



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Unidad de Posgrado

**Actividad antifúngica del extracto etanólico de las
hojas de *Solanum hispidum Pers* y citotoxicidad en
líneas celulares de cáncer humano**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Recursos
Vegetales y Terapéuticos

AUTOR

Jannelle Cyndi MENDOZA LEÓN

ASESOR

César Máximo FUERTES RUITÓN

Lima, Perú

2022



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

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

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Mendoza J. Actividad antifúngica del extracto etanólico de las hojas de *Solanum hispidum Pers* y citotoxicidad en líneas celulares de cáncer humano [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado; 2022.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Jannelle Cyndi Mendoza León
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	10613744
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-0948-9685
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	César Máximo Fuertes Ruitón
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	15289369
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-6170-3549
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Jorge Luis Arroyo Acevedo
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	06785241
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Yadira Fernández Jerí
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	28307333
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Jose Antonio Llahuilla Quea
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	09780810
Datos de investigación	

Línea de investigación	B.2.1.1. Plantas medicinales con potencial farmacéutico y productos terapéuticos (estudios fitoquímicos, estudios toxicológicos, estudios farmacológicos, procesos de industrialización)
Grupo de investigación	No aplica.
Agencia de financiamiento	Sin financiamiento.
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Centro Nacional de Control de Calidad y del Centro Nacional de Salud Pública del Instituto Nacional de salud. País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Chorrillos Av. Defensores del Morro N° 2268 Latitud: -12.128067 Longitud: -77.0888159
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Agosto 2020 – Noviembre 2021
URL de disciplinas OCDE	Bioquímica, Biología molecular https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.03



**ACTA DE SUSTENTACIÓN VIRTUAL DE TESIS PARA OPTAR
AL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN RECURSOS VEGETALES Y TERAPÉUTICOS**

Siendo las **09:00 hrs. del 08 de febrero de 2022** se reunieron mediante la plataforma de Google meet de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado Evaluador de tesis, presidido por el Dr. Jorge Luis Arroyo Acevedo e integrado por los siguientes miembros: Dr. César Máximo Fuertes Ruitón (Asesor), Dra. Yadira Fernández Jeri y Dr. José Antonio Llahuilla Quea; para la sustentación oral y pública de la tesis intitulada: **"ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Solanum hispidum Pers* Y CITOTOXICIDAD EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER HUMANO"**, presentado por la Bachiller en Farmacia y Bioquímica **Jannelle Cyndi Mendoza León**.

Acto seguido se procedió a la exposición de la Tesis, con el fin de optar al Grado Académico de **Magíster en Recursos Vegetales y Terapéuticos**. Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por la graduando.

A continuación, el Jurado Evaluador de Tesis procedió a la calificación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

17 (DIECISIETE) - MUY BUENO

Luego, el Presidente del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue a la Bachiller en Farmacia y Bioquímica **Jannelle Cyndi Mendoza León**, el Grado Académico de Magister en **Recursos Vegetales y Terapéuticos**.

Siendo las **10:45 hrs.** se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las **10:55 hrs.** del 08 de febrero de 2022.

Dr. Jorge Luis Arroyo Acevedo (P.P., T.C.)
Presidente

Dr. César Máximo Fuertes Ruitón (P. P., D.E.)
Miembro - Asesor

Dra. Yadira Fernández Jeri (P. P., D.E.)
Miembro

Dr. José Antonio Llahuilla Quea (P. Asoc. T.C.)
Miembro

Observaciones:

Dedicatoria

A mis amadas hijas: Grecia Alondra y Jimena Luana

A mi esposo y compañero: Javier Surichaqui

A mis queridos padres: Neptali y Laura

A mis hermanos: Anneliese, Miriam, Alan y Liliana

Agradecimientos

Al creador de todo Dios, por la vida y todas las oportunidades brindadas.

A mi asesor Dr. Cesar Fuertes Ruitón, por su constante motivación.

A mis padres por apoyarme con la información etnobotánica y en la colección de hojas.

A los coordinadores de investigación Q.F. Roberto Torres y M.V. Alberto Cisneros.

A los integrantes de los laboratorios de fisicoquímica del CNCC –INS por brindarme las facilidades, Javier M., Alfredo H., Rosa Q., Alejandro N., Héctor C. y Manuel N.

A los integrantes de los laboratorios de microbiología del CNCC –INS por brindarme el apoyo, Edith L., Ana C., Elena T., Jackeline Ch. y Christian Z.

A los integrantes del laboratorio de Cultivos Celulares del CNSP-INS por el apoyo brindado, en especial a Alberto Cisneros, Janet Otarola y Henry Bailón

A los supervisores de productos biológicos y sustancias de referencia por sus donaciones Alberto Cisneros, Elena Torres y Sandra Gayoso.

A mi amigo Alberto Chuquipiondo por su apoyo en el procesamiento de datos.

Al Jefe del INS, Directores Generales y Directores Ejecutivos por su apoyo en la autorización del uso de los laboratorios necesarios.

Al jurado evaluador por sus acertadas observaciones, Dr. Jorge Arrollo, Dr. José Llahuilla y Dra. Yadira Fernández.

A todos los colaboradores por su apoyo en este trabajo de investigación

Índice

	Página
Páginas preliminares	
Página de aceptación de la Tesis	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Índice general	v
Índice de tablas	vii
Índice de figuras	viii
Índice de abreviaturas	ix
Resumen	x
Abstract	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	2
2.1 Antecedentes de investigación	2
2.2 Aspectos teóricos	4
2.2.1 Hongos	4
2.2.2 Micosis	5
2.2.3 Cultivos celulares y líneas celulares	10
2.2.4 Cáncer	15
2.2.5 Actividad antifúngica y citotóxica en plantas medicinales	17
III. METODOLOGÍA	22
3.1 Tipo de investigación	22
3.2 Diseño de investigación	22
3.3 Consideraciones éticas	22
3.4 Diagrama de flujo del procedimiento	22
3.4.1 Selección de la muestra	22
3.4.2 Obtención del extracto etanólico estabilizado	23
3.4.3 Estudios de solubilidad	23
3.4.4 Análisis fitoquímico preliminar	24
3.4.5 Análisis cromatográfico	24
3.4.6 Determinación de la actividad antifúngica	25
3.4.7 Determinación de la concentración mínima inhibitoria	26
3.4.8 Determinación de la actividad citotóxica	30

3.4	Unidad de análisis	34
3.5	Población de estudio	34
3.6	Muestra	34
3.7	Técnicas o instrumentos de recolección de la información	34
3.8	Procesamiento de la información o de datos	35
IV.	RESULTADOS	36
4.1	Estudios de solubilidad	36
4.2	Análisis fitoquímico preliminar	37
4.3	Análisis cromatográfico	39
4.4	Determinación de la actividad antifúngica	40
4.5	Determinación de la Concentración mínima inhibitoria	44
4.6	Determinación de la actividad citotóxica	46
V.	DISCUSIÓN	49
VI.	CONCLUSIONES	54
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
VIII.	ANEXOS	66
Anexo 1	Clasificación Taxonómica de la especie	66
Anexo 2	Imágenes de la especie <i>Solanum hispidum</i> Pers	67
Anexo 3	Imágenes de resultados de las principales pruebas realizadas	68
Anexo 4	Lecturas de absorbancia en el lector de microplacas Multiskan	70
Anexo 5	Productos biológicos y medios de cultivo utilizados	71
Anexo 6	Sustancias de referencia, solventes, reactivos, equipos e instrumentos	72
Anexo 7	Estadística de datos para <i>C. albicans</i> ATCC 10231	73
Anexo 8	Estadística de datos para <i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404	75
Anexo 9	Estadística de datos frente a <i>T. mentagrophytes</i> ATCC 9533	77
Anexo 10	Resumen del tratamiento estadístico de datos para actividad antifúngica	79
Anexo 11	Cálculos de la CI 50 mediante análisis de regresión lineal	80

Índice de tablas

		Página
Tabla 1	Algunos hongos patógenos para el humano y enfermedades que producen.	5
Tabla 2	Características de las principales infecciones fúngicas	6
Tabla 3	Principales líneas celulares, medios de cultivo y sueros.	15
Tabla 4	Principales tipos de cáncer	15
Tabla 5	Compuestos antifúngicos descubiertos y métodos utilizados.	19
Tabla 6	Distribución de los pocillos para determinación de CMI de los hongos	29
Tabla 7	Criterios cuantitativos para determinar la actividad antifúngica	30
Tabla 8	Líneas celulares usadas para evaluar actividad citotóxica	30
Tabla 9	Distribución de los pocillos para las placas HT-29	32
Tabla 10	Distribución de los pocillos para las placa H-460	33
Tabla 11	Criterios cuantitativos para determinar la actividad citotóxica	34
Tabla 12	Solubilidad del extracto etanólico de <i>S. hispidum</i> Pers.	36
Tabla 13	Metabolitos presentes en el extracto etanólico de <i>S. hispidum</i> Pers.	37
Tabla 14	Metabolitos ausentes en el extracto etanólico estabilizado de <i>S. hispidum</i> Pers.	38
Tabla 15	Medida de las zonas de inhibición de <i>C. albicans</i> ATCC 10231	40
Tabla 16	Medida de las zonas de inhibición de <i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404.	41
Tabla 17	Medida de las zonas de inhibición de <i>T. mentagrophytes</i> ATCC 9533	42
Tabla 18	Resultados estadísticos para demostrar actividad antifúngica	43
Tabla 19	Valores de CMI del extracto etanólico de los hongos en estudio	45
Tabla 20	Absorbancias de microplaca para la línea celular HT-29	47
Tabla 21	Porcentaje de supervivencia celular y CI 50 para HT-29	48
Tabla 22	Absorbancias de microplaca para la línea celular H 460	49
Tabla 23	Porcentaje de supervivencia celular y CI 50 para H 460	50

Índice de figuras

		Página
Figura 1	Obtención de una línea celular	11
Figura 2	Tipos y evolución de las líneas celulares	12
Figura 3	Subcultivo en monocapa	13
Figura 4	Clasificación de las líneas celulares	14
Figura 5	Modelo esquemático de carcinogénesis	16
Figura 6	Diagrama de flujo del procedimiento	22
Figura 7	Cromatografía en capa delgada para esteroides	39
Figura 8	Cromatografía en capa delgada para alcaloides	39
Figura 9	Halo de inhibición <i>C. albicans</i> ATCC 10231	40
Figura 10	Halo de inhibición <i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404	41
Figura 11	Halo de inhibición <i>T. mentagrophytes</i> ATCC 9533	42
Figura 12	CMI para <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	44
Figura 13	CMI para <i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	44
Figura 14	CMI para <i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 9533	45
Figura 15	Imágenes microscópicas de las líneas celulares antes del tratamiento	46
Figura 16	Imágenes microscópicas de las líneas celulares después del tratamiento	46

Índice de abreviaturas

ATCC	American Type Culture Collection
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
MTT	Methyl thiazol tetrazolium
HT	Human Tumor
NCI	National Cancer Institute
CI 50	Concentración Inhibitoria 50
MEM	Medio Mínimo Esencial de Eagle
DMEM	Dulbecco MEM modificado
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
OMS	Organización Mundial de la Salud
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
FDA	Food and Drug Administration
E-test	Epsilon Test
SRB	Sulforrodamina B
ATC	Ácido tricloroacético
DMSO	Dimetilsulfóxido
D.O	Densidad óptica
SNC	Sistema Nervioso Central
INS	Instituto Nacional de Salud
CNSP	Centro Nacional de Salud Pública
CNCC	Centro Nacional de Control de Calidad
CIEI	Comité Institucional de Ética en Investigación
UV	Ultravioleta
ADS	Agar Dextrosa Saboraud
UFC	Unidades formadoras de colonias
MOPS	3-morpholine-1- sulfonic acid
FBS	Fetal Bovine Serum
PBS	Phosphate Buffered Saline
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
M	Molaridad (mol/L)

Resumen

El objetivo del presente estudio fue determinar la actividad antifúngica y citotóxica del extracto etanólico estabilizado de las hojas de *Solanum hispidum* Pers. Se realizó el análisis fitoquímico utilizando las reacciones de color y precipitación, se determinó la actividad antifúngica *in vitro* mediante el método de difusión en placa frente a *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 y *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533, posteriormente se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) por el método de microdilución colorimétrico y para la actividad citotóxica se utilizó el bioensayo de reducción del MTT (azul de tetrazolio), en líneas celulares de cáncer de colon HT-29 y cáncer de pulmón NCI-460. Los metabolitos presentes fueron los compuestos fenólicos, taninos, flavonoides, esteroides, alcaloides y saponinas; por cromatografía en capa delgada se separaron 10 alcaloides y 5 saponinas esteroidales. La actividad antifúngica se evidenció mediante zonas de inhibición superiores a 18 mm en todos los hongos (p valor < 0.05); las CMIs encontradas fueron de 125 µg/mL para *Candida albicans* ATCC 10231 y *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533 y 250 µg/mL para *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404. Para evaluar la actividad citotóxica se calculó el porcentaje de supervivencia celular, la reducción de la supervivencia fue dosis dependiente en ambas líneas celulares, encontrándose porcentajes de reducción de 77,07% a 31,91% para HT-29 y de 82,85% a 34,29% para NCI-460; los valores de CI 50 fueron 17,28 µg/mL y 22,17 µg/mL respectivamente.

Se concluye que el extracto etanólico de las hojas de *Solanum hispidum* Pers tiene actividad antifúngica y citotóxica.

Palabras clave: Actividad antifúngica, actividad citotóxica, concentración mínima inhibitoria, *Solanum hispidum* Pers, líneas celulares.

Abstract

The present research work had as general objective to determine the antifungal and cytotoxic activity of the ethanolic extract of the leaves of *Solanum hispidum* Pers.

The phytochemical analysis was carried out using the color and precipitation reactions, The *in vitro* antifungal susceptibility was determined by the diffusion method in plate against *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 and *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533, subsequently the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by the colorimetric micromethod and the cytotoxic activity was evaluated by the bioassay MTT (Methylthiazolilyldiphenyl-tetrazolium bromide), using colon cancer cell lines HT-29 and lung cancer NCI-460

The metabolites present were phenolic compounds, tannins, flavonoids, steroids, alkaloids and saponins; 10 alkaloids and 5 steroidal saponins were separated by thin layer chromatography. Antifungal activity is evidenced by clear zone with a diameter greater than 18 mm in all fungi (p value <0.05); the MICs were 125 µg/mL for *Candida albicans* ATCC 10231 and *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533 and 250 µg / mL for *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404. To evaluate the cytotoxic activity, the percentage of viability, the reduction in survival was dose dependent on both cell lines, with reduction percentages from 77.07% to 31.91% for cell lines HT-29 and from 82.85% to 34.29% for cell lines NCI-460; IC 50 values were 17.28 µg/mL and 22.17 µg/mL respectively.

The research work concludes that the ethanolic extract of the leaves of *Solanum hispidum* Pers has antifungal and cytotoxic activity, demonstrated with the statistical t test antifungal activity and correlation test for cytotoxic activity.

Key words: Antifungal activity, cytotoxic activity, minimal inhibitory concentration, *Solanum hispidum* Pers, cell lines.

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN

Las micosis, en particular las dermatofitosis, constituyen una de las patologías cutáneas más frecuentes, los estudios epidemiológicos en nuestro país sobre la incidencia en la población general de dichos procesos son numerosos, constituyendo un problema la resistencia, los fracasos terapéuticos, los efectos adversos y la toxicidad que existe con el uso de antimicóticos convencionales por lo que es necesario buscar nuevas alternativas para su tratamiento. La medicina tradicional representa una alternativa importante pero necesita ser validado hacia la medicina convencional.

El cáncer constituye un importante problema de Salud Pública a nivel mundial y una de las principales causas de muerte en nuestro país, desarrollando mayor impacto en las poblaciones de menores recursos, los tratamientos clásicos para el cáncer son la cirugía, las radiaciones y la quimioterapia; sin embargo desde la antigüedad se usan las plantas para prevenir y tratar diversos tipos de cáncer, por este motivo se empiezan a evaluar sus propiedades citotóxicas, debido a la necesidad de seguir encontrando alternativas para el tratamiento del cáncer.

En el Perú, *Solanum hispidum* Pers crece entre los 1800-3500 msnm, se distribuye principalmente en Cajamarca, Huaraz, Carhuaz entre otros; el presente estudio pretende validar el uso que le dan los pobladores de Carhuaz quienes aplican el contenido de las bayas en forma tópica, para el tratamiento de hongos de los pies, asimismo para complementar la búsqueda de plantas y extractos potencialmente activos en el tratamiento del cáncer y guiados por el género de esta especie se hace necesario una evaluación *in vitro* utilizando líneas celulares de cáncer humano.

El presente estudio experimental tiene como objetivo general: Determinar la actividad antifúngica y citotóxica del extracto etanólico de las hojas de *Solanum hispidum* Pers. y como objetivos específicos: Evaluar los principales compuestos fitoquímicos presentes en el extracto etanólico estabilizado de hojas de *Solanum hispidum* Pers, Determinar la actividad antifúngica *in vitro* del extracto etanólico de hojas de *Solanum hispidum* Pers y Determinar la actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer humano del extracto etanólico de hojas de *Solanum hispidum* Pers.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de investigación

Zamilpa et al¹, realizó estudios con el extracto metanólico de las hojas de *Solanum crysotrichum* y determinó sus propiedades antifúngicas *in vitro* para patógenos como: *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton gypseum*. Asimismo, anteriormente², se demostró que especies como *Solanum americanum* y *Solanum nigrescens* poseen actividad fungicida y fungistática para dermatofitos comunes como *Epidermophyton floccosum*, *Thichophyton rubrum* y *Trichophytum mentagrophytes*; además Yamashita et al³ logró determinar la estructura de dos nuevos glicósidos esteroidales aislados de *Solanum dulcamara* los cuales también demostraron actividad antifúngica. Herrera et al⁴ efectuó un estudio clínico con una crema derivada de *Solanum crysotrichum* en *Tinea pedis* usando como control positivo ketoconazol crema 2 %, los estudios micológicos se realizaron mediante inspección directa y aislamiento del patógeno, los resultados mostraron que el grupo experimental mostró una efectividad clínica superior 96.08 % frente al grupo control 91.67 % y mejoraron en la inspección directa 78.43 % frente al grupo control 77.78%. Además Dabur et al⁵ mencionó que el extracto metanólico de *Solanum xanthocarpum* inhibe el crecimiento de *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus niger* mediante el método de difusión en disco y dilución en caldo de cultivo.

Gonzalez M et al⁶, aportó un estudio en la especie *Solanum hispidum* Pers., guiados por el antecedente de la medicina folclórica mexicana que lo usa como antimicótico, se evaluó la actividad antifúngica de saponinas esteroidales obtenidas a partir del extracto metanólico de sus hojas, además se aisló una nueva saponina esteroideal la cual demostró también actividad antifúngica en microorganismos ATCC de *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Aspergillus niger* y *Candida albicans*, las cepas que mostraron mayor sensibilidad fueron *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum*. Chang L, Rosabal Y & Morales J⁷ realizaron un estudio sobre la composición fitoquímica de los extractos etéreo, alcohólico y acuoso de hojas y tallos de la especie *Solanum nigrum* L en Cuba y encontraron varias familias de metabolitos secundarios como alcaloides, flavonoides, cumarinas, taninos y saponinas. Asimismo en el año 2015 Shivakumar & Vidyasagar⁸ demostraron propiedades antifúngicas de los extractos metanólico y etéreo de hojas de *Solanum nigrum* L. para *Trichophyton rubrum*,

Trichophyton tonsurans, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum gypseum* y *Candida albicans*, encontrando mejor actividad en el extracto metanólico.

Toro, et al⁹ aportó un estudio de citotoxicidad de extractos acuosos de *Solanum melongena* L. (berenjena), utilizó el extracto acuoso de la cáscara y de la pulpa, en estos extractos se encontraron valores de CI 50 entre 453 y 479 µg/mL respectivamente usando tres líneas tumorales humanas TK-10 (adenocarcinoma renal), MCF-7 (adenocarcinoma de mama) y VACC-62 (melanoma); determinaron que las fracciones activas poseían naturaleza alcaloídica y esteroidea, además se aislaron componentes como solanina, solanósidos y alcaloides esteroídicos. Asimismo Villavicencio et al¹⁰ evaluó la citotoxicidad en cultivos celulares Hela (cáncer cervical) del extracto etanólico de para especies utilizadas por la medicina tradicional mexicana para curación de heridas, úlceras, tumores y cáncer cervical. Los extractos que tuvieron efecto citotóxico fueron *Juniperus deppeana* (CI 50 = 4,63 µg/mL) y *Solanum rostratum* (CI 50 = 127,5 µg/mL).

Patel et al¹¹, realizó un estudio cuyo objetivo fue evaluar la actividad anticancerígena del extracto metanólico de los frutos de *Solanum nigrum* sobre la línea celular Hela, la citotoxicidad se evaluó mediante el ensayo de SRB y el ensayo MTT, además concluyó que el extracto metanólico de *Solanum nigrum* tiene un efecto citotóxico significativo en la línea celular HeLa. También se estudió el extracto hidroalcohólico de frutos de *Solanum nigrum* L y hojas de *Cururbita pepo*, estos reportaron actividad citotóxica en líneas celulares de células cancerígenas HepG2 (hepatocarcinoma humano) y CT26 (carcinoma de colon de ratón), con una CI 50 de 56.46 µg/mL y 77.6 µg/mL para el primer extracto y CI 50 de 132.6 µg/mL y 167.2 µg/ml para el segundo extracto respectivamente; la CI 50 del extracto de *S. nigrum* fue mayor que los controles positivos, el extracto de *Taxus baccata* y el cisplatino, el estudio concluyó que el extracto de *S. nigrum* tiene actividad citotóxica en células cancerígenas¹². En el año 2014 Moglad E et al¹³ aportó un estudio de citotoxicidad del extracto metanólico de hojas y tallos de *Solanum nigrum* en líneas celulares de cáncer (PC-3 de próstata y Hela de útero) y en líneas celulares normales (3T3) fibroblastos de ratón y CC-1 hepatocitos de rata Wistar, se obtuvo un de 74.28% y 80.49% de inhibición del crecimiento de líneas de Cancer PC-3 y Hela, además los extractos tuvieron efecto no tóxico sobre líneas celulares normales con CI 50 mayor a 100 µg/mL excepto el extracto metanólico de hojas de con un 85.63% de inhibición del crecimiento. Mulkherjee et al¹⁴ realizó

estudios comparativos de las actividades antiproliferativas del extracto acuoso y extracto metanólico de *Solanum nigrum* en líneas celulares HeLa y siHa infectadas con virus del papiloma humano, el extracto metanólico mostró mayor actividad. Gallmeier M & Torres C¹⁵ estudiaron el efecto antineoplásico de *Solanum dulcamara* BIRM sobre células de carcinoma mamario canino, el extracto comercial de *S. dulcamara* se usa empíricamente para el cáncer en Chile, por ello se evaluaron sus propiedades antiproliferativa y antiinvasiva, al realizar la evaluación se demostró que poseen potencial efecto citotóxico no selectivo disminuyendo la proliferación de células tumorales y no tumorales. En el año 2018 Burger¹⁶ hizo un estudio de la actividad citotóxica del extracto crudo y dos fracciones, fracción acuosa y fracción orgánica de *Solanum aculeastrum*, los extractos fueron citotóxicos para la línea celular de neuroblastoma SH-SY5 el CI 50 10.72 µg/mL para el extracto crudo y 17.21 µg/mL para el extracto acuoso, se determinaron los alcaloides Solamargina (activo CI 50 = 15.62 µg/ml) y la solanina (no activa).

2.2. Aspectos Teóricos

2.2.1. Hongos

Los hongos son organismos eucarióticos y heterótrofos que pertenecen al reino Fungi, además pertenecen al grupo *Eumycota*¹⁷. Son diversos eucariotas que engloban a las levaduras, los mohos además a los productores de setas. Los hongos son ubicuos, tienen amplia distribución en nuestro planeta, la mayoría son benéficos mientras que algunos son dañinos¹⁸. Se estima que podrían existir hasta 1,5 millones de hongos, de los cuales se han descrito más de 100 000 especies¹⁹, de éstas sólo 500 causan enfermedades en seres humanos y aproximadamente 100 tienen la capacidad de producir infecciones en huéspedes sanos y los demás producen enfermedades en huéspedes débiles o inmunodeprimidos²⁰. Los hongos son muy importantes en actividades como la descomposición de la materia orgánica, el ciclo de nutrientes, además son necesarios en el desarrollo sostenible^{21,22}. Los hongos benéficos son importantes en la producción de metabolitos de interés en la biotecnología y la medicina; se usan en la industria de alimentos y bebidas en la elaboración del pan, queso, yogurt, cerveza, vino, etc; también en la obtención de sustancias inmunosupresoras (ciclosporina) y antibióticos (penicilina)^{22,23}. Según Estrada¹⁸ para combatir estas infecciones existen inconvenientes

como la poca disponibilidad de fármacos antifúngicos así como la resistencia que adquieren los hongos primarios y oportunistas que lo producen.

Tabla 1. Algunos hongos patógenos para el humano y enfermedades que producen

Hongos que atacan al hombre	Enfermedad
<i>Epidermophyton</i> <i>E. floccosum</i>	Tiñas: tiña del cuerpo, tiña del pie, tiña ungular.
<i>Microsporum</i> <i>M. canis, M. gypseum</i>	Tiña de la cabeza, tiña del cuerpo.
<i>Trichophyton</i> <i>T. mentagrophytes, T. rubrum</i>	Tiñas: tiña del pie, tiña de la barba, tiña de la cabeza, tiña del cuerpo, tiña de la ingle.
<i>Candida</i> <i>C. albicans</i>	Candidiasis, candidemia.
<i>Cryptococcus</i> <i>C. neoformans</i>	Criptococosis
<i>Paracoccidioides</i> <i>P. brasiliensis</i>	Paracoccidioidomicosis
<i>Aspergillus</i> <i>A. fumigatus, A. Flavus, A. niger</i>	Aspergilosis pulmonar, diseminada.
<i>Histoplasma</i> <i>H. capsulatum</i>	Histoplasmosis.

Adaptado de Zacchino²⁴.

2.2.2. Micosis

Las micosis son infecciones fúngicas, los cuales de acuerdo a su ubicación y para su mejor estudio se clasifican en superficiales y profundas: dentro de las superficiales tenemos las superficiales propiamente dichas (pitiriasis), la superficial cutánea

(dermatofitosis) y la superficial mucosa (candidiasis)²⁵; y dentro de las profundas tenemos la micosis subcutánea²⁶ y la micosis sistémica²⁷.

Tabla 2. Características de las principales infecciones fúngicas

Micosis (ubicación)	Tipo de patógeno	Órgano	Géneros más frecuentes
Superficial	Primaria	Piel y pelo	<i>Malassezia</i>
Superficial (cutánea)	Primaria	Piel y uñas	<i>Thichophyton</i> <i>Epidermophyton</i> <i>Microsporum</i>
Superficial (mucosa)	Oportunista	Vagina, boca, tractos: digestivo, urinario. Ojos	<i>Candida</i> <i>Aspergillus, fusarium</i>
Profunda (sistémica)	Primaria (Endémica)	Piel (cutáneo y subcutáneo), linfocutáneo, órganos adyacentes (huesos, médula ósea y pulmones)	<i>Coccidioides</i> <i>Histoplasma</i> <i>Blastomyces</i> <i>Paracoccidioides</i>
	Oportunista	Cualquier órgano (pulmones, cerebro, sangre, etc.)	<i>Candida</i> <i>Aspergillus</i>

Adaptado de Broks²⁰ et al y Sanchez²⁵⁻²⁷.

2.2.2.1. Micosis Superficiales

Pitiriasis

La pitiriasis es una infección superficial producida por hongos del género *Malazzesia*, antes denominados *pityrosporum*²⁸. Los hongos del género *malazzesia* se clasifican en

lipofílicas como *M. slooffiae*, *M. obtusa*, *M. furfur*, *M. sympodialis* y *M. globosa*, etc. y no lipofílicas como *M. pachydermatis*.

Son saprofitas que ocupan la superficie de la epidermis, glándulas sebáceas y folículos pilosos, estos pueden afectar la epidermis interfiriendo en la síntesis de la melanina, al parecer el hongo biosintetiza una enzima o también componentes tóxicos que destruyen las células productoras de los pigmentos²⁸. La pitiriasis versicolor es una infección superficial poco grave que por lo general no presenta síntomas y no es contagiosa; los factores que favorecen al desarrollo de esta enfermedad son el calor, la humedad, la hiperhidrosis, cierto tipo de piel grasosa y la utilización de aceites en forma tópica. Los huéspedes inmunocomprometidos desarrollan mayores complicaciones²⁸.

Dermatofitosis

La dermatofitosis es una infección superficial de la piel causada por dermatofitos²⁵. Los dermatofitos agrupan a los hongos filamentosos, pluricelulares, taxonómicamente relacionados que son capaces de adaptarse a diversos ambientes, estos parasitan las estructuras queratinizadas, por ello se les denomina queratinofílicos; y producen infecciones cutáneas, del pelo y de las uñas en seres humanos y en animales^{18,29}.

Los dermatofitos se encuentran divididos en cuatro géneros y varias especies como son: *Trichophyton*, los cuales producen tricofitias y parasitan la piel, pelo y uñas como *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*; *Microsporum* los cuales parasitan piel lampiña y pelos como *M. cannis*; *Epidermophyton* que afectan la piel, a veces las uñas pero es incapaz de parasitar el pelo, la única especie es *E. floccosum*; y *Keratinomyces* (*K. ajelloi*)^{18,25}.

La dermatofitosis se presenta con diversos síntomas que incluyen lesiones leves que pueden evidenciar inflamaciones o supuraciones intensas, conocidas también como *tineas* o tiñas y por lo general adquieren su denominación de acuerdo a su localización como *tinea pedis* (pies), cuyo agente causal principal es *Trichophyton rubrum* y es el agente causal principal de la infección más común por dermatofitos, *tinea unguium* (uñas), cuyos causantes principales son *Trichophyton mentagrophytes* y *Epidermophyton floccosum*^{18,29}, los dermatofitos afectan entre 15 – 20% de la población peruana siendo el grupo etáreo más afectado el de 16 a 30 años, la dermatofitosis crónicas más frecuente son causadas por *T. rubrum* y *T.mentagrophytes*^{30,31,32}. Los dermatofitos causan infecciones fúngicas en personas sanas e inmunocomprometidas³³.

Candidiasis superficiales

La candidiasis superficial es una infección de las mucosas causada por hongos del género *Candida*, las que producen enfermedad son *Candida albicans* y *Candida no albicans* dentro de éste grupo están *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* entre otros³⁴; *C. albicans* causa más del 90% de las infecciones fúngicas^{28,35}, es un hongo levaduriforme, predominantemente unicelular; existen varias manifestaciones:

Candidiasis intertriginosa afecta principalmente los pliegues cutáneos (axilas, ingle, mamas, glúteo, etc) y los espacios interdigitales; los factores que predisponen para la candidiasis son la falta de higiene, presencia de humedad y la temperatura local además de ciertas enfermedades preexistentes como obesidad, diabetes o inmunológicas. Las lesiones que se evidencian son placas eritematosas, vesículas o pústulas con descamación alrededor del eritema asociados a prurito en las zonas afectadas^{28,35}.

Candidiasis oral también llamada muguet, afecta la zona orofaríngea, debido al sobrecrecimiento de cepas de la flora oportunista asociados a factores que lo favorecen como el uso de corticoides y antibióticos; la infección tiene un inicio asintomático, posteriormente se experimenta ardor o dolor, llegando a dificultar la ingestión oral. Es típica la presencia de placas blanquecinas en el paladar, la mucosa de las mejillas, la lengua, los labios, etc²⁸.

Candidiasis genital, afecta a nivel de la mucosa no queratinizada genital, la vagina y el glande, presenta síntomas poco específicos que consisten en ardor, sensación de picazón, flujo vaginal y disúrea²⁸.

En el Perú las dermatomicosis crónicas más frecuentes son causadas por el género *Trichophyton* 42.6%, seguidode *C. albicans* 15.3% y *C. no albicans* 11.8%; continuan *malazzesia spp* 9.1% y las infecciones mixtas 7.2%^{30,32}.

2.2.2.2. Micosis profundas

Micosis subcutánea

La micosis subcutánea es una infección de la hipodermis causada por hongos que ingresan a través de una lesión penetrante en la piel. Entre las que producen enfermedad se encuentran esporotricosis, eumicetomas, cromomicosis, lobomicosis y rinosporidiosis. La esporotricosis se produce cuando el hongo *Sporothrix schenckii* ingresa al organismo mediante una lesión con algún material contaminado o por

inhalación con sus esporas, manifestando lesiones granulomatosas, nodulares o ulceraciones en la dermis e hipodermis. El eumicetoma se produce cuando hongos Eumycetos infectan el tejido subcutáneo causando lesiones granulomatosas crónicas, incremento del volumen de la hipodermis, incluso afectan el tejido muscular y los huesos produciendo nódulos firmes con fibrosis y deformaciones en la zona afectada, afectan generalmente las extremidades inferiores a nivel del pie. La cromomicosis se presenta con síntomas similares a la esporotricosis²⁶.

En el Perú esporotricosis es endémico principalmente en Abancay, seguido de Cajamarca, Ayacucho, Cuzco y Otuzco (La Libertad); el grupo etéreo más afectado son los menores de 14 años³⁶ y la forma más frecuente de diseminación es la cutáneo-linfática³⁷. Continúan en frecuencia las cromomicosis y micetomas³⁶.

Micosis sistémica

Es una infección fúngica de los órganos internos que se inicia en sitios profundos, adquirida vía cutáneo-linfo-hemática o inhalatoria afectando principalmente los pulmones y el tracto gastrointestinal incluso pueden generalizarse. La micosis sistémica se agrupa en dos dependiendo de la capacidad infectiva del hongo: Micosis sistémica por hongo verdadero (patógeno primario) y micosis sistémica oportunista²⁷.

La micosis sistémica por hongo verdadero es producida por organismos que tienen la capacidad de infectar a huéspedes inmunocompetentes, se presentan con síntomas generales como fiebre, dolor, inflamación de los ganglios y dolor torácico, se adquieren principalmente por vía inhalatoria. Las micosis sistémicas producidas por hongos verdaderos son: Paracoccidioidomicosis, histoplasmosis, coccidioidomicosis y blastomicosis. La paracoccidioidomicosis afecta sólo a América Latina³⁸, es causado por *Paracoccidioides brasiliensis* y en el Perú se presenta en las regiones tropicales de la Selva Peruana³⁶.

Las micosis sistémicas oportunistas afectan a pacientes inmunocomprometidos (SIDA, enfermedades malignas, enfermedades neutropénicas, intervenidos con cirugías extensas o trasplantes de órganos); son producidas por hongos saprofitos que causan enfermedades como las candidiasis, las aspergilosis, las criptococosis y las zigomicosis sistémicas²⁷. La candidiasis sistémica ingresa al torrente sanguíneo a través del tracto gastrointestinal y la piel³⁴. La aspergilosis generalmente afecta el aparato respiratorio, el aspergillus es ubicuo y pocos pueden causar enfermedades graves

cuando las personas inmunocomprometidas, enfermedad pulmonar subyacente o asma inhalan sus esporas fúngicas³⁹, la aspergilosis invasiva es causada mayormente por *A. fumigatus*, *A. flavus* y *A. terreus*⁴⁰.

En el Perú se estima que candidiasis, incluyendo candidiasis vulvovaginal, oral, esofágica y candidemia; además aspergilosis, incluyendo aspergilosis crónica pulmonar, invasiva y broncopulmonar alérgica, son las infecciones fúngicas más frecuentes afectando al 1.9% de la población⁴¹ y las micosis profundas que afectan son Esporotricosis (38%), paracoccidiomicosis (34%), eumicetomas (13%), cromomicosis (5%), histoplasmosis (4%), criptococosis (4%), lobomicosis (1%)⁴¹.

A nivel mundial las enfermedades fúngicas causan muertes entre 1,5 a 2 millones de personas al año siendo los principales afectados los inmunocomprometidos con infecciones como candidiasis, aspergilosis invasiva, meningitis criptocócica, seguidos de histoplasmosis diseminada y neumonía por neumocistis⁴².

2.2.3. Cultivos Celulares y líneas celulares

El uso de la técnica de cultivos celulares comenzó con Harrison (1907) y A. Carrel (1912)⁴³; sin embargo Earle (1948) alcanzó obtener la línea celular L, primera línea celular de mamíferos (ratón) y Gry (1952) logró cultivar la línea celular HeLa, primera línea celular derivada de un tumor humano (cáncer cervical); y hasta finales del siglo pasado existían en el mundo 50 laboratorios que lo utilizaban⁴⁴, sin embargo su uso se ha incrementado por varios motivos: reduce considerablemente el uso de animales de experimentación, se manipulan fácilmente en condiciones adecuadas, se trabaja con muestra homogénea, es posible trabajar en pequeña, mediana y a gran escala; resulta económico en investigación de fármacos, las líneas celulares pueden mantenerse o preservarse por largos periodos mediante la criopreservación y se encuentran disponibles numerosas líneas celulares debidamente caracterizados en bancos internacionales⁴⁵. El desarrollo de la biotecnología y la biología molecular hacen posible obtener células de todo origen para realizar diversos estudios con gran potencial e impacto⁴⁶, especialmente para probar medicamentos nuevos y para investigación⁴⁷. El cultivo celular se define como una serie de procesos que permiten preservar las células *in vitro*⁴⁸, conservando al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas⁴⁵. La línea celular de cultivo se define como células obtenidas a partir de un cultivo o explante primario que se ha adaptado para crecer continuamente en el laboratorio y que

tiene múltiples usos, se usa en investigación (investigación del cáncer), en virología, ingeniería de proteínas, inmunología (producción de vacunas y anticuerpos monoclonales), estudios de interacción y señalización celular, en la diferenciación y el desarrollo, en toxicología (citotoxicidad, mutagénesis, carcinogénesis)⁴⁷.

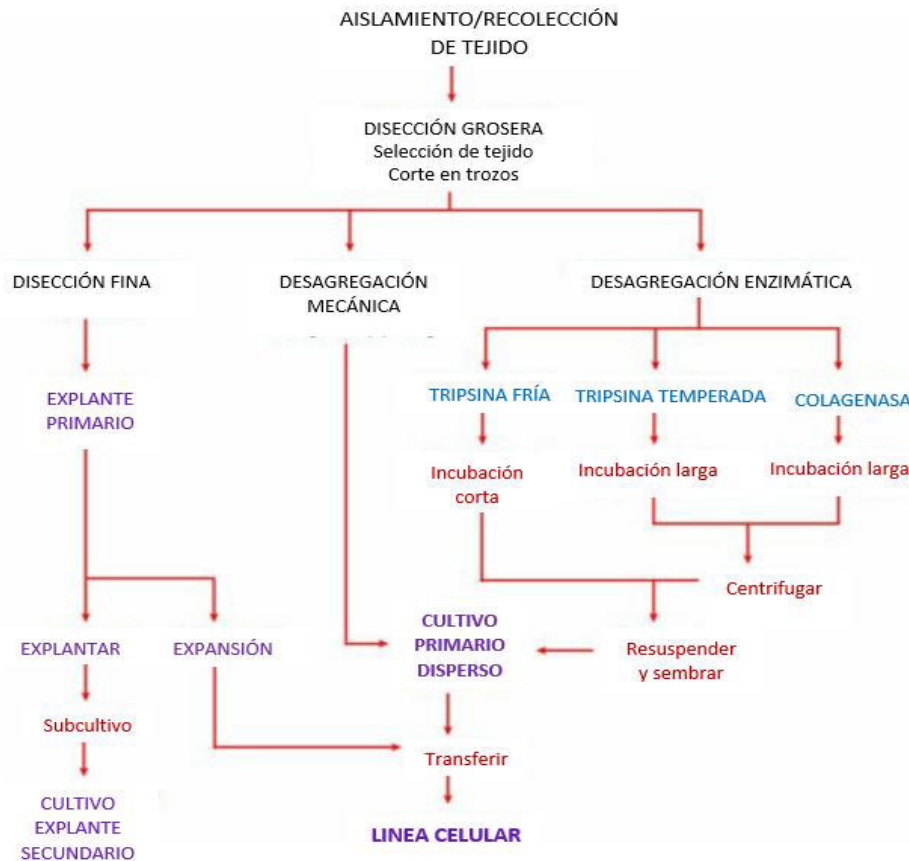


Figura 1. Obtención de una línea celular a partir de cultivo primario y del aislamiento de tejidos⁴⁸.

Tipos de cultivos celulares

Cultivos Primarios: Cultivo de células, tejidos u órganos tomados directamente del organismo y puestos a crecer en un medio artificial⁴⁹, estas son poblaciones con tiempo de duplicación lento⁴⁸, con este cultivo se inicia un conjunto de procesos selectivos que finalmente dan lugar a una línea celular uniforme⁴⁵.

Línea Celular: Cultivo de células uniformes con gran capacidad de multiplicarse *in vitro*, obtenido desde el primer pasaje de un cultivo primario y que mantiene las características propias del tejido o tumor de origen⁴³.

Línea celular primaria: Son poblaciones de células que se duplican en forma rápida y óptima, se clasifica en dos tipos⁴³:

- o Línea celular continua: Línea celular que puede ser subcultivada *in vitro* indefinidamente (≥ 70 subcultivos).
- o Línea celular finita: Línea celular que tiene un número definido de posibles subcultivos (alrededor de 50).

Línea celular secundaria: Son células con signos de deterioro, presentan tiempos de duplicación lentos, los cuales derivan en transformación, senescencia y muerte.

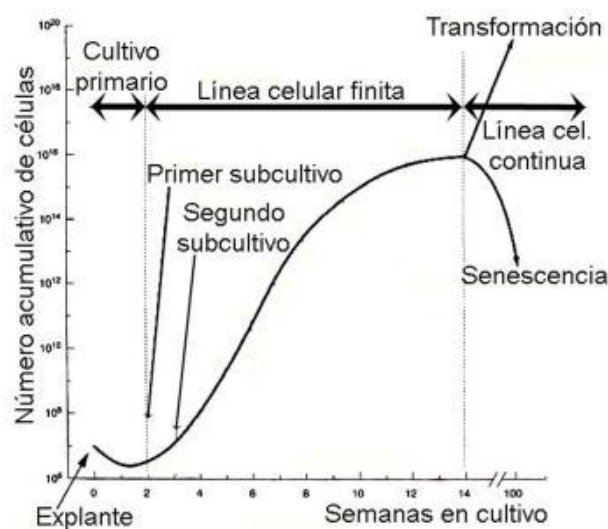


Figura 2. Tipos y evolución de las líneas celulares⁴⁵.

Curva de crecimiento de los cultivos celulares⁵⁰

La curva de crecimiento de los cultivos celulares después de la siembra en un sustrato, se divide en cuatro fases con periodos de duración distintos;

- Fase de Latencia: Las células del cultivo no aumentan, incluso pueden reducirse debido a que se están restableciendo del shock propio del subcultivo, restaurando daños, reponiendo elementos perdidos con la tripsinización como el glicocalix hasta lograr adhesión al sustrato.
- Fase logarítmica o de Crecimiento exponencial: El número de células aumenta, incrementándose de manera óptima, dependiendo del número de células y la velocidad de crecimiento se duplican en promedio cada 24 horas, en esta fase se determina el tiempo de duplicación de la población celular.

- Fase estacionaria o de confluencia: Las células del cultivo se saturan y dejan de dividirse, el sistema permanece viable pero estable; la inhibición es por contacto en monocapa y en suspensión es por consumo del medio.
- Fase de decaimiento o muerte: Las células entran en una fase de senescencia que termina con la muerte celular, cuando el cultivo se extiende por demasiado tiempo.

Proceso de cultivo de las líneas celulares

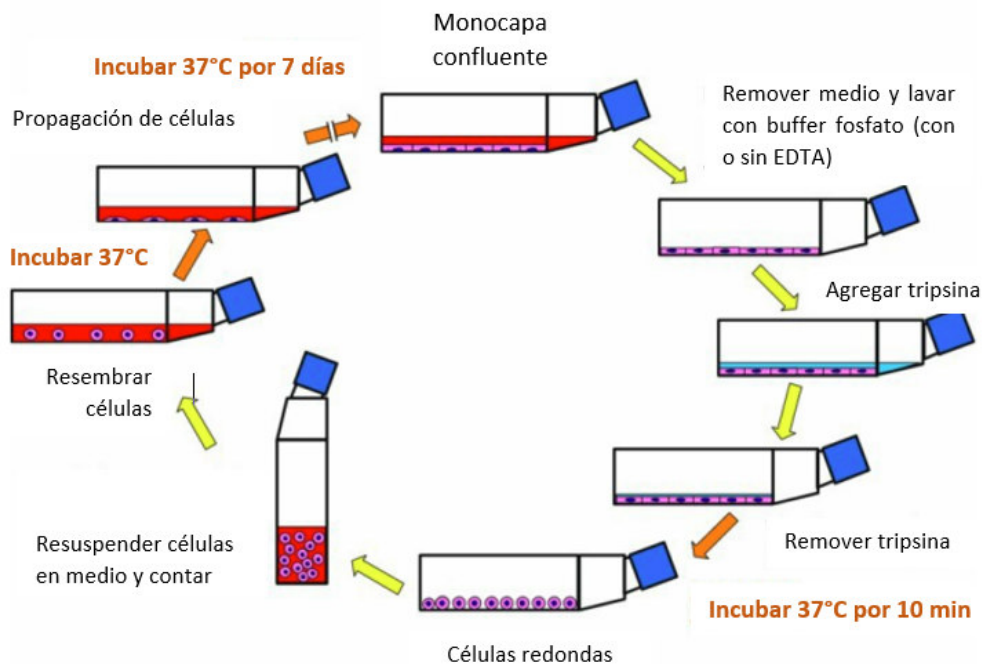


Figura 3. Subcultivo en monocapa: Etapas del ciclo de subcultivo y crecimiento de células monocapa después de la tripsinización⁴⁸.

Para cada prueba, se debe trazar previamente una curva de crecimiento celular en cada sustrato, de modo que se pueda determinar el periodo de retraso, el tiempo de duplicación y la densidad de saturación (densidad celular en la meseta); un retraso prolongado implica que el cultivo debe adaptarse al sustrato; son preferibles tiempos de duplicación cortos cuando se desea optimizar el número de células, la densidad de saturación y los costos; el rendimiento de la curva de crecimiento puede realizarse de manera simplificada mediante el uso de placas multipocillo y un criterio de valoración cromogénico como el ensayo MTT^{51,52}, alternativamente el monitoreo continuo *in situ* mediante análisis de imágenes permite un análisis rápido de las curvas de crecimiento sin la necesidad de muestrear y contar⁵².

Clasificación de las líneas celulares

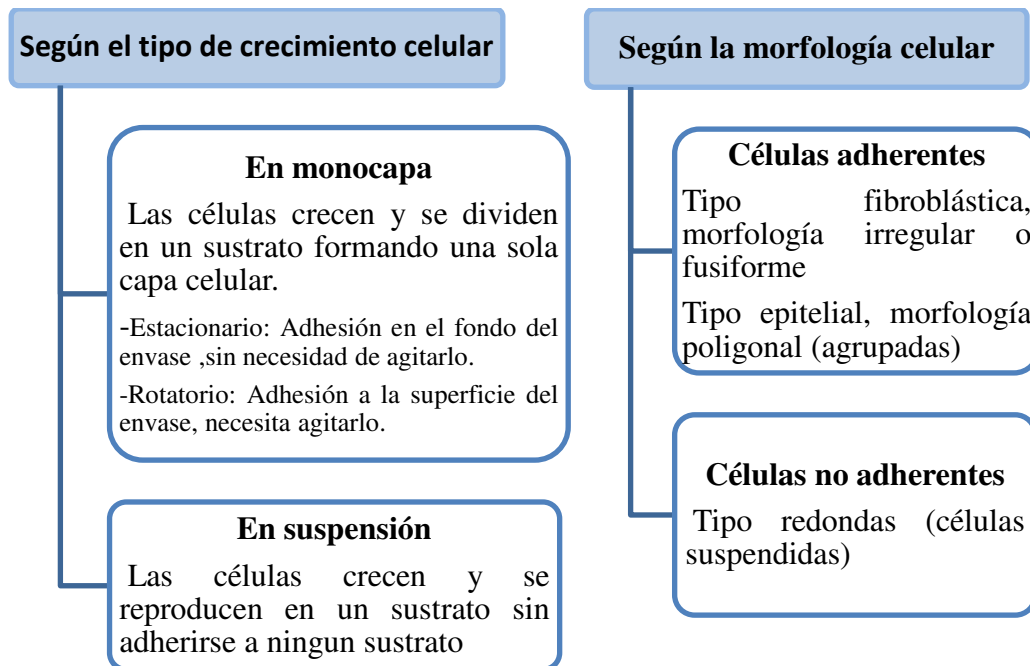


Figura 4. Clasificación de las líneas celulares, adaptado^{50,53}.

Factores que influyen en el desarrollo de líneas celulares

Los principales factores son la naturaleza del sustrato, las condiciones fisicoquímicas del medio de cultivo y las condiciones de incubación^{49,50,53}.

Naturaleza del sustrato: La capacidad de las células de adherirse al sustrato depende de las propiedades físicas del envase (vidrio, plástico desechable, microsoportes) y del medio de crecimiento, el aislamiento y la propagación de células; una línea celular específica puede requerir un medio selectivo sin suero mientras que las células cultivadas para la formación de productos, como huéspedes para la propagación viral o para estudios moleculares, se basan principalmente en el MEM de Eagle, el DMEM que contiene mayor cantidad de aminoácidos y vitaminas, o el RPMI 1640 que está suplementado con selenio, insulina y transferrina; suplementados con suero.

Las condiciones fisicoquímicas y de incubación que influyen son: PH (> 7.4), %CO₂ (5%), Bicarbonatos, buffers, osmolaridad, temperatura (37 °C), viscosidad, la tensión superficial y la presencia de espuma, factores adicionales son el balance de sales, proteínas, lípidos, nutrientes, sueros (suero fetal bovino), los suplementos orgánicos (aminoácidos, vitaminas, glucosa, hormonas y factores de crecimiento), suplementos inorgánicos (minerales, sales y cofactores) así como de los inhibidores (antibióticos); el

suero de ternera y suero fetal bovino contiene hormonas, factores de crecimiento y otros involucrados en el transporte de nutrientes⁴⁸.

Tabla 3. Principales líneas celulares, medios de cultivo y sueros

Líneas celulares	Medio de cultivo	Suero
3T3	MEM, DMEM	Suero de ternera
Fibroblastos	Eagle's MEM	Suero de ternera
Línea celular continua	Eagle's MEM, DMEM	Suero de ternera
Tumores Humanos	DMEM/F12, L15, RPMI 1640	Suero fetal bovino

Adaptado de Freshney⁴⁸.

2.2.4. Cáncer

Es una enfermedad en la que aparecen células anormales que se multiplican de manera descontrolada, invadiendo y destruyendo tejidos circundantes; muchas células cancerosas se diseminan mediante el sistema hemolinfático⁴⁷.

Tabla 4. Principales tipos de cáncer

Denominación	Iniciación	Lugar que afecta
Carcinomas	Células epiteliales	Epitelio externo e interno de órganos del cuerpo.
Sarcomas	Células óseas, musculares, condrocitos, adipocitos.	Huesos, tendones, articulaciones y músculos
Leucemias	Células sanguíneas	Médula ósea
Linfomas	Células inmunitarias	Sistema inmunitario y sistema linfático
Mielomas	Células plasmáticas	Sistema inmunitario
Cáncer del SNC	Células nerviosas	Tejido encefálico y medula espinal

Adaptado^{47,54}.

El cáncer de colon se presenta en los tejidos del intestino grueso, la mayoría se presentan como adenocarcinoma, cáncer cuyo inicio se da en las células de la mucosa (productoras de moco además de otros líquidos). El cáncer de pulmón se presenta como carcinoma, debido a que se inicia en los tejidos del pulmón generalmente en las células que recubren las vías respiratorias; existen dos formas de presentación principales, cáncer de pulmón de células pequeñas y cáncer de pulmón de células no pequeñas; estos tipos de cáncer se diagnostican con base en el aspecto que tengan las células bajo un microscopio^{47,55}.

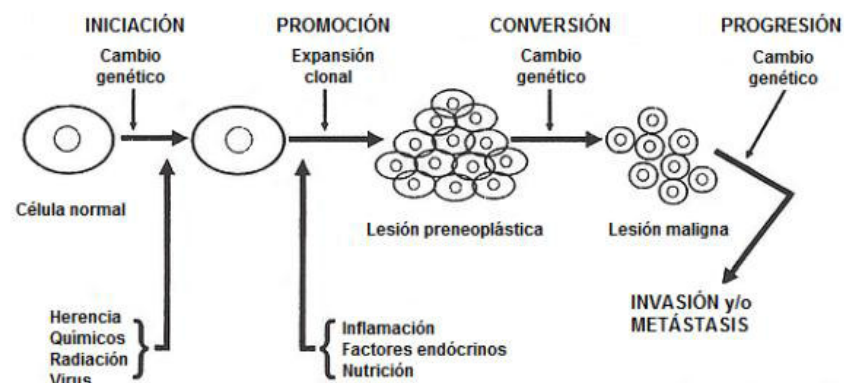


Figura 5. Modelo esquemático de carcinogénesis⁵⁶.

Las células cancerosas son las fundadoras de la enfermedad, que inician y dirigen el avance de la progresión del tumor, portando una serie de mutaciones, existe una subclase de células neoplásicas del tumor conocidas como células madre cancerosas, éstas células poseen características y marcadores propios de las líneas celulares normales y aparecen particularmente en los carcinomas⁵⁷.

En Lima metropolitana, en el año 1994 afectaban principalmente el cáncer gástrico, cáncer de mama, cuello uterino, pulmón, próstata e hígado; en el año 2016 de acuerdo al sexo la distribución del cáncer era del 56,3% para mujeres y 43,7% para varones⁵⁸; datos más actuales señalan que cada año se diagnostican 66 000 nuevos casos de cáncer en el Perú y fallecen 32 000⁵⁹, para el año 2018 la primera causa de muerte en el Perú fue el cáncer, dentro de los más frecuentes tenemos en mujeres cáncer mamario (19%), cervical (11%) y gástrico (7%) y en varones cáncer prostático (25%), gástrico (10%) y colorrectal (7%); y dentro de las más mortales tenemos cáncer gástrico (13,9%), pulmonar (8,6%) y de prostático (8,2%), se consideran factores de riesgo la estructura

etárea poblacional, estilos de vida sedentarios, dieta no saludable, entre otros⁶⁰. En el año 2019 la mortalidad más elevada fue para cáncer de próstata, estómago, mama, colorrectal y cérvix, además un estudio por regiones señala que en la sierra afecta principalmente el cáncer gástrico, en la selva el cáncer cérvico uterino y en la costa central y sur el cáncer de pulmón⁵⁸.

2.2.5. Actividad antifúngica y citotóxica en plantas medicinales

Desde la antigüedad se hace uso de las plantas para el tratamiento de enfermedades^{61,62}. La OMS⁶³ define las plantas medicinales como aquellas que en uno o más órganos (hoja, flor, tallo, raíz, fruto, etc) contienen sustancias que pueden ser utilizadas con fines terapéuticos o que son precursores en la obtención de medicamentos y define droga vegetal como parte de la planta medicinal en la que se concentra la mayor cantidad de componentes activos; El uso de plantas y sus extractos ha permitido el descubrimiento del 74% de sustancias químicas vegetales que se usan como fármacos en la actualidad^{64,65}. Los compuestos obtenidos de las plantas con mayor actividad son: terpenos, compuestos fenólicos, flavonoides, cumarinas, alcaloides, saponinas, etc⁶⁶.

Las familias más citadas por su actividad antifúngica *in vitro* son Famiaceae, Fabaceae, Asteraceae y Solanaceae⁶⁷; mientras que los metabolitos más citados por su actividad antifúngica son compuestos fenólicos 47%, terpenoides 20% y alcaloides 11%⁶⁸. Los metabolitos más citados por su actividad citotóxica son los compuestos fenólicos, terpenoides, acetogeninas y alcaloides⁶⁹, estos se encuentran en familias como Malvaceae y Asteraceae⁷⁰, específicamente las familias Lythraceae y Asteraceae para cáncer de colon, pulmón y próstata revelando compuestos fenólicos, taninos hidrolizables, antocianinas, flavonoides y terpenoides⁷¹.

2.2.5.1. Determinación de la actividad antifúngica

Para detectar agentes antifúngicos *in vitro* se usan diferentes tipos de ensayos que dependen del medio de cultivo a emplear, el antibiótico o extracto a cuantificar y la cepa fúngica a probar; es así que se dispone de ensayos útiles para determinar la CMI o concentración mínima inhibitoria que consiste en determinar la concentración mínima de antimicrobiano capaz de impedir el crecimiento de un microorganismo en las condiciones establecidas^{72,73}.

Métodos de difusión: En esta técnica, el extracto de la planta o compuesto a probar contenido en un reservorio (discos de papel, agujeros en el medio de cultivo o cilindros sobre su superficie), se pone en contacto con un medio sólido (p.e. agar), inoculado con un hongo determinado. Luego de un tiempo adecuado de incubación, se mide el diámetro o el radio de la zona clara (donde no hubo crecimiento). La información que brinda es cualitativa, útil para establecer la sensibilidad del microorganismo, también nos permite establecer una comparación con una sustancia control. El método presenta problemas con sustancias que no difundan en el medio^{24,72}.

Métodos de dilución: En este tipo de métodos, una cantidad fija de muestra a ser probada es mezclada homogéneamente con un medio conveniente (p.e. agar, caldo, etc). Usualmente se hacen diluciones de la muestra original a cada una de las cuales se inoculan con el hongo a probar y se determina la CMI, tiene la ventaja de ser cuantitativo y puede ser usado tanto con muestras solubles e insolubles con agua^{24,72,74}. En este grupo se incluye el método de macrodilución en caldo y el método de microdilución en caldo, para este último se dispone de los estándares CLSI, con la cual se puede evaluar la susceptibilidad antifúngica además son muy útiles para medir la CMI, el método M-27-A2 CLSI⁷⁵ para levaduras y *Candida sp*, el método M38-A CLSI⁷⁶ para dermatofitos y hongos filamentosos como *Aspergillus sp* y el método M44-A Difusión en disco⁷⁷.

Métodos bioautográficos: Es un método de mucha utilidad para la localización de compuestos antifúngicos en un cromatograma de un extracto complejo, esto permite el aislamiento bioguiado de los compuestos activos; una de las técnicas es la bioautografía por inmersión, en la cual un medio de agar inoculado es aplicado sobre la placa cromatográfica en la que ha corrido el extracto. Los compuestos deben pasar al agar por difusión y las zonas de inhibición son visualizadas con un colorante vital²⁴.

Métodos comerciales: Tenemos a los métodos aprobados por la FDA como Epsilon test, dilución en agar o E-Test⁷⁸, que es una expansión de la técnica de difusión en disco y consiste en la inoculación de un hongo en la superficie del agar en la que se incorpora en discos un gradiente predefinido de antimicrobiano equivalente a 15 diluciones⁷⁴; Sensitre® Yeast one que consiste en microdilución utilizando azul de alamar como indicador colorimétrico de oxidación-reducción y Vitek 2®, método automatizado para determinar la CMI por lectura espectrofotométrica, muy usado en levaduras⁷⁸.

Tabla 5. Compuestos antifúngicos descubiertos y métodos utilizados

Tipo de compuesto	Fuente natural	Método utilizado
Alcaloides	<i>Liriodendrum tulipifera</i>	Difusión
Biflavonas	<i>Cupressocyparis leylandii</i>	Dilución
Antraquinonas	<i>Morinda lucida</i>	Bioautografía
Triterpenoides	<i>Terminalia bellerica</i>	Difusión + dilución
	<i>Lantana indica</i>	Dilución
Saponinas esteroidales	<i>Solanum nigrescens</i>	Dilución
	<i>Trillium grandiflorum</i>	Difusión + dilución

Adaptado de Zacchino²⁴

2.2.5.2. Determinación de la actividad citotóxica

Para evaluar la actividad citotóxica existen bioensayos *in vitro*, mediante el uso de las líneas celulares⁷⁹. Estos ensayos son muy usados para determinar citotoxicidad de agentes químicos y drogas además permite la detección de cambios celulares tempranos que podrían ser inadvertidos *in vivo*⁴⁶. La citotoxicidad celular se define como una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a que se produzca un daño que puede ser detectado⁸⁰ y la evaluación de la citotoxicidad en un ambiente controlado hace posible detectar cambios en la función celular como alteración de la permeabilidad de la membrana celular, de la división celular, de la biosíntesis proteica, hormonal o enzimática, el metabolismo energético, además las transformaciones celulares, las alteraciones y mutaciones genéticas así como cuantificar la supervivencia celular⁴⁸. Se emplean dos tipos de ensayos:

Los ensayos que miden la integridad de la membrana: se basa en la exclusión celular con el uso de colorantes como el rojo neutro (las células viables tienen la capacidad de retención del colorante)⁸¹, Azul de kenacid (las células viables retienen el colorante)^{82,83}; violeta de genciana y azul de tripano (tiñen las células muertas debido a que el colorante no puede atravesar la membrana selectiva de la célula viva)⁸³. Para

células cancerígenas son ampliamente usadas la eosina que tiñe de color rosa anaranjado el citoplasma, pared celular, colágeno, tejido conjuntivo y otras estructuras de células vivas y la hematoxilina que tiñe de color violeta azulado intenso los ribosomas, cromatina y estructuras del núcleo⁴⁷.

Los ensayos que miden la actividad metabólica celular: se basa en la medición de productos de la actividad metabólica celular con el uso de colorantes indicadores de viabilidad celular, el proceso incluye los siguientes pasos: primero lograr el desarrollo celular en un medio de cultivo, segundo enfrentar las células viables obtenidas con una concentración conocida del compuesto a evaluar, tercero incubarlas durante un tiempo y temperatura adecuados y por último usar un colorante redox para medir la citotoxicidad.

El bioensayo de citotoxicidad por sulforrodamina consiste en el uso sulforrodamina B (SRB), colorante aniónico que se une electrostáticamente a proteínas aniónicas de células cancerosas que han sido previamente precipitadas con ácido tricloroacético (ATC) y posterior lectura de absorbancia a 450 nm ó 515 nm en microplacas⁸⁴. La densidad óptica es directamente proporcional al crecimiento celular e inversamente proporcional al grado de citotoxicidad en la célula⁵². El bioensayo MTT, consiste en el uso de las sales de tetrazolio y se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), en las mitocondrias de las células viables se reduce a formazan y este complejo MTT-formazán producido se puede determinar espectrofotométricamente una vez que el MTT-formazán se haya disuelto en un disolvente adecuado DMSO dimetilsulfóxido. La capacidad de las células para reducir el MTT constituye un indicador de la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional es interpretada como una medida de la viabilidad celular^{48,51}; es ampliamente usado en el tamizaje de drogas cancerígenas⁵². El bioensayo de resazurina^{85,86} o azul de alamar permite determinar la citotoxicidad de diferentes compuestos de manera no destructiva debido a que son colorantes no tóxicos para las células y se basan en la detección de la viabilidad mediante el uso de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa, las células viables reducen la resazurina a resorufina y dihidroresorufina, estos compuestos son detectables mediante medición de fluorescencia y absorbancia respectivamente. Las células no viables perdieron su capacidad metabólica y no podrán reducir al colorante. Las células muertas no tienen capacidad metabólica y no reducirán al colorante⁸³.

2.2.5.3. *Solanum hispidum*. Pers

Esta especie es de la familia *Solanaceae*, las cuales son plantas herbáceas o leñosas con las hojas alternas, simples y sin estípulas; son dicotiledóneas con alrededor de 98 géneros además 2700 especies, mega diversos en hábitat, morfología y ecología. La familia es cosmopolita, distribuyéndose por toda la tierra con la excepción de la Antártida. América del Sur y América Central albergan la mayor diversidad de sus especies⁶⁴. La familia *Solanaceae* es una de las más ricas en especies en la flora peruana⁸⁷. El género *Solanum*, mayoritario de las *Solanaceae*, con aproximadamente 1400 especies, siendo en América del sur endémico y mega diverso⁸⁸. En el Perú para el género *Solanum* L. existe un listado de 276 especies (253 nativas y 23 introducidas), el pico de mayor diversidad se observa entre 2500 y 3000 msnm, sin embargo la mayor diversidad de especies endémicas se encuentran entre 3000 y 3500 msnm, Cajamarca (Cajamarca) tiene el mayor número de especies endémicas, seguido de Huaraz y Carhuaz (Ancash): y Canta y huarochirí (Lima). *Solanum hispidum* Pers es endémica⁸⁹, tiene un altura entre 1,5 a 2,5 metros, de copa redonda, posee espinas en su tallo, las hojas son aterciopeladas, grandes y ovaladas con presencia de espinas en el haz y envés, las flores son hermafroditas lilas o tonos azulados, los frutos consisten en bayas verdes y son amarillos en la madurez, contienen semillas aplanadas de 1,5 mm aproximadamente, esta especie es nativa de Sudamérica (Perú, Colombia, Ecuador y Bolivia), de México y Guatemala⁹⁰.

Clasificación Taxonómica

División: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUBCLASE: ASTERIDAE

ORDEN: SOLANALES

FAMILIA: SOLANACEAE

GENERO: *Solanum*

Especie: *Solanum hispidum* Pers.

Nombre vulgar: Ñahui pashta

Determinado por Mg. Asunción Alipio Cano Echevarría y Blgo. Paúl Gonzales Arce.

En abril del 2017 Una porción de la parte aérea se conservó para su identificación en el Herbario de la UNMSM donde se conserva un boletín.

CAPITULO III. METODOLOGÍA

3.1. Tipo de investigación

El presente trabajo de investigación es experimental, prospectivo y de causalidad.

3.2. Diseño de investigación

Diseño con pos prueba únicamente y grupo control

3.3. Consideraciones éticas

En el presente trabajo de investigación no existen problemas éticos ni morales debido a que se cumplieron con los criterios establecidos por el diseño de investigación de la UNMSM y del CIEI - INS; de manera similar se respetó la autoría de la información bibliográfica haciendo referencia a los autores con sus respectivos datos.

3.4. Diagrama de flujo del procedimiento

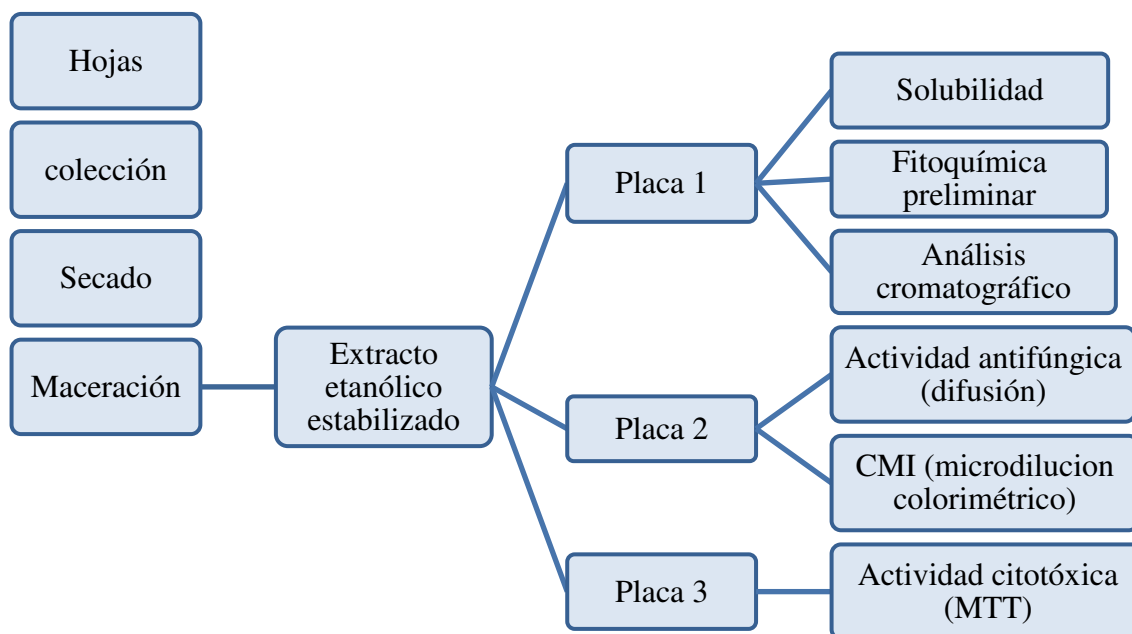


Figura 6. Diagrama de flujo del procedimiento.

3.4.1. Selección de la muestra

Se colectaron las partes aéreas de varios individuos distribuidos al azar, se seleccionaron las hojas procurando que todas correspondan a la misma etapa fenológica, que sean de similar tamaño y no se encuentren deterioradas⁹¹. La selección de las hojas sanas se realizó de manera cuidadosa utilizando una tijera, en agosto del 2020, se realizó

el traslado en caja de cartón separadas con papel kraft para asegurar su integridad y evitar daños, en el laboratorio de fisicoquímica del Centro Nacional de Control de Calidad - INS las hojas se lavaron para eliminar el exceso de tierra y partículas extrañas que pudieran presentar⁹¹.

Se procedió al secado extendiéndolas en papel kraft sobre una mesa por 7 días, realizando el cambio de papel kraft todos los días, se completó el secado a 40°C en estufa de aire circulante marca MEMMERT por un periodo de 5 días, finalmente se trituró y se realizó la molienda de las hojas secas, las cuales fueron reducidas a polvo fino en un molino de cuchillas. El polvo así obtenido fue almacenado en porciones de 100 g aprox. en bolsas de plástico con cierre hermético conservándolo en un desecador a temperatura ambiente hasta su posterior utilización⁹¹.

3.4.2. Obtención del extracto etanólico estabilizado.

Se procedió a pesar 100 g de polvo fino, se adicionaron 900 mL de etanol al 90% y se maceró en frasco de vidrio ámbar a temperatura ambiente con agitación durante 7 días. El extracto obtenido fue filtrado con una gasa, luego a través papel de filtro rápido (Whatman), posteriormente se evaporó a presión reducida en un rotaevaporador Buchi a 40 °C y 60 rpm para extraer el etanol y preservar la potencial actividad en el extracto etanólico estabilizado^{91,92}. Se logró obtener 15,06 g de extracto seco estabilizado, rendimiento 15,06%, los cuales se distribuyeron en 3 placas Petri de vidrio y para su conservación se guardaron a temperatura ambiente en un desecador, al momento de realizar las pruebas fueron retomados para los análisis, la primera placa se usó para los estudios de solubilidad, evaluación fitoquímica preliminar y análisis cromatográfico, la segunda se usó para determinar la actividad antifúngica y concentración mínima inhibitoria y la tercera placa se usó para determinar la actividad citotóxica.

3.4.3. Estudios de solubilidad

En una batería de tubos de ensayo adecuadamente rotulados con los nombres de los solventes de diferente polaridad, se pesaron 20 mg de extracto etanólico estabilizado de *Solanum hispidum* Pers y se le agregó 1 mL del solvente indicado (agua destilada, etanol, metanol, acetato de etilo, cloroformo, éter dietílico y n-hexano), se agitó cada tubo y se procedió a observar los resultados por un máximo de 10 min^{93,94}.

3.4.4. Análisis fitoquímico preliminar

Para el análisis fitoquímico preliminar del extracto etanólico estabilizado de *Solanum hispidum* Pers, se realizaron las pruebas de color y precipitación con la finalidad de determinar la presencia o ausencia de los principales metabolitos secundarios.^{94,95,96}

Los metabolitos presentes se identificaron siguiendo la marcha fitoquímica propuesta por Lock⁹⁴, empleando pruebas de tricloruro férrico para compuestos fenólicos, gelatina cloruro de sodio para taninos, Shinoda para flavonoides^{94,95}, la presencia de flavonoides fue confirmada por Pews y vapores de amoníaco⁹⁶; Liebermann-Burchard^{94,95}, ácido tricloroacético, Rosenthaler y Salkowski para diferenciar triterpenoides y esteroides⁹⁶; Borntranger para naftaquinonas, antronas y antraquinonas, Kedde para cardenólidos, Rosenheim para leucoantocianidinas; Dragendorf, Mayer, Bouchardat, Sonneschein para alcaloides⁹⁴, prueba de espuma para saponinas, prueba de hidroxilamina para cumarinas, prueba de Erlich para alcaloides indólicos y prueba de Bajlet para lactonas y sesquiterpenlactonas^{95,96}.

3.4.5. Análisis cromatográfico

El análisis cromatográfico se realizó por cromatografía en capa delgada para confirmar la presencia de esteroides y alcaloides en el extracto etanólico estabilizado de *Solanum hispidum* Pers. Para determinar esteroides por cromatografía en capa delgada se usaron placas de Silicagel 60 F254 activadas a 105 °C por 15 minutos, fase móvil cloroformo-metanol-agua (64:50:10) v/v, se aplicó 3,5 µL de extracto concentrado disuelto en metanol (2 gramos de extracto crudo disuelto en 2 mL de metanol y posterior aforo a 5 mL), la separación de siembra fue de 1.5 cm entre cada aplicación, se usó como revelador cloruro de antimonio III 10% en cloroformo, para demostrar presencia de esteroides en detección visible se observan manchas de color rojo o violeta y en UV 365 nm se observan manchas rojo violeta o celeste y/o verde^{97,98,99} y para determinar la presencia de alcaloides se utilizaron placas de silicagel 60 F254 activadas a 105°C por 15 minutos, la fase móvil consistió en Cloroformo-Metanol (95:5) v/v, se aplicó 5 µL de extracto concentrado disuelto en metanol (2 gramos de extracto en 2 mL), con separación de siembra de 1,5 cm entre cada aplicación, para demostrar la presencia de alcaloides la detección fue visible observando manchas de color los cuales indican presencia de alcaloides esteroidales y saponinas esteroidales⁸⁸.

3.4.6. Determinación de la actividad antifúngica

La actividad antifúngica se determinó utilizando el método de difusión en placa, este método se fundamenta en la difusión de las sustancias activas en un medio sólido que se evidencia por la formación de halos claros alrededor de las colonias¹⁰⁰.

Hongos utilizados

Candida albicans ATCC 10231, *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533 y *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 provistos por el Cepario del Laboratorio de Microbiología y Biológicos del Instituto Nacional de Salud, donde se encuentran conservados a -70 °C y para el ensayo se procedió a viabilizarlos usando Caldo Sabouraud para *C. albicans* y Agar Dextrosa Sabouraud (ADS) para *T. mentagrophytes* y *A. brasiliensis*.

