

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO
FACULTAD DE MEDICINA HUMANA



EFECTO SINERGICO IN VITRO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Minthostachys mollis*
MÁS FLUCONAZOL SOBRE *Candida albicans* ATCC 10231

PROYECTO DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE MÉDICO CIRUJANO

AUTOR (A): NOMBRES Y APELLIDOS
JAUREGUI ROJAS, ANA SOFIA

ASESORA: DRA ELVA MEJIA DELGADO

Trujillo – Perú

2016

“EFECTO SINERGICO IN VITRO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Minthostachys mollis*
MÁS FLUCONAZOL SOBRE *Candida albicans* ATCC 10231”

MIEMBROS DEL JURADO

PRESIDENTE: DRA ELENA CÁCERES ANDONAIRE

SECRETARIO: DR MARCO ZARATE ARCE

VOCAL: DR VICTOR BARDALES ZUTA

FECHA DE SUSTENTACION: 14/03/17

PRESENTACION

Ante el inmenso conocimiento sobre *Candida albicans*, tanto teórica y clínicamente, sigue existiendo una gran morbilidad en diversas partes del mundo, pero a pesar de sus diversos tratamientos anti fúngicos, también existe la posibilidad de tratamientos naturales como una alternativa ó combinados con los antimicóticos convencionales.

Por lo que en este trabajo de tesis se busca determinar el efecto sinérgico in vitro del aceite esencial de *Minthostachy mollis* mas fluconazol sobre *Candida albicans* y ampliar el conocimiento de los efectos de la medicina natural.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo, en primer lugar a Dios
Por darme la fortaleza y sabiduría para realizar cada día
Esta ardua tarea que es la medicina.

A mis padres y hermana,
por brindarme su apoyo incondicional en toda mi
formación académica.

A mis amigos, especialmente a mi gran compañera Loli
por mostrar paciencia y gran ayuda incondicional
en mi vida profesional.

AGRADECIMIENTO

A mis docentes,

De la Universidad Privada Antenor Orrego

por brindarme su conocimiento

y su ayuda en mi formación como medico

A mi asesora,

Dra. Elva Mejía Delgado,

por haberme brindado su apoyo durante

el desarrollo de esta tesis

RESUMEN

Objetivo: Evaluar si hay efecto in vitro del aceite esencial de *Minthostachys mollis* “muña” más fluconazol sobre *Candida albicans*.

Material y métodos: Se llevó a cabo un estudio experimental, el cual se desarrolló en el laboratorio de Farmacología de la Universidad Nacional de Trujillo y el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo. Se preparó el aceite esencial *Minthostachys mollis* (muña) en 4 concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100% . Se utilizó el método de Kirby Bauer (difusión en disco) para evaluar la sensibilidad antimicótica y el efecto antimicótico y la concentración inhibitoria mediante la determinación de la concentración de Unidades Formadoras de Colonias (UFC). Se expuso la cepa de *Candida albicans* a las 4 concentraciones del aceite esencial de la muña, asimismo hubieron dos grupos control uno para Fluconazol y, otro con el inóculo de *Candida albicans* sin ningún tratamiento. Se realizaron 10 repeticiones para cada caso.

Resultados: Se determinó que existe diferencia estadística altamente significativa entre el efecto sinérgico antimicótico de las diferentes concentraciones del aceite esencial de *Minthostachys mollis* más fluconazol sobre el crecimiento de *Candida albicans* ($p < 0.001$), mediante los halos de inhibición según la escala de Duraffourd. La concentración inhibitoria se presentó en todas las concentraciones excepto en el control (fluconazol) en el que se obtuvo un crecimiento de 4.5×10^3 .

Conclusiones:

El aceite esencial de *Minthostachys mollis* “muña” más fluconazol si tiene efecto sinérgico in vitro frente a *Candida albicans* ATCC 10231

Palabras clave: Efecto sinérgico, *Minthostachys mollis*, Fluconazol, *Candida albicans*

ABSTRACT

Objective: Evaluate if exist effect in vitro of the essential oil of *Minthostachys mollis* "muña" plus fluconazole on *Candida albicans*.

Methods: An experimental study was carried out, which was carried out in the laboratory of Pharmacology of the National University of Trujillo and the Microbiology laboratory of the Faculty of Medicine of the National University of Trujillo. The essential oil *Minthostachys mollis* (muña) was prepared in 4 concentrations of 25%, 50%, 75% and 100%. The Kirby Bauer method (disc diffusion) was used to evaluate the antimycotic sensitivity and the antimycotic effect and the inhibitory concentration by determining the concentration of Colony Forming Units (CFU). The *Candida albicans* strain was exposed to the 4 concentrations of peppermint essential oil, there were also two control groups for Fluconazole and one with *Candida albicans* oil without any treatment. Ten replicates were performed for each case.

Results: It was determined that there is a statistically significant difference between the antifungal synergistic effect of the different concentrations of the essential oil of *Minthostachys mollis* plus fluconazole on the growth of *Candida albicans* ($p < 0.001$), by means of the inhibition halos according to the Duraffourd scale. The inhibitory concentration was present in all concentrations except control (fluconazole), in which a growth of 4.5×10^3 was obtained.

Conclusions:

The essential oil of *Minthostachys mollis* "muña" plus fluconazole if it has an in vitro synergistic effect against *Candida albicans*

Keywords: Synergistic effect, *Minthostachys mollis*, Fluconazole, *Candida albicans*

INDICE

I.- INTRODUCCION	09
1.1.- Marco Teórico	09
1.2.- Antecedentes	14
1.3.- Justificación	15
1.4.- Problema	15
1.5.- Hipótesis: Nula Y Alternativa	16
1.6.- Objetivos: Generales Y Específicos	16
II.- MATERIAL Y METODOS	16
2.1.- Población De Estudio	17
2.2.- Criterios de Selección: Inclusión y Exclusión	17
2.3.- Muestra	18
2.4.- Diseño De Estudio	19
2.5.- Variables y Operacionalización De Las Variables	20
2.6.- Procedimiento	22
2.7.- Técnicas e Instrumentos De Recolección De Datos	26
2.8.- Procesamiento y Análisis Estadístico	26
2.9.- Consideraciones Éticas	27
III.- RESULTADOS	28
IV.- DISCUSION	36
V.- CONCLUSIONES	40
VI.- RECOMENDACIONES	41
VII.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	42
VIII.- ANEXOS	46

I. INTRODUCCION

1.1 Marco Teórico:

Candida albicans se identificó en el siglo XIX, pero más investigaciones sobre su biología, y de otras levaduras patógenas, se hicieron a partir de la segunda mitad del siglo XX.¹ La infección en humanos fue descrita por primera vez como la candidiasis oral por Hipócrates en el siglo V antes de Cristo. En 1853, Charles Robin observó microscópicamente células y filamentos en los raspados epiteliales, y lo llamó *Oidium albicans*. Posteriormente, más de 160 sinónimos se utilizaron antes de que *Candida albicans* se convirtiera en el nombre aceptado para esta especie.²

Candida albicans, es el principal hongo patógeno de los seres humanos³ el cual, causa enfermedades en huéspedes comprometidos con procesos patológicos locales o sistémicos.⁴

Es un hongo comensal y que con frecuencia pertenece a la flora benigna de la piel y mucosas.⁵

Candida albicans es el agente causal más común en infecciones intrahospitalarias, ya que el 40% de los pacientes se han contaminado con cepas de *Candida* a través de catéteres produciendo fungemia con alta mortalidad⁶ siendo el responsable de aproximadamente el 60% de los casos de candidemia⁷. En los últimos 30 años se ha visto un notable incremento en la incidencia de candidiasis invasiva. Aunque globalmente *C. albicans* sigue siendo la especie más importante.⁸

La infección por *Candida albicans* es el resultado del sobrecrecimiento de microorganismos oportunistas cuando se suprime la microflora competitiva con antibióticos y otros factores⁹.

Candida albicans puede causar dos tipos principales de las infecciones en los seres humanos: infecciones superficiales, como la candidiasis oral o vaginal e infecciones sistémicas potencialmente mortales.¹⁰

La habilidad de *C. albicans* para crecer sobre superficies y formar biopelículas está asociada con su virulencia, porque es un comensal de mucosas y de la superficie intestinal que puede servir como fuente para infecciones invasivas.¹¹ *Candida albicans* en su fase de comensal se presenta como levadura; pero en su fase patógena se divide por gemación produciendo pseudohifas y micelio verdadero.¹²

El equilibrio entre la infección, la colonización y la eliminación depende de la capacidad de las cepas de *Candida* para modular la expresión de factores de virulencia en la respuesta a los cambios del medio ambiente, combinado con la competencia del sistema inmune del huésped. Para permitir la invasión a los tejidos del huésped, las cepas de *Candida* poseen constitutivamente enzimas hidrolíticas que destruyen o alteran los constituyentes de las membranas. Las enzimas secretadas por *C. albicans*, reflejan su grado de patogenicidad, siendo las principales enzimas las proteasas y fosfolipasas.¹³

La morfología de *C. albicans* es un determinante de virulencia, como la forma de sus hifas tiene un papel clave en el proceso de infección.¹⁴

Este microorganismo puede ser aislado desde la mucosa el tracto gastrointestinal, oral y vaginal, dando una infección llamada comúnmente candidiasis, caracterizada por manchas blancas que pueden ser eliminadas fácilmente y revela un área de inflamación en la membrana subyacente, conocida como pseudomembrana.¹⁵

El diagnóstico microbiológico de las infecciones por *Candida albicans* fundamentalmente se basa en el cultivo microbiológico. Sin embargo se han desarrollado técnicas alternativas como la detección de biomarcadores circulantes o ADN fúngico.¹⁶ El diagnóstico temprano permite realizar un tratamiento empírico adecuado en etapas tempranas de la enfermedad y esto genera una mayor posibilidad de afectar la alta mortalidad de esta patología.¹⁷

Aunque paralelamente al incremento en las infecciones por *Candida spp.* se han introducido nuevos agentes antifúngicos con un espectro antimicótico más amplio y mayor potencia anti fúngica, la alta proporción de fracasos terapéuticos, la aparición frecuente de efectos adversos o resistencias, son problemas crecientes que no han logrado resolverse hasta ahora.¹⁸

Para el tratamiento farmacológico de la candidiasis existen tres grandes grupos de agentes antimicóticos: polienos (nistatina y anfotericina), imidazoles (clotrimazol, miconazol y ketoconazol) y triazoles (fluconazol) siendo el fluconazol el más usado como alternativa terapéutica habitual en el tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas específicas.¹⁹

El fluconazol es un antifúngico de la familia de los triazoles, tiene una excelente eficacia ante diferentes especies de *Candida* y menor efectividad ante los hongos filamentosos²⁰ que se absorbe de forma rápida tras su administración y la disponibilidad para las células es elevada, por tener una baja tasa de unión a proteínas plasmáticas.²¹

