

UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA



**ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE MICRODILUCIÓN DE
ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS HIDROFÍLICOS Y
LIPOFÍLICOS DE PLANTAS MEDICINALES FRENTE A *Candida albicans*
ATCC 90028**

Tesis previa a la Obtención del Título de Bioquímica Farmacéutica.

AUTORES:

ESTEFANIA ALEXANDRA CAÑAR INGA

CI: 0105159297

EVA MIREYA PAGUAY VERDUGO

CI: 0302398839

DIRECTORA:

DRA. MARÍA DE LOURDES JERVES ANDRADE. MGT.

CI: 0101660579

ASESORES:

DR. FABIÁN LEÓN TAMARIZ PhD CI: 0102311610

DRA. NANCY MIRIAN CUZCO QUIZHPI MGT CI: 0301624854

CUENCA-ECUADOR

2017



RESUMEN

Las infecciones fúngicas han adquirido gran importancia a lo largo de las últimas décadas. Las micosis por hongos levaduriformes constituyen las infecciones más importantes, los agentes etiológicos de esta patología son numerosos siendo *Candida albicans* el principal patógeno del género *Candida* que afecta al ser humano. Si bien se dispone de tratamiento farmacológico; los cambios epidemiológicos de las candidiasis, la capacidad de los agentes antifúngicos y el incremento de la resistencia a éstos han creado controversias que van dirigidas a la búsqueda de nuevas alternativas.

El objetivo del presente trabajo fue estandarizar la técnica de microdilución en placa para la determinación de la actividad anti-candida de los extractos de plantas medicinales tanto lipofílicas como hidrofílicas, para lo cual se utilizaron 12 plantas: Ajo (*Allium sativum*), Cullen (*Otholobium pubescens*), Congona (*Peperomia inaequalifolia*), Romero (*Rosmarinus officinalis*), Menta (*Mentha piperita*), Matico (*Piper aduncum*), Tomillo (*Thymus vulgaris*), Lechuguilla (*Gamochaeta spicata*), Nogal Negro (*Juglans nigra*), Rosas (*Rosa spp.*), Papaya (*Carica Papaya*) y Achira (*Canna indica*); un control positivo de acción probada (antimicótico); un control negativo (solvente) y como agente patógeno al microorganismo *Candida albicans* ATCC 90028.

Se aplicó una estadística descriptiva para observar y describir el efecto que presentaron las plantas en estudio al utilizar la técnica de ensayo, y un método analítico para analizar el porcentaje de inhibición del crecimiento del microorganismo en relación a la concentración del antifúngico y de los productos vegetales.

Al analizar los resultados que relacionan las variables, se concluyó que no fue efectiva la estandarización de la técnica con los productos vegetales.

Palabras clave: Actividad anti-candida, estandarización, microdilución, *Candida albicans*.



ABSTRACT

Fungal infections have become very important over the last few decades. Mycoses caused by yeast infections are the most important infections. The etiological agents of this pathology are numerous, with *Candida albicans* being the main pathogen of the genus *Candida* that affects humans. Although pharmacological treatment is available; the epidemiological changes of the candidiasis, the capacity of the antifungal agents and the increase of the resistance to these have created controversies that are directed to the search of new alternatives.

The objective of the present work was to standardize the microdilution technique in plate for the determination of the anti-candida activity of the extracts of both lipophilic and hydrophilic medicinal plants, for which we used 12 plants: Ajo (*Allium sativum*), Culen (*Otholobium pubescens*), Congo (*Peperomia inaequalifolia*), Rosemary (*Rosmarinus officinalis*), Mint (*Mentha piperita*), Matico (*Piper aduncum*), Thyme (*Thymus vulgaris*), Lechuguilla (*Gamochaeta spicata*), Black Walnut (*Juglans nigra*), Rosas (*Rosa spp.*), Papaya (*Carica Papaya*) and Achira (*Canna indica*); A positive control of proven action (antimycotic); A negative control (solvent) and as pathogenic agent to the microorganism *Candida albicans* ATCC 90028.

A descriptive statistic was applied to observe and describe the effect of the plants under study when using the test technique and an analytical method to analyze the percentage inhibition of growth of the microorganism in relation to the concentration of antifungal and plant products.

When analyzing the results that relate the variables, it was concluded that the standardization of the technique with the vegetal products was not effective

Key words: Anti-candida activity, standardization, microdilution, *Candida albicans*.



INDICE

RESUMEN	2
ABSTRACT.....	3
DEDICATORIA	14
DEDICATORIA	15
AGRADECIMIENTOS	16
AGRADECIMIENTOS	17
INTRODUCCIÓN	18
JUSTIFICACIÓN	20
HIPÓTESIS	20
OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS	20
CAPÍTULO I	21
1 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI-CANDIDA: MICRODILUCIÓN	
21	
1.1 Candida albicans	21
1.1.1 Datos Clínicos.....	23
1.1.2 Patogenia.....	23
1.1.3 Tratamiento.....	24
1.2 Microdilución.....	24
1.2.1 Fundamento	25
1.3 PLANTAS MEDICINALES.....	26
1.3.1 Ajo (<i>Allium sativum</i>).....	28
1.3.2 Lechuguilla (<i>Gamochaeta spicata</i>).....	31
1.3.3 Matico (<i>Piper aduncum</i>).....	32
1.3.4 Menta (<i>Mentha piperita</i>).....	34
1.3.5 Nogal Negro (<i>Juglans nigra</i>).....	36



1.3.6	Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>).....	38
1.3.7	Tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>)	40
1.3.8	Culen (<i>Otholobium pubescens</i>).....	43
1.3.9	Congona (<i>Peperomia inaequalifolia</i>)	45
1.3.10	Achira (<i>Canna indica</i>).....	47
1.3.11	Papaya (<i>Carica Papaya</i>).....	49
1.3.12	Rosas (<i>Rosa spp.</i>)	51
CAPÍTULO 2.....		54
2	MATERIALES Y MÉTODOS.....	54
2.1	DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	54
2.2	MATERIAL VEGETAL.....	54
2.3	VARIABLES	54
2.4	OBTENCIÓN DE EXTRACTOS.....	55
2.4.1	Extracción por Percolación.....	55
2.4.1.1	Lavado, secado y preparación	55
2.4.1.2	Preparación de los extractos	55
2.4.1.3	Concentración del extracto.....	56
2.4.1.4	Liofilización.....	56
2.4.2	Extracción con fluidos supercríticos.....	57
2.5	OBTENCIÓN DE ACEITES ESENCIALES.....	57
2.5.1	Recolección y lavado.	57
2.5.2	Destilación por arrastre de vapor.	57
2.6	ACTIVIDAD ANTI-CANDIDA	58
2.6.1	Método	58
2.7	MANEJO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.....	61
CAPITULO 3.....		62



RESULTADOS	62
CAPITULO 4.....	68
4 CONCLUSIONES.....	68
CAPITULO 5.....	69
5 RECOMENDACIONES	69
BIBLIOGRAFIA	70
ANEXOS	78
ANEXO 1 ILUSTRACIONES	78

**ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla N° 1. Descripción Taxonómica del Ajo (<i>Allium sativum</i>)	30
Tabla N° 2. Descripción Taxonómica de la Lechuguilla (<i>Gamochaeta spicata</i>)	33
Tabla N° 3. Descripción Taxonómica del Matico (<i>Piper aduncum</i>)	35
Tabla N° 4. Descripción Taxonómica de la Menta (<i>Mentha piperita</i>)	37
Tabla N° 5. Descripción Taxonómica del Nogal Negro (<i>Juglans nigra</i>)	39
Tabla N° 6. Descripción Taxonómica del Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	41
Tabla N° 7. Descripción Taxonómica del Tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>).....	42
Tabla N° 8. Descripción Taxonómica del Culen (<i>Otholobium pubescens</i>)	45
Tabla N° 9. Descripción Taxonómica de la Congona (<i>Peperomia inaequalifolia</i>)	47
Tabla N° 10. Descripción Taxonómica de la Achira (<i>Canna indica</i>).....	49
Tabla N° 11. Descripción Taxonómica de la Papaya (<i>Carica papaya</i>)	51
Tabla N° 12. Descripción Taxonómica de la Rosa (<i>Rosas spp.</i>)	53
Tabla N°13. Porcentaje de Inhibición de Crecimiento de <i>Candida albicans</i> ATCC 90028 con Fluconazol.....	66
Tabla N°14. Prueba T de Inhibición de Crecimiento de <i>Candida albicans</i> ATCC 90028 con Fluconazol.....	66
Tabla N°15. Porcentaje de Inhibición de Crecimiento de <i>Candida albicans</i> ATCC 90028 con Extractos.....	68
Tabla N°16. Porcentaje de Inhibición de Crecimiento de <i>Candida albicans</i> ATCC 90028 con Aceites Esenciales.....	68



ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen N° 1. <i>Candida albicans</i>	24
Imagen N° 2. Colonias de <i>Candida albicans</i>	24
Imagen N° 3. Ajo (<i>Allium sativum</i>).....	30
Imagen N° 4. Lechuguilla (<i>Gamochaeta spicata</i>).....	33
Imagen N° 5. Matico (<i>Piper aduncum</i>).....	34
Imagen N° 6. Menta (<i>Mentha piperita</i>).....	36
Imagen N° 7 Nogal Negro (<i>Juglans nigra</i>).....	38
Imagen N° 8 Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>).....	40
Imagen N° 9 Tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>)	42
Imagen N° 10 Culen (<i>Otholobium pubescens</i>).....	44
Imagen N° 11 Congona (<i>Peperomia inaequalifolia</i>)	46
Imagen N° 12 Achira (<i>Canna indica</i>)	48
Imagen N° 13 Papaya (<i>Carica papaya</i>)	50
Imagen N° 14 Rosas (<i>Rosa spp.</i>).....	53
Imagen N° 15. Inhibición de Crecimiento de <i>Candida albicans</i> ATCC 90028 con Fluconazol.....	67



ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración N° 1. Percolación	79
Ilustración N° 2: Evaporación del solvente.....	79
Ilustración N° 3: Concentración del extracto a base de nitrógeno	80
Ilustración N° 4: Extracción por fluidos súper críticos	80
Ilustración N° 5. Obtención de aceites esenciales por arrastre de vapor.	81
Ilustración N° 6. Activación de <i>Candida albicans</i> ATCC 90028.....	81
Ilustración N° 7. Siembra en placa fondo plano	82



Estefanía Alexandra Cañar Inga, autora de la tesis “Estandarización de la Técnica de Microdilución de Actividad Antifúngica de Extractos Hidrofilicos y Lipofílicos de Plantas Medicinales frente a *Candida albicans* ATCC 90028”, reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Bioquímica Farmacéutica. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora.

Cuenca, 29 de Marzo de 2017

Estefanía Alexandra Cañar Inga

C.I: 0105159297



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Eva Mireya Paguay Verdugo, autora de la tesis “Estandarización de la Técnica de Microdilución de Actividad Antifúngica de Extractos Hidrofílicos y Lipofílicos de Plantas Medicinales frente a *Candida albicans* ATCC 90028”, reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Bioquímica Farmacéutica. El uso que la Universidad de Cuenca hiciera de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora.

Cuenca, 29 de Marzo de 2017

Eva Mireya Paguay Verdugo
C.I: 0302398839



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Estefanía Alexandra Cañar Inga, autora de la tesis “**Estandarización de la Técnica de Microdilución de Actividad Antifúngica de Extractos Hidrofílicos y Lipofílicos de Plantas Medicinales frente a *Candida albicans* ATCC 90028**”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 29 de Marzo de 2017

Estefanía Alexandra Cañar Inga
C.I: 0105159297

ESTEFANIA ALEXANDRA CAÑAR INGA
EVA MIREYA PAGUAY VERDUGO

12



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Eva Mireya Paguay Verdugo, autora de la tesis “Estandarización de la Técnica de Microdilución de Actividad Antifúngica de Extractos Hidrofilicos y Lipofílicos de Plantas Medicinales frente a *Candida albicans* ATCC 90028”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 29 de Marzo de 2017

Eva Mireya Paguay Verdugo

C.I: 0302398839



DEDICATORIA

Esta Tesis va dedicada a mi amado hijo Juan José Faicán, posiblemente en este momento no entiendas mis palabras, pero cuando seas capaz quiero que te des cuenta lo que significas para mí ya que tu afecto y tu cariño han sido los detonantes de mi felicidad, de mi esfuerzo, de mis ganas de buscar lo mejor para ti. Eres la razón de que me levante cada día, de esforzarme por el presente y el mañana, libras mi mente de todas las adversidades que se presentan y me impulsas cada día a superarme; sé que no ha sido fácil pero tal vez si no te tuviera no habría logrado tantas cosas grandes.

Te agradezco por ayudarme a encontrar el lado dulce de la vida, eres mi orgullo y fuiste mi motivación más grande para concluir con éxito este proyecto.

ALEXANDRA CAÑAR



DEDICATORIA

Esta Tesis va dedicada a mi amada madre Giralda Verdugo González, quién es el pilar fundamental de mi familia ya que ha sido padre y madre para mí y mis hermanas. Quién a pesar de todo se ha limitado en muchas cosas para poder darnos lo necesario y que podamos llegar a ser profesionales. Es ella quién me ha apoyado siempre, quién ha sabido estar conmigo en las buenas pero sobre todo me ha acompañado en las malas.

Mami eres la mujer que me llena de orgullo, y no va a haber manera de devolverte todo lo que me has ofrecido desde que nací e incluso desde antes. Esta tesis es un logro más en mi vida, y sin lugar a duda gran parte de esto ha sido gracias a ti. Madre no sé qué hubiese sido de mí sin ti.

Simplemente te amo y te adoro mamita.

EVA MIREYA PAGUAY VERDUGO



AGRADECIMIENTOS

A Dios por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mi madre Carmita por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.

A mi padre José por los ejemplos de perseverancia y constancia que lo caracterizan y que me ha infundado siempre, por el valor mostrado para salir adelante y por su amor.

A mi hermana Claudia por ser el ejemplo de una hermana mayor de la cual aprendí aciertos y de momentos difíciles, gracias por tu infinita paciencia y ayuda a lo largo de mi vida, por cimentar en mí las bases de responsabilidad y deseos de superación.

A José Faicán gracias por tu apoyo y cariño, que me han permitido finalizar con éxito este proyecto.

A mis abuelitos Miguel y Bárbara, mis tías, tíos, primas, y a todos aquellos que participaron de forma directa o indirectamente en la elaboración de esta tesis.

A mi gran amiga Karen Aguilar, tú has estado desde que empezamos la universidad; el tiempo sigue pasando y ahí estas cerca de mi ofreciendo lo mejor que tienes, gracias por tu apoyo, por tus esfuerzos, por mantener viva la amistad.

