhibición la concentración al 75% y el menor efecto inhibitorio fue la concentración al 5%, evaluada según la escala de Duraffourd.

-Tabla 02

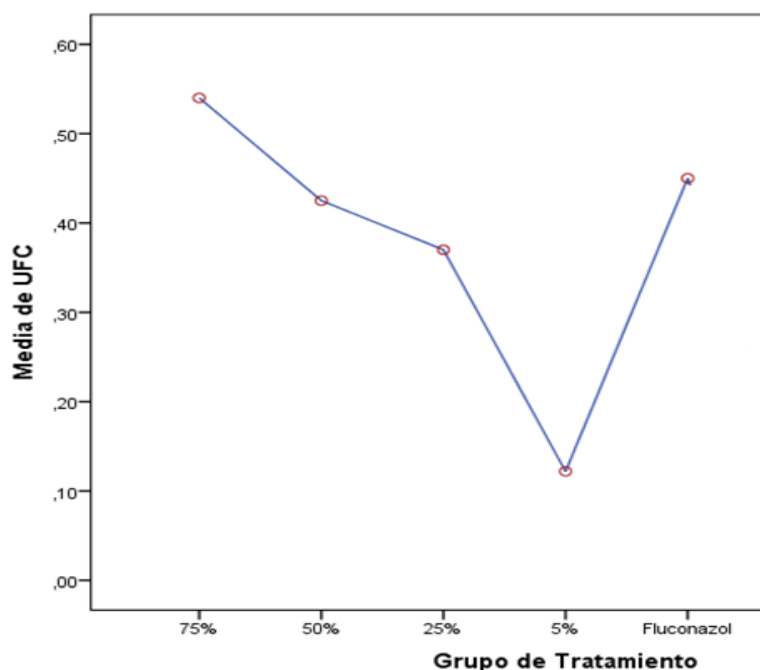
Concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico de *F. Ananassa* sobre *M. gypseum*. UPAO, Trujillo - 2019

Grupo de tratamiento	n	Promedio	Desv. Estándar	
75%	13	0.540 A	0.0021	
50%	13	0.425 A	0.0018	
25%	13	0.370 A	0.0026	
5%	13	0.122 A	0.0016	
Fluconazol	13	0.450 A	0.0018	
Blanco	13	0.044 A	0.0023	
				P
				0.0000

Datos obtenidos por el investigador. **(Anexo 05)**

En la tabla 02, se determinó la medición de absorbancia por espectrofotometría en todas las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *F. ananassa* inoculados con *M. gypseum*, observando a las 48 horas de incubación que la concentración al 75% presentó mayor absorbancia (0,540 A) es decir presentó menor concentración del hongo a comparación de la lectura inicial del blanco que tuvo un promedio de absorbancia de 0,044 A es decir mayor concentración del hongo. La CIM fue al 25%.

- **Gráfico 01:**



Fuente: Datos obtenidos por el investigador. **(Anexo 06)**

En el gráfico 01, se observa que el efecto antifúngico in vitro del fluconazol fue menor que la concentración al 75% (0,540 A) del extracto etanólico de *F. ananassa* alcanzando un nivel de absorbancia de 0,450 A; es decir la concentración al 75 % presenta mayor absorbancia por lo tanto menor concentración del hongo.

IV. DISCUSIÓN

La presente investigación demostró el efecto antifúngico del extracto etanólico de *F. ananassa* sobre *M. gypseum* en sus concentraciones 25%, 50% y 75% ya que el diámetro de los halos de inhibición (18,2; 22, 5 mm; 28,1 mm respectivamente) mediante la técnica de Kirby Bauer se ubicaron dentro del rango de sensibilidad en la escala de Duraffourd. Estadísticamente se hallaron diferencias, esto concuerda con los resultados obtenidos por Widyarmar et al ³⁷ (2017) haciendo uso de la misma técnica de Kirby, utilizó cinco concentraciones de extractos de *F. ananassa* “fresa” (100%, 50%, 25%, 12,5% y 6,25 %) contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, donde el mayor efecto inhibitorio fue la concentración al 100%; similar a nuestro estudio donde la concentración al 75% tuvo mayor efecto inhibitorio por lo tanto en ambos casos las concentraciones mayores tuvieron mayor efecto , como se observa en la tabla 1.