Este derivado triazolico inhibe de forma selectiva a la enzima 14 alfa esterol demetilasa en la síntesis del ergosterol, que es dependiente del citocromo p450. La depleción del ergosterol, en conjunto con la acumulación de compuestos intermedios en la síntesis del mismo, conlleva a una pérdida de la funcionalidad de la membrana plasmática.²²

Se absorbe casi por completo en el tubo digestivo. Las concentraciones plasmáticas son básicamente las mismas aunque el fármaco se administre por vía oral o intravenosa y su disponibilidad no se altera con el alimento o la acidez gástrica. Las concentraciones plasmáticas son de 4 a 8 ug/ml. Su excreción renal es del 90% en un tiempo de 25 - 30 horas. Se difunde con facilidad a los líquidos corporales. Se une en un 11 a 12% a las proteínas plasmáticas.²³

La concentración mínima inhibitoria (CMI) de fluconazol para cepas sensibles \leq a 8mg/L; para cepas dosis dependientes entre 16 y 32 mg/L; y para cepas resistentes mayor o igual de 64mg/L. Sin embargo el EUCAST (*European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing*) recomienda en caso de *Candida albicans* \leq 2 mg/L para las cepas sensibles, 4 mg/L para las cepas dosis dependientes y $>$ 4 mg/L para las cepas resistentes.²⁴

En aproximadamente el 10% de los pacientes tratados con fluconazol se produce diarrea, náuseas/vómitos, y dolor abdominal, no siendo necesario el retiro del fármaco. Además se ha asociado a teratogénesis en el embarazo, cuando se usa en el primer trimestre y en dosis altas.²⁵

Existen además interacciones farmacológicas, clínicas o potencialmente importantes entre fluconazol y los hipoglucemiantes orales, anticoagulantes de tipo cumarina, fenitoína, ciclosporina, rifampicina, teofilina, terfenadina, cisaprida, astemizol. Este triazol causa interacciones medicamentosas clínicamente importantes a través de sus efectos sobre las enzimas humanas del citocromo P450.²⁶

Actualmente, muchas propiedades terapéuticas de diversas plantas han sido demostradas científicamente con diversas acciones biológicas en base a la extracción de sus principios activos. La *Minthostachys mollis* (muña) que

crece entre los 2500 y 3500 msnm en la sierra del Perú, tiene una variedad de propiedades usadas en la medicina tradicional.

Es un arbusto perenne que crece en la región andina; es ampliamente utilizada por las comunidades rurales donde es valorado por sus propiedades medicinales.²⁷

Son flores pequeñas, blancas, irregulares o zigomorfas. Esta planta herbácea de 0,5 m de altura, con hojas pubescentes aromáticas y blancas espigas de flores, tiene un olor tipo menta.²⁸ Se encuentran reunidas en pseudo verticilos axilares, formados por cuatro pequeñas cimas, brevemente pedunculadas, dos en cada axila y situadas en la parte superior de las ramas.²⁹ Se desarrolla en suelos arenosos, ricos en materia orgánica, bien drenados, con buena retención de humedad, con un pH entre 5-8 y un clima con elevada luminosidad, florece en época de lluvia, se multiplica por semilla y por codo.³⁰

Es usado como digestivo, antihelmíntico, antidiarreico y en el tratamiento de infecciones del tracto respiratorio y urinario. Además, se ha demostrado su efecto antibacteriano e insecticida.⁷

Los aceites esenciales de muña, son una fuente importante de compuestos químicos con actividad antioxidante los cuales tienen efecto favorable en la conservación de alimentos y en la salud humana. El aceite esencial de muña representa una mayor fuente de compuestos fenólicos principalmente de isomentona, pulegona y timol y mostraría una mayor actividad antioxidante.¹⁰

Este tipo de aceite esencial tiene un aspecto líquido oleoso, transparente, color ligeramente amarillo, olor fuerte, agradable, sabor picante. Es inmiscible en agua, ligeramente miscible en alcohol al 70%, miscible en éter, cloroformo y tetracloruro de carbono.²³

1.2 Antecedentes

Alcalá-Marcos y cols 2011 demostraron el efecto antimicótico del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* en comparación con el fluconazol en cultivo de *Candida albicans*, utilizando un estudio experimental, el cual midió 80 halos de inhibición distribuidos en 5 grupos, los cuales fueron el grupo de muña (GM) al 25%, grupo muña al 50%, grupo muña al 100%, un grupo control positivo (fluconazol) y un grupo control negativo (aceite mineral). Los resultados mostraron que la mediana de los halos de inhibición de GM25% fue de 32,00 mm; para GM50% de 40,00 mm, GM100% 46,80 mm; y del grupo control por fluconazol fue de 39,00 mm. Existió diferencia significativa entre la mediana del grupo muña 100% y grupo muña 25% con respecto al grupo Fluconazol ($p < 0,001$), mas no entre este último y el grupo muña 50% ($p > 0,05$) Finalmente, se concluyó que el aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (al 100%) tuvo mayor efecto antimicótico (contra *Candida albicans*) que el Fluconazol; además, el efecto antimicótico del Fluconazol fue mayor que la *Minthostachys mollis* al 25%, y fue el mismo que la *Minthostachys mollis* al 50%.²⁶

1.3 Justificación:

A pesar del conocimiento previo sobre *Candida albicans*, y por el aumento de la morbimortalidad, existen numerosos medicamentos antifúngicos, la mayoría de los cuales produce efectos colaterales y *Candida albicans* muestra resistencia, es por ello que los estudios se dirigen hacia el uso de productos naturales, que presenten propiedades farmacológicas, lo que motiva a realizar el presente estudio para conocer el efecto antimicótico de *Minthostachys mollis*. Las plantas han sido utilizadas desde tiempos muy remotos por diversas culturas y se han difundido en los últimos siglos entre diferentes países para beneficio de la humanidad

El presente proyecto pretende conocer a *Minthostachys mollis* ; a nivel teórico y su factibilidad como antifúngico, colaborando en el ámbito clínico con un estudio posterior “in vivo”, pudiendo ser utilizada como un adyuvante en el tratamiento de enfermedades causadas por *Candida albicans*. Por lo que se quiere evaluar el efecto del fluconazol asociado al aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis*, conocida como muña, la que podría contribuir a una nueva alternativa terapéutica, de menor costo y mayor eficacia, comparado con la monoterapia de fluconazol en cultivos in vitro de *Candida albicans*.

1.4 Formulación del Problema Científico:

¿Hay efecto sinérgico in vitro del aceite esencial de *Minthostachys mollis* con el fluconazol sobre *Candida albicans*?

1.5 Hipótesis

H0: No existe efecto sinérgico in vitro del aceite esencial de *Minthostachys mollis* más fluconazol sobre *Candida albicans* ATCC 10231

H1: Existe efecto sinérgico in vitro del aceite esencial de *Minthostachys mollis* más fluconazol sobre *Candida albicans* ATCC 10231

1.6 Objetivos

General:

- Evaluar el efecto sinérgico in vitro del aceite esencial de *Minthostachys mollis* “muña” más fluconazol sobre *Candida albicans*

Específicos:

- Determinar el efecto sinérgico antimicótico in vitro del aceite esencial de *Minthostachys mollis* al 25, 50, 75, 100% más fluconazol sobre *Candida albicans* mediante la susceptibilidad (Kirby Bauer)
- Medir la concentración de *Minthostachys mollis* más fluconazol con mayor efecto sinérgico sobre *Candida albicans*, mediante el conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC)

II..MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Poblaciones

Población Diana o Universo

Cepa de *Candida albicans* ATCC 10231

Población de Estudio

Especie de *Candida albicans* obtenidas del laboratorio de la sección de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo

2.2 Criterios de Selección

Criterios de Inclusión:

- Placas Petri conteniendo el aceite esencial de *Minthosstachys mollis* en Agar Sabouraud y *Candida albicans*, sometido a proceso de esterilización previo.
- Placas Petri con un mismo tamaño, sin diferencias entre ellas

Criterios de Exclusión.

- Placas petri conteniendo aceite esencial de *Minthosstachys mollis* en Agar Sabouraud y *Candida albicans*, que presente algún tipo de daño o rajadura en su estructura durante el proceso de esterilización.
- Placas petri conteniendo el aceite esencial de *Minthosstachys mollis* en Agar Sabouraud y *Candida albicans* cuyo resultado en el proceso de esterilización pueda ser dudoso.

Criterios de eliminación:

- Placa Petri conteniendo el aceite esencial de *Minthosstachys mollis* en Agar Sabouraud y *Candida albicans* que sufran deterioro o contaminación durante la conservación y los procedimientos que no permitan su medición posterior

2.3 Muestra

Unidad de análisis:

La unidad de análisis lo constituyen los halos de inhibición producto del efecto sinérgico del aceite de las diferentes concentraciones de *Minthostachys mollis* y fluconazol; sobre cepas de *Candida albicans*

Unidad de muestreo:

Unidades formadoras de colonias de *Candida albicans*, producto del efecto sinérgico del aceite de *Minthostachys mollis* y fluconazol

Fórmula para el tamaño de la muestra:

Para determinar el tamaño de la muestra se usó la formula de comparación de grupos:

