

UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA



FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA

**“EFECTO ANTIFÚNGICO DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LAS
HOJAS DE *Petiveria alliacea* L. (*Mucura*) FRENTE A CEPAS DE CANDIDA
ALBICANS *IN VITRO*”**

**Tesis para optar al Título Profesional de Químico
Farmacéutico y Bioquímico**

Bach: López Astocondor Jenny Janet

Bach: Prado Henostroza Mery Ysabel

ASESOR: Q.F. Roa Chunga Luis

**LIMA – PERÚ
2018**

TÍTULO:

**“EFECTO ANTIFÚNGICO DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LAS
HOJAS DE *Petiveria alliacea* L. (*Mucura*) FRENTE A CEPAS DE CANDIDA
ALBICANS *IN VITRO*”**

DEDICATORIA

A Dios, porque sin él nada hubiera sido posible

A mis padres, cimientos fundamentales en mi vida.

Sin ellos, hubiera sido imposible lograr mis metas. Su lucha incansable son virtudes que atesoro con mucha admiración. Asimismo, son un ejemplo para mis hermanas y familia en general.

A mi esposo, quien me acompañara en cada jornada. Él significa el gran ahínco y tesón en momentos difíciles y cansancio. A ellos esta investigación, sin ellos, no hubiera sido posible.

López Astocondor Jenny Janet

Esta tesis se la dedico a Dios por acompañarme y guiarme en cada momento.

A mi madre por su valentía, amor y apoyo. Ella es mi fortaleza.

A mi papá Carlos, desde el cielo me acompaña en cada paso.

A mi papitos, hermanos, tío pully, sus consejos, cuidados y ejemplos de vida los llevo conmigo siempre. A Carlos, por motivar esfuerzo y alegría en mí.

Prado Henostroza Mery Ysabel

AGRADECIMIENTO

A través de estas líneas quisiera expresar mi sincero agradecimiento a todas las personas que, con sus recursos científicos y humanos, colaboraron en la realización de este trabajo de investigación.

Mi asesor de tesis, Q.F. Luis Roa Chunga, por su generosidad en darme la oportunidad de usar sus habilidades y conocimientos científicos en un marco de confianza, cariño y amistad son fundamentales para la realización de este trabajo.

Al Dr. Edwin Alarcón, por la orientación y ayuda que nos dio para la realización de esta tesis por su apoyo y amistad que me permitió aprender mucho más de lo que estudié en este proyecto.

A todos nuestros profesores de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, por sus enseñanzas tanto de la profesión y de la vida, siempre impulsándonos a seguir adelante.

ÍNDICE GENERAL

Dedicatoria	
Agradecimientos	
Índice de Tablas	
Índice de Figuras	
Índice de Anexos	
Resumen	
Abstract	
Introducción	

CAPÍTULO I: PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1	Descripción de la realidad problemática	3
1.2	Identificación y formulación del problema	4
1.2.1	Problema general	4
1.2.2	Problemas específicos	4
1.3	Objetivos de la investigación	5
1.3.1	Objetivo General	5
1.3.2	Objetivos Específicos	5
1.4	Justificación e importancia del estudio	5
1.5	Limitaciones de la investigación	6

CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO

2.1	Antecedentes de la investigación	7
2.1.1	Nacionales	7
2.1.2	Internacionales	9
2.2	Bases teóricas	11
2.2.1.	<i>Petiveria alliacea</i> L. (Mucura)	11
2.2.1.1	Descripción botánica	12
2.2.1.2	Nombres comunes	13
2.2.1.3	Ubicación geográfica	13
2.2.1.4	Composición química	14
2.2.1.5	Usos Medicinales	14
2.2.2	Candidiasis	16
2.2.2.1	Clasificación taxonómica	16
2.2.2.2	Vías de infección	19
2.2.2.3	Patogenia	19
2.2.2.4	Mucosa vaginal	21
2.2.2.5	Candidiasis mucocutánea crónica	21

2.2.2.6	Candidiasis Profunda o Invasiva	22
2.2.2.7	Cultivos	22
2.3	Formulación de hipótesis	26
2.3.1	Hipótesis general	26
2.3.2	Hipótesis específicas	26
2.4	Definición de Términos Básicos	26

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

3.1	Tipo y nivel de la investigación	28
3.1.1.	Tipo de la investigación	28
3.1.2.	Nivel de la investigación	29
3.2	Diseño de investigación	29
3.3	Población y muestra de la investigación	30
3.3.1.	Población	30
3.3.2	Muestra	30
3.4	Técnicas e instrumento de recolección de datos	30
3.4.1.	Técnica	30
3.5	Equipos materiales y reactivos	32
3.6	Procedimiento experimental	34
3.6.1	Recolección de las hojas de <i>Petiveria alliacea L.</i> (Mucura)	34
3.6.2	Evaluación de la actividad antimicrobiana	40
3.7	Técnicas estadísticas de análisis de datos	43

CAPÍTULO IV: RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN

4.1	Resultados de la investigación	45
4.2	Discusión de resultados	55

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1	Conclusiones	57
5.2	Recomendaciones	58

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
-----------------------------------	-----------

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1	Usos medicinales según el país de origen	15
TABLA 2	Método de excavación en placa	42
TABLA 3	Resultados de la prueba de solubilidad	45
TABLA 4	Resultados de metabolitos primarios y secundarios	46
TABLA 5	Resultados de la concentración de extracto al 50%	47
TABLA 6	Análisis estadístico según dosis de 50 mg/mL	48
TABLA 7	Análisis de resultados según su nivel de significancia, según dosis de 50 mg/mL	48
TABLA 8	Análisis de varianza	49
TABLA 9	Resultados de la concentración de extracto al 100%	50
TABLA 10	Análisis de resultados según su nivel de significancia	50
TABLA 11	Análisis de varianza	51
TABLA 12	Análisis estadístico, según dosis de 100 mg/mL	51
TABLA 13	Concentración de extracto al 150%	52
TABLA 14	Análisis estadístico, según dosis de 150 mg/mL	52
TABLA 15	Análisis de resultados según su nivel de significancia en dosis de 150 mg/mL	53
TABLA 16	Análisis de resultados según su nivel de significancia	53
TABLA 17	Comparativo entre las dosis 50, 100 y 150 mg/ mL	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	<i>Petiveria alliacea</i> L. (Mucura)	11
Figura 2	Hojas de Mucura	13
Figura 3	Lesión por Candida en espacios intergítales de mano	21
Figura 4	Medición de halos de inhibición	43
Figura 5	Comparativo de halos de inhibición, según dosis de 50 mg/mL	49
Figura 6	Comparativo de halos de inhibición, según dosis de 100 mg/mL	51
Figura 7	Comparativo de halos de inhibición, según dosis de 150 mg/mL	54
Figura 8	Porcentaje de inhibición	55

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Matriz de consistencia	63
Anexo 2. Testimonio fotográfico	64
Anexo 3. Reporte por espectrofotometría Uv- Vis	78
Anexo 4. Certificado botánico de <i>Petiveria alliacea L.</i>	79
Anexo 5. Ficha de observación ad- hoc de la marcha fitoquímica	80
Anexo 6. Validación del instrumento	82
Anexo 7. Ficha de observación ad-hoc de la prueba de solubilidad	83
Anexo 8. Validación del instrumento	84
Anexo 9. Ficha de observación para determinar el efecto antifúngico	85
Anexo 10. Validación del instrumento	86

RESUMEN

Este trabajo de investigación tuvo como objetivo general determinar el efecto anti fúngico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Petiveria alliacea* L. (Mucura) frente a cepas de *Cándida albicans*, *in vitro*. Este estudio pertenece a un diseño experimental. Para la realización se necesitó extracto hidroalcohólico de hojas de *Petiveria alliacea* L. La técnica utilizada fue una ficha de observación para la recopilación de información. Asimismo, se usó el screening fitoquímico, prueba de espectrofotometría UV Vis para flavonoides totales y prueba de cromatografía de capa fina. Resultados: se comprobó el efecto del extracto hidroalcohólico de la *Petiveria alliacea* L. "Mucura" 50, 100 y 150 mg/ml. Se visualiza los halos de Inhibición en mm comparado con el fluconazol llegando a un promedio de 32.88 mm el fluconazol y a 19.98 mm el extracto. Conclusiones: Existe efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Petiveria alliacea* L. (Mucura) frente a cepas de *Candida albicans*, *in vitro*. Se demostró la presencia de metabolitos secundarios. La concentración óptima del extracto donde se evidencio mayor eficacia fue el de 150 mg/mL

Palabras clave: Extracto hidroalcohólico; Mucura; *Petiveria alliacea* L.; *Candida albicans*.

ABSTRACT

The general objective of this research was to determine the antifungal effect of the hydroalcoholic extract of the leaves of *Petiveria alliacea* L. (Mucura) against strains of *Candida albicans*, *in vitro*. This study belongs to an experimental design. For the realization, hydroalcoholic extract of *Petiveria alliacea* L. leaves was needed. The technique used was an observation sheet for the collection of information. Likewise, phytochemical screening, UV Vis spectrophotometry test for total flavonoids and thin layer chromatography test were used. Results: the effect of the hydroalcoholic extract of *Petiveria alliacea* L. "Mucura" 50, 100 y 150mg/mL was verified. Inhibition halos are visualized in mm compared to fluconazole reaching an average of 32.88 mm fluconazole and 19.98 mm extract. Conclusions: There is an antifungal effect of the hydroalcoholic extract of the leaves of *Petiveria alliacea* L. (Mucura) against strains of *Candida albicans*, *in vitro*. The presence of secondary metabolites was demonstrated. The optimum concentration of the extract where the greatest efficacy was evidenced was 150 mg / mL.

Keywords: Hydroalcoholic extract; Mucura; *Petiveria alliacea* L.; *Candida albicans*.

INTRODUCCIÓN

En el Perú existe una gran diversidad de plantas medicinales, por lo cual es necesario realizar un estudio que determine las cualidades medicinales que poseen. Además existen muchas plantas que no han sido investigadas, por ende, sus posibles propiedades que contribuyen con la salud son desconocidas y de ser descubiertas estas serían de gran utilidad para la humanidad.