En nuestros resultados obtenidos en la tabla 1 se observó el efecto antifúngico de *F. ananassa* sobre *M. gypseum* en sus concentraciones al 25%, 50 % y 75% , esto contrasta con los resultados obtenidos por Seleshe et al ³⁸(2017) quienes realizaron una investigación en Corea sobre el extracto etanólico de tres tipos de fresas *Robus corchorifolius* , *Rubus parvifolius* y *Duchesnea chrysantha* contra *Aspergillus niger* y *Candida albicans* , empleando el método de difusión en disco al igual que en nuestro presente estudio, sin embargo se demostró que no hubo inhibición contra esos hongos. La diferencia de los hallazgos pueden deberse a las condiciones ecológicas del lugar de procedencia de los frutos que los autores estudiaron ya que lo obtuvieron de Corea cuyas diferencias climatológicas son diferentes al de nuestro país. Esto lo puede explicar la investigación de Qiao³⁹ et al (2016) en la zona Norte de China, donde el impacto del cambio climático alteró los componentes bioactivos de sus cultivos; por otro lado Bartl⁴⁰ et al (2012) quienes realizaron una investigación en Perú, donde la fresa fue cultivada sin ningún tipo de protección, con buenos resultados.

En esta investigación se preparó el extracto etanólico de *F. ananassa* utilizando como solvente al etanol obteniendo efecto antifúngico sobre *M. gypseum*, esto contrasta con el procedimiento que realizó Asgarpanah et al ⁴¹(2015) quienes utilizaron los extractos crudos y subfraccionados de cuatro plantas medicinales *Phlomis olivieri*, *Verbascum speciosum*, *Sambucus ebulus* and *Erigeron hyrcanicus* donde el solvente de acetato de etilo presentó también efecto antifúngico contra *M. gypseum*. Estos resultados comprueban que ambos solventes utilizados son adecuados para que se obtengan los principios activos de estos productos naturales demostrando que el extracto etanólico de *F. ananassa* presenta efecto inhibitorio tal como postuló Giampieri et al ⁴²(2012) donde la capacidad antimicrobiana de la fresa está relacionada con los compuestos fenólicos siendo el pelargonidin-3-glucósido su componente más importante.

En los resultados obtenidos en la tabla 2 de este trabajo de investigación, la concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico de *F. ananassa* utilizando el método EUCAST en el espectrofotómetro fue al 25%, además se identifico que la concentración al 75 % del extracto presentó mayor absorbancia que el fluconazol significando menor entrada de luz, menor concentración del hongo. Este procedimiento contrasta con lo establecido por Santos ⁴³ et al (2007) quienes emplearon el método CLSI afirmando que no existen puntos de cortes para determinando la resistencia de los dermatofitos al fluconazol, sólo se sospecha de resistencia cuando la concentración mínima inhibitoria es mayor o igual a 64 ug/ml según el rango establecido para *Cándida spp.* y *Aspergillus spp.* empleando la lectura visual. Estas diferencias entre los métodos utilizados EUCAST y CLSI para determinar la CMI utilizando la lectura espectrofotométrica y la lectura visual, respectivamente, es de relevancia en nuestro estudio ya que la lectura espectrofotométrica presenta una medición más objetiva.

En los resultados obtenidos en el gráfico 1, respecto a la sensibilidad del antifúngico este estudio demostró que *M. gypseum* fue sensible al fluconazol, esto contrasta con los resultados obtenidos por Chau et al ⁴⁴ (2019), donde los hongos *Microsporum*, *Epidermophyton* y *Trichophyton* tuvieron resistencia al fluconazol en 92,9%,100%,100%, respectivamente. Estas diferencias entre

ambos estudios se debería según Cervelatti ⁴⁵(2006) a la resistencia microbiológica que existe debido a la presencia de mutaciones en los propios patógenos como es el caso de *Trichophyton rubrum* donde su gen TruMDR1 fue clonado sobreexpresándose en presencia de varios antifúngicos como el fluconazol conduciendo al fracaso del tratamiento farmacológico, Sin embargo, aún no existen estudios donde realicen el análisis genómico de *Microsporum gypseum* siendo importante realizarlo para comprender su mecanismo de resistencia.

V. CONCLUSIONES

- El extracto etanólico de *F. ananassa* (“fresa”) tiene efecto antifúngico in vitro sobre *M. gypseum*.
- La concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico de *F. ananassa* fue al 25%.
- La concentración del extracto etanólico de *F. ananassa* al 75% presentó mayor efecto antifúngico que el fluconazol.