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

Dónde:

n = Número de repeticiones en cada uno de los grupos

$Z\alpha/2 = 1.96$ para una confianza del 95%

$Z\beta = 0.84$ para una potencia del 80%

$S = 0.8 (X_1 - X_2)$ valor assumido por no haber estudios similares

Reemplazando valores:

$$n = \frac{(1,96 + 0,84)^2 2(0,80)^2 (X_1 - X_2)}{(X_1 - X_2)}$$

$$n = 10$$

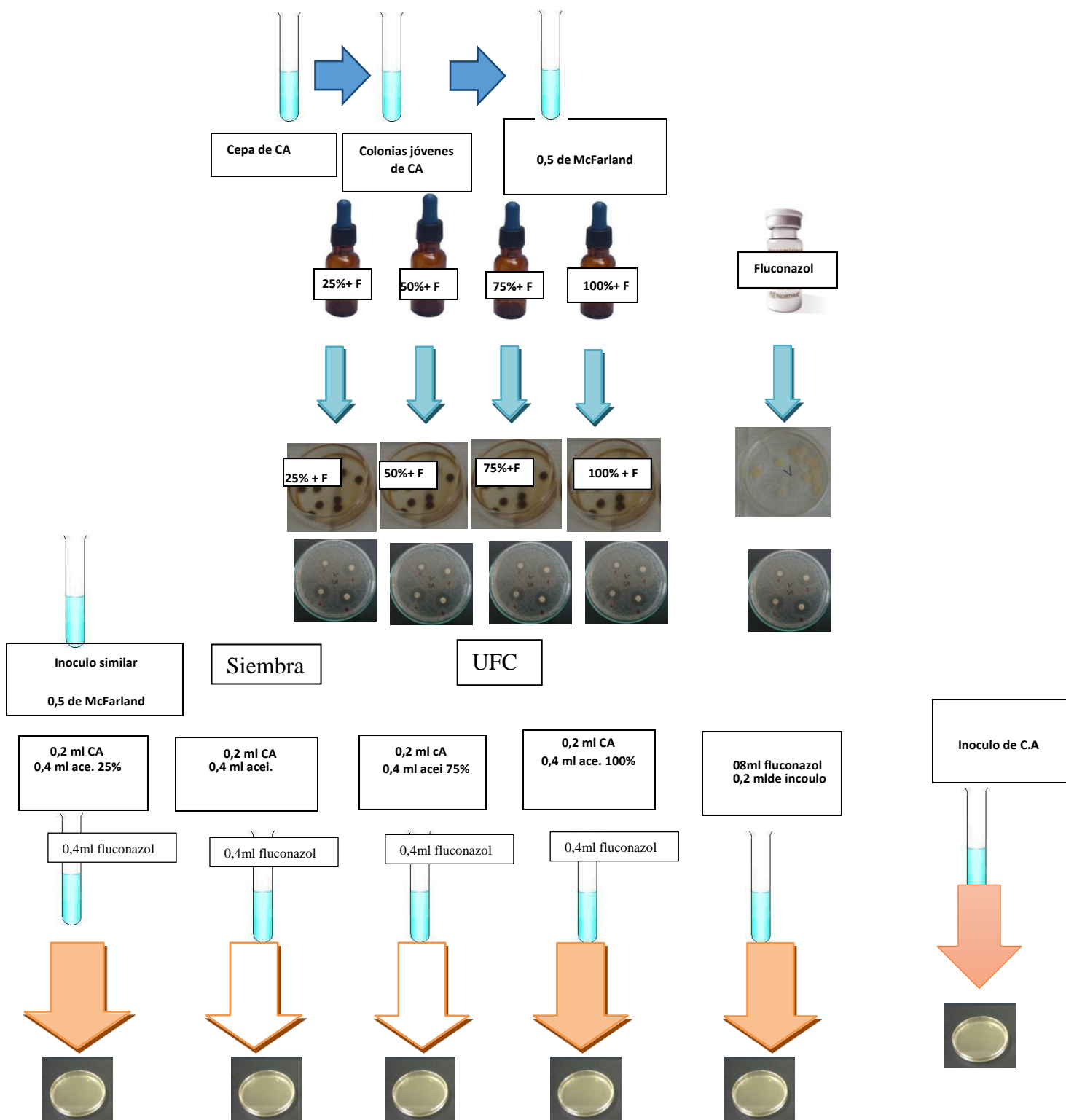
Luego la muestra esta conformada por las 10 repeticiones para cada una de las concentraciones

2.4 DISEÑO DEL ESTUDIO

Tipo de estudio.-: Experimental, comparativo

Diseño específico:

C. albicans (CA)



2.5 Variables y Operacionalizacion de Variables

Independiente: Aceite esencial de *Minthostachys mollis* mas fluconazol

Dependiente: Efecto sinérgico antimicótico in vitro sobre *Candida albicans*

Operacionalizacion de Variables

VARIABLE	TIPO DE VARIABLE	ESCALA	INDICADOR	INDICE
<i>Minthostachys mollis</i>	Independiente Cualitativa	Nominal	Concentraciones	25%, 50% 75% 100% del aceite esencial
Fluconazol	Independiente Cualitativa	Nominal	2mg/ml	
Efecto sinérgico antimicótico in vitro de <i>Minthostachys mollis</i> y fluconazol sobre <i>Candida albicans</i>	Dependiente Cuantitativa	Razón	Diámetro de halos de inhibición UFC	Kirby Bauer (mm)

Definiciones operacionales.-

1. **Aceite esencial de *Minthostachys mollis*** : liquido de color verde amarillento, con olor aromático al mentol, con sabor picante- fresco no persistente, que se obtiene de la destilación por arrastre de vapor de hojas.(32)
2. **Efecto antimicótico in vitro:** capacidad para evitar el crecimiento de una cepa fúngica o producir la muerte en condiciones experimentales.(34)

Susceptibilidad antimicótica: Calidad de ser más vulnerable de lo normal frente a un tratamiento antimicótico (33)

Diámetro inhibitorio: halo translúcido detectado alrededor del disco, en la que no se observa el crecimiento del agente fúngico, incluye el diámetro del disco. Se mide en milímetros, según la escala de Duraffourd y cuantitativamente según la concentración inhibitoria mínima.(35)

Escala de Duraffourd: Escala utilizada para determinar cuantitativamente el efecto inhibitorio in vitro según el diámetro de inhibición. (36)

- Nula (-) para un diámetro inferior a 8mm
- Sensibilidad limite (sensible= +) para un diámetro entre 8 y 14
- Medio (muy sensible = ++) para un diámetro entre 14 y 20
- Sumamente sensible (+++) para un diámetro superior a 20mm

2.6 PROCEDIMIENTOS:

Recolección de la muestra.

10 Kg de la especie vegetal de muña fue recolectada en el mes de Febrero en el Distrito de Huaraz, Provincia de Huaraz, .región de Ancash. Asimismo un ejemplar completo fue llevado al Museo de Historia Natural y Cultural de la Universidad Privada Antenor Orrego para su identificación taxonómica.

Preparación de la muestra

Selección y lavado: Los 10 kg de muña fueron transportadas al laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo, a cargo de la Químico Farmacéutico Marilú Soto ,en donde se seleccionó solamente las hojas que estén en buenas condiciones y se eliminaron las sustancias extrañas presentes en la muestra vegetal. Luego se precedió a lavar el material vegetal con agua destilada, seguido de una desinfección, utilizando hipoclorito de sodio al 0.5 %. Posteriormente se realizó un enjuague de las hojas con agua destilada estéril, esto es para retirar los residuos de hipoclorito(37)

Extracción del aceite esencial

La obtención del aceite se realizó por el método de “destilación por arrastre de vapor de agua” (convencional) el cual permite un buen rendimiento.

El aceite esencial fue extraído a partir de las hojas frescas, previamente cortadas en partes pequeñas, se colocó en un balón de fondo plano y se la sometió a una corriente de vapor de agua sobrecalentada; de esta manera se arrastró la esencia que posteriormente por acción del refrigerante, será condensada. El producto destilado se separó tomando en cuenta sus propiedades de inmiscibilidad y diferencia de densidades entre el agua y el aceite esencial, utilizando una pera de separación de vidrio, se filtró, guardándose en un frasco de vidrio color ámbar (para evitar la

descomposición por la luz) y bajo refrigeración a una temperatura de 4 °C.
(37)

Determinación del rendimiento de aceite esencial

La determinación del porcentaje de rendimiento del aceite esencial (%RAE), se realizó por el método de arrastre de vapor de agua en un equipo de destilación de acero inoxidable. A partir de 10 kg de hojas de *Minthostachys mollis*(muña), se obtuvo un determinado volumen que fue medido con una probeta florentino. Por el método gravimétrico-volumétrico se determinó el %RAE, aplicando la siguiente fórmula (37).

$$\%RAE = \text{Vol. AE (mL)} / \text{P muestra (g)} \times 100$$

Dónde:

Vol. AE : Volumen del aceite esencial obtenido en mililitros.

P :Muestra: Peso de la muestra a destilar en gramos.

Preparación de las diferentes concentraciones del aceite esencial

Las concentraciones se prepararán según el siguiente cuadro:

Volumen de aceite esencial	Tween 80	Volumen final	Concentración (%)
0.75 mL	2.25 mL	3 mL	25
1.5 mL	1.5 mL	3 mL	50
2.25 mL	0.75 mL	3 mL	75
3 mL	-	3 mL	100

Luego, se colocó cada una de las concentraciones en frascos de vidrio de color ámbar estéril, para protegerlas de la luz, llevándolas posteriormente a refrigeración de 4 a 8 °C, hasta la realización del análisis microbiológico

Obtención de la cepa

La cepa de *Candida albicans* se obtuvo del cepario del Laboratorio de la Universidad Nacional de Trujillo.

Preparación de la cepa e inóculo

Una vez obtenidas la cepa, se cultivaron en tubos de ensayo con tapa rosca, las cuales contuvo el Agar Sabouraud y dextrosa 4% para *Candida albicans*, se incubó a 37°C con el fin de obtener colonias jóvenes. Luego de 24 horas, se tomó una muestra del cultivo con el asa bacteriológica y se preparó una suspensión con solución salina estéril a partir de las colonias jóvenes hasta alcanzar una turbidez semejante al estándar 0.5 de Mac Farland (1.5×10^8 UFC/ml), esta comparación se llevó a cabo visualmente utilizando un fondo blanco y fuente de luz adecuada. El tubo conteniendo la bacteria fue girado entre las manos durante 30 segundos, antes de proceder al sembrado.(36)

Sembrado

La siembra se realizó utilizando un hisopo estéril, el cual fue embebido en el tubo de cada cepa y a una distancia de 10 cm de la llama del mechero. Las placas recién sembradas se colocaron dentro de una estufa a 37°C de Temperatura durante 24 horas. (36)

Determinación del efecto sinérgico antimicótico

Para la prueba de susceptibilidad, se utilizó el método de Kirby y Bauer (difusión de discos). Por lo que se prepararon 4 diluciones a las concentraciones de 100%, 50%, 75% y 25%. Se utilizaron discos de papel de filtro Whatman N°4, de 6 mm de diámetro, los cuales fueron embebidos con 0,4ml en las concentraciones mencionadas del aceite de *Minthostachys mollis* más 0,4ml de fluconazol, luego con una aguja

estéril se colocaron sobre los cultivos de *Candida albicans* en las placas petri previamente preparadas. Cada placa petri contuvo el agar respectivo para la cepa y sobre ellas se colocaron los discos con las 4 concentraciones de aceite esencial mas fluconazol y para el disco del antibiótico control de *Candida albicans* se utilizó fluconazol (medicamento de menor resistencia en el medio). Posteriormente las placas se incubaron a 37° C en la estufa por 24 horas.(36)

La lectura se llevó a cabo a las 24 horas. Se midieron los halos de inhibición (susceptibilidad) de cada concentración y cada agente, incluyendo el área del disco de papel filtro con una regla milimetrada.