A nuestra directora Dra. Lourdes Jerves por su gran apoyo y motivación para la culminación de nuestros estudios profesionales y para la elaboración de esta tesis; a la Dra. Nancy Cuzco, Ing. Vladimiro Tobar y Dr. Fabián León por su tiempo compartido y por impulsar el desarrollo de nuestra formación profesional.

A mi compañera de tesis Eva Paguay por su bondad, compañerismo y apoyo durante la elaboración de nuestro proyecto.

ALEXANDRA CAÑAR



AGRADECIMIENTOS

Al finalizar tan arduo trabajo lleno de dificultades, es inevitable expresar un gran agradecimiento a personas e instituciones sin las cuales no hubiese sido posible terminar este trabajo.

Primeramente es muy importante agradecer a Dios, quién por medio de su bondad y amor me ha permitido llegar a este punto en mi vida.

A mi familia: mi madre y hermanas, en quienes he tenido un ejemplo principalmente de perseverancia y responsabilidad durante mi carrera universitaria.

A nuestra directora, Dra. Lourdes Jerves Andrade, quien con su apoyo, paciencia y tiempo pero sobre todo con su sabiduría nos ha sabido guiar para poder culminar tan grande meta en nuestras vidas.

A nuestros asesores: Dra. Nancy Cuzco Mgt. y Dr. Fabián León PhD, quienes nos brindaron gran parte de su tiempo para ayudarnos a solucionar los inconvenientes presentados.

Al Ing. Vladimiro Tobar, quién con sus conocimientos en el campo estadístico nos guió para obtener los resultados concluyentes que fortalecieron la investigación.

A mi compañera de tesis Alexandra Cañar, por su paciencia, dedicación, esfuerzo y apoyo durante todo el proceso de desarrollo de esta investigación.

Finalmente, agradecer al Proyecto VLIR de Plantas Medicinales de la Facultad de Ciencias Químicas de nuestra prestigiosa Universidad de Cuenca por facilitarnos: los laboratorios, los equipos y más materiales que fueron indispensables para el desarrollo de nuestro trabajo de titulación.

EVA MIREYA PAGUAY VERDUGO



INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años la incidencia de enfermedades fúngicas se ha incrementado, las causas pueden ser: el aumento considerable de pacientes inmunocomprometidos, cirugía de trasplante, quimioterapia, nutrición parenteral, y el uso de agentes antimicrobianos de amplio espectro, agregados a la presencia de Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), dándose verdaderas “placas Petri vivientes” individuales, quienes son altamente susceptibles a las infecciones oportunistas. (Carmilema Sánchez & Delgado Delgado, 2010)

Candida albicans es un hongo que se encuentra frecuentemente en la flora normal de la piel, boca, garganta, estómago y vagina, pudiendo causar diferentes infecciones dependiendo del lugar donde se encuentre.

Los fármacos antifúngicos actualmente disponibles presentan problemas de resistencia, interacciones farmacológicas, toxicidad y elevado precio; además el costo de la terapia antifúngica incluye también los rubros asociados a la mortalidad por el fracaso del tratamiento, hospitalización prolongada y complicaciones. (Rojas Armas, Ortiz Sanchez, Jáuregui Maldonado, Ruiz Ouiroz, & Almonacid Roman, 2015)

Por otro lado, las plantas medicinales durante mucho tiempo fueron la principal fuente de productos terapéuticos, con la aparición de la industria farmacéutica y los avances de la farmacología, las plantas pasaron a ser fuente de principios activos de medicamentos de síntesis, y más tarde, han sido desplazadas por éstos. En la actualidad hay “una vuelta a la naturaleza” con el consiguiente aumento en el consumo de productos elaborados a base de plantas medicinales.

Un gran porcentaje de los principios activos presentes en las plantas, deben su actividad terapéutica a compuestos químicos de gran importancia denominados metabolitos secundarios que pueden encontrarse distribuidos en algunas partes anatómicas o por toda la planta, entre estos tenemos: los aceites esenciales, alcaloides, flavonoides, gomas y vitaminas los cuales se obtienen mediante la extracción, aislamiento e identificación de los mismos. (Valle Vargas & Yanac Salcedo, 2014)

Por lo anteriormente expuesto, surge la necesidad de disponer de una técnica de screening estandarizada en las condiciones de trabajo de laboratorio del Proyecto VVir de



Plantas Medicinales, que permita encontrar extractos bioactivos frente a *Cándida albicans*, como un primer paso en la búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento, aprovechando la biodiversidad del Ecuador. Se seleccionó la de microdilución, que emplea una serie de diluciones, para determinar el porcentaje de inhibición, y que presenta claras ventajas por su rapidez, sencillez y economía debido al uso de microvolúmenes. (Sánchez, Susana, & Delgado Delgado, 2010)

Actualmente, los métodos cuantitativos son ampliamente utilizados debido a que son simples, reproducibles y fáciles de leer e interpretar. La técnica de microdilución en caldo propuesta por el CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, antiguo NCCLS) documento M27-A2 para levaduras es una de las más difundidas. Desde su aparición los protocolos establecidos por el CLSI han sido aceptados universalmente como el método de referencia para el ensayo de la actividad “*in vitro*” de los compuestos antifúngicos. (Bulla Quintero & Hernández Zorro, 2010)



JUSTIFICACIÓN

El género *Candida* corresponde a cerca del 80% de las infecciones fúngicas en Estados Unidos (Gill, 2015). *Candida albicans* presenta una variedad de cepas resistentes y los fármacos actuales tienen una significativa toxicidad y causan resistencia. Frente a este problema de Salud Pública, los compuestos derivados de las plantas constituyen sustitutos importantes y por lo tanto, es indispensable estandarizar una técnica de microdilución para determinar la actividad anticándida de diferentes extractos vegetales con probable potencial antifúngico, que a más de determinar y establecer con exactitud el porcentaje de inhibición frente a *Candida albicans*, permita optimizar tiempo y recursos tanto humanos como materiales.

HIPÓTESIS

Al aplicar la técnica de microdilución en placa, los resultados obtenidos con el antifúngico y con cada uno de los extractos serán reproducibles independientemente de las condiciones en las que se realice.

OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS

OBJETIVO GENERAL

- ✓ Estandarizar la técnica de microdilución para evaluar la actividad antifúngica de plantas medicinales frente a *Candida albicans*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Obtener un cryostock de levaduras con una concentración de $5 \cdot 10^6$ UFC/ml
- ✓ Determinar la actividad anti-candida de los extractos hidrofílicos y lipofílicos de 12 plantas medicinales mediante la técnica de microdilución en placa.
- ✓ Determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* ATCC 90028 por efecto del antifúngico y de los productos vegetales.
- ✓ Realizar el análisis estadístico de los datos.



CAPÍTULO I

1 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI-CANDIDA: MICRODILUCIÓN

1.1 *Candida albicans*

Las infecciones por especies del género *Candida* y especialmente por *Candida albicans* han aumentado en las tres últimas décadas. La zona más frecuente afectada son los pliegues cutáneos donde la humedad crea un hábitat adecuado para su supervivencia. Se puede manifestar como: intertrigo de grandes pliegues, erosión interdigital, candidiasis del pañal, foliculitis, onicomycosis candidiásica con paroniquia y peionixis. (Ruiz Quiroz, 2013)

Suele presentarse como una célula oval levaduriforme de 2 a 4 micras, con paredes finas; sin embargo, en tejidos infectados también se han identificado formas filamentosas de longitud variable, con extremos redondos de 3 a 5 micras de diámetro y pseudohifas, que son células alargadas de levadura que permanecen unidas entre sí.

Las levaduras o blastosporas son microorganismos eucarióticos, las cuales se reproducen asexualmente por gemación, este proceso de división implica la producción de nuevo material celular proveniente de la superficie de la blastospora. Cuando el brote o yema ha crecido y se encuentra en su tamaño óptimo, se suscita la división celular y se forma un tabique o septo entre las dos células.

La forma filamentosa del hongo (hifa) es una estructura microscópica tubular, la cual contiene múltiples unidades celulares divididas por septos y puede surgir a partir de blastosporas o de hifas existentes. Esta crece continuamente por extensión apical.

Todas las especies de *Candida* presentan una apariencia microscópica similar; todas son Gram positivas, pero en algunas ocasiones la forma de las blastosporas puede variar de ovoide a elongada o esférica. Microscópicamente *Candida albicans* presenta dimorfismo, el cual es una transformación de la forma ovoide de las blastosporas (levaduras) gemantes a hifas. (Pardi & Cardozo, 2002)

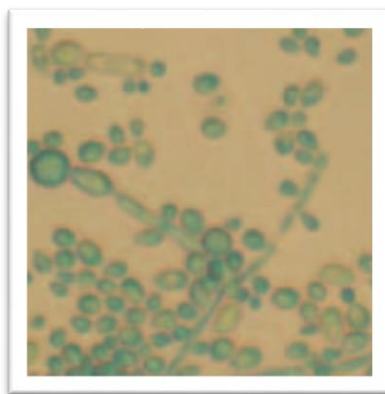


Imagen N° 1. *Candida albicans*

Fuente: (Bonilla González, Funes Andrade, Cañenguez, & Elizabeth, 2015)

Las colonias son de crecimiento rápido, circulares, lisas, blancas o cremosas, pastosas, blandas de bordes precisos y centro ligeramente prominente.



Imagen N° 2. Colonias de *Candida albicans*

Fuente: (Bonilla González et al., 2015)

Candida albicans está asociada a seres vivos de sangre caliente. Su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C; los reservorios más importantes en los seres humanos son el tracto digestivo, respiratorio y la mucosa genital (vagina) los mismos que son responsables de candidiasis endógenas. En estas localizaciones se comporta como un saprobio y su aislamiento no implica la presencia de infección. *Candida albicans* no sobrevive durante mucho tiempo en superficies secas pero su supervivencia es mayor cuando hay humedad.



1.1.1 Datos Clínicos

Candida albicans produce enfermedades a nivel de:

- La boca: la infección bucal se presenta principalmente en los lactantes y aparece como parches adherentes que consisten principalmente en seudomicelios y epitelio descarnado con solo mínimas erosiones de la membrana, se lo conoce como algodoncillo.
- Los genitales femeninos: la pérdida del pH ácido normal de la vagina predispone a la vulvovaginitis, esta produce irritación, prurito intenso y secreción.
- La piel: la infección se presenta principalmente en las partes húmedas del cuerpo, como las axilas, pliegues interglúteos o la ingle; las cuales se vuelven de color rojizo y exudan líquido.
- Las uñas: una hinchazón del pliegue de la uña puede conducir al engrosamiento y a la formación de surcos transversos de las uñas y finalmente la pérdida de las mismas.
- Los pulmones y órganos: en los pacientes quirúrgicos o con inmunosupresión *Candida* puede ser un invasor secundario, afectar órganos como los pulmones, riñones y otros.
- Candidiasis crónica mucocutánea: en los niños es una deficiencia de la inmunidad celular. (Bonilla González et al., 2015)

1.1.2 Patogenia

La adherencia de *Candida albicans* es el primer paso en la colonización e invasión de los tejidos mucocutáneos, la cual es probablemente mediada por la interacción de las glicoproteínas de superficie de la levadura con la célula epitelial del hospedero. Luego se produce la aparición de tubos germinativos, micelio o pseudomicelio, los cuales penetran



directamente en la célula epitelial. La adherencia continúa con la producción de enzimas hidrofílicas como proteinasas, fosfatasas y fosfolipasas. (Flores & Elizabeth, 2015)

1.1.3 Tratamiento

Los fármacos disponibles para el tratamiento de la candidiasis se agrupan en:

- Polienos: Anfotericina B, Nistatina.
- No Polienos: Griseofulvina
- Azoles: Fluconazol, Posaconazol, Voriconazol, Itraconazol
- Equinocandinas: Caspofungina, Micafungina y Anidulafungina.
- Análogos de pirimidina: 5-fluocitosina
- Alilaminas: Terbinafina
- Tiocarbamatos: Tolnaftato
- Morfolinas.

Los fármacos más empleados en el tratamiento contra la candidiasis son los antifúngicos azólicos o azoles, estos actúan inhibiendo la enzima 14- α -lanosterol demetilasa al interactuar con el citocromo P-450 del hongo. El bloqueo de esta enzima impide la conversión de lanosterol en ergosterol, componente fundamental de la membrana citoplásmica del hongo, produciéndose una alteración de la permeabilidad de la membrana y la acumulación de peróxidos tóxicos. Lamentablemente el uso excesivo e inadecuado de azoles ha ocasionado el desarrollo de resistencia en diversas especies de *Candida*. (Marcos-Zambrano, Escribano, Recio, & Guinea, 2013)

1.2 Microdilución

La microdilución es una técnica basada en la actividad inhibitoria, se realiza en una placa de poliestireno que contiene 96 pocillos la misma que puede contener hasta 8 diluciones de 12 diferentes agentes antifúngicos, usando un pocillo como control positivo (caldo más inóculo), otra como control negativo (solo caldo) y también una para el control de la estabilidad del proceso usando una concentración ya conocida del antifúngico. El volumen de cada pocillo es de 0,3 ml aproximadamente.



La utilización de micropipetas y de placas de titulación facilitó el desarrollo del método que interpreta el crecimiento fúngico en los diferentes pocillos por medio de un autoanalizador (mediciones por turbidez o fluorescencia).

A diferencia de la macrodilución, se disminuyen las horas de trabajo en los laboratorios ya que se realizan en menor tiempo, por ello no requiere de tanto personal.

La microdilución, actualizada por el Clinical and Laboratory Standards Instituted (CLSI), permite un informe selectivo de los antifúngicos. (Carmilema Sánchez & Delgado Delgado, 2010)

Esta técnica es controversial puesto que para algunos es fácil de realizar, mientras que, para otras personas puede convertirse en un proceso dificultoso. Un limitante de esta técnica es la subjetividad en la evaluación de crecimiento fúngico cuando la interpretación es visual.