VI. RECOMENDACIONES

- Se recomendaría el uso del extracto etanólico de *F.ananassa* para un estudio in vivo en el que se compruebe su eficacia para el tratamiento de micosis causadas por *M. gypseum* , a fin de tener una medida terapéutica alternativa a los fármacos actualmente usados ante las micosis causadas por este hongo.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cugnani H, Sharma S, Wright K. A preliminary study on the occurrence of keratinophilic fungi in soils of Jamaica. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 2014 ;56(3):231-234.
2. Murmu S, Debnath C, Pramanik K, Mitra T, Jana S, Dey S, et al. Detection and characterization of zoonotic dermatophytes from dogs and cats in and around Kolkata. *Veterinary World* 2015; 8(9) :1078-1082.
3. Sigurgeirsson B, Baran R. The prevalence of onychomycosis in the global population- a literature study. *Jeadv* 2014; 28: 1480–1491.
4. Romagnoli C, Baldisserotto A, Malisardi G, Vicentini C, Mares D, Andreotti E, et al. A multi-target approach toward the development of novel candidates for antidermatophytic activity: ultrastructural evidence on α -bisabolol-treated *Microsporum gypseum*. *Molecules* 2015; 20: 11765-11776.
5. Zeng H, Chen X, Liang J. In vitro antifungal activity and mechanism of essential oil from fennel (*Foeniculum vulgare* L.) on dermatophyte species. *Journal of Medical Microbiology* 2015 ;64: 93–103.
6. Molina A. Aspectos clínicos, diagnósticos y terapéuticos de las dermatofitosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011; 29(3):33-39.
7. Kallel A, Hdidier A, Fakhfakh N, et al. Teignes du cuir chevelu: principale mycose de l'enfant. Étude épidémiologique sur 10 ans à Tunis. *J Mycol Med* 2017; 27(3):345-50.
8. Heidrich D, Rocha M, Ottonelli C, Massotti C, Daboit T, Vetoratt G, et al. Dermatophytosis: a 16- year retrospective study in a metropolitan area in southern Brazil. *J infect Dev Ctries* 2015;9(8):865-871.
9. Sei Y. 2011 Encuesta epidemiológica de dermatomicosis en Japón. *Med Mycol J.* 2015; 56 (4): 129 – 135.
10. Romagnoli C, Baldisserotto A, Vicentini C, Mares D, Andreotti E, Vrtuani S, et al. Antidermatophytic action of resorcinol derivatives: ultrastructural

- evidence of the activity of phenylethyl resorcinol against *Microsporium gypseum*. *Molecules* 2016; 21: 1306.
11. Chinnapun D. Virulence factors involved in pathogenicity of dermatophytes. *Walailak J Sci & Tech* 2015; 12(7): 573-580.
 12. Ye F, Li M, Zhu S, Zhao Q, Zhong J. Diagnosis of dermatophytosis using single fungus endogenous fluorescence spectrometry. *Biomedical optics express* 2018; 9(6):1-10.
 13. Khurana A, Sardana K, Chowdhary A. Antifungal resistance in dermatophytes: recent trends and therapeutic implications. *Fungal Genetics and Biology* 2019; 132: 1-29.
 14. Ghannoum M. Azole resistance in dermatophytes: Prevalence and mechanism of action. *J Am Acad Dermatol* 2015; 72(5) :133-138.
 15. Friedman D, Schwartz I. Emerging Fungal Infections: New Patients, New Patterns, and New Pathogens. *J. Fungi* 2019;(5) 67: 2-19.
 16. Plumed C, Vakevainen K, Komulainen H, Rautiainen M, Smeds A, Raitanen J, et al. The antimicrobial effects of wood-associated polyphenols on food pathogens and spoilage organisms. *International journal of food microbiology* 2013; 164: 99–107.
 17. Ljevar A, Curko N, Tomasevic M, Radosevic K, Srcek V, Ganic K. Phenolic composition, antioxidant capacity and in vitro cytotoxicity assessment of fruit wines. *Food Technol. Biotechnol.* 2016 ;54 (2) 145–155.
 18. Letowska A, Kucharska A, Winska K, Szumny A, Olszanska A, Mizgier P, et al. Composition and antioxidant activity of red fruit liqueurs. *Food Chemistry* 2014;157: 533–539.
 19. Maksimovic J, Poledica M, Mutavdzic D, Mojovic M, Radivojevic D, Milivojevic J. Variation in nutritional quality and chemical composition of fresh strawberry fruit: combined effect of cultivar and storage. *Plant foods hum nutr* 2015; 12-16.
 20. Manganaris G, Goulas V, Vicente A, Terry L. Berry antioxidants: small fruits providing large benefits. *J Sci Food Agric* 2014; 94: 825–833.
 21. Souza V, Pereira P, Da Silva T, Oliveira L, Pio R, Queiroz F. Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. *Food Chemistry* 2014; 156: 362–368.