Determinación de las Unidades Formadoras de Colonias UCF/mL

Con el inóculo preparado anteriormente, se empezó a sembrar en las placas Petri con las concentraciones de 25 %, 50%, 75% y 100 % de aceite esencial *Minthostachys mollis* mas fluconazol (04ml para cada uno) y como control se sembraron cepas de *Candida albicans* con tratamiento y sin éste , luego se incubó en la estufa a 37°C . La lectura se hizo dentro de 24 horas.

Se realizó el conteo de UFC empleando la siguiente formula.⁴²

$$UFC= N/4 \times A \times D$$

Donde

N= número de colonias

A=área

D= dilución

Los resultados obtenidos fueron registrados en las fichas de recolección de datos para su análisis.

2.7 Técnica de Recolección de datos:

Se realizó a través de la observación y la información recolectada, se registró en una ficha confeccionada especialmente para el presente trabajo. (Anexo N° 1 y 2).

2.8 Procesamiento y Análisis estadístico

En el presente trabajo de investigación, se utilizó las tablas estadísticas de resumen, así como gráficos estadísticos para presentar los resultados de la investigación.

La comparación de los resultados obtenidos en la investigación se realizó mediante la prueba de análisis de varianza (ANOVA), considerando un nivel de significancia de 0.05. Posteriormente se utilizó la prueba de Duncan, para determinar diferencias significativas entre pares de grupos considerando significativo si $p < 0.05$.

Todos los datos fueron procesados de manera automatizada con el soporte del paquete estadístico SPSS 23.

2.9. CONSIDERACIONES ÉTICAS

El presente proyecto de investigación se llevó a cabo teniendo en cuenta los pilares bioéticos médicos básicos: Autonomía, justicia, beneficencia, no maleficiencia.

La declaración de Helsinki, adoptada por la 18^o Asamblea Médica Mundial en Helsinki, Finlandia, Junio 1964 y modificada por la Asamblea Médica Mundial en Tokio, enero 2004 como que todo proyecto de investigación biomédica en seres humanos debe ir precedido de una minuciosa evaluación de los riesgos predecibles en comparación con los beneficios previsibles para el participante o para otros. La preocupación por el interés del individuo debe siempre prevalecer sobre los intereses de la ciencia y de la sociedad. Con el debido protocolo de seguridad según la OMS en la protección del personal técnico del laboratorio. (38)

También se tomó en cuenta el artículo 15 de la Declaración Universal sobre Bioética y Derechos Humanos, el cual señala que de toda investigación científica y sus aplicaciones deberían compartirse con la sociedad en su conjunto y en el seno de la comunidad internacional, en particular con los países en desarrollo (43)

Con respecto a las consideraciones nacionales, se tomó en cuenta los siguientes artículos del Código de Ética del Colegio médico del Perú:

Art. 48^o, El médico debe presentar la información proveniente de una investigación médica, para su publicación, independientemente de los resultados, sin incurrir en falsificación ni plagio y declarando si tiene o no conflicto de interés (44)

III. RESULTADOS

Después de realizar los tratamientos in vitro de *Minthostachys mollis* más Fluconazol sobre *Candida albicans* se determinó lo siguiente:

Candida albicans es sensible al efecto sinérgico de *Minthostachys mollis* más fluconazol debido a que el diámetro promedio de los halos de inhibición son mayores a 8mm, según la escala de Duraffourd, a excepción del control del antimicótico (fluconazol) tal como se muestra en la tabla 1.

En la tabla 2 se muestra el análisis de varianza, donde se obtuvo como resultado que si existe diferencia estadística altamente significativa del diámetro del halo de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* del aceite esencial de *Minthostachys mollis* en comparación con el antimicótico (fluconazol) donde el valor de P de la tabla de ANOVA es $< 0,05$ ($p=0,000$)

En la tabla 3 se muestra la comparación de los promedios de los halos de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* ATCC 10231, después de haber aplicado la técnica de Kirby Bauer según los grupos de tratamiento. Se realizó la prueba de DUNCAN, en la cual se encontró que no existe diferencia significativa entre los diámetros del aceite esencial de muña más fluconazol al 25% y 50% (Subconjunto 2) y del 75% comparado con el 100% (subconjunto 3)

En la gráfica 1, se muestra el efecto antimicótico del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) más fluconazol en todas las concentraciones superior al antimicótico (Fluconazol) sobre *Candida albicans* ATCC 10231, donde se aprecia que conforme aumenta la concentración aumenta los halos de inhibición, pero existe poca diferencia entre los grupos de 25% y 50%, 75% y 100%.

En la tabla 4 muestra las concentraciones inhibitorias según las Unidades Formadoras de colonias(UFC) según el grupo de tratamiento., en la cual la asociación del aceite esencial de muña mas fluconazol no mostro crecimiento de *Candida albicans ATCC 10231*, en comparación con el control (fluconazol) en la cual hubo crecimiento de 4.5×10^3

En la gráfica 2 se evidencia que sin tratamiento antimicótico, la cepa de *Candida albicans ATCC 10231* produce crecimiento de 10^8

Tabla 1

Diámetro promedio de los halos de inhibición del Aceite Esencial del *Minthostachys Mollis* sobre *Candida Albicans* ATCC 10231, según grupo de tratamiento. UPAO, Trujillo - 2016

Grupos de tratamiento	n	Promedio	Desv. Estándar
25% + Fluconazol	10	20.0	2.981
50% + Fluconazol	10	20.8	2.348
75% + Fluconazol	10	38.8	5.514
100% + Fluconazol	10	39.0	9.298
Control (Fluconazol)	10	6.00	0

Fuente: Datos obtenidos en la hoja de recolección de datos, creada por el autor. UPAO 2017

Tabla 2

Análisis de varianza del diámetro de los halos de inhibición en el control anti fúngico de *Candida albicans* ATCC 10231

F de V	SC	GL	CM	F	p
Tratamientos	79.005	4	19.751	75.246	0.0000
Error	11.812	45	0.262		
Total	90.817	49			

Fuente: Datos obtenidos en la hoja de recolección de datos, creada por el autor. UPAO 2017

Tabla 3

Prueba de Duncan para la comparación del diámetro de los halos de inhibición según grupos de tratamiento

Grupo de Tratamiento	n	Subconjunto para $\alpha= 0.05$		
		1	2	3
Control (Fluconazol)	10	6.00		
25% + Fluconazol	10		20.0	
50% + Fluconazol	10		20.8	
75% + Fluconazol	10			38.8
100% +Fluconazol	10			39.0

Fuente: Datos obtenidos en la hoja de recolección de datos, creada por el autor. UPAO 2017

GRÁFICA 1:

