



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**“EFECTO ANTIMICÓTICO IN VITRO DEL EXTRACTO
ETANÓLICO DE *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC
(CENTELLA) FRENTE A CEPAS DE *Candida albicans*
ATCC 10231”**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO
FARMACÉUTICO

AUTORES:

GUTIERREZ PUJAICO, LIZZET

<https://orcid.org/0009-0007-5039-836X>

TORRES OCHOA, ELMER ALEJANDRO

<https://orcid.org/0009-0003-7729-3729>

ASESOR:

M.Sc. HUALPA CUTIPA, EDWIN

<https://orcid.org/0000-0002-7999-6917>

LIMA – PERÚ

2023

DECLARACIÓN JURADA DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD

Yo, Lizzet Gutierrez Pujaico, con DNI **46528287** en mi condición de autor(a) de la tesis/ trabajo de investigación/ trabajo académico) presentada para optar el presentada para optar el TITULO PROFESIONAL de Químico Farmacéutico (grado o título profesional que corresponda) de título “**EFECTO ANTIMICÓTICO IN VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC (CENTELLA) FRENTE A CEPAS DE *Candida albicans* ATCC 10231**”, AUTORIZO a la Universidad María Auxiliadora (UMA) para publicar de manera indefinida en el repositorio institucional, el archivo digital que estoy entregando, en cumplimiento a la Ley N°30035 que regula el Repositorio Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación de acceso abierto y su respectivo Reglamento.

Indicar que dicho documento es **ORIGINAL** con un porcentaje de similitud 13% y, que se han respetado los derechos de autor en la elaboración del mismo. Además, recalcar que se está entregado la versión final del documento sustentado y aprobado por el jurado evaluador.

Conforme a lo indicado firmo el presente documento dando conformidad a lo expuesto.

Lima, 01 de marzo de 2024.



Lizzet Gutierrez Pujaico

Firma del autor:



Hualpa Cutipa Edwin

Firma del Asesor:

1. Apellidos y Nombres
2. DNI
3. Grado o título profesional
4. Título del trabajo de Investigación
5. Porcentaje de similitud

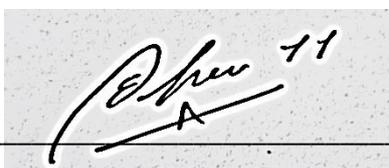
DECLARACIÓN JURADA DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD

Yo, Elmer Alejandro Torres Ochoa, con DNI **71483819** en mi condición de autor(a) de la tesis/ trabajo de investigación/ trabajo académico) presentada para optar el presentada para optar el TITULO PROFESIONAL de **QUÍMICO FARMACEUTICO** (grado o título profesional que corresponda) de título **“EFECTO ANTIMICÓTICO *IN VITRO* DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC (CENTELLA) FRENTE A CEPAS DE *Candida albicans* ATCC 10231”,** AUTORIZO a la Universidad María Auxiliadora (UMA) para publicar de manera indefinida en el repositorio institucional, el archivo digital que estoy entregando, en cumplimiento a la Ley N°30035 que regula el Repositorio Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación de acceso abierto y su respectivo Reglamento.

Indicar que dicho documento es **ORIGINAL** con un porcentaje de similitud 13% y, que se han respetado los derechos de autor en la elaboración del mismo. Además, recalcar que se está entregado la versión final del documento sustentado y aprobado por el jurado evaluador.

Conforme a lo indicado firmo el presente documento dando conformidad a lo expuesto.

Lima, 01, de Marzo de 2024.



Elmer Alejandro Torres Ochoa
Firma del autor:



Hualpa Cutipa, Edwin
Firma del Asesor:

1. Apellidos y Nombres
2. DNI
3. Grado o título profesional
4. Título del trabajo de Investigación
5. Porcentaje de similitud

TESIS FINAL SUSTENTADA

INFORME DE ORIGINALIDAD

13%

INDICE DE SIMILITUD

12%

FUENTES DE INTERNET

4%

PUBLICACIONES

1%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	hdl.handle.net Fuente de Internet	3%
2	renati.sunedu.gob.pe Fuente de Internet	2%
3	repositorio.uap.edu.pe Fuente de Internet	1%
4	repositorio.uladech.edu.pe Fuente de Internet	1%
5	repositorio.uigv.edu.pe Fuente de Internet	1%
6	core.ac.uk Fuente de Internet	1%
7	Leslie Helening Saenz Pupuche, Ana Cecilia Tejada Vásquez, Juana Del Carmen Guerrero Hurtado. "Efecto antifúngico in vitro de extracto etanólico del rizoma de <i>Curcuma longa</i> L. Sobre cepas de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231", Revista Peruana de Medicina Integrativa, 2021	<1%

8	Submitted to Universidad TecMilenio Trabajo del estudiante	<1 %
9	repositorio.unid.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
10	repositorio.upao.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
11	repositorio.usanpedro.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
12	repositorio.uwiener.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
13	repositorio.uroosevelt.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
14	www.medigraphic.com Fuente de Internet	<1 %
15	Submitted to Universidad Europea de Madrid Trabajo del estudiante	<1 %
16	www.perunoticias.net Fuente de Internet	<1 %

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 20 words

Excluir bibliografía

Activo

DEDICATORIA

La presente tesis la dedico a toda mi familia en especial a mi madre y a mi difunto padre que a sido un pilar fundamental en mi formación como profesional, por brindarme la confianza, consejos, oportunidad y recursos para lograrlo, a mi hijo por ser mi inspiración y mi sustento en momentos difíciles brindándome su amor, paciencia y comprensión, y por último a mis verdaderos amigos con los que compartimos todos estos años juntos.

Bach. Gutierrez Pujico, Lizzet

Dedico esta tesis a mi madre Digna Ochoa por su amor, comprensión y haberme dado el soporte, para lograr todas y cada una de mis metas, a mi padre Filomeno Torres mi más profundo agradecimiento por ser la guía que ilumina mi camino en cada paso que doy diariamente. A mis hermanos por brindarme su respaldo y confianza es un tesoro invaluable que valoro enormemente. Me siento realmente afortunado por contar con su amor y apoyo constante en mi vida.

Bach. Torres Ochoa, Elmer Alejandro

AGRADECIMIENTO

Deseamos manifestar nuestra más sincera gratitud a la Universidad María Auxiliadora por brindarnos la formación académica necesaria para nuestro crecimiento profesional y el logro de nuestras metas establecidas.

También queremos expresar nuestro agradecimiento a nuestros padres, familiares y compañeros por su apoyo constante a lo largo de todo el proceso de estudio.

Además, extendemos nuestro agradecimiento a nuestro tutor, el MSc. Hualpa Cutipa, Edwin, por su incansable dedicación y paciencia en cada fase de este proyecto de investigación.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
I. 1II. MATERIALES Y MÉTODOS	6
II.1. Enfoque y diseño de la investigación	6
II.2. Población, muestra y muestreo	6
II.3. Variables de investigación	6
II.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos.	7
II.5. Plan de recolección de datos	7
II.6. Métodos de análisis estadísticos	10
II.7. Aspectos éticos	10
III. ¡Error! Marcador no definido.IV. DISCUSIÓN	15
IV.1. Discusión de resultados	15
IV.2. Conclusiones	18
IV.3. Recomendaciones	19
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
ANEXOS	24
ANEXO A. Instrumentos de recolección de datos	24
ANEXO B. Matriz de consistencia	27
ANEXO C. Operacionalización de las variables	28
ANEXO D. Certificado Taxonómico	29
ANEXO E. Informe de análisis de laboratorio	30
ANEXO F. Certificado de Agar Dextrosa Sabouraud	31
ANEXO G. Certificado de análisis de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	33
ANEXO H. Evidencias fotográficas	35
ANEXO I. Porcentaje de rendimiento	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Análisis solubilidad de (centella)	11
Tabla 2. Tamizaje fitoquímico de (centella)	11
Tabla 3. Promedio de los valores obtenidos de las mediciones de los halos de inhibición del extracto de (centella) sobre <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	12
Tabla 4. Análisis descriptivos estadísticos de los resultados obtenidos en la prueba microbiológica de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	13
Tabla 5. Prueba estadístico de ANOVA del efecto antimicótico in vitro contra <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	13
Tabla 6. Comparaciones múltiples de los halos de inhibición de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	14
Tabla 7. Ensayo de subgrupos de Tukey para <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	14

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Muestra de tipo Hojas de <i>Ranunculus praemorsus</i> Kunth ex DC (CENTELLA)	35
Figura 2. Lavado de la muestra	35
Figura 3. Desinfección de la muestra	35
Figura 4. Escurrido de la muestra	36
Figura 5. Procedimiento de secado de la muestra	36
Figura 6. Procedimiento de molienda de la muestra	36
Figura 7. Preparación del macerado del extracto etanólico	37
Figura 8. Procedimiento de filtración del macerado del extracto etanólico	37
Figura 9. Obtención de extracto seco	37
Figura 10. Pesado del Agar	38
Figura 11. Autoclave para el uso en la prueba microbiológica	38
Figura 12. Agar Saboraud Dextrosa	38
Figura 13. Cepa biológica de tipo: <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	39
Figura 14. Placas preparadas	39
Figura 15. Comparación de turbidez mediante el reactivo de Mc. Farland	39
Figura 16. Rotulado de placas	40
Figura 17. Sembrado de la cepa biológicas en las placas	40
Figura 18. Preparando discos con la cepa <i>Candida albicans</i>	40
Figura 19. Placa con <i>C. albicans</i> y con discos	41
Figura 20. Sustancias experimentales y controles	41
Figura 21. Incubación de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	41
Figura 22. Placas Petri con halos de inhibición	42
Figura 23. Lectura de resultados	42
Figura 24. Lectura de resultados	42

RESUMEN

Objetivo: Determinar el efecto antimicótico *in vitro* del extracto etanólico de *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC (centella) frente a cepas de *Candida albicans* ATCC 10231.

Materiales y métodos: cuantitativo, experimental; la población fue *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC; por otro lado, se empleó 10 placas Petri inoculadas con *Candida albicans* ATCC 10231. Se realizó una marcha fitoquímica y la técnica de difusión en agar, constituida por grupos al 25 %, 50 %, 75 % y 90 % frente a Fluconazol 25 ug.

Resultados: las medias de los diámetros en concentraciones del 25%, 50%, 75% y 90% del extracto etanólico de *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC (centella) sobre *Candida albicans* ATCC 10231 fueron más bajos que los registrados por el Fluconazol 25 ug (28.57 mm). La prueba estadística ANOVA fue significativa ($p < 0,05$) para Fluconazol 25 ug en comparación con el conjunto de control. En el extracto obtenido de (centella) se identificó la presencia de azúcares reductores, lactonas α, β -insaturadas, compuestos fenólicos, flavonoides, antocianinas y alcaloides.

Conclusión: el extracto etanólico de *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC (centella) mostro una acción antimicótica del 90% sobre *Candida albicans* ATCC 10231 lo cual puede estar asociado a la presencia de los metabolitos identificados en dicho extracto.

Palabras clave: Efecto antimicótico, *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC, *Candida albicans*.

ABSTRACT

Aim: To determine the in vitro antifungal effect of the ethanolic extract of *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC (centella) against strains of *Candida albicans* ATCC 10231.

Materials and methods: quantitative, experimental; the population was *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC; On the other hand, 10 Petri plates inoculated with *Candida albicans* ATCC 10231 were used. A phytochemical march and the agar diffusion technique were carried out, consisting of groups at 25%, 50%, 75% and 90% against Fluconazole 25 ug.

Results: the average diameters at concentrations of 25%, 50%, 75% and 90% of the ethanolic extract of *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC (centella) on *Candida albicans* ATCC 10231 were lower than those recorded by Fluconazole 25 ug (28.57mm). In the ANOVA statistical test it was significant with ($p < 0.05$) for Fluconazole 25 ug compared to the control set. The presence of reducing sugars, α, β -unsaturated lactones, phenolic compounds, flavonoids, anthocyanins and alkaloids was identified in the centella extract.

Conclusion: the ethanolic extract of *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC (centella) that presented antifungal action was 90% against *Candida albicans* ATCC 10231 which could be associated to secondary metabolites identified from ethanolic extract.

Key words: Antifungal effect, *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC, *Candida albicans*.

I. INTRODUCCIÓN

La micosis es una enfermedad producida por microorganismos, muchas veces en su mayoría oportunistas requiriendo de un hospedero para poder vivir y reproducirse. Dichos microbios son capaces de producir daños a nivel de la piel, mucosas y faneras. En Norteamérica el 50% de los pacientes internado en la Unidad de cuidados intensivos (UCI) padecen de este tipo de infección (1). Según la Organización Mundial de la Salud han aumentado anualmente las micosis y/o infecciones de transmisión sexual producidas por *Cándida albicans* (2). Uno de los principales problemas en el tratamiento es la escasez de conocimiento para tratar dichas micosis. En Costa Rica, la tasa de ineficacia en los tratamientos debido a la elección incorrecta de los medicamentos está en aumento, debido a la utilización empírica de fármacos para combatir infecciones fúngicas. Esta situación se da sin el respaldo del personal médico y debido a una deficiente observancia del esquema de aplicación (3)(4).

En India las infecciones fúngicas oportunistas afectan especialmente a pacientes inmunodeprimidos, y pueden ser patologías micóticas superficiales e infecciones micóticas invasivas, siendo la más común las levaduras patógenas humanas *Candida albicans*. Las opciones de tratamiento son limitadas, y pueden llegar a la muerte cuando hay complicaciones importantes (5). En España durante la actual pandemia, se ha manifestado que los pacientes con COVID-19 pueden padecer de candidiasis a nivel sistémico sin embargo este sigue siendo tema de análisis (6).

En nuestro país las infecciones micóticas presentan una elevada prevalencia en la población, tal es el caso del personal militar, deportistas profesionales, pacientes inmunodeprimidos e incluso personas con enfermedades subyacentes como los diabéticos (8)(9).

El tratamiento de la candidiasis está basado en fármacos como el fluconazol, terbinafina, nistatina, griseofulvina, clotrimazol, anfotericina B y caspofungina; que cumplen su acción terapéutica. Sin embargo, estos medicamentos pueden generar múltiples reacciones adversas, por ejemplo, el uso prolongado de azoles se asocia con hepatotoxicidad y efectos relacionados con las hormonas, que incluyen ginecomastia, alopecia, disminución de la libido, oligospermia, azoospermia, impotencia, hipopotasemia, hiponatremia y (raramente) insuficiencia suprarrenal.

Voriconazol y posaconazol se han asociado con neuropatías periféricas, e itraconazol y voriconazol con pancreatitis. Además, el voriconazol se ha asociado con periostitis, reacciones fototóxicas y carcinoma de células escamosas (11).

Los productos naturales poseen capacidad terapéutica de forma natural. Asimismo, cabe resaltar la importancia de dichos productos debido a que poseen una amplia gama de diversidad de estructuras químicas multidimensionales. Además, el interés en el uso de compuestos naturales para alterar funciones biológicas ha experimentado un aumento significativo en los últimos años. Los medicamentos formulados a base de hierbas y las costumbres médicas tradicionales son consideradas más económicas y al alcance de la mayoría de las comunidades rurales en comparación con los fármacos actuales(12).

Basándose en estadísticas proporcionadas por la Organización Mundial de la Salud, más del 60 % de la población global hace uso de las plantas medicinales y casi el 39 % de medicamentos convencionales provienen de estas. La alta diversidad estructural de los productos naturales derivados de plantas medicinales se ha realizado desde la perspectiva de la fitoquímica, siendo su eficacia asociada con complejidad de sus propiedades estéricas y químicas tridimensionales. Todo ello ofrece muchas ventajas en términos de eficiencia y selectividad en patologías e infecciones entre ellas las ocasionadas por agentes micóticos (13).

Algunas plantas oriundas del Perú que han sido descritas y estudiadas por su actividad antifúngica son: *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum. (shacapa), *Psidium acutangulum* DC (guayaba) y *Origanum vulgare* L (orégano), etc. (26).

Por lo tanto, debido al gran impacto del uso de plantas medicinales frente a cuadros infecciosos antimicóticos, es importante investigar fuentes naturales para encontrar alternativas en el tratamiento de enfermedades que eviten las reacciones adversas indeseadas. Siendo necesario realizar investigaciones experimentales utilizando recursos vegetales con un alto potencial farmacéutico. *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC (centella) es una especie vegetal que ha mostrado evidencia empírica de su utilidad antimicótica para el cual se requiere una demostración científica.

La especie vegetal denominada *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC (centella), pertenece a la familia Ranunculaceae, conocida como Urpi papa (kichwa), taruga

tañi, achicoria de venado, frutilla silvestre. Su principal hábitat se ubica en las zonas boscosas. Dentro de los usos tradicionales se le asocia al tratamiento de problemas articulares, artritis, reumatismo, dolor muscular, dolor de huesos, heridas e infecciones por hongos (14).

Por otro lado, la actividad antimicrobiana puede ser evaluada con diferentes técnicas, siendo la técnica de Kirby-Bauer uno de los principales procedimientos aplicados para este tipo de estudios. El método implica un proceso de dispersión en gel para evaluar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los agentes antimicrobianos, con el propósito de establecer su eficacia (16).

Asimismo, una de las patologías más comunes comprende a la dermatofitosis, también llamadas tiñas, son causadas por hongos que se multiplican en tejidos queratinizados, como piel, uñas y el pelo. Los géneros más comunes son *Microsporum*, *Epidemophyton* y *Trichophyton*, siendo este último el más frecuente. Estos presentan como factores de virulencia a una amplia gama de enzimas que facilitan los procesos de invasión y adherencia en el huésped (18).

En el contexto del tratamiento medicamentoso, se emplean antihongos que forman parte de la familia de los Azoles y su consumo puede ser a través de vía oral o tópica (con óvulos y cremas). Algunos ejemplos de estos medicamentos son el fluconazol, ketoconazol, itraconazol y clotrimazol (19).

Abubakar et al. (2018), tuvieron el objetivo de descubrir la actividad antifúngica de 3 extractos de especies naturales frente a *Cándida albicans* y *Trichophyton rubrum* utilizando método experimental con siembras en Agar, realizaron detección de antifúngicos aplicando el procedimiento de diseminación en pocillos de agar, se recolectaron aislados clínicos de *A. flavus*, *T. rubrum* y *C. albicans* de la Unidad de Microbiología del Hospital de Especialistas de Sokoto, Nigeria y se concluyó que si existe importante efecto antifúngica frente *Cándida albicans* y *Trichophyton rubrum* (20).

Rivera et al. (2018), identificaron la efectividad antifúngica del aceite esencial de orégano contra variedades de *Candida albicans*, utilizando la técnica de Kirby-bauer, como resultado hallaron el aceite esencial inhibió el crecimiento del microorganismo empleado. La capacidad antifúngica frente a *C.albicans* del extracto esencial de orégano proveniente de México fue comprobada al ser

encapsulado en tres matrices poliméricas diferentes. Se concluyó que las propiedades individuales de las emulsiones, como las medidas de las partículas y el componente emulsionante, brindan la posibilidad a estas formulaciones de ser utilizadas en diversos productos que puedan ser cómodamente administrados en un paciente para enfrentar infecciones causadas por *C. albicans* (21).

Rasool et al. (2014) evaluaron la acción bactericida del extracto de *Ranunculus muricatus* L., contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Bacillus pumilus*, *Salmonella typhimurium* y *Pseudomonas aeruginosa*. En sus resultados el estudio sinérgico reveló la mejor actividad antibacteriana contra *B. subtilis* y *B. pumilus* a un nivel de 1 µg/ml excepto *E. coli* y *S. aureus*. El metanol fue considerado como un excelente solvente para la actividad antimicrobiana (22).

Requejo y Vásquez V (2021), determinaron la actividad antifúngica del aceite esencial de orégano y la resina de copaiba ante *Candida albicans*, obteniéndose mediante la técnica de destilación por vapor, en tanto que la secreción de copaiba fue adquirida de forma directa mediante cortes realizados en el árbol. La valoración de la acción antifúngica fue llevada a cabo mediante el método Kirby-Bauer, empleando distintas concentraciones de las muestras frente a *Candida albicans*, el resultado manifestó que solo el aceite esencial de orégano tuvo el efecto deseado (23).

Idrogo y Muñoz (2022) Determinaron el efecto antibacteriano in vitro el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC (centella) frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Su conclusión fue que el extracto de centella no presentó efecto antibacteriano frente cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (24).

Chumpe (2019) analizo la actividad bactericida del extracto hidroalcohólico *Berberis vulgaris* L. (agracejo) ante *Staphylococcus aureus*, la técnica empleada consistió en el método de diseminación en placa. Se corroboró que la acción bactericida de agracejo al 30% es equiparable al efecto antibacteriano de la azitromicina, ya que ambos exhiben una zona de inhibición similar (33 mm en el extracto al 30% y 39 mm en la azitromicina). Además, se verificó la existencia de compuestos bioactivos como alcaloides, compuestos fenólicos y flavonoides, que podrían estar relacionados con la actividad antibacteriana observada, como resultado obtuvo que

el extracto a las concentraciones de 10, 20 y 30 % inhibieron el crecimiento del microorganismo (25).

La presente investigación en el ámbito teórico pretende contribuir de manera científica confirmando el uso tradicional y empírico de (centella) frente a infecciones micóticas en la población, por otro lado, reforzara el conocimiento acerca de los diferentes fitoconstituyentes que se encuentran en esta planta.

Asimismo, podría mejorar el tratamiento de las infecciones micóticas siendo un aporte practico a la comunidad ofreciendo un tratamiento alternativo, económico y accesible hacia la población que no cuenta con un ingreso económico estable; en cuadros micóticas leves a moderados, de igual importancia servirá como un tratamiento coadyuvante a la terapia farmacológica el cual no pretende suplantar el tratamiento médico indicado por facultativo.

El objetivo fue determinar el efecto antimicótico in vitro del extracto etanólico de *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC (centella) contra *Candida albicans* ATCC 10231.

Hipótesis: Una concentración específica del extracto etanólico de *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC (centella) tendría un efecto antimicótico in vitro frente *Candida albicans* ATCC 10231.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1. Enfoque y diseño de la investigación

El enfoque del presente estudio es cuantitativo, con diseño experimental, explicativo y transversal, debido a que se llevó a cabo en un momento específico. Es de naturaleza experimental porque se intervinieron la variable independiente para observar su incidencia en la variable dependiente en un entorno controlado y no natural (27).

II.2. Población, muestra y muestreo

II.2.1. Población botánica: Se recolectaron 10 kilos de hojas *Ranunculus praemorsus* Kunth, del distrito de Pulan, provincia de Santa Cruz, ubicada en Cajamarca.

Muestra: Se tomo 2 kilos de hojas de *Ranunculus praemorsus* Kunth.

Criterios de inclusión:

- Hojas con apariencia adecuada y sin daños.
- Hojas originarias plantas procedentes de Cajamarca.

Criterios de exclusión:

- Raíces
- Flores
- Tallos

Muestreo: La selección se realizó mediante un método de muestreo no probabilístico, usando criterios de inclusión y exclusión.

II.2.2. Población microbiológica: Cepas de *Candida albicans* ATCC 10231

Muestra: 10 placas petri inoculadas con la cepa estándar.

II.3. Variables de investigación

Variable independiente: Extracto etanólico de hojas *Ranunculus praemorsus*.

- **Definición conceptual:** Extracto líquido logrado mediante maceración con etanol, derivado de (centella) (28).
- **Definición operacional:** Se realizó una maceración de las hojas de la especie vegetal *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC (centella).

Variable dependiente: Efecto antimicótico.

- **Definición conceptual:** Capacidad de una sustancia para inhibir y/o eliminar el crecimiento de cepas antimicóticas (29).
- **Definición operacional:** Placas petri inoculadas con *Candida albicans* ATCC 10232 las cuales fueron sometidas a diferentes concentraciones de extracto etanólico vegetal.

II.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos.

La técnica usada fue la observación y aplicación de procedimientos analíticos de tipo fitoquímico y microbiológico denominado como método de difusión en agar en disco o Kirby Bauer, en función a medición de halos de inhibición y catalogada según la escala de Duraffourd.

El instrumento fue la ficha de observación *ad hoc* para el registro del análisis microbiológico del extracto etanólico de *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC (centella).

II.5. Plan de recolección de datos

II.5.1. Recolección de la muestra

Las hojas de *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC (centella) fueron recolectados en el distrito de Pulan, provincia de Santa Cruz, ubicado en Cajamarca.

II.5.2. Identificación de la muestra

La clasificación taxonómica de *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC se efectuó por un especialista en identificación taxonómica.

II.5.3. Preparación de material

- a) **Selección de hojas:** Se eligió aquellas hojas que no presenten signos de daños físicos o a causa de microorganismos.
- b) **Lavado de las hojas:** Este se realizó con agua destilada para retirar cualquier tipo de impureza.
- c) **Secado de las hojas:** Primero se realizó a temperatura ambiente sobre papel Kraft y luego se llevaron a una estufa con una temperatura de 40°C.
- d) **Molienda de las hojas:** El procedimiento se llevó a cabo con un mortero y pilón.

II.5.4. Preparación del extracto seco hidroalcohólico

Se utilizó un aproximado de 340 g de hojas molidas de la especie vegetal en estudio junto con 860 mL de alcohol etílico al 70 %, para realizar el proceso de maceración durante un período de tiempo de 7 días y bajo una agitación constante, todo este proceso se realizó en un envase color ámbar correctamente sellado. Una vez concluida la etapa de maceración, fue realizado un filtrado del contenido empleando papel filtro Whatman N°4, después la muestra fue expuesta a 37°C dentro de la estufa con la finalidad de deshidratar el extracto el cual finalmente fue conservado en un recipiente de color ámbar.

II.5.5. Análisis cualitativo de (centella)

Prueba de solubilidad

Se añadió 0,5 g del extracto deshidratado en cada tubo, posteriormente se incorporó 0,5 mL de diversos solventes, incluyendo diclorometano, éter de petróleo, agua destilada, cloroformo, metanol, butanol y etanol. Estos solventes forman parte de la serie eluotrópica.

Marcha fitoquímica del extracto

Se realizó el análisis fitoquímico empleando compuestos (Índice Afro simétrico Cloruro férrico, Fehling A y B, Wagner, NaOH 10 %, Benedict, Gelatina, Liebermann-Burchard, Shinoda, Gelatina-sal, Dragendorff, Baljet) los cuales

están contemplados en el método planteado por Lock (1994). Para este fin se utilizaron 14 tubos de ensayo adicionándole 1 mL de extracto fluido (30).

II.5.6. Actividad antimicótica

Activación de la cepa: Se utilizó el producto de microbiología Kwik-stik, el cual alberga las cepas de *Candida albicans*. El Kwik-stik está equipado con un compartimiento superior que contiene un líquido hidratante. Este líquido se activa al presionar una vez la ampolla ubicada en la tapa. Después de esta acción, se mantuvo el Kwik-stik en posición vertical para permitir que el líquido fluya hacia la parte inferior, donde se encuentran los gránulos. Para finalizar, se ejerció presión en la parte inferior del dispositivo con el fin de obtener una suspensión uniforme. De manera inmediata, se impregnó el hisopo, que contiene el producto, con el líquido hidratado y se transfirió a una placa con agar sabouraud dextrosa, la cual se incubó a una temperatura de 37°C durante 24 horas.