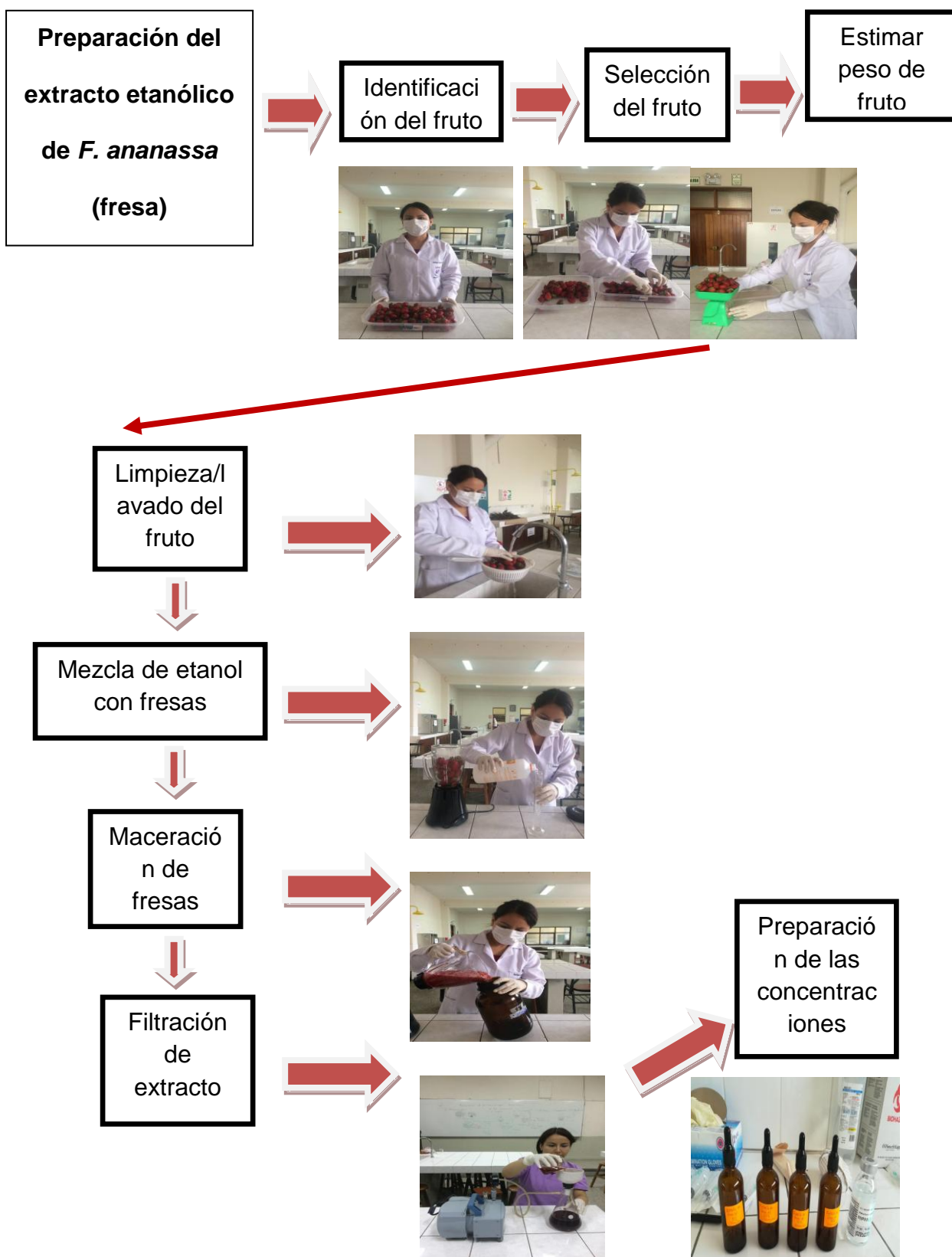
22. Amatori S, Mazzoni L, Suarez J, Giampieri F, Gasparrini M, Hernandez T, et al. Polyphenol-rich strawberry extract (PRSE) shows in vitro and in vivo biological activity against invasive breast cancer cells. *Scientific reports* 2016, 1-13.
23. Afrin S, Gasparrini M, Hernandez T, Rodriguez P, Mezzetti B, López A, et al. Promising Health Benefits of the Strawberry: A Focus on Clinical Studies. *J. Agric. Food Chem.* 2016; 64: 4435–4449.
24. Jahan S, Siddique R. Determination of antimicrobial activity of some commercial fruit (apple, papaya, lemon and strawberry) against bacteria causing urinary tract infection. *European Journal of Microbiology and Immunology* 2018; 8(3) : 95–99.
25. Sarkar S, Sen U, Dhar M, Absar N, Islam K. Evaluation of nutritive, antioxidant and mineral composition of two newly developed varieties of strawberry (*Fragaria ananassa*) and their antimicrobial activity and brine shrimp toxicity study. *Asian Journal of agricultural research* 2011; 5(6): 283-291.
26. Cruz Z, Gonzalez M, Novales M, Keever V. Experimental studies. Research designs for the evaluation of interventions in clinical settings. *Rev alerg mex* 2018; 65 (2) : 178-186.
27. Gonzales AA. Obtención de aceites esenciales y extractos etanólico de plantas del Amazonas. Universidad nacional de Colombia. 2004; 1-100
28. Khan S, Imran M, Imran M, Pindari N. Antimicrobial activity of various ethanolic plant extracts against pathogenic multi drug resistant *Candida* spp. *Bioinformation* 2017; 13(3): 67–72.
29. Avendaño G, Acevedo B. Microencapsulation process of natural dye from strawberry (*Fragaria vesca*). *Avances investigación en Ingeniería* 2014; 11(1):1794-4953.
30. EUCAST definitive document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MIC of antifungal agents for fermentative yeasts. *Clin Microbiol Infect.* 2008; 14:398-405.
31. Matuschek E, Brown D, Kahlmeter G. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and infection* 2014; 20 (4): 256- 266.