Las plantas medicinales tienen importancia en el área de salud, captando la atención de instancias internacionales como la Organización Mundial de la Salud (OMS), el 80 por ciento de la población de países en desarrollo hace uso de la medicina alternativa para tratar problemas de salud. Esto ha permitido el incremento considerable en remedios herbolarios y medicamentos elaborados a partir de material vegetal o de sus extractos.

Las levaduras del género *Candida* causan enfermedades en humanos que varían desde infecciones superficiales no graves, hasta sistémicas y potencialmente mortales. Candidiasis, es el origen común de la enfermedad vaginal y, aunque es una infección no considerada incapacitante, generalmente causa síntomas incómodos que alteran el comportamiento del paciente. ¹⁰

Por consiguiente, este estudio se sostiene en la siguiente interrogante: ¿Cuál es el efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Petiveria alliacea* L.(Mucura) frente a cepas de *Candida albicans*, *in vitro*? En ese sentido el desarrollo de la temática tiene el siguiente criterio estructural:

En el capítulo 1 se desarrolla lo siguiente: planteamiento y formulación del problema de la investigación.

En el capítulo 2 se presentan los antecedentes nacionales e internacionales, y las bases teóricas que corresponden a las variables de estudio respectivamente, así mismo se realiza la definición de términos relacionados.

En el capítulo 3 se plantea la Metodología de la investigación, se explican las técnicas e instrumentos de recolección de datos y fundamento de los equipos utilizados en la investigación. Así mismo el procesamiento y análisis de los datos estadísticos.

En el capítulo 4 se detalla la discusión de los resultados y se realiza la comprobación de la hipótesis.

En el Capítulo 5 encontramos las Conclusiones y Recomendaciones.

CAPÍTULO I:

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 DESCRIPCIÓN DE LA REALIDAD PROBLEMÁTICA

Un porcentaje significativo de mujeres presentan una infección por candidiasis vulvovaginal como mínimo una vez en todas sus vidas. Además, al menos la mitad de ellas presentará 2 o más incidentes infecciosos durante un año. A pesar de que sólo el 5% de los casos la enfermedad se vuelve crónica (se habla de la candidiasis vulvovaginal recurrente en cuatro episodios en un año se diagnostican) es el hecho de que la recaída es un reto para los ginecólogos y algunos cambios en la calidad de vida de las mujeres¹.

La vulvovaginitis por candida es un problema común asociado con altas tasas de enfermedad. En los Estados Unidos, los signos y síntomas vaginales son una de las razones principales para que las mujeres busquen asesoramiento de ginecólogos, con informes de más de 10 millones de consultas por año.

Candidiasis Vulvovaginitis, es una enfermedad inflamatoria de la vagina, que son producidas por varias especies de hongos, principalmente *Candida* spp, secundarios generalmente alteradas condiciones fisiológicas, la determinación de una reducción de la inmunidad local.³ Especies de *Candida* se han identificado en el tracto genital inferior entre 10-20% de las mujeres sanas en edad reproductiva, en el 6-7% de las mujeres menopáusicas, y en el 3-6% de las niñas pre púberes⁴. Sin embargo, la identificación de vulvovaginal de *Candida* no es necesariamente indicativo de la enfermedad por *Candida*, habida cuenta de que el diagnóstico de vulvovaginitis requiere la presencia de inflamación vulvovaginal. Alrededor del 25% de la vulvovaginitis infecciosa es candidiasis. *Candida albicans* es responsable del 90% de los episodios de candidiasis vulvovaginal. Otras especies menos comunes, también llamados no-albicans, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, y *Candida krusei*, lo que representa 10% de la candidiasis y recientemente ha aumentado la incidencia y un aumento en la resistencia al tratamiento habitual.⁵

Si no se controla la problemática mencionada, se corre el riesgo que esta patología se incremente en muchas mujeres peruanas. Se altere la calidad de vida, y en el caso de una mujer gestante, infecte al feto y genera una serie de consecuencias negativas tanto para la madre como el bebé. En el ámbito laboral, esta población femenina se verá perjudicada también económicamente, puesto que no podrá laborar de manera eficiente.

1.2 IDENTIFICACIÓN Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

1.1.1 PROBLEMA GENERAL

¿El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Petiveria alliacea* L. (Mucura) tendrá efecto antifúngico sobre cepas de *Candida albicans in vitro*?

1.2.2. PROBLEMAS ESPECÍFICOS

1. ¿El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Petiveria alliacea* L. (Mucura) presentará metabolitos secundarios?
2. ¿Cuál será la concentración óptima del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Petiveria alliacea* L. (Mucura) que posee efecto antifúngico *in vitro* por el método de difusión en Agar?
3. ¿Cómo será el efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Petiveria alliacea* L. (Mucura) *in vitro* por el método de difusión en Agar comparado con el fármaco Fluconazol?

1.3 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.3.1 Objetivo general

Determinar el efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Petiveria alliacea* L. (Mucura) en cepas de *Candida albicans in vitro*.

1.3.2 Objetivos específicos

1. Identificar la presencia de metabolitos secundarios en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Petiveria alliacea* L. (Mucura).
2. Determinar la concentración óptima del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Petiveria alliacea* L. (Mucura) que posee efecto antifúngico *in vitro* por el método de difusión en Agar.
3. Determinar el efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Petiveria alliacea* L. (Mucura) *in vitro* por el método de difusión en Agar comparado con el fármaco Fluconazol.

1.4 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Son muchos los factores que han permitido aumentar la candidiasis en el mundo, pudiendo llegar a niveles crónicos si no se recibe un adecuado tratamiento. La investigación nos permite contribuir con una alternativa en un posible tratamiento, brindándonos el beneficio de mejorar la salud de muchas personas. Se busca también que disminuya el excesivo uso de medicamentos en pacientes que no lo necesiten o no hayan recibido una atención médica.

Si somos responsables con el uso que le damos a los medicamentos mejoraremos nuestra salud además podremos prevenir cuadros graves de infecciones que nos perjudican en diferentes ámbitos de nuestra vida. Conocer una alternativa en el tratamiento y que no sea perjudicial en nuestro organismo es un gran aporte a la sociedad que podemos aprovechar. En nuestro país existe una variedad de plantas con metabolitos de actividad antibacteriana que pueden ser aprovechadas y difundidas en cada lugar con el fin de mejorar las condiciones de salud.

Reflexionando sobre las condiciones de esta enfermedad y los beneficios que podemos encontrar, nos motivamos a realizar la investigación y encontrar métodos que nos permitan aportar beneficios y conocimiento en la sociedad o comunidad en beneficio de ellos. La farmacia alternativa es una buena opción para contribuir con nuevos conocimientos para combatir estas infecciones y evitar los efectos no deseados de la medicina convencional, teniendo un medicamento de procedencia

natural y sin contraindicaciones entonces mi especialidad de Químico Farmacéutico haría una contribución de nuevos conocimientos en beneficio de la sociedad, por lo que se plantea en este trabajo el uso de *Petiveria alliacea L.* (Mucura) la cual según estudios tiene propiedades antifúngicas que nos puede ayudar a solucionar este problema. Por ello tenemos el propósito de reconocer sus metabolitos y comprobar su efecto antifungico en candidas albicans

1.5 LIMITACIONES DE LA INVESTIGACIÓN

- El tiempo de espera para la obtención de *Petiveria alliacea L.* (Mucura), ya que esta fue obtenida desde la ciudad de Iquitos.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

2.1.1. ANTECEDENTES NACIONALES

Zaa, *et al.* (2012)⁶ Efecto antiinflamatorio y antioxidante del extracto hidroalcohólico de *Petiveria alliacea* L.

Realizaron un estudio sobre el “Efecto antiinflamatorio y antioxidante del extracto hidroalcohólico de *Petiveria alliacea*” en Lima durante el año 2012. Por ello, fue necesaria la evaluación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico. La dosis empleada para el desarrollo del estudio fue de 200mg/mL de *Petiveria alliacea*, lo cual redujo notablemente en un 42% los niveles de MDA comparado con el agua. Para la evaluación antiinflamatoria fue necesario inducir una inflamación producto de una inyección de carragenina (solución al 1%), en la parte subplantar de ratones y en la “bolsa de aire subcutánea” de ratas para la inflamación aguda y crónica respectivamente. Con respecto a la evaluación antiinflamatoria existe una significativa disminución del edema en un 23,26% a las cuatro horas del tratamiento. En relación a la inflamación crónica existe una disminución del 25,9% y 29,5% del peso y volumen del exudado extraído. Asimismo, se resuelve que existe un descenso del 24% de peso de tejido fibroso. Por lo tanto, estos datos determinaron que hay un efecto antioxidante y antiinflamatorio de *Petiveria alliacea*.

Ruiz J. (2013) ⁷ Actividad antifúngica *in vitro* y concentración mínima inhibitoria mediante microdilución de ocho plantas medicinales.

Determinar la acción antifúngica de los extractos metanólicos, etanólicos e hidroalcohólicos de *Hypericum laricifolium* (partes aéreas), *Ilex guayusa* Loes (hojas), *Juglans neotropica diels* (corteza), *Piper lineatum* (hojas), *Piper* spp. (Hojas), *Psidium guajava* (hojas), *Cassia reticulata* Wild (planta entera) y *Terminalia*

catappa (hojas). Para la ejecución de esta investigación fue necesario que las muestras procedieran de los siguientes departamentos: Cajamarca y Amazonas, luego fue necesario el uso del método de difusión en agar frente a *Candida albicans*, *Aspergillus niger* y *Microsporium canis* cepa clínica y la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) a través del método de microdilución colorimétrico, utilizando como controles ketoconazol y fluconazol. Luego de realizar el trabajo de campo se determinó que los extractos demostraron la actividad antifúngica significativa con respecto a *Candida albicans* y *Microsporium canis*. Por otro lado, ninguno tuvo actividad frente a *Aspergillus niger*, a través de microdilución se estableció que 19 (79%), 18 (75%) y 24 (100 %) de los extractos indagados presentaron CMIs ≤ 1000 $\mu\text{g/mL}$, frente a *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida albicans* cepa clínica y *Microsporium canis*, mutuamente. Los extractos provenientes de *Juglans neotropica* Diels, *Psidium guajava* y *Terminalia catappa*, bajo CMIs < 100 $\mu\text{g/mL}$, presentaron el mayor nivel de actividad antifúngica.