Preparación del estándar 0.5 de McFarland: Se emplearon los estándares de turbidez de McFarland para la cantidad aproximada de bacterias en una suspensión, comparando su opacidad con la del estándar. El patrón de McFarland se preparó utilizando cloruro de bario y una solución de ácido sulfúrico para obtener un precipitado de sulfato de bario. Se crearon patrones con diferentes niveles de turbidez ajustando los volúmenes de ambos reactivos, lo que representó diversas concentraciones bacterianas.

Preparación del inóculo: Se llevó a cabo la preparación de una suspensión directa utilizando solución salina al 0.9% (cloruro de sodio) a partir de las colonias obtenidas de la placa incubada previamente durante 24 horas. La turbidez resultante fue ajustada de inmediato, comparándola visualmente con la turbidez del estándar 0.5 de McFarland, con el objetivo de obtener una disolución de 1×10^8 UFC/mL de la cepa utilizada.

Inoculación de las Placas: Estos medios de cultivo fueron inoculados con la cepa objeto de estudio mediante un asa de siembra, aplicando la técnica de esparcimiento en varias direcciones (31).

Preparación de los discos: Se elaboraron utilizando papel de filtro Whatman N° 1 con una medida de 6 mm, estos estuvieron libres de microorganismos, y finalmente, se impregnaron con las siguientes sustancias:

- Grupo experimental 1: extracto etanólico de (centella) 25%.
- Grupo experimental 2: extracto etanólico de (centella) 50%.
- Grupo experimental 3: extracto etanólico de (centella) 75%.
- Grupo experimental 4: extracto etanólico de (centella) 90%.
- Grupo control: Fluconazol 25 µg.
- Grupo control: Alcohol de 70°.

Después, todas las placas se colocaron en incubación a 37°C durante un lapso de 24 a 48 horas. Posteriormente, se evaluó el tamaño de los halos de inhibición utilizando un calibrador vernier. Al concluir, estos resultados fueron analizados utilizando la "Escala de Duraffourd".

II.6. Métodos de análisis estadísticos

Fundamentado en los datos recopilados, se ejecutó el análisis numérico empleando el software SPSS v.27. Se utilizó estadísticas descriptivas para investigar medidas de posición central y variabilidad, mostrando los resultados a través de tablas y gráficos. Posteriormente, se efectuó pruebas para verificar la normalidad y homogeneidad de las varianzas. Por último, se utilizó estadística inferencial mediante ANOVA y el test de Tukey para comparar los diferentes grupos.

II.7. Aspectos éticos

El estudio se realizó aplicando los correctos procedimientos de laboratorio fijados en el Manual de la Institución Nacional de Salud, satisfaciendo las condiciones para ser reconocido como un estudio novedoso. Los investigadores aseguraron no poseer conflictos de interés (32-33).

III. RESULTADOS

III.1. Prueba de solubilidad

Tabla 1. Solubilidad de la planta (centella) a distintos solventes

TUBO	SOLVENTE	RESULTADOS
N° 1	Éter de petróleo	-
N° 2	Diclorometano	-
N° 3	Cloroformo	-
N° 4	Butanol	+
N° 5	Etanol 96°	+
N° 6	Etanol 70°	+++
N° 7	Metanol	+
N° 8	Agua destilada	++

Leyenda:

- Insoluble: (-)
- Poco soluble: (+)
- Medianamente soluble: (++)
- Muy soluble: (+++)

En la tabla 1, se aprecia el resultado de mayor solubilidad (+++) observado en el solvente Etanol 70°; le sigue el agua destilada con media solubilidad (++) y poca solubilidad en Metanol, Etanol 96° y Butanol.

III.2 Marcha fitoquímica del extracto etanólico de *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC (centella).

Tabla 2. Tamizaje fitoquímico de (centella)

TUBO	ENSAYOS	METABOLITO	RESULTADO
N° 1	Borntrager	Antraquinonas	+
N° 2	Cloruro férrico	Compuestos fenólicos	+++
N° 3	Liebermann-Burchard	Terpenos y esteroides	+
N° 4	Dragendorff	Alcaloides	++
N° 5	Mayer	Alcaloides	+
N° 6	Wagner	Alcaloides	+
N° 7	Baljet	Lactonas α,β -insaturadas	+++
N° 8	Gelatina	Taninos	-
N° 9	Gelatina-sal	Taninos	-
N° 10	NaOH 10%	Antocianinas	++
N° 11	Benedict	Azúcares reductores	+++
N° 12	Fehling A y B	Azúcares reductores	+++
N° 13	Espuma	Saponinas	+
N° 14	Shinoda	Flavonoides	++

Leyenda:

- Ausente: (-)
- Mínimo: (+)
- Mediano: (++)
- Abundante: (+++)

En la tabla 2, se muestra los resultados del tamizaje fitoquímico desarrollado siguiendo el protocolo establecido por Olga Lock (34), para comprobar la suposición propuesta. A través de este procedimiento, se examinó la existencia de distintos compuestos secundarios con efecto antimicótico en el extracto etanólico obtenido de *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC (centella). Se observó la presencia de Azúcares reductores, Lactonas α,β -insaturadas y Compuestos fenólicos con una abundante presencia (+++). De igual manera, se detectaron otros metabolitos como Flavonoides, Antocianinas y Alcaloides con mediana presencia (++) . Estos hallazgos avalan la existencia de estas sustancias.

III.3 Actividad antimicótica del extracto etanólico de *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC (centella). Datos descriptivos.

Tabla 3. Promedio de los valores obtenidos de las mediciones de los halos de inhibición del extracto de (centella) sobre *Candida albicans* ATCC 10231

Microorganismo	Diámetros de inhibición en mm					
	Etanol 70°	25%	50%	75%	90%	Fluconazol 25ug
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	6	6	6	6	8.33	28.56
	6	6	6	6	8.37	28.58
	6	6	6	6	8.39	28.60
	6	6	6	6	8.37	28.57
	6	6	6	6	8.36	28.56
	6	6	6	6	8.34	28.55
	6	6	6	6	8.37	28.58
	6	6	6	6	8.35	28.55
	6	6	6	6	8.36	28.58
	6	6	6	6	8.37	28.57
Media	6	6	6	6	8.36	28.57

Tabla 4. Análisis descriptivos estadísticos de los resultados obtenidos en la prueba microbiológica de *Candida albicans* ATCC 10231

95% de intervalo de confianza para la media							
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231		N	Media	Desviación estándar	Error estándar	Límite inferior	Límite superior
	Etanol 70°	10	6,0000	0,00000	0,00000	6,0000	6,0000
	Ext. 25%	10	6,0000	0,00000	0,00000	6,0000	6,0000
	Ext. 50%	10	6,0000	0,00000	0,00000	6,0000	6,0000
	Ext. 75%	10	6,0000	0,00000	0,00000	6,0000	6,0000
	Ext. 90%	10	8,3610	0,01729	0,00547	8,3486	8,3734
	Fluconazol 25ug	10	28,5700	0,01563	0,00494	28,5588	28,5812

En la tabla 4, se aprecia que la muestra obtenida mediante el uso del Etanol 70° no presentó actividad antimicótica contra *Candida albicans* ATCC 10231, mostrando una media de 6.0. En la tabla 3, se evidencia que las distintas concentraciones de (centella) 25%, 50% y 75% mostraron nula sensibilidad (media de 6,0 mm). Por otro lado, a una concentración del 90% se determinó una baja sensibilidad (media de 8,3 mm). Además, la cepa evaluada mostró elevada sensibilidad frente al control utilizado (Fluconazol 25ug) con una medida de 28,5 mm.

IV.4 Análisis estadístico inferencial del efecto antimicótico del extracto etanólico de *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC (centella).

Tabla 5. Prueba estadística de ANOVA del efecto antimicótico in vitro contra *Candida albicans* ATCC 10231

ANOVA						
		Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Entre grupos	4113,868	5	822,774	9085842,571	0,000
	Dentro de grupos	0,005	54	0,000		
	Total	4113,872	59			

En la tabla 5, la prueba estadística de ANOVA fue empleada para evaluar si existen diferencias entre los tratamientos mediante la comparación de sus medias. Se aprecia un resultado con un valor de $p < 0.05$ (sig), el cual evidencia que hay diferencias significativas entre los tratamientos aplicados contra *Candida albicans*

ATCC 10231. Con el propósito de identificar las diferencias significativas entre los distintos medios, se llevó a cabo un análisis POST HOC utilizando el procedimiento de Tukey.

Tabla 6. Comparaciones múltiples de los halos de inhibición de *Candida albicans* ATCC 10231

Comparaciones múltiples						
(I) Grupo	(J) Grupo	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	IC - 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Fluconazol 25ug	Etanol 70°	22,57000*	0,00426	0,000	22,5574	22,5826
	25%	22,57000*	0,00426	0,000	22,5574	22,5826
	50%	22,57000*	0,00426	0,000	22,5574	22,5826
	75%	22,57000*	0,00426	0,000	22,5574	22,5826
	90%	20,20900*	0,00426	0,000	20,1964	20,2216
Etanol 70°	Fluconazol 25ug	-22,57000*	0,00426	0,000	-22,5826	-22,5574
	25%	0,00000	0,00426	1,000	-,0126	0,0126
	50%	0,00000	0,00426	1,000	-,0126	0,0126
	75%	0,00000	0,00426	1,000	-,0126	0,0126
	90%	-2,36100*	0,00426	0,000	-2,3736	-2,3484

En la tabla 6, se constató que el valor $p < 0.05$ en comparación de (Fluconazol 25ug) y los experimentales al 25%, 50%, 75% y 90%, el cual evidencia que el Fluconazol 25ug muestra un efecto inhibitorio significativamente mayor que los experimentales en todas las concentraciones frente *Candida albicans* ATCC 10231. Por otro lado, se observa que la significancia ($p > 0.05$) entre Etanol 70° y los grupos experimentales al 25%, 50%, 75% evidenció que no existen diferencias entre los conjuntos evaluados. Además al 90% ($p < 0.05$) en comparación con el (Etanol 70°) permitió determinar que existen diferencias estadísticas entre ambas pruebas.

Tabla 7. Ensayo de subgrupos de Tukey para *Candida albicans* ATCC 10231

HSD Tukey ^a				
Grupo	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
Etanol 70°	10	6,0000		
25%	10	6,0000		
50%	10	6,0000		
75%	10	6,0000		
90%	10		8,3610	
Fluconazol 25ug	10			28,5700
Sig.		1,000	1,000	1,000

IV. DISCUSIÓN

IV.1. Discusión de resultados

Candida albicans ATCC 10231, una cepa común de hongo que representa una preocupación global debido a su creciente resistencia a los tratamientos antimicóticos. Su capacidad para causar infecciones oportunistas en individuos inmunocomprometidos y sanos plantea un desafío significativo para la salud pública en todo el mundo (2).

Según el resultado microbiológico, se identificó que el extracto de (centella) solo presentó acción antimicótica a una concentración de 90% sobre *Candida albicans* ATCC 10231 con una sensibilidad baja formando un halo de 8,3 mm. Este resultado se asemeja al estudio de Rivera et al. (2018), quienes identificaron la efectividad antifúngica del aceite de orégano contra *C. albicans*, obteniendo que el aceite esencial a la concentración del 100% inhibió el crecimiento del microorganismo empleado con halos de 11,75 mm, 8 mm y 7 mm respectivamente. (21). A pesar de ser diferentes plantas y enfoques, los resultados son semejantes en el sentido de que ambos extractos (el de centella y el aceite esencial de orégano) mostraron actividad antimicótica contra *Candida albicans*, lo que sugiere su potencial para combatir infecciones causadas por este microorganismo. Otros resultados similares fueron hallados por Alca (2019), quien evaluó el efecto antimicótico de los aceites esenciales de orégano y canela frente a *Candida albicans*, obteniendo que el efecto sinérgico de ambas sustancias fue muy efectiva a las concentraciones de 50%, 75% y 100% con halos de (14, 16 y 16) mm, respectivamente (24). Los resultados son semejantes debido a que tanto el extracto de centella como los aceites esenciales de orégano y canela mostraron actividad antimicótica contra *Candida albicans*. Aunque derivan de diferentes plantas, sus propiedades antimicóticas los hacen efectivos contra el mismo microorganismo.

Según el resultado, en la tabla 2, se realizó la marcha fitoquímica, revelando la notable alteración cromática que correspondió a los azúcares reductores y compuestos fenólicos; así como flavonoides y alcaloides. El mismo que coincide con el estudio de Chumpe (2019), quien determinó la composición fitoquímica y acción bactericida del extracto hidroalcohólico *Berberis vulgaris* L. (agracejo) ante *Staphylococcus aureus*, demostrando la existencia de compuestos alcaloides,

fenólicos, flavonoides, taninos, estos fueron un indicador más para establecer que el extracto de (agracejo) presentó acción bactericida frente la cepa en estudio (25).

La investigación sobre los metabolitos secundarios en el extracto etanólico de *Ranunculus praemorsus* revela interesantes coincidencias en diversos estudios sobre su composición fitoquímica. Estos estudios han puesto de manifiesto la presencia de compuestos tales como: triterpenoides, flavonoides y alcaloides, que muestran una notoria actividad antifúngica frente *Candida albicans*. Estas coincidencias en la identificación de metabolitos bioactivos resaltan la relevancia de la Centella como fuente potencial de agentes naturales con capacidad para combatir la proliferación de *Candida albicans*, una especie fúngica de importancia médica debido a su implicación en infecciones oportunistas en seres humanos (35).

Según el resultado, en la tabla 6, se identificó que el extracto etanólico de (centella) presentó acción antimicótica a mayor concentración del 90% frente la cepa en estudio. Además, se determinó que fue significativo ($p < 0.05$) en comparaciones entre el Etanol 70° y la concentración del extracto al 90%. Dicha similitud fue encontrada por Rasool *et al.* (2014) quienes evaluaron la acción bactericida del extracto de planta entera de *Ranunculus muricatus* L., contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus pumilus*, *Salmonella typhimurium* y *Pseudomonas aeruginosa*. Obteniendo que a un nivel de 1 µg/ml presentó acción bactericida frente *B. subtilis* y *B. pumilus* (22). Ambos estudios coincidieron en que los extractos de plantas evaluados demostraron actividad inhibidora contra las cepas específicas. El extracto de *Ranunculus praemorsus* inhibió el 90% del crecimiento de *Candida albicans*, y el extracto de *Ranunculus muricatus* mostró actividad contra varias cepas bacterianas. Del mismo modo, se corrobora con el estudio de Requejo y Vásquez V (2021), quienes determinaron la acción antifúngica del aceite de orégano y la resina de copaiba ante *Candida albicans*, hallando que solo el aceite de orégano tuvo el efecto deseado en concentraciones del 50%, 75% y 100% con una medida de (25 mm, 31,2 mm y 33,2 mm) respectivamente. Además fue significativo con $p < 0.05$ entre las diversas concentraciones y el control positivo. (23). Ambos extractos (centella y aceite de orégano) son semejantes en su efecto antimicótico contra *Candida albicans*. Aunque de diferentes plantas y concentraciones, ambos inhibieron el crecimiento del microorganismo, apoyado por ($p < 0.05$) en contraste con el control positivo.

Según el resultado, en la tabla 7, se evidencia que *Candida albicans* ATCC 10231, los diámetros de inhibición de las medias de las concentraciones del extracto etanólico de centella fueron menores comparados con la media del fluconazol 25 ug.

El cual señaló que el agente bactericida utilizado como referencia positiva exhibió un diámetro de inhibición mayor con (28,5700 mm). Presentando coincidencias con el estudio de Abubakar *et al.* (2018), quienes reportan la actividad antifúngica de 3 extractos de especies naturales frente a *Cándida Albicans*, obteniendo que todos los extractos investigados tuvieron una actividad antifúngica, significativo con ($p < 0,05$) en comparación con el fármaco antifúngico estándar (nistatina, 100 mg/ml) el cual reportó 31.00 ± 2.89 frente *C. Albicans*. (20). A pesar de emplear diferentes controles (fármacos antifúngicos estándar), ambos estudios arrojaron resultados similares. Los extractos naturales evaluados demostraron una actividad antifúngica inferior frente a *Candida albicans* en comparación con los fármacos convencionales. De igual manera se corrobora con el estudio de Chumpe (2019) analizo la acción bactericida del extracto de *Berberis vulgaris* L. (agracejo) ante *Staphylococcus aureus*, obteniendo que las hojas de agracejo al 30% fue equiparable al efecto bactericida de la azitromicina, no obstante no superó su efecto inhibidor (33 mm al 30% y 39 mm para azitromicina) (25). Ambos estudios coinciden en que los extractos no superaron el control positivo en su efecto antimicrobiano. Tanto *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC como *Berberis vulgaris* L. no superaron a Fluconazol y azitromicina en la inhibición de *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*, respectivamente.

IV.2. Conclusiones

- Según los resultados obtenidos el extracto etanólico de *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC (centella) muestra una acción antimicótica sobre *Candida albicans* ATCC 10231.
- Los análisis fitoquímicos desarrollados demuestran abundante presencia (+++), de azúcares reductores, lactonas α , β -insaturadas y compuestos fenólicos; seguido de flavonoides, antocianinas y alcaloides.
- La concentración del 90% del extracto etanólico de *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC (centella) mostró mayor acción antimicótica sobre *Candida albicans* ATCC 10231.
- La acción antifúngica de las diferentes concentraciones del extracto etanólico evaluadas (25%, 50%, 75% y 90%) del extracto etanólico de *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC (centella) sobre *Candida albicans* ATCC 10231 fueron inferiores a los obtenidos por el control positivo (Fluconazol 25 ug).

IV.3. Recomendaciones

- Se sugiere llevar a cabo un análisis más detallado sobre la solubilidad del extracto etanólico de (centella) en diferentes medios y solventes, para comprender mejor su comportamiento y estabilidad en diferentes condiciones.
- Se recomienda ampliar la marcha fitoquímica del extracto etanólico de (centella), con el fin de identificar y cuantificar una mayor variedad de compuestos químicos presentes en el extracto. Esto permitirá establecer una correlación más sólida entre los componentes químicos y la actividad antimicótica observada.
- Se sugiere realizar comparaciones adicionales con otros extractos o compuestos conocidos por su actividad antimicótica, para evaluar la potencia relativa del extracto etanólico de (centella) contra *Candida albicans*.
- El hallazgo del presente estudio indica que hubo acción antimicótica *in vitro*, por lo que sugiere un posible enfoque terapéutico alternativo para combatir estas infecciones resistentes. Sin embargo, es esencial seguir investigando y profundizando en esta área para entender completamente el mecanismo de acción del extracto, su toxicidad potencial y su eficacia en modelos *in vivo*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Perez P, Cabrera Y. Actividad antimicótica *in vitro* del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. (Orégano) frente a *Candida albicans* ATCC 10231 Y *Trichophyton rubrum* 28188. Universidad María Auxiliadora; 2020.
2. Flores C, Saavedra K. Efecto del extracto etanólico de *Tropaeolum majus* “Mastuerzo” sobre cepas de *Candida albicans in vitro*. universidad Roosevelt; 2021.
3. Gómez A, Arenas. R. Onicomicosis mixta. Un caso por *Trichophyton rubrum*, *Fusarium sp.* y *Candida albicans*. Dermatología Cosmética y Quir. 2020;18(1):48–50.
4. Al-Snafi A. Usos tradicionales, constituyentes y efectos farmacológicos de *Ononis Spinosa*. IOSRPHR. 2020;10(2):53–9.
5. Chatterjee S, Ghosh R, Mandal N. Inhibición del desarrollo de biopelículas e hifas, dos características virulentas de *Candida albicans* por metabolitos secundarios de un hongo endofítico *Alternaria tenuissima* que tiene un potencial antifúngico de amplio espectro. Microbiol Res. 2020; 232:1–11.
6. Pemán J, Ruiz A, García-Vidal C, Salavert M, Ramírez P, Puchades F, et al. Fungal co-infection in COVID-19 patients: Should we be concerned. Rev Iberoam Micol. 2020;37(2):41–6.
7. Balboa N, Núñez D, Alvear M, Cerón A, Paredes M. Evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana de un propóleo chileno sobre muestras clínicas de exudados bucofaríngeos y cepas ATCC. Bol latinoam Caribe plantas med. aromát. 2018;17(6):541–54.
8. Carhuaz Y. Etiología de la onicomicosis en pacientes varones atendidos en el Centro Médico Naval Cirujano Mayor Santiago Távara en el período enero-marzo del 2017. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2017.
9. Salinas R. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. “Orégano peruano” frente a *Staphylococcus aureus*. Universidad Norbert Wiener; 2018.

11. Abad, M, Guerra, J, Bermejo, P, Irurzun, A, & Carrasco, L. Search for antiviral activity in higher plant extracts. *Phytotherapy Research*. 2000; 14 (8): 604–607.
12. Adem, S, Eyupoglu, V, Sarfraz, I, Rasul, A, & Ali, M. (2020). Identification of potent COVID-19 main protease (M pro) inhibitors from natural polyphenols: An in silico strategy unveils a hope against CORONA. *Phytotherapy Research*. 2020; 1(1) 1-13
13. Alagu, S, Shafreen, R, Priya, A. y Shunmugiah, KP (2020). Ethnomedicines of Indian origin for combating COVID-19 infection by hampering the viral replication: Using structure-based drug discovery approach. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*. 2020. 1(1):1–16.
14. Alipio A. Flora etnomedicinal del cerro “La botica” empleada por el poblador de Cachicadan, Santiago de Chuco, Perú 2019. [Tesis Para optar el Grado Académico de Biólogo]. Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2018.
16. Rodriguez J. Evaluación de la eficiencia de películas bioactivas como inhibidoras de la actividad microbiana usando la técnica Kirby-Bauer y su biodegradación por envejecimiento. Universidad Nacional de Ingeniería; 2020.
17. Romero A, Baldeon I. “Actividad antibacteriana del extracto etanólico de las flores de *Tropaeolum majus* L. (mastuerzo), frente a *Staphylococcus epidermidis*, por la técnica de Kirby-Bauer.” Universidad Inca Garcilaso de la Vega. Universidad Inca Garcilaso de la Vega; 2019.
18. Jiménez H, Briseño G, Mercado E, Arenas R. Tinea pedis y otras infecciones podales: Datos clínicos y microbiológicos en 140 casos. *Dermatología Cosmet Medica y Quir*. 2017;15(3):156–61.
19. Bisso A. Vista de Fundamentos básicos de la terapia antimicrobiana. *Rev Soc Perú Med Interna*. 2018; 31 (1)(1):11–3.
20. Abubakar A, Dandare A, Magaji U, Abubakar I, Yerima M. Potenciales antifúngicos de *Acacia nlotica*, *Ziziphus pastilla* Linn y *Lawsonia inermis*. 2018;3(1):1–6.

21. Rivera L, Andrews E, García E, Herrera S. Efecto antifúngico de emulsiones a base de aceite esencial de orégano mexicano (*Lippia graveolens*), contra *Candida albicans*. Rev Salud Jalisco. 2018; 1:42–4.
22. Rasool S, Ali S, Mughal T. Antimicrobial and synergistic studies of *Ranunculus muricatus* L. against some indigenous bacteria. Pakistán Journal of Botany 2014, 46(1) pp.345-352.
23. Requejo F, Vasquez D. Efecto antimicótico “in vitro” del aceite esencial de *Origanum vulgare* “Orégano” y resinas de *Copaifera paupera* “Copaiba” sobre *Cándida albicans* ATCC20131. María Auxiliadora; 2021.
24. Idrogo G, Muñoz Jhan M. Efecto antibacteriano *in vitro* del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Ranunculus praemorsus* kunth ex DC (centella) frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. [Tesis pregrado]. [Lima]: Universidad María Auxiliadora; 2022. 56 p.
25. Chumpe M. Efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de las hojas de *berberis vulgaris* L. (agracejo) en cepas de *staphylococcus aureus* estudio in vitro. [Tesis pregrado]. [Lima]: Universidad Inca Garcilaso de la Vega; 2019. 86 p.
26. Wen Louise, Haddadb M, Fernández I, Espinoza G, Ruiz C. Actividad antifúngica de cuatro plantas usadas en la medicina tradicional Peruana: aislamiento de 3'-formil - 2',4',6' - trihidroxidihidrochalcona, principio activo de *Psidium acutangulum*. Rev. Soc. Quím. Perú, 2011; 77(3) p. 199-204.
27. Amiel J. Metodología y diseño de la investigación científica. 1st ed. Ruiz M, editor. Lima: Fondo editorial de la Universidad Científica del Sur; 2014. 1–329 p.
28. Cortez K, Mego L. Actividad antibacteriana *in vitro* del extracto hidroalcohólico de las vainas de *Caesalpinia spinosa* “Taya”, frente a *Streptococcus mutans*. Universidad Privada Antonio Guillermo Urrelo; 2017.
29. Villavicencio J. Efecto Antimicótico *in vitro* de *Origanum vulgare* sobre cepas de *Candida albicans*. Odontol Sanmarquina. 2017;19(2):5–8.

30. Lock O. Investigación fitoquímica: métodos en el estudio de productos naturales. 3rd ed. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú; 2016. 287 p.
31. Cueva J. Actividad antifúngica *in vitro* del aceite esencial y extracto alcohólico del *Syzygium aromaticum* “clavo de olor” sobre *Candida albicans* cepa ATCC 10231. Universidad Nacional de Chimborazo; 2017.
32. Oficina ejecutiva de investigación. Manual de procedimientos de ensayos clínicos. N° 279-2017-J-OPE/INS Perú: Ministerio de salud; 2017 p. 118.
33. Brítez J. La Ética en investigaciones humanas y el Comité de Ética. Rev virtual Soc Parag Med Int. 2016;3(1):8–10.
34. Lock O. Investigación fitoquímica: métodos en el estudio de productos naturales. 3rd ed. Lima: Pontificia universidad católica del Perú; 2016. 287 p.
35. Goo, Y. Therapeutic Potential of *Ranunculus Species* (Ranunculaceae): A Literature Review on Traditional Medicinal Herbs. Plants. 2022;11(12):1599-1612.

ANEXOS

ANEXO A. Instrumentos de recolección de datos.

ENSAYO ANTIMICÓTICO *IN VITRO*

Investigador(es):

Muestra:

Fecha:

N°	Frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10232				
	Control	Fluconazol 50 µg	Ext 25 %	Ext 50 %	Ext 75 %
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					

Tabla B: Marcha fitoquímica del extracto etanólico.

IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS		
Metabolitos	Reactivos	Resultado
Quinonas	Borntrager	
Compuestos fenólicos	FeCl ₃	
Flavonoides	Shinoda	
Antocianinas	NaOH 10%	
Taninos	Gelatina	
Taninos	Gelatina Sal	
Alcaloides	Dragendorff	
Alcaloides	Wagner	
Alcaloides	Mayer	
Triterpenos y Esteroides	Liebermann Burchard	
Lactonas α , β insaturadas	Baljet	
Azucres Reductores	Benedict	
Azucres Reductores	Fehling	
Saponinas	Espuma	

Donde:

- (-) Ausente
- (+) Mínimo
- (++) Mediano
- (+++)

ANEXO B. Matriz de consistencia.

Formulación del problema	Objetivos	Hipótesis
Problema General	Objetivo General	Hipótesis General
¿Cuál es el efecto antimicótico <i>in vitro</i> del extracto etanólico de <i>Ranunculus praemorsus</i> Kunth ex DC (CENTELLA) frente a cepas de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231?	Determinar el efecto antimicótico <i>in vitro</i> del extracto etanólico de <i>Ranunculus praemorsus</i> Kunth ex DC (CENTELLA) frente a cepas de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.	Una concentración específica del extracto etanólico de <i>Ranunculus praemorsus</i> Kunth ex DC (CENTELLA) tendría un efecto antimicótico <i>in vitro</i> frente a cepas de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.
Problemas Específicos	Objetivos Específicos	Hipótesis Específicas
¿Qué metabolitos posee el extracto etanólico de <i>Ranunculus praemorsus</i> Kunth ex DC (CENTELLA) responsables del efecto antimicótico <i>in vitro</i> ?	Identificar los metabolitos presentes en el extracto etanólico de <i>Ranunculus praemorsus</i> Kunth ex DC (CENTELLA) responsables del efecto antimicótico <i>in vitro</i> .	El extracto etanólico de <i>Ranunculus praemorsus</i> Kunth ex DC (CENTELLA) tiene metabolitos responsables del efecto antimicótico <i>in vitro</i> .
¿Cuál es la concentración del extracto etanólico de <i>Ranunculus praemorsus</i> Kunth ex DC (CENTELLA) que posee efecto antimicótico <i>in vitro</i> sobre <i>Candida albicans</i> ATCC 10231?	Determinar la concentración del extracto etanólico de <i>Ranunculus praemorsus</i> Kunth ex DC (CENTELLA) que posee efecto antimicótico <i>in vitro</i> sobre <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.	Existe una concentración del extracto etanólico de <i>Ranunculus praemorsus</i> Kunth ex DC (CENTELLA) que posee efecto antimicótico <i>in vitro</i> sobre <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.
¿Cuál es el efecto antimicótico <i>in vitro</i> del extracto etanólico de <i>Ranunculus praemorsus</i> Kunth ex DC (CENTELLA) comparado con fluconazol 25 µg sobre <i>Candida albicans</i> ATCC 10231?	Comparar el efecto antimicótico <i>in vitro</i> del extracto etanólico de <i>Ranunculus praemorsus</i> Kunth ex DC (CENTELLA) con fluconazol 25 µg sobre <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.	La actividad antimicótica del extracto etanólico de <i>Ranunculus praemorsus</i> Kunth ex DC (CENTELLA) es significativamente mayor comparado a discos de fluconazol 25 µg sobre <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.

ANEXO C. Operacionalización de las variables

VARIABLES	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIONES	INDICADORES	ESCALA DE MEDICIÓN	N° DE ÍTEMS	VALOR
VARIABLE INDEPENDIENTE Extracto etanólico de <i>Ranunculus praemorsus</i> Kunth ex DC (CENTELLA)	Fracción líquida obtenida por maceración etanólica, extraída de las hojas de la especie vegetal <i>Ranunculus praemorsus</i> Kunth ex DC (CENTELLA).	Se realizará una maceración de las hojas de la especie vegetal <i>Ranunculus praemorsus</i> Kunth ex DC (CENTELLA).	Fitoquímica	Pruebas de solubilidad Marcha fitoquímica	Ordinal	14	(-) Ausente (+) Escaso (++) Leve (+++) Moderado (++++) Abundante
VARIABLE DEPENDIENTE Efecto antimicótico <i>in vitro</i> frente a cepas de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.	Es la capacidad de una sustancia para inhibir y/o eliminar el crecimiento de un hongo.	Placas petri inoculadas con cepas de <i>Candida albicans</i> ATCC 10232 las cuales serán sometidas a diferentes concentraciones de extracto etanólico vegetal.	Microbiológico	Medición de diámetro de inhibición (mm)	Razón	10	<8 mm: nulo 8 – 14 mm: Sensible 14 – 20 mm: Muy sensible >20 mm: Sumamente sensible

ANEXO D. Certificado Taxonómico.



CERTIFICACION DE IDENTIFICACION BOTANICA

JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA CRUZ. BIÓLOGO COLEGIADO. CBP 3796 – INSCRITO EN EL REGISTRO DE PROFESIONALES QUE REALIZAN CERTIFICACIONES DE IDENTIFICACION TAXONÓMICA DE ESPECÍMENES Y PRODUCTOS DE FLORA – RESOLUCIÓN DIRECTORAL N.º 0311-2013- MINAGRI-DGFFS-DGEFFS.

CERTIFICA:

Que, GUTIERREZ PUJAICO, LIZZET y TORRES OCHOA, ELMER ALEJANDRO, Universidad María Auxiliadora, Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, con fines de investigación para desarrollar la tesis titulada: EFECTO ANTIMICÓTICO IN VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *RANUNCULUS PRAEMORSUS* KUNTH EX DC (CENTELLA) FRENTE A CEPAS DE *CANDIDA ALBICANS* ATCC 10231, han solicitado la identificación y certificación botánica de una planta procedente del distrito de Pulán, provincia de Santa Cruz, departamento de Cajamarca, donde es conocida con el nombre vulgar de “centella”, la muestra ha sido identificada como *Ranunculus praemorsus Kuntk ex DC*. Según la base de datos de Tropicos del Missouri Botanical Garden que sigue el sistema moderno de clasificación de las angiospermas (APG), publicado en 1998 por el Grupo para la Filogenia de las Angiospermas, el sistema APG evita el uso de la nomenclatura taxonómica clásica por arriba de orden. - Mark W. Chase & James L. Reveal (2009 – APG III) consideran a todas las plantas verdes en la Clase Equisetopsida. Teniendo en cuenta los datos de la base de wTropicos, APG III y APG IV, la especie identificada tiene las siguientes categorías taxonómicas y clados:

Reino: Plantae
División: Angiospermae
Clase: Equisetopsida
Subclase: Magnoliidae
Superorden: Ranunculanae
Orden: Ranunculales
Familia: Ranunculaceae
Género: *Ranunculus*
Especie: *Ranunculus praemorsus* Kuntk ex DC.

Nombre vulgar: “centella”

Se expide la presente certificación con fines de investigación científica.

Lima, 11 de agosto del 2022



Jirón Sánchez Silva 156 – 2do. Piso -Urb. Santa Luzmila - Lima 07

ANEXO E. Informe de análisis de laboratorio



"Año del Fortalecimiento de la Soberanía Nacional"

Informe de Resultados

Solicitado por: GUTIERREZ PUJAICO, LIZZET
TORRES OCHOA, ELMER ALEJANDRO

Muestra: Extracto de *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC (CENTELLA)

Fecha de ensayo: 27-08-2022

Microorganismo	Diámetros de inhibición en mm					
	90%	75%	50%	25%	Fluconazol 25ug	Etanol 70°
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	8.33	6	6	6	28.56	6
	8.37	6	6	6	28.58	6
	8.39	6	6	6	28.60	6
	8.37	6	6	6	28.57	6
	8.36	6	6	6	28.56	6
	8.34	6	6	6	28.55	6
	8.37	6	6	6	28.58	6
	8.35	6	6	6	28.55	6
	8.36	6	6	6	28.58	6
	8.37	6	6	6	28.57	6

*Tamaño de discos: 6mm, por lo que al reportarse 6 mm es indicativo que no existe formación halo de inhibición

*Concentración del inóculo: 1.5×10^8 UFC/mL

Lic. T.M. Walter A. Siri Rodriguez

CTMP. 10808

ANEXO F. Certificado de Agar Dextrosa Sabouraud



CERTIFICATE OF ANALYSIS

PRODUCT CM0041B
SABOURAUD DEXTROSE AGAR 500g

LOT NUMBER 2875975

EXPIRY DATE 2024.11.30

DATE OF MANUFACTURE 2019.10.21

Delivery/Customer information	
Date Printed	2019.11.05
Delivery No.	
Customer	
Customer Order Number	

Physical Characteristics	Results	Specification
Appearance	Straw powder	Straw powder
Colour on reconstitution	Straw 2	Straw 1-2
pH (25°C)	5.7	5.4 - 5.8
Clarity	Clear	Clear

Microbiological Performance	Control cfu	Test cfu	Recovery Test	
			%	Description
Aerobic incubation at 20-25°C for up to 5 days				
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i> ATCC®2700	44	45	102	Cream, domed cols
<i>Candida albicans</i> ATCC®10231	34	34	100	Cream, domed cols
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC®16404	69	79	114	White mycelia, black spores

Testing has been performed in accordance with ISO11133:2014

Aerobic incubation at 25 ± 2°C for 5 days				
<i>S. cerevisiae</i> ATCC®9763 WDCM00058	66	75	114	Cream, domed cols
<i>A. brasiliensis</i> ATCC®16404 WDCM00053	69	79	114	White mycelia, black spores

Control Medium: Sabouraud Dextrose Agar

A satisfactory result is represented by recovery of positive strains equal to or greater than 70% of the control medium. Refer to product specification for full details.



Tested by the Quality Control Laboratory
OXOID LIMITED
 Wade Road, Basingstoke, Hampshire RG24 8PW. England
 oxoid@thermofisher.com www.oxid.com

FDA Reg No. 8010096

Certificate No. FM 00914



CERTIFICATE OF ANALYSIS

PRODUCT CM0041B
SABOURAUD DEXTROSE AGAR 500g
LOT NUMBER 2875975

The information given is believed to be correct, all results reported in this certificate relate only to the product and lot stated in this certificate of analysis. However, both the information and the product are offered without warranty for any application other than that specified in the current Oxoid Manual. This certificate shall not be reproduced except in full, without written approval of the Quality Control Laboratory, Oxoid Limited, Basingstoke. The results reported were obtained at the time of release.
Lot Accepted. 2019.11.05

Carissa Courtney

.....
Carissa Courtney
Director Quality, EMEA

ATCC is a registered trade mark of the American Type Culture Collection.
NCTC and National Collection of Type Cultures are registered trade marks of the Health Protection Agency.



Tested by the Quality Control Laboratory
OXOID LIMITED
Wade Road, Basingstoke, Hampshire RG24 8PW. England
oxoid@thermofisher.com www.oxid.com

ANEXO G. Certificado de análisis de *Candida albicans* ATCC 10231



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: <i>Candida albicans</i> Catalog Number: 0443 Lot Number: 443-1195** Reference Number: ATCC® 10231™* Passage from Reference: 3 (7) Mean Assay Value (MAV): 42 CFU per 0.1 ml	Expiration Date: 2022/9/30 Release Information: Quality Control Technologist: Jackie L. Mackedanz Release Date: 2020/10/1
---	--

Performance	
Macroscopic Features: Small to medium, white, circular, convex, dull colonies. Microscopic Features: Gram positive, ovoidal, budding yeast cells.	Medium: Nutrient Method: Gram Stain (1)

ID System: MALDI-TOF (1)
 See attached ID System results document.


 Amanda Kuperus
 Director of Quality Control
 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.

⚠ 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.



(7) The Mean Assay Value (MAV) stated above may deviate from the end-user's MAV based on variables inherent to each laboratory environment, such as methods, media type, equipment, pipettes, and individual technician technique.

Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results



Meaning of Score Values

Range	Interpretation	Symbols	Color
2.00 – 3.00	High-confidence identification	(+++)	green
1.70 – 1.99	Low-confidence identification	(+)	yellow
0.00 – 1.69	No Organism Identification Possible	(-)	red

Meaning of Consistency Categories (A - C)

Category	Interpretation
(A)	High consistency: The best match is a high-confidence identification. The second-best match is (1) a high-confidence identification in which the species is identical to the best match, (2) a low-confidence identification in which the species or genus is identical to the best match, or (3) a non-identification.
(B)	Low consistency: The requirements for high consistency are not met. The best match is a high- or low-confidence identification. The second-best match is (1) a high- or low-confidence identification in which genus is identical to the best match or (2) a non-identification.
(C)	No consistency: The requirements for high or low consistency are not met.

Run Creation Date/Time: 2020-09-30T15:45:43.612 JLM

Applied MSP Library(ies): BDAL, Mycobacteria Library (bead method), Filamentous Fungi Library

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value
G2 (+++) (A)	443-1195	Candida albicans	2.29

Comments:

N/A

ANEXO H. Evidencias fotográficas

TRATAMIENTO DE LA MUESTRA



Figura 1. Muestra de tipo Hojas de *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC (centella)



Figura 3. Desinfección de la muestra



Figura 2. Lavado de la muestra



Figura 4. Escurrido de la muestra



Figura 5. Procedimiento de secado de la muestra



Figura 6. Procedimiento de molienda de la muestra



Figura 7. Preparación del macerado del extracto etanólico



Figura 8. Procedimiento de filtración del macerado del extracto etanólico

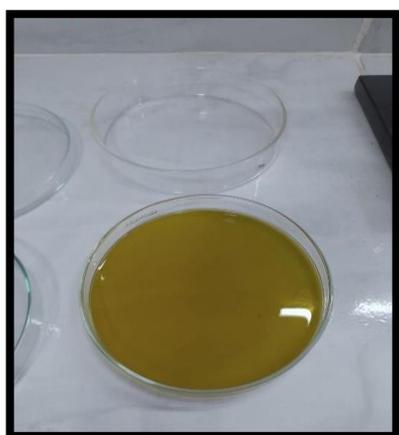


Figura 9. Obtención de extracto seco

ENSAYO MICROBIOLÓGICO



Figura 10. Pesado del Agar



Figura 11. Autoclave para el uso en la prueba microbiológica



Figura 12. Agar Saboraud Dextrosa



Figura 13. Placas preparadas



**Figura 14. Cepa biológica de tipo:
Candida albicans ATCC 10231**



**Figura 15. Comparación de turbidez mediante el
reactivo de Mc. Farland**

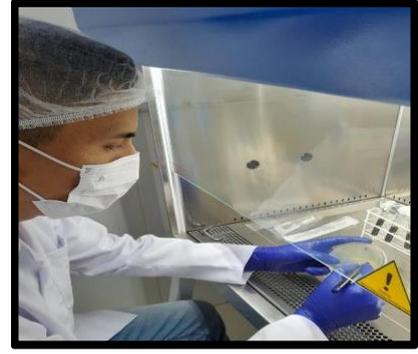


Figura 16. Rotulado de placas



Figura 17. Sembrado de la cepa biológicas en las placas



Figura 18. Preparando discos con la cepa *Candida albicans*

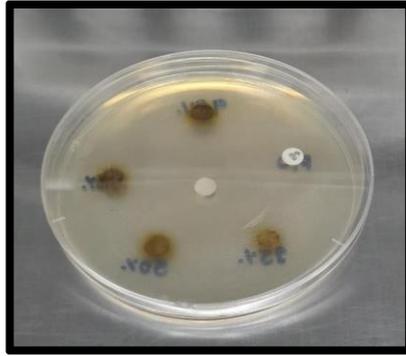


Figura 19. Placa con *C. albicans* y con discos



Figura 20. Sustancias experimentales y controles



Figura 21. Incubación de *Candida albicans* ATCC 10231

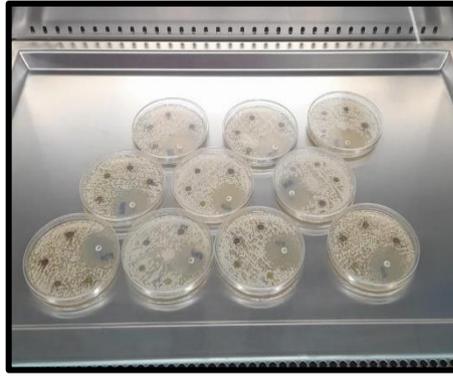


Figura 22. Placas Petri con halos de inhibición

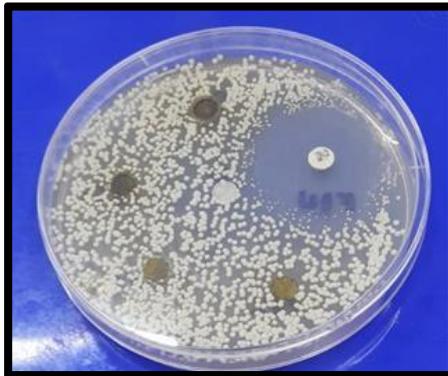


Figura 23. Lectura de resultados

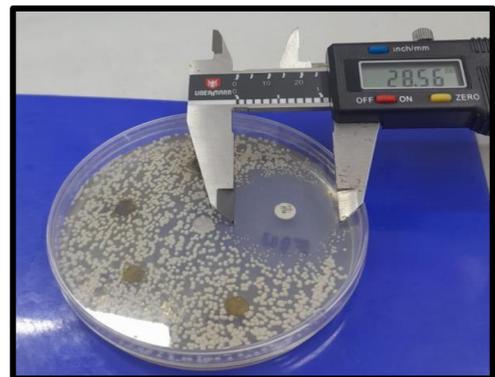


Figura 24. Lectura de resultados

ANEXO I. Porcentaje de rendimiento

Porcentaje de rendimiento

Determinación del porcentaje de rendimiento

Tenemos la cantidad de producto obtenido en la extracción química.

$$\%E = \frac{Pf}{Pi} \times 100$$

Dónde: %E = porcentaje de rendimiento

Pf = peso final (extracto seco)

Pi = peso inicial (muestra molida)

Fuente: Efecto de los extractos secos clorofórmico y de diclorometano de *Tropaeolum tuberosum* (Ruiz & Pavón) mashua sobre los parámetros seminales y toxicidad aguda

<http://www.scielo.org.co/pdf/rccqf/v48n1/0034-7418-rccqf-48-01-94.pdf>

Extracción por maceración

$$\%E = \frac{43.2 \text{ g}}{340 \text{ g}} \times 100 = 12.7\%$$

Pf= 43.2 gr extracto seco obtenido

Pi = 340 gr. muestra molida