32. Sharma H, Yunus G, Mohapatra A, Kulshrestha R, Agrawal R, Kalra M. Antimicrobial efficacy of three medicinal plants *Glycyrrhiza glabra*, *Ficus religiosa*, and *Plantago major* on inhibiting primary plaque colonizers and periodontal pathogens: An in vitro study. *Indian J Dent Res* 2016 Mar-Apr; 27(2): 200 - 4.
33. Koneman E., Allen S, Dowell V, Janda W, Sommers H, Winn W. *Diagnóstico Microbiológico*. 6ta ed. Buenos Aires: Médica Panamericana S.A ; 2016.
34. Arendrup M, Cuenca M, Meletiadis J, Mouton W, Lagrou K, Howard S. Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts. *Eucast antifungal MIC method for yeasts* 2015; 7(3): 1-21.
35. Nilapwar S, Nardelli M, Westerhoof H, Verma M. *Methods in Enzymology Absorption Spectroscopy* 2011, 500: 59-75.
36. Ley General de Salud. N° 29889. Concordancias: D.S.N° 033-2015-SA. Perú: 06 octubre de 2015.
37. Widyarman A, Widjaja S, Idrus E. Strawberry Extract's Effects on *Enterococcus faecalis* and *Porphyromonas gingivalis* Biofilms in vitro. *Scientific dental Journal* 2017: 01-05.
38. Seleshe S, Lee J, Lee S, Lee H, Kim G, Yeo J, et al. Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Ethanol Extracts of Three Kinds of Strawberries. *Prev. Nutr. Food Sci.* 2017; 22(3): 203-210.
39. Qiao J, Yu D, Wu J. How do climatic and management factors affect agricultural ecosystem services? A case study in the agro-pastoral transitional zone of northern China. *Science of the Total Environment* 2018; 314–323.
40. Bartl K, Verones F, Hellweg S. Life Cycle Assessment Based Evaluation of Regional Impacts from Agricultural Production at the Peruvian Coast. *Environmental science & Technology* 2012; 46: 9872–9880.
41. Asgarpanah J, Hashemi S, Hashemi E, Askari K. In Vitro Antifungal Activity of Some Traditional Persian Medicinal Plants on Pathogenic Fungi. *Chin J Integr Med* 2015; 1-5.