Estandarización de las suspensiones fúngicas

Se realizó la siembra en ADS de cepas *T. mentagrophytes* y *A. brasiliensis* y se incubaron a 20°C - 25 °C durante 7 a 10 días, las esporas fueron recuperadas de estos cultivos; se emplearon colonias maduras por arrastre de la superficie con 10 mL de solución salina 0.9% y tween 80 al 0.1%. La suspensión se trasvasó a un tubo de ensayo, las conidias se obtuvieron mediante agitación del filtrado a 2500 rpm durante 10 y posteriormente se filtró con papel de filtro. Estos elementos fúngicos fueron utilizados como inóculo ajustando la turbidez hasta lograr el inóculo deseado (1×10^5 UFC/mL) para las esporas, se comprobó con diluciones seriadas en placa. Para *C. albicans* se incubó 100 µL de cepa en 10 mL de Caldo Sabouraud a 20 °C -25 °C por 48-72 horas, cumplido el tiempo de incubación se suspendieron los microorganismos hasta lograr un inóculo deseado de (1×10^6 UFC/mL). Los ajustes fueron realizados espectrofotométricamente y se corroboró con diluciones seriadas en placa^{100,108}.

Preparación de las placas para dispensación

Se preparó el medio ADS, se esterilizó y se mantuvo a 45 °C para incorporar 1 ml de suspensión fúngica estandarizada (1×10^6 UFC/mL) por cada 100 ml de medio de cultivo; se agitó y homogenizó para distribuir 20 ml a placas Petri previamente rotuladas de 90 mm de diámetro. Se dejó solidificar, una vez solidificado se realizaron pozos con la ayuda de un sacabocado N° 6 (perforador de acero inoxidable con 11 mm

de diámetro externo), se realizaron 1 a 2 excavaciones por placa para evitar la superposición de halos¹⁰⁰.

Adición de muestras y controles e incubación de placas

Se agregó a cada pozo 100 uL del extracto etanólico de *Solanum hispidum* Pers 25 mg/mL (Se resuspendió 50 mg del extracto etanólico estabilizado en 2 mL de Dimetilsulfóxido) y se dejaron reposar las placas por 1 hora en las condiciones del laboratorio para lograr difusión y se trasladaron cuidadosamente a la incubadora, se incubaron a 37 °C por 24 horas para *Candida albicans*, 72 horas para *Aspergillus brasiliensis* y 7 días para *Trichophyton mentagrophytes*. Fueron usados como controles positivos nistatina, ketoconazol y fluconazol, se pesaron 25 mg de estándar en 25 ml de diluyente DMSO para los dos primeros y agua para el fluconazol, realizando luego una dilución de 2mL en 10mL para lograr una concentración final de 0,2 mg/mL para los 3 estándares, se usó como blanco el DMSO y agua. Las pruebas se realizaron utilizando 8 placas para cada tratamiento y se adicionaron 100µL por pozo¹⁰⁰.

Lectura y criterios de interpretación

Se observaron las zonas claras de inhibición de crecimiento (halos) y se midieron los diámetros en mm con la ayuda de un vernier, se considera actividad antifúngica significativa cuando el diámetro de la zona de inhibición es superior a 18 mm^{100,101}.

Una vez determinada la actividad antifúngica se procedió a determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) utilizando el método de microdilución colorimétrico en microplaca siguiendo los protocolos del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI), usando para la levadura el protocolo M27-A2 modificado por Liu et al¹⁰²; y para el dermatofito y la espora se usó el protocolo M38-A modificado por Fernández et al¹⁰³ y Liu et al¹⁰².

3.4.7. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Se determinó mediante el método de microdilución colorimétrico partiendo de los microorganismos que demostraron actividad antifúngica por el método de difusión en placa.

Preparación del medio de cultivo

Se preparó pesando en beakers separados 1,04 g del medio RPMI 1640 en polvo y 3,46 g de buffer MOPS, ambos se disolvieron en aproximadamente 20 mL de agua destilada estéril, finalmente se mezclaron en un matraz volumétrico y se aforó a 100 mL con agua destilada estéril; se filtró usando un filtro con tamaño de poro 0,45 μm ^{75,76}.

Preparación del inóculo

Para *C.albicans* se usó un sembrado de 48 h previos al ensayo (100 μL de cepa en 10 mL de Caldo Sabouraud) a 20°C - 25°C, el día de la prueba se ajustó a una turbidez espectrofotométrica equivalente a $1-5 \times 10^6$ ufc/mL (inóculo concentrado), luego se procedió a realizar una dilución 1:50 seguida de 1:20 con el medio RPMI 1640, para obtener un inóculo de $1-5 \times 10^3$ UFC/mL (inóculo 2x); para el dermatofito y la espora se usaron los repiques sembrados una semana antes y el día del ensayo se ajustó espectrofotométricamente a 530 nm entre 0,15 y 0,18 de unidades de absorbancia o su equivalente en porcentaje de transmitancia. El inóculo concentrado ($1-2 \times 10^6$ UFC/mL) fue diluido a razón de 1:50 para obtener un inóculo 2x ($1,2 \times 10^4$ a 6×10^4 UFC/mL). Se corroboraron los inóculos mediante plaqueo por incorporación en ADS de 10 μL de inóculo ajustado la levadura y 10 μL de una dilución de 1:10 del inóculo ajustado para la espora y el dermatofito^{75,76,102,103}.

Preparación de los controles y muestras

Preparación del estándar para levaduras ketoconazol 2x, se pesó 16 mg de ketoconazol y se aforó a 10 mL con DMSO en matraz volumétrico, luego se realizó dilución de 0,4 mL en 20 mL con medio RPMI, esta es la solución 2x = 32 $\mu\text{g/mL}$ de ketoconazol, finalmente en las placas de microtitulación se obtuvieron concentraciones decrecientes en el rango de 16,0 $\mu\text{g/mL}$ a 0,03 $\mu\text{g/mL}$ ^{75,76,104}.

Preparación del estándar para la espora y el dermatofito fluconazol 2x, se pesó 12,8 mg de fluconazol y se aforó a 20 mL con agua destilada estéril, luego se realizó dilución de 4 mL en 20 mL con medio RPMI, esta es la solución 2x = 128 $\mu\text{g/mL}$ de fluconazol, finalmente en las placas de microtitulación se obtuvieron concentraciones decrecientes en el rango de 64,0 $\mu\text{g/mL}$ a 0,125 $\mu\text{g/mL}$ ^{75,76,104}.

Preparación del extracto etanólico 2x, se pesó 250 mg se extracto etanólico estabilizado de *Solanum hispidum* Pers y se disolvió en 2,5 mL de DMSO (100 mg/mL)¹⁰², luego se

realizó dilución de 0,8 mL en 20 mL con medio RPMI, esta es la solución 2x = 4000 µg/mL, finalmente en las placas de microtitulación de obtuvieron concentraciones decrecientes en el rango de 4000 µg/mL a 7,81 µg/mL¹⁰⁴.

El control negativo fue el medio RPMI con resazurina, también denominado control de esterilidad o control de ausencia de crecimiento para lo cual se preparó 20 mL de RPMI con 0,1 mL de la la solución indicadora de óxido reducción¹⁰².

Preparación de la solución indicadora de óxido reducción (resazurina 20 mg/mL): se pesó 400 mg de resazurina y se aforó a 20 mL con agua destilada estéril en matraz volumétrico estéril. Esta solución fue filtrada a través de un filtro con tamaño de poro de 0,45 µm. La proporción usada fue de 0,1 mL de la solución indicadora preparada por cada 20 mL de suspensión del inóculo 2x^{102,104}.

Distribución de las placas e incubación

La prueba se realizó en placas de microtitulación estériles de 96 pocillos estériles, de fondo en U utilizando pipeta multicanal, siguiendo la siguiente distribución, A1-H1: Control negativo (200 µL RPMI con resazurina), A2-A11: Concentraciones finales de estándar ketoconazol (a partir de 200 µL inóculo 2x con resazurina), B2-12 al G2-12 concentraciones finales del extracto etanólico de *Solanum hispidum* Pers (a partir de 200 µL inóculo 2x con resazurina), H2-H11: concentraciones finales de estándar fluconazol (a partir de 200 µL inóculo 2x con resazurina) y A12-H12: control de crecimiento positivo (100 µL inóculo 2x con 100 µL medio RPMI). A partir de los inóculos 2x de 200 µL cogiendo 100 µL para transferir a los siguientes pocillos¹⁰⁴.

Las placas de microtitulación fueron incubadas a 37 °C por 24 horas para la levadura y por 5 a 7 días para la espora y el dermatofito^{102,103}.

Posterior a la incubación se observaron visualmente los resultados mediante el cambio de color de morado oscuro a rosado o incoloro, para determinar el valor del CMI se considera la concentración más baja en la cual no se produce el viraje del color¹⁰².

Tabla 6. Distribución de los pocillos para determinar la CMI de los hongos *C.albicans*, *A. brasiliensis* y *T. mentagrophytes* frente al extracto etanólico de *S. hispidum* Pers.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CN	16,0	8,0	4,0	2,0	1,0	0,5	0,25	0,13	0,06	0,03	CC
B	CN	2000	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	3,91	CC
C	CN	2000	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	3,91	CC
D	CN	2000	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	3,91	CC
E	CN	2000	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	3,91	CC
F	CN	2000	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	3,91	CC
G	CN	2000	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	3,91	CC
H	CN	64,0	32,0	16,0	8,0	4,0	2,0	1,0	0,5	0,25	0,125	CC

Adaptado de Ruiz¹⁰⁴, CN: Control negativo, CC: Control de crecimiento, K: Ketoconazol y F: Fluconazol, los datos consignados indican las concentraciones finales en $\mu\text{g/mL}$.

Lectura y criterios de interpretación

Los criterios de interpretación se tomaron de acuerdo a los parámetros de Holets, F. et al¹⁰⁵, el extracto tiene actividad antifúngica significativa cuando el CMI es ≤ 1000 $\mu\text{g/mL}$, según la siguiente clasificación:

Tabla 7. Criterios cuantitativos para determinar actividad antifúngica.

Criterio	Nomenclatura
Actividad antifúngica	CMI
Buena	$< 100 \mu\text{g/mL}$
Moderada	$100 \text{ a } < 500 \mu\text{g/mL}$
Débil	$500 \text{ a } 1000 \mu\text{g/mL}$

3.4.8. Determinación de la actividad citotóxica

Líneas celulares

Tabla 8. Líneas celulares usadas para evaluar actividad citotóxica

Línea celular	Morfología	Origen	Especie-edad	Medio de cultivo
H460	Epitelial	Cáncer pulmón	de Humano-adulto	MEM
HT-29	Epitelial	Cáncer colon	de Humano-adulto	RPMI
3T3	Fibroblasto	-	Ratón-embionario	DMEM

Se utilizaron las líneas celulares de cáncer humano H460 de cáncer de pulmón y HT 29 de cáncer colorrectal y como línea celular normal fibroblastos 3T3; células de crecimiento adherente en monocapa, adquiridas en el banco de células del Laboratorio de cultivo celular del CNSP del INS, donde se encuentran conservadas a -190 °C. Se trabajó en Cabina de Seguridad biológica para mantener las condiciones de esterilidad¹⁰⁶.

Las líneas celulares H460 fueron cultivadas en MEM, las líneas celulares HT29 fueron cultivadas en Medio RPMI 1640 y las líneas celulares 3T3 fueron cultivadas en DMEM, todas suplementadas con 10 % de FBS o suero de ternera según corresponda, se usó como antibiótico gentamicina sulfato en concentración de 50 µg/ml, en frascos de cultivo estériles de 25 cm² incubados a 37°C y 5% CO₂; para el mantenimiento de las líneas celulares se procedió a renovación del medio de cultivo cada 48 horas, realizando el lavado de las células con PBS pH 7,2 a 7,4^{85,86}.

Recuento celular y verificación de la viabilidad

Se resuspendieron las líneas celulares, lavando la monocapa de cada línea celular por 3 veces con 4 mL de Solución tampón de fosfatos (PBS) y agregando 4 mL de solución de tripsina 0,02% , se incubó por 10 minutos en condiciones estándar de 37 °C y 5% CO₂. Se realizó el conteo de la suspensión de células obtenida en cámara de recuento

Neubauer usando el método de exclusión celular de eosina 0.2%⁴⁷. Se trabajaron las líneas celulares verificando previamente la viabilidad en cámara de Neubauer, las viabilidades comprobadas fueron para HT-29 (RPMI) 98,15%, para 3T3 (DMEM) 100.0% y para H460 (MEM) 99,25%.

Determinación de la concentración celular

Se partieron de concentraciones celulares de 5,000 a 15,000 células/ pocillo en 100 μL ¹⁰⁸ y se ajustó esta concentración para utilizar el método de reducción de MTT, para las líneas celulares cancerígenas H460, HT-29 a 40 000 células/pocillo y para la línea celular normal 3T3 a 20 000 células/pocillo, en un volumen 160 μL /pocillo¹⁰⁸, se usaron microplacas estériles de fondo plano para favorecer la adhesión celular, las concentraciones celulares óptimas de incorporaron en microplacas de 96 pocillos con ayuda de una pipeta multicanal y fueron incubadas durante 48 horas en condiciones estándar 37°C y 5% CO₂, para lograr que las células se adhieran a la superficie del pocillo^{85,86}.

Tinción con MTT

Cumplido el tiempo de tratamiento, se verificaron los cultivos con 90% de confluencia, fue retirado el medio de cultivo anterior y se adicionaron en los pocillos 100 μL de las diferentes concentraciones de muestras de extracto etanólico estabilizado *Solanum hispidum* Pers y 100 μL del control positivo; se dispensaron a los pocillos 100 μL de MTT adicionalmente. Se incubaron las microplacas por 4 horas a 37 °C y 5% CO₂, posteriormente, de manera cuidadosa se desechó el sobrenadante y fueron adicionados en los pocillos 100 μL de DMSO. Se procedió a la lectura de las microplacas ensayadas con el MULTISKAN un lector de microplacas a $\lambda = 570 \text{ nm}$. Los datos obtenidos fueron tomados como medida indirecta de la supervivencia celular^{85,86}.

Preparación de las muestras y controles

Previo al uso del extracto etanólico estabilizado de *Solanum hispidum* Pers, se verificó la esterilidad del extracto inoculando porciones a medios de cultivo tioglicolato fluido con indicador y caldo de triptocaseína con posterior incubación a 32,5 \pm 2,5 °C y 22,5 \pm 2,5 °C respectivamente por 14 días¹⁰⁹; se pesaron 250 mg del extracto etanólico estabilizado y se disolvieron en 2,5 mL con DMSO (100 mg/mL), a partir de esta solución se realizó una dilución en medio de cultivo sin suplementar de 2,5 mL en 100

mL en matr az volum etrico est eril (2 500 $\mu\text{g/mL}$), se realizó dilución adicional de 2,5 mL en 25 mL de medio de cultivo sin suplementar (250 $\mu\text{g/mL}$) y se realizaron dos diluciones adicionales de 1 en 10 para obtener concentraciones finales de 25 $\mu\text{g/mL}$ y 2,5 $\mu\text{g/mL}$.

Se usó como control positivo doxorrubicina 10 μmolar ^{85,86}, se preparó pesando 25 mg de doxorrubicina clorhidrato en matr az volum etrico de 25 mL, se aforó con agua y luego se realizó una dilución de 1 en 10 con medio de cultivo¹⁰⁹.

Distribución de los pocillos y c culos

Tabla 9. Distribución de los pocillos para las placas de la línea celular HT-29

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Control + : Doxorrubicina 10 μM											
B	Extracto etanólico <i>Solanum hispidum</i> Pers 2,5 $\mu\text{g/mL}$											
C	Extracto etanólico <i>Solanum hispidum</i> Pers 25 $\mu\text{g/mL}$											
D	Extracto etanólico de <i>Solanum hispidum</i> Pers 250 $\mu\text{g/mL}$											
E	Fibroblastos 3T3 +Extracto etanólico de <i>Solanum hispidum</i> Pers 25 $\mu\text{g/mL}$											
F	Fibroblastos 3T3 +Extracto etanólico de <i>Solanum hispidum</i> Pers 25 $\mu\text{g/mL}$											
G	Fibroblastos 3T3 +Extracto etanólico de <i>Solanum hispidum</i> Pers 25 $\mu\text{g/mL}$											
H	Control de crecimiento celular											

Elaboración propia. A1-A12 Control +, B1-B12 Extracto etanólico *Solanum hispidum* Pers 2,5 $\mu\text{g/mL}$, C1-C12 Extracto etanólico *Solanum hispidum* Pers 25 $\mu\text{g/mL}$, D1-D12 Extracto etanólico *Solanum hispidum* Pers 250 $\mu\text{g/mL}$, E1-G12 Fibroblastos + Extracto etanólico *Solanum hispidum* Pers 25 $\mu\text{g/mL}$, H1-H12 Control de crecimiento celular.

Tabla 10. Distribución de los pocillos para las placas de la línea celular H460

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Control + : Doxorubicina 10 µM											
B	Control de crecimiento celular H460											
C	Fibroblastos 3T3 +Extracto etanólico de <i>Solanum hispidum</i> Pers25 µg/mL											
D	Fibroblastos 3T3 +Extracto etanólico de <i>Solanum hispidum</i> Pers25 µg/mL											
E	Fibroblastos 3T3 +Extracto etanólico de <i>Solanum hispidum</i> Pers25 µg/mL											
F	Extracto etanólico de <i>Solanum hispidum</i> Pers 250 µg/mL											
G	Extracto etanólico <i>Solanum hispidum</i> Pers 25 µg/mL											
H	Extracto etanólico <i>Solanum hispidum</i> Pers 2,5 µg/mL											

Elaboración propia. A1-A12 Control +, B1-B12 control de crecimiento, C1-E12 Fibroblastos, F1-H12 Extracto etanólico *Solanum hispidum* Pers.

Se midió la inhibición del crecimiento de células citotóxicas en las líneas celulares, se reportó el porcentaje de inhibición del crecimiento de líneas celulares, midiendo la densidad óptica (absorbancia)⁵². En todos los casos se asumió un 100% de supervivencia en las células sin tratamiento¹¹⁰.

Se calculó el porcentaje de supervivencia celular mediante la siguiente fórmula

$$\% \text{ supervivencia celular} = \frac{\text{Absorbancia células tratadas}}{\text{Absorbancia células controles}} \times 100$$

A partir de los datos obtenidos se calculó la curva dosis respuesta teniendo en cuenta el rango de concentración utilizado (2,5 µg/mL, 25 µg/mL y 250 µg/mL) y el porcentaje de reducción correspondiente, a partir de ello se calculó la concentración que produce la reducción de la viabilidad celular en un 50% CI 50, Se trazó una curva lineal dosis respuesta para y se trabajó con la curva más cercana al 50% para calcular CI 50⁷¹.

Lectura y criterios de interpretación

Los criterios de interpretación se tomaron de acuerdo a los parámetros de la Guía del NCI⁴⁷, adaptado por Phongpaichit¹¹¹ y Kuete¹¹². De manera general los extractos poseen actividad citotóxica significativa cuando el CMI es $\leq 100 \mu\text{g/mL}$ ¹¹¹ y los compuestos puros tienen actividad citotóxica significativa cuando el CMI es $\leq 10 \mu\text{M}$ ^{47,110} y de manera específica se considera que el extracto crudo tiene actividad citotóxica si el valor de CI 50 luego de incubación de 48 a 72 horas es $\leq 20 \mu\text{g/mL}$ y $4 \mu\text{g/mL}$ para compuesto puro^{47,71}.

Tabla 11. Criterios cuantitativos para determinar actividad citotóxica.

Criterio	Nomenclatura	
	CI 50	CI 50
Actividad citotóxica	Extracto crudo	Compuesto puro
Buena	$< 20 \mu\text{g/mL}$	$< 1 \mu\text{M}$
Moderada	$20 \text{ a } 50 \mu\text{g/mL}$	$1 \mu\text{M a } 10\mu\text{M}$
Débil	$50 \text{ a } 100 \mu\text{g/mL}$	$> 10 \mu\text{M}$

3.5. Unidad de análisis

Extracto etanólico de hojas de la especie *Solanum hispidum* Pers.

3.6. Población de estudio

Especies de *Solanum hispidum* Pers de Carhuaz - Ancash.

3.7. Muestra

900 g de hojas colectadas de la especie *Solanum hispidum* Pers de Carhuaz - Ancash.

3.8. Técnicas de recolección de datos

Para los estudios de solubilidad, el análisis fitoquímico y la cromatografía en capa delgada, los datos fueron registrados mediante evidencia fotográfica y en un formato de tablas indicando; en la prueba de solubilidad si el extracto es insoluble, poco soluble, soluble y muy soluble en el solvente de prueba; en el análisis fitoquímico los metabolitos investigados reportando la reacción de color y/o precipitación observada y en la cromatografía en capa delgada indicando los valores de Rf obtenidos.

Para la determinación de la actividad antifúngica y de la CMI *in vitro*, los datos fueron registrados mediante evidencia fotográfica y mediante el uso de tablas en las que se señala las medidas de los diámetros de las zonas de inhibición para comparación con la referencia y se indicaron los CMI realizados visualmente.

Para la determinación de la actividad citotóxica se registraron datos fotográficos y lecturas de absorbancia, cálculo del porcentaje de supervivencia y la determinación del CI 50.

3.9. Procesamiento de la información o de datos

Para el análisis de datos se utilizó la estadística descriptiva e inferencial, se utilizaron además las pruebas de igualdad de varianzas para evidenciar el grado de dispersión de los datos así como la prueba t de una muestra evaluando la significancia estadística utilizando el p valor con el programa MINITAB 19. Para determinar la actividad citotóxica se calculó el porcentaje de supervivencia celular y para establecer la Concentración Inhibitoria 50 (CI 50) se realizó una curva lineal del porcentaje de supervivencia celular y las concentraciones del extracto etanólico estabilizado de *Solanum hispidum* Pers (concentración - respuesta).

CAPÍTULO IV. RESULTADOS

4.1. Estudios de solubilidad

Tabla 12. Solubilidad del extracto etanólico estabilizado de *Solanum hispidum* Pers.

Solvente	Índice de polaridad	Resultado
Agua destilada	9.0	+
Etanol	5.2	+++
Metanol	5.1	+++
Acetato de etilo	4.4	++
Cloroformo	4.1	++
Eter dietílico	2.8	++
n-hexano	0.0	+

Leyenda: -: Insoluble, +: poco soluble, ++ soluble, +++ muy soluble

El extracto etanólico estabilizado es muy soluble en etanol y metanol, seguido por la solubilidad en acetato de etilo y éter dietílico, entonces el extracto contiene alto porcentaje de compuestos de polaridad intermedia y de alta polaridad.

4.2. Análisis fitoquímico preliminar

Tabla 13. Metabolitos presentes en el extracto etanólico de *Solanum hispidum* Pers.

Pruebas	Reacción observada	Resultado
Compuestos fenólicos		
Tricloruro férrico	Color azul verdoso	++
Taninos		
Gelatina – cloruro de sodio	Precipitado amarillo	++
Flavonoides		
Shinoda	Color rojo	++
Pews	Color café	++
Hidroxido de sodio	Color anaranjado	++
Vapores de amoníaco	Color amarillo	++
Esteroides		
Ácido tricoloroacético	Color verde brillante a 60 °C	+++
Liebermann-Burchard	Color verde en interfase	+++
Rosenthaler	Color amarillo verdoso	+++
Salkowski	Color amarillo	+++
Alcaloides		
Dragendorf	Precipitado anaranjado	+++
Mayer	Precipitado blanco	+++
Bouchardat	Precipitado anaranjado	+++
Sonneschein	Precipitado anaranjado	+++
Saponinas		
Prueba de espuma	Formación de espuma	++

Leyenda: - Ausencia, + leve, ++ Moderado, +++ abundante

Tabla 14. Metabolitos ausentes en el extracto etanólico de *Solanum hispidum* Pers.

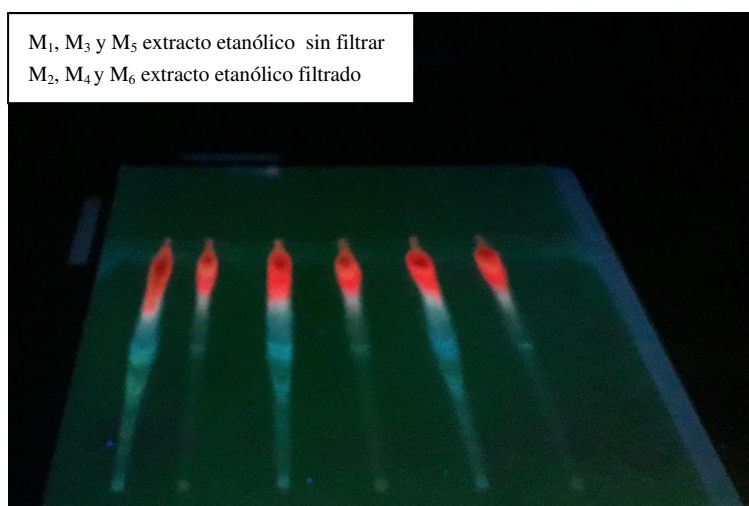
Pruebas	Reacción observada	Resultado
Alcaloides indólicos		
Erlich	No forma color violeta	-
Cumarinas		
Hidroxilamina	No forma color violeta	-
Naftoquinonas, antraquinonas y antronas		
Borträger	No forma color rojo en fase acuosa	-
Glucósidos cardiotónicos		
Kedde	No forma color púrpura	-
Lactonas y sesquiterpenlactonas		
Bajlet	No forma color rojo	-
Leucoantocianidinas		
Rosenheim	No forma color rojo	-

Leyenda: - Ausencia, + leve, ++ Moderado, +++ abundante

En las tablas 13 y 14 se observa que los metabolitos con mayor abundancia son los alcaloides y los esteroides, continúan los compuestos fenólicos, flavonoides, taninos y saponinas y se encuentran ausentes los alcaloides indólicos, cumarinas, quinonas, glucósidos cardiotónicos, lactonas, sesquiterpenlactonas y leucoantocianinas.

4.3. Análisis cromatográfico

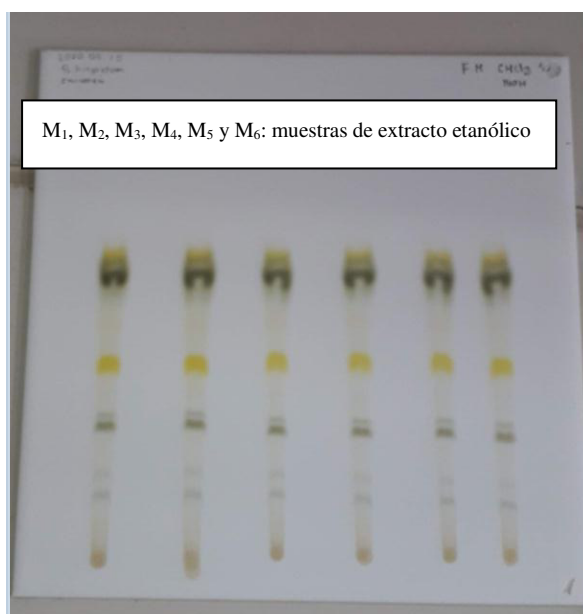
La cromatografía en capa delgada confirma la presencia de esteroides y alcaloides en el extracto etanólico estabilizado de *Solanum hispidum* Pers.



Fluorescencia	Rf
Rojo	0,97
Rojo	0,86
Violeta	0,73
Celeste	0,65
Celeste	0,56

Fig 7. Cromatografía en capa delgada para esteroides, se sembraron 6 muestras del extracto y se logra separación observándose cinco manchas fluorescentes para saponinas esteroidales frente a la luz UV; los valores de Rf variaron desde 0,56 hasta 0,97.

$$Rf_2 = \frac{9.8}{15} = 0.65$$



	Mancha	Rf
10	Amarillo	0,76
9	Verde	0,73
8	Verde	0,72
7	Plomo	0,70
6	Amarillo	0,66
5	Amarillo	0,45
4	Plomo	0,32
3	Plomo	0,29
2	Marrón	0,17
1	Marrón	0,13

Fig 8. Cromatografía en capa delgada para alcaloides, se sembraron 6 muestras del extracto y se logra separación de 10 alcaloides, los valores de Rf encontrados fueron de 0,13 hasta 0,76.

4.4. Determinación de la actividad antifúngica

4.4.1. Actividad antifúngica frente a *Candida albicans* ATCC 10231

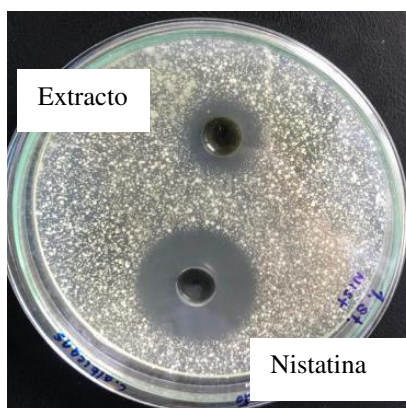


Figura 9. Halos de inhibición de *Candida albicans* ATCC 10231, método de difusión en placa.

Tabla 15. Medidas de las zonas de inhibición *Candida albicans* ATCC 10231

Datos	Nistatina (control 1)	Fluconazol (control 2)	Extracto 1 (prueba)
1	29.4 mm	25.0 mm	25.9 mm
2	30.0 mm	25.0 mm	26.0 mm
3	28.7 mm	24.9 mm	25.5 mm
4	30.4 mm	25.1 mm	26.3 mm
5	28.9 mm	25.3 mm	26.0 mm
6	30.1 mm	25.3 mm	26.1 mm
7	30.0 mm	25.2 mm	26.1 mm
8	29.2 mm	24.8 mm	25.2 mm

La concentración de los controles nistatina y fluconazol fue 0,2 mg/mL y del etanólico estabilizado de *Solanum hispidum* Pers fue 25 mg/mL, se observan zonas de inhibición superiores a 18 mm para los controles y para el extracto lo que manifiesta actividad antifúngica del extracto frente al hongo *Candida albicans* ATCC 10231.

4.4.2. Actividad antifúngica frente a *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404

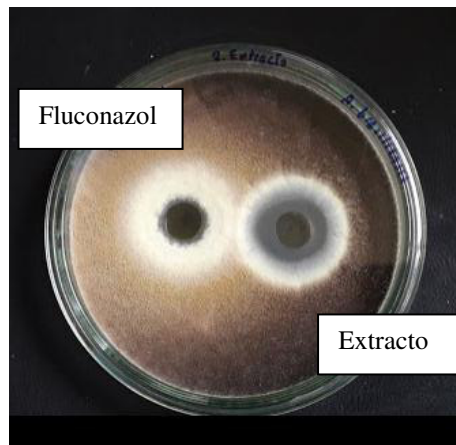


Figura 10. Halos de inhibición de *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, método difusión en placa.

Tabla 16. Medida de las zonas de inhibición de *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404.

Datos	Fluconazol (control 1)	Ketoconazol (control 2)	Extracto (prueba)
1	14.5 mm	20.1 mm	22.2 mm
2	15.5 mm	20.5 mm	23.1 mm
3	14.8 mm	21.2 mm	22.5 mm
4	14.9 mm	21.3 mm	21.8 mm
5	14.4 mm	21.4 mm	21.5 mm
6	14.4 mm	21.6 mm	22.4 mm
7	15.2 mm	21.7 mm	23.4 mm
8	15.5 mm	22.2 mm	22.8 mm

La concentración de los controles fluconazol y ketoconazol fue 0,2 mg/mL y del etanólico estabilizado de *Solanum hispidum* Pers fue 25 mg/mL, se observan zonas de inhibición superiores a 18 mm para el ketoconazol y para el extracto, los diámetros de las zonas de inhibición de fluconazol no supera los 18mm; se manifiesta actividad antifúngica del extracto frente al hongo *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404.

4.4.3. Actividad antifúngica frente a *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533



Figura 11. Halos de inhibición de *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533, método difusión en placa.

Tabla 17. Medidas de las zonas de inhibición de *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533

Datos	Fluconazol (control 1)	Ketoconazol (control 2)	Extracto (prueba)
Placa 1	17.5 mm	24.2 mm	25.6 mm
Placa 2	16.8 mm	24.3 mm	24.8 mm
Placa 3	18.0 mm	23.5 mm	25.2 mm
Placa 4	16.9 mm	23.6 mm	24.5 mm
Placa 5	17.2 mm	23.4 mm	28.0 mm
Placa 6	17.3 mm	23.7 mm	25.2 mm
Placa 7	18.0 mm	23.2 mm	25.3 mm
Placa 8	18.1 mm	23.8 mm	24.5 mm

La concentración de los controles fluconazol y ketoconazol fue 0,2 mg/mL y del etanólico de *Solanum hispidum* Pers fue de 25 mg/mL, se observan zonas de inhibición superiores a 18 mm para el ketoconazol y para el extracto lo que manifiesta actividad antifúngica del extracto frente al hongo *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533, el diámetro de la zona de inhibición del fluconazol no supera los 18 mm.

Tabla 18. Resultados del tratamiento estadístico para demostrar la actividad antifúngica

Evaluación de la actividad antifúngica			
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 9533
Estadístico	<i>t</i> de una muestra	<i>t</i> de una muestra	<i>t</i> de una muestra
Condición	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$
Resultado	$p = 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.001$
Conclusión	Sí	Sí	Sí

La prueba *t* realizada para demostrar actividad antifúngica frente a los hongos de estudio como *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 y *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533 del extracto etanólico estabilizado de *Solanum hispidum* Pers; comparando las medias de las mediciones encontradas con el valor de referencia de 18 mm para los diámetros de la zona de inhibición, confirma que todas las medias son mayores de 18 mm y lo cual demuestra actividad antifúngica del extracto frente a los tres hongos, los controles negativos demostraron que no influyen en la actividad de los extractos y los controles positivos se usaron para demostrar la formación de zonas de inhibición mas no para demostrar comparaciones entre el tratamiento de prueba y los controles.

4.5. Determinación de la concentración mínima inhibitoria

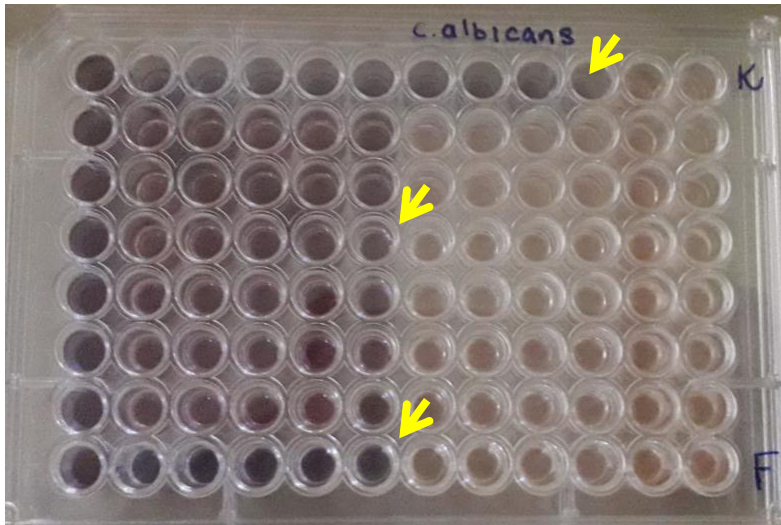


Figura 12. CMI para *Candida albicans* ATCC 12031, método de microdilución colorimétrico en microplaca con resazurina: CMI del extracto etanólico 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Ketoconazol 0.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Fluconazol 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, moderada actividad antifúngica para *Candida albicans*.

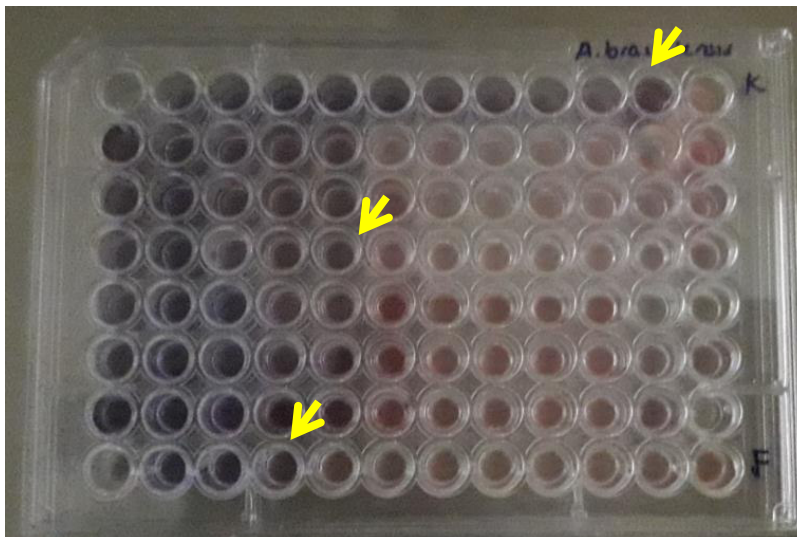


Figura 13. CMI para *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, método de microdilución colorimétrico en microplaca con resazurina: CMI del extracto etanólico 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Ketoconazol 0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Fluconazol 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, moderada actividad antifúngica para *Aspergillus brasiliensis*.

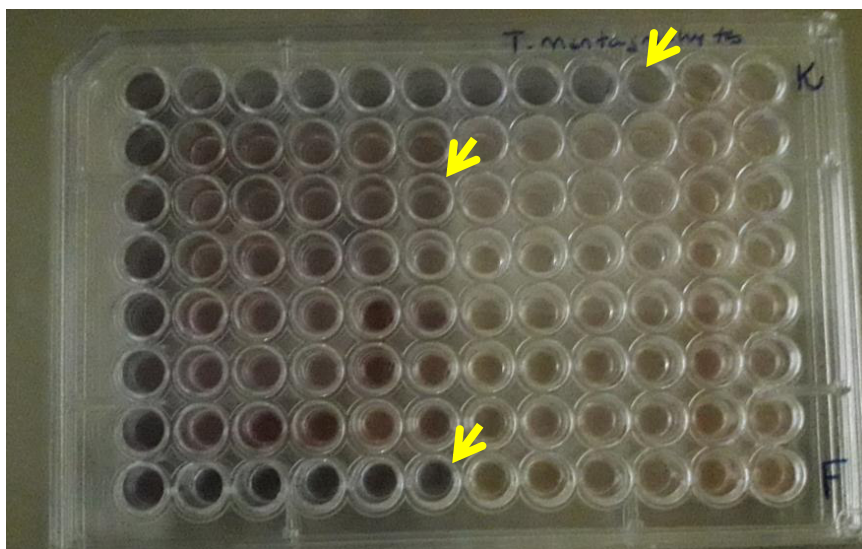


Figura 14. CMI para *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533, el extracto etanólico 125 µg/mL, Ketoconazol 0,06 µg/mL, Fluconazol 4 µg/mL; moderada actividad para *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533

Tabla 19. Valores de la CMI del extracto etanólico en los hongos en estudio.

Solución prueba	Concentración Mínima Inhibitoria (µg/mL)			
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	<i>Aspergillus</i> ATCC 16404	<i>brasiliensis</i>	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 9533
Extracto	125	250		125
Ketoconazol	0,06	0,03		0,06
Fluconazol	2	16		4

De acuerdo a los valores encontrados para la CMI, se observa moderada actividad antifúngica para *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 y *Trichophyton metagrophytes* ATCC 9533; con variaciones favorables para las cepas *Candida albicans* ATCC 10231 y *Trichophyton metagrophytes* ATCC 9533.

4.6. Determinación de la actividad citotóxica

Líneas celulares

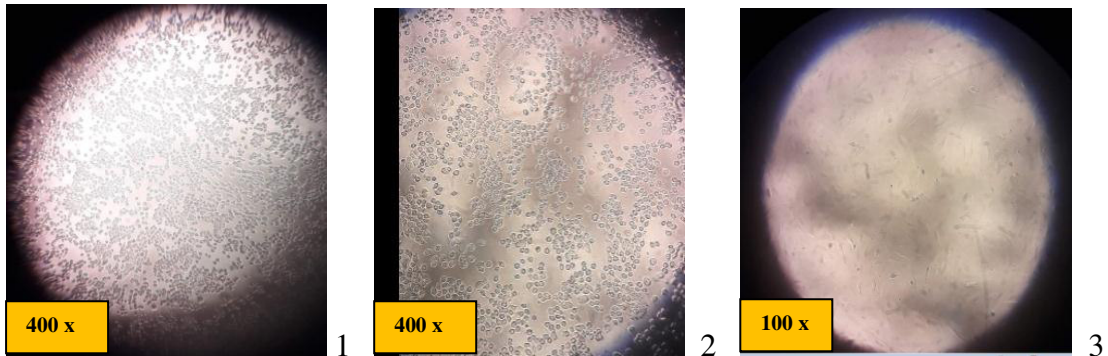


Figura 15. Imágenes microscópicas de las líneas celulares antes del tratamiento:

1. Cáncer de pulmón H460, 2. Cáncer de colon HT-29 y 3. Línea celular normal 3T3.

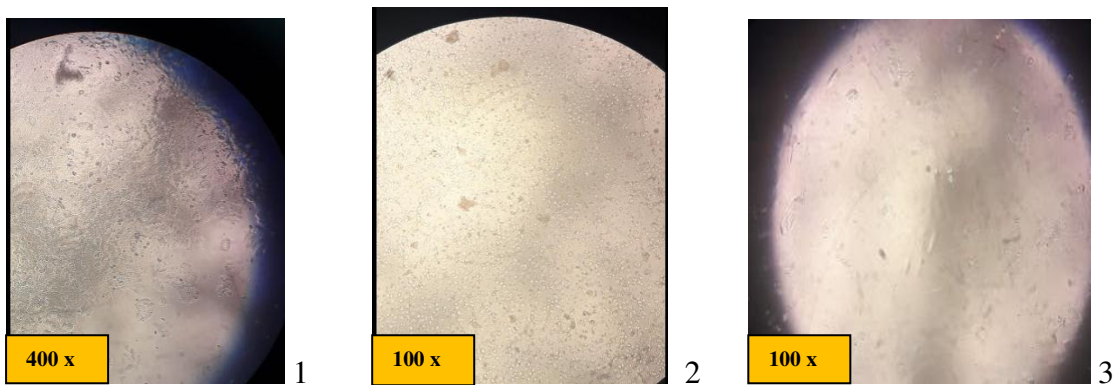


Figura 16. Imágenes microscópicas de las líneas celulares después del tratamiento:

1. Cáncer de pulmón H460, 2. Cáncer de colon HT-29 y 3. Línea celular normal 3T3.

Al comparar las figuras 15 y 16 se observan cambios en la estructura de con ruptura de la membrana citoplasmática en las líneas celulares de cáncer humano y en el control positivo.

Tabla 20. Absorbancia de microplacas para la línea celular HT-29

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Promedio
A	0.191	0.196	0.208	0.230	0.239	0.262	0.286	0.245	0.280	0.297	0.292	0.303	0,252417
B	0.550	0.564	0.522	0.491	0.457	0.501	0.455	0.464	0.416	0.476	0.339	0.470	0,475417
C	0.207	0,246	0,239	0,211	0,229	0,218	0,219	0,219	0,212	0,217	0,221	0,226	0,222000
D	0,224	0,225	0,180	0,184	0,207	0,173	0,167	0,187	0,193	0,203	0,210	0,209	0,196835
E	0,145	0,148	0,163	0,130	0,235	0,148	0,148	0,152	0,163	0,158	0,176	0,138	0,158667
F	0,144	0,156	0,130	0,160	0,160	0,141	0,149	0,269	0,180	0,205	0,231	0,225	0,179167
G	0,205	0,171	0,140	0,154	0,192	0,169	0,144	0,172	0,159	0,174	0,201	0,187	0,172333
H	0,544	0,609	0,620	0,612	0,511	0,629	0,588	0,580	0,613	0,678	0,706	0,712	0,616833

Tabla 21. Porcentaje de supervivencia celular y CI 50 para la línea celular HT-29

		Concentración	Promedio	% supervivencia celular	CI 50
A	Control + Doxorrubicina	10 μ Molar	0,252417	40,92	17,28
B	Extracto etanólico estabilizado de <i>Solanum hispidum</i> Pers.	2,5 μ g/mL	0,475417	77,07	
C		25 μ g/mL	0,222000	35,99	
D		250 μ g/mL	0,196835	31,91	
E		Células normales 3T3	25 μ g/mL	0,158667	
F	0,179167			29,05	
G	0,172333			27,94	
H	Control crecimiento HT-29	-	0,616833	100,00	

De acuerdo a las absorbancias registradas se calcula el valor promedio de cada fila para calcular el porcentaje de supervivencia celular y posteriormente a partir de la curva concentración en μ g/mL versus respuesta, porcentaje de supervivencia calcular la CI 50 trazando una curva lineal de dos puntos en la curva más cercana al 50 % para calcular la CI 50; la CI 50 = 17,28 μ g/mL nos indica de acuerdo a los criterios que el extracto etanólico estabilizado de *Solanum hispidum* Pers tiene buena actividad citotóxica (< 20 μ g/mL) para las líneas celulares de cáncer humano HT-29 (cáncer de colon).

Tabla 22. Absorbancias de microplacas para la línea celular H 460

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Promedio
A	0,183	0,199	0,198	0,184	0,187	0,158	0,219	0,189	0,217	0,224	0,210	0,215	0,198583
B	0,698	0,691	0,684	0,723	0,640	0,632	0,668	0,459	0,459	0,503	0,446	0,474	0,589750
C	0,219	0,226	0,224	0,219	0,202	0,202	0,220	0,195	0,222	0,214	0,237	0,224	0,275917
D	0,244	0,262	0,216	0,210	0,234	0,196	0,194	0,186	0,213	0,225	0,244	0,235	0,204000
E	0,216	0,240	0,213	0,222	0,212	0,177	0,188	0,193	0,185	0,205	0,227	0,230	0,217000
F	0,217	0,217	0,190	0,206	0,240	0,167	0,158	0,191	0,204	0,214	0,210	0,234	0,219750
G	0,309	0,278	0,234	0,281	0,255	0,307	0,247	0,280	0,288	0,278	0,215	0,229	0,209000
H	0,639	0,699	0,466	0,488	0,426	0,421	0,440	0,408	0,494	0,489	0,466	0,427	0,488583

Tabla 23. Porcentaje de supervivencia celular y CI 50 para la línea celular H460

		Concentración	Promedio	% supervivencia celular	CI 50	
A	Control + Doxorrubicina	10 μ Molar	0,198583	33,67	22,17	
B	Control crecimiento H460	-	0,589750	100,00		
C	Células normales 3T3	25 μ g/mL	0,217000	36,80		
D			0,219750	37,26		
E			0,209000	35,44		
F	Extracto etanólico estabilizado de <i>Solanum hispidum</i> Pers.	250 μ g/mL	0,204000	34,29		
G			25 μ g/mL	0,266750		45,23
H			2,5 μ g/mL	0,488583		82,85

Con las absorbancias obtenidas se calcula el valor promedio de cada fila para calcular el porcentaje de supervivencia celular y posteriormente a partir de la curva concentración en μ g/mL versus respuesta, porcentaje de supervivencia calcular la CI 50, se traza una curva lineal de dos puntos utilizando los puntos más cercanos al 50 % para calcular la CI 50; la CI 50 = 22,17 μ g/mL indica de acuerdo a los criterios que el extracto etanólico estabilizado de *Solanum hispidum* Pers tiene moderada actividad citotóxica (20 – 50 μ g/mL) para las líneas celulares de cáncer humano H-460 (cáncer de pulmón).

CAPÍTULO V. DISCUSIÓN

El extracto etanólico estabilizado de hojas de *Solanum hispidum* Pers. fue obtenido teniendo como referencia la polaridad de los extractos que ofrecen mayor número de compuestos bioactivos^{112,113}, mediante la técnica de maceración^{114,115}; los componentes que se pueden encontrar en extractos polares son taninos hidrolizables, taninos condensables, alcaloides, esteroides, aminos cuaternarios, antocianinas, leucoantocianinas, cumarinas, antracénoides, flavonoides, chalconas, lactonas insaturadas y antraquinonas; y son los extractos alcohólicos (etanólico y metanólico) los solventes universales usados en investigación fitoquímica^{115,116,117}. Se usó el extracto etanólico considerando los criterios de selectividad, solubilidad, costo y seguridad¹¹⁵.

Se realizó el estudio de solubilidad del extracto para verificar su solubilidad en solventes apolares como el hexano, de baja polaridad como el éter dietílico, de polaridad intermedia como cloroformo y acetato de etilo, de alta polaridad como el etanol y metanol o polar como el agua; se evidenció que el extracto es soluble en solventes de alta polaridad siendo concordante con lo señalado por otros autores para extractos crudos^{115,116}.

En el análisis fitoquímico preliminar se determinaron la presencia de compuestos fenólicos, taninos, flavonoides, esteroides, alcaloides y saponinas, metabolitos presentes también en otras especies del género *Solanum* como *Solanum nigrum*^{7,8}. En el género *Solanum* se encuentran con facilidad alcaloides⁶⁴ y esteroides^{117,118} que dan positivo a la prueba de Liebermann-Burchard dando un color que va desde el azul hasta el verde en extractos etanólicos^{112,118}, los alcaloides fueron encontrados en diversas especies como *Solanum nigrum*⁷ y *Solanum crinitripes*¹¹⁹; estudios previos reportaron saponinas esteroidales en *Solanum hispidum* Pers^{6,120} y *Solanum dulcamara*³; también fueron encontrados con facilidad saponinas esteroidales en *Solanum quitoense*¹²¹ que reportaron saponinas esteroidales en frutos verdes. En el presente análisis fitoquímico no se evidenció presencia de triterpenoides, alcaloides indólicos (Erlich), glicósidos cardiotónicos ni quinonas o antraquinonas tampoco leucoantocianinas, estos resultados son compatibles con resultados similares en estudios de especie *Solanum*¹²².

En el análisis cromatográfico por cromatografía en capa delgada se confirmó que el extracto contiene esteroides y alcaloides, para la prueba de esteroides se obtuvieron cinco manchas fluorescentes frente a la luz de la lámpara UV con valores de Rf

similares a otros estudios en extractos vegetales para esteroides (0.54, 0.65, 0.85, 0.96)⁹⁹ y para esteroides alcaloídicos se tuvieron valores de Rf que fueron compatibles o similares a los encontrados por otros estudios en la especie *Solanum jamaicense* como solasodina (0.42), Solasodieno (0.71-0.72), diosgenina (0.62), Dieno de diosgenina (0.75), yucagenina 0.33, yamogenina 0.66, tigogenina 0.69 y soladulcidina 0.77 y clorogenina 0.35⁸⁸.