Sin embargo se han realizado modificaciones de la técnica con el fin de obtener un resultado de mayor confiabilidad empleando métodos: colorimétricos, tales como el MTT (bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) que son detectores de liberación de componentes constitutivos celulares y miden la actividad de enzimas; y métodos de fluorescencia como la resazurina (azul, no fluorescente) que es reducida a resofurina (rosado, altamente fluorescente), por oxidoreductasas que se encuentran principalmente en la mitocondria de células viables. (ESCOBAR & RIVERA, 2010) Estos métodos han sido utilizados en varios estudios de susceptibilidad como indicador de viabilidad (Bulla Quintero & Hernández Zorro, 2010)

1.2.1 Fundamento

Inicialmente la Anfotericina B y la 5-fluorocitosina eran las únicas opciones terapéuticas para el tratamiento de las infecciones fúngicas profundas y la realización de pruebas de sensibilidad antifúngica no estaban muy justificadas. A medida que la industria farmacéutica introdujo en el mercado nuevos antifúngicos se hizo necesaria la realización de pruebas de sensibilidad con el fin de comparar la actividad de los mismos y detectar las posibles resistencias. (NCCLS, 2002)

El principal objetivo de cualquier prueba de sensibilidad antifúngica es predecir cuál será el resultado de un tratamiento; en muchas ocasiones los resultados se expresan para un patógeno aislado y analizado, de forma cualitativa como por ejemplo:



- Sensible: cuando el compuesto inhibe el crecimiento.
- Resistente: cuando el antifúngico no será eficaz.
- Intermedio: cuando la efectividad de aquel compuesto dependerá de su localización o de la dosificación utilizada. (Bulla Quintero & Hernández Zorro, 2010)

En 1985 el “National Committee on Clinical Laboratory Standards” (NCCLS) creó un comité para el estudio y estandarización de las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos en las levaduras del género *Candida* y en *Cryptococcus neoformans*, que dio lugar a la publicación en 1992 de la propuesta de un método (M27-P) en el que se incluyeron los puntos de corte para algunos antifúngicos y los porcentajes de inhibición para las cepas de control de calidad. (NCCLS, 2002)

Las técnicas de dilución en caldo se pueden utilizar para medir cuantitativamente la actividad *in vitro* de un antifúngico frente a un microorganismo. Estas pruebas consisten en la preparación de una serie de tubos (macrodilución) o pocillos (microdilución) con caldo a los que se les agrega el antifúngico en diferentes concentraciones, luego se inocula cada uno con una suspensión estandarizada del microorganismo en estudio, los cuales después de ser incubados nos permiten detectar el desarrollo fúngico o la inhibición en la suspensión, mediante la valoración de la turbidez del medio; tomando como puntos críticos determinantes en el resultado final la cantidad del inóculo, pureza del mismo y el tiempo de incubación. (Bulla Quintero & Hernández Zorro, 2010)

1.3 PLANTAS MEDICINALES

Desde tiempos antiguos la fitoterapia ha sido empleada, su capacidad curativa se manifiesta por la existencia de herbarios desde la época de los asirios, sumerios, babilonios y fenicios; razón por la cual, el estudio de los componentes de las plantas medicinales se centra en las sustancias que ejercen una acción farmacológica sobre el ser humano o los seres vivos en general. (Carmilema Sánchez & Delgado Delgado, 2010)

En los últimos años la investigación científica de las plantas medicinales ha resurgido con inusitado interés, partiendo del hecho de que gran parte de la población, especialmente indígena, recurre a la medicina tradicional como fuente única para resolver sus problemas de salud. Sin embargo la medicina popular está desapareciendo debido a los procesos



de aculturación de los pueblos indígenas, fuentes de todo el conocimiento milenario, que está dejando de ser transmitido. (González, Carbonell, Sánchez, Llovet, & Ginarte, 2016)

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la fitoterapia como la “Ciencia que estudia la utilización de los productos de origen vegetal, con fines terapéuticos, ya sea para prevenir, atenuar, o curar un estado patológico”. Sin embargo, limita el uso de productos vegetales a la administración por vía oral o tópica y de ninguna manera se autoriza el uso de éstos por vía parenteral, debiendo ser utilizado solamente en caso de afecciones leves a moderadas y en algunos casos de enfermedades crónicas.(Torres Camacho & Castro Cañaviri, 2014)

La OMS y otras organizaciones fomentan y financian la utilización de plantas medicinales sobre una base científica con relación a la efectividad terapéutica y a la relativa inocuidad de éstas, ya que estudios han revelado el potencial de las plantas superiores como fuente de agentes infecciosos, permitiendo un avance al uso empírico de las especies vegetales medicinales con una base científica.

Dado el rechazo mundial que están teniendo algunos productos sintéticos medicinales, por las reacciones adversas que provocan en los pacientes junto con la contaminación ambiental que genera su fabricación; los científicos y el personal médico acuden con mayor frecuencia a los productos naturales.

De las 520 nuevas drogas aprobadas entre 1983 y 1984, el 39% fueron productos naturales o derivados de productos naturales, y el 60 a 80% de drogas antibacterianas y de anticancerígenos son derivados de productos naturales. (González et al., 2016)

Con la creciente aparición de enfermedades e infecciones resistentes a los medicamentos modernos con los cuales fueron tratadas como antibióticos y antifúngicos convencionales ha incrementado el interés por encontrar medicamentos que puedan sustituir los fármacos sintéticos brindando nuevas oportunidades terapéuticas.(Pascal & Maritsa, 2015)

1.3.1 Ajo (*Allium sativum*)

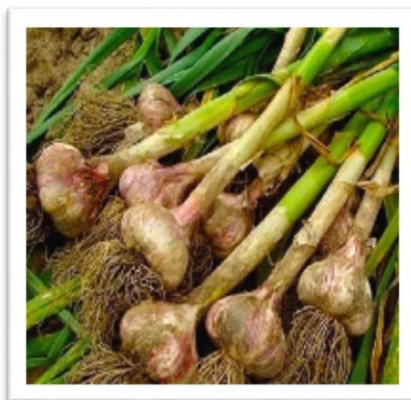


Imagen N° 3. Ajo (*Allium sativum*)

Fuente: (VALENCIA GARCÍA, 2014)

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Liliopsida
Orden	Asparagales
Familia	Amaryllidaceae
Género	<i>Allium</i>
Especie	<i>Sativum</i>
Nombre Común	Ajo

Tabla N° 1. Descripción Taxonómica del Ajo (*Allium sativum*)

Fuente: (VALENCIA GARCÍA, 2014)

1.3.1.1 Descripción Botánica

Planta perenne de un metro y medio de altura, hojas planas de ocho milímetros de anchura; flores verdosas o blanquecinas, a veces rosadas, muy poco abundantes que sobresalen con su largo pedúnculo sobre una cabezuela de bulbillos. El bulbo se encuentra



formado por una envoltura blanca dentro de la cual se encuentran varios bulbillos (dientes de ajo). (Sánchez Araya, 2015)

1.3.1.2 Origen y Distribución

Procedente del Centro y Sur Asiático, se propagó a la zona del Mediterráneo muy rápidamente y de ahí al resto del mundo. Se introdujo al continente Americano por los conquistadores españoles a través de México desde donde fue diseminado hacia todo el continente. (VALENCIA GARCÍA, 2014)

1.3.1.3 Composición Química

El compuesto precursor del olor y sabor se encuentran en mayor concentración en el ajo es la S-acetilcisteína-sulfóxido (aliina), la cual representa el 70-80% de los tiosulfinatos formados; cuando el bulbo es triturado la acción enzimática de la aliinasa produce la conversión de la aliina en alicina, ácido pirúvico y amoníaco. Las cantidades de ácido pirúvico y amoniaco producidos son equivalentes a las cantidades de sustrato consumidos (aliina), por lo cual en la actualidad se utiliza la cuantificación de ácido pirúvico para medir la pungencia e indirectamente y cualitativamente la concentración del sustrato precursor. (Wilson, 2016)

Contiene además vitamina A, B1, B2, C, una amina del ácido nicotínico, colina, hormonas, alicetona I Y II, ácido sulfocianico, yodo, trazas de uranio, (Cahuas, Velásquez, Castillo, Cueva, & Rodriguez, 2015) lípidos (cerebrósidos, prostanglandinas A, B, E y F), diterpenos (giberelina), carbohidratos (fructanos de allium) y saponinas (derivados de erubiósido, sativósido y tigonina). (Dominguez, Pérez, & Batista, 2016)

1.3.1.4 Propiedades Farmacológicas

El ajo presenta actividades antioxidantes debido a los compuestos fenólicos y azufrados los cuales actúan sinérgicamente bloqueando la actividad del oxígeno reactivo sobre las proteínas, lípidos y ácido desoxirribonucleico (ADN).

De manera individual los compuestos azufrados participan en actividades hipolipémicas, antitrombóticas, anticancerígeno, antimicrobianas, antiparasitarias, antifúngicas, antibacteriales, inmunogénicas, glicémicas, inmunomoduladoras.



Presenta propiedades probióticas gracias a los carbohidratos los cuales escapan el proceso digestivo en el intestino delgado y son fermentados por bifidobacterias y lactobacillus en el intestino grueso. (Wilson, 2016)

El ajo fresco y picado presenta la alicina el cual tiene varias propiedades entre ellas:

- Actividad antibacteriana contra una amplia gama de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, incluyendo cepas resistentes a múltiples enterotoxígenos de *Escherichia coli*.
- Actividad antifúngica, especialmente contra *Candida albicans*.
- Actividad antiparasitaria, incluso algunos de los principales parásitos protozoarios intestinales humanos tales como: *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*.
- Actividad antiviral, contra la influenza A y B, el citomegalovirus, rinovirus y rotavirus.

La actividad antifúngica del ajo comparada con la del Fluconazol alcanza el 95%. Se considera que el extracto de *Allium sativum* tiene acción semejante al Fluconazol, por lo que se puede utilizar en el tratamiento de enfermedades bucales. (Urióstegui-Flores, 2015) (Reyes, 2014)

Estudios recientes han demostrado que posee efectos antitrombóticos y anticancerígenos. (VALENCIA GARCÍA, 2014)

1.3.2 Lechuguilla (*Gamochaeta spicata*)



Imagen N°4. Lechuguilla (*Gamochaeta spicata*)

Fuente: (Marchiori & Inze, 2015)

Reino	Plantae
División	Magnoliopsida
Clase	Magnoliopsida
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Género	<i>Gamochaeta</i>
Especie	<i>Spicata</i>
Nombre Común	Lechuguilla, Peludilla

Tabla N° 2. Descripción Taxonómica de la Lechuguilla (*Gamochaeta spicata*)

Fuente: (Castillo-Quiroz et al., 2014)

1.3.2.1 Descripción Botánica

Son hierbas anuales o bienales; presentan tallos ascendentes y erectos que miden entre 20-45 cm de altura. Sus hojas son glabras en la cara adaxial y blanco-tomentosas en la cara abaxia; miden entre 4-10 cm. Sus flores son hermafroditas en número de 2-4 por capitulescencia. Su fruto es granuloso. (Papa, Tuesca, & Nisensohn, 2010)

1.3.2.2 Origen y Distribución

De origen americano, se encuentra ampliamente distribuida en Centro y Sudamérica y florece en el verano. Vive en campos, caminos y costa arenosa. En ciertos lugares es considerada maleza. (Marchiori & Inze, 2015)

1.3.2.3 Composición Química

La lechuguilla contiene flavonoides y un alto contenido de azúcar. Esta planta presenta una habilidad para crecer en ambientes en los cuales hay poca cantidad de agua. (Castillo-Quiroz et al., 2014)

1.3.2.4 Propiedades Farmacológicas

En infusiones son utilizadas para contrarrestar la fiebre, malestares renales, pulmonares y respiratorios.

Posee actividad expectorante y su raíz es hemostática. Los extractos etanólicos de las hojas y flores tienen propiedades anti-candida, hemostáticas y vasoconstrictoras; estos extractos poseen también actividad desinfectante.

Es también empleado como cicatrizante, en la conjuntivitis y circulación. (Marchiori & Inze, 2015)

1.3.3 Matico (*Piper aduncum*)

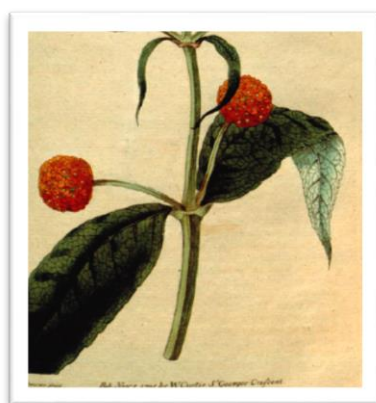


Imagen N°5. Matico (*Piper aduncum*)

Fuente: (Bustamante & Álvarez, 2015)

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Piperales
Familia	Piperaceae
Género	<i>Piper</i>
Especie	<i>Aduncum</i>
Nombre Común	Matico

Tabla N° 3. Descripción Taxonómica del Matico (*Piper aduncum*)

Fuente: (Bustamante & Álvarez, 2015)

1.3.3.1 Descripción Botánica

Es un arbusto perenne que alcanza los 5 metros de altura.(Arroyo, 2016) Su tallo es leñoso, ramificado de color verde o gris pálido; presenta hojas alternas y pecioladas, simples con 5 nervaduras. Inflorescencia axilar o terminal en espigas de 15 cm con flores pequeñas e imperceptibles a la vista, presenta un olor característico.(Valle Vargas & Yanac Salcedo, 2014)

1.3.3.2 Origen y Distribución

Propia de la Sierra de Ecuador, crece entre los caminos, matorrales y plantaciones de la región interandina. (Vásquez & Alexandra, 2015)

1.3.3.3 Composición Química

El matico contiene flavonoides (quercertina), saponinas, taninos, glucósidos, alcaloides, cumarinas, esteroides, triterpenos, azúcares reductores, quinonas, compuestos grasos, resinas y fenoles. (Arroyo et al., 2013; Valle Vargas & Yanac Salcedo, 2014; Vásquez, 2015) El componente activo más importante del matico es el tanino que se encuentra en una concentración del 5,7% .(Loja Morocho, 2014)

Su aceite esencial contiene sesquiterpenos (γ -gurjuneno, β -bisaboleno, trans- β farneseno, β -sesquifelandreno), parafinas de 18-29 carbonos y ésteres metílicos de ácidos grasos. (Vásconez & Alexandra, 2015)

1.3.3.4 Propiedades Farmacológicas

El té elaborado de las hojas y raíces es usado para tratar diarrea, disentería, náuseas, úlceras, infecciones del aparato urinario, trastornos hemorrágicos, inflamación, infecciones bacterianas y fúngicas. (Arroyo, 2016)

En el estudio realizado por Braga E. Y Col en el 2007 *Piper aduncum* fue una de las plantas más activas contra *Candida albicans*.(Valle Vargas & Yanac Salcedo, 2014)

La propiedad cicatrizante se atribuye a la gran cantidad de taninos presentes. (Loja Morocho, 2014)

Los flavonoides son los responsables de propiedades antioxidantes, efecto antisecretor y propiedades citoprotectoras.

La propiedad antiulcerosa se debe principalmente a la gran cantidad de saponinas y taninos que se encuentran presentes en sus hojas. (Arroyo et al., 2013)

1.3.4 Menta (*Mentha piperita*)



Imagen N° 6. Menta (*Mentha piperita*)

Fuente: (VALENCIA GARCÍA, 2014)

Reino	Plantea
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Lamiales
Familia	Lamiaceae
Género	<i>Mentha</i>
Especie	<i>Mentha piperita</i>
Nombre Común	Menta, Menta inglesa

Tabla N° 4. Descripción Taxonómica de la Menta (*Mentha piperita*)

Fuente: (VALENCIA GARCÍA, 2014)

1.3.4.1 Descripción Botánica

Hierba perenne aromática de una altura entre los 30 y 60 cm, muy ramificada. Las hojas tienen una longitud aproximada de 4-6 cm, son ovaladas-lanceoladas y generalmente pecioladas con un borde dentado. Las flores son pequeñas, de color lila y aparecen agrupadas en espigas. (VALENCIA GARCÍA, 2014)

1.3.4.2 Origen y Distribución

Originaria de Asia Central y el Mediterráneo, se encuentra ampliamente distribuida en los diferentes países de Sudamérica. Crece en lugares frescos y húmedos de climas templados. (VALENCIA GARCÍA, 2014)

1.3.4.3 Composición Química

Posee compuestos polifenólicos, antioxidantes, flavonoides, limoneno y terpenos. (Soria & Ramos, 2015) (Saravia et al., 2013)

Las hojas y umbrales florales presentan una composición del 1-4% de aceite esencial. (Martínez, 2015)

El aceite esencial que se extrae de las hojas por destilación contiene mentol que es uno de los principales compuestos por el cual tiene alto valor comercial y responsable de atribuciones medicinales.(VALENCIA GARCÍA, 2014)

1.3.4.4 Propiedades Farmacológicas

Presenta actividad antiséptica, aromatizante y tranquilizante. A dosis altas puede causar efectos narcóticos, estupefacientes, además puede producir acidez y reacciones alérgicas como enrojecimiento de la piel, dolor de cabeza y heridas en la boca. (Soria & Ramos, 2015).

El aceite esencial presenta actividad contra hongos filamentosos. (Martínez, 2015), además posee propiedades antioxidantes, analgésicas, antibacterianas. Tiene propiedades digestivas, ayuda a mantener un buen aliento, se emplea para espasmos intestinales, inflamación de la garganta, tos, cefaleas entre otras. (VALENCIA GARCÍA, 2014)

1.3.5 Nogal Negro (*Juglans nigra*)

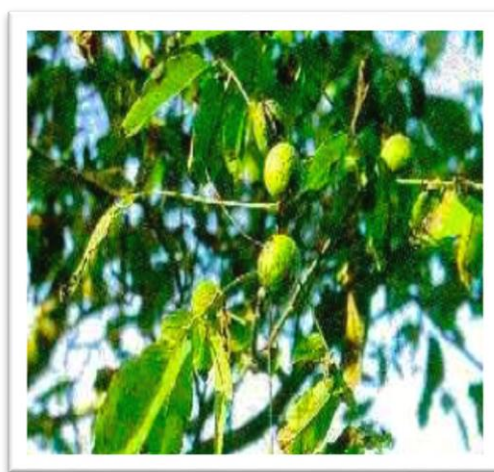


Imagen N°7 Nogal Negro (*Juglans nigra*)

Fuente: (Anguieta & Alexandra, 2013)

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Fagales
Familia	Juglandaceae
Género	<i>Juglans</i>
Especie	<i>Nigra</i>
Nombre Común	Nogal, Tocte

Tabla N°5. Descripción Taxonómica del Nogal Negro (*Juglans nigra*)

Fuente: (Anguieta & Alexandra, 2013)

1.3.5.1 Descripción Botánica

Árbol notable que alcanza un gran tamaño, puede llegar a medir unos 30 metros de altura. Las hojas de nogal son compuestas y al machacarlas entre los dedos revelan un delicioso y distintivo aroma dulzón. Las flores y los frutos son producidas en ramas separadas. Las inflorescencias son largas y colgantes, los frutos de los nogales son globosos y grandes con la cáscara café y una pulpa oscura que rodea la dura semilla; la almendra de los frutos es comestible. (Anguieta & Alexandra, 2013)

1.3.5.2 Origen y Distribución

Ampliamente distribuidos por Norteamérica, el sur de Europa y Asia, en la región Neotropical, en Centroamérica y los Andes desde Venezuela hasta el norte de Argentina. (Anguieta & Alexandra, 2013)

1.3.5.3 Composición Química

En las hojas encontramos:

- Derivados naftoquinónicos: juglona, hidrojuglona, glucósidos.
- Flavonoides: hiperósido, juglandina, derivados de quercetina, kaempferol

Su aceite esencial presenta: Terpenos monocíclicos, taninos catéquicos.

En el pericarpio encontramos: agua, glicósidos, taninos, aminoácidos y ácido ascórbico.

En la semilla se encuentra: derivados polifenólicos, ácido gálico, ácido elágico, taninos, aceite con propiedades secantes, glicéridos e hidroxitriptamina. (Anguieta & Alexandra, 2013)

1.3.5.4 Propiedades Farmacológicas

La pulpa del fruto ha sido empleada por sus propiedades tintóreas, pues suelta un colorante oscuro que sirve para teñir telas y para teñir el cabello.

Presenta propiedades antifúngicas, antisépticas, queratinizantes sobre la piel, astringentes, hipoglucemiantes, antisudoral, tranquilizante, antitumoral, tonificante capilar, etc. (Anguieta & Alexandra, 2013)

Las hojas son consideradas fuente de compuestos saludables y se emplean en el tratamiento de dermatitis, insuficiencia venosa y úlceras, posee propiedades antidiarreica, antihelmíntica, antiséptica, antibacteriana, antifúngica y antiproliferativa; también han sido empleadas en lavados uterinos y para lavar heridas, llagas y úlceras en la cavidad bucal. (Paola, 2016)

1.3.6 Romero (*Rosmarinus officinalis*)

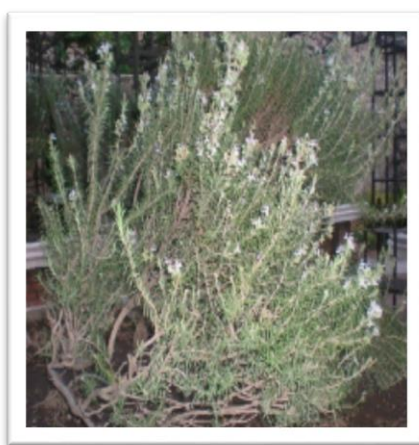


Imagen N°8 Romero (*Rosmarinus officinalis*)

Fuente: (VALENCIA GARCÍA, 2014)

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Lamiales
Familia	Lamiaceae
Género	<i>Rosmarinus</i>
Especie	<i>Officinalis</i>
Nombre Común	Romero

Tabla N°6. Descripción Taxonómica del Romero (*Rosmarinus officinalis*)

Fuente: (VALENCIA GARCÍA, 2014)

1.3.6.1 Descripción Botánica

Es una planta perenne que alcanza los 2 metros de altura. Tiene tallos lignificados y erectos, las hojas son compuestas y se encuentran enfrentadas, el haz es de un verde más intenso que el envés, de tonalidades blanquecinas. Las flores son de color azulado y nacen de las axilas de las hojas. (VALENCIA GARCÍA, 2014)

1.3.6.2 Origen y Distribución

Originaria del Mediterráneo, que es su hábitat natural del género *Rosmarinus*, donde es muy común verlo en los campos, crece en áreas en donde el suelo es seco, arenoso y rocoso. (VALENCIA GARCÍA, 2014)

1.3.6.3 Composición Química

Las hojas y flores poseen una composición de 0,5-2% de aceite esencial. (Martínez, 2015) El aceite esencial está compuesto principalmente por hidrocarburos monoterpénicos tales como α -pineno, β -pineno y canfeno; ésteres terpénicos (1,8-cineol); alcanfor, linalol, verbinol, tepineol, entre otros. Terpenoides como carnosol o picrosalvina, ácido oceánico, entre otros. Flavonoides como apigenina, diosmetina, diosmina, genkwuanina, hispidulina. Ácidos fenólicos, entre otros. (VALENCIA GARCÍA, 2014)

1.3.6.4 Propiedades Farmacológicas

Las actividades farmacológicas que se le atribuyen son relacionadas a la actividad del aceite esencial y sus compuestos fenólicos antioxidantes responsables de la actividad microbiana, antimutagénica, antiinflamatoria, entre otras. (VALENCIA GARCÍA, 2014)

El aceite esencial presenta actividad sobre *Candida albicans*. (Martínez, 2015)

1.3.7 Tomillo (*Thymus vulgaris*)

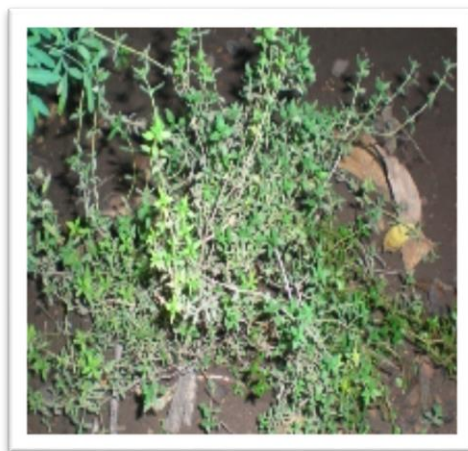


Imagen N°9 Tomillo (*Thymus vulgaris*)

(VALENCIA GARCÍA, 2014)

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Lamiales
Familia	Lamiaceae
Género	<i>Thymus</i>
Nombre Científico	<i>Vulgaris</i>
Nombre Común	Tomillo

Tabla N°7. Descripción Taxonómica del Tomillo (*Thymus vulgaris*)

Fuente: (VALENCIA GARCÍA, 2014)

1.3.7.1 Descripción Botánica

Planta aromática y medicinal de 15-30 cm de altura, tiene hojas opuestas, lanceoladas, con los bordes enrollados y pilosos. Las flores agrupadas en racimos terminales son muy pequeñas y densas, de una tonalidad rosácea o blanquecina. El fruto es tetraquenio, lampiño y de color marrón. La planta al estar provista de glándulas esenciales desprende un fuerte aroma característico. (VALENCIA GARCÍA, 2014)

1.3.7.2 Origen y Distribución

Originaria de la región del Mediterráneo, ampliamente distribuido en Sudamérica debido a sus propiedades culinarias. (VALENCIA GARCÍA, 2014)

1.3.7.3 Composición Química

Contiene principalmente aceite esencial el cual presenta timol que se encuentra en mayor proporción; contiene también p-cimeno, alcanfor, carvacrol, linalol, 1,8-cineol, y-terpineno, borneol, acetato de bornillo, acetato de linalino, geraniol, α y β -pineno, limoneno entre otros, los cuales le confieren olor, sabor y propiedades químicas. (VALENCIA GARCÍA, 2014)



Posee flavonoides heterósidos como el luteol, apigenol y en menor cantidad flavonas metoxiladas como la cosmosiína, timonina, isotimonina, 8-dimetil-timonina, timusina, naringenina, eriodictiol, cirsimaritina, xantomicrool, 5-desmetilnobiletina, 5-desmetilsinensetina, sideritoflavona, cirsilineol y 8-metoxi-cirsilinoel. También se ha indicado la presencia de flavanonas, flavonoles y heterósidos de luteolina.

Presenta también taninos, serpilina, saponinas ácidas y neutras, ácidos labiático, oleanólico y ursólico, ácidos fenilcarboxílicos, ácido rosmarínico, ácido litospérmico y resinas. (Yauripoma & Fredy, 2015)

1.3.7.4 Propiedades Farmacológicas

Cuenta con propiedades antioxidantes, antibacterianas, antifúngicas y desinfectantes. (VALENCIA GARCÍA, 2014)

Su extracto tiene efecto antiviral contra HSV-1, HSV-2 Y HSV-1 resistente a Aciclovir, tiene efecto relajante sobre anillos traqueales de cobayo comparable a teofilina.

Su aceite esencial presenta actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Proteus vulgaris*, *Vibrio spp*, *Listeria monocytogenes*, entre otras; además tiene actividad citotóxica contra tres líneas celulares de cáncer humano: carcinoma de próstata, carcinoma pulmonar y cáncer de mama. Presenta además importante actividad antioxidante gracias al ácido rosmarínico y los derivados hidroxicinámicos y compuestos flavonoides. (Yauripoma & Fredy, 2015) (Rojas Armas et al., 2015)

Su aceite esencial presenta actividad antifúngica especialmente sobre *Candida albicans* y potencia la acción de la Anfotericina B contra el mismo microorganismo; esta propiedad se debe a la presencia de timol en él se presenta en mayor proporción, debido a que dañan la biosíntesis del ergosterol y rompen la integridad de la membrana. (Rojas Armas et al., 2015)

Presenta actividad antiinflamatoria y analgésica gracias al carvacrol el cual tiene una acción inhibitoria de la biosíntesis de las prostaglandinas. (Yauripoma & Fredy, 2015)

1.3.8 Culen (*Otholobium pubescens*)



Imagen N° 10 Culen (*Otholobium pubescens*)

Fuente: (San Martín Acevedo & Muñoz Villagra, 2013)

Reino	Plantae
División	Angiospermae
Clase	Dicotyledoneae
Orden	Rosales
Familia	Fabaceae (Leguminosae)
Género	<i>Otholobium</i>
Especie	<i>Pubescens</i>
Nombre Común	Culen, Hualhua, Colin macho

Tabla N°8. Descripción Taxonómica del Culen (*Otholobium pubescens*)

Fuente: (Contreras & Juan, 2005)



1.3.8.1 Descripción Botánica

Es un arbusto erguido, ramificado que alcanza entre 1-5 metros de altura. Sus hojas son compuestas, trifoliadas y aromáticas. Las flores pequeñas son de color lila azulada o purpúreo y su fruto es pequeño, seco y oval. (Contreras & Juan, 2005)

1.3.8.2 Origen y Distribución

Planta silvestre que crece en la región andina del Perú, Chile, Ecuador, Bolivia y Argentina; crece de preferencia en lugares húmedos de los valles y las quebradas de la pre-cordillera. (Contreras & Juan, 2005)

1.3.8.3 Composición Química

El *Otholobium* contiene: aceites esenciales (psoraleno), taninos, gomas, resinas, esteroides, saponinas, flavonas, flavonoides, furocumarinas, terpenoides, tiene como componente mayoritario al bakuchiol un terpenoide fenólico con actividades antimicrobianas, hipoglicemiante y citotóxicas.

Presenta un alto contenido de psoraleno de estructura cumarínica.(Contreras & Juan, 2005)

1.3.8.4 Propiedades Farmacológicas

Se emplea como carminativo, digestivo, antiespasmódico, hipoglucemiante, antidiarreico, laxante, vermífugo, purgante.

Posee también propiedades antiinflamatorias, astringente, catártica, hemostática y anti infecciosa.

La propiedad astringente se debe a la presencia de Bakuchiol.

La presencia de una buena cantidad de aceites esenciales, taninos y flavonoides favorece su actividad como antiespasmódico, permite emplearse en infecciones intestinales y favorece la digestión como carminativo. Es bueno para lavar heridas, hacer gárgaras y limpiar las vías respiratorias de alguna infección. (Contreras & Juan, 2005).

1.3.9 Congona (*Peperomia inaequalifolia*)

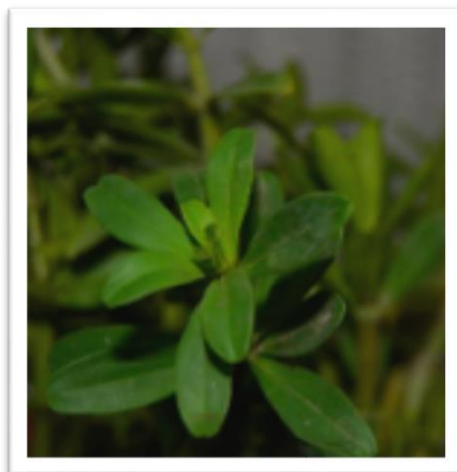


Imagen N° 11 Congona (*Peperomia inaequalifolia*)

Fuente: (Santacruz Endara, 2015)

Reino	Plantae
División	Angiospermae
Clase	Dicotiledoneas
Orden	Piperales
Familia	Piperaceae
Género	<i>Peperomia</i>
Especie	<i>Inaequalifolia</i>
Nombre Común	Congona, Congonita

Tabla N° 9. Descripción Taxonómica de la Congona (*Peperomia inaequalifolia*)

Fuente: (Guillermo Navarro, 2002)



1.3.9.1 Descripción Botánica

Es una planta herbácea suculenta, que alcanza 50 cm de altura, con tallo cilíndrico, nudoso y ramificado. Las hojas son de color verde brillante, redondas, verticiladas, de mayor tamaño las basales superiores, opuestas y con el margen entero. Las flores son de color verdoso y dan lugar a frutos pequeños. (Guillermo Navarro, 2002)

1.3.9.2 Origen y Distribución

Planta nativa de América tropical y subtropical. Se encuentra ampliamente distribuida en Perú, Ecuador y Colombia. Principalmente se cultiva en los jardines para la producción de la “horchata lojana”.

Crece en climas tropicales, subtropicales y templados. (Santacruz Endara, 2015)

1.3.9.3 Composición Química

Posee tres prenilfenoles: grifolin, ácido grifólico y piperogalin, tres proctoriones, dos quinonas preniladas, piperigalone y galopiperone y una dihidroquinona prenilada: hydropiperone.

Se ha reportado la presencia de compuestos fenólicos tipo flavonoides, saponinas, alcaloides en menor cantidad, diversas terpenlactonas, taninos, esteroides, triterpenos y grupos indólicos. (Guillermo Navarro, 2002)

1.3.9.4 Propiedades Farmacológicas

La congona presenta propiedad antiinflamatoria, antibacteriana e insecticida. Se utiliza como humectante de la piel gracias a la presencia de ácidos grasos como el palmitato de isopropilo.

Los extractos de las flores son empleados como tranquilizantes y analgésicos; también se ha usado para el tratamiento de otitis y conjuntivitis. (Mamani & Mamani, 2016; Santacruz Endara, 2015)

Presenta actividad frente a las bacterias Gram positivas, inhibe el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus Fecalis* y *Salmonella*. (Mora-Vivas et al., 2016)

1.3.10 Achira (*Canna indica*)



Imagen N° 12 Achira (*Canna indica*)

Fuente: (Carrillo, 2014)

Reino	Vegetal
División	Spermatofita
Clase	Monocotyledonea
Orden	Scitamimeneae
Familia	Cannaceas
Género	<i>Canna</i>
Especie	<i>Indica</i>
Nombre Común	Achira

Tabla N° 10. Descripción Taxonómica de la Achira (*Canna indica*)

Fuente: (Carrillo, 2014)



1.3.10.1 Descripción Botánica

La achira es una especie herbácea que alcanza entre 2,5 a 3 m de altura. Las hojas son grandes y lanceoladas, pueden llegar hasta 65-70 cm de longitud y 30-35 cm de ancho, poseen un color verde oscuro con bordes de color marrón violáceo y venas. Sus flores son de color rojo. (Torres, Arango, & Khoury, 2015)

1.3.10.2 Origen y Distribución

La achira es de origen Sudamericano, existe en toda América tropical; siendo cultivada en Brasil, Ecuador, Perú, Bolivia; también existe en la India, Asia, Polinesia y África. En Ecuador se encuentra en los valles templados y cálidos entre 1.700 y 2.500 metros sobre el nivel del mar. (Carrillo, 2014)

1.3.10.3 Composición Química

Contiene almidón el cual tiene un alto contenido de amilasa que es una proteína importante. (Carrillo, 2014)

Presenta flavonoides, alcaloides, esteroides, taninos, saponinas, glicósidos cardiacos, compuestos de fenol, terpenoides, compuestos fenólicos, aceites fijos y en menor cantidad fitoesteroles; siendo las hojas las que presentan la mayor cantidad de flavonoides y alcaloides. (Romero Vásquez & Valdez Valles, 2016)

1.3.10.4 Propiedades Farmacológicas

Es una excelente fuente de nutrientes para niños, es empleada en personas que sufren problemas digestivos. (Carrillo, 2014)

Las hojas se utilizan para tratar la malaria, la ictericia aguada de la hepatitis y alergias. Se emplea como diurético, emoliente, para aliviar las hemorragias nasales, limpiar úlceras, antiabortiva, antiséptico, astringente, para evitar el agotamiento del flujo de la leche y para el tratamiento del cáncer.

Poseen actividad antibacteriana y antioxidante. (Romero Vásquez & Valdez Valles, 2016)

1.3.11 Papaya (*Carica Papaya*)



Imagen N° 13 Papaya (*Carica papaya*)

Fuente: (Rodríguez Cárdenas & Mori Ortíz, 2014)

Reino	Plantae
División	Spermatohyta
Clase	Magnoliatae
Orden	Violales
Familia	Caricaceae
Género	<i>Carica</i>
Especia	<i>Papaya</i>
Nombre Común	Papaya, Mamon

Tabla N° 11. Descripción Taxonómica de la Papaya (*Carica papaya*)

Fuente: (Rodríguez Cárdenas & Mori Ortíz, 2014)



1.3.11.1 Descripción Botánica

Es una planta herbácea, arborescente, de crecimiento rápido y de vida corta. Su tallo es recto y cilíndrico y alcanza los 10 metros de altura. Las hojas son grandes, palmeadas, con lóbulos profundos y borde dentado. (Di Giacomo, 2015) Esta especie emite varios tipos de flores y cada una origina un tipo diferente de fruto en cuanto a forma y calidad. (Rodríguez Cárdenas & Mori Ortiz, 2014)

1.3.11.2 Origen y Distribución

Planta tropical que apareció en México, Centroamérica y en el norte de América del Sur, se ha difundido a los Valles de América del Sur. (Torres Alberca, 2015), crece y produce frutos en lugares de gran insolación con temperaturas entre 22-28°C. (Areas, Fitoria, & Matamoros, 2015)

1.3.11.3 Composición Química

Del látex del fruto verde se extrae la papaína que es una fitoproteasa aplicada en la industria cervecera. (Mendez, Becerra, Hernández, Díaz, & Muñoz, 2016) La composición del látex incluye proteínas, carbohidratos, vitaminas, calcio, potasio y fósforo. (Areas et al., 2015)

Contiene vitamina A, B, C, carotenoides, hierro, calcio, potasio y sodio; razón por la cual su demanda es mayor ya que presenta propiedades nutricionales. (Di Giacomo, 2015)

Sus hojas contienen alcaloides, taninos (0,5 a 0,6%) y glicósidos, no contiene saponinas; la corteza y raíz contiene alcaloides y taninos. Las semillas contienen glucósidos (carpasemina, sinigrina), una enzima (mirosina), tropaolina y 25% de un aceite con un bajo valor de yodo. La corteza contiene xilitol (pentaalcohol) y saponósidos. (Rodríguez Cárdenas & Mori Ortiz, 2014)

1.3.11.4 Propiedades Farmacológicas

Brinda un efecto favorable en la digestión y asimilación de alimentos. (Di Giacomo, 2015)

La fruta madura es utilizada como laxante, abortiva, antibacteriana y digestiva. El jugo de papaya es empleado en el tratamiento de verrugas y las úlceras.

La presencia de papaína hace que esta fruta sea empleada en el tratamiento de la malaria, la hipertensión, diabetes, hipercolesterolemia, ictericia y helmintiasis intestinal.

Sus flores son empleadas para promover la menstruación y su corteza para los dolores de dientes.

Sus hojas son empleadas como tónico para el corazón, tratamiento de problemas gástricos, fiebre, disentería amebiana, afecciones reumáticas y para reducir tumores elefantoides. El extracto metanólico posee efecto vasodilatador y antioxidante. Su extracto acuoso acelera los procesos de cicatrización, tiene un efecto antiinflamatorio, actividad antitumoral e inmunomoduladora. (Rojo, 2014)

Las fracciones proteicas obtenidas de hojas, semilla, pulpa y cáscara del fruto presentan actividad antibiótica contra *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Shigella flexneri*. (Urióstegui-Flores, 2015)

Presenta actividad antihelmíntica contra *Heligmosomoides polygyrus* y *Ascaris lumbricoides*. (Rodríguez Cárdenas & Mori Ortíz, 2014)

1.3.12 Rosas (*Rosa spp.*)



Imagen N° 14 Rosas (*Rosa spp.*)

Fuente: (Vivanco López, 2014)

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Rosales
Familia	Rosácea
Género	<i>Rosa</i>
Especie	<i>spp.</i>
Nombre Común	Rosa, Rosal

Tabla N° 12. Descripción Taxonómica de la Rosa (*Rosas spp.*)

Fuente: (Vivanco López, 2014)

1.3.12.1 Descripción Botánica

Son rosales de porte bajo. La raíz es vigorosa, pivotante y profunda, su tallo es leñoso y termina en flor. Las hojas de color verde están compuestas de tres o cinco folíolos y presentan una superficie lisa por la parte del haz y en el envés presentan nervaduras sobresaliente y rugosas. Las flores con completas de cinco pétalos y periginas, según el número de pétalos pueden ser sencillas, semidobles, dobles y muy dobles. (Romero Arellano, 2013)

1.3.12.2 Origen y Distribución

Es nativa de Europa y desde ahí se ha propagado hacia todo el mundo. El cultivo de la rosa se inició como símbolo de belleza por babilonios, egipcios, romanos y griegos. Existen alrededor de 100 especies de rosas. (Romero Arellano, 2013)

1.3.12.3 Composición Química

La raíz del rosal contiene ácido tánico, como las hojas; además estas presentan pectina lo que confiere su acción astringente. Los pétalos contienen taninos, ácidos orgánicos (ácidos cítrico, ácido málico), materias gomosas, y pequeñas cantidades de esencia. El fruto contiene azúcar, vitamina C, lecitina, azúcar invertido y aceites grasos. En las



semillas se encuentra un glucósido la multiflorita con propiedades purgantes. (Ayerbe & García, 2010)

1.3.12.4 Propiedades Farmacológicas

Los pétalos son empleados como laxante suave y también son recomendados para combatir los parásitos intestinales. Se emplea como astringente, es recomendado para realizar baños oculares, gargarismos y lociones.

El fruto es empleado a nivel respiratorio para controlar los síntomas de la gripe.

El aceite de las semillas es utilizado para mejorar la cicatrización de heridas tórpidas, posee beneficios como antiarrugas y previene el envejecimiento prematuro. (Vivanco López, 2014)

El agua de rosas es empleada principalmente como antiescorbútico por su riqueza de vitamina C, tiene también propiedades diuréticas por lo que se le recomienda en afecciones urinarias como la uretritis y cistitis.

Su extracto presenta propiedades antiinflamatorias y cicatrizantes, se emplea en limpieza de heridas, es muy útil en afecciones de la boca como candidiasis, gingivitis y dolores dentarios, presenta además actividad antibacteriana. (Ayerbe & García, 2010)



CAPÍTULO 2

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

El tipo de investigación realizada en el presente estudio fue descriptiva y analítica.

Se utilizó la metodología descriptiva porque se observó y describió el efecto que presentó el antifúngico y los productos vegetales al utilizar la técnica de microdilución en placa sobre *Candida albicans* ATCC 90028.

El método analítico fue empleado para analizar el porcentaje de inhibición que presentaron los extractos, aceites esenciales y el antifúngico frente al microorganismo *Candida albicans* ATCC 90028 sometiéndolos a distintas concentraciones aplicando la técnica de microdilución en placa.

2.2 MATERIAL VEGETAL

Las plantas medicinales empleadas en el presente estudio: Tomillo, Nogal, Romero, Menta, Matico, Ajo y Lechuguilla, las cuales se adquirieron en el Mercado 10 de Agosto de la ciudad de Cuenca; los extractos de Congona y Culen fueron proporcionadas por el Proyecto VLIR de Plantas Medicinales; hojas de Papaya y Achira traídas desde el cantón Yunguilla perteneciente a la provincia del Azuay. Todas estas plantas empleadas en el estudio fueron elegidas por su actividad tanto positiva como negativa frente a *Candida albicans* según revisiones bibliográficas.

2.3 VARIABLES

En el presente estudio las variables dependientes fueron la actividad antifúngica y el porcentaje de inhibición; y como variables independientes se consideraron la planta y/o sus partes, la concentración de los extractos y aceites esenciales, el tipo de microorganismo, el número de repeticiones, el tipo de extracción y el tipo de extracto.



2.4 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS

2.4.1 Extracción por Percolación

2.4.1.1 Lavado, secado y preparación

Las plantas fueron adquiridas en el mercado 10 de Agosto de la ciudad de Cuenca, ubicado en las calles Juan Jaramillo y General Torres. Se procedió a seleccionar las partes útiles de cada una de las plantas, desechando aquellas que estuvieron rotas o con insectos, luego las partes seleccionadas se lavaron con agua corriente para eliminar impurezas como tierra, después se los dejó reposar en agua destilada por diez minutos; para posteriormente escurrirlas y colocarlas en la estufa durante 24 horas para secarlas a una temperatura de 40 °C. Una vez secas se las conservó en bolsas de papel cerradas en un ambiente fresco y oscuro.

Se pesan 3,3g de droga la cual fue pulverizada por medio de una licuadora, hasta lograr que el tamaño de la partícula sea lo más pequeño posible, se añadió el solvente con el fin de humectar la droga pulverizada por un tiempo de 12 horas para de esta manera facilitar el paso del solvente y aumentar la porosidad de la pared celular, lo que va a permitir la difusión de las sustancias extraíbles hacia el exterior de las células (Carmilema Sánchez & Delgado Delgado, 2010).

2.4.1.2 Preparación de los extractos

Transcurrido el tiempo de humectación de la droga se procedió a cargar el percolador con el solvente y se lo dejó durante 24h, tomando como precaución de que la llave del embudo de separación esté bien cerrada para evitar goteo de la fracción más concentrada durante el tiempo de reposo.

En el método de percolación, si bien hay una maceración previa el disolvente se renueva de modo continuo y, debido a ello, mantiene el gradiente de concentración lo más alto posible, el disolvente corre de arriba a abajo a través de la capa de droga; el disolvente puro desplaza al que contiene la sustancia extraída sin ser necesario aplicar presión. La calidad del extracto depende, al igual que la maceración, del grado de finura de la droga, la velocidad de difusión de las sustancias activas desde la droga al disolvente y en la velocidad de pasaje del disolvente. (Cruz, 2007)



Al iniciar la percolación es importante separar el 75% del total del peso de la planta empleada para la extracción, ésta constituye la fracción más concentrada de la extracción. La percolación se llevó a cabo a un goteo constante de 20 gotas por minuto durante 3h, tiempo en el cual se logró la extracción completa de los principios activos.

2.4.1.3 Concentración del extracto

Al finalizar la percolación, el extracto obtenido fue llevado al rotavapor (Heidolph laborota 4011 HB G3, Alemania), en el cual se eliminó el solvente del extracto hasta su sequedad.

Luego se realizó la redisolución del extracto para lo cual se empleó la fracción más concentrada obtenida al iniciar la percolación. Para facilitar la redisolución se utilizó el baño maría con ultrasonido (Cole Parmer, Illinois, EEUU), luego se pasó a un tubo, y fue añadido un poco más de solvente para lograr la redisolución completa del extracto.

Posterior a la redisolución del extracto, éste se llevó a concentrar a base de nitrógeno hasta un volumen aproximado de 2ml.

2.4.1.4 Liofilización

La liofilización es un proceso de secado que se basa en sublimar el hielo de un producto congelado. El agua del producto pasa, por tanto, directamente de estado sólido a vapor sin pasar por el estado líquido, para lo cual se debe trabajar por debajo del punto triple del agua, 0.01°C y 4.5mmHg (Granada, 2010)

Los 2ml de extracto obtenido de la concentración con nitrógeno se pasaron a un tubo para liofilización previamente pesado y con agua extra pura se lavó el tubo con la ayuda del baño maría con ultrasonido (Cole Parmer, Illinois, EEUU) y se colocó en el tubo para liofilización hasta completar un volumen de aproximadamente 25ml. Se tapó el tubo para liofilización con un corcho de caucho y se congeló el extracto en el biofreezer a -70°C , primero durante 5 minutos, y luego de girado por 3 minutos más y volviéndolo a girar por 1 minuto más. Una vez congelado se tapó el tubo con papel aluminio y fue guardado en el biofreezer. Al siguiente día el extracto congelado fue colocado en el equipo para liofilización (LABCONCO, EEUU) y liofilizado durante 24 horas.

Cuando el extracto estuvo liofilizado se procedió a pesar en la balanza analítica (BOECO) en distintos viales y a guardarlos en congelación.



2.4.2 Extracción con fluidos supercríticos

Un fluido supercrítico es cualquier sustancia a una temperatura y presión por encima de su punto crítico termodinámico y que tiene la propiedad de difundirse a través de los sólidos como un gas, y de disolver los materiales como un líquido. Adicionalmente, puede cambiar rápidamente la densidad con pequeños cambios en la temperatura o presión. Estas propiedades lo hacen conveniente como un sustituto de los solventes orgánicos como cloroformo, diclorometano, entre otros, en los procesos de extracción. (Velasco, Villada, & Carrera, 2007)

Para la extracción con fluidos súper críticos se empleó el equipo con sistema de Waters® MV-10 ASFE® en el cual, la muestra se coloca en el recipiente para la extracción y se corre el equipo. El proceso con este tipo de extracción tiene una duración de aproximadamente 4 horas.

2.5 OBTENCIÓN DE ACEITES ESENCIALES

2.5.1 Recolección y lavado.

Las plantas fueron adquiridas en el Mercado 10 de agosto de la ciudad de Cuenca, ubicado en las calles Juan Jaramillo y General Torres. Las plantas pasaron por un proceso de selección de las partes útiles y en buen estado para luego proceder a lavarlas, eliminando todo tipo de impureza que estas presenten como tierra por ejemplo. Una vez lavadas con agua corriente se procedió a dejar las plantas en agua destilada por diez minutos, pasado este tiempo las plantas fueron colocadas sobre papel periódico sin impresión en mallas de acero inoxidable hasta que escurran.

2.5.2 Destilación por arrastre de vapor.

Es un proceso que tiene una duración de 3 horas, en el cual, la muestra vegetal generalmente fresca y cortada en trozos pequeños, es encerrada en una trampa tipo Clevenger y sometida a una corriente de vapor de agua sobrecalentado, la esencia así arrastrada es posteriormente condensada, recolectada y separada de la fracción acuosa. (Castillo-Quiroz et al., 2014)

Una vez preparada la planta utilizada, se pesaron 200g; utilizando una placa de vidrio y un cuchillo se picó finamente la planta para lograr el mayor volumen de aceite esencial



posible, para luego colocar ésta dentro del balón de vidrio de fondo redondo. Se adicionó un litro de agua destilada y canicas de vidrio para evitar que la ebullición fuere brusca el momento de someter al calentamiento.

Se procedió a armar el equipo colocando el balón de vidrio de fondo redondo que contiene la planta dentro de la manta de calentamiento (Thermo Fisher, Guatemala), colocamos la trampa de tipo Clevenger y sosteniéndolo con una pinza. En la parte superior de la trampa tipo Clevenger se colocó el refrigerante y también asegurado con una pinza. Es importante anotar que en las uniones se debe colocar silicón para evitar que existan fugas del aceite esencial.

Conectada la manta de calentamiento y esperó a que comience la ebullición. Una vez comenzada la ebullición se controló el proceso de calentamiento en series de 20 minutos encendido y 5 minutos apagado, para de esta manera evitar ebulliciones bruscas durante 3 horas. Es importante mencionar que se utilizó un paño húmedo sobre el balón para que si se diera una ebullición brusca se agilite el enfriamiento.

En el momento que se terminó el proceso, se apagó la manta de calentamiento y se dejó enfriar durante un lapso de 15 minutos. Se realizó la recolección del aceite esencial de la bureta del sistema de destilación.

Se añadió sulfato de sodio anhidro para eliminar las fracciones de agua, luego se centrifugó a 3000rpm durante 5 minutos y se pasó el aceite con la ayuda de una pipeta Pasteur a un tubo limpio. Finalmente se trasvasó el aceite a viales color ámbar para protegerlos de la luz y almacenarlos en refrigeración.

2.6 ACTIVIDAD ANTI-CANDIDA

2.6.1 Método

a. Preparación del extracto

Para este ensayo se utilizó una disolución de 5mg/ml, la cual se llevó a cabo adicionando 1ml de DMSO (Dimetilsulfóxido) a aproximadamente 5mg del extracto.



b. Microorganismo de prueba

Se utilizó una cepa de *Candida albicans* ATCC 90028 (American Type Culture Collection), la que se conservó mediante la realización de un cryostock.

c. Preparación de medios de cultivo

Sabouraud Dextrose Agar (SDA)

Sabouraud Dextrose Agar es un medio de peptona suplementado con dextrosa para favorecer el crecimiento de hongos. Las peptonas son fuentes de factores de crecimiento nitrogenados. La dextrosa proporciona una fuente de energía para el crecimiento de microorganismos. (Becton, 2015)

Medio RPMI 1640

RPMI-1640 fue desarrollado en el Roswell Park Memorial Institute, del cual proviene su nombre. Utiliza un sistema de tampones entre ellos Bicarbonato, MOPS (3-(N-morpholino) propanosulfónico ácido), HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic ácido), etc.; y alteraciones en las cantidades de aminoácidos y vitaminas. Ha sido utilizado para el cultivo de leucocitos normales y neoplásicas humanas. RPMI-1640, cuando se complementa adecuadamente, ha demostrado una amplia aplicación para apoyar el crecimiento de muchos tipos de células cultivadas, incluyendo linfocitos humanos frescos en el ensayo de estimulación de fitohemaglutinina. (SIGMA-ALDRICH, 2017)

d. Cultivo Overningt

Para la activación de la cepa primero se temperó las cajas Petri que contenían Sabouraud Dextrose Agar (SDA) en la estufa a 37°C. Se sembró con hisopo por estría bajo cámara de flujo laminar, luego se procedió a incubar las placas a 37°C durante 12 – 18 horas.

e. Preparación del cryostock

Del cultivo preparado se tomaron las colonias necesarias para realizar un cryostock de *Candida albicans* de concentración 5×10^6 UFC/ml en el medio.

Materiales y métodos

- Hacer un cultivo de 24h en una placa de SDA.



- Poner 100ul del cultivo de *Candida albicans* ATCC 90028 sobre la placa con agar SDA.
 - Sostener el asa de siembra en la llama.
 - Difundir homogéneamente.
 - Incubar la placa al revés a 37°C por 24 horas.
 - Tomar todas las colonias de la placa con un asa de cultivo redonda quemada.
 - Disolver en 10ml de agua destilada estéril.
 - Este se puede almacenar en refrigeración hasta por una semana.
- Determinación de la concentración del cultivo por una serie de diluciones.
 - Hacer una serie de diluciones de la levadura ($10^{-1} - 10^{-10}$).
 - Adicionar 0,9ml de agua destilada estéril por tubo
 - Tomar 100ul del cultivo y adicionarlo al tubo 1 (10^{-1}) y mezclar.
 - Realizar el paso anterior hasta obtener los 10 tubos de diluciones.
 - Placas de SDA
 - Poner 100ul de cada tubo en una cada placa de SDA.
 - Flamear el asa de siembra en la llama hasta incandescencia, enfriar.
 - Difundir homogéneamente.
 - Incubar la placa al revés a 37°C por 24 horas.
 - Determinar el número de unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml).

Número de colonias x dilución x 10

- Hacer un cryostock con una concentración de $5 \cdot 10^6$ UFC/ml del cultivo hecho en agua.
 - Hacer la dilución en RPMI 1640 con glicerol 1/10 (1ml de glicerol estéril + 9ml RPMI 1640) + vortex.
 - Dividir en criotubos a un volumen de 1-1,5ml.
 - Poner en un tanque de nitrógeno líquido.



f. Screening

Se utilizaron placas de 96 pocillos de fondo plano y procedimos de la siguiente manera:

- I. Utilizar una pipeta multicanal y añadir 10ul de las soluciones de cada concentración del extracto en cada uno de los pocillos de la placa. En la columna 1 se llena con 200 µl de medio RMPI 1640 y en la columna 10 se llena con 200µl de la suspensión del inóculo de *Candida albicans*.
- II. Añadir a cada pocillo de las columnas 2 a 9, 190µl de la suspensión del inóculo de *Candida albicans* utilizando una pipeta multicanal.
- III. Incubar a 37°C durante 24 horas. Es aconsejable para evitar la desecación la colocación de las placas en una caja cerrada.
- IV. Pasado este tiempo leer las placas en el espectrofotómetro con una densidad óptica de 405nm.
- V. Realizar los cálculos necesarios para la obtención del porcentaje de inhibición de las concentraciones por cada una de los extractos o aceites esenciales empleadas en el estudio.

2.7 MANEJO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Los datos obtenidos se organizaron en tablas diseñadas para el ingreso de la información proveniente de los resultados de laboratorio y se procesaron para obtener las IC50 e IC90 y finalmente poder realizar la discusión y obtener las conclusiones correspondientes.

Se realizaron análisis de datos por medio del test de student el cual se utiliza para determinar si hay una diferencia significativa entre las medias de dos grupos, es decir para comparar dos medias. También se realizó un análisis de boxplot el cual proporcionan una visión general de la simetría de la distribución de los datos; si la mediana no está en el centro del rectángulo, la distribución no es simétrica.



CAPITULO 3

RESULTADOS

La aplicación de la técnica requería de la elaboración de un cryostock, para el cual se partió de una cepa de *Candida albicans* ATCC 90028 inactiva y por un proceso de cultivo en SDA (Sabouraud Dextrose Agar), se obtuvo un cryostock con una concentración de 5×10^6 UFC/ml según indica la misma. Se verificó la cepa ATCC 90028 mediante pruebas de identificación como tinción de Gram y túbulos germinales.

Otro requisito para el desarrollo de la técnica fue la preparación de extractos y aceites esenciales; obtenidos mediante diferentes procesos como: percolación: Nogal (*Juglans nigra*), Lechuguilla (*Gamochaeta spicata*), Ajo (*Allium sativum*), Papaya (*Carica papaya*), Achira (*Canna indica*), Tomillo (*Thymus vulgaris*); extracción mediante fluidos supercrítico: Ajo (*Allium sativum*) y destilación por Arrastre de Vapor: Menta (*Mentha piperita*), Romero (*Rosmarinus officinalis*), Matico (*Piper aduncum*) respectivamente.

Se consideró que el principal indicador de la estandarización sería el resultado de la aplicación de la técnica con el compuesto antifúngico: fluconazol, de tal forma que se obtenga resultados confirmatorios en cuanto a su actividad para valores de acuerdo con la bibliografía (NCCLS, 2002) entre 8 y 64 $\mu\text{g/ml}$. No obstante cuando se probó con diferentes concentraciones del antifúngico que oscilaron entre 0.5 y 64 $\mu\text{g/ml}$, los resultados no discriminaron actividad, conforme se puede ver en la tabla N° 14 (Porcentaje de Inhibición de Crecimiento de *Candida albicans* ATCC 90028 con Fluconazol) y tabla N° 15 (Prueba T de Porcentaje de Inhibición de Crecimiento de *Candida albicans* ATCC 90028 con Fluconazol). Se realizó el test de student para comparar las diferencias significativas con las diferentes concentraciones del fluconazol.

Concentración µg /ml	64	32	16	8	4	2	1	0,5
Fluconazol	78,57	81,82	78,57	68,83	70,78	77,27	75,97	67,53
Fluconazol	75,69	79,17	71,53	67,36	79,86	77,08	68,06	60,42
Fluconazol	86,19	71,13	69,87	79,08	73,64	77,82	66,11	59,83
Fluconazol	77,40	76,71	75,34	86,30	82,88	78,08	72,60	80,82
Fluconazol	80,47	86,69	83,14	84,91	81,07	86,98	84,91	84,62
Fluconazol	83,12	81,39	81,39	78,35	71,43	80,52	77,49	67,97
Fluconazol	91,58	90,10	90,10	91,09	88,12	88,61	78,71	86,14
Fluconazol	92,50	86,25	83,75	91,25	82,92	86,25	75,83	80,00
Fluconazol	76,23	75,41	55,74	36,89	53,28	50,00	36,07	39,34
Fluconazol	65,00	53,33	51,67	47,50	60,00	47,50	55,00	50,83
Fluconazol	42,31	-32,69	0,00	23,08	30,77	26,92	-17,31	-78,85
Fluconazol	41,54	44,62	32,31	60,77	53,08	53,85	38,46	58,46
Fluconazol	75,67	78,00	77,00	74,67	77,00	75,67	80,67	74,00
Fluconazol	66,49	51,35	45,95	44,86	75,14	68,65	63,78	60,54

Tabla N°14. Porcentaje de Inhibición de Crecimiento de *Candida albicans* ATCC

90028 con Fluconazol

Fuente: Registro de Laboratorio

Concentración µg /ml	64	32	16	8	4	2	1
Prueba T	0,0705	0,0496	0,2557	0,1886	0,1020	0,0989	0,3629

Tabla N°15. Prueba T de Inhibición de Crecimiento de *Candida albicans* ATCC

90028 con Fluconazol

Fuente: Registro de Laboratorio

Al realizar un análisis de diagrama de caja o bloxplot, el cual es un gráfico que nos proporciona una visión general de la simetría de la distribución de los datos y la existencia de valores atípicos se observó que, la mediana no se encuentra en el centro de ninguno de los rectángulos, por lo tanto, la distribución no es simétrica (Véase imagen N°15)

Inhibición de Crecimiento de *Cándida* con Fluconazol

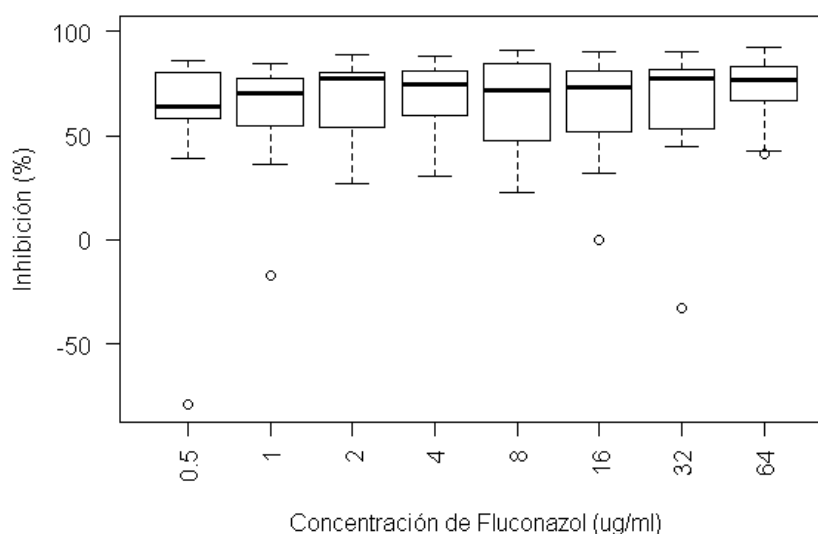


Imagen N° 15. Inhibición de Crecimiento de *Candida albicans* ATCC 90028 con Fluconazol

Fuente: Registro de Laboratorio

Se realizó el estudio de la actividad anti-candida del extracto de 9 plantas, de las cuales 6 no presentaron actividad y 3 resultaron positivas frente a *Candida albicans* ATCC 90028.

Entre las plantas activas tenemos el Ajo (*Allium sativum*), Nogal (*Juglans nigra*), Rosas (*Rosas spp*) y Tomillo (*Thymus vulgaris*).

Del Ajo (*Allium sativum*) se elaboraron 2 tipos de extractos en los cuales se observó que el obtenido a partir de la planta fresca mostró una actividad superior frente al obtenido de la planta seca.

En el caso de la Lechuguilla (*Gamochaeta spicata*), Culen (*Otholobium pubescens*) y Congona (*Peperomia inaequalifolia*) los resultados fueron negativos a las concentraciones estudiadas.

Como patrones negativos se emplearon los extractos de Papaya (*Carica papaya*) y Achira (*Canna indica*) en los cuales se comprobó la ausencia de inhibición frente a *Candida*



albicans. (Véase Tabla N° 16 Porcentaje de Inhibición de Crecimiento de *Candida albicans* ATCC 90028 con Extractos).

CONCENTRACIÓN EXTRACTOS	TIPO DE EXTRACTO	128 µg /ml	64 µg /ml	32 µg /ml	16 µg /ml	8 µg /ml	4 µg /ml	2 µg /ml	1 µg /ml
Lechuguilla	Etanólico	-152,13	-37,20	1,37	39,87	31,22	13,34	19,75	33,67
Esencia rosas	Etanólico	32,90	65,42	84,39	90,32	91,35	86,71	97,81	97,81
Ajo seco	Hidroalcohólico	46,21	55,76	52,91	66,40	37,73	53,00	47,98	46,60
Ajo fsc	Etanol 10% en CO ₂	81,58	34,56	37,48	29,10	60,74	46,63	40,79	43,71
Nogal	Etanólico	9,08	56,37	77,04	85,80	88,83	90,92	88,52	90,61
Tomillo	Etanólico	4,63	58,80	73,96	67,71	68,40	57,87	58,22	55,32
Congona	Etanol 10% en CO ₂	-62,34	0,64	37,02	27,66	41,06	32,55	37,23	20,85
Culen	Etanol 10% en CO ₂	-122,31	-59,56	32,07	34,26	53,78	55,78	20,52	7,17
Papaya	Clorofórmico	-90,92	-39,60	-34,17	-3,28	0,63	17,91	23,46	17,28
Achira	Clorofórmico	31,85	20,99	1,23	12,59	-4,81	32,35	19,63	13,46

Tabla N°16. Porcentaje de Inhibición de Crecimiento de *Candida albicans* ATCC 90028 con Extractos

Fuente: Registro de Laboratorio

Se realizó también el estudio de actividad anti-candida de los aceites esenciales de los cuales Romero presentó actividad, mientras que, la Menta y el Matico resultaron negativos. (Véase la Tabla N° 17 Porcentaje de Inhibición de Crecimiento de *Candida albicans* ATCC 90028 con Aceites Esenciales)

CONCENTRACIÓN ACEITES ESENCIALES	128 µg/ml	64 µg/ml	32 µg/ml	16µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml
Menta	18,29	-50,86	-16,95	15,05	5,90	13,90	26,10	25,14
Romero	81,79	67,55	45,86	38,25	36,92	27,48	42,72	11,09
Matico	-64,93	-2,54	-6,02	-1,20	0,27	30,52	8,03	47,66

Tabla N°17. Porcentaje de Inhibición de Crecimiento de *Candida albicans* ATCC 90028 con Aceites Esenciales

Fuente: Registro de Laboratorio

Es necesario tomar en cuenta que, los valores obtenidos en el estudio no permiten hacer conclusiones ya que no se considera estandarizada la técnica de microdilución.

DISCUSIÓN

El método de microdilución es el más práctico para screening debido a que se emplean cantidades pequeñas de extracto y micro volúmenes de medio de cultivo, presentando así grandes ventajas. El trabajo que se realizó en el laboratorio VVir de Plantas Medicinales, pretendía estandarizar la técnica de microdilución para de esta manera determinar la concentración antifúngica, IC 50 e IC 90 de los extractos y aceites esenciales de plantas empleadas frente a *Candida albicans* ATCC 90028.

Para la estandarización de la técnica de microdilución se utilizaron como métodos de referencia varios documentos; la CLSI segunda edición, que indica el medio de cultivo y los antifúngicos a emplear, es por esto que, como antifúngico se empleó fluconazol en su nombre comercial Diflucan IV. Los puntos de corte de fluconazol frente a *Candida* están entre un rango de 64µg/ml y 8µg/ml, siendo los valores $\geq 64\mu\text{g/ml}$ resistente y valores $\leq 8\mu\text{g/ml}$ susceptible. (NCCLS, 2002)

Las plantas empleadas en este estudio fueron elegidas tras una exhaustiva investigación bibliográfica, la cual indica si presentan o no actividad frente a *Candida albicans* independientemente de las concentraciones a las que se emplee. Entre las plantas elegidas como positivas están: Ajo (*Allium sativum*), Nogal (*Juglans nigra*) y Tomillo (*Thymus vulgaris*), y entre las negativas: Lechuguilla (*Gamochaeta spicata*), Matico (*Piper aduncum*), Menta (*Mentha piperita*), Romero (*Rosmarinus officinalis*) (Estrada Orozco, 2010). Fue necesario también el uso de plantas que, bajo referencias indiquen no tener ningún tipo de actividad frente a *Candida* como: Papaya (*Carica papaya*), Achira (*Canna indica*). El estudio se realizó con tres extractos más que fueron proporcionados por el Proyecto VLIR de Plantas Medicinales de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca, para conocer si presentan o no actividad frente a *Candida albicans*, estos fueron: Rosas (*Rosa spp.*), Culen (*Otholobium pubescens*), Congona (*Peperomia inaequalifolia*). (Estrada Orozco, 2011)

Como parte de los cálculos estadísticos realizados para conocer si la técnica se estandarizó o no, tenemos el test de student, el cual va a ayudar a determinar si las medidas muestrales de dos grupos difieren estadísticamente entre sí. (Sabiote, Pérez, & Llorente, 2007)

En el caso del Fluconazol, se realizó el test de student pareado porque, cada resultado pertenecía a una placa realizada en diferentes días, en el cual se analizó los diferentes



porcentajes de inhibición frente a la concentración más baja del antifúngico y se analizó también el porcentaje de inhibición del mismo antifúngico frente a la concentración más alta, demostrando que no existe variabilidad entre estos dos factores analizados, por lo tanto, la técnica no se estandarizó para el antifúngico.

En cuanto a los extractos y aceites esenciales, se observó que sí existe variabilidad entre las diferentes concentraciones, también se compararon los porcentajes de inhibición de los productos vegetales, sin embargo, la técnica no se logró estandarizar puesto que, hay puntos en los que a menor concentración analizada, los extractos presentan mayor actividad, lo cual es considerado una incongruencia.

Es importante tomar en cuenta que el buffer recomendado para tamponar el medio de cultivo RMPI 1640 con glutamina y sin bicarbonato de sodio fue el MOPS (3-(N-morpholino) propanesulfonic acid) (NCCLS, 2002), lamentablemente no se logró conseguir dicho buffer por lo que, para la realización de la técnica se empleó un buffer alternativo indicado por la bibliografía el cual fue el HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic ácido).

Los resultados no fueron los esperados y se puede deber a que, al usar el medio de cultivo tamponado con HEPES era necesario el uso conjuntamente con Bicarbonato de sodio para que de esta manera el medio de cultivo este mas enriquecido y se pueda promover un mayor crecimiento de *Candida albicans*. (de Carvalho Dias, Barbugli, & Vergani, 2016)

En ensayos previos se ha observado que la técnica presenta limitaciones importantes como la falta de reproducibilidad y la interpretación de los resultados ya que es muy subjetiva y solo personal ampliamente experimentado puede ofrecer datos confiables; intentando resolver estos inconveniente se han desarrollado modificaciones a la técnica que consisten en emplear indicadores de fluorescencia de óxido-reducción como la resazurina o mediante métodos colorimétricas como las sales de tetrazol MTT. (Bulla Quintero & Hernández Zorro, 2010)



CAPITULO 4

4 CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en la presente investigación “Estandarización de la técnica de microdilución de actividad antifúngica de extractos hidrofílicos y lipofílicos de plantas medicinales frente a *Candida albicans* ATCC 90028” es posible plantear las siguientes conclusiones:

Se elaboró un cryostock de levaduras a una concentración de 5×10^6 UFC/ml y se verificó su concentración.

No se logró estandarizar la técnica ya que los resultados obtenidos para el fluconazol no coinciden con la hipótesis planteada y que el porcentaje de inhibición varía independientemente de su concentración.

A pesar de haber determinado que ciertos extractos y aceites esenciales presentan o no actividad, estos resultados no pueden ser considerados válidos, puesto que, no fueron reproducibles; por lo tanto, no se pudo hacer una comparación con los resultados obtenidos en estudios bibliográficos previos.



CAPITULO 5

5 RECOMENDACIONES

De acuerdo a la experiencia obtenida, se sugiere tomar en cuenta ciertas recomendaciones para la realización de la microtécnica como:

Se puede utilizar extractos libres de clorofila para evitar interferencias entre el color el extracto y el color del medio de cultivo el momento de la lectura en el espectrofotómetro.

Que la microtécnica podría emplear como tampón del medio de cultivo el buffer MOPS, el cual es el recomendado por la técnica, ya que en el caso del presente estudio no se lo utilizó debido a que no se lo pudo conseguir.



BIBLIOGRAFIA

- Anguieta, S., & Alexandra, M. (2013). Estudio Clínico de la Actividad Antifúngica del Gel con Tocte, Higo, Dulcamara y Salvia en Niños de la Comunidad Sanjapamba con *Malassezia furfur*.
- Areas, M. F., Fitoria, I. C., & Matamoros, J. A. (2015). *Elaboración de un compuesto farmacológico a base de látex de Carica papaya con actividad cicatrizante evaluada en modelo experimental in vivo en ratas Wistar, con amputación de colas en la Facultad de Ciencias Médicas de Julio-Octubre 2012*. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua,
- Arroyo, J. (2016). *Efecto antitumoral in vitro del aceite esencial de Piper aduncum L.(matico) y su toxicidad oral en ratones Piper aduncum L.(matico) essential oil in vitro antitumoral effect and oral toxicity in mice*. Paper presented at the Anales de la Facultad de Medicina.
- Arroyo, J., Bonilla, P., Moreno-Exebio, L., Ronceros, G., Tomás, G., Huamán, J., . . . Rodriguez-Calzado, J. (2013). Efecto gastroprotector y antisecretor de un fitofármaco de hojas de matico (*Piper aduncum*). *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 30(4), 608-615.
- Ayerbe, A. G., & García, E. T. (2010). El escaramujo: propiedades y uso terapeutico. *Medicina naturista*, 4(1), 44-52.
- Becton, D. (2015). BBL Sabouraud Dextrose Agar. In *BBL Sabouraud Dextrose Agar* (12 ed., pp. 1-4). USA.
- Bonilla González, C. E., Funes Andrade, A. E., Cañenguez, P., & Elizabeth, L. (2015). *Aislamiento e identificación de Candida albicans de la cavidad oral, mediante el uso del Agar cromogénico en la población interna del Asilo San Antonio y Casa de la Misericordia de la ciudad de San Miguel*. Universidad de El Salvador,
- Bulla Quintero, G. M., & Hernández Zorro, A. M. (2010). Ensayo preliminar de una modificación de la técnica de microdilución propuesta por la CLSI documento



M38-A, mediante el uso de 2, 3, 5-trifenil-tetrazolium como método alternativo para la medición de viabilidad de propágulos fúngicos.

Bustamante, S., & Álvarez, N. (2015). Fundamentación preclínica del uso etnomédico de matico (*Buddleja globosa* Hope). *Revista de Fitoterapia*, 15(1), 37-51.

Cahuas, C. L., Velásquez, M. L., Castillo, H. R., Cueva, V. S., & Rodríguez, J. C. (2015). Efecto in vitro de diferentes concentraciones de *Allium sativum* "ajo" frente a dermatofitos y *Candida albicans*. *UCV-SCIENTIA*, 2(2), 23-33.

Carmilema Sánchez, C. S., & Delgado Delgado, R. A. (2010). Validación del método de microdilución para la actividad antimicrobiana de extractos de plantas (ortiga, ajeno, malva olorosa).

Carrillo, J. V. (2014). *Determinación de los requerimientos de riego del cultivo de Achira (Canna edulis, Ker Gawier; Canna indica, L) y sus estadios fenológicos, con riego por aspersión, en el sector Cabrería-Chumberos, perteneciente al sistema de riego Palmira*. Loja: Universidad Nacional de Loja,

Castillo-Quiroz, D., Martínez-Burciaga, O. U., Ríos-González, L. J., Rodríguez-de la Garza, J. A., Morales-Martínez, T. K., Castillo-Reyes, F., & Avila-Flores, D. Y. (2014). Determinación de Áreas Potenciales para Plantaciones de Agave lechuguilla Torr. para la Producción de Etanol Identification of Potential Areas for the Establishment of Plantation of Agave lechuguilla Torr. to Production of Ethanol. *Revista Científica*, 6(12).

Contreras, S., & Juan, E. (2005). Efecto del extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Otholobium pubescens* en la hiperglicemia experimental en *Rattus norvegicus* var. *Albinus*.

Cruz, S. M. (2007). PROYECTO FODECYT No. 09-2007.

de Carvalho Dias, K., Barbugli, P. A., & Vergani, C. E. (2016). Influence of different buffers (HEPES/MOPS) on keratinocyte cell viability and microbial growth. *Journal of microbiological methods*, 125, 40-42.



- Di Giacomo, M. (2015). Obtención de papaína a partir de látex de *Carica papaya* mediante procesos extractivos escalables y de bajo impacto.
- Dominguez, E. M. S., Pérez, S. R., & Batista, N. N. A. (2016). Investigaciones actuales del empleo de *Allium sativum* en medicina. *Revista Electrónica Dr. Zoilo E. Marinello Vidaurreta*, 41(3).
- ESCOBAR, L., & RIVERA, A. (2010). Estudio comparativo de los métodos de resazurina y MTT en estudios de citotoxicidad en líneas celulares tumorales humanas. *Vitae*, 17(1), 67-74.
- Estrada Orozco, S. P. (2011). *Determinación de la Actividad Antibacteriana in vitro de los Extractos de Romero (Rosmarinus officinalis y Tomilla) y Tomillo (Thymus vulgaris)*.
- Flores, M., & Elizabeth, D. (2015). *Cándida albicans en secreción vaginal de mujeres en edad fértil y su relación con los factores de riesgo*.
- Gill, G. (2015). Fungal infections in Intensive Care Service of a specialized hospital Adults. *DEL NACIONAL*, 7(2), 07-14.
- González, R. P., Carbonell, L. L., Sánchez, Y. O., Llovet, A. M., & Ginarte, M. L. H. (2016). 01 Caracterización Fitoquímica de extractos obtenidos a partir de hojas y corteza de *Spondias mombin* (jobo), su relación con las propiedades medicinales de esta especie. *MULTIMED Revista Médica Granma*, 20(2).
- Granada. (2010). Secado por Liofilización. In *Prácticas Docentes en la Facultad de Ciencias* (pp. 1-4). Granada, España.
- Guillermo Navarro, R. F. (2002). Comprobación del efecto cicatrizante de *Peperomia scutellaefolia* R. et P., aspectos etnofarmacológicos, botánicos y estudio químico.
- Loja Morocho, J. P. (2014). Elaboración de un gel anticótico a base de manzanilla (*Matricaria chamomilla*) y matico (*Piper angustifolium*), en la provincia de El Oro, 2014.



- Mamani, D. U., & Mamani, S. L. M. (2016). VALORACION CICATRIZANTE DEL EXTRACTO DE CONGONA (PEPEROMIA CONGONA RUIZ & PAV) EN HERIDA POST TRAUMATICA EN RATAS WISTAR. EVALUACION HISTOLOGICA. *Revista Científica Investigación Andina*, 15(1), 141.
- Marchiori, A. E., & Inze, J. P. (2015). Diversidad y manejo de malezas otoño invernales asociadas a cultivos de soja y maíz en la región centro-noreste de Córdoba.
- Marcos-Zambrano, L., Escribano, P., Recio, S., & Guinea, J. (2013). Candida y candidiasis invasora: estudio de la actividad antifúngica in vitro de arasertaconazol frente a cepas clínicas de Candida y caracterización molecular de cepas productoras de candidemia relacionada con el catéter.
- Martínez, P. N. (2015). Evaluación del poder antifúngico de los extractos de romero, menta y salvia sobre hongos que atacan a las naranjas. *Revista sobre Estudios e Investigaciones del Saber Académico*(7), 28-32.
- Mendez, D. F., Becerra, L. C., Hernández, H. E., Díaz, A. J., & Muñoz, A. J. (2016). Incidence of the soil mechanization over the physical properties and the vegetative growth of papaya (*Carica papaya* L.). *Revista de Ciencias Agrícolas*, 33(1), 53-63.
- Mora-Vivas, F. D., Velasco, J., Díaz, T., Rojas-Fermín, L., de Torres, L. D., Ríos-Tesch, N., & Carmona, J. (2016). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Peperomia acuminata* de los Andes venezolanos. *Revista Peruana de Biología*, 23(3), 301-304.
- NCCLS. (2002). *Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de sensibilidad antifúngica (documentos M27-A, M-38 Y M-44)*. In E. Canton Lacasa, E. Martín Mazuelos, & A. Espinel-Ingroff (Eds.).
- Paola, H.-M. (2016). Evaluación de la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico estandarizado de hojas de *Juglans Neotropica* Diels (nogal peruano). *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 81(3).



- Papa, J. C., Tuesca, D., & Nisensohn, L. (2010). Control tardío de rama negra (*Conyza bonariensis*) y peludilla (*Gamochaeta spicata*) con herbicidas in-hibidores de la protoporfirin-IX-oxidasa previo a un cultivo de soja.
- Pardi, G., & Cardozo, E. I. (2002). Algunas consideraciones sobre *Candida albicans* como agente etiológico de candidiasis bucal. *Acta odontol. venez*, 40(1), 9-17.
- Pascal, C., & Maritsa, L. (2015). Efecto antifúngico del aceite esencial del *origanum vulgare* (orégano) y *cymbopogon citratus* (hierba luisa), sobre cepas de *Candida albicans* en comparación con la nistatina estudio invitro.
- Reyes, I. E. C. (2014). Actividad antimicrobiana y antifúngica de *Allium Sativum* en estomatología. *16 de Abril*, 53(254), 59-68.
- Rodríguez Cárdenas, M. M., & Mori Ortiz, N. (2014). Actividad antibacteriana in vitro de los extractos etanólico e hidroalcohólico de hojas de *Carica papaya* (Papayo), frente a *staphylococcus aureus* y *escherichia coli*, por el método de macrodilución.
- Rojas Armas, J., Ortiz Sanchez, J., Jáuregui Maldonado, J., Ruiz Ouiroz, J., & Almonacid Roman, R. (2015). *Aceite esencial de Thymus vulgaris L (tomillo), su combinación con EDTA contra Candida albicans y formulación de una crema*. Paper presented at the Anales de la Facultad de Medicina.
- Rojo, I. E. J. (2014). *Carica papaya: una planta con efecto terapéutico*. *Horizonte sanitario*, 12(2), 35-36.
- Romero Arellano, M. C. Y. (2013). RENDIMIENTO Y CALIDAD DE PRODUCCIÓN DE CINCO CULTIVARES DE ROSA EN EL MUNICIPIO DE TENANCINGO, ESTADO DE MÉXICO.
- Romero Vásquez, S. M., & Valdez Valles, J. A. (2016). Capacidad antioxidante in vitro de los flavonoides totales del extracto fluido de las hojas de *Canna indica L.*(achira) frente al radical libre 2, 2-difenil-1-picrilhidrazilo.



- Ruiz Quiroz, J. R. (2013). Actividad antifúngica in vitro y concentración mínima inhibitoria mediante microdilución de ocho plantas medicinales.
- Sabiote, C. R., Pérez, J. G., & Llorente, T. P. (2007). Fundamentos conceptuales de las principales pruebas de significación estadística en el ámbito educativo. *LISLL, Ed.) Grupo Editorial Universitario*.
- San Martín Acevedo, J., & Muñoz Villagra, V. (2013). Productos forestales no madereros de la Región del Maule. In.
- Santacruz Endara, G. P. (2015). Evaluación del efecto acaricida del aceite esencial de congona, (*Peperomia inaequalifolia* Ruiz & Pav.) en plantas de frutilla (*Fragaria vesca* L.).
- Saravia, S. G. d., Borrego, S., Lavin, P., Valdés, O., Vivar, I., Battistoni, P. A., & Guiamet, P. (2013). *Productos ambientalmente amigables de origen vegetal empleados en el control de microorganismos intervinientes en el biodeterioro del patrimonio cultural*. Paper presented at the VII Congreso de Medio Ambiente.
- SIGMA-ALDRICH. (2017). RPMI-1640 Media. In SIGMA-ALDRICH (Ed.). USA.
- Soria, N., & Ramos, P. (2015). Use of medicinal plants in Primary Health Care in Paraguay: some considerations for its safe and effective use. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*, 13(2), 08-17.
- Sánchez Araya, P. (2015). Plantas tóxicas para perros y gatos en Costa Rica.
- Sánchez, C., Susana, C., & Delgado Delgado, R. A. (2010). *Validación del método de microdilución para la actividad antimicrobiana de extractos de plantas (ortiga, ajeno, malva olorosa)*.
- Torres Alberca, M. R. (2015). Elaboración y Evaluación Nutricional de un Cupcake a base de harina de Achira (*Canna_ edulis*) fortificado con harina de Garbanzo (*Cicer arietinum* l) y Papaya (*Carica papaya*).



- Torres Camacho, V., & Castro Cañaviri, A. E. (2014). Fitoterapia. *Revista de Actualización Clínica Investiga*, 42, 2185.
- Torres, S. S. C., Arango, C. C. S., & Khoury, C. K. (2015). Impacto del cambio climático para el 2020 en la distribución potencial de Achira (*Canna indica* L.) en Colombia usando tres modelos de circulación global de la familia de escenarios de emisión A2. *Revista Ingeniería y Región*, 13(1), 91-102.
- Urióstegui-Flores, A. (2015). Hierbas medicinales utilizadas en la atención de enfermedades del sistema digestivo en la ciudad de Taxco, Guerrero, México. *Revista de Salud Pública*, 17(1), 85-96.
- VALENCIA GARCÍA, A. (2014). HIERBAS AROMÁTICAS Y ESPECIAS MÁS UTILIZADAS EN MÉXICO.
- Valle Vargas, B. J., & Yanac Salcedo, A. R. (2014). EFECTO DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE *Piper aduncum* “MATICO” SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Candida albicans* in-vitro, PROCEDENTES DEL DISTRITO DE OTUZCO-LA LIBERTAD-2014.
- Velasco, R. J., Villada, H. S., & Carrera, J. E. (2007). Aplicaciones de los fluidos supercríticos en la agroindustria. *Información tecnológica*, 18(1), 53-66.
- Vivanco López, L. R. (2014). Estudio de la cadena productiva en la fábrica de horchatas de la asociación artesanal de plantas medicinales “la laureñita”(asaplamell).
- Vásconez, C., & Alexandra, M. (2015). Comparación del efecto cicatrizante de las tinturas elaboradas a base de matico (*Eupatorium glutinosum*) y acíbar de sábila (*Aloe barbadensis*) aplicado en ratones (*Mus musculus*).
- Vásquez, M. R. S. (2015). Estudio fitoquímico y cuantificación de flavonoides totales de las hojas de *Piper peltatum* L. y *Piper aduncum* L. procedentes de la región Amazonas. *In Crescendo*, 6(1), 33-43.



Wilson, E. C. F. (2016). Determinación de fenoles totales, fructanos y pungencia en seis cultivares de ajos (*Allium sativum* L.) en el Perú. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 76(1).

Yauripoma, C., & Fredy, J. (2015). Evaluación de la Actividad Cicatrizante de un Gel elaborado a base de los extractos de Guarango (*Caesalpinia Spinosa*), Nogal (*Juglans Regia*) y Tomillo (*Thymus Vulgaris*) en ratones (*Mus Musculus*).

ANEXOS

ANEXO 1 ILUSTRACIONES

Ilustración N° 1. Percolación



FUENTE: Registro de laboratorio

Ilustración N° 2: Evaporación del solvente



FUENTE: Registro de laboratorio

Ilustración N° 3: Concentración del extracto a base de nitrógeno



FUENTE: Registro de laboratorio

Ilustración N° 4: Extracción por Fluidos Súper Críticos



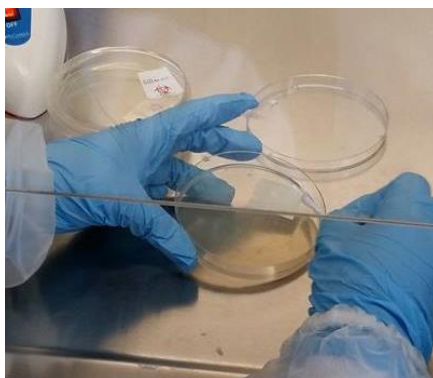
FUENTE: Registro de laboratorio

Ilustración N° 5. Obtención de Aceites esenciales por arrastre de vapor.



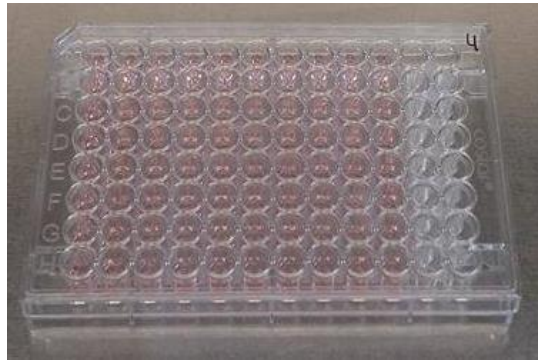
FUENTE: Registro de laboratorio

Ilustración N° 6. Activación de *Candida albicans* ATCC 90028



FUENTE: Registro de laboratorio

Ilustración N° 7. Siembra en placa fondo plano



FUENTE: Registro de laboratorio