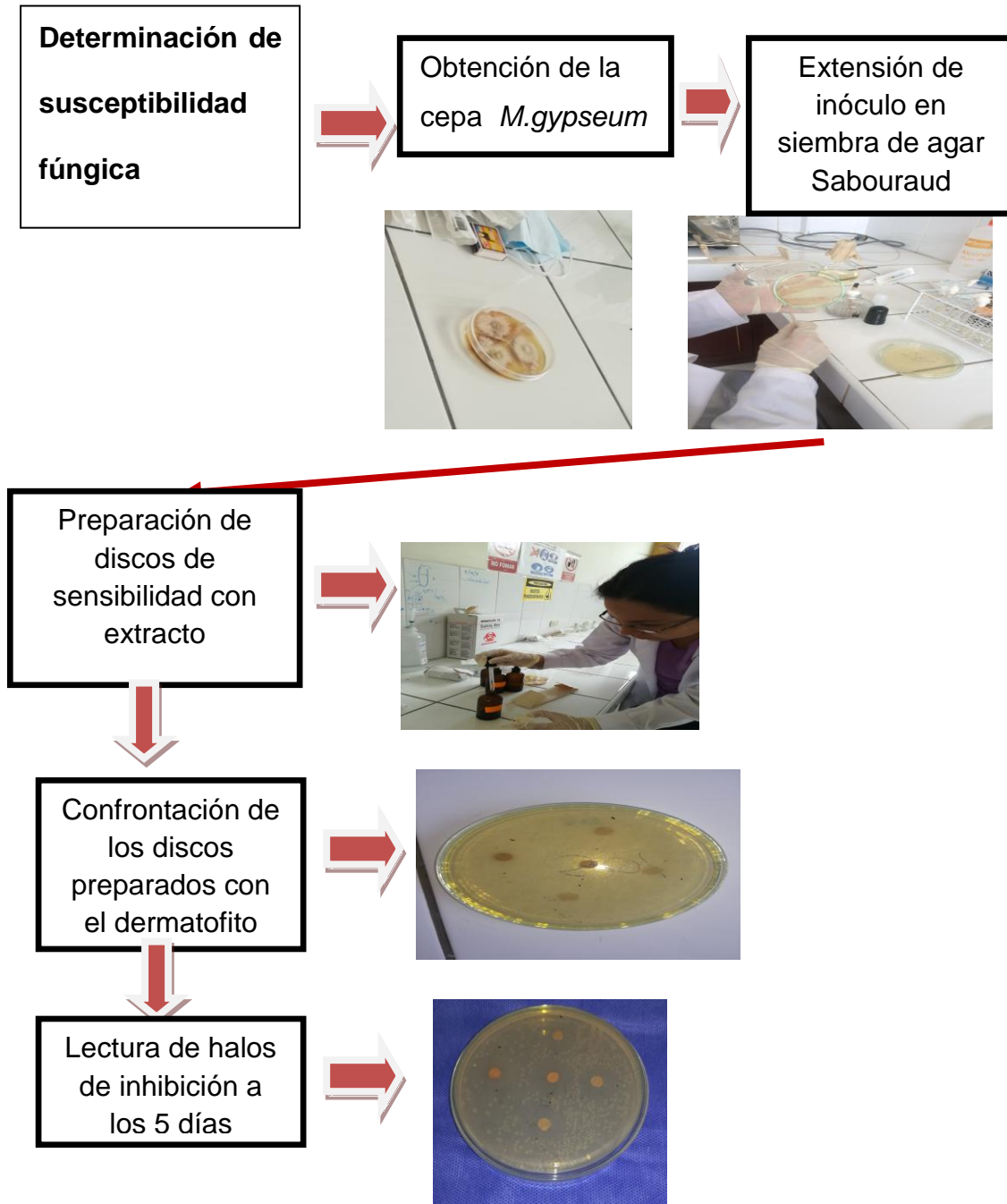
42. Giampieri F, Tulipani S, Alvarez-Suarez M, Quiles L, Mezzetti B, Battino M. The strawberry: composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition*. 2012, 28, 9-19. .
43. Santos D., Hamdan J. In vitro activities of four antifungal drugs against *Trichophyton rubrum* isolates exhibiting resistance to fluconazole. *Mycoses* 2007, 50: 286–289.
44. Chau T, Thi K, Nguyen T, Tran K, Gandolfi M, Satolli F, et al. Antifungal susceptibility of dermatophytes isolated from cutaneous fungal infections: the Vietnamese experience. *Open Access Maced J Med Sci*. 2019; 7(2): 247–249.
45. Cervelatti E, Fachin A, NOZAWA F, Rossi M. Molecular cloning and characterization of a novel ABC transporter gene in the human pathogen *Trichophyton rubrum*. *Med Mycol* 2006; 44: 141-147.