La actividad antifúngica del extracto etanólico de *S. hispidum* Pers fue evaluada para validar el uso de esta especie en las zonas de colección como antifúngico basado en gran parte a su quimiotaxonomía y el uso etnomedicinal⁶, estudios fitoquímicos mencionan que las saponinas esteroidales que poseen amplia distribución en Solanaceas le confieren actividad antimicrobiana y antifúngica^{118,122}, las Solanáceas estudiadas que demostraron actividad antifúngica son *Solanum crysotrichum*¹, *Solanum dulcamara*³, *Solanum hispidum*⁶ y *Solanum nigrum*⁸; otros autores señalan como responsables de la actividad antifúngica a los flavonoides, glicósidos fenólicos y saponinas^{73,119}. En referencia a los hongos de estudio *C. albicans* ATCC 10231, *T. mentagrophytes* ATCC 9533 y *A. brasiliensis* ATCC 16404; mediante el método de difusión en placa, especies de *Solanum* como es el caso de *S. nigrum* también demostraron actividad antifúngica para hongos como *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *Microsporium gypseum*, *Candida albicans*⁸; *Solanum crysotrichum* fue activo para *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. gypseum*^{1,4}; *Solanum americanum* y *Solanum nigrescens* demostraron actividad para *Epidermophyton floccosum*, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*², mientras que *Solanum xanthocarpum* fue activo frente a *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus niger*⁵. Se usaron como controles nistatina, fluconazol y ketoconazol, fármacos muy usados en tratamiento de infecciones fúngicas por estas especies^{123, 124} cuyo espectro de acción es variada, siendo nistatina activo para varias especies del género *Candida*¹²⁵, ketoconazol es activo para levaduras del género *Candida* así como dermatofitos del género *Epidermophyton*, *Trichophyton* y *Microsporium* asimismo presenta actividad *in vitro* para hongos miceliales como los del género *Aspergillus*, también el fluconazol posee actividad para hongos de los géneros *Candida*, *Trichophyton* y *Aspergillus*, sin embargo para este hongo micelial existen alternativas más específicas como el itraconazol, griseofulvina y caspofungina¹²⁶. El método usado resulta útil en el tamizaje de antifúngicos¹⁰⁰. La actividad del extracto frente a *Candida albicans* ATCC 10231 se evidenció porque los diámetros de la zona de

inhibición fueron mayores a 18 mm, en comparación con los controles fue ligeramente mayor que el fluconazol pero mucho menor que la nistatina; frente a *Aspergillus brasiliensis* también se obtuvieron halos superiores a 18 mm, la actividad fue ligeramente mayor que el ketoconazol¹⁰⁰, el fluconazol no presentó actividad significativa en el presente estudio y frente a *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533 los diámetros de las zonas de inhibición fueron superiores a 18 mm, fue ligeramente mayor que el ketoconazol, el fluconazol no demostró actividad para este microorganismo¹⁰⁰. Cabe resaltar que éstos no son fármacos de elección en caso de Apergilosis¹²⁵.

Al evaluar la CMI mediante el micrométodo colorimétrico en placas de microtitulación, para *C. albicans* se obtuvieron valores de CMI = 62,5 µg/mL, estos resultados indican que el extracto tiene buena actividad para éste hongo, estudios similares en *Solanum nigrum* reportaron valores de CMI = 150 µg/mL utilizando método de difusión⁸, para *Aspergillus brasiliensis* se determinaron valores de CMI = 250 µg/mL para el extracto indicando que tiene moderada actividad antifúngica frente a este hongo y para *Trichophyton mentagrophytes* se determinaron que valores de CMI = 125 µg/mL mostraron inhibición del crecimiento fúngico, estudio similar en *Solanum nigrum* reportó actividad con CMI = 310 µg/mL para *T.mentagrophytes*⁸, los valores pueden variar de acuerdo a la especie y metodología utilizada, el método de microdilución colorimétrico en microplaca es un método recomendado por la CLSI principalmente en dermatofitos y hongos filamentosos¹¹⁶ y ha sido usado con buenos resultados por otros investigadores^{104,127}. Se usaron como controles ketoconazol y fluconazol.

La actividad citotóxica mediante el bioensayo MTT fue determinada para el extracto etanólico de *Solanum hispidum* Pers, para este estudio se determinó previamente la esterilidad del extracto para evitar posibles interferencias en las respuestas por contaminación de las líneas celulares; para evaluar la actividad citotóxica se verificó previamente la viabilidad celular mediante observación en el microscopio invertido con eosina 0,2% realizando el conteo respectivo en cámara de Neubauer además se conservó la evidencia fotográfica de la morfología inicial en la cual se observó integridad de la membrana celular y de la morfología posterior al tratamiento para evidenciar cambios o daños de las líneas celulares, en esta observación se logra evidenciar daños en las tres líneas celulares con ruptura de la membrana celular, se usaron aumentos de 100x y

400x; se realizaron lecturas en lector de microplacas después del tratamiento para calcular el porcentaje de supervivencia celular y mediante estimación de la curva dosis respuesta usando el porcentaje de supervivencia celular calcular la CI 50; para línea celular de cáncer de colon HT 29 se obtuvo CI 50 = 17,28 $\mu\text{g/mL}$ y para la línea celular de cáncer de pulmón H460 se obtuvo CI 50 = 22,17 $\mu\text{g/mL}$ lo que indica que tiene buena actividad *in vitro* para el cáncer de colon y moderada actividad citotóxica *in vitro* para el cáncer de pulmón. Según algunos autores son los esteroides que le confieren actividad citotóxica y antitumoral^{118,122}. Estudios previos reportaron citotoxicidad de *Solanum melongena* con CI 50 entre 453 y 479 $\mu\text{g/mL}$ para adenocarcinoma renal TK-10, adenocarcinoma de mama MCF-7 y melanoma VACC-62⁹, *S. rostratum* mostró CI 50 = 127,5 $\mu\text{g/mL}$ en células Hela (línea celular de cáncer cérvico uterino)¹⁰, también reportaron actividad citotóxica *Solanum crinitum* y *Solanum jabrense* cuyos flavonoides y alcaloides tuvieron actividad citotóxica en diferentes líneas celulares tumorales¹²⁸, *Solanum surattense* demostró actividad citotóxica para línea celular de carcinoma pulmonar A549¹²⁹; además el extracto metanólico de *Solanum nigrum* también reportó actividad citotóxica con CI 50 entre 56,46 y 77,60 $\mu\text{g/mL}$ para células cancerígenas HepG2 y CT26 respectivamente¹², extractos hidroalcohólicos de *Solanum nigrum* tuvieron repuesta similar frente a la línea celular Hela^{11,13,14}, también las especies *Solanum dulcamara*¹⁵ y *Solanum aculeastrum*¹⁶ reportaron actividad citotóxica *in vitro*, los estudios en *Solanum dulcamara* fueron realizados en líneas celulares de carcinoma mamario canino CF41.Mg en el cual se propone que existe un efecto antiproliferativo mediante la disminución de la expresión y promoción de la degradación de andrógenos y pro-apoptósico mediante activación de la fosfatidilserina y reducción de la fosforilación de la protein kinasa AKT, los estudios en *Solanum aculeastrum* proponen un mecanismo de acción, en el cual los alcaloides y flavonoides se difunden rápidamente en la célula e interfieren en la membrana de las células tumorales afectando la permeabilidad y posteriormente la síntesis de DNA y RNA otro efecto podría ser la inhibición de glicoproteína P (P-gp), en esta especie se encontró una CI 50 = 10,72 $\mu\text{g/mL}$ para línea celular neuroblastoma SH-SY5; estudios también refieren que *Solanum hispidum* tiene actividad citotóxica para células de diversos tipos de cánceres sin embargo no resultan citotóxicas para células hematopoyéticas¹²⁰. Los medios de cultivo usados para la línea celular de cáncer de colon HT-29 fueron RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino, para la línea celular de cáncer pulmonar

H460 fue Medio MEM y para la línea celular normal fibroblastos 3T3 de origen murino se usó DMEM, se trabajó en condiciones estándar de 37°C 95% aire y 5% CO₂, para la prueba se sembró en cada pocillo 160 µL de medio con una concentración de 40 000 células por pocillo para las líneas celulares cancerígenas y 20 000 para la línea celular 3T3, estudios fueron reportados anteriormente concentraciones menores como 3000 células por pozo¹⁰⁷ y 20000 células por pozo¹³⁰, cabe señalar que el método MTT tiene linealidad demostrada en concentraciones de 2000 a 50000 células por pocillo^{51,52}, este método ha sido utilizado para evaluar líneas celulares cancerígenas HT-29 y H460 usando como control positivo el antineoplásico cisplatino y como una línea de control normal 3T3^{107,131}.

Para el análisis de la actividad citotóxica se usó como línea control fibroblastos 3T3 de origen murino y como control positivo el fármaco doxorrubicina^{85,86,127} de acuerdo a estudios anteriores que mostraron buenos resultados¹³² y se evaluó el efecto citotóxico de DMSO en medio como control negativo¹³³. La concentración de doxorrubicina fue de 10µM basado en estudios de citotoxicidad anteriores que usaron concentraciones de 0,10 µM, 1 µM y 10 µM con porcentajes de supervivencia de 83%, 79% y 43% respectivamente^{86,109}.

CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES

El extracto etanólico estabilizado de las hojas de *Solanum hispidum* Pers. presenta compuestos fenólicos, taninos, flavonoides, esteroides, 10 alcaloides y 5 saponinas esteroidales.

El extracto etanólico estabilizado de las hojas de *Solanum hispidum* Pers posee moderada actividad antifúngica *in vitro* mediante el método de difusión en placa contra los hongos *Candida albicans* ATCC 10231, *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533 y *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, presentando zonas de inhibición superiores a 18 mm (p valor ≤ 0.05); las concentraciones mínimas inhibitorias por el método de microdilución colorimétrico fueron de 125 $\mu\text{g/mL}$ para *Candida albicans* ATCC 10231 y *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533 y 250 $\mu\text{g/mL}$ para *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, confirmando la actividad moderada para los hongos mencionados.

El extracto etanólico estabilizado de hojas de *Solanum hispidum* Pers posee actividad citotóxica, mediante el bioensayo MTT, para las líneas celulares de cáncer humano HT-29 y H460 evidenciándose reducción dosis dependiente del porcentaje de supervivencia celular para las líneas celulares HT-29 y para H460, la CI 50 determinadas fueron de 17,28 $\mu\text{g/mL}$ y 22,17 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

CAPÍTULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Zamilpa, A., Tortoriello, J., Navarro, V., Delgado, G. y Alvarez, L. Five new steroidal saponins from *Solanum chrysotrichum* leaves and their antimycotic activity. *J. Nat. Prod.* 2002; 65(1): 1815-19.
2. Cáceres, A., López, B., Girón, M., Logemann, H. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. *J. Ethnopharmacol.* 1991; 31(3): 263-76.
3. Yamashita, T., Matsumoto, T., Yahara, S., Yoshida y N., Nohara, T. Structures of two new steroidal glycosides from *Solanum dulcamara*. *Chem Pharm Bull.* 1991; 39 (6): 1626-28.
4. Herrera, A., Soberanes, A., Rivera, M., Cruz, E., Zamilpa, A., Alvares, L. y Tortoriello, J. Effectiveness and tolerability of a standarized phytodrug derived from *Solanum Chrysotrichum* on tinea pedís. *Planta Med.* 2003; 69(1): 390-95.
5. Dabur R, Sing H, Chhillar, AK, Ali, M. y Sharma, GL. Antifungal potential of Indian medicinal plants. *Fitoterapia.* 2004; 75(4): 389-91.
6. Gonzales M., Zamilpa A., Marquina, S., Navarro, V. y Alvarez, L. Antimycotic spirostanol saponins from *Solanum hispidum* leaves and their structure-activity relationship, *J. Nat. Prod.* 2004; 67(1): 938-41.
7. Chang L, García L, Rosabal & Morales J. Caracterización fitoquímica y la evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos de hojas y tallos de *Solanum nigrum* L que crece en cuba. *Rev Mex Cienc Farm.* 2013; 44(4):30-35.
8. Shivakumar P & vidyasagar G. Antimycotic activity of low polar petroleum ether and interpolar methanolic young leaf extracts of *Solanum nigrum* L. *Int. Lett. Nat. Sci.* 2015; 4 (1): 47-56.
9. Toro, M., Batanero, J. Gálvez, M. y cordero, M. Actividad citotóxica de *Solanum melongena* L. *Revi. de Fitoter.* 2004; 4(2): 149-151.
10. Villavicencio, M., Pérez, B., Mendoza, E. y Maldonado, V. Citotoxicidad en células hela de extractos de tres especies de plantas medicinales de Hidalgo, México. *Polibotánica.* 2008; 26 (1):1-7.
11. Patel S, Gheewala N, Suthar A & Shah A. *In vitro* Cytotoxicity Activity of *Solanum nigrum* extract against HeLa cell line and Vero cell line. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2009; 1(1): 38-46.

12. Shokrzadeh, M., Azadbakht, M., Ahangar, N., Hashemi, A., Saeedi, S. Cytotoxicity of hydroalcoholic extracts of *Cucurbita pepo* and *Solanum nigrum* on HepG2 and CT26 cancer cell lines. *Pharmacogn. Mag.* 2010; 6(23): 176-179.
13. Moglad E, Abdalla O, Koko W, Saadabi A. *In vitro* Anticancer Activity and Cytotoxicity of *Solanum nigrum* on cancers and Normal cell lines. *Int J Canc Res.* 2014; 10(2): 74-80.
14. Mukherjee C, Paul S & Kundu R. Comparative Evaluation of anti-proliferative activity of *Solanum nigrum* methanolic and aqueous extract on Hela, Siha and C33A Cells. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2015; 7(4):320-324.
15. Gallmeier M, Torres C (2017). Efecto antineoplásico de extracto de *Solanum dulcamara* L. sobre líneas celulares de carcinoma mamario canino. [Tesis de maestría] Santiago: Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias UNIVERSIDAD DE CHILE; 2017.
16. Burger T, Mokoka T, Fouche G et al. Solamargine, a bioactive steroidal alkaloid isolated from *Solanum aculeastrum* induces non-selective cytotoxicity and p-glycoprotein inhibition. *BMC Complement Altern Med.* 2018; 18(137):1-11.kkk
17. Kapoor K. *Illustrate Dictionary of Microbiology.* Oxford Book Company. Jaipur. 2010. PÁG. 91-92.
18. Estrada G, Ramírez M. *MICOLOGÍA GENERAL.* Primera edición. Manizales, Caldas: Centro editorial UCM; 2019.
19. García H, Rivas C & Leos C. Actividad antifúngica. En Rivas C, Oranday M, & Verde M (Eds). *Investigación en plantas de importancia médica.* Barcelona, España. *Omnia Science*; 2016 p. 101-128
20. Brooks G, Butel J & Morse S. *Microbiología Médica de Jawez, Melnick y Adelberg.* 18TH Ed. Mexico DF: el Manual Moderno; 2005. 621-622.
21. Mueller GM & Bills GF. *Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods.* Elsevier Academic Press. Oxford. 2004. Pág. 12.
22. Guarro J. Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012; 30(1):33-39.
23. Engelkirk PG & Duben-Engelgerik J. *BURTON'S MICROBIOLOGY FOR THE HEALTH SCIENCES.* 9TH Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2011.

24. Zacchino S. Estratégias para a descoberta de novos agentes antifúngicos. Em Yunes and Calixto eds. Plantas como fontes de novos medicamentos. SC, Brasil: Grifos (Ed); 2001.
25. Sánchez L, Matos R & Kumakawa H. Infecciones micóticas superficiales. *Dermatol peru.* 2009; 19 (3): 226-230.
26. Sánchez L, Galarza C, Matos R. Infecciones micóticas subcutáneas. *Dermatol peru.* 2009; 20(1): 362-371.
27. Sánchez L, Galarza C & Matos R. (2010) Infecciones micóticas sistémicas o profundas: paracoccidiomicosis. *Dermatol peru.* 2010; 20(1): 01-16.
28. Conejo F, Martínez A, Alvez F, Hernández A, Baquero E, et al. Documento de consenso SEIP-AEPap-SEPEAP sobre la etiología, el diagnóstico y el tratamiento de las infecciones cutáneas micóticas de manejo ambulatorio. *Pediatr Aten Primaria.* 2016; 18(1): 149-172.
29. Ospina D, Hoyos R, Arango M, Orozco F & Rios J. Actividad antifúngica de extractos vegetales de biomasa celular de nem sobre aislamientos de dermatofitos. *Rev colomb biote.* 2014; 16(2): 187-193.
30. Bejar V, Villanueva F, Guevara JM et al. Epidemiología de las dermatomicosis en 30 años de estudio en el Instituto de Medicina Tropical Daniel A. Carrión. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. *An. Fac. med.* 2014; 75 (2): 167-172.
31. Romero S. Dermatofitosis humana en una comunidad con desigualdad social. Ayacucho 2018. *Investigación UNSCH.* 2019; 27(1): 79-86.
32. Romero S, Guevara R. Dermatofitosis en estudiantes de la Institución Educativa “San Juan de la Frontera”, Ayacucho, Perú, 2010. *Rev Per Epidemiol.* 2011; 15(1): 65-68.
33. Molina A. Aspectos clínicos, diagnósticos y terapéuticos de las dermatofitosis. *Enferm Infecc Microbiol clin.* 2011; 29(3): 33-39.
34. Lazo V, Hernández G, Méndez R. Candidiasis sistémica en pacientes críticos, factores predictores de riesgo. *Horiz Med.* 2018; 18(1):75-85.
35. Garrote A. Micosis cutáneas. Educación Sanitaria. *OFFARM.* 2002; 21(8): 82-90
36. Zurita S. Esporotricosis y paracoccidiomicosis en Perú: experiencias en prevención y control. *Rev. Peru.med.exp.Salud pública.* 2014; 31(2): 352-357.
37. Galarza C. enfoque de las micosis profundas em el Perú. *Dermatol peru.* 1996; 6(1):1-2.

38. Bonifaz J. MICOLOGÍA MÉDICA BÁSICA. 5TH Ed. New York: Mc Graw-Hill; 2015.
39. Scott L. Mayo Clinic Family Health book. 5TH Ed: Mayo clinic Press; 2018. Pág. 417, 441.
40. Fortún J, Meije Y, Fresco G y Moreno S. Aspergilosis. Formas clínicas y tratamiento. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012; 30(4):201-208.
41. Galeano E, Tobón A, Pérez C. Compromiso dermatológico en infecciones micóticas profundas. *Dermatol Peru*. 2019; 29 (1): 17-21.
42. Kneale M, Bartholomew J, Davies E & Denning D. Global acces to antifungal therapy and its variable cost. *JAntimicrobChemother*, 2016; 71(1):3599-3606.
43. Arias J, Arias L. Técnicas básicas en cultivo de células. Cultivo de células *in vitro*. Edición en Español. Barcelona: Editorial Académica Española; 2012.
44. Garza L. CITOTOXICIDAD IN VITRO: Estudio del potencial de diversas líneas celulares en la evaluación de sustancias [Tesis de Doctorado]: Monterrey: Universidad Autónoma de Nuevo León; 1990.
45. Beltrán N, González C. Técnica de cultivos celulares e ingeniería de tejidos. Morelos: Universidad autónoma Metropolitana. 2016.
46. García, S. Citotoxicidad y genotoxicidad de dos extractos naturales [Tesis de Doctorado]: Buenos Aires: Universidad de Buenos aires; 2003.
47. Instituto Nacional del Cáncer (Diccionario de Cáncer de NCI). Última fecha de actualización 03/31/2021. Disponible en [cáncer.gov/español/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer]. Accedido el día 03.31.2021.
48. Freshney R. CULTURE OF ANIMAL CELLS. A Manual of Basic Technique and Specialized Applications. 7TH Ed: Wiley Blackwell; 2016.
49. Wayne A & Carter G. Simplified and Economical Cell Culture Techniques for Laboratories Beginning. Ed. Clinical Microbiology Laboratory. Michigan. 1972
50. Miguel M & Herrero E. Desarrollo de las Técnicas de Cultivos Celulares. 1^a Ed. Pontevedra España: Escuela de Gestión Sanitaria; 2016.
51. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for celular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*. 1983; 65(1):55-63.

52. Monks A, Scudeiro D, Skehan P, Shoemaker R, Paul K, Vistica D et al. Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* 1991; 83 (11):757-766.
53. Olaya A. Introducción a los cultivos celulares para bioquímicos: Tipos, medios y manipulación. Barcelona; Editorial Académica Española; 2017.
54. Lozano J, Galindo J, García-Borrón J, Martínez J, Peñafiel R & Solano F. Capítulo 29 Cáncer Aspectos moleculares en BIOQUIMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR para ciencias de la salud. 3ª ed. Madrid: Mc Graw Hill Interamericana; 2005.
55. Catalan V, Honorato F, García F et al. Carcinogénesis colónica: proceso de transformación neoplásica. *Rev. med. Univ Navarra.* 2003; 47(1): 15-19.
56. Herrera A, Garcia M. Capítulo 3 Carcinogénesis en Manual de Oncología: Procedimientos médico quirúrgicos. 2ª Ed. Instituto Nacional de Cancerología, Mexico: Mc Graw Hill (Ed); 2003.
57. Lobo N, Shimnono Y, Qian D & Clarke M. The biology of cancer stem cells. *Annu. Rev. Dev. Biol.* 2007; 23(1): 675-99.
58. Ramos W. Día mundial contra el cáncer. *Boletín epidemiológico del Perú.* 2019; 28(05): 109-110.
59. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: Globocan Sources and methods. *Int J Cancer.* 2019. 144 (8): 1941-1953.
60. Vallejos C, Aguilar A, Flores C. Situación del cáncer en el Perú. *Diagn.* 2020; 59(2): 77-85.
61. Huffman M. Self-medicative behavior in African great apes. An evolutionary perspective into the origin of human traditional medicine. *Bioscience.* 2001; 51(8): 651-661.
62. Soler D, Macias C, Pereira E, Dranguet Y, Guzman V, Calzada A. Farmacología de las plantas medicinales. *Rev Inf Científica* [Internet]. 2009; 61(1): 1-14. [citado 09 setiembre de 2021]. Recuperado de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=551757317013>.
63. WHO. The Promotion and Development of Traditional Medicine, Ed. WHO, Technical Report Series, No. 622, Ginebra. 1978.
64. Chang L & Rosabal Y. *Solanum nigrum*. *Revista Ciencias.* 2011:1-6.

65. Martinez A, Uscanga A & Rodriguez P. Actividad citotóxica in vitro frente a células tumorales. En Rivas C, Oranday M & Verde M (Eds.). *Investigación en plantas de importancia médica*. Barcelona, España: OmniaScience. 2016. 269-312.
66. Avalos A& Perez-Urria E. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca Serie Fisiologia Vegetal*. 2009; 2(3): 119-145.
67. Gurgel L, sindrim J, Martins D, Cechinel V, Rao V. In vitro antifungal activity of dragon's blood from *Croton urucana* against dermatophytes. *J Ethnopharmacol*. 2005; 97(2): 409-412.
68. Bolougne I, Petit P, Ozier H, Desfontaines L, Loranger G. Insecticidal and antifungal chemicals produced by plants: A review. *EnvironChemLett*. 2012; 10(4): 325-347.
69. Avalos J, Treviño J, Verde M, Rivas C, Oranday A, Moran J et al. Evaluación citotóxica de los extractos etanólicos de *Azadirachta indica* (A. Juss) sobre diferentes líneas celulares. *Rev Mex Cienc Farm*. 2014; 45(3): 33-34.
70. Tayarani Z & Seyed A. Capítulo 28 Cytotoxic Plants: Potential uses in prevention and treatment of cancer in Current Cancer Treatment- Novel beyond Conventional Approaches. Intech Ed. Ozdemir; 2011 p. 651-692.
71. Dahlawi H, Jordan N, Clench MR, Le Maitre C. Bioactive actions of pomegranate fruit extract on leukemia cell lines in vitro hold promise for new therapeutic agents for leukemia. *Nutr Cancer*. 2012; 64(1):100-110.
72. Taroco R, Seija R, Vignoli R. Capítulo 36 Métodos de Estudio de la sensibilidad antibiótica en: Temas de Bacteriología y Virología Médica. 2ª ed. Montevideo: FERMUR Eds; 2006 p. 663-671.
73. Davicino R, Mattar M, Casali Y, Correa S, Pettenati E y Micalizzi B. Actividad antifúngica de extractos de plantas usadas en medicina popular en Argentina. *Rev. peru. biol*. 2007; 14(2): 247-251.
74. Jorgensen J & Sahm D. Chapter 72 Antimicrobial susceptibility testing in: Manual of clinical microbiology. 11TH ed. New Jersey: Wiley; 2015.
75. Clinical Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast; approved standard NCCLS document M27-A2. Wayne PA: National Committee for Clinical Laboratory Standard Institute. 2002.

76. Clinical Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard CLSI document M38-A2. Wayne PA: Clinical Laboratory Standards Institute. 2008.
77. Clinical Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility. M44-A.
78. Zapata F, Cardona N. Lo que debemos saber sobre los métodos de sensibilidad a los antifúngicos. *Rev CES Med.* 2012; 26(1): 71-83.
79. Borenfreund E, Babich H y Martin N. Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays – The neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. *Toxicol in vitro.* 1988; 2(1): 1-6.
80. Reppeto M. Toxicología Fundamental. Métodos alternativos. Toxicidad in vitro. 3ª ed. Sevilla: enpses-Mercie Group; 2002.p. 303-305.
81. Norton F. Dye exclusión viability assay using a hemacytometer: Tech Note: Nalge Nunc International corp. 2000; 3(25): 67-68.
82. Lodish H, Berk A, Zipurky L, Matsudaira P, Darnell J. Biología Celular y molecular. 4ª ed. New York: Freeman and çcompany eds; 2002.p. 595-597.
83. Acevedo J, Angeles J, Rivera H, Petrievich V, Nolasco N, colli N et al. Modelos in vitro para evaluación y caracterización de péptidos bioactivos. En Segura M, Chel L & Betancur D (eds). Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias; Barcelona: OmniaScience; año.
84. Pérez R, García M, Martínez M & Soto M. (2006). ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y ANTIOXIDANTE DE *Petiveria aliácea* L. *Revista Chapingo Serie Horticultura.* 2006; 12(1): 51-56.
85. Escobar M, Fabio A y Aristizábal F. Aplicación de un método fluorométrico para evaluar la proliferación celular en líneas celulares tumorales. *Vitae.* 2010; 17(2):173-180.
86. Escobar L, Rivera A y Aristizabal F. Estudio comparativo de los métodos de resazurina y MTT en estudios de citotoxicidad en líneas celulares tumorales humanas. *Vitae.* 2010; 17(1): 67-74.
87. Knaap S, Spooner D, León B. Solanaceae endémicas del Perú. *Rev. peru. biol.* 2006; 13 (2): 612-643.
88. Ferrer A, Ferreira E, Tenorio F, Santana K, Aiardes. Aislamiento e identificación de compuestos esteroidales de los frutos de *Solanum jamaicence* Mill. *Rev. Cubana Quim.* 2018; 30 (2):222-231.

89. Särkinen T, Baden M, Gonzáles P, Cueva M, Giacomini L, Spooner D et al. Listado anotado de *Solanum* L. (Solanaceae) en el Perú. *Rev.per.biol.* 2015; 22 (1): 003-062.
90. Bernal R, Gradstein S & Celis M (eds.). Catálogo de plantas y líquenes de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales, 2015. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. Disponible en [<http://catalogoplantasdecolombia.unal.edu.com>]. Accedido el día 07/20/2021.
91. Sarker S, Latif Z, Gray A. Natural Products Isolation. 2TH ed. New Jersey: Humana Press Inc; 2006.
92. Handa S, Khanuja S, Longo G, Rakesh D. Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. Trieste: ICS UNIDO; 2008.
93. Lozano N, Solís L, Bonilla P. Sustancias químicas bioactivas de la *Peperomia flavamentosa*. *Ciencia e Investigación* [Internet]. 1998; 1(1): 32-34 [citado 14 de julio de 2021], Disponible en: <https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/farma/article/view/4749>.
94. Lock O. INVESTIGACIÓN FITOQUÍMICA. Métodos en el estudio de productos naturales. 3^a ed. Lima: PUCP; 2016.
95. Dominguez X. Métodos de investigación fitoquímica. Limusa; 1973.
96. Barba J. Introducción al análisis de los productos vegetales. Universidad Metropolitana de México; 1997.
97. Wagner H & Blatt S. Plant Drug Analysis: A thin layer Chromatography Atlas. Berlín Germany: Editorial Springer-Verlag. 1984 p. 225-244.
98. Medinilla, B. Manual de laboratorio de fitoquímica. Universidad San Carlos de Guatemala; 1993 p.8-9.
99. Santizo D. Aislamiento y cuantificación gravimétrica de saponinas esteroidales contenidas en *Yucca elephantipes* (Izote) [Tesis de grado]. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia (Universidad San Carlos de Guatemala); 2013.
100. Rojas R, Bustamente B, Bauer J et al. Antimicrobial activity of select Peruvian Medicinal Plants. *J Ethnopharmacol.* 2003; 88(2): 199-204.
101. Tapia C. Actualización en pruebas de susceptibilidad antifúngica. *Rev. Chil. Infect.* 2009; 26(2):144-150.

102. Liu M, Seidel V, Katerere D & Gray A. Colorimetric broth microdilution method for the antifungal screening of plant extracts against yeast. *Methods*. 2007; 42: 325-329.
103. Fernández TB, Cabañes F, Carrillo A, Esteban A, Inza I, Abarca L & Guarro J. Collaborative evaluation of optimal antifungal susceptibility testing conditions for dermatophytes. *J Clin Microb*. 2002; 40(11): 3999-4003.
104. Ruiz Quiroz JR. Actividad antifúngica in vitro y concentración mínima inhibitoria mediante microdilución de ocho plantas medicinales. [Tesis de maestría] Lima: Facultad de Farmacia y bioquímica UNMSM; 2013.
105. Holetz F, Pessini G, Sanches N, Cortez, Nakamura C, Filho B. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002; 97(7): 1027-1031.
106. Roberts W & Carter GR. Simplified and economical cell culture techniques for laboratories beginning clinical veterinary virology. Michigan: Clinical Microbiology Laboratory Department of Microbiology and Public Health College of Veterinary Medicine; 1972.
107. Callacondo D, Quispe M, Lindo S & Vaisberg A. Actividad citotóxica del extracto etanólico de *Gnaphalium spicatum* "KETO KETO" en cultivos de líneas celulares tumorales humanas. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 2008; 25(4): 380-385.
108. USP 42 Farmacopea de los Estados Unidos Americanos. NF 37 Formulario Nacional. Rockville: United States Pharmacopeial Convention ; 2019.
109. Morantes S, Perdomo S, Carrillo E & Aristizabal F. Caracterización del perfil quimiosensibilidad y del estado de ampliación génica de un panel de líneas celulares de origen tumoral pulmonar. *Rev. Colomb. Biotecnol*. 2013; 15 (1): 42-51.
110. Phongpaichits, Nikom J, Rungjindamai, Sakayaroj J, Hutadilok N, Rukachai S & Kirkitara K. Biological activities of extracts from endophytic fungi isolated from *Garcinia* plants. *FEM Immunol. Med. Microbiol*. 2007; 51(3): 517-525.
111. Kuete V, Fankam A, Wiench B & Effert T. Cytotoxicity and modes of action of the methanol extracts of six Cameroonian medicinal plants against multidrug-resistant tumor cells. *J Evid-Based Complementary Altern Med*. 2013 p.1-10.
112. Foy E, Mac Donald D, cuyos M, dueñas R. Extracción, identificación y evaluación de saponinas en *Aguaricus bisporus*. *Biotiempo*. 2005; 5: 31-36.

113. Azwanida N. A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Med Aromat Plants*. 2015; 4(3):1-6
114. Zhang QW, Ling LG & Ye WC. Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chin Med*. 2018; 13:20.
115. Bart HJ & Pils S. An Introduction in Industrial Scale Natural Products Extraction. In Bart HJ Verlag. Extraction of Natural Products from Plants. 1TH Ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & CO KGaA; 2011.
116. Tecanhuey L. Estudio fitoquímico de *Ipomoea murucoides* [Tesis de grado]. Puebla. Escuela de Ciencias (Universidad de las Américas Puebla); 2005.
117. Retamozo Montes A. contenido de glicoalcaloides esteroidales totales en las hojas y frutos de *Solanum hispidum* Pers y *Solanum radicans* L y determinación de su bioactividad frente a *Artemia salina*. [Tesis de grado] Ayacucho: Facultad de Ciencias de la Salud UNSCH; 2018.
118. Martínez A. Saponinas esteroides. Universidad de Antioquía [online]. Medellín 2001.
119. Cañon T, Mendo M. Estudio fitoquímico de la especie vegetal *Solanum crinitripes* Dunal (Solanaceae) y evaluación de uso como agente antimicrobiano [Tesis de grado] Bogotá: Facultad de Ciencias Aplicadas y Ambientales (UDCA); 2018.
120. Velasco R, Rosas B, Martínez C, Herrera S, Tapia A & Vega A. Efecto de *Solanum hispidum* sobre la proliferación de células hematopoyéticas *in vitro* e *in vivo*. *Medigraphic Artemisa*. 2009; 34(1):77-78.
121. Flechas H, Sanchez L & Silva J. Tamizaje fitoquímico y cálculo del rendimiento de saponinas esteroidales de tres procedencias *Solanum quitoense* Var. Septentrionale “naranjillo”. *Colombia forestal*; 2008; 11: 201-211.
122. Ramírez A, Isaza G, Pérez J, Martínez M. Estudio fitoquímico preliminar y evaluación de la actividad antibacteriana de *Solanum dolichosepalum* Bitter (frutillo). *Rev Cubana Plant Med*. 2017; 22(1): 1-11.
123. Sandoval N, Arenas R, Giusiano G, García D, Chávez L, Zuñiga P. Diagnóstico y tratamiento de dermatofitosis y pitiriasis versicolor. *Rev Med Hondur*. 2012; 80(2): 66-74.
124. Mendez J y Herrera M. Métodos de susceptibilidad antifúngica: revisión metodológica. *Rev.méd.Hosp.Nac.Niños* [Internet]. 2001; 36(2): 37-44.

125. Diaz MC, Camponovo R, Araya I et al. Identificación y sensibilidad antifúngica *in vitro* de *Candida spp.* de origen vaginal a fluconazol, clotrimazol y nistatina. *Rev Esp Quimioter.* 2016; 29 (3): 151-154.
126. San Juan J, Fernandez C, Almaguer M et al. Sensibilidad *in vitro* de cepas cubanas de *Aspergillus spp.* de origen clínico y ambiental. *Biomédica.* 2017; 37(1): 452-459.
127. Martin E, Canton E & Espinel A. Otros métodos para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos. *Rev Iberoam Micol.* 2007; 16(1):1-9.
128. Esteves-Souza A, Sarmiento da silva T, Fernandes C, de Carvalho M, Braz-Fiho R & Echevarria A. Cytotoxic activities against Erlich carcinoma and human K562 leukaemia of alkaloids and flavonoid from two *Solanum* Species. *J. Braz. Chem. Soc.* 2002; 13(6): 836-842.
129. Lu Y, Luo J, Kong L. Steroidal alkaloid saponins and steroidal saponins from *Solanum surattense*. *Phytochemistry.* 2011; 30 (30): 1-5.
130. León C, Gómez S, Morantes S. Caracterización del perfil de sensibilidad de un panel de líneas celulares para valoración de citotoxicidad *in vitro*. *Biomédica.* 2006; 26: 161-168.
131. Borrego P. et al. Evaluación de la actividad citotóxica de extractos y fracciones de las especies *Conyza trihecatactis*, *Agerantina vacciniaefolia*. *Bistua.* 2016; 12(2):212-227.
132. Moyano D, Murcia L, Parra D, Burgos A, Aristizabal F. Evaluación de la actividad citotóxica y antimicrobiana del compuesto [Ag(phen)₂]SalH. *Rev Colomb Quím.* 2012; 41(1): 47-59.
133. Quispe A, Zavala D, Posso M. y Rojas, J. Efecto citotóxico de *Annona muricata* (guanábana) en cultivo de líneas celulares de adenocarcinoma gástrico y pulmonar. *Cienc. Investig. Méd. Estud.* 2007; 12(1): 19-22.

CAPÍTULO VIII. ANEXOS

Anexo 1. Clasificación taxonómica de la especie *Solanum hispidum* Pers.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



"Año del Buen Servicio al Ciudadano"

CONSTANCIA N°053-USM-2017

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

La muestra vegetal (planta completa) recibida de **Jannelle Cyndi MENDOZA LEON**, egresada de la Maestría en Recursos Vegetales y Terapéuticos-Universidad Nacional Mayor de San Marcos, ha sido estudiada y clasificada como: ***Solanum hispidum*** Pers. y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUBCLASE: ASTERIDAE

ORDEN: SOLANALES

FAMILIA: SOLANACEAE

GENERO: *Solanum*

ESPECIE: *Solanum hispidum* Pers.

Nombre vulgar: "Ñahui pashta"

Determinado por Mg. Asunción Alipio Cano Echevarría y Blgo. Paúl Gonzales Arce

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.

Fecha, 27 de abril de 2017


Mag. ASUNCIÓN CAÑO ECHEVARRÍA
JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

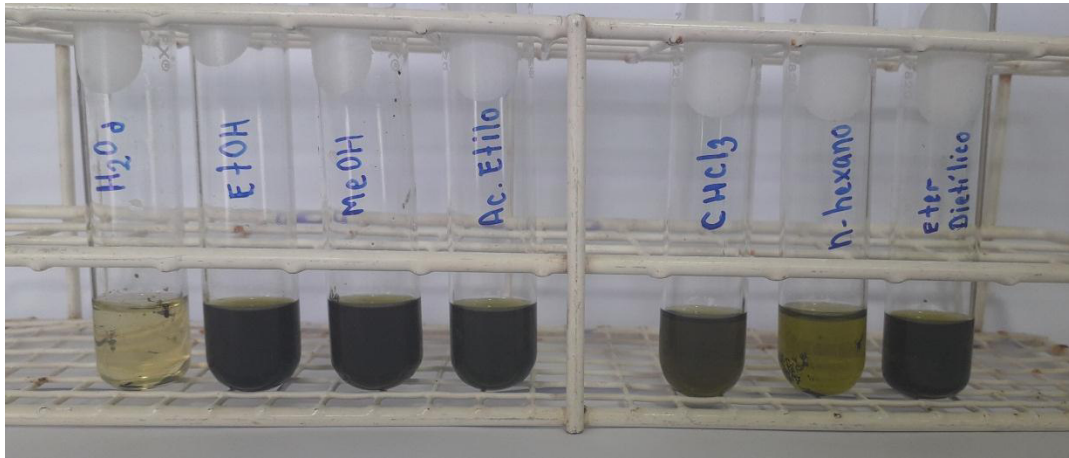


ACE/ddb

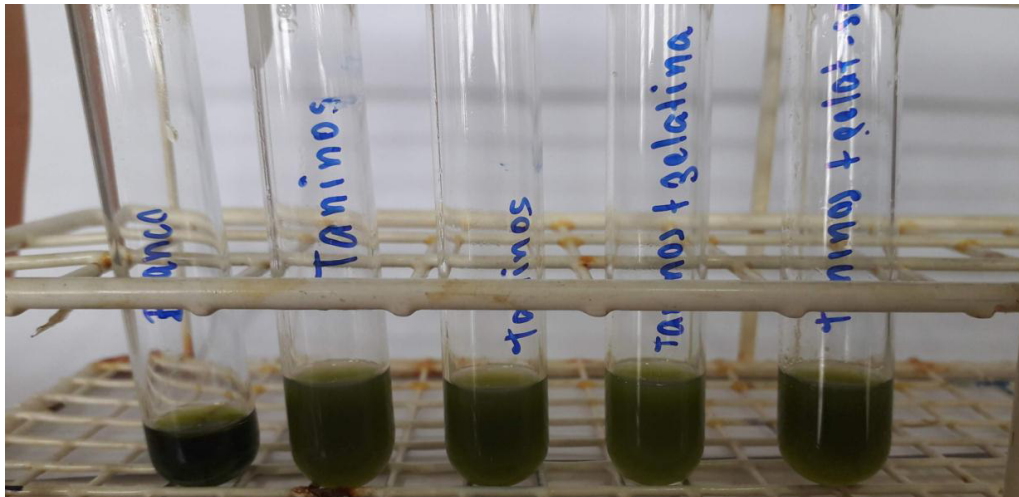
Anexo 2. Imágenes de la especie *Solanum hispidum* Pers



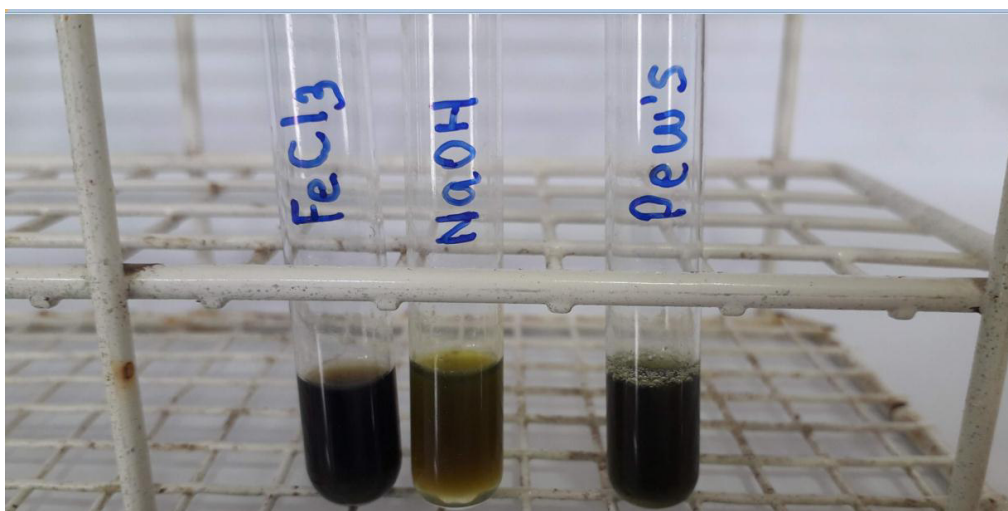
Anexo 3. Imágenes de resultados de las principales pruebas realizadas



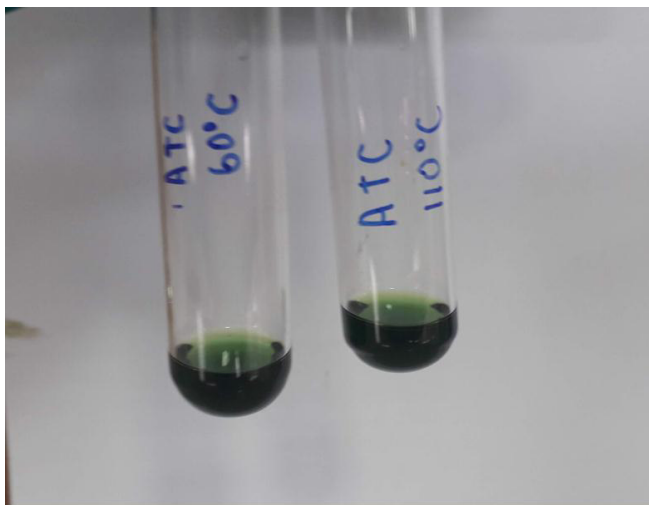
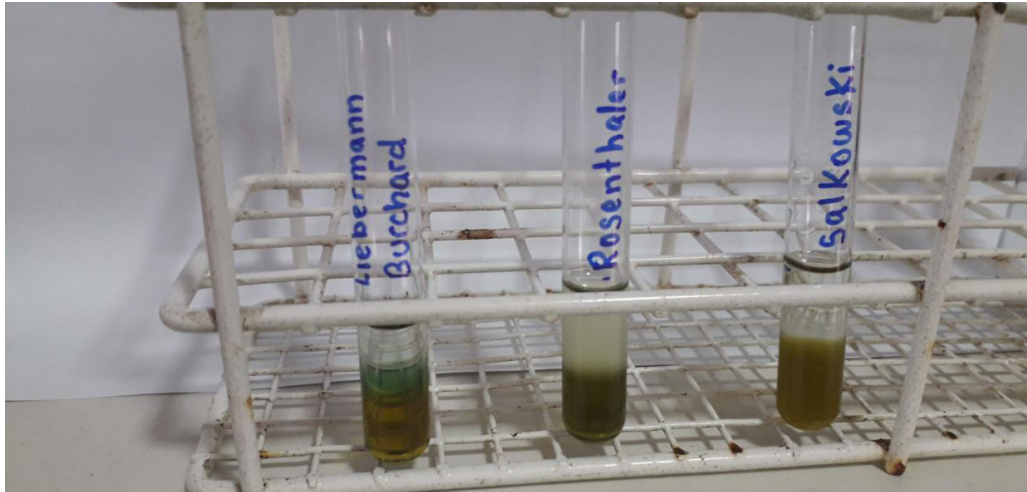
Solubilidad del extracto



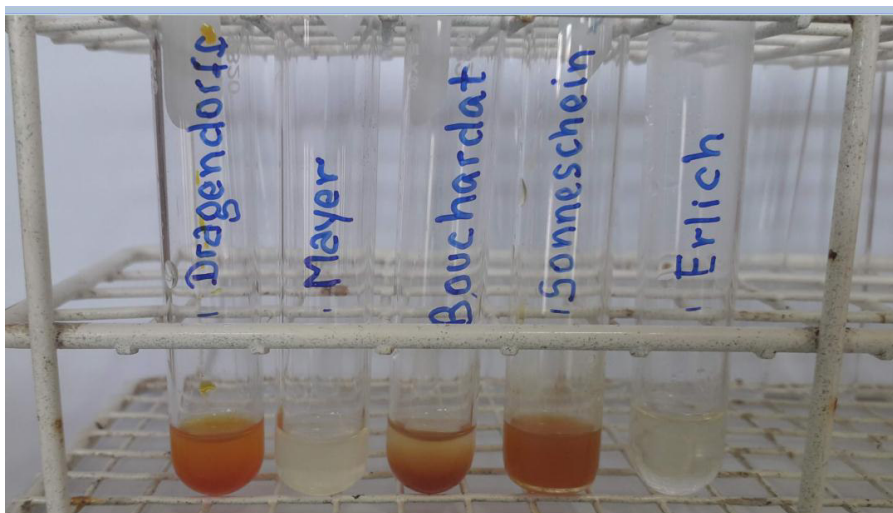
Resultado taninos



Resultado flavonoides



Resultados esteroides



Resultados alcaloides

Anexo 4. Lecturas de absorbancia en el lector de microplacas Multiscan

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,191	0,196	0,208	0,230	0,239	0,262	0,286	0,245	0,280	0,297	0,292	0,303
B	0,550	0,564	0,522	0,491	0,457	0,501	0,455	0,464	0,416	0,476	0,339	0,470
C	0,207	0,246	0,239	0,211	0,229	0,218	0,219	0,219	0,212	0,217	0,221	0,226
D	0,224	0,225	0,180	0,184	0,207	0,173	0,167	0,187	0,193	0,203	0,210	0,209
E	0,145	0,148	0,163	0,130	0,235	0,148	0,148	0,152	0,163	0,158	0,176	0,138
F	0,144	0,156	0,130	0,160	0,160	0,141	0,149	0,269	0,180	0,205	0,231	0,225
G	0,205	0,171	0,140	0,154	0,192	0,169	0,144	0,172	0,159	0,174	0,201	0,187
H	0,544	0,609	0,620	0,612	0,511	0,629	0,588	0,580	0,613	0,678	0,706	0,712

Microplaca 1. Lectura de la absorbancia de las respuestas línea celular HT-29

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,183	0,199	0,198	0,184	0,187	0,158	0,219	0,189	0,217	0,224	0,210	0,215
B	0,698	0,691	0,684	0,723	0,640	0,632	0,668	0,459	0,459	0,503	0,446	0,474
C	0,219	0,226	0,224	0,219	0,202	0,202	0,220	0,195	0,222	0,214	0,237	0,224
D	0,244	0,262	0,216	0,210	0,234	0,196	0,194	0,186	0,213	0,225	0,244	0,235
E	0,216	0,240	0,213	0,222	0,212	0,177	0,188	0,193	0,185	0,205	0,227	0,230
F	0,217	0,217	0,190	0,206	0,240	0,167	0,158	0,191	0,204	0,214	0,210	0,234
G	0,309	0,278	0,234	0,281	0,255	0,307	0,247	0,280	0,288	0,278	0,215	0,229
H	0,639	0,699	0,466	0,488	0,426	0,421	0,440	0,408	0,494	0,489	0,466	0,427