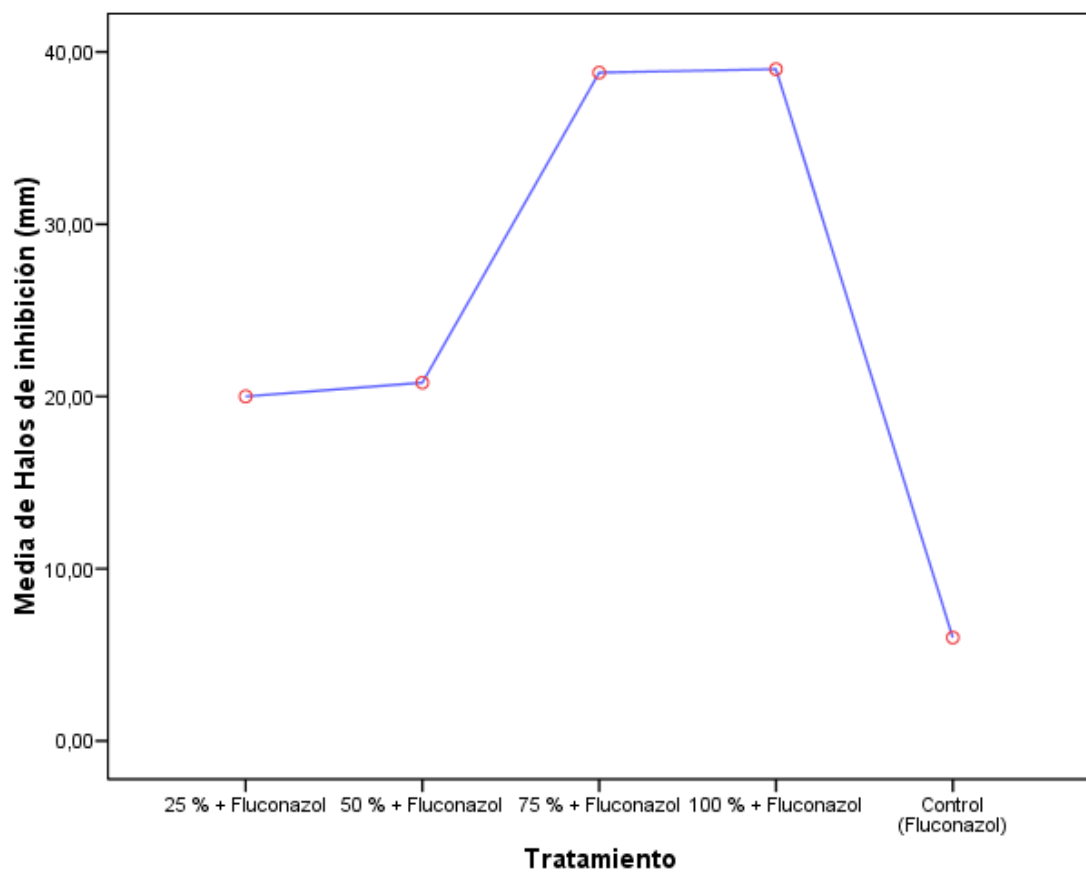


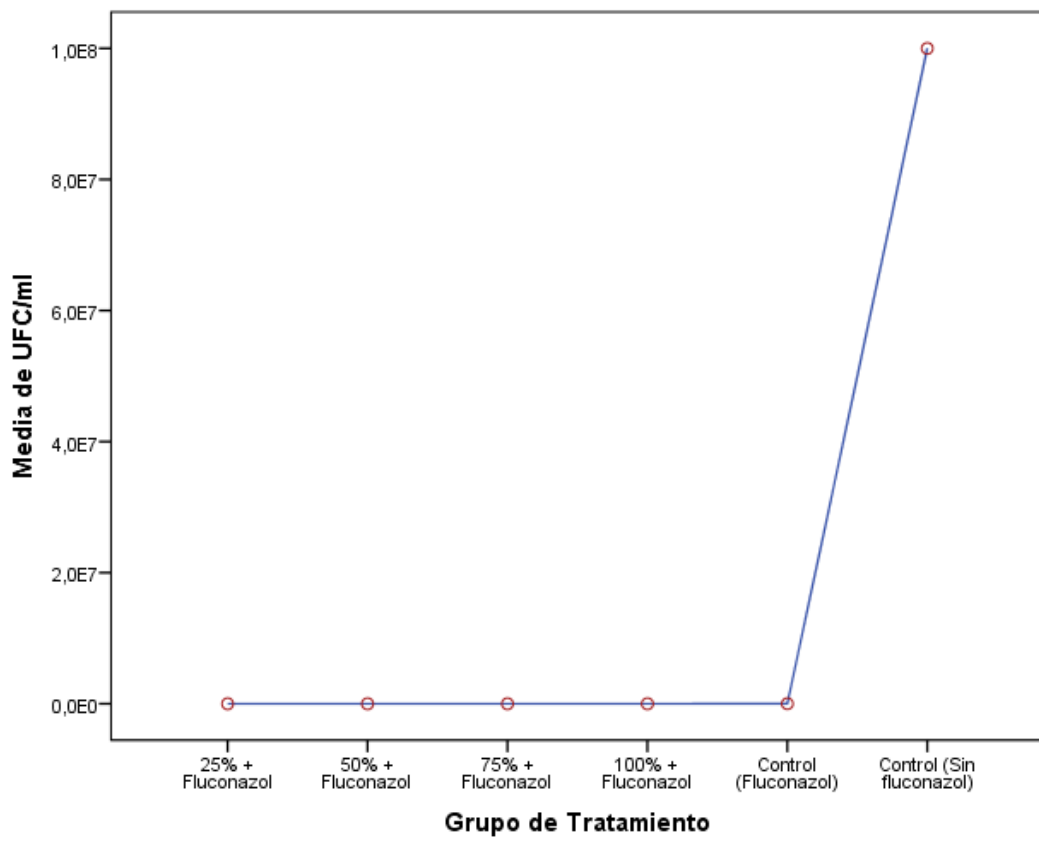
Tabla 4

Concentración inhibitoria para las UFC, del Aceite Esencial del *Minthostachys Mollis* sobre *Candida Albicans* ATCC 10231 según grupo de tratamiento. UPAO, Trujillo - 2017

Grupo de tratamiento	n	Promedio	Desv. Estándar	t	p
25% + Fluconazol	10	0	0	-	-
50% + Fluconazol	10	0	0	-	-
75% + Fluconazol	10	0	0	-	-
100% + Fluconazol	10	0	0	-	-
Control (Fluconazol)	10	4.5E+03	6.3E+01		
Control (Sin Fluconazol)	10	1.0E+08	0	4999818.7	0.0000

Fuente: Datos obtenidos en la hoja de recolección de datos, creada por el autor. UPAO 2017

GRÁFICO 2:



IV. DISCUSION

El uso de las plantas medicinales con fines terapéuticos es una práctica que se ha realizado desde tiempos remotos en diferentes culturas y que actualmente sigue siendo una de las alternativas para diversos tratamientos. En este contexto podemos referirnos a numerosos estudios sobre los aceites esenciales, en los cuales se destaca su gran utilidad en diversas actividades biológicas tales como antioxidantes, antiinflamatorias, analgésicas, antiespasmódicas, antibacterianas y antimicóticas. Esta última actividad es la que cobra gran importancia debido a la creciente resistencia a los antimicóticos tradicionales en los tiempos actuales. (10)

En nuestro país, existe también una diversidad de flora, y dentro de ésta tenemos a una planta llamada *Minthostachys mollis* conocida como muña, la cual presenta efectos terapéuticos.

La presente investigación demostró el efecto sinérgico antimicótico del aceite esencial de *Minthostachys mollis* más fluconazol sobre *Candida albicans* utilizando el método de Kirby y Bauer (difusión en disco) y el conteo de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC).

En la primera tabla se muestra el efecto sinérgico inhibitorio del aceite esencial de *Minthostachys mollis* asociado a fluconazol en diferentes concentraciones más un control del fármaco antimicótico.

Obteniendo como resultado que el grupo control tenga efecto nulo sobre *Candida albicans*, ya que se observó un diámetro de 6mm, es decir que se utilizó una cepa resistente al fluconazol, comparado con la asociación de muña al 25% más fluconazol que mostró un diámetro de inhibición de 20.0mm, y el promedio del diámetro fue incrementando conforme aumenta la concentración de los grupos de tratamiento; comparado con el estudio que

realizó Alcalá-Marcos y cols (2011), quienes demostraron el efecto antimicótico del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* en comparación con el fluconazol en cultivo de *Candida albicans*, y sus resultados fueron que en los halos de inhibición de GM25% fue de 32,00 mm; para GM50% de 40,00 mm, GM100% 46,80 mm; y del grupo control por fluconazol fue de 39,00 mm.²⁶

Dicha investigación produce diferentes resultados, lo que puede ser explicado porque la cepa utilizada en el presente estudio fue resistente a fluconazol, como lo corrobora el artículo Casalnuovo IA, y cols (2004) En la cual las especies de *Candida* y en muchos otros hongos, el gen ERG11 se encarga de la síntesis de la Erg11p o la enzima 14 α demetilasa indispensable para la síntesis del ergosterol. La resistencia a los azoles se ha descrito en aislamientos clínicos en los que se demuestra una disminución de la expresión de dicha enzima o la presencia de mutaciones específicas que la afectan en su estructura o función; y puede ser inducida por regulación negativa de su síntesis tras la exposición prolongada al fluconazol.³⁹

Otra justificación de las diferencias de la susceptibilidad de *Candida* frente a *Minthostachys mollis* en este estudio y otras investigaciones podría deberse a las características propias de la *Minthostachys mollis*, es decir que este efecto también depende del lugar de procedencia de cada especie, además de otros factores como el clima, la altitud, la parte de planta utilizada, el estado de crecimiento entre otros.⁴¹

En la tabla 3 y gráfico 2 muestran que la capacidad inhibitoria al 25% y 50% del aceite esencial de muña más fluconazol tuvo similar efecto antimicótico. Así mismo el efecto sobre *Candida albicans* entre 75% y 100% de aceite

esencial de muña asociado fluconazol no presentan diferencia significativa sobre su capacidad inhibitoria.

Además los resultados obtenidos del aceite esencial de muña al 75% y 100% más fluconazol representan una mayor eficacia en la susceptibilidad frente a *Candida albicans* comparado con el 25 % y 50% de aceite esencial de muña más fluconazol.

Dichos resultados se comparan con el estudio que realizó Cano C.(2007) ²⁶ quien observó que el aceite esencial de “muña” presentó efectos antimicóticos frente a cepas de *Candida albicans* a las concentraciones de 50 y 100% y frente algunos dermatofitos.

En la tabla 4 se determinó que la sinergia entre el fluconazol mas el aceite esencial de muña al 25%, 50%, 75% y 100% mostraron efecto fungicida sobre la cepa de *Candida albicans* mediante las Unidades Formadoras de Colonias frente a los grupo de control. Pero se evidenció que el control solo con Fluconazol detuvo el crecimiento de la cepa de *Candida albicans* pero no en su totalidad, es decir a pesar que en los halos de susceptibilidad no mostro efecto si lo hizo en el método de UFC.

Se infiere que ante una nueva alternativa del uso del aceite esencial de *Minthostachys mollis* asociado a Fluconazol (antimicótico usado con mayor frecuencia en el ámbito clínico) podría obtenerse mejores efectos, comparados con el uso de una monoterapia farmacológica, ya que el aceite esencial por sus propiedades lipofílicas o hidrofílicas, intervienen en la destrucción de la pared del hongo y de la membrana citoplasmática los cuáles resultan en el rompimiento de la membrana y coagulación del citoplasma. El aceite esencial también inhibe la síntesis de DNA, RNA, proteínas y polisacáridos en los hongos, evocando cambios similares a los fármacos antimicóticos.⁴¹

La resistencia de *Candida* sp. representa un reto terapéutico que deja un menor número de posibilidades para el tratamiento de estas infecciones que se caracterizan, a su vez, por una alta morbimortalidad.¹⁹ De ahí la relevancia del presente estudio en el que una cepa resistente al fluconazol se hace susceptible cuando se une con la *Minthostachys mollis*, pudiendo ser aplicado posteriormente in vivo, es decir la presente investigación abre nuevas posibilidades terapéuticas, contribuyendo también con la Microbiología.

V. CONCLUSIONES

- Existe efecto sinérgico antimicótico in vitro del aceite esencial de *Minthostachys mollis* “muña” más Fluconazol frente a *Candida albicans*.
- *Candida albicans* es sensible frente a todas las concentraciones del aceite esencial de *Minthostachys mollis* “muña” mas fluconazol, siendo su efecto dosis dependiente.
- El efecto fungicida del aceite esencial de *Minthostachys mollis* “muña” frente a *Candida albicans* fue efectivo en las concentraciones todas las concentraciones de 25 %, 50%, 75% y 100% no observándose crecimiento de unidades formadoras de colonias.

VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar trabajos similares para determinar la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de muña más fluconazol sobre *Candida albicans*
- Continuar las investigaciones y estudios in vivo para determinar los efectos adversos o colaterales y dosis contra *Candida albicans*

Referencias Bibliográficas

1. Barnett J. A history of research on yeasts 12: medical yeasts part I, *Candida albicans*. *Yeast* 2008;25:385-417
2. Schell W. Biology of candida infections. En: UpToDate; 2015 [acceso 16 de octubre de 2015]. Disponible en: <http://www.uptodate.com/contents/biology-of-candida-infections>
3. Vyas V, Barrasa M, Fink G. A *Candida albicans* CRISPR system permits genetic engineering of essential genes and gene families. *Sci Adv* 2015.
4. Medina A, Vega A, Zuluaga G. Eficacia in vitro de la moxifloxacina frente a *Candida albicans* en enfermedad periodontal. *Av. periodoncia* 2014; 26(1):45-50.
5. Surbery P. Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nature Reviews* 2011;9:737-748
6. Merino G, Cedillo L, Silva F, Muñoz A, Castañeda E. Análisis morfológico de biopelículas de *Candida albicans* producidas en diferentes condiciones de pH y temperatura analizadas por microscopía óptica y de fuerza atómica. *Rev Mex Micol* 2014, 33:1-8.
7. Muñoz V. Caracterización fenotípica y molecular de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* en muestras clínicas. [Tesis]. Valdivia: Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias, 2012.
8. *Candida*: epidemiología y factores de riesgo para especies no albicans. Cornistein W, Mora A, Orellana N, Capparelli F, Del Castillo M. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2013;31(6):380-384.
9. Hongos, algas, protozoos, helmintos. En: Tortora G, Funke B, Case C. 9a ed. Buenos Aires: Médica Panamericana, 2007. p. [346- 350]
10. Mayer F, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms, *Virulence* 2013, 4:2, 119-128
11. Lora C, Luján M, Robles H, Saravia V, Cabeza J. Efecto in vitro de diferentes concentraciones de *Illium sativum* “ajo” frente a dermatofitos y *Candida albicans*. *UCV - Scientia* 2010; 2(2):23-33.
12. Kim J, Sudbery P. *Candida albicans*: a major human fungal pathogen. *The Journal of Microbiology* 2011;49(2):171-177

13. Canton E, García J, Martín E, Pemán J, Guinea J. Métodos microbiológicos para el diagnóstico manejo y estudio de la infección fúngica invasora. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2014;32(6):375-379
14. Cortés J, Concha A, Cediell L, Castillo J. Métodos diagnósticos en candidemia: una revisión sistemática de la literatura con meta-análisis. *Rev Chil Infect* 2011;28(5):423-428
15. Zuluaga A, De Bedoult C, Agudelo C, Hurtado H, Arango M, Restrep A y cols. Sensibilidad a fluconazol y voriconazol de especies de *Candida* aisladas de pacientes provenientes de unidades de cuidados intensivos en Medellín, Colombia (2011 – 2007). *Rev Iberoam Micol.* 2010;27(3):125-129.
16. Casnati B, Papone V, Cuestas M, Lorenzo S, Álvarez R, Massa F. Valoración del tratamiento local de candidosis oral. Correlación etiológica. *Odontoestomatología* 2011;13(18):66-75
17. Buitrago M, Restrepo J, Fernández A, Manrique F, Carrillo D. Generalidades de queratitis micótica. *Rev Univ Ind Santander Salud* 2013;45(3):55-69
18. Carrillo A, Tur C, Hernández J, Santos P, Cáceres D, Giusiano G. *Rev Iberoam Micol* 2010;27(2):49-56
19. Bello A. *Vademecum Farmacologico- Terapeutico.* 1991
20. Bennett J. Antimicóticos. En: Brunton L, Chabner B, Knollman B. Goodman & Gilman Las bases farmacológicas de la terapéutica. 12a ed. McGraw-Hill. p. 1579-1580.
21. García L, García P, Marín P, Rodríguez M. Sensibilidad a fluconazol de levaduras de interés clínico: nuevos puntos de corte. *Rev Esp Quimioter* 2012;25(4):266-268
22. Gómez C. Resistencia de levaduras del género *Candida* al fluconazol. *Infection* 2010;14(s2):s172-s180
23. Ruiz N, Arriaga M, Ocharán M, Sánchez J, Pérez E, Montes M, Rodríguez U, Cruz J. Aspectos farmacocinéticos del fluconazol. *Rev Hosp Jua Mex* 2013;80(1):28-33
24. Suárez D, Fernández J, Melgarejo M. Efecto de la luz y el ácido giberélico (AG3) en la germinación de *Minthostachys molis* Kunth. Griseb. (Labiatae). *Acta Biol Colomb* 2011;16(2):149-154

25. Mora F, Rojas L, Silva B, Usubilaga A. Chemical composition and in vitro antibacterial activity of the essential oil of *Minthostachys mollis* (kunth) Griseb Vaught from the Venezuelan Andes. *Natural Product Communications* 2009;4(7):991-1000
26. Alcalá K, Alvarado G, Alejandro A, Huayané E. Actividad antimicótica del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña) comparado con el fluconazol en cultivo de *Candida albicans*. *CIMEL* 2011;16(2):83-86
27. Azaña I. Efectividad antibacteriana in vitro del aceite esencial de *Minthostachys mollis* griseb (muña) sobre bacterias prevalentes en patologías periapicales crónicas de origen endodóntico. [Tesis] Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2010
28. Cano C. Actividad antimicótica in vitro y elucidación estructural del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica, 2007
29. Chaquilla G, Estela W, Torres V, Ballinas M, Gastélum M, Nevárez G. Composición química y contenido de fenoles totales en aceites esenciales de muña *Minthostachys setosa* Briq Epl y anís *Pimpinella anisum* L. *ECIPERÚ* 2011;8(2):107-111.
30. Huari G. Efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) en *Streptococcus mutans* [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Odontología, 2014
31. López K, Dzul K, Lugo C, Arias J, Zavala J. Mecanismos de resistencia antifúngica de los azoles en *Candida albicans*. Una revisión. *Rev Biomed* 2016;27:127-36.
32. Celestino K, Cusi Y, Fabián G, Lazo Y, Maldonado K, Méndez Y y cols. Investigación científica aplicada a la industria de la muña. Huancayo: Universidad Nacional del Centro del Perú; 2013. Disponible en: <https://es.scribd.com/doc/145058458/MUNA-TRABAJO>
33. Diccionario de Medicina Océano Mosby. 6 ed. Barcelona: Océano Grupo Editorial; 2003: 1313
34. Huanca Choque Nancy Ivón, Surco Luna Victor Jezbít. ANTIMICOTICOS. *Rev. Act. Clin. Med* [revista en la Internet]. [citado 2016 Oct 23]. Disponible en: http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2304-37682012001000010&lng=es.

35. Zapata-González F, Cardona-Castro N. Lo que debemos saber sobre los métodos de sensibilidad a los antifúngicos. Rev CES Med 2012; 26(1): 71-83
36. Castillo C. Efecto inhibitorio in vitro de Myrciaria dubia "camu-camu" sobre Staphylococcus aureus y Candida albicans. [Tesis de bachiller en medicina]. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo; 2013.
37. Boncún M., Zari G., Ruiz R., Soto M., Vengas M. Guía de prácticas de Farmacognosia I. 2da edición. Trujillo. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de Trujillo; 2012.
38. Declaración de Helsinki de la asociación médica mundial. Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos, 2008
39. Casalnuovo IA, Di Francesco P, Garaci E. Fluconazole resistance in *Candida albicans*: a review of mechanisms. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2004; 8: 69 – 77
40. Kalembe D, Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Curr Med Chem. 2003; 10(10): 813-29
41. Fuertes CM, Mungia J. Estudio comparativo del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Kumth Griseb “ muña”) de tres regiones peruanas por cromatografía de gases y espectrometría de masas. Ciencia e investigación. 200;4(1): 26
42. Shibata H, Kondo K, Katsuyama R, Alkyl Gallates, Intensifiers of β -Lactam Susceptibility in Methicillin- Resistant Sthaphylococusaureus. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49(2):549-55
43. UNESCO. Declaración universal sobre bioética y derechos humanos. Paris; 2005
44. Colegio Médico del Perú. Código de ética y deontología. Lima; 2007

ANEXO N°1

TABLA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

“Efecto sinérgico *in vitro* de cuatro concentraciones del aceite esencial de *Minthostachys mollis* mas Fluconazol sobre *Candida albicans*.”

NUMERO DE MUESTRA	SUSCEPTIBILIDAD(KIRBY BAUER)				CONTROL DE FLUCONAZOL
	25% + FLUCONAZOL	50% + FLUCONAZOL	75% + FLUCONAZOL	100% + FLUCONAZOL	
MUESTRA 1	2.0	2	4.6	4.6	0.6
MUESTRA 2	2.2	1.8	4.6	4.4	0.6
MUESTRA 3	2.0	2	4.4	4.4	0.6
MUESTRA 4	2.0	1.8	3.8	2.8	0.6
MUESTRA 5	2.4	2.4	3.6	2.6	0.6
MUESTRA 6	2.0	2.4	4	2.8	0.6
MUESTRA 7	1.8	2.4	3.6	3.2	0.6
MUESTRA 8	2.4	2	3	5	0.6
MUESTRA 9	1.8	2	3.2	4.6	0.6
MUESTRA 10	1.4	2	4	4.6	0.6
TOTAL	20/10= 2	20.8/10= 2.8	38.8/10=3.88	39/10=3.9	0.6

ANEXO N°2

**Concentración del aceite esencial de *MInthostachys mollis* mas fluconazol
sobre *Candida albicans*, mediante UFC**

NUMERO DE MUESTRA	UCF/ mL				<i>Candida albicans</i> sin fluconazol	Fluconazol
	25% + FLUCONAZOL	50% + FLUCONAZOL	75% + FLUCONAZOL	100% + FLUCONAZOL		
MUESTRA 1	0	0	0	0	10 ⁸	4.5 x10 ³
MUESTRA 2	0	0	0	0	10 ⁸	4.5 x10 ³
MUESTRA 3	0	0	0	0	10 ⁸	4.4 x10 ³
MUESTRA 4	0	0	0	0	10 ⁸	4.5 x10 ³
MUESTRA 5	0	0	0	0	10 ⁸	4.5 x10 ³
MUESTRA 6	0	0	0	0	10 ⁸	4.4 x10 ³
MUESTRA 7	0	0	0	0	10 ⁸	4.5 x10 ³
MUESTRA 8	0	0	0	0	10 ⁸	4.5 x10 ³
MUESTRA 9	0	0	0	0	10 ⁸	4.6 x10 ³
MUESTRA 10	0	0	0	0	10 ⁸	4.4 x10 ³
Total	0	0	0	0	10 ⁸	4.5 x10 ³

ANEXO 3

**(PREPARACION DEL ACEITE ESENCIAL DE *MINTHOSTACHYS*
MOLLIS)**



1. IDENTIFICACION DE LA PLANTA



2. SELECCIÓN DEL MATERIAL VERGETAL



3. LIMPIEZA / LAVADO



4. SELECCIÓN DE HOJAS DEL TALLO



5. PESADO DE HOJAS



6. COLOCACIÓN DE HOJAS PESADAS EN EL EQUIPO DE DESTILACION MAS AGUA



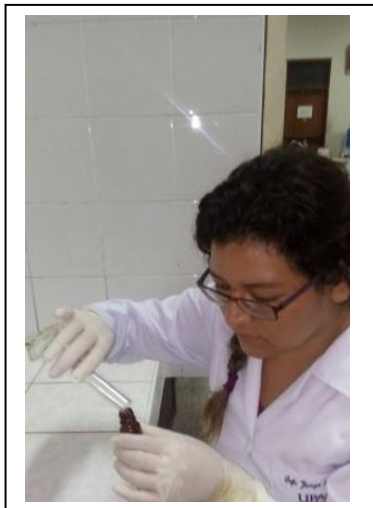
7. PROCEDIMIENTO DE DESTILADO DE ACEITE(1HRA)



8. SEPARACION DEL ACEITE EN LA PERA DE DECANTACION



9. COLOCACION DEL ACEITE EN LOS FRASCOS AMBAR Y REFIGERACION

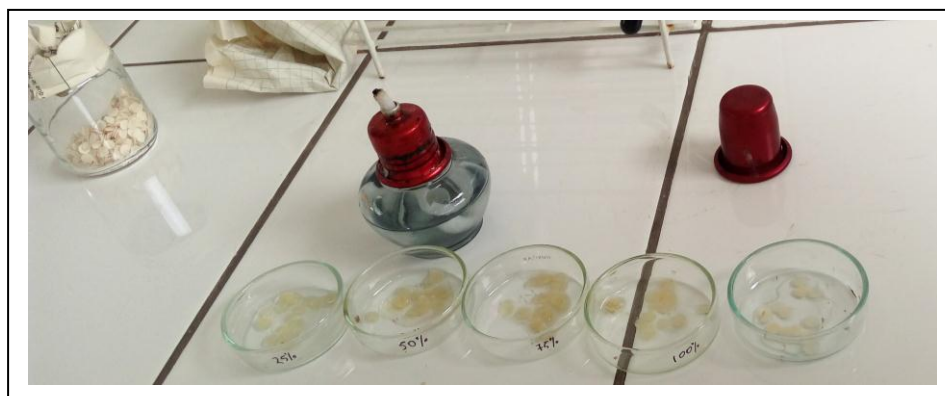
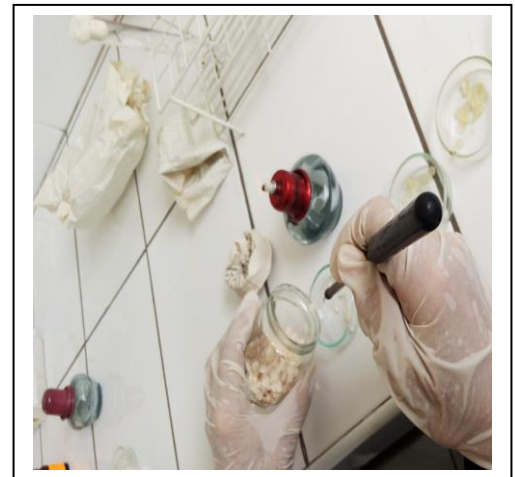


10. PREPARACION DE LAS CONCENTRACIONES



ANEXO N° 4

DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD Y
RESISTENCIA ANTIMICOTICA DEL
ACEITE ESENCIAL DE *MINTHOSTACHYS*
MOLLIS MAS FLUCONAZOL



Se prepararon discos de papel de filtro estériles, los cuales fueron sumergidos dentro del aceite esencial de *Minthostachys mollis* mas fluconazol y el control con fluconazol por un periodo de una hora.

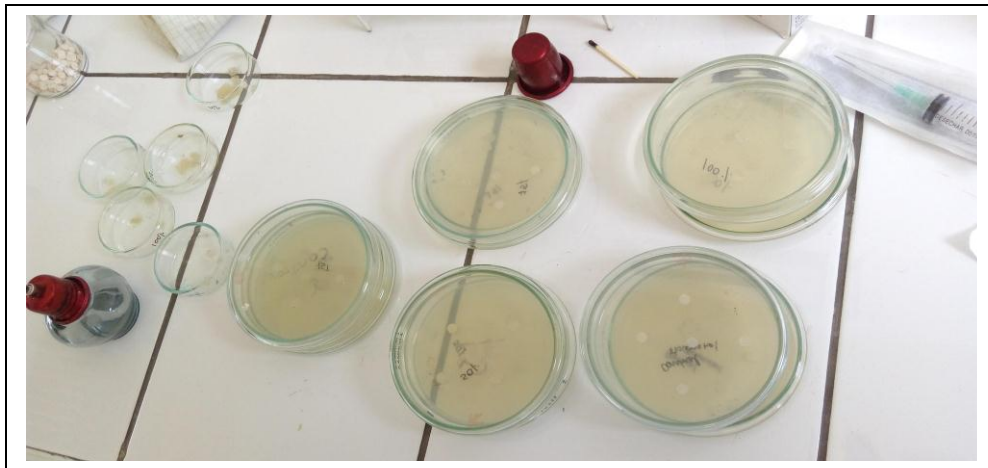


Se prepara una suspensión de caldo glucosado a partir de las colonias jóvenes hasta alcanzar una turbidez semejante al estándar 0.5 de Mac Farland (1.5×10^8 UFC/ml), esta comparación se llevó a cabo visualmente.

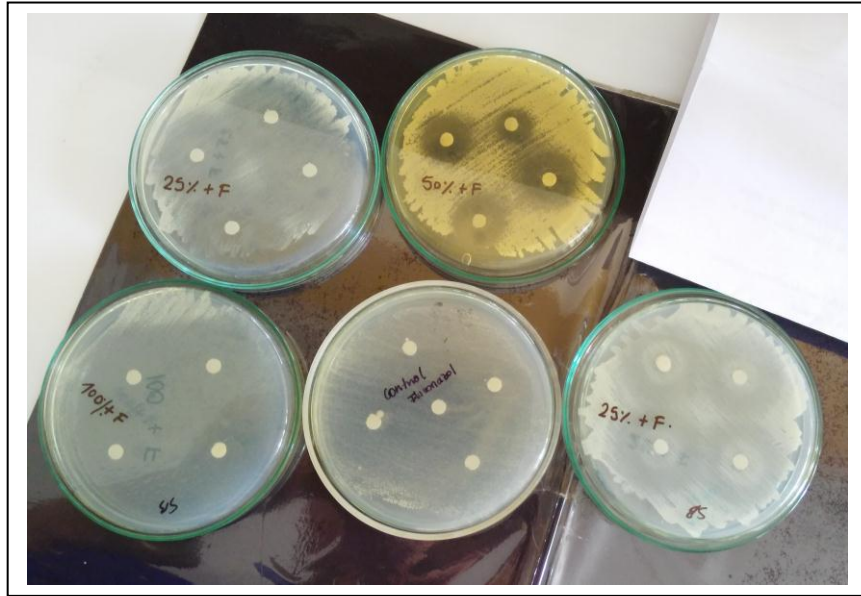




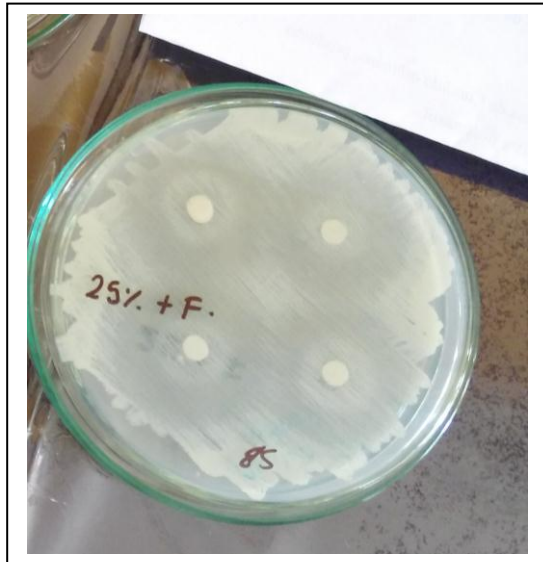
Se preparó las placas petri con medio Agar Sabouraud, sobre las cuales se sembró el hongo de *Candida albicans* ATCC 10231 en camada con hisopos estériles embebido del cultivo.



Con una aguja estéril se colocaron los discos embebidos de cada concentración del aceite esencial de muña al 25 %, 50%,75%y 100 % más fluconazol y el control de discos con dicho fármaco; se colocaron sobre los cultivos de *Candida albicans* resistente en las placas Petri.



La lectura se llevó a cabo a las 24 horas mediante la inspección visual de cada placa.



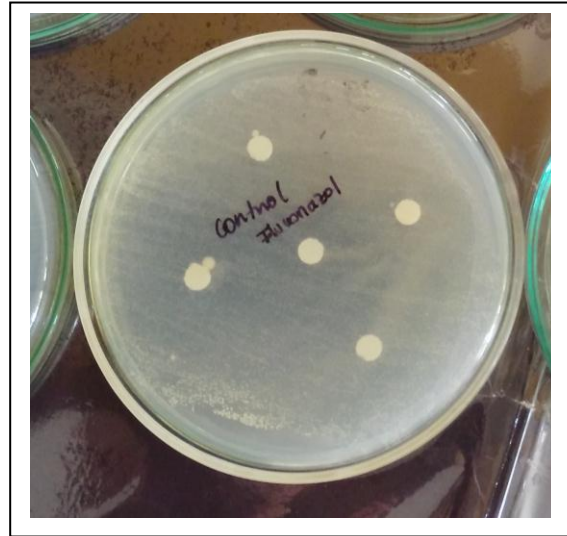
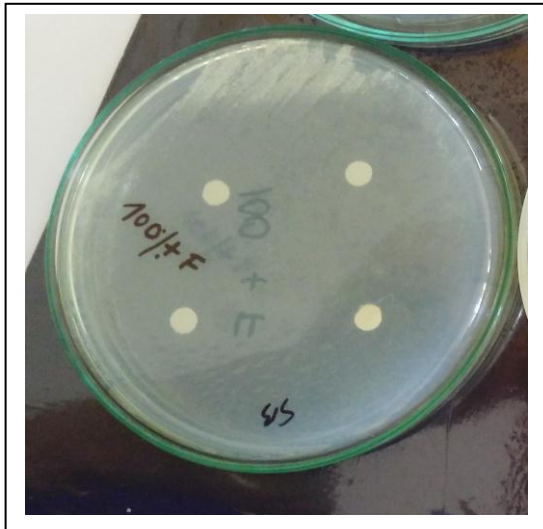


TABLA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

"Efecto sinérgico in vitro de cuatro concentraciones del aceite esencial de *Mentha piperita* más Fluconazol sobre *Candida albicans*."

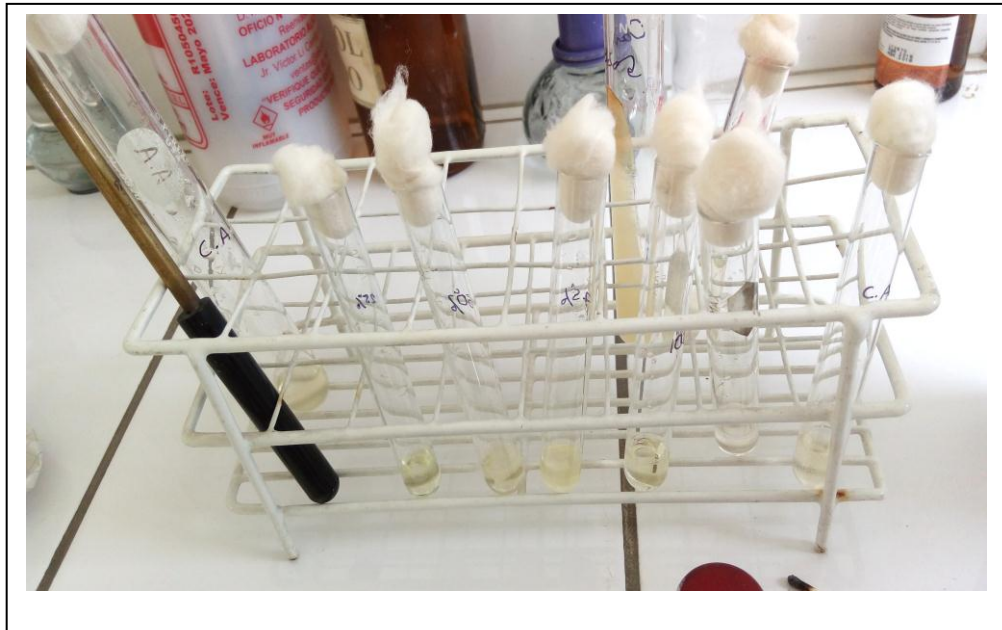
ANEXO 1

NUMERO DE MUESTRA	SUSCEPTIBILIDAD(KIRBY BAUER)				CONTROL DE FLUCONAZOL
	25%+ FLUCONAZOL	50%+ FLUCONAZOL	75%+ FLUCONAZOL	100%+ FLUCONAZOL	
MUESTRA 1	2.0	2	4.6	4.6	0.6
MUESTRA 2	2.2	1.8	4.6	4.4	0.6
MUESTRA 3	2.0	2	4.4	4.4	0.6
MUESTRA 4	2.0	1.8	3.8	2.8	0.6
MUESTRA 5	2.4	2.4	3.6	2.6	0.6
MUESTRA 6	2.0	2.4	4	2.8	0.6
MUESTRA 7	1.8	2.4	3.6	3.2	0.6
MUESTRA 8	2.4	2	3	5	0.6
MUESTRA 9	1.8	2	3.2	4.6	0.6
MUESTRA 10	1.4	2	4	4.6	0.6

La inspección visual se efectuó tomando el registro en milímetros de los halos de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* para luego usar la Escala de Duraffourd: Escala utilizada para determinar cualitativamente el efecto inhibitorio in vitro, según diámetro de inhibición

ANEXO N° 5

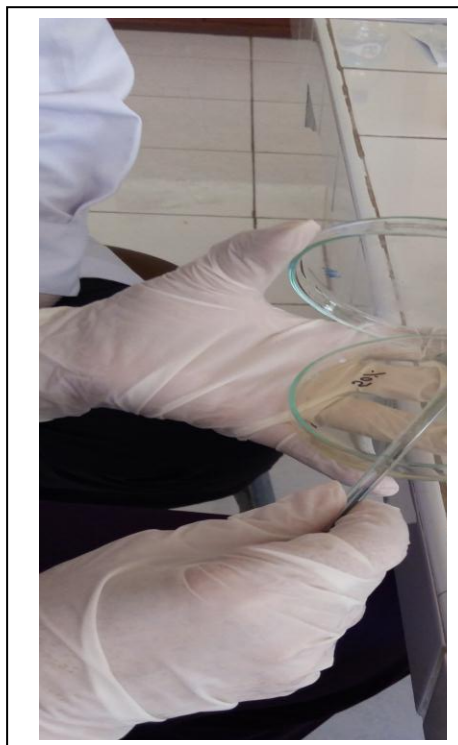
**DETERMINACIÓN DEL EFECTO
ANTIFUNGICO DEL ACEITE ACEITE
ESENCIAL DE *MINTHOSTACHYS MOLLIS*
MAS FLUCONAZOL MEDIANTE UFC**



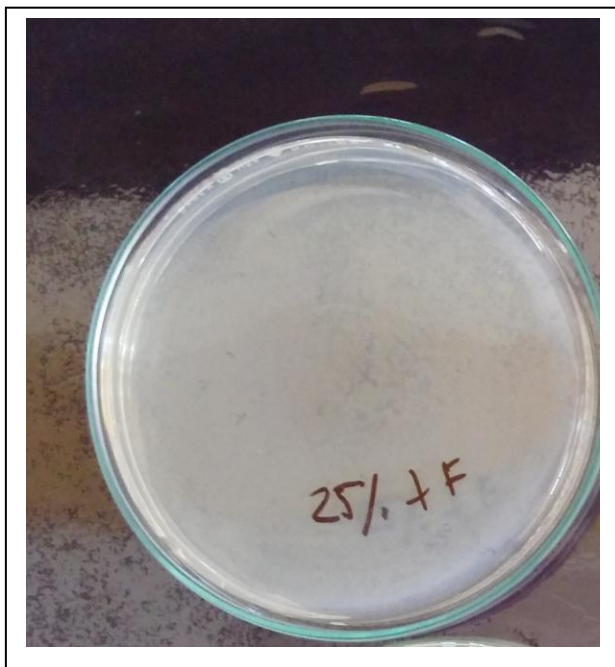
Utilizándose 4 tubos de ensayo para las concentraciones de 25 % + F, 50 % + F, 75% + F y 100 % + F de 0.8ml más 0.2ml de la cepa estandarizada de *Candida albicans* ATCC 10231

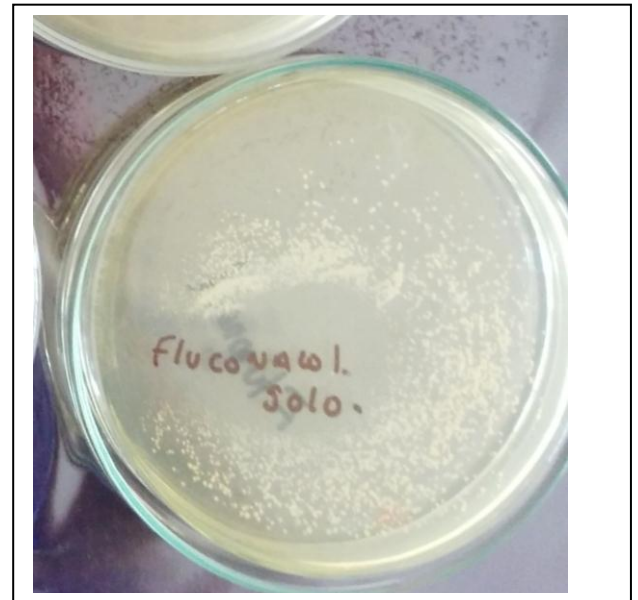
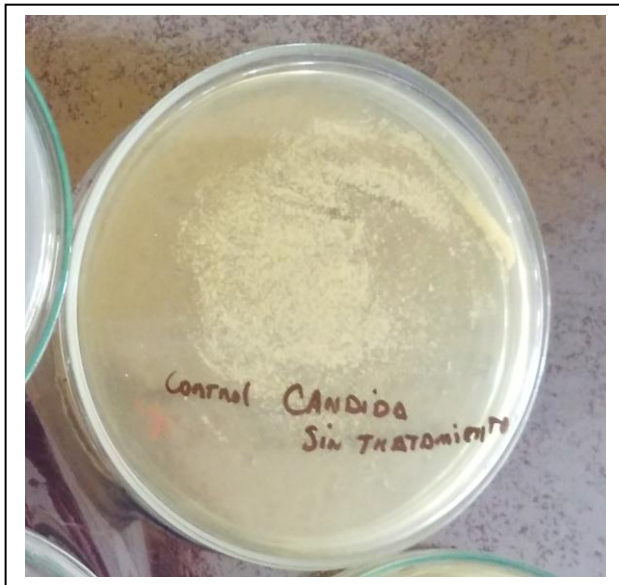
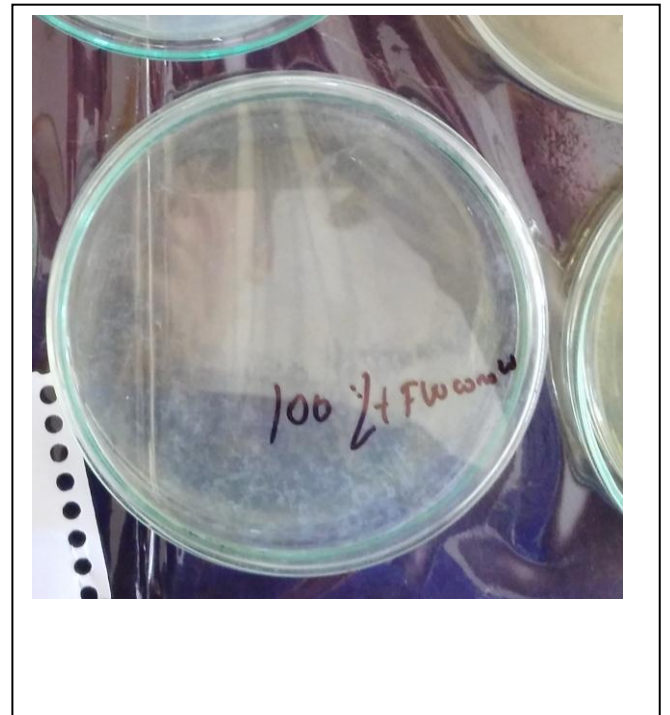
Control farmacológico: 1 tubo de ensayo de 0.8 ml de fluconazol con 0.2 ml de la cepa este último tubo usado es para el control.

El control micótico : 1 tubo de ensayo (cultivo bacteriano sin ningún tratamiento),

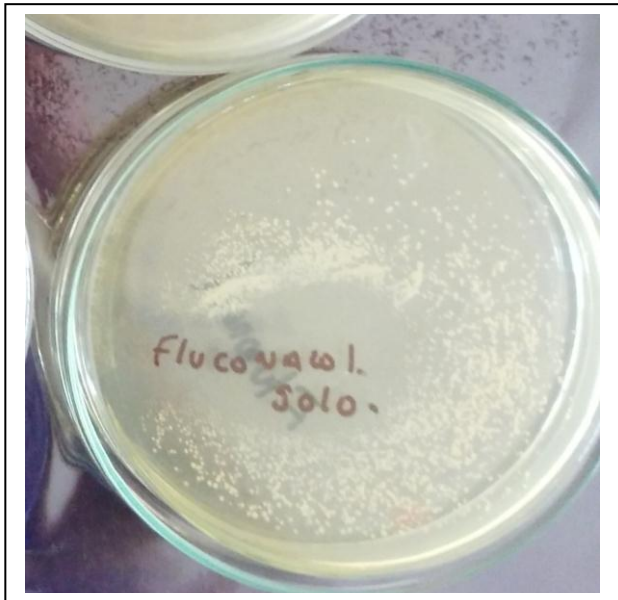


Posteriormente para la determinación de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de cada tubo se sembró 0,1 ml en placas con agar saboraud preparadas previamente, utilizando el asa de Drigalsky para dispersar la muestra. Y se pondrán a temperatura a 37 grados centígrados por 24 horas para observar resultados.





Se determinó la ausencia de las unidades formadoras de colonias en todas las concentraciones usadas.



Se determinó el conteo de UFC en el control farmacológico de fluconazol con el método de los 4 cuadrantes mediante la fórmula: $UFC:N/4 \times A \times D$

ANEXO N°6