ANEXOS

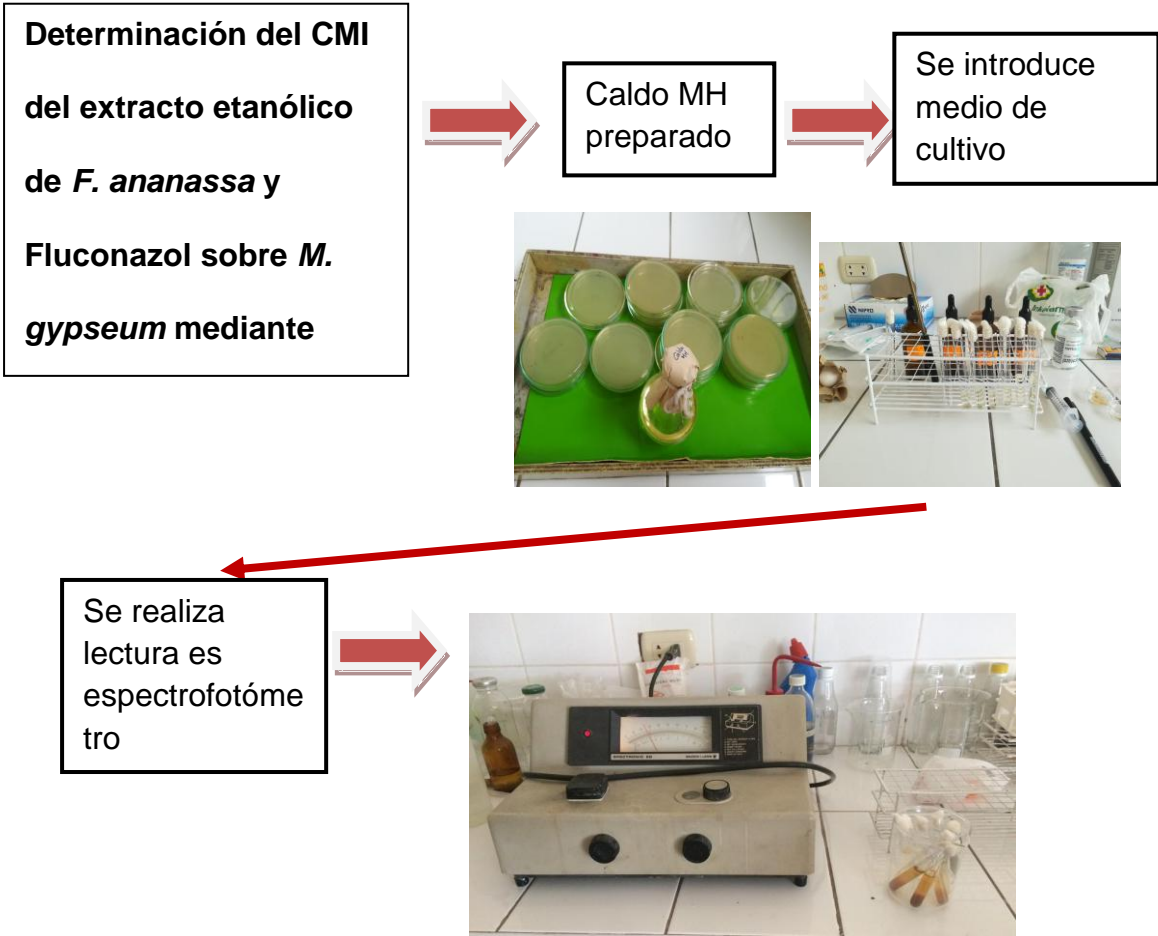
Anexo N°01



Anexo N°02:



Anexo n°03



Anexo n°04

Hoja de recolección de datos

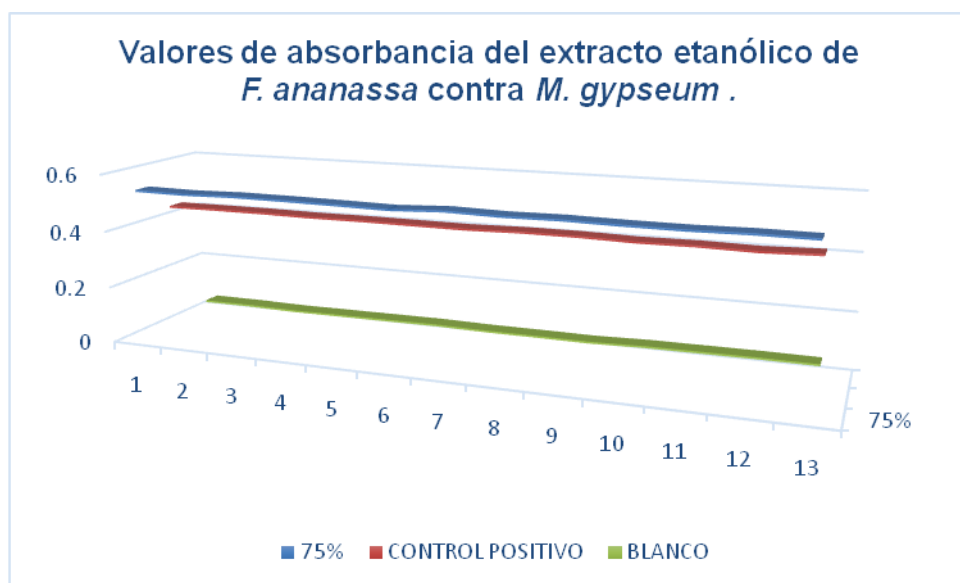
Número de repeticiones	Concentración del extracto etanólico de <i>F.ananassa</i> Halos de inhibición expresada en (mm) para evaluar susceptibilidad fúngica				
	75%	50%	25%	5%	Fluconazol
01	29 mm	25 mm	18 mm	13 mm	14 mm
02	28 mm	24 mm	16 mm	14 mm	14 mm
03	28 mm	24 mm	18 mm	12 mm	16 mm
04	25 mm	24 mm	19 mm	11 mm	13 mm
05	34 mm	24mm	20 mm	13 mm	14 mm
06	31 mm	24 mm	20 mm	16 mm	16 mm
07	30 mm	25 mm	18 mm	10 mm	15 mm
08	31 mm	23 mm	20 mm	9 mm	16 mm
09	28 mm	23 mm	16 mm	9 mm	17 mm
10	26 mm	20 mm	18 mm	11 mm	14 mm
11	25 mm	19 mm	17 mm	9 mm	14 mm
12	25 mm	19 mm	17 mm	9 mm	13 mm
13	25 mm	18 mm	20 mm	9 mm	15 mm
MEDIA	28,1 mm	22,5 mm	18,2 mm	11,2 mm	14,7 mm

Anexo n°05

Hoja de recolección de datos

Número de repeticiones	Valores de absorbancia del extracto etanólico de <i>F. ananassa</i> contra <i>M. gypseum</i>					
	75%	50%	25%	5%	Fluconazol	Blanco
01	0,540A	0,425A	0,370A	0,122A	0,450A	0,045A
02	0,538A	0,423A	0,371A	0,120A	0,451A	0,045A
03	0,542A	0,427A	0,369A	0,124A	0,451A	0,042A
04	0,541A	0,424A	0,370A	0,122A	0,449A	0,043A
05	0,539A	0,426A	0,367A	0,121A	0,450A	0,044A
06	0,536A	0,425A	0,373A	0,123A	0,449A	0,045A
07	0,544A	0,422A	0,368A	0,125A	0,448A	0,042A
08	0,540A	0,428A	0,372A	0,119A	0,452A	0,042A
09	0,542A	0,425A	0,370A	0,121A	0,452A	0,041A
10	0,539A	0,424A	0,365A	0,121A	0,448A	0,046A
11	0,538A	0,426A	0,375A	0,123A	0,450A	0,047A
12	0,541A	0,427A	0,369A	0,123A	0,447A	0,048A
13	0,540A	0,423A	0,371A	0,122A	0,453A	0,047A
MEDIA	0,540 A	0,425A	0,370A	0,122A	0,450A	0.045A

Anexo n°06



La absorbancia de la concentración al 75 % de *F. ananassa* presenta diferencia significativa con el resultado del fluconazol.