Microplaca 2. Lectura de la absorbancia de las respuestas línea celular H460

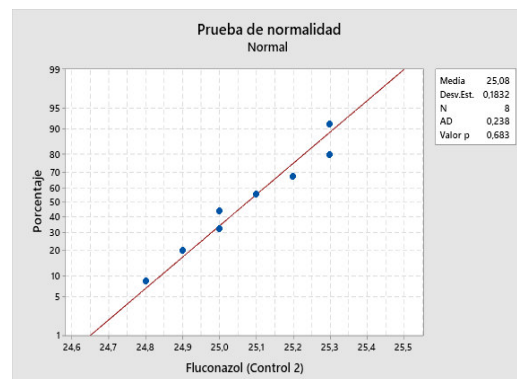
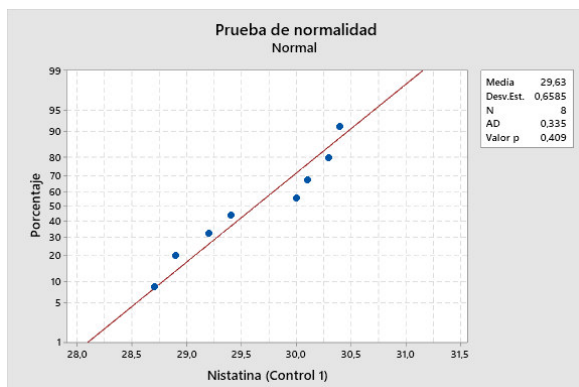
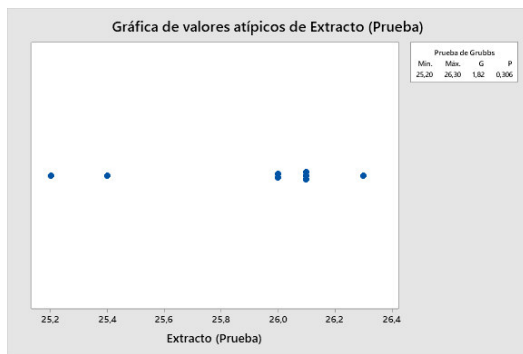
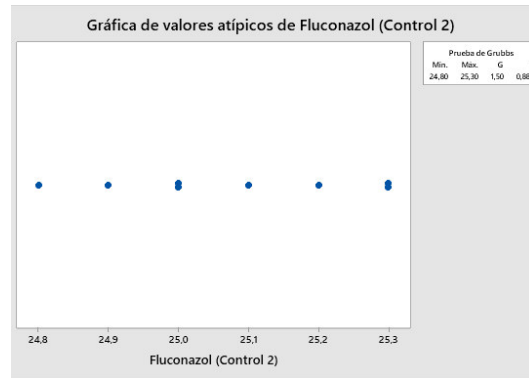
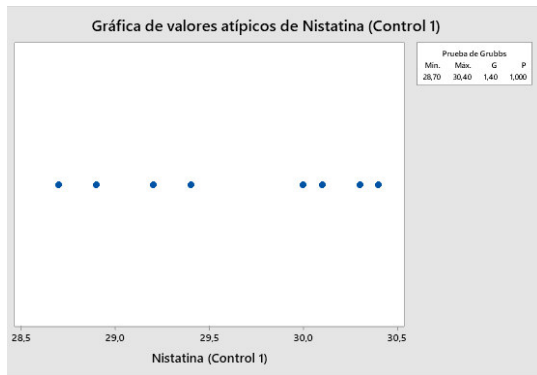
Anexo 5. Productos biológicos y medios de cultivo utilizados

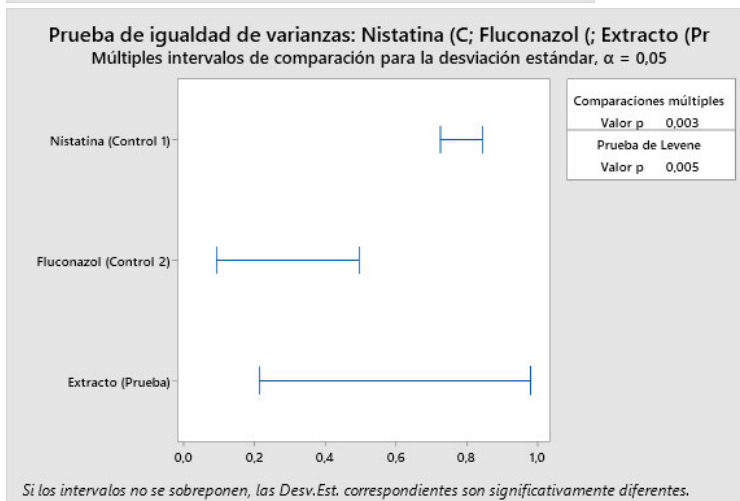
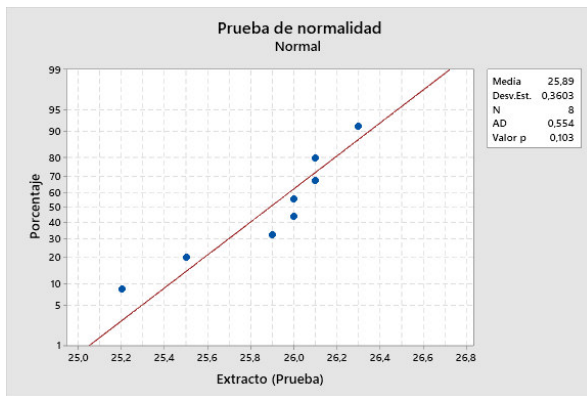
Productos biológicos				
Nombre	Origen/Marca/pasaje	Lote	Conservación (Fecha)	Fecha de Viabilización
Candida albicans ATCC 10231	ATCC 10231/CNCC	2048320	-70 °C	2020-01-13
Aspergillus brasiliensis ATCC 16404	ATCC 16404/CNCC	2941764	-70 °C	2020-05-24
Trichophyton mentagrophytes ATCC 9533	ATCC 9533/CNCC	3318554	-70 °C	2020-06-30
Línea celular 3T3	CNSP/p-116	11004087	-190 °C (2017-10-11)	2020-12-21
Línea celular HT-29	CNSP/p-130	-	-190 °C (2011-09-29)	2020-12-21
Línea celular NCI-H460	CNSP/p-140	-	-190 °C (2011-09-29)	2020-12-21
Medios de cultivo				
Nombre	Origen/Marca	Lote	Conservación	Fecha de vencimiento
Agar Dextrosa Sabouraud (ADS)	OXOID	2326836	Ambiente	2023-05-31
Caldo dextrosa Sabouraud	Lofilchem	071917502	Ambiente	2021-07-16
Peptona	BD	7030896	Ambiente	2021-11-21
Caldo peptona cloruro sódico	OXOID	2300690	Ambiente	2020-10-01
Medio MEM	Sigma Aldrich	SLBW4162	2 °C – 8 °C	
Medio Dulbecco's (DMEM)	Caisson	11180009	2 °C – 8 °C	2022-11-30
Medio RPMI				
RPMI con glutamina y sin bicarbonato	Sigma Aldrich- polvo	SLCC9741	2 °C – 8 °C	-
Suero fetal bovino	PAN/BIOTECH - polvo	P2170108	- 20 °C	30-06-2022
Buffer MOPS (3-Morpholine sulfonic acid)	Sigma Aldrich- polvo	K51926529 003	Ambiente	31-10-2024
Tripsina	Caisson - líquido	08141006	2 °C – 8 °C	31-10-2021
Piruvato de sodio	Caisson - líquido	07191005	2 °C – 8 °C	31-07-2021
MTT (Thiazolil blue tetrazolium bromide)	Alfa Aesar - polvo	A12503	Ambiente	25-04-2021
Resazurina sal sódica	Alfa Aesar - polvo	10232548	Ambiente	2023-05-31
Fosfato monobásico de potasio	Merck - polvo	AM1090173	Ambiente	2022-04-01
Tween 80	Fischer Scientific - polvo	163994	Ambiente	2021-06

Anexo 6. Sustancias de referencia, solventes, reactivos, equipos e instrumentos utilizados

SUSTANCIAS DE REFERENCIA (Estándares)				
Nombre	Proveedor/Tipo/Potencia	Lote	Conservación	Fecha de vencimiento
Ketoconazol	Medrock –Secundario- 99.2% T/C	KET/11709322	< 25 °C	2022-08-30
Fluconazol	Medrock –Secundario- 99.6% T/C	IN0161600001	< 25 °C	2021-09-30
Nistatina	InterPharma-Secundario-6167.4 IU/mg	P1WS-N02-03	2°C – 8 °C	2020-12-14
Doxorrubicina	GP Pharm-Secundario-98.8% T/C	MP2098	15°C – 30 °C	2021-01-31
SOLVENTES Y REACTIVOS				
Nombre	Marca	Lote	Conservación	Fecha de vencimiento
Etanol	MERCK	K50289627	Ambiente	2021-05-31
Metanol	JTBaker	Y38C32	Ambiente	2023-09-14
Acetato de etilo	JTBaker	0000192081	Ambiente	2022-12-26
Cloroformo	JTBaker	V08C56	Ambiente	2021-02
Eter dietílico	Merck	K50029121	Ambiente	2021-02
n-hexano	Merck	K53380591	15 °C – 25 °C	2024-04-20
Dimetilsulfóxido ACS	Scharlau	19537505	15 °C – 25 °C	2002-02
Hidróxido de sodio	Merck/sólido	B1556098	Ambiente	2021-04-30
Cloruro férrico. 6 H ₂ O	CDH/polvo	080617	Ambiente	Mayo 2022
Ácido Tricloroacético	JTBaker/cristales	0000134674	Ambiente	2021-05-30
EQUIPOS E INSTRUMENTOS				
Equipo	Marca/Laboratorio	Vigencia	Materiales	Proveedor/Lote
Estufa	MEMMERT/CNCC	2021-12	Microplacas 96 pocillos	Cyto-one/ 1911504
Baño termostático	Ficher/CNCC		Cámara de Neubauer	Brand
Rotaevaporador	Buchi/CNCC		Frascos de cultivo 25 cm ²	
Cabina de Bioseguridad	Thermo Fisher Scientific/CNCC	2021-01	Papel filtro	Whatman
Microscopio invertido	NIKON ELIPSE TS 100/CNSP		Pipeta multicanal	Eppendorf
Multiskan lector de microplacas	Thermo Scientific/CNSP	2020-12	Pipeta monocanal	Eppendorf
Cabina de Bioseguridad	Labconco/CNSP	2021-08	Regla metálica	Hope
Incubadora de CO ₂	Scientific/CNSP	2021-07	Placas de microtitulación	USALAB/20190620
Balanza analítica	Sartorius/CNCC		Puntas de pipeta (tips)	Eppendorf
Vernier (pie de rey)	Mitutoyo/CNCC		Placas de petri	
Espectrofotómetro UV vis			Agitador magnético	Ika Werk

Anexo 7. Tratamiento estadístico de datos para actividad antifúngica frente a *Candida albicans* ATCC 10231





Prueba t de 1 muestra para la media de Extracto (Pr

Informe de resumen

¿Es la media mayor que 18?

La media de Extracto (Pr es significativamente mayor que el objetivo ($p < 0,05$).

Estadísticas

Tamaño de la muestra	8
Media	25,888
Límite inferior de 95%	25,646
Desviación estándar	0,36031
Objetivo	18

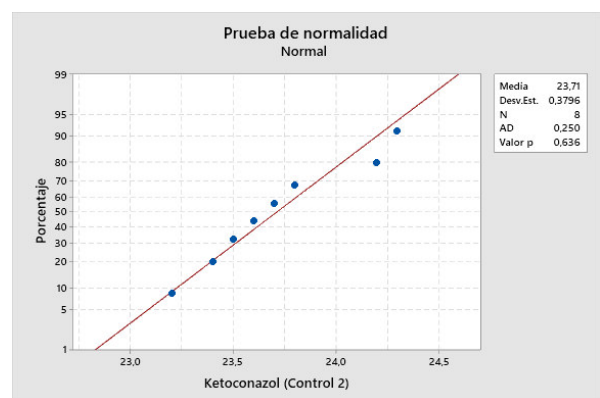
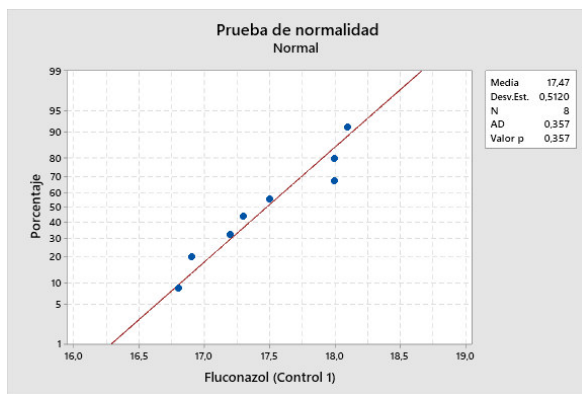
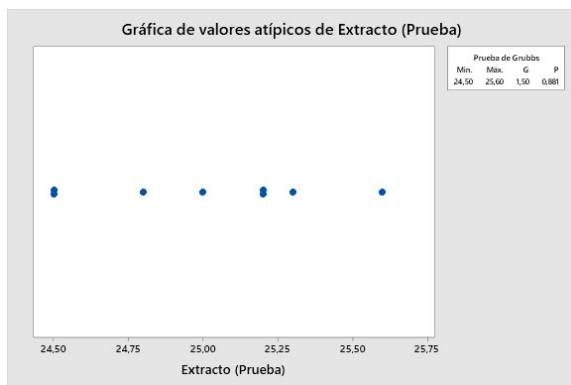
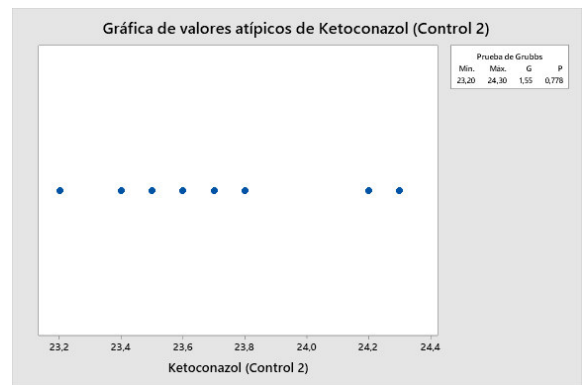
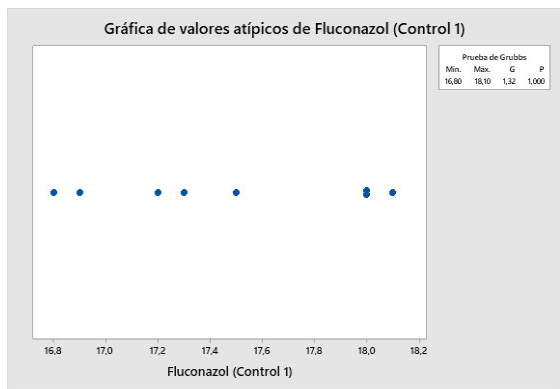
Distribución de los datos

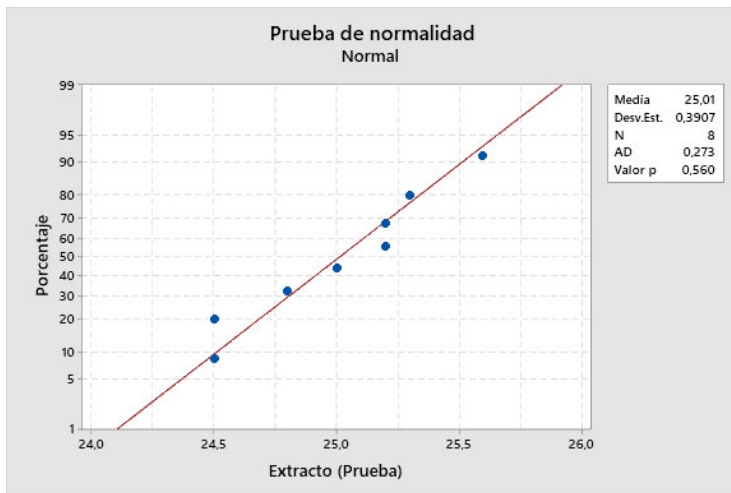
¿Dónde se encuentran los datos con respecto al objetivo?

Comentarios

- Prueba: Usted puede concluir que la media es mayor que 18 en el nivel de significancia de 0,05.
- IC: Cuantifica la incertidumbre asociada a la estimación de la media a partir de los datos de las muestras. Usted puede estar 95% seguro de que la media verdadera es mayor que 25,646.
- Distribución de datos: Compare la ubicación de los datos con el objetivo. Busque datos poco comunes antes de interpretar los resultados de la prueba.

Anexo 8. Tratamiento estadístico de datos para actividad antifúngica frente a *Aspergillus brasiliensis* atcc 16404.





Prueba t de 1 muestra para la media de Extracto (Pr Informe de resumen

¿Es la media mayor que 18?

La media de Extracto (Pr es significativamente mayor que el objetivo ($p < 0,05$).

Estadísticas

Tamaño de la muestra	8
Media	25,013
Límite inferior de 95%	24,751
Desviación estándar	0,39074
Objetivo	18

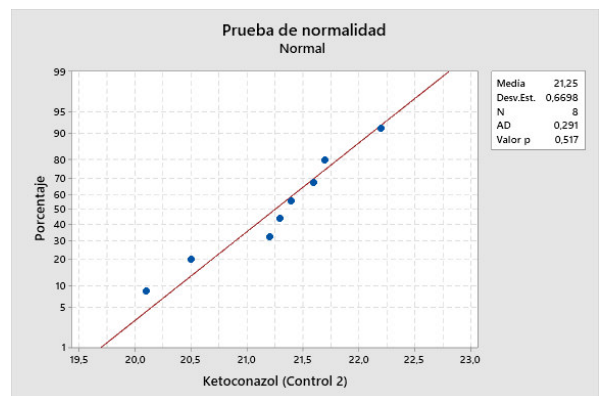
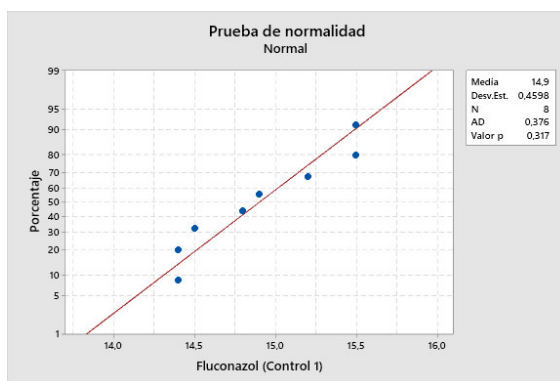
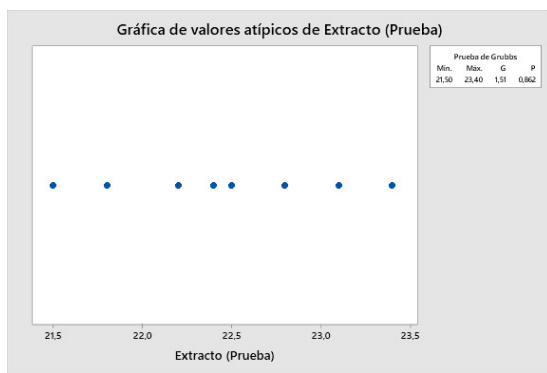
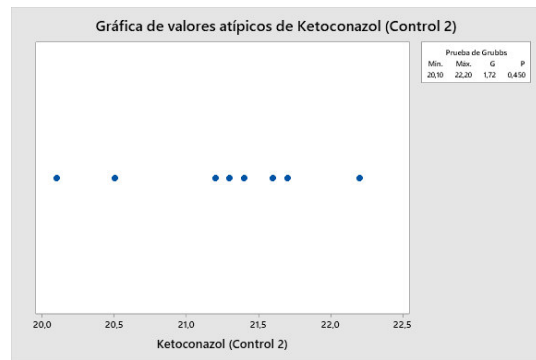
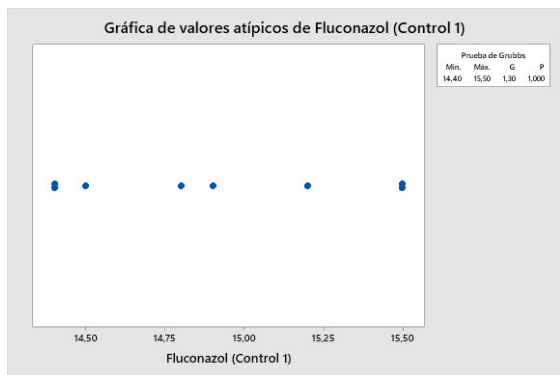
Distribución de los datos

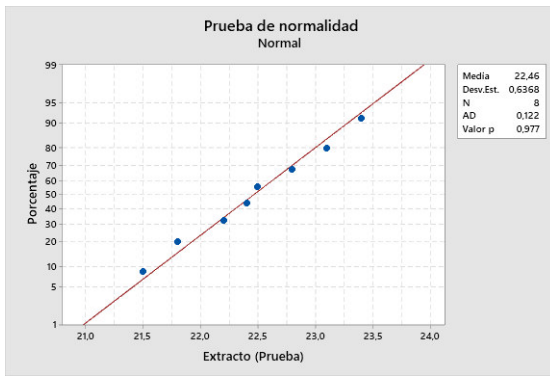
¿Dónde se encuentran los datos con respecto al objetivo?

Comentarios

- Prueba: Usted puede concluir que la media es mayor que 18 en el nivel de significancia de 0,05.
- IC: Cuantifica la incertidumbre asociada a la estimación de la media a partir de los datos de las muestras. Usted puede estar 95% seguro de que la media verdadera es mayor que 24,751.
- Distribución de datos: Compare la ubicación de los datos con el objetivo. Busque datos poco comunes antes de interpretar los resultados de la prueba.

Anexo 9. Tratamiento estadístico de datos para actividad antifúngica frente a *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533.





Prueba t de 1 muestra para la media de Extracto (Pr Informe de resumen

¿Es la media mayor que 18?

La media de Extracto (Pr es significativamente mayor que el objetivo ($p < 0,05$).

Estadísticas

Tamaño de la muestra	8
Media	22,463
Límite inferior de 95%	22,036
Desviación estándar	0,63682
Objetivo	18

Distribución de los datos

¿Dónde se encuentran los datos con respecto al objetivo?

Comentarios

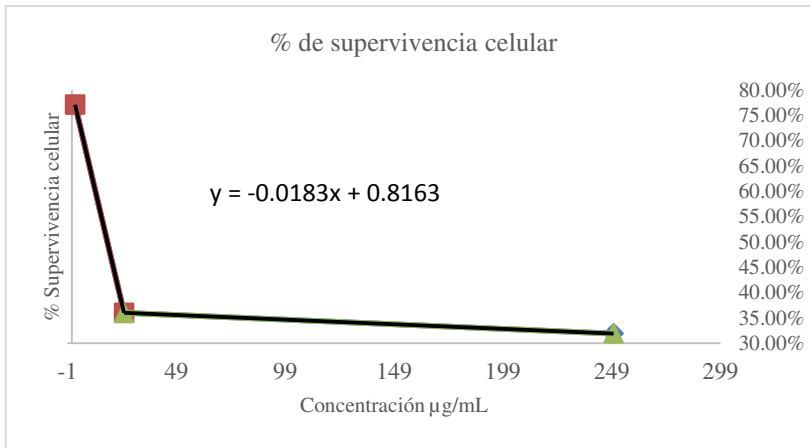
- Prueba: Usted puede concluir que la media es mayor que 18 en el nivel de significancia de 0,05.
- IC: Cuantifica la incertidumbre asociada a la estimación de la media a partir de los datos de las muestras. Usted puede estar 95% seguro de que la media verdadera es mayor que 22,036.
- Distribución de datos: Compare la ubicación de los datos con el objetivo. Busque datos poco comunes antes de interpretar los resultados de la prueba.

Anexo 10. Resumen del tratamiento estadístico de datos para actividad antifúngica

Prueba	Valores atípicos	Normalidad	Igualdad de varianzas	Actividad del extracto
Estadístico	Grubbs	Anderson-Darling	Levenne	t de una muestra
Control 1	1.00	0.409		
Control 2	0.888	0.683		
Prueba	0.306	0.103		
p valor	p > 0.05	p > 0.05	0.005	0.001
Condición	p < 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p < 0.05
Conclusión	No	Si	No	Si

El conjunto de datos no presenta valores atípicos (H_0 = No hay valores atípicos en los datos, se acepta), siguen una distribución normal (H_0 = Los datos siguen una distribución normal, se acepta), las varianzas no son iguales (H_0 = Las varianzas son iguales, se rechaza) y la prueba t de una muestra para media del extracto confirma que el extracto tiene actividad antifúngica ya que las medias de los tratamientos son mayores de 18 mm (H_0 = Las medias son \leq 18 mm, se rechaza).

Anexo 11. Cálculo de la CI 50 mediante análisis de regresión lineal



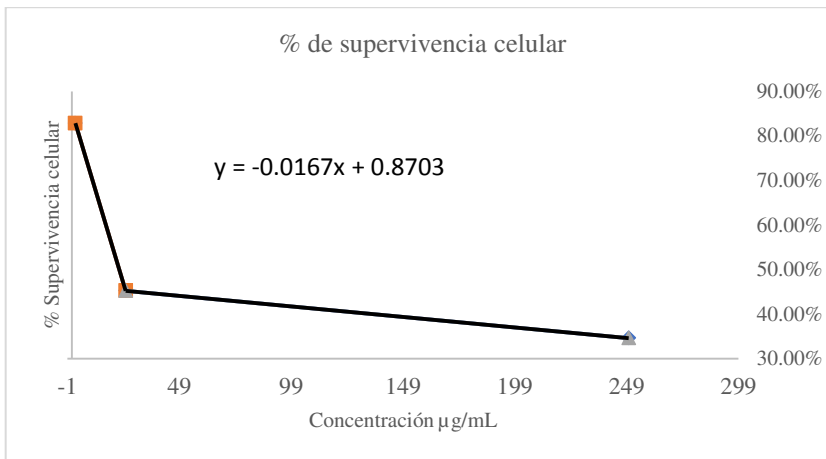
Para HT-29, cálculo de CI 50 a partir de la fórmula de la ecuación

$$y = -0.0183x + 0.8163$$

Despejando x

$$x = \frac{0.8163 - y}{0.0183}$$

Para determinar CI 50 reemplazar $y = 0.50$ entonces $x = 17, 28 \mu\text{g/mL}$



Para H 460, cálculo de CI 50 a partir de la fórmula de la ecuación

$$y = -0.0167x + 0.8703$$

Despejando x

$$x = \frac{0.8703 - y}{0.0167}$$

Para determinar CI 50 reemplazar $y = 0.50$ entonces $x = 22, 17 \mu\text{g/mL}$