Soto M. (2014) ⁸ Metabolitos secundarios y efectos antibacteriano in vitro de extracto hidroetanólico de Cantua.

Este estudio científico tuvo como principal objetivo establecer los metabolitos secundarios y determinar el efecto antimicrobiano in vitro. Por ello, fue necesario el recojo de plantas provenientes de la provincia de Otuzco, provenientes de “La Libertad”. Con respecto a la metodología fue necesario el uso de la maceración y tamizaje fitoquímico con etanol del 70% para el extracto hidroetanólico de las flores. Además, fue necesario sembrar en placas y elaboración de pozos de agar a concentraciones de 0,5 mg/mL, 1,0 mg/mL y 1,5 mg/mL del extracto. Los resultados obtenidos fueron los siguientes. Se halló metabolitos secundarios, tales como: catequinas, lactonas, triterpenos y esteroides, saponinas, compuestos fenólicos, taninos, quinonas, flavonoides y antocianidinas, las cuales inhibieron el crecimiento bacteriano de las cepas *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. De igual forma fue la agrupación de 1,5 mg/mL la que mostró mayor porcentaje de inhibición con respecto a las cepas estudiadas.

2.1.2. ANTECEDENTES INTERNACIONALES

A. Ochoa Pacheco, J. E. Marín Morán, D. Fernández Fernández, Y. Vinet Guillot, Y. García Ramírez (2006) ⁸ “Estandarización preliminar de parámetros de calidad del extracto blando de las hojas de *Petiveria alliacea L*”

Se realizó una estandarización preliminar de los parámetros de calidad de un extracto blando de la especie vegetal *Petiveria alliacea L*. Se prepararon nueve lotes de extractos blandos, con hojas recolectadas en los meses de septiembre a mayo, según el procedimiento descrito en la Norma Ramal de Salud Pública 311 de Cuba (NRSP). A estos lotes se les determinaron los parámetros de calidad físicos (características organolépticas, índice de refracción, densidad relativa, sólidos totales y análisis capilar), físico-químicos (pH), y químico-cualitativo (tamizaje fitoquímico), según NRSP 312 de Cuba y Guía Metodológica de Investigación en plantas medicinales del Ministerio de Salud Pública de Cuba (MINSAP), respectivamente. Los resultados se procesaron utilizando el programa estadístico STATGRAPHICS, mostrando que los parámetros: características organolépticas, análisis capilar y tamizaje fitoquímico, se mantienen iguales en todos los lotes en estudio; así como que el pH no presenta diferencias estadísticamente significativas entre los mismos. Los restantes parámetros mostraron diferencias estadísticas entre los lotes, informándose sus intervalos de confianza para un 95 % de confiabilidad. Los meses para una óptima preparación del extracto blando, según parámetro sólidos totales, son abril-mayo.

Batista A, et al. (2011) ⁹ Efecto protector de *Petiveria alliacea L*. (Anamú) sobre la inmunosupresión inducida por fluoruracilo en ratones.

Determinar las propiedades protectoras de la planta *Petiveria alliacea L*. con respecto a la inmunosupresión producida por la droga citostática 5- Fluoruracilo (5-FU). Para la elaboración de este estudio se necesitaron 5 conjuntos de 5 roedores hembras Balb/c, de los cuales 2 agrupaciones de tratamiento con 2 niveles de dosis de hojas y tallos de la respectiva planta. Se presentaron otros 2 grupos control compuesta por una solución de NaCl y con el vehículo (solución de carboximetil celulosa) por vía oral, inducidos por cinco días, luego una administración única de 150 mg/kg de 5-FU y la continuación del tratamiento en los restantes 5 días. De la

investigación se pudo obtener lo siguiente: el grupo que tuvo una mayor dosis de *Petiveria alliacea* tuvo una mínima afectación por la inmunosupresión provocada por 5-FU, en relación con los grupos tratados. Estos datos sustentan la utilización de la fórmula de la *Petiveria alliacea* Linn en enfermos tratados con antineoplásicos para la defensa contra la inmunosupresión.

Illnait MT, et al. (2010)¹⁰ Efecto antifúngico de un extracto de *Petiveria alliacea* L.

. La utilidad de *Petiveria alliacea* L. como agente antimicrobiano ha sido reportada por diferentes autores. Sin embargo, su actividad como antimicótico ha sido poco estudiada. El objetivo del presente estudio fue constatar el efecto antifúngico in vitro de un extracto hidroalcohólico de esta planta (EHAPAL) en 11 cepas de levaduras. (*Candida albicans* ATCC 64548 y ATCC 64550, *C. krusei* ATCC 6258, *C. glabrata* ATCC 90030, *C. lusitaniae* ATCC 200951, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, *Rhodotorula mucilaginosa* LMIPK 0282, *Trichosporon asahii* LMIPK 0293, *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* LMIPK 0291 y LMIPK 0292). La actividad antifúngica in vitro fue evaluada mediante procedimientos de difusión en agar y dilución en caldo. La concentración final de células en el medio (Sabouraud con EHAPAL al 0; 0,5; 2,5; 5 y 10 % fue de $0,5 \cdot 10^3$ levaduras $\cdot \text{mL}^{-1}$. Se definió como concentración mínima inhibitoria (CMI) la menor concentración del extracto que inhibiera al menos el 50 % del crecimiento al compararlo con el control de crecimiento de cada cepa. De las 11 cepas estudiadas, 9 fueron totalmente inhibidas en presencia del extracto al 10 % y seis con él al 7.5 %. El 100 % de las cepas alcanzó la CMI50 a concentraciones entre 5 y 7,5 % de EHAPAL. Concentraciones más bajas del extracto solo produjeron inhibición débil del crecimiento. Los resultados demuestran el efecto antifúngico in vitro del anamú en todas las cepas de levaduras estudiadas, sugiriendo que el extracto de esta planta pudiera ser potencialmente empleado en el tratamiento de las infecciones causadas por estos agentes.

2.2. BASES TEÓRICAS

2.2.1 *Petiveria alliacea* L. (Múcura)

Petiveria alliacea L, popularmente llamada como Múcura o Anamú, es una planta natural procedente de la parte tropical de América. Se atribuye a propiedades antiespasmódicas, diuréticas, emenogogas, estimulantes y sudoricas. También se ha utilizado en cataplasmas para aliviar el dolor, el goteo, la artritis, la mala memoria e inducir el aborto. Además, varios productos aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos están disponibles en el mercado internacional. Como un medicamento que respalda el sistema inmunitario y, en general, estimulantes que lo utilizan como materia prima.⁵



Figura N°1: (*Petiveria alliacea*) Múcura.

Fuente: <http://siagroexport.com/es/project/mucura-petiveria-alliaceae/>

También conocida como múcura en el Amazonas peruano, se han utilizado como una hierba componente de la brujería. Los habitantes también lo usan para tratar enfermedades sanguíneas y vasculares. En la medicina herbal brasileña, tipi se considera anticonvulsivo, diurético, emenagogo, estimulante y sudor. Además, se utiliza contra la artritis, la hidropesía, mala memoria y para inducir el aborto, así como una cataplasma para aliviar el dolor y curar "el mal del alma", atribuyó mágico.⁽¹²⁾

Clasificación Taxonómica

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Subclase: *Caryophyllidae*

Orden: *Caryophyllales*

Familia: *Phytolaccaceae*

Género: *Petiveria*L.

Especie: *P.alliacea* L.

2.2.1.1 Descripción botánica

La mucura se caracteriza por ser una planta duradera, de forma vertical. Esta planta puede llegar a medir hasta un metro de alto. Asimismo, se distingue por tener un tallo leñoso ubicado en la parte inferior, posee ramas de grosor delgado y crecientes; hojas en distinto orden, de diferentes formas como: elíptica, ovalada, ligeramente más resistentes que la pantorrilla de 3 a doce centímetros de largo y de 2 a dos y medio centímetros de ancho.

Esta planta posee un tallo de textura leñosa, vertical, pequeño. Cuenta con ramas delgadas y crecientes; hojas salteadas alternamente. Tienen forma elípticas u ovaladas, agudas en la punta, estrechas en la base, ligeramente más fuertes o de la pantorrilla, de tres a doce centímetros de largo y de dos a dos y medio centímetros de ancho; frutas capsulares, pequeñas, kilogramos, sésiles, flores pequeñas y delgadas, torneado de blanqueamiento a lejía, ensambladas en las uñas. *Petiveria alliacea* L. bracteadas pequeñas en racimos terminales o axilares L., debido a las articulaciones cortas de las flores simulan cabezas finas delgadas erectas de diez a quince centímetros de longitud; equipado con techos, que sirve como raíz fusiforme que se extiende, irregularmente ramificada, su superficie externa es ligera, longitudinal de sección transversal fina; fácilmente reconocible por su distintivo olor a ajo, donde se origina su nombre.



Figura N°2: Hojas de Mucura.

2.2.1.2 Nombres comunes

Anamu, apacina, apacina, Apazote zorro, aposina aveterinaryte pájaro, calauchin raíz chasser congo vermine, douvant-douvant, emeruaiuma, hierba ajo, guinea henweed, hoja de indias pintadas Guinea, raíz barranco, poules herbe aux, gallinas hierba , gato huevo, raíz de Kojo, Kuan, kudjuruk, lemtewei, lemuru, mala pouri, mapurit, mapurita, mucuracáa, océano, payche, pipi, tipi, horrible verbena.

2.2.1.3 Ubicación geográfica

Es procedente de la parte sureña de los Estados Unidos de América y México. Esta planta se produce en el Estado de Florida para la distribución de toda América Central. Usualmente se desarrolla en zonas húmedas y oscuras. ¹³

2.2.1.4 Composición Química

Distintas familias de metabolitos secundarios fueron identificadas en *Petiveria alliacea* L. clasificadas en los siguientes: taninos, alcaloides, flavonoides, triperpenos, lactonas, cumarinas y esteroide. No obstante, en algunas ocasiones, no se identificaron con exactitud todos los metabolitos. Hay reportes de la existencia de: saponinas, cianogenéticos, glicósidos cardiotónicos y/o otros. Todavía no se puede determinar si pertenecen a falsos positivos o es fruto de las alteraciones químicas ocasionado por los métodos de extracción o el procesamiento de la planta. En referencia a los derivados de azufre, los cuales tienen una procedencia desconocida, son producto de las reacciones enzimáticas producidas en la planta en el proceso de la recolección. ¹⁴

2.2.1.5 Usos medicinales

Los estudios realizados sobre las cualidades anti-inflamatorias proceden de Brasil y Cuba. Asimismo, en los países de Argentina, México y Guatemala se realizaron investigaciones sobre las propiedades antirreumáticas y analgésicas. De otro lado, en Puerto Rico, Haití, Guatemala y Brasil consideran a esta planta con efectos antipiréticos. “La raíz seca del anamú se evidenció de manera eficaz en la separación de la irritación provocada por el aceite de cróton o el granuloma derivado por los pellets de algodón”.⁸

El extracto bruto liofilizado provenientes de las raíces causó un resultado analgésico significativo dados en modelos experimentales. La administración por el medio oral del extracto, según la dosis de 43,9 mg / kg. Las ratas evidenciaron un descenso de la migración de neutrófilos, células mononucleares y eosinófilos.

El sistema inmunológico no identifica las células cancerígenas como suyas, por ende, tienen una función de vigilancia inmunológica contra el avance del cáncer. En este sentido, el anamu puede tener importancia como inmunoestimulante. Asimismo, hay compuestos presentes en la planta que podrían justificar una acción directa sobre las células cancerígenas. De los catorce mil extractos vegetales evaluados como candidatos con potencial anticancerígeno, el anamu fue una de las treinta y cuatro plantas selectas en una clasificación farmacológica realizada en la Universidad de Illinois.

Tabla N° 1: Usos medicinales de *Petiveria alliacea* L. (Mucura) el país de Origen.

Perú	Resfriado, influenza, alucinaciones
Argentina	Antiséptico, resfriado, diarrea, diurético, emenagogo, febrífugo, dolor de cabeza, infecciones del tracto respiratorio, reumatismo, dolor de muelas, infecciones urinarias
Brasil	Abortivo, analgésico, antihelmíntico, antirreumático, asma, antiinflamatorio, antiespasmódico, artritis, emenagogo, cáncer, diabetes mellitus, diaforético, diurético, fiebre, dolor de cabeza, inflamación, malaria, osteoartritis, reumatismo, sedativo, dolor de muelas
Colombia	Dentición (prevención de caries), partos
Cuba	Abortivo, antiinflamatorio, cáncer, diabetes mellitus
Guatemala	Abscesos, dolor de estómago, desórdenes sanguíneos, dermatitis, diarrea, emenagogo, fiebre, furúnculos, dolor de cabeza, inflamación cutánea, menstruación, sinusitis, enfermedades de la piel, erupciones, hongos
Haití	Dolor de cabeza, antiséptico, depurativo, diurético, expectorante, fiebre, insecticida, sedativo, espasmos, sudorífico, tumor, vermífugo
México	Abortivo, catarro, resfriado, depurativo, diurético, emenagogo, epilepsia, expectorante, fiebre, dolor de cabeza, erupciones cutáneas, histeria, influenza, parálisis, rabia, reumatismo, espasmos, sudorífico, dolor de muelas, tumor, enfermedades venéreas, vermífugo
Nicaragua	Dolores, resfriado, catarro, corazón, riñones, hígado, dolores, desórdenes pulmonares, dificultad respiratoria
Paraguay	Abortivo, enfermedades digestivas, emenagogo, fiebre, influenza, dolores (musculares), sinusitis, afecciones de la piel, dolor de muelas
Venezuela	Abortivo, depurativo, emenagogo, espasmos, sudorífico, vermífugo

Fuente: *Utilización de la Planta de Anamú (Petiveria alliacea L.), en el tratamiento de la mastitis caprina, en la Finca Santa Rosa de la Universidad Nacional Agraria (UNA). Ronald Selvin Salmerón Altamirano Septiembre, 2006 Managua, [Tesis] Nicaragua.*

2.2.2 CANDIDIASIS

Definición:

La candidiasis invasiva (CI) abarca una gran cantidad de enfermedades crónicas, en las que destacan: meningitis, candidiasis y otras. Además, requiere de la participación de distintos órganos, no incluye infecciones y enfermedades no graves como es el caso de la candidiasis esofágica y orofaríngea.¹⁵

La candidiasis es una infección originada por especies de *Cándida*, con expresiones considerablemente variables clínicas de evolución aguda, subaguda, crónica o episódica, en la que el hongo puede causar lesiones en la piel, moco cutáneo, profundo o dispersado.

Los agentes etiológicos: El agente principal es *Candida albicans*, pero pueden intervenir diferentes tipos de *Candida*, tales como, *Cándida famata*, *Candida dubliniensis*, *Cándida krusei*, *Candida lusitaniae*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, entre otros. Las levaduras de otros géneros aparte de *Candida*, como *Saccharomyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, pueden ostentar cuadros clínicos similares a la Candidiasis.⁴

Candida albicans:

La candidiasis es un importante generador de la mucosa y unidad de patología tracto genital inferior y es el más solitario de la candidemia en Argentina (40,75%) y en el planeta, a pesar de que esta cifra va en descenso a expensas de la aparición de otras especies llamadas reemergentes, especialmente *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*; Se considera que causa infecciones de procedencia endógeno. El alejamiento es vinculado, con frecuencia, a personas que poseen tumores sólidos y que no han experimentado el amplio uso de fluconazol profiláctico.

La candidiasis invasiva es una consecuencia del progreso médico y técnico que ha surgido en los últimos años de la enfermedad, y no es de sorprender que su implicancia sea significativa en los centros de salud terciarios de los lugares que se encuentran en desarrollo.¹⁶

2.2.2.1 Clasificación taxonómica: Teniendo en cuenta la reproducción sexuada de las levaduras se las incluye:

Dominio: *Eucarya*

Reino: *Fungi*

División: *Eumycota*

Subdivisión: *Deuteromycotina*

Clase: *Blastomycetes*

Familia: *Cryptococaceae*

Género: *Candida*

Especies: *C. albicans*; *C.*

Epidemiología

Es una infección que se da en diferentes países, además es considerada como la infección más frecuente en las personas. Su importancia se ha elevado sustancialmente en las últimas décadas. La levadura produce, aproximadamente, el 7.45% de micosis, 25% de micosis superficiales y entre 75 y 88% de infecciones de hongos nosocomiales. Asimismo, afecta a todas las personas, pues no distingue por el color, sexo, lugar de procedencia, raza. Existen especies de *Candida* en la tierra, el agua salada y dulce, agua de verduras, frutas, secreciones de plantas, es decir, en cualquier sustancia abundante en hidratos de carbono simples. De igual forma, en las personas, las regiones digestivas, respiratorias y mucocutáneas de humanos y mascotas. El aparato gastrointestinal del individuo posee una mínima proporción de *Candida albicans*, no obstante, su presencia es constante. Durante la etapa adulta existen 2 elementos que se encargan de parametrar el nivel de levadura que se encuentra en el intestino:

Candida es parte de la microbiota de la piel, membranas mucosas y genital y el tracto digestivo de los seres humanos, por lo que hay cultivos positivos en ninguna diferencia entre la colonización, la infección y la enfermedad de profundidad. La candidiasis invasiva no es popular, ya que para diagnosticarla es muy difícil, a tal

punto que hacerlo implica un desafío para los profesionales de la salud, puesto que los síntomas son inusuales y por lo general no se hacen notar tan fácilmente. ¹⁷

Entre los componente encargados del nivel de levadura en la flora intestinal se encuentra: los antimicrobianos, inhibidores de la adhesión, el potencial redox y la competencia por los nutrientes disponibles y 2- dieta, como la ingesta excesiva de fruta fresca, caramelo u otro material fermentable dará lugar a un aumento significativo en la cantidad de levadura intestinal, especialmente *C. albicans*. En adición de *C. albicans* de otras especies pueden colonizar la mucosa oral y el tracto gastrointestinal como humano *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*, *C. krusei*.

La piel presenta: flora de levadura residente, que incluye *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*. Otras especies como *C. albicans* y *C. tropicalis* no se encuentran regularmente en la piel normal, excepto en la parte ano-genital y alrededor de la boca. En mucosa vaginal normal puede ser aislado de *C. albicans* y, rara vez, *C. glabrata*, *C. tropicalis* *C. parapsilosis* y *C. krusei*.

La incidencia de candidiasis neonatal en la etapa de la niñez de niños de muy baja contextura (< 1.000 g) ronda entre el 7 y el 20%, y unicamente del 1% en neonatos con más de 1.500 g.¹⁸

La transferencia horizontal de la Candidiasis parapsilosis (manos del personal autorizado) está debidamente estudiada. La mayor parte de los casos están vinculados con el catéter, por el mismo que el retiro es sanador y está relacionado con una mortalidad menor. ¹⁹

2.2.2.2 Vías de infección

Como se mencionó anteriormente, la mayoría de las infecciones producidas endógenamente desde muco embalses piel o piel (introducido por catéteres u otros dispositivos médicos, que perturba la barrera de la piel), pero también puede ser exógeno, por ejemplo, en hospitales, en el que la levadura puede ser transmitida a los lactantes de erróneamente botellas o pacientes con trasplante esterilizada o inmunocomprometidos de material quirúrgico, aparatos de diálisis o endoscopio pobres descontaminado o la transferencia horizontal de la incidencia de la infección

de la levadura en las manos o uñas del personal médico que labora en la sección de cuidados intensivos, sin el cuidado respectivo.

2.2.2.3 Patogenia

El frágil equilibrio que hay entre la levadura y el hospedador puede romper y llevar al parasitismo o al desarrollo de una infección oportunista. El proceso de la enfermedad de *Candida* funciona en relación a la relación entre varios factores:

Factores que facilitan la infección son:

- * Patogenicidad intrínseca del microorganismo.
- * Mecanismos de protección del huésped

En términos generales, la candidiasis cutánea mucosa es común en personas que presentan dificultades en las células T, por ejemplo: los pacientes que contrajeron el virus del VIH, personas que padecen de diabetes. La candidiasis invasiva ocasiona la infección más grave, pues implica el estilo de vida de la persona enferma, se va desarrollando en pacientes que están inmunocomprometidos, de manera crítica. Con frecuencia, en los casos de candidiasis invasiva intervienen 1 o 2 factores predisponentes.

Por otro lado, una de los motivos principales de la candidiasis invasiva es la neutropenia, a pesar de que las personas enfermas, a quienes se les ha realizado trasplantes de órganos con enfermedades, tienen una alta probabilidad de sufrir de candidiasis invasiva.

Producción de enzimas extracelulares: son proteinasas y fosfolipasas específicas de cada cepa. Una familia de 10 isoenzimas con actividad proteínasa fue detectada en *C. albicans*.

La producción de hifas y pseudohifas: Aumentos en la capacidad invasiva de levadura, la adhesividad, la resistencia a la fagocitosis, aumenta el poder asesino en las células hospedadoras conocidas como sap (secretada proteínaasa aspártica), que Sap 1 -3 son cruciales para la infección superficial y el SAP 4-6 sería importante en la candidiasis invasiva.

Mecanismos de protección del huésped

a- No inmunes:

1- La interacción con otros segmentos de la flora microbiana.

- 2- La integridad funcional del estrato córneo.
- 3- El proceso de descamación producto de la proliferación epidérmica incitada por la inflamación.

Formas Clínicas de Candidiasis

Grandes y pequeños pliegues

1- Cutánea Uñas: Onixis blastomicética

Granuloma candidiásico

Mucosa oral: muguet, glositis, queilitis

Mucosa genital: vaginitis y balanitis

2- Mucocutánea Mucosa digestiva: esofagitis, gastritis, enteritis y lesiones perianales

Mucosa bronquial

Candidiasis mucocutánea crónica

- Candidemia: Transitoria o persistente

3- Candidiasis - Candidiasis Localizada (en diferentes órganos)

Invasiva -Aguda

- Candidiasis Sistémica o

Diseminada –Crónica



Figura N°3: Lesión por Candida en espacios interdigitales de mano.

Fuente: *Abelson JA, Moore T, Bruckner D, Deville J, Nielsen K. Epidemiología de las candidiasis invasoras en población pediátrica y adulta.*

2.2.2.4 Mucosa vaginal

Vulvovaginitis por Candida

Es más común en mujeres con diabetes, mujeres embarazadas o personas tratados con ATB o píldoras anticonceptivas. La infección se destaca por la aparición de espesor, la secreción de bultos, de apariencia blanca o blanca amarillenta lechosa (que tiene una apariencia de leche cuajada) y las placas de color blanco grisáceo pseudomembranosa, que se encuentra en la mucosa vaginal. Toda la vida está hinchada y generalmente la picazón es muy intensa. Pueden ocurrir como un episodio independiente o constante. Casi el 10% de las mujeres han experimentado sucesos de vulvovaginitis se ven afectados. Se precisa como candidiasis vulvovaginal periódica cuando causan 3 o más episodios de candidiasis vulvovaginal durante 1 año. Los pacientes responden adecuadamente al tratamiento antifúngico, pero esto no evita repeticiones futuras. La mayor parte de féminas que padecen de candidiasis vulvovaginal recurrente, no experimentan factores predisuestos conocidos.

2.2.2.5 Candidiasis mucocutánea crónica

Se refiere a un síndrome infeccioso inusual que aqueja a la etapa de la niñez con diferentes deficiencias genéticas. Los primeros síntomas de manifiestan durante los primeros años de vida, por ejemplo: los niños pueden padecer una eritema localizada en la piel que crece hasta ser lesiones hiperqueratósicas y la mucosa en la parte bucal con síntomas clínicos característicos de la candidiasis, queilitis, glositis, onixis, paroniquia, infecciones de los pliegues grandes y pequeñas producidas por *Candida*. Por lo general, no se convierten en una infección diseminada.²⁰

2.2.2.6 Candidiasis Profunda o Invasiva

Las invasiones principales de levaduras es a través de los catéteres intravenosos (que implica especies colonizan la piel de los pacientes y / o aquellos principalmente colonizar las manos de personal del hospital) y por inducción por medio de la mucosa intestinal (implica especies que conviven, anteriormente, en el tracto gastrointestinal). La tasa de la candidiasis invasiva ha sufrido un crecimiento significativo en las últimas décadas. Este problema está relacionado con tasa alta

de muerte, por ello, es importante que la candidiasis invasiva sea detectada en sus inicios. El tratamiento de la candidiasis invasiva se rige en la relación a la investigación micológica y clínica.²¹

2.2.2.7 Cultivos

Los hongos del género *Candida* crecen bien en los medios generales: glucosa Agar Sabouraud (ASG), Czapek, papa dextrosa de agar (APD). Es apropiado plantar medios con antibióticos, como cloranfenicol (cloranfenicol ASG) o cicloheximida (Mycosel) (recuerde que *C.krusei*, *C. tropicalis* son sensibles a este ATB) para prevenir el desarrollo de bacterias contaminantes. El medicamento "Lactrimel" se utiliza en material de cuero para el aislamiento de dermatofitos. El medio Blood Heart Brain (CCS) está indicado para el aislamiento de *Histoplasma capsulatum* a 37°C.

El desarrollo de la colonia es visible a las 24-48 horas a 28°C, pero no es aconsejable eliminar las tuberías plantadas antes de los 7 días para el material de superficie y de 1 mes para la profundidad. Las colonias resultantes son generalmente lisas, suaves, brillantes, blancas o de color beige débil con el tiempo puede volverse gruesas, dobladas o sin membrana.

Identificación de género y especie.²²

Luego de realizarse la identificación de especie y género es vital que se tome en cuenta el uso de un medio cromogénico, tales como: CHROMagar *Candida* (CHROMagar, Paris, France) para encontrar la potencial mezcla de levaduras dentro de una sola muestra y así poder detectar la *Candida albicans* (de coloración verde), *Candida tropicalis* (coloración azul) y *Candida krusei* (colonias rosas secas y rugosas) y colonias rosas húmedas (otras especies de *Candida*).

Tratamiento:

El acrecentamiento consecutivo de infecciones invasivas por *Candida* y la alta tasa de mortalidad se toman como medidas obligatorias para evitarlas, que en la mayoría de situaciones implican la aplicación del tratamiento profiláctico de pacientes con mayor riesgo. El hecho de que la colonización de intensidad de trabajo múltiple o la presencia de candidiasis localizada también cooperen con un

mayor riesgo de infecciones diseminadas es otro factor que llevó al tratamiento de estas infecciones en las primeras etapas.²³

A pesar de que las consecuencias del incremento en el consumo de antifúngicos probablemente todavía no se conozcan en su totalidad, se espera que genere cambios en los hongos ecológicos procedentes de la selección de organismos resistentes. En particular, el uso generalizado de fluconazol en pacientes con respuesta inmune deteriorada asociada con la aparición de especies de *Candida* es resistente a este fármaco. Este fenómeno no solo se ha demostrado en pacientes con infección por VIH, sino también en otros grupos de pacientes con un sistema inmunológico deteriorado, incluso en forma aislada en pacientes inmunocompetentes. Dos investigaciones multicéntricas en pacientes transplantados de médula ósea o leucemia aguda que recibieron profilaxis con fluconazol, un aumento en la prevalencia de la colonización de *Candida krusei* y una disminución en la colonización de *Candida albicans* se observó, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas.²⁴

La introducción de fluconazol en el Centro de Oncología Johns Hopkins para la profilaxis antifúngicas de trasplante de médula ósea se asocia con aumento de la colonización y la infección se extendió *C. krusei*, una especie de *Candida* que es intrínsecamente resistente a fluconazol. Los autores concluyeron que la supresión de las cepas más virulentas de *Candida albicans* contribuyó a la aparición de las especies menos virulentas, pero no fue sensible a fluconazol y *C. krusei*. En pacientes con infección por VIH, también ha demostrado el fenómeno de resistencia a los azoles. Como ya se mencionó, la alta tasa de infecciones por *Candida* oroespágicas y la idoneidad del fluconazol para el tratamiento, se convierten en un fármaco ampliamente usado y en una referencia antifúngica azole. Además, debido a su buena tolerancia y baja toxicidad, y la perspectiva del efecto clínico, los centros a finales de los 80 decidieron contar con la profilaxis secundaria como tratamiento continuo a dosis bajas del fármaco.²⁵

Fluconazol

Es un medicamento que contiene bis-triazol fungistático que puede ser fungicida, según el nivel de concentración que posea. Tiene la cualidad de interceder en la actividad del citocromo P-450, el cual es imprescindible para el proceso de síntesis de esteroides ubicadas en la membrana celular de los hongos. Asimismo, el produce un efecto negativo en los triglicéridos y fosfolípidos ubicadas en la membrana micótica. La operación positiva, es decir, en oposición a las levaduras, se denota en los cultivos de tejido de agar y medio fúngico con aminoácidos sintéticos, sin embargo, las congregaciones minúsculas inhibitorias (MICs) derivadas de los medios usuales son principalmente más elevadas para el fluconazol que para otros azoles del tipo ketoconazol. ²⁶

En comparación, el fluconazol es el azol es más fuerte en sistemas de animales que sufren de infección micótica. Las investigaciones *in vivo* evidenciaron que el fluconazol aumenta la calidad de vida en los animales que fueron inducidos a *Candida*, *Coccidioides*, *Criptococo*, *Blastomices*, *Aspergillus* e *Histoplasma*.

La dosis de fluconazol, 40 a 120 mg/kg/día, disminuyó la carga micótica de los animales con micosis sistémicas y dosis inferior (25 a 10 mg/kg/día) sanaron del cincuenta al cien por ciento de los animales que padecían de candidiasis vaginal. El fluconazol se impregna, casi en su totalidad, luego del consumo vía oral, e pesar de la existencia de alimentos o antiácidos o el pre-tratamiento con antagonistas receptores de H₂ y su biodisponibilidad sobrepasa el 90%.

Las agrupaciones plasmáticas máximas son, por lo general, de igual forma luego de ser adquirida ya sea por la vía intravenosa u oral. Como acto consecutivo de la administración oral, bajo la dosis de 100 mg y 400 mg son de 1,9 mg/l y 6,7 mg/l, correspondientemente. La adquisición oral perdura de fluconazol por seis a diez días lleva a un aumento en la concentración plasmática máxima de 2,5 veces más que la obtenida posteriormente a una sola dosis. Posterior a la administración del fluconazol por vía oral, se absorbe apropiadamente y logra una biodisponibilidad de aproximadamente 90%. La presencia de alimentos o antiácidos no perturba su absorción. Se distribuye ampliamente y su volumen aparente de distribución (0,8 l/kg) se aproxima al del total del agua corporal.

La alianza a proteínas plasmáticas equivale a una disminución de al menos el 11% aproximadamente. La vida promedio plasmática en enfermos que desarrollan la función renal con normalidad es de aproximadamente treinta horas consiguiendo una concentración máxima de cuatro y medio a ocho mcg/mL luego de una dosis oral de 100 mg. La consumo consecutivo por 6 a 10 días produce una creciente en la concentración plasmática máxima de 2,5 veces superior que la conseguida luego de una sola dosis. Más del 80% del fluconazol distribuido es excretado por medio de la orina sin cambios y cerca del 11% es excretado por esta vía como metabolitos.²⁶

Dosis y vía de administración

La dosis que se recomienda son:

- Vía oral: 400 mg. cada día hasta el momento en el surja la intervención clínica, para luego proceder con 200 a 400 mg al día por 10 a 12 semanas como acto siguiente de que los cultivos del líquido cefalorraquídeo hayan sido negativos.

Con respecto a las personas que padezcan de sida también pueden continuar con esta última dosis, sin embargo, el tiempo no es definido.

Candidiasis orofaríngea:

Durante el primero día, el paciente debe consumir 200 mg, luego la dosis va disminuyendo en un 50%, como mínimo, durante dos semanas.

Candidiasis esofágica: administrada por vía oral. Debe consumirse, durante el día 1, 200 mg, y durante tres semanas deberá ser administrado la dosis de 100 mg 1 vez al día.

Candidiasis sistémica:

En el día 1, la dosis deberá ser equivalente a 400 mg, y en los días consecutivos la dosis deberá reducirse a la mitad durante (1 vez al día), al menos, un mes y en los próximos quince días posterior a la desaparición de síntomas.

Candidiasis vulvovaginal y balanitis:

La dosis corresponde a 150 mg, durante una sola vez. Sin embargo, las personas que tienen una deficiencia en la parte renal deberán modificar la dosis de fluconazol.²⁶

2.3. FORMULACIÓN DE HIPÓTESIS

2.3.1. HIPÓTESIS GENERAL

Existe efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Petiveria alliacea* L. (Mucura) en cepas de *Candida albicans*, *in vitro*.

2.3.2. HIPÓTESIS ESPECÍFICAS

1. Existen algunos metabolitos secundarios en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Petiveria alliacea* L. (Mucura)
2. Existe una concentración óptima del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Petiveria alliacea* L. (Mucura) que posee efecto antifúngico *in vitro* por el método de difusión en Agar.
3. Existe relación del efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Petiveria alliacea* L. (Mucura) *in vitro* con la acción antifúngica de fármaco Fluconazol.

2.4. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICO

Microorganismos: Ser vivo microscópico que presenta una organización biológica elemental.²⁹

Cepa: se distingue por ser característica de un organismo en particular que mantiene sus propiedades bioquímicas y macroscópicas homogéneas y únicas.²⁹

Actividad Antibacteriana: Se entiende por la acción que ejerce un factor externo sobre el crecimiento microbiano.²⁹

Droga Vegetal

Se le denomina de esta forma a los segmentos de una planta, de corte medicinal, que posee una sección de 1 o varios principios activos que luego se erradicarán. Las hojas de estas plantas poseen un alto índice de alcaloides y heterósidos. Por otro lado, el tallo posee únicamente una vía de recorrido

entre las hojas y las raíces, no obstante cabe la posibilidad de que tenga los principios en estado activo ubicada en la corteza. ²⁷

Maceración

Se comprende por este proceso como el acercamiento consecutivo durante el lapso de tiempo de la droga con el menstruo, lo cual conforma una agrupación igualitaria mezclado. De esta forma, el menstruo reacciona de igual forma para todos los segmentos de la droga circulando a través en todas las direcciones y sentidos y disolviendo sus principios activos hasta ocasionar una concentración en estabilidad con la del contenido celular. ²⁸

Taxonomía:

Ciencia que trata con los principios, métodos y propósito de la clasificación, generalmente científica; Se aplica, especialmente en biología, a la organización jerárquica y sistemática de grupos de animales y plantas.²⁹

Planta Medicinal

Es un recurso biológico, en algunos casos se utiliza completo, en otros casos únicamente una parte, flores, fruta entre otros. A partir de la sección seleccionada, se obtienen extractos que se utilizan para el tratamiento de algunas condiciones, como dolor de cabeza, estómago, hinchazón, etc., algunos llaman remedio medicinal o remedio herbal, también se conoce como medicina tradicional o fitoterapia; La acción terapéutica (alivio o mejora), es porque contiene ingredientes activos. ³⁰

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

3.1. TIPO Y NIVEL DE INVESTIGACIÓN

3.1.1. TIPO DE LA INVESTIGACIÓN

El tipo de estudio que se empleará para esta investigación será de tipo “**experimental**”. Para Hernández, Collado y Baptista los diseños experimentales son los que permiten la manipulación intencionada de una o más variables independientes para analizar las consecuencias que se generan en la variable dependiente. Según este postulado, en este estudio, se manipulará de manera intencionada la variable independiente: Extracto hidroalcohólico de las hojas de *Petiveria alliacea* L. (Mucura), para luego analizar las consecuencias de manipulación que se generarán en la variable dependiente: Efecto antifúngico. Además, la investigación será de enfoque cuantitativo, ya que se presentarán los resultados a través de mediciones numéricas para probar las hipótesis planteadas en este estudio.

De acuerdo a las características y al alcance de los resultados, es un estudio de tipo:

- **Experimental:** Debido a la introducción y manipulación de los extractos para la determinación del efecto antifúngico.
- **Transversal:** Porque el estudio se realizó en un momento dado, ya que las variables se observaron en un solo momento después de un corto período de tiempo con una aproximación de 24 horas después del cultivo.
- **In vitro:** Porque la investigación se realiza con parámetros controlados, en medios de cultivo que sirven para el desarrollo de las bacterias y las condiciones de investigación son intencionalmente manipuladas.

3.1.2. NIVEL DE LA INVESTIGACIÓN

Nivel: Descriptiva

3.2. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

La investigación se realizó con medios de cultivo y cepas ATTC (American Type Culture Collection, las cuales fueron importados a través de laboratorios GenLab S.A.C y cultivados en el laboratorio de ecología microbiana de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Para la recolección de datos, se utilizó una ficha elaborada donde se anotaron los datos obtenidos a través de una medición de los halos con el vernier. Las pruebas fueron realizadas en los laboratorios de Control de Calidad de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, entre los meses de marzo 2018 y abril del 2018.

El diseño de la investigación que se realizará será de tipo: Experimental; es decir, se empleará para el experimento grupo experimental y grupo de control.

3.3. POBLACIÓN Y MUESTRA DE LA INVESTIGACIÓN

3.3.1. POBLACIÓN

50 arbustos de *Petiveria alliacea* L. (Mucura) en un área aproximada de 200 metros cuadrados

3.3.2. MUESTRA

Extracto hidroalcohólico de *Petiveria alliacea* L. (Mucura).

3.4. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

3.4.1 TÉCNICA

La técnica empleada para el recojo de información fue la “observación”. Esta se realizará registrando los datos obtenidos en cada proceso a través de Fichas de observación participante, que permitirá a nuestro equipo anotar de manera detallada todos los procedimientos que permitan llegar a los hallazgos. También se emplearán fotografías para probar los procesos ejecutados.

- **Screnning Fitoquímico**

Estos ensayos se pueden verificar sobre la misma droga; en forma entera, pulverizada o como es más frecuente en extractos que se pudieron obtener de diferentes procedimientos de extracción de la planta y con diferentes solventes.

Son ensayos de tipo cualitativo que permiten la identificación de la droga a estudiar, es por lo general la presencia de determinados compuestos específicos derivados del metabolismo secundario de la planta.

También para los ensayos de metabolitos secundarios se les hace prueba pero van a hacer comunes a todas las plantas es por eso que carece de interés diagnóstico.

Las pruebas para el Screnning fitoquímico comprenden reacciones de identificación (coloreadas, de precipitación, fluorescencia, microsublimación).

- **Prueba de Cromatografía en capa fina (CCF)**

Se le denomina de esta forma a las técnicas de análisis básicas, ya que para la ejecución la muestra no debe ser en gran cantidad. Por lo general la utilizan para medir indicadores en los productos naturales.

También es usado para el ensayo semicuantitativo contrastando el nivel de manchas vistas con estándares adecuados. ⁽²⁾

La localización de estos elementos, de forma aislada, usualmente es producto de métodos particulares o generales, pues la luz ultravioleta detecta los compuestos que se encargan de absorber la longitud de onda larga 365nm y de onda corta a 254 nm. ⁽³⁾

Para la evaluación antifúngica se utilizó método de difusión en Agar (excavación en placa) y evaluando el diámetro del halo que genera según la guía de procedimiento validado en la Universidad Cayetano Heredia.

- **Prueba de espectrofotometría UV VIS para Flavonoides Totales**

Para las técnicas cromatográficas para su separación o detección para flavonoides son muy variadas, así como también en las condiciones en las cuales ellas puedan realizarse.

3.5. EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS

Equipos

Para el trabajo se utilizaron los siguientes equipos:

Balanza Gramera. - para el pesado de las hojas de Mucura.

Balanza Analítica. - para el pesado de las dosis de Mucura.

Estufa. - para el secado de las hojas de Mucura.

Rotavapor. - para la extracción de alcohol de las hojas de Mucura.

Espectrofotómetro UV-Vis. -

Plancha de calentamiento.- para el secado de las placas cromatográficas.

Lámpara de luz UV 254 y 366 nm.- para ver las manchas de Alcaloides y Flavonoides.

Autoclave

Incubadora

Vernier

Materiales:

Se utilizaron los siguientes materiales:

Material estéril de Laboratorio

Papel Kraft

Matraz Erlenmeyer 250 y 500 mL

Embudo de vidrio

Papel filtro

Tubos de ensayo

Pipetas

Fiolas de 50 mL

Pera de bromo de 250 mL

Estándar de Quercetina

Estándar de Cafeína
Pipeta de 25 mL
Sacabocado
Placas Petri
Micropipetas de 100 uL
Tubos de ensayo de 15 x 150
Mechero
Asa de Kolle

Reactivos

Para el trabajo se utilizaron los siguientes reactivos:

Mayer
Wagner
Dragendorff
Ácido Fosfowolframio
Sonneschein
Reineckato
Shinoda (magnesio + ácido clorhídrico concentrado)
Cloruro Férrico
Gelatina al 1%
Hidróxido de sodio al 5% (Reacción de Bortranger)
Ninhidrina
Fehling A
Fehling B
Lugol
Tricloruro de Aluminio al 2%
Reactivo 2,4 DNPH
Acetato de sodio 1 M

Solutos

Para el trabajo se utilizaron los siguientes solutos:

Metanol : Agua (25:75)

Metanol

Agua destilada

Alcohol de 96°C

Cloroformo

Isopropanol

Reactivo BAW (Butanol : Agua : Acido Acético) (4:3:1)

Ácido sulfúrico 2 N

Hidróxido de sodio al 10%

Agar Dextrosa Sabouraud (Merck)

Solución salina fisiológica

Caldo Tioglicolato

Dimetil sulfoxido (DMSO)

Standar

Control Positivo “Fluconazol”

Material Biológico

Candida albicans ATCC 10231

3.6. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

El screening fitoquímico, cromatografía en capa fina, prueba de cuantificación de flavonoides totales por espectrofotometría UV-Vis, prueba de solubilidad y ensayos preliminares así como también el estudio del efecto antifúngico de las hojas *Petiveria alliacea* L. “Mucura” se ejecutaron en los laboratorios de Control de Calidad de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

3.6.1 Recolección de las hojas de *Petiveria alliacea* L. (Mucura)

Las hojas de *Petiveria alliacea* L. (Mucura) fueron recolectadas en la provincia de Iquitos, y enviados a Lima, se recolectaron aproximadamente 1 1/2Kgs. de hojas de *Petiveria alliacea* L.(Mucura).

El transporte de las hojas desde el lugar de recolección se realizaron en bolsas de papel limpios para evitar la contaminación, asegurar la ventilación, evitando la putrefacción, teniendo como destino final los laboratorios de Control de Calidad de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Secado de las hojas de *Petiveria alliacea* L. (Mucura)

Se procede a separar las hojas con cuidado, seleccionando las hojas libres de hongos y sin daños, obteniendo así 1 1/4Kgs. de hojas de *Petiveria alliacea* L. "Mucura" Se realiza la limpieza con alcohol de 70°, para retirar así todo rastro de tierra o barro que pueda presentar, luego se puso a secarlas al ambiente, no deben estar expuestas al sol directamente; Por último las hojas son colocadas en la estufa bajo una temperatura de 40 °C; se utilizó esta temperatura para no alterar los metabolitos durante cuarenta y ocho horas, esto con el propósito de lograr una muestra muy seca y factible de triturar. Posteriormente se pulverizó obteniendo 250 gr. de fino polvo.

Maceración del extracto de *Petiveria alliacea* L. (Múcura)

En un envase estéril de vidrio ámbar de boca ancha se colocó el material vegetal pulverizados (250 gr). Las muestras se procesaron en solución hidroalcohólica alcohol de 70°, a temperatura ambiente. Se cerró herméticamente para evitar que el solvente se evapore, durante la extracción se realizó agitación periódica al envase, para que se mezcle el soluto y el solvente, se macero a temperatura ambiente por un lapso de 10 días. La muestra se guardó en un frasco oscuro debidamente rotulado, se conservó en un lugar fresco hasta su posterior uso.

Después del tiempo transcurrido la muestra de Múcura fue filtrada con papel filtro, obteniendo así solo líquido para nuestros análisis posteriores.

Extracto seco de las hojas de *Petiveria alliacea* L. (Mucura)

Para el procedimiento del extracto seco se llevó el extracto filtrado al rotavapor, equipo que es utilizado para la evaporación del solvente; este equipo consta de una vasija de calentamiento donde ponemos el agua destilada, un brazo que sujeta el balón donde es depositada la muestra y al otro extremo un refrigerante que tiene una terminación para el recojo del alcohol en la muestra. Este trabajo es a una temperatura controlada que no excedió los 50°, después de un tiempo transcurrido la muestra fue llevada a la estufa a 40° para obtener el extracto seco.

La muestra fue recolectada en envase protegido de la luz y guardada a temperatura de 2 a 8 °C hasta su utilización para la prueba de solubilidad y dosificación para la prueba del efecto antifúngico.

Prueba de Solubilidad

Para la realización de esta prueba se utilizó el extracto seco de *Petiveria alliacea* L. "Mucura". Para ello fue necesario seleccionar una pequeña muestra seca, la cual fue puesta en tubos de ensayo para luego mezclarlo con 3 mL: Alcohol de 96°, Metanol, Etanol, Cloroformo, Agua y Isopropanol. De esta forma se podrá saber con exactitud cuál es más soluble con respecto a la muestra.

Screening Fitoquímico

El procedimiento es poner de 2 a 3 mL del extracto de *Petiveria alliacea* L. "Mucura" en los tubos de ensayo para luego agregar de dos a tres gotas de los reactivos para la identificación de los metabolitos.

Metabolitos Primarios

A.- Prueba para Glúcidos.

Reactivo de Fehling A y B

Se le agrega 5 mL de Fehling A y B y se lleva a baño maría la presencia de un precipitado anaranjado ladrillo nos da la presencia de Glúcidos en la muestra.

B.- Prueba para Almidón.

Reactivo de Lugol

Si existe almidón en la muestra, entonces obtendrá el color violáceo, luego de añadir tres gotas de Lugol.

C.-Prueba para Cetonas.

Reactivo de 2,4 Dinitrofenilhidrazina (DNPH)

A la muestra se le agrega una gota de DNPH si presenta un precipitado amarillo o naranja rojizo nos da la presencia de cetonas en la muestra.

Metabolitos Secundarios

A.- Prueba para Alcaloides

Para la prueba de identificación de alcaloides se hacen ensayos generales como son (Wagner, Mayer, Dragendorff, Scheibler, Sonneschein y Reineckato) sobre el extracto de *Petiveria alliacea L.* "Mucura", se considera que hay presencia de alcaloides si se obtienen cuatro resultados positivos de los ya citados. ⁽³⁾

Reactivo de Mayer.- (Yoduro de mercurio y potasio): Se observa precipitado blanco o crema, en el momento en el que se agrega tres a cinco gotas del extracto.

Reactivo de Wagner.- (yodo-yoduro de potasio): Se observa precipitado marrón, en el momento en el que se agrega tres a cinco gotas del extracto.

Reactivo de Dragendorff.- (Yoduro de bismuto y potasio): Se observa precipitado rojo naranjado, en el momento en el que se agrega tres a cinco gotas del extracto.

Reactivo de Scheibler.- (Ácido fosfortungtico): Se observa precipitado blanco, en el momento en el que se agrega tres a cinco gotas del extracto.

Reactivo de Sonneschein.- (Ácido fosfomolibdico): Se observa precipitado naranja, en el momento en el que se agrega tres a cinco gotas del extracto.

Reactivo de Reineckato.- $(\text{NH}_4 [\text{Cr} (\text{NH}_3)_2(\text{SCN})_4]2\text{H}_2\text{O})$: Se observa precipitado rosa, en el momento en el que se agrega tres a cinco gotas del extracto.

B.- Prueba de Flavonoides y Compuestos Fenólicos

Las plantas condensan una gran pluralidad de elementos fenólicos dadas en la etapa del desarrollo, estos compuestos productos de la ruta biosintética del ácido fenilpropanoico.

Es interesante señalar que este tipo de metabolitos, caracterizadas por su organización poseen a las antraquinonas, naftoquinonas y taninos, este último es condensado de un flavonoide como la antocianidina y si es hidrolizable de ácidos fenólicos.

Reactivo de Shinoda.- (Limaduras de magnesio + HCl concentrado), presenta un color de amarillo a rojo a magenta, en el caso de los flavanoles. Serán flavonas si se presenta una coloración roja, azul o violeta. Si en caso la coloración fuera amarilla, entonces sería isoflavonas. Se deduce que son isoflavononas, chalconas y auronas si en caso fueran incoloras.

Reactivo de Cloruro Férrico.- (Cloruro férrico disuelto en agua), emanarán un color azul, verde o negra cuando se agrega de tres a cinco gotas, prueba general.

Reactivo de Gelatina al 1%.- (Gelatina + cloruro de sodio), cuando se le añade de tres a cinco gotas, entonces dará un precipitado blanco (taninos).

Reactivo de Hidróxido de sodio al 5% (Reacción de Bortranger).- Para detectar Antraquinonas, Naftoquinonas y Quinonas, se le añadirá de tres a cinco gotas y luego dará un tono de color rojo.

Cromatografía en capa fina para Alcaloides

Para la prueba de cromatografía se usó una placa cromatográfica de la marca Merck (TLC Silica gel F₂₅₄) como fase estacionaria, para nuestro solvente de elución fue Metanol: Agua en proporción de (25:75) respectivamente, y se usó una jeringa en μl para la inoculación de la muestra.

Para la comparación se usó un estándar de Cafeína en concentración de 10 mg/ mL. Se inyectó 5 µl, caso similar ocurrió con la muestra de la Palta.

Una vez contenida la placa cromatográfica las dos inyecciones es sumergida en la fase móvil, donde procederá a la separación de los metabolitos por absorción y polaridad, una vez culminada la elución del activo se saca la placa cromatográfica y se lleva a una plancha de calentamiento hasta evaporar el solvente, caso seguido se evidencia las manchas de desplazamiento en la luz UV 254 nm.

Para la identificación de alcaloides en la muestra se rocía ácido sulfúrico a 2 % y luego el reactivo de Dragendorff, como revelador, para una evidencia positiva se tiene que ver manchas naranjas.

La muestra de "Mucura" dio positivo para alcaloides.

Cromatografía en capa fina para Flavonoides

Para la prueba de cromatografía en capa fina para flavonoides se usó la placa cromatográfica de la marca Merck (TLC Silica gel F₂₅₄) como fase estacionaria, para la fase móvil se usó el solvente Reactivo de BAW, elución de Butanol, Agua, Ácido acético glacial en proporción de (20:15:5) respectivamente, esta mezcla se colocó en una pera de bromo de 250 mL y se agitó, se evidenció la formación de dos fases, la fase móvil es la menos densa.

Para la comparación se usó un estándar de Quercetina en una concentración de 10 mg/ mL el cual se inyectó 5 µl a la placa cromatográfica, caso similar con la muestra de "Mucura".

En la placa cromatográfica se aplicó 5 µl del estándar y de muestra una vez terminada la corrida la muestra fue secada en una plancha de calentamiento, hasta evaporación del solvente, se evidenció las manchas en la luz UV a 254 nm, y se usó como revelador el tricloruro de aluminio, para una muestra positiva es característico de manchas amarillas.

La muestra de "Mucura" dio positivo para flavonoides.

Método de Flavonoides Totales

Para la realización de la prueba se tuvo una concentración de 1 mg/mL de estándar Quercetina, se hizo diluciones para obtener concentraciones de 0.024, 0.1 y 0.2 mg/mL en fioles de 50 mL y se enrasan con etanol.

Después a cada concentración se tomó 2 mL de alícuota y se agregó 6 mL de etanol + 0.4 mL del reactivo de tricloruro de aluminio al 2% + 0.4 mL del reactivo de acetato de sodio 1M y agua cantidad suficiente para 20 mL de volumen total. Se incubo por 30 minutos.

Para las muestras se tomó una alícuota de 0.5 mL y se agregó 6 mL de etanol + 0.4 mL del reactivo de tricloruro de aluminio al 2% + 0.4 mL del reactivo de acetato de sodio 1M y agua cantidad suficiente para 20 mL de volumen total. Se incubo por 30 minutos.

Para las lecturas en el espectrofotómetro UV-VIS se consideró una longitud de onda de 415 nm.

Los resultados fueron los siguientes:

Se obtuvo 16.24 mg de Quercetina / mL de extracto; es decir que los flavonoides totales se expresan en miligramos equivalentes de Quercetina por mililitros de extracto.

3.6.2 EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTFUNGICO

Se realizó experimentalmente la determinación de la actividad antifúngica del extracto hidroalcohólico de las hojas de la *Petiveria alliacea* "Mucura" (a partir de una muestra llevada a sequedad bajo técnicas especificadas anteriormente) frente a la cepa *Candida albicans* ATCC 10231, en concentraciones 50 mg/mL, 100 mg/mL y 150 mg/mL), empleando el método de difusión en Agar (excavación en placa) y evaluando el diámetro del halo que genera. Considerando como controles de susceptibilidades: un blanco Dimetil sulfoxido DMSO para descartar que la actividad inhibitoria fuese por el solvente del extracto hidroalcohólico. Y un control de efecto antifúngico seleccionando Fluconazol

Reactivación de los cultivos de cepa *Candida albicans*

La cepa de *Candida albicans* sembrado en Agar Sabouraud por 24 h a 37 °C.

Preparación y estandarización de los inóculos de cepa *Candida albicans*

A partir de un cultivo joven las colonias de la cepa de *Candida albicans* fueron suspendidas en caldo Tioglicolato , incubado a 37 °C por 24 h y a partir de este se realizó una dilución con solución salina fisiológica estéril hasta alcanzar la turbidez equivalente al tubo N° 0,5 del Nefelómetro de Mac Farland (1.5×10^8 UFC/mL).

Preparación del medio de cultivo

La metodología de preparación del medio de cultivo Agar Sabouraud se encuentra relacionada a la marca del medio empleado.

Para este estudio se empleó el medio de marca Merck cuya forma de preparación es la siguiente, se pesó 4,5 g de medio Agar Sabouraud por cada 100 mL de agua destilada, proceder con la homogenización en baño María hasta lograr la disolución completa.

Luego se procedió con la esterilización en autoclave del medio de cultivo a 121°C y 15 lb de presión por un periodo de 15 minutos.

Terminado el periodo se retira el medio de autoclave dejando reposar hasta lograr que su temperatura aproximadamente se encuentre a 45 a 50°C.

Una vez logrado que el medio se encuentre a la temperatura esperada, se incorporó empleando la micropipeta un volumen de 100 µL del inóculo estandarizado de *Cándida albicans* por cada 100 mL de agar preparado, homogenizando con movimientos circulares.

Empleando una pipeta de 25 mL se depositó el agar Sabouraud que contenía el inóculo estandarizado de *Cándida albicans* en una placa Petri, se dejó solidificar por un lapso mínimo de 10 minutos a temperatura ambiente, rotular la placa.

Determinación de efecto antifungico

Para la inoculación del extracto hidroalcohólico de la *Petiveria alliacea* "Mucura" (concentraciones de 50 mg/mL, 100 mg/mL y 150 mg/mL Dimetil Sulfoxido DMSO y Fluconazol. se utilizó el método de excavación en placa.

A cada placa de agar Sabouraud que contiene el inóculo estandarizado de *Cándida albicans*, se hicieron excavaciones en número de tres por cada placa de 8mm de diámetro y 8 mm de profundidad empleando un sacabocado estéril, distribuidos de la siguiente manera:

TABLA 2. Método de excavación en placa.

GRUPOS	BLANCO	CONTROL POSITIVO	CONCENTRACIÓN DE EXTRACTO
Placa Petri N°1	DMSO	Fluconazol 60 mg/mL	Extracto hidroalcohólico de la <i>Petiveria alliacea</i> "Mucura" 50 mg/mL
Placa Petri N°2	DMSO	Fluconazol 60 mg/mL	Extracto hidroalcohólico de la <i>Petiveria alliacea</i> "Mucura" 100 mg/mL
Placa Petri N°3	DMSO	Fluconazol 60 mg/mL	Extracto hidroalcohólico de la <i>Petiveria alliacea</i> "Mucura" 150 mg/mL

Se rotulo cada una de las placas y se procedió a incubar las placas a 37°C por un periodo de 24 horas, todas las pruebas se realizaron por quintuplicado.

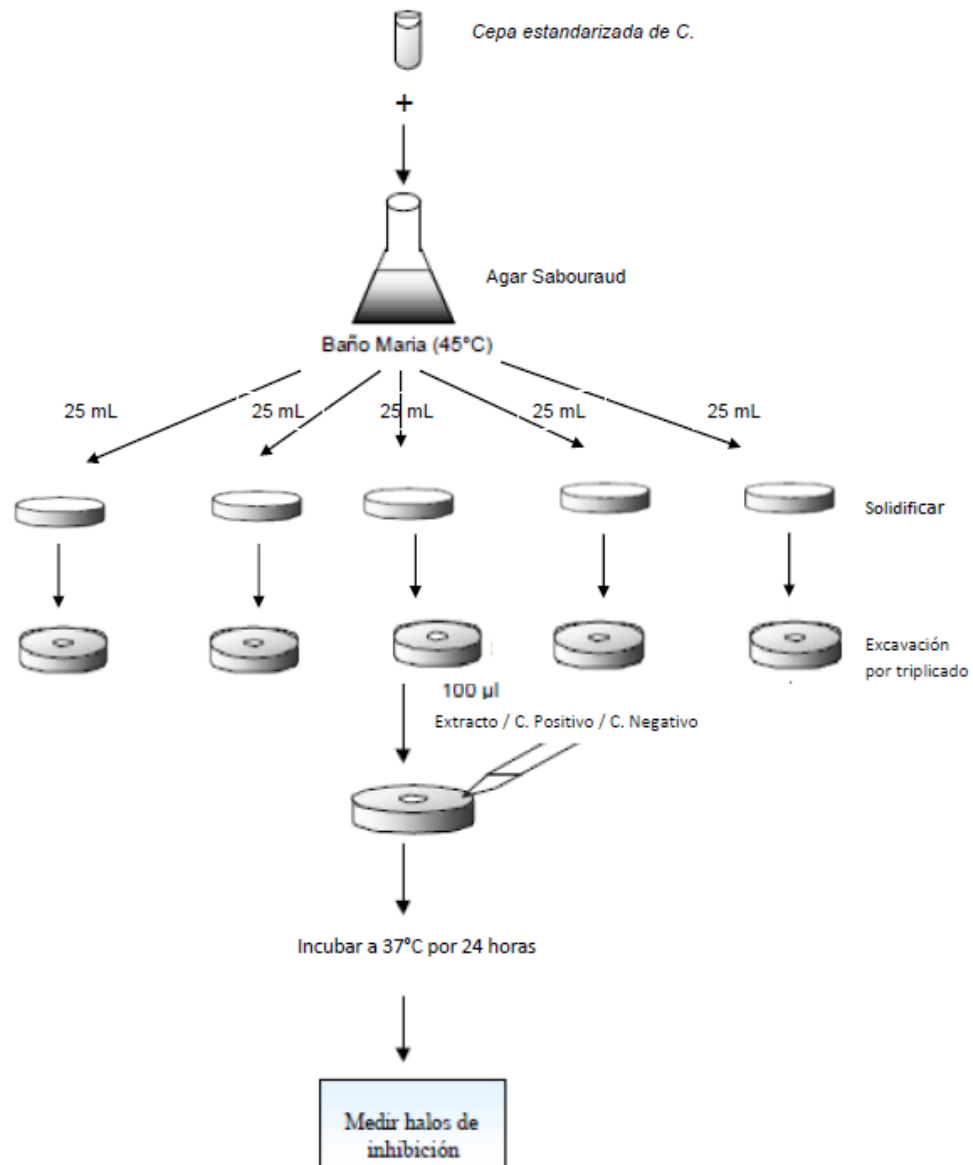


Figura 4. Medición de halos de inhibición.

3.7. TÉCNICAS ESTADÍSTICAS DE ANÁLISIS DE DATOS

Para el análisis estadístico fue necesario la organización de fichas de recolