

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



**“EFECTO ANTIFÚNGICO IN VITRO DEL EXTRACTO
ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Bixa orellana* L. “Achiote”
SOBRE *Candida albicans* ATCC 10231”**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE
MÉDICO CIRUJANO**

AUTORA:

Rosnira Amrosia ESPÍNDOLA MILLA

ASESORA:

Dra. Elva Manuela MEJÍA DELGADO

TRUJILLO – PERÚ

2015

MIEMBROS DEL JURADO

Dr. Eduardo Fernandez Vasquez

Dra. Elena Caceres Andonaire

Dra. Cecilia Bardales Vasquez

ASESORA:

Dra. Elva Mejía Delgado

DEDICATORIA

A mi padre **Armando Espíndola C.**, mi mejor amigo por guiar mis pasos y mis acciones, por sus palabras de aliento en momentos difíciles, por enseñarme esa humanidad y a ser tenaz.

A mi madre, **Rita Milla C.**, por impulsar en mí, siempre, un deseo de superación. Por todo su amor incondicional, su perseverancia y su propio sacrificio para ver cumplir mis sueños

A mis hermanas, **Rosmeri y Rosario** y mi hermano **Armando**, por ser mis aliados, mis compañeros de los momentos buenos y malos, por su cariño, sus cuidados, su apoyo en cada momento y por haber sido mí ejemplo a seguir.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios, por bendecirme tanto, por haberme dado muchas oportunidades en la vida, enseñándome con cada una de ellas lo hermoso que es la vida, a valorar a la gente que me rodea a ser más humana y tratar con consideración y respeto a mis semejantes.

A la Dra. Elva Mejía D. Por su asesoramiento acertado, su apoyo y sus palabras de aliento en la realización del trabajo.

Agradezco a mi familia, por enseñarme todo lo bueno que ahora hay en mí, gracias porque sé, que muchas veces sacrificaron sus propios sueños por ver cumplir los míos.

A ti, gracias por escucharme, por cuidarme, por todos esos momentos y tu esfuerzo por verme reír.

INDICE

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN

ABSTRACT

	Paginas
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MATERIA Y METODOS.....	9
III. RESULTADOS.....	22
IV. DISCUSIÓN.....	28
V. CONCLUSIONES.....	33
VI. RECOMENDACIONES.....	34
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
ANEXOS.....	41

RESUMEN

Objetivo: Evaluar el efecto antifúngico in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* L. “Achiote” sobre *Candida albicans* ATCC 10231

Material y Métodos: Se llevó a cabo un estudio experimental in vitro. Se preparó el extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* L. “Achiote” a 5 concentraciones: 5% (50 mg/ml), 50% (500 mg/ml), 75% (750 mg/ml) y 100% (1000 mg/ml).

Para evaluar la actividad antifúngica se utilizó el método de Kirby Bauer (difusión en disco) y la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), se expuso *Candida albicans* ATCC 10231 a cinco concentraciones del extracto, así mismo se utilizaron dos grupo control, uno con fluconazol y otro con el inóculo microbiano con suero fisiológico; realizándose 10 repeticiones en cada caso.

Resultados: El presente estudio demostro el efecto antifúngico del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* L. “Achiote” sobre *Candida albicans* ATCC 10231 al comparar los halos de inhibición según escala de Duraffourd para las 5 concentraciones utilizadas, según la cual *Candida albicans* ATCC 10231 fue sensible a partir concentraciones de 50% y 75% con un diametro promedio de los halos de 11.6 y 16.1mm de diametro respectivamente, mientras que a concentracion de 100% el diametro promedio del halo fue 33.8 Mostrando así un efecto semejante al fluconazol. La CMI para *Candida albicans* ATCC 10231 fue a concentración del 5% (50 mg/ml).

Además utilizando las pruebas de análisis de varianza (ANOVA) y DUNCAN, se observó que existe diferencia estadísticamente significativa entre las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Bixa orellana* L. “Achiote” sobre el crecimiento de *Candida albicans* ATCC 10231 ($P < 0.05$).

Conclusiones: El extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* L. “Achiote” si tiene efecto antifúngico sobre *Candida albicans* ATCC 10231

Palabras Clave: *Bixa orellana* L., fluconazol, *Candida albicans*.

ABSTRACT

Objective: Evaluate the in vitro antifungal effect of the ethanol extract of leaves of *Bixa orellana L.* "Achiote" on *Candida albicans* ATCC 10231.

Methods: An experimental study in vitro was performed. Ethanolic extract of the leaves of *Bixa orellana L.* "Achiote" was prepared to 5 concentrations: 5% (50 mg / ml), 50% (500 mg / ml), 75% (750 mg / ml) and 100% (1000 mg / ml).

The method of Kirby Bauer (disk diffusion) and determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) was used to evaluate the antifungal activity was exhibited *Candida albicans* ATCC 10231 to five concentrations of the extract, also two control groups were used, one fluconazole and another with the microbial inoculum with saline; performing 10 repetitions each.

Results: The present study demonstrated the antifungal effect of ethanol extract of the leaves of *Bixa orellana L.* "Achiote" on *Candida albicans* ATCC 10231 to compare the inhibition halos according scale Duraffour for 5 concentrations used, that *Candida albicans* ATCC 10231 was sensitive concentrations from 50% to 75% with an average diameter of halos of 11.6 and 16.1mm in diameter respectively while a concentration of 100% the average diameter of the halo was 33.8 and showing a similar effect to fluconazole. MIC *Candida albicans* ATCC 10231 for at concentration was 5% (50 mg / ml).

Further tests using analysis of variance (ANOVA) and Duncan, it was observed that there is statistically significant difference between different concentrations of ethanol extract of *Bixa orellana L.* "Achiote" on the growth of *Candida albicans* ATCC 10231 ($P < 0.05$).

Conclusions: The ethanol extract of the leaves of *Bixa orellana L.* "Achiote" if you have antifungal effect against *Candida albicans* ATCC 10231

Keywords: *Bixa orellana L.*, *fluconazole*, *Candida albicans*.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Marco teórico:

Uno de los principales problemas que enfrenta el sector de salud tanto en el ámbito intrahospitalario como extrahospitalario es la infección de heridas expuestas y esto se debe a la presencia de microorganismos patógenos en el medio ambiente, como lo es *Candida albicans*, que invade tejidos vulnerables causando así manifestaciones clínicas localizadas, diseminadas o sistémicas; donde los mecanismos inmunológicos han demostrado estar alterados.^{1,2}

La importancia clínica de las enfermedades fúngicas fue reconocida en la segunda mitad del siglo pasado, sobre todo por el aumento del número de pacientes inmunodeprimidos y el incremento de la agresividad de las técnicas diagnósticas y terapéuticas que han hecho crecer la población susceptible de sufrir alguna infección fúngica oportunista, siendo el agente más común *Candida albicans*, que puede causar infecciones en la superficie cutánea, mucosas (digestiva; oral y vaginal), y las potencialmente mortales infecciones sistémicas.^{3,4,5}

C. albicans taxonómicamente es un eumiceto del grupo de los *Fungi imperfecti* se presenta como una célula oval levaduriforme de 2 a 4 micras, con paredes finas. Las levaduras o blastosporas son microorganismos eucarióticos, asimilan y fermentan azúcares, se reproducen asexualmente por un proceso específico de división celular conocido como 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 se encuentra en su tamaño óptimo, se suscita la división celular y se forma un tabique o septo ente 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.⁶

La membrana citoplasmática de *C. albicans* es una estructura que reviste gran importancia, ya que los antimicóticos actúan a nivel de la misma, además de contener las enzimas responsables de la síntesis de la pared celular. La pared celular de *C. albicans* es esencial para su patogenicidad desde el momento en que es requerida para su crecimiento. Además la pared celular le proporciona rigidez y protección. La composición química de *C. albicans* está representada por proteínas y polisacáridos.⁶

Entre las características del microorganismo que podrían contribuir a su potencial patógeno se encuentran la capacidad de adhesión a tejidos, el dimorfismo levadura-micelio, la hidrofobicidad de su superficie celular, la secreción de proteinasas, y el cambio de fenotipo.^{7,8} Se cree que la capacidad de adhesión a distintos tejidos y superficies inanimadas es importante en las fases iniciales de la infección por *Candida*: La adhesión se lleva a cabo por medio de la combinación de mecanismos específicos e inespecíficos. La capacidad de transformación de la fase de levadura a una forma micelial se encuentra regulada por el pH y la temperatura. La transformación dota a *Candida* de un mecanismo de respuesta a las alteraciones ambientales. Las hifas de *Candida albicans* muestran tigmotropismo (sentido del tacto); esta propiedad les permite crecer a lo largo de surcos y a través de poros, y podría facilitar la infiltración de las superficies epiteliales.⁸

La composición de la superficie celular del género *Candida* puede afectar tanto a la hidrofobicidad de la célula como a la misma respuesta inmunitaria. El tipo y el

grado de glucosilación de las manoproteínas de superficie pueden incidir en la hidrofobicidad de la célula y, por ende, en la adhesión a las células epiteliales. La capacidad del género *Candida* de pasar rápidamente de un morfotipo a otro se conoce como cambio de fenotipo el cual le permite que el microorganismo se adapte con rapidez a los cambios acontecidos en su entorno, facilitando su capacidad de supervivencia, invasión de tejidos y evasión de las defensas del organismo anfitrión.^{8,9}

El tratamiento de candidiasis en mucosas es sencillo en inmunocompetentes en quienes los antifúngicos tópicos resultan eficaces; sin embargo, en inmunodepresión existen altas tasas de recurrencias o recidivas, requiriendo terapia intensiva, tanto sistémica como local; y a pesar de los excelentes resultados con antifúngicos azólicos orales, existen formas clínicas de candidiasis rebeldes al tratamiento con ketoconazol, fluconazol e incluso anfotericina B.^{10,11}

La creciente aparición de resistencia, toxicidad e interacciones farmacológicas de los antimicrobianos tradicionales actualmente está fomentando la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas entre los productos naturales; siendo las más estudiadas las plantas con sus respectivos frutos, corteza, raíz y semillas.¹²

La zona central altoandina es uno de los ecosistemas más importantes del mundo. Ésta región es una fuente muy rica de especies para la agricultura, la domesticación de plantas y las aplicaciones medicinales. Se calcula la existencia de unas 30 millones de especies de plantas, sin embargo, sólo unas pocas han sido estudiadas e identificadas hasta ahora; solo el potencial farmacológico de alrededor de 1% de todas las especies de plantas ha sido evaluado, lo que las hace un gran reservorio para el descubrimiento de nuevas moléculas bioactivas y agentes

fitoterapéuticos.^{13,14} Considerándolas así sustitutos más seguros o más eficaces como fuente de agentes antimicrobianos que los producidos en la industria.^{15,16}

Entre las especies de la zona central altoandina destaca *Bixa orellana* L., o mejor conocida en nuestro país como ``achiote``. *Bixa orellana* L. de la familia *Bixaceae*, la cual según Brako y Zarucchi el género, para el Perú, consta de 5 especies caracterizadas por un porte únicamente leñoso, siendo arbustivas o arbóreas de 2-4 metros, copa baja y extendida. Hojas simples de base redondeada, color verdosas claras, de largos pecíolos. Flores en ramilletes terminales de panículas, de 5-10 cm de longitud, con pelos glandulares; hermafroditas, blanquecinas a rosadas y el fruto es una cápsula roja, de 2 a 6 cm de largo, con pelos gruesos espinosos, dehiscente, verdosa oscura a morada (según variedades), que al madurar pasa a pardo rojizo o naranja oscuro.^{17,18}

En el Perú se encuentra distribuido en los departamentos Huánuco (Tingo María), Tumbes, Madre de Dios, Cusco, Loreto, Junín y Amazonas.¹⁹ Este árbol crece en climas cálido, semicálido, semiseco y templado, soporta temperaturas de 20 a 35 °C; y, en altitud, de 100 a 1.500 msnm, aunque crece mucho mejor en zonas bajas de no más de 500 msnm, sin heladas; y lluvias anuales de 1.000 a 1.500 mm.^{20, 21}

En su composición química se han identificado treinta y cinco componentes entre los principales tenemos: Flavonoides, taninos y terpenoides. En las hojas encontramos: flavonoides (apigenina, hipoaletina, cosmosiina) diterpenos (farnesilacetona, garanil geraniol, geranil formato) y un derivado sesquiterpénico, alcaloides, asteroides, fenoles, taninos pirogálicos, antraquinonas, cumarinas fijas, aceites esenciales y ácido gálico, vitaminas (A, B, y C). Las semillas: contienen bixina (colorante rojo), norbixina, criphthoxantina, euxina, metilbixina, aminos,

leucoantocianinas, triterpenos y taninos. Presenta carotenoides expresados como provitamina, también contienen un alto contenido de proteínas, fósforo y bajo contenido en calcio.²³

La composición química que presentan principalmente los órganos fotosintéticos (hojas) explicarían sus propiedades terapéuticas como las siguientes:²⁴ astringente, antihelmíntico, antitumoral, antiinflamatoria, antimicrobiano, hipoglicemiante y antiulceroso.^{25,26}

En un estudio de análisis retrospectivo sobre las propiedades antifúngicas en plantas superiores se determinó que la presencia de Saponinas, flavonoides, taninos, glicósidos y terpenoides, serían los que confieren dicha propiedad.²⁷

Un estudio realizado evaluó la actividad antimicrobiana y la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos de *Bidens pilosa L.*, *Bixa orellana L.*, *Cecropia peltata L.*, *Cinchona officinalis L.*, *Gliricidia sepium HB & K*, *Jacaranda mimosifolia D. Don Don*, *Justicia secunda Vahl*, *Piper pulchrum C. DC*, *Paniculata L.* *Spilanthes americana Hieron* contra cinco bacterias (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus β hemolític*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*), y uno de levaduras (*Candida albicans*). El etanol, hexano y agua extractos fueron obtenidos por métodos estándar. Todos los microorganismos se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC). La CMI se determinó en los extractos de plantas que mostraron cierta eficacia contra los microorganismos ensayados. Sulfato de gentamicina (1,0 µ g / ml), clindamicina (0,3 µ g / ml) y nistatina (1,0 µ g / ml), se utilizaron como controles positivos. El extracto etanólico de todas las especies se activa frente a *Staphylococcus aureus* a excepción de *Justicia secunda*. Del mismo modo, *Justicia secunda* y *Piper*

pulchrum C. DC mostró un análogo CMI contra *Candida albicans* (0,5 y 0,6 μ g / ml, respectivamente) en comparación con la nistatina (0,6 μ g / ml).²⁸

En otro experimento se estudiaron 20 plantas usadas en la medicina tradicional brasileña por su actividad antifúngica contra *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*. Entre los 20 extractos metanólicos ensayados, los extractos del *Schinus terebintifolius*, *Occimum gratissimum*, *Cajanus cajan*, y *Piper aduncum* fueron los más activos contra *C. albicans* (CMI de 1.25 mg/mL) mientras que *Bixa orellana*, *O. gratissimum*, y *Syzygium cumini* mostraron la mejor actividad contra *C. neoformans* (CMI de 0.078 mg/ml).²⁹

Algunos curanderos de la Amazonía peruana hacen uso de esta planta en alteraciones neurológicas como la epilepsia, .³⁰ Así mismo como antidiarreico, antitusígeno, para desórdenes de la próstata e inflamaciones internas, hipertensión arterial, cistitis, obesidad, insuficiencia renal, afecciones respiratorias, antiséptico vaginal y como antiveneno contra *Bothrops asper venom* y *Bothrops atrox venom*, para afecciones respiratorias y antiséptico vaginal.³¹⁻³²

Justificación:

La actividad antifúngica de *Bixa orellana* L. ``Achiote`` todavía no está muy estudiada, sin embargo, en sus hojas podemos encontrar flavonoides (apigenina, hipoaletina, cosmosiina) diterpenos (farnesilacetona, garanil geraniol, garanil formato) y un derivado sesquiterpénico, alcaloides, esteroides, fenoles, taninos pirogálicos, antraquinonas, cumarinas fijas, aceites esenciales y ácido gálico, vitaminas (A, B, y C); los cuales poseen acción antimicrobiana,²³ éstos convierten a *Bixa orellana* L. en una potencial fuente de antibiótico y antifúngico. Por otro lado, la aparición de especies patógenas con resistencia intrínseca, cepas con

resistencia secundaria, interacciones farmacológicas significativas, biodisponibilidad insuficiente y toxicidad de los fármacos tradicionales, han fomentado la búsqueda de nuevas alternativas entre productos naturales contra los patógenos más frecuentes como, *Candida albicans*.¹² Debido a que existen pocos trabajos publicados de la actividad antifúngica de *Bixa orellana* L.; y siendo nuestro país uno de los más ricos en biodiversidad, se considera pertinente y factible la realización de este proyecto para evaluar su actividad antifúngica contra *Candida albicans* ATCC 10231 y servir como base para estudios futuros, así mismo, aprovechar los recursos biológicos de nuestro país con un respaldo científico en beneficio de la salud de la población.

1.2. Formulación del Problema:

¿Existe efecto antifúngico in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* L. "Achiote" sobre *Candida albicans* ATCC 10231?

1.3. Hipótesis:

H1: El extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* L. "Achiote" tiene efecto antifúngico in vitro sobre *Candida albicans* ATCC 10231.

H0: El extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* L. "Achiote" no tiene efecto antifúngico in vitro sobre *Candida albicans* ATCC 10231.

1.4. Objetivos:

Objetivos Generales:

Evaluar el efecto antifúngico del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana L.* ``Achiote`` sobre *Candida albicans* ATCC 10231.

Objetivos Específicos:

- ❖ Determinar el efecto antifúngico del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana L.* ``Achiote`` en concentraciones de 5%, 25%, 50% 75% y 100% utilizando el método de kirby-Bauer sobre *Candida albicans* ATCC 10231.
- ❖ Determinar la concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana L.* ``Achiote`` utilizando concentraciones al 5%, 25%, 50% 75% y 100% sobre *Candida albicans* ATCC 10231

II. MATERIAL Y MÉTODO

2.1. Población Muestral:

Conformada por constituida por 52 discos de difusión y las placas inoculadas con la cepas de *Candida albicans* ATCC 10231

2.2. Muestra:

❖ Unidad de análisis.

La unidad de análisis la constituyó cada uno de los discos de difusión y placas Petri observadas.

❖ Unidad de muestreo:

El Unidades formadoras de colonias de *Candida albicans* ATCC 10231 y producto del efecto antifúngico del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* L. “Achiote”

❖ Tamaño muestral

Considerando que los antifúngicos de uso común presentan 80% de alta efectividad frente al 28% del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* L. “Achiote”:

$$n = \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 2 S^2}{(X1 - X2)^2}$$

Siendo n= el número de repeticiones a efectuar en cada investigación

$$Z_{\alpha/2} = 1.96 \text{ para } \alpha = 0.05$$

$$Z_{\beta} = 0.84 \text{ para } \beta = 0.20$$

$$S = 0.8 (X1 - X2)$$

n=10

Con estos datos se determinó una muestra de 10 observaciones para cada concentración del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* L. ``Achiote`` para *Candida albicans* ATCC 10231:

10 repeticiones colocándose a una concentración de 5%

10 repeticiones colocándose a una concentración de 25%

10 repeticiones colocándose a una concentración de 50%

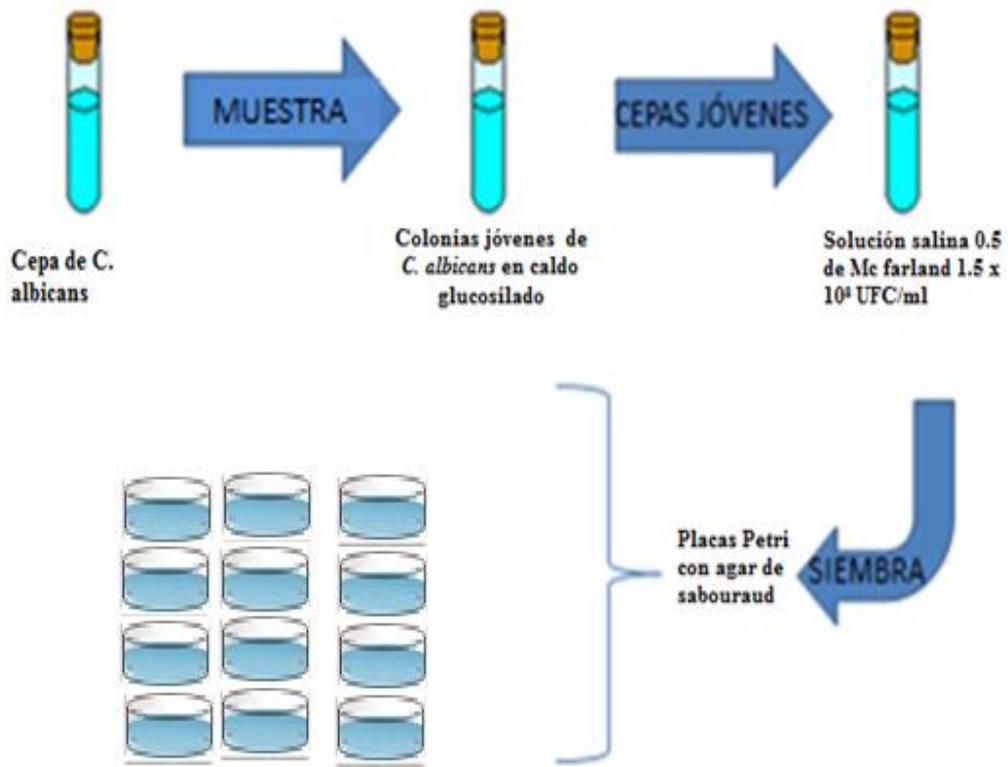
10 repeticiones colocándose a una concentración de 75%

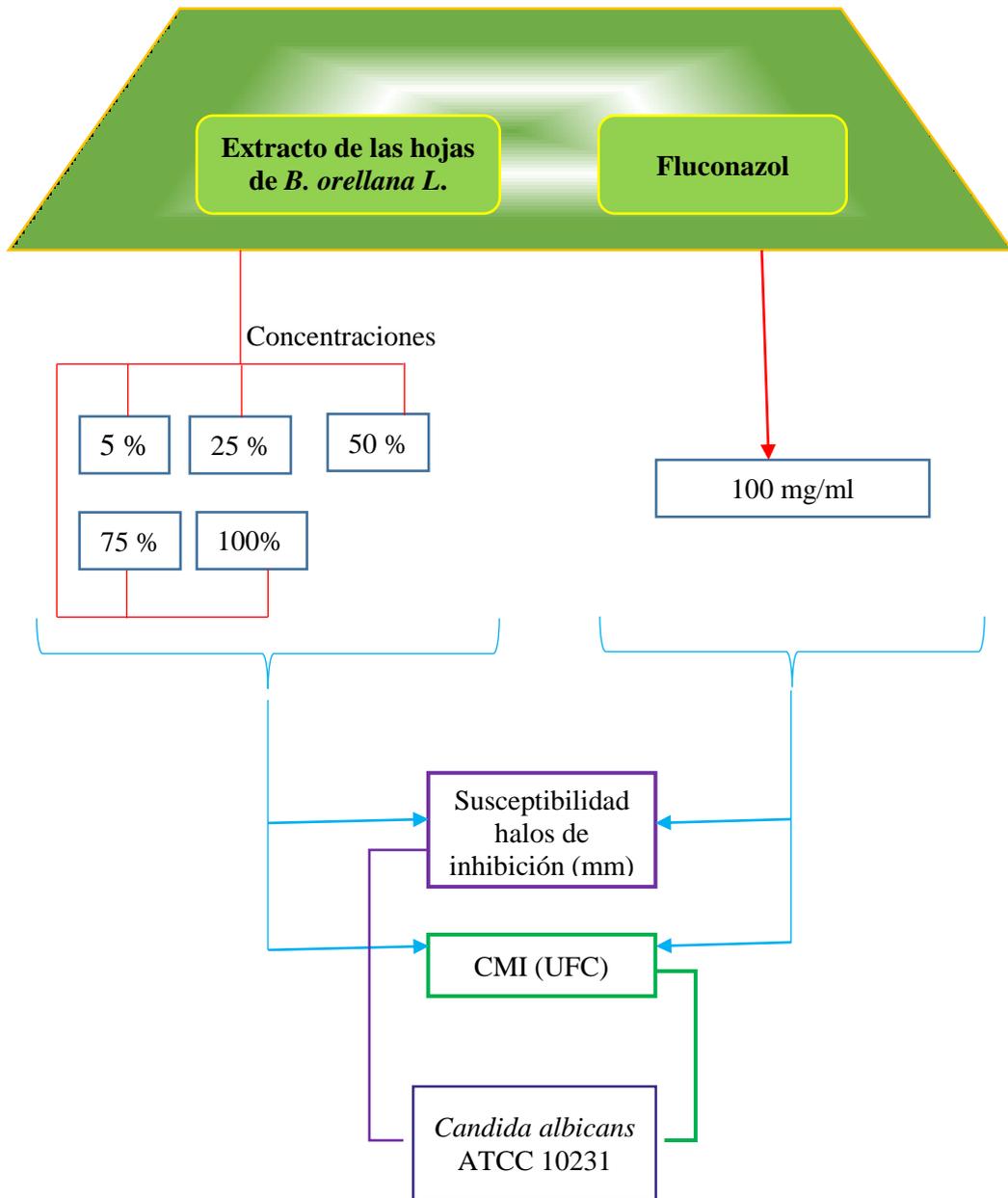
10 repeticiones colocándose a una concentración de 100%

2.3. Diseño de estudio

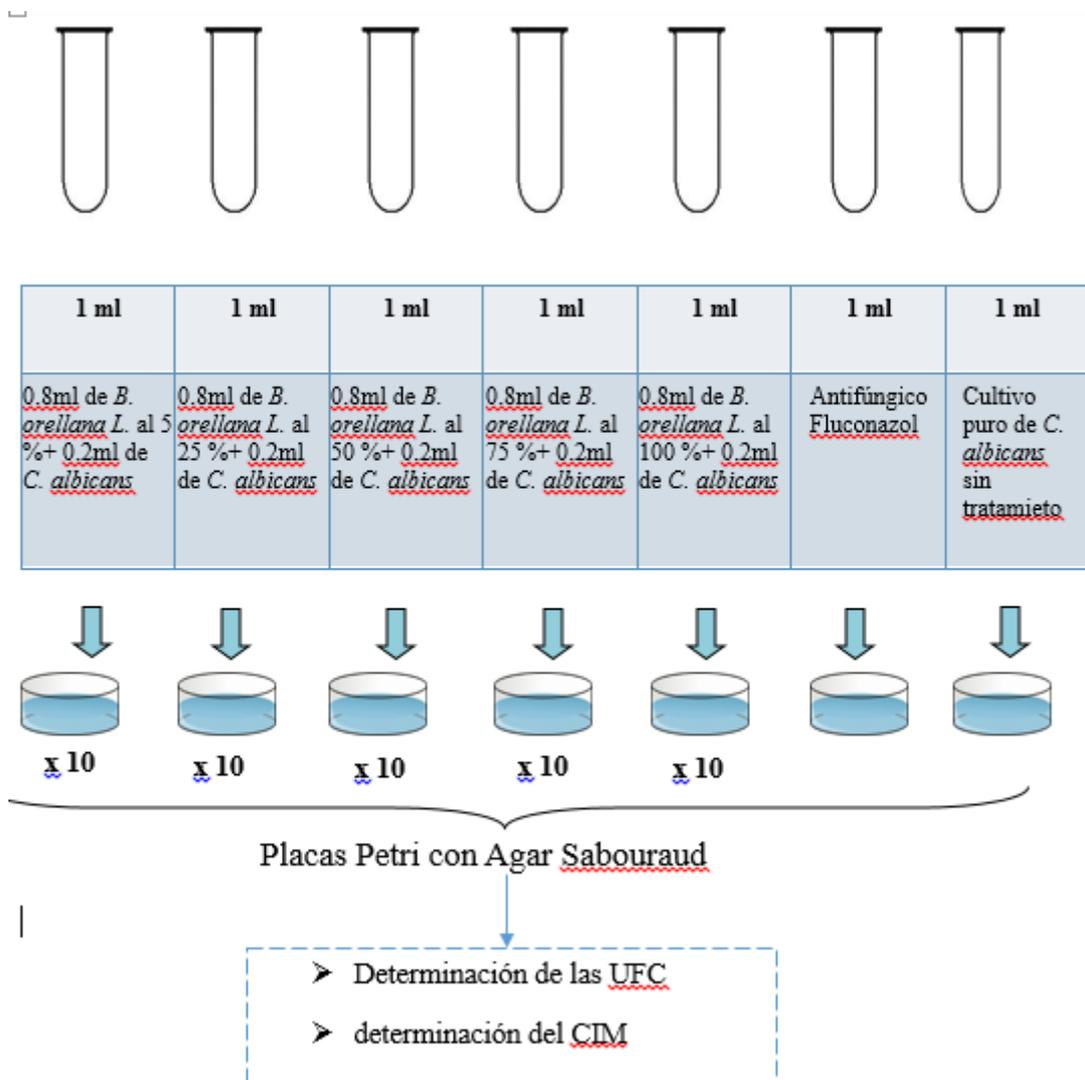
❖ Tipo de estudio

El presente estudio correspondió a un diseño experimental.





DETERMINACIÓN DE LA CMI



2.4. Variables y escalas de medición

	VARIABLES	TIPO	ESCALA DE MEDICIÓN	INDICADOR
Variable Independiente	Extracto etanólico de las hojas de <i>Bixa orellana</i> L. “Achiote”	Cualitativa	Nominal	Concentraciones al 5%, 25%, 50%, 75%, 100% del extracto acuoso.
Variable Dependiente	Efecto antifúngico in vitro sobre <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Cuantitativo	De razón	Unidades formadoras de colonias (UFC)
		Cuantitativo	De razón	Diámetro del halo de inhibición Según escala de Duraffourd.

2.5. Definiciones de Variables Operacionales:

2.5.1. Variable Independiente:

Extracto con olor característico, obtenido a partir de las hojas de *Bixa orellana* L. “Achiote” por maceración en contacto con etanol, seguida de la eliminación de dicho solvente por un procedimiento físico, contiene los principios activos de las hojas.

2.5.2. Variable dependiente:

❖ **Efecto antifúngico in vitro:** Capacidad para evitar la reproducción o producir la muerte del microorganismo en condiciones experimentales, determinado luego de medir el crecimiento del microorganismo mediante la longitud del diámetro del halo de inhibición (diámetro del papel filtro=6mm, por ello se considerará inhibición valores mayores a 6mm) y el conteo de unidades formadoras de colonias.

❖ **Halo de Inhibición:** Zona alrededor del disco donde una sustancia antimicrobiana es capaz de impedir el crecimiento del microorganismo al cabo de 18 a 24 horas de incubación. Se utilizará como medida los diámetros de estas zonas en mm según la escala de Duraffourd y cuantitativamente según la CMI.

❖ **Concentración mínima inhibitoria (CMI):**

Concentración mínima del extracto etanólico que es capaz de impedir el crecimiento fúngico in vitro en condiciones normales. Se midió mediante el conteo de las UFC, considerándose como CMI a la menor concentración en la cual no se observaron UFC. Este método nos ofrece información sobre la sensibilidad de los microorganismos S (sensible), I (intermedio) y R (resistente). Se puede realizar mediante:

Difusión en agar: Disco placa y E test

Dilución: Medio sólido y Medio líquido (micro/macrodilución)

Mecanizados y Automatizados

❖ **Escala de Duraffourd:** Escala utilizada para determinar cualitativamente el efecto inhibitorio in vitro, según diámetro de inhibición.³⁴

- Nula (-) para un diámetro inferior a 8 mm.
- Sensibilidad límite (sensible = +) para un diámetro comprendido entre 8 a 14 mm.
- Medio (muy sensible = ++) para un diámetro entre 14 y 20 mm.

- Sumamente sensible (+++) para un diámetro superior a 20 mm.

2.6. Procedimiento

2.6.1. Aprobación del proyecto:

Para la realización del presente estudio de investigación se obtuvo el permiso para la ejecución mediante la aprobación del proyecto por el Comité permanente de Investigación Científica de la Escuela de Medicina de la Universidad Privada Antenor Orrego a través de la Resolución Del Decanato.

2.6.2. Recolección de la muestra:

2 kilos de hojas frescas de *Bixa orellana L.* fueron recolectados en la localidad de Quillabamba, Provincia de La Convención en el Departamento del Cusco ubicada a 1050 m.s.n.m.

2.6.3. Preparación del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana L.*:

La preparación del extracto etanólico se realizó en el Laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo.

❖ Tratamiento del material vegetal:

1. Selección: Se seleccionaron las hojas en buen estado, eliminándose todas aquellas que estuvieron con manchas, con signos de ataque de insectos y hongos o deterioradas.³⁵

2. Lavado y secado: Las hojas seleccionadas fueron lavadas con agua destilada estéril, y luego fueron extendidas sobre papel Kraft y oreadas a temperatura

ambiente durante 24 horas. Trascurrido este tiempo se llevaron a la estufa a temperatura de 40°C durante 24 horas.

3. Pulverización y tamización: Una vez secadas las hojas, se pulverizaron con ayuda de un mortero. Luego se pasaron a través de un tamiz N° 22, obteniéndose partículas moderadamente gruesas, que se conservaron en frascos de boca ancha de color ámbar debidamente rotulado.

Obtención del extracto etanólico de *Bixa orellana* L.

❖ Maceración

En un recipiente de vidrio de boca ancha y de color ámbar, se colocaron 100 g de polvo moderadamente grueso. Luego se añadieron 1000 mL de etanol a 70°GL (*Gay-Lussac*), dejándose macerar en ausencia de luz y a temperatura ambiente por 7 días, agitándose manualmente durante 10 minutos 2 veces al día. El macerado se filtró con papel filtro Whatman N° 1 y el filtrado se evaporó en un rotavapor (Heidolph WB 2000) a presión reducida y temperatura controlada, no mayor a 50°C. Finalmente, el extracto se colocó en cápsulas de porcelana y se llevó a secar a la estufa a 40 °C.³⁶ A partir del extracto seco se prepararon las concentraciones 5%, 25%, 50%, 75% y 100% disueltas en etanol a 70°GL. Luego cada concentración del extracto fueron esterilizadas por filtración con membrana, usando filtros Millipore de 0.44 µm y 0.22 µm.³⁷ Finalmente, las concentraciones preparadas, del extracto etanólico, se colocaron en viales ámbar de 10 mL y fueron almacenadas a 4°C hasta su posterior utilización.

2.6.3. Obtención de la cepa

La cepa de *Candida albicans* ATCC 10231 fue obtenida del Laboratorio GenLab del Perú SAC- Lima y conservada en el cepario del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo.

2.6.4. Preparación de la cepa

Una vez obtenida la cepa, ésta fue reactivada en tubos de ensayo con tapa rosca en medio Agar Sabouraud dextrosa 4% a 25°C por 48 horas para *Candida albicans* ATCC 10231.

2.6.5. Preparación del inóculo

La cepa de *Candida albicans* ATCC 10231 se diluyó en caldo glucosado hasta obtener una suspensión semejante a la turbidez del tubo N° 0,5 del nefelómetro de MacFarland, que corresponde a $1,5 \times 10^8$ UFC/ml

2.6.6. Sembrado

Con un hisopo estéril, el cual fue embebido en el tubo del cultivo preparado y a una distancia de 10 cm de la llama de un mechero, se sembró en placas Petri conteniendo agar Sabouraud para *Candida albicans* ATCC 10231, hisopando uniformemente sobre toda la superficie del agar y girando cada placa 30°C por 10 veces aproximadamente.

2.6.7. Determinar el efecto inhibitorio (prueba de susceptibilidad)

Para la prueba de susceptibilidad se prepararon 5 diluciones del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* L. las concentraciones de 5%, 25%, 50%, 75% y 100%. Dichas diluciones se conservaron a 4°C para el estudio microbiológico.

Luego de realizar el sembrado de la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231 en placas Petri, se realizó la prueba de susceptibilidad utilizando el método de Difusión en Discos o método de Kirby-Bauer. Se prepararon discos de papel filtro estériles sumergiéndolos dentro de cada una de las concentraciones de extracto etanólico; y después, con aguja estéril fueron colocados sobre los cultivos de *Candida albicans* ATCC 10231 en las placas Petri preparadas previamente. Se utilizaron como grupos controles el fluconazol y suero fisiológico estéril. Posteriormente las placas se incubaron a 37°C durante 48 horas.

La siembra de los microorganismos fue para cada una de las concentraciones del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* L. Los valores que se obtuvieron se compararon con los respectivos grupos controles.

Finalmente la lectura se llevó a cabo a las 48 horas. Luego de la cual se midieron los halos de inhibición (susceptibilidad) de cada una de las concentraciones, incluyendo el área del disco de papel de filtro, con una regla milimetrada, procediéndose de igual manera con ambos controles. La lectura de los halos de inhibición producidos se midió en milímetros, teniendo en cuenta la escala de Duraffourd.

2.6.8. Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Se prepararon seis tubos de ensayo cinco de los cuales fueron para las concentraciones de 5% (50 mg/ml) , 25% (250 mg/ml), 50% (500 mg/ml), 75% (750 mg/ml) y 100% (1000 mg/ml), a los cuales, se añadieron 0.8 mL de cada concentración, luego se realizó la inoculación de 0,2 mL del hongo (en concentraciones semejantes al tubo 0.5 de la escala de Mac Farland); el sexto tubo correspondió al control con fluconazol, se añadió 0.8 ml de fluconazol y 0.2 ml del hongo y un tubo con cultivo de *C. albicans* sin tratamiento. Después los tubos

fueron incubados a 37°C por 48 horas. Posteriormente, se determinaron las cuentas viables sembrando 0.1ml de solución de cada uno de los tubos en 10 placas con agar Sabouraud por cada concentración y grupos controles, utilizando el asa de Driglasky para dispersar la muestra; dichas placas se colocaron en la estufa por 48 horas a 37°C y luego se observó el crecimiento del microorganismo mediante el conteo de unidades formadoras de colonias, considerándose como CMI a la menor concentración en la cual no se observaron UFC. Todo el procedimiento se llevó a cabo dentro del diámetro de 10 cm de la llama de un mechero.³⁷

Los resultados obtenidos fueron registrados en las fichas de recolección de datos (Anexo 1 y 2) para su posterior análisis.

2.7. Procesamiento, análisis e interpretación de la información.

Los datos obtenidos fueron procesados con el soporte del paquete estadístico SPSS 20.0

❖ **Estadística descriptiva:** Para analizar la información se construyeron tablas de frecuencias de una entrada con sus valores absolutos. Se calculó su media y su desviación estándar.

❖ **Estadística Analítica:** Para determinar el efecto inhibitorio de cada tipo de solución se hizo un análisis de varianza de un diseño completamente aleatorizado, el cual tuvo como objetivo básico la comparación de las medias de más de dos poblaciones. Es decir en el ANOVA se compararon siempre las medias de varias poblaciones, el cual se hizo a través de un contraste de hipótesis, además también se analizaron las diferencias de medias que hay entre las muestras, y también, se analizó el tamaño de muestra.

Luego se utilizó la prueba de Duncan para comparaciones múltiples, este es un test que permitió comparar las medias de los niveles de un factor después de haber rechazado la hipótesis nula de igualdad de medias mediante la técnica ANOVA. Este test trabaja con un umbral cambiante, el cual dependerá del número de medias implicadas en la comparación. Para determinar el número de medias implicadas en la comparación se ordenaron las medias muestrales de menor a mayor y así al hacer una comparación entre dos medias sabremos además, cuantas medias quedan dentro. Para la comparación de medias se usó parámetro p de este umbral, ambos con un nivel de significancia del 95%.

2.8. Aspectos éticos:

Con respecto a la ética, por realizarse el trabajo de investigación in vitro, no hay incumplimiento de normas éticas. Sin embargo en el presente trabajo se respetó el principio ético adoptado en el capítulo 6 del código de ética del Colegio Médico del Perú titulado: “Del trabajo de investigación”, específicamente el 6 Art. 48°, donde habla de la veracidad en la publicación de los resultados obtenidos en el estudio. Así mismo, se tuvo en cuenta los principios de bioseguridad correspondiente a trabajos in vitro.³⁸

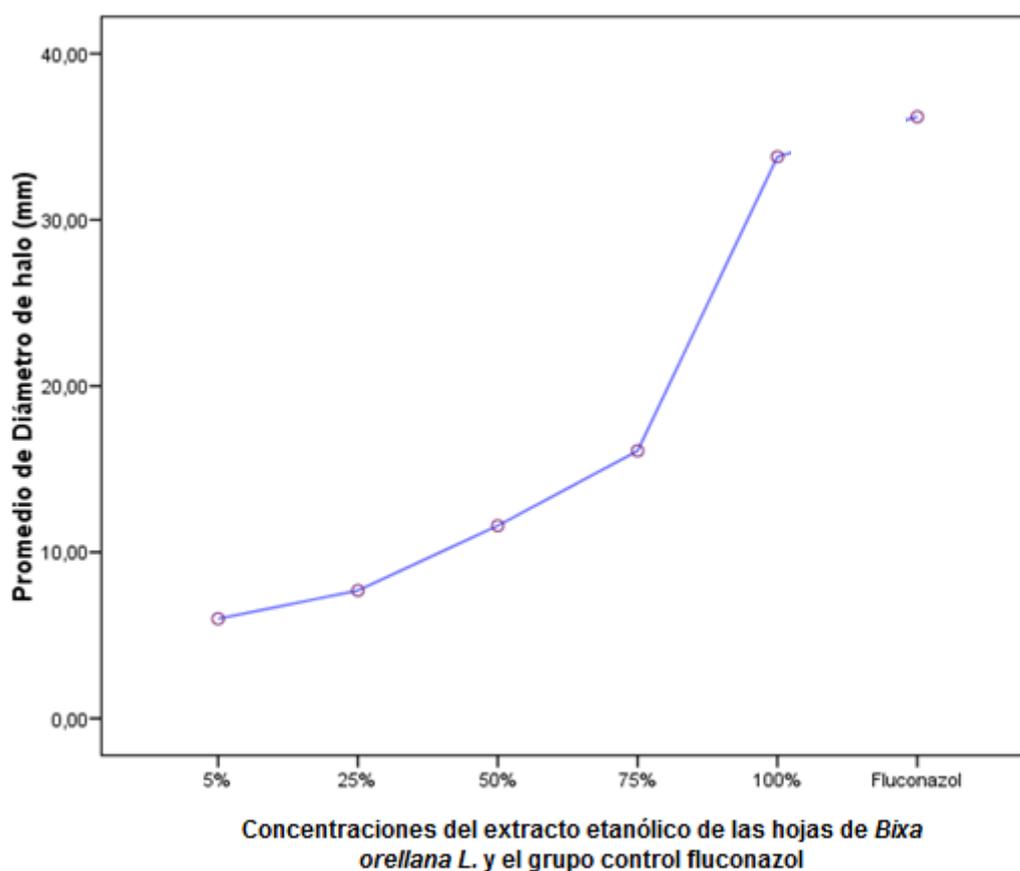
III. RESULTADOS

TABLA N° 1: Diámetro promedio de halo del efecto antifúngico a diferentes concentraciones del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana L.* y del fluconazol sobre la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231.

Concentraciones del Extracto etanólico de <i>Bixa orellana L.</i>	ni	Promedio	Desv. Est.
5%	10	6.0	0.67
25%	10	7.7	0.67
50%	10	11.6	1.07
75%	10	16.1	1.97
100%	10	33.8	4.26
Grupo Control			
Fluconazol	10	36.2	3.19

Fuente: Datos obtenidos por la investigadora, año 2015

GRAFICO 01. Promedio de efecto antifúngico del fluconazol y las diferentes concentraciones del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana L.* sobre la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231



Fuente: Datos obtenidos por el grupo investigador, año 2015.

Se observa que el efecto inhibitorio está en relación directa con la concentración del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana L.*, es decir conforme aumenta la concentración, también aumenta el diámetro de halo de inhibición. Así mismo con el uso de fluconazol se halló el mayor diámetro de halo de inhibición.

TABLA N° 2: Análisis de varianza del efecto antifúngico a diferentes concentraciones del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana L.* y el fluconazol sobre la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231

FV	SC	GL	CM	F	P
Tratamientos	8,736.13	5	1,747.227	305.74	0.000
Error	308.60	54	5.715		
Total	9,044.73	59			

Fuente: Datos obtenidos por el grupo investigador año2015

Esta tabla muestra que existe diferencia significativa entre el efecto antifúngico in vitro de las diferentes concentraciones del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana L.* y del fluconazol sobre el crecimiento de *Cándida albicans* ATCC 10231 , dado que el valor de P de la tabla de análisis de varianza es menor que 0.05 indica que es altamente significativa.

TABLA N°03: Comparaciones múltiples del efecto antifúngico a las diferentes concentraciones del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana L.* y el fluconazol sobre la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231. Mediante la prueba de DUNCAN

Concentraciones del Extracto etanólico de <i>Bixa orellana L.</i>	ni	Grupos para Alfa = 0.05				
		G1	G2	G3	G4	G5
5%	10	6.0				
25%	10	7.7				
50%	10		11.6			
75%	10			16.1		
100%	10				33.8	
Fluconazol	10					36.2

Fuente: Datos obtenidos por el grupo investigador año 2015

Esta tabla muestra que existen cinco grupos significativamente diferentes sobre el crecimiento de *Candida albicans* ATCC 10231: un primer grupo conformado por las concentraciones de 5% y 25% siendo ambas semejantes entre sí por no presentar efecto antifúngico, es a partir de la concentración de 50% que se observa efecto antifúngico, mientras que a la concentración de 100% se asemeja a la efectividad con el Gold estándar de los antifúngicos que es el fluconazol. Estos grupos son estadísticamente diferentes entre sí a un nivel de significancia de 0.05.

TABLA N°5: Número de unidades formadoras de colonias (UFC) de *Candida albicans* ATCC 10231 en función de cinco concentraciones del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* L. “Achiote” y del Fluconazol.

Repeticiones	Concentración del extracto etanólico de <i>Bixa orellana</i> L. “Achiote”					Control Positivo	Control Negativo
	5%	25%	50%	75%	100%	Fluconazol	
Medida 1 (UFC)	0	0	0	0	0	0	10 ⁸ cel/ml
Medida 2 (UFC)	0	0	0	0	0	0	10 ⁸ cel/ml
Medida 3 (UFC)	0	0	0	0	0	0	10 ⁶ cel/ml
Medida 4 (UFC)	0	0	0	0	0	0	10 ⁷ cel/ml
Medida 5 (UFC)	0	0	0	0	0	0	10 ⁷ cel/ml
Medida 6 (UFC)	0	0	0	0	0	0	10 ⁸ cel/ml
Medida 7 (UFC)	0	0	0	0	0	0	10 ⁵ cel/ml
Medida 8 (UFC)	0	0	0	0	0	0	10 ⁸ cel/ml
Medida 9 (UFC)	0	0	0	0	0	0	10 ⁷ cel/ml
Medida 10 (UFC)	0	0	0	0	0	0	10 ⁸ cel/ml
Promedio	0	0	0	0	0	0	10⁸ cel/ml

Fuente: Datos obtenidos por el grupo investigador, año 2015.

Se puede apreciar que no hay unidades formadoras de colonias promedio de *Candida albicans* ATCC 10231 en ninguna de las 5 concentraciones de extracto etanólico de *Bixa orellana* L.; así como tampoco con el fármaco utilizado como control, el fluconazol

Tabla N° 6: Análisis de varianza para evaluar los bloques (cepa *Candida albicans* ATCC 10231) y los tratamientos (actividad inhibitoria del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana L.* y actividad inhibitoria de Fluconazol)

<i>FV</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
TRATAMIENTOS	0	5	0	---	----
ERROR	0	54	0		
Total	0	59			

Fuente: Datos obtenidos por el grupo investigador, año 2015.

En esta tabla se muestra que no existe una diferencia estadística significativa en el crecimiento de UFC de *Candida albicans* ATCC 10231 de acuerdo a la concentración del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana L.* “Achiote”. y actividad inhibitoria de Fluconazol, dado que el valor P de la tabla (P = infinito) es mayor que 0,05.

IV. DISCUSIÓN

Según la Organización Mundial de Salud, la medicina tradicional comprende a las prácticas, los enfoques, los conocimientos y las creencias sanitarias diversas que incorporan medicinas basadas en plantas; en animales o minerales; y en ejercicios aplicados de forma individual, o en combinación, para mantener el bienestar, además de tratar, diagnosticar y prevenir las enfermedades.³⁹

El empleo de las plantas y sus frutos con fines terapéuticos es una práctica que se ha realizado desde el origen de la humanidad y actualmente es enorme la difusión y popularidad de las terapias vegetales en el mundo. De esta forma, el uso de las especies vegetales medicinales que se ha venido haciendo en forma empírica y basada en la tradición tiene hoy una base científica.⁴⁰⁻⁴²

El año 2007 se realizó una cumbre internacional organizada por el Colegio Médico del Perú, conocida como La Declaración de Lima, la cual reconoce la importancia de la medicina tradicional y recomienda su armonización y articulación con los sistemas de salud oficiales de cada país.⁴³ La medicina occidental y tradicional no son excluyentes sino que coexisten dependiendo de la disponibilidad de los servicios de salud.⁴⁴

En este contexto podemos referirnos a numerosos estudios sobre los extractos etanólicos, en los cuales se destaca su gran utilidad en diversas actividades biológicas tales como antioxidantes, antiinflamatorios, analgésico, antibacteriano y antifúngico. Esta última actividad es la que cobra gran importancia debido al aumento del número de pacientes inmunodeprimidos y el incremento de la agresividad de las técnicas diagnósticas y terapéuticas que han hecho crecer la población susceptible de sufrir alguna infección fúngica oportunista, siendo el agente más común *Candida albicans*,

que puede causar infecciones en la superficie cutánea (intertrigo de grandes pliegues, erosión interdigital, candidiasis del pañal), y mucosas (infección oral o muguet, esofagitis, , vulvovaginitis y balanitis). Las infecciones fúngicas sistémicas y dérmicas son la causa de gran morbi-mortalidad en este tipo de pacientes, siendo las dermatomicosis un problema serio para niños de las naciones del tercer mundo como una consecuencia del deficiente cuidado sanitario.⁴⁵ Los fármacos disponibles actualmente tienen una toxicidad importante, producen recurrencia o causan resistencia, razón por la cual se está procurando el uso de nuevos antifúngicas más potentes pero sobretodo más seguros que los existentes.⁴⁶

El Perú, un país con gran diversidad de especies vegetales, el tema ha sido trabajado mediante varios estudios de etnobotánica realizados en poblaciones diversas, aun así, muchas permanecen desconocidas en el ámbito terapéutico.⁴⁷ Entre las cuales tenemos a *Bixa orellana* L. “Achiote”, Conocido por su uso en la industria alimentaria. Pero poco estudiada sobre su actividad antifúngica.

La presente investigación demostró la actividad antifúngica del extracto etanólico de *Bixa orellana* L. “Achiote” frente a *Candida albicans* ATCC 10231 utilizando el método de Kirby y Bauer (difusión en disco) y determinando la concentración mínima inhibitoria.

La actividad antimicrobiana de *Bixa orellana* L. “Achiote”, se puede explicar por el gran contenido de compuestos glucósidos flavonicos, taninos, y terpenoides. Aunque los mecanismos mediante los cuales la producen no están bien esclarecidos, algunos estudios hacen mención sobre la actividad antifúngica de los flavonoides, podría darse por la inhibición de la conversión dimórfica mediante dos mecanismos: el primero sería inhibiendo la generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) durante la formación del tubo germinativo, ya que los EROs juegan un rol durante la

invasión e infección de los tejidos, en la formación del tubo germinal y crecimiento de las hifas; se ha demostrado que existe una estrecha correlación entre la formación del tubo germinal y el incremento de la adherencia de *C. albicans* a las células epiteliales de la mucosa, por lo que se ha sugerido desde entonces que este pudiera ser uno de los mecanismos relacionados con la virulencia por parte de las especies de *Candida albicans*; el otro mecanismo sería inhibiendo la degradación del glutatión, principal regulador no enzimático del equilibrio redox intracelular; durante la elongación de las hifas.^{48,49}

En el presente estudio se encontró que el extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* L. “Achiote”, tuvo efecto inhibitorio in vitro frente a *Candida albicans* ATCC 10231, Como se observa en la Tabla N ° 1 se presentan de manera descriptiva las 10 observaciones registradas para cada una de las 5 concentraciones evaluadas del extracto etanólico de *Bixa orellana* L. “Achiote” y del antimicótico de referencia que correspondió al efecto del fluconazol; se expresaron en términos del diámetro en milímetros del halo de inhibición, en función de estos valores se determinaron los correspondientes promedios como cifra representativa de cada concentración del extracto y del fungicida; tomando en cuenta la asignación cualitativa categorizando el halo a través de los valores de corte de la Escala de Duraffourd, observando un efecto que se incrementa de manera directamente proporcional al incremento de la concentración del preparado es así que a concentraciones de 5% y 25% el halo de inhibición es nulo por tener un diámetro promedio de 6 mm en el primer caso y 7.7 mm en el segundo; mientras que al 50% (500 mg/ml) el diámetro promedio es de 11.6 ± 1.07 estableciendo un grado de sensibilidad limite; a partir de la concentración de 75% se alcanza el efecto in vitro de sensibilidad media por presentar halo de inhibición promedio de 16.1 ± 1.97 mm, mientras que a concentraciones del 100% se

obtiene un efecto in vitro de suma sensibilidad, la cual es semejante al efecto in vitro que consigue el fluconazol puesto que solo con estas 2 exposiciones se alcanzaron halos de inhibición mayores a 20 mm en las 10 repeticiones con un promedio de 33.8 ± 4.26 mm y 36.2 ± 3.19 mm.

En relación a los referentes previos observamos cierta coincidencia con los hallados en el estudio realizado.

En el Grafico N°01, se observa que el efecto inhibitorio está en relación directa con la concentración del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* L. “Achiote”, a mayor concentración, mayor diámetro de halo de inhibición. Así mismo con el uso de fluconazol se halló el mayor diámetro de halo de inhibición.

Para comprobar si existía diferencia entre los promedios de las cinco concentraciones como se observa en la Tabla N°02 se verifica mediante el análisis de Varianza la cual indica que las cinco concentraciones utilizadas si tuvieron una diferencia dosis dependiente debido que los grupos mostraron tener diferencias altamente significativas ($p < 0.00$)

En la Tabla N°03 la prueba de comparaciones múltiples Duncan respectivamente la comparación de los efectos fungicidas expresados como una medida de los promedios en los halos de inhibición, en este sentido la tendencia observada condiciona 5 categorías: el primer grupo conformado por las concentraciones de 5% y 25%, las cuales no tienen diferencia significativa entre sí ni efecto inhibitorio, por otro lado el efecto inhibitorio mínimo se da a partir del segundo grupo perteneciente a la concentración de 50 %, así mismo a concentraciones de 100% se logra un efecto semejante mas no igual que el grupo control con fluconazol, el cual es mínimamente superior. Tras esta valoración analítica es posible precisar a partir de que concentración es que se empieza a obtener el efecto anti fúngico

esperado y por lo tanto la concentración que tendría relevancia para su aplicación en la práctica clínica diaria.

En la Tabla N°04 se expone de manera descriptiva las observaciones, en esta ocasión respecto a las unidades formadoras de colonias de *Candida albicans* ATCC 10231 registradas con las 6 exposiciones en estudio; en este sentido se observa una distribución homogénea en el sentido de no registrar crecimiento de colonias con ninguna de las 5 concentraciones del extracto y evidentemente tampoco con la exposición al fluconazol, el grupo control de *Candida albicans* ATCC 10231, sin tratamiento confirmó el efecto de *Bixa orellana* L. “Achiote”, ya que el resultado fue de 10^8 Cel./ml. Esta información se complementa en la Tabla N° 6 con el análisis de varianza respectivo tras el cual se puede concluir que la concentración inhibitoria mínima del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* corresponde al 5%; y en términos de este criterio se le puede asignar a esta preparación un efecto in vitro similar al observado para el fluconazol. Cabe aclarar que la razón entre la discordancia entre la ausencia de UFC en una concentración de 5 % y el efecto inhibitorio mínimo que se da a partir del 50%, podría ser debido a que el extracto de *Bixa orellana* L. no difunde con facilidad con la técnica de dilución en placa.

Tomamos en cuenta también las conclusiones a las que llegaron Braga y **Cols. En Brasil** quienes estudiaron 20 plantas usadas en la medicina tradicional brasileña por su actividad antifúngica; entre los 20 extractos metanólicos ensayados; se incluyó a *Bixa orellana* el cual en esta serie; evidenció la mejor actividad contra *Criptococcus neoformans* con una concentración inhibitoria mínima de 0.078 mg/ml; valor que corresponde a una concentración baja del extracto; lo cual resulta coincidente con nuestros hallazgos puesto que evidenciamos que fue la concentración al 5% la que fue suficiente para alcanzar esta denominación ³²

V. CONCLUSIONES

1. El extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* L. “Achiote” tiene efecto antifúngico in vitro sobre *Candida albicans* ATCC 10231, el cual está en relación a la concentración utilizada.
2. La concentración inhibitoria mínima para *Candida albicans* ATCC 10231 por parte del extracto etanólico de las hojas de *Bixa orellana* L. “Achiote” fue al 5%.

VI. RECOMENDACIONES

1. Dada la importancia de precisar las asociaciones definidas en la presente investigación; se recomienda la realización de nuevos estudios experimentales, para otro tipo de hongos y otros microorganismos.
2. Utilizar concentraciones menores al 5%, para estudios posteriores
3. Realizar estudios in vivo en animales de laboratorio con infecciones fúngicas experimentales.
4. Sería conveniente desarrollar la intervención experimental aleatorizada en el contexto clínico de interés; con la aplicación del preparado en pacientes.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arenas R. *Micología Médica Ilustrada*, 4ª ed., México, Mc GrawHill 2011; pp. 221-241
2. Arenas R., Torres Guerrero E, Vásquez del Mercado E. Infecciones por *Candida* spp en un hospital de segundo nivel: datos clínico-epidemiológicos y tipificación. *Dermatología CMQ* 2014;12(1):18-23
3. Moyes DL, Naglik JR. Mucosal Immunity and *Candida albicans* Infection. *Clin Dev Immunol.* 2011 9:1-9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3137974/>
4. Gow NA, van de Veerdonk FL, Brown AJ, Netea MG. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol.* 2011; 10(2):112-22. URL:
5. Kim J, Sudbery P. *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. *J Microbiol.* 2011; 49(2):171-7.
6. Brooks Geo F.; Butel Janet S.; Morse Stephen A.; *Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg.* Manual moderno editorial, 16a edición; México DF. Santa Fe de Bogota. Pág. 742 – 750
7. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence.* 2013; 4(2): 119–128.
8. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. *Microbiología Médica.* 6ta edición. España: Elsevier; 2009.

9. Estela Castrillón Rivera LE., Palma Ramos A., Padilla Desgarenes C. Factores de virulencia en *Candida* sp. *Dermatología Rev Mex* 2005;49:12-27
10. Gavaldà J, Ruiz I. Recomendaciones para el tratamiento de la infección fúngica invasiva por *Candida* spp. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2003; 21 (9):498-508.
11. Fortún J, Carratalá J, Gavaldá J, Lizasoain M, Salavert M, De la Cámara R. Recomendaciones sobre el tratamiento de la enfermedad fúngica invasiva por *Aspergillus* spp. y otros hongos filamentosos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011; 29 (6):435-454.
12. Zacchino S. Estratégias para a descoberta de novos agentes antifúngicos. En: Yunes and Calixto eds. *Plantas como fontes de novos medicamentos*. SC, Brasil: Grifos (Ed); 2001.
13. Taniguchi S., Imayoshi Y., Hatano T. Yazaki K., Yoshida T. Hydrolysable Tannin Production in *Oenothera tetrapetala* Shoot Tissue Culture. *Plant Biotechnology* 2002; 19(5): 357-363.
14. Soria R. Estudio farmacobotánico de *Oenothera multicaulis* R&P. Tesis de Maestría en Recursos Vegetales y Terapéuticos - UNMSM, Lima, 1988.
15. Termentzi A, Fokialakis N, Skaltsounis AL. Natural resins and bioactive natural products thereof as potential antimicrobial agents. *Curr Pharm Des*. 2011;17(13):1267-90.
16. Di Santo R. Natural products as antifungal agents against clinically relevant pathogens. *Nat Prod Rep*. 2010; 27(7):1084-98.

17. Mostacero LJ., Mejía CF., Gamarra TO. Taxonomía de las fanerógamas útiles del Perú. Concytec. Trujillo – Perú. 2002; 1 (2):1323p
18. Gentry AH. 1993. A field guide to the families and genera of woody plants of Northwest South America (Colombia, Ecuador, Perú). Washington, DC. 1993
19. Vásquez MR, Rojas GR del P. 2000. Plantas vasculares del amazonas peruano; clave de identificación botánica de las fanerógamas amazónicas. Jardín Botánico de Missouri, USA.
20. Alarco de Zabria A. Perú, el libro de las plantas mágicas. CONCYTEC. Lima, 2000. 2:311 pp.
21. Cartaya O., Reynaldo I. Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. Cultivos Tropicales. 2001; 22(2):5-14.

<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193215009001>
22. Ramírez T. Evaluación de la Actividad Hipoglicémica del Extracto Acuoso de las Hojas de Bixa Orellana “Achiote” [Tesis]. Ayacucho (Perú): Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2001. p 23-26, 29-31
23. Araújo Vilar D., Suênia de Araujo Vilar M., Nervo Raffin F., Rosa de Oliveira M., Flamarion de Oliveira C. Traditional Uses, Chemical Constituents, and Biological Activities of Bixa orellana L. The Scientific World Journal. 2014 (2014):11. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/857292>
24. Toledo de Oliveira T., Nagem T., Rocha da Costa M., Marciano da Costa L., Magalães L., Stringheta E. Biological properties of natural dyes. Ars Pharmaceutica. 2004;45(1):5-20

25. Reddy MK, Alexander-Lindo RL, Nair MG. Relative inhibition of lipid peroxidation, cyclooxygenase enzymes, and human tumor cell proliferation by natural food colors. *J Agric Food Chem.* 2005;53(23):9268-73.
26. Huamán O, Sandoval M, Arnao I, Béjar E. Efecto antiulceroso del extracto hidroalcohólico liofilizado de hojas de *Bixa orellana* (achiote), en ratas. *An fac med.* 2009;70(2):97-102.
27. Montes Belmont R., Cruz Cruz V., Martínez Martínez G., Sandoval García G., García Licona R., Zilch Domínguez S, et al. Propiedades Antifúngicas en Plantas Superiores: Análisis Retrospectivo. *Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C.* 2000:18 (2):125- 131.: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61218210>
28. Rojas, J., Ochoa, V., Ocampo, S., Muñoz, J. Detección de la actividad antimicrobiana de 10 plantas medicinales utilizados en la medicina folclórica de Colombia: Una posible alternativa en el tratamiento de las infecciones nosocomiales. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2006; 6: 2-2
29. Braga FG, Bouzada ML, Fabri RL, Matos MO, Moreira FO, Scio E, Coimbra ES Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *J Ethnopharmacol.* 2007; 111(2):396–402
30. Shilpi JA, Taufiq-Ur-Rahman M, Uddin SJ, Alam MS, Sadhu SK, Seidel V. Preliminary Pharmacological Screening of *Bixa orellana* L. Leaves. *J Ethnopharmacol.* 2006 Nov 24; 108(2):264-71. Epub 2006 Jun 12
31. Silva H, Alvarado R, Hidalgo J, Cerruti T, Dávila W, Mestanza M. Instituto de Medicina Tradicional- *Bixa orellana* L. *IMET-IPSS.* 1998 (2):12-20.
32. Zegarra L, Vaisberg A, Loza C, Aguirre RL, Campos M, Fernandez I, Talla O. et al. Double-blind randomized placebo-controlled study of *Bixa orellana* in

- patients with lower urinary tract symptoms associated to benign prostatic hyperplasia. *Int Braz J Urol.* 2007;33(4):493-500.
33. Otero R, Núñez V, Barona J, Fonnegra R, Jiménez SL, Osorio RG, et al. Snakebites and Ethnobotany in the Northwest Region of Colombia. Part III: Neutralization of the Haemorrhagic Effect of *Bothrops atrox* venom. *J Ethnopharmacol.* 2000; 73(1-2):233-41.
 34. Duraffourd C, D'Hervicourt, LLapraz J. Cuaderno de Fitoterapia Clínica. Barcelona: Masson, 1987.
 35. Miranda M. Métodos de Análisis de Drogas y Extractos. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad Habana de Cuba.2002.
 36. Sharapin N, *et al.* Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. SECAB CYTED.2000.pág. 27-31
 37. Koneman E, Allen S, Dowell V, Janda W, Sommers H, Winn W. Konemam Diagnóstico Microbiológico. 3ª ed. Buenos aires: Médica Panamericana; 2008.
 38. Colegio Médico del Perú. Código de Ética y Deontología. Lima [Perú]: CMP; 2007.
 39. Organización Mundial de la Salud. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005. Ginebra: OMS; 2002.
 40. Maureen H, Garcia B, Rojo D, Olivares D. Almendro de la India: Potencial biológico valioso. *Rev Cubana Invest Biomed* 2003; 22(1): 41-7.
 41. Guerra M, C. Mayra Rodríguez Jorge, Gastón García Simón y Celia Llerena Rangel, “Actividad antimicrobiana del aceite esencial y crema de *Cymbopogon*

- citratus (DC). Stapf', Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos, Rev Cubana Plant Med 2004; 9(2).
42. Araujo J, Ramsés A. Actividad Antimicrobiana de Plantas. Rev Perú 2008; 6(1): 6-7.
 43. Primera Cumbre Mundial de Armonización de Medicina Tradicional, Alternativa y Complementaria, Lima, Perú, 2007. Acta Med Per. 2008;25(2):123--4.
 44. 7. Mathez-Stiefel SL, Vandebroek I, Rist S. Can Andean medicine coexist with biomedical healthcare? A comparison of two rural communities in Peru and Bolivia. J Ethnobiol Ethnomed. 2012;24;8:26
 45. Navarro García V.M., Gonzalez A., Fuentes M., Aviles M., Rios M.Y, Zepeda G., Antifungal activities of nine traditional Mexican medicinal plants. J Ethnopharmacol. 2003; 87(1): 85–88
 46. Ruiz JR, Roque M. Actividad antimicrobiana de cuatro plantas del Nor-orientе peruano. Ciencia e Investigación UNMSM 2009; 12(1): 41-47.
 47. Bussmann RW, Sharon D, Vandebroek I, Jones A, Revene Z. Health for sale: the medicinal plant markets in Trujillo and Chiclayo, Northern Peru. J Ethnobiol Ethnomed. 2007;3:37.
 48. Kanwal Q, Hussain I, Latif H, Javaid A. Antifungal activity of flavonoids isolated from mango (*Mangifera indica* L.) leaves. Nat prod resch 2010;24(20):1907-14.
 49. Candiracci M, Citterio B, Piatti E. Antifungal activity of the honey flavonoid extract against *Candida albicans*. Food Chemistry 2012; 131: 493–99.

ANEXOS

ANEXO N° 1

Tabla N° 1: Diámetro de halo de inhibición de *Candida albicans* ATCC 10231 en función de cinco diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Bixa orellana* L. “Achiote” y del Fluconazol

Número de repeticiones	Concentración del extracto etanólico de <i>Bixa orellana</i> L. “Achiote”					Control Positivo
	5%	25%	50%	75%	100%	Fluconazol
Halo 1 (mm)	6	7	11	16	30	40
Halo 2 (mm)	5	7	12	15	32	36
Halo 3 (mm)	6	8	12	20	36	40
Halo 4 (mm)	7	8	13	18	42	38
Halo 5 (mm)	6	8	10	15	30	38
Halo 6 (mm)	7	7	11	14	34	32
Halo 7 (mm)	6	9	12	14	32	32
Halo 8 (mm)	6	8	12	18	40	36
Halo 9 (mm)	5	7	10	16	30	38
Halo 10 (mm)	6	8	13	15	32	32

Fuente: Datos obtenidos por la investigadora, año 2015.

ANEXO N° 2

TABLA N°2: Número de unidades formadoras de Colonias (UFC) de *Candida albicans* ATCC 10231 en función de cinco concentraciones del extracto etanólico de *Bixa orellana* L. “Achiote” y del Fluconazol.

Repeticiones	Concentración del extracto etanólico de <i>Bixa orellana</i> L. “Achiote”					Control Positivo	Control Negativo
	5%	25%	50%	75%	100%	Fluconazol	
Medida 1 (UFC)	0	0	0	0	0	0	10 ⁸ cel/ml
Medida 2 (UFC)	0	0	0	0	0	0	10 ⁸ cel/ml
Medida 3 (UFC)	0	0	0	0	0	0	10 ⁶ cel/ml
Medida 4 (UFC)	0	0	0	0	0	0	10 ⁷ cel/ml
Medida 5 (UFC)	0	0	0	0	0	0	10 ⁷ cel/ml
Medida 6 (UFC)	0	0	0	0	0	0	10 ⁸ cel/ml
Medida 7 (UFC)	0	0	0	0	0	0	10 ⁵ cel/ml
Medida 8 (UFC)	0	0	0	0	0	0	10 ⁸ cel/ml
Medida 9 (UFC)	0	0	0	0	0	0	10 ⁷ cel/ml
Medida 10 (UFC)	0	0	0	0	0	0	10 ⁸ cel/ml
Promedio	0	0	0	0	0	0	10⁸ cel/ml

Fuente: Datos obtenidos por la investigadora, año 2015.

ANEXO N° 3

IMÁGENES

Fotografía 1: Selección: de las hojas de *Bixa orellana* L. “Achiote”



Fotografía 2: Secado de las hojas en la estufa a 40°C



Fotografía 3: Molienda en mortero



Fotografía 4: hojas pulverizadas de *Bixa orellana* L. “Achiote”



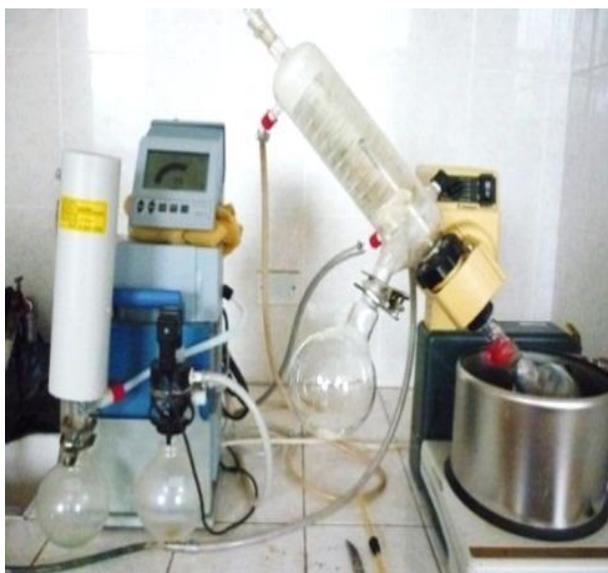
Fotografía 5: Filtración con papel Whatman N°1



Fotografía 6: Filtración de la muestra en el equipo de filtración al vacío.



Fotografía 7: Concentración del extracto etanólico en un equipo de rotavapor a una temperatura de 40°C



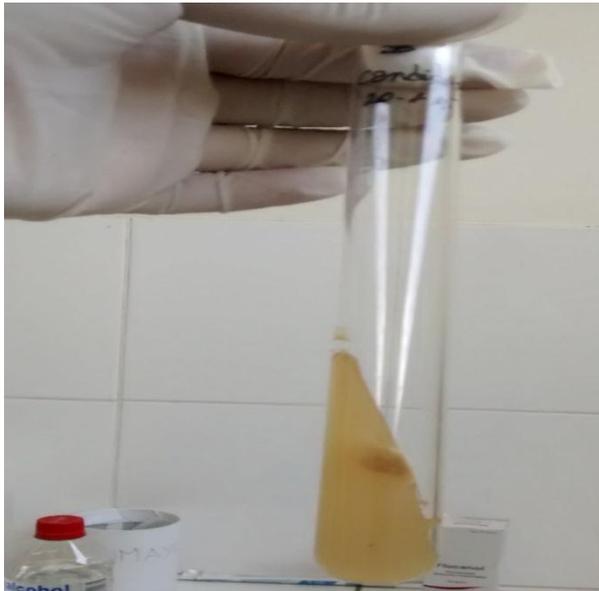
Fotografía 8: Concentraciones listas al 5%, 25%, 50%, 75% y 100% de *B. orellana* L. "Achiote"



ANEXO N°4

Preparación y sembrado

Fotografía 8: Cepa de *Candida albicans* ATCC 10231



Fotografía 9: Siembra de *Cándida albicans* ATCC 10231



Fotografía 10: Reactivación de inocuo en caldo glucosado



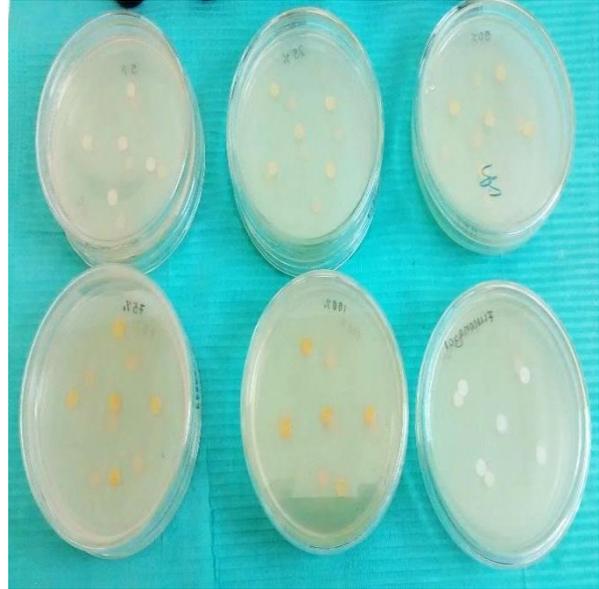
Fotografía 11: Comparación de la turbidez de Mac Farland y solución salina



Fotografía 12: Siembra de *Cándida albicans* ATCC 10231



Fotografía 13: Siembra de *Cándida albicans* ATCC 10231



ANEXO N°5

Fotografía 14: Preparación de las concentraciones de *B. orellana* L. "Achiote" o. para la determinación CIM



Fotografía 15: Inoculación de las concentraciones para determinación de la CIM



Fotografía 16: control de resultado de la CMI al 100% comparado con el grupo control de *C. albicans* ATCC 10231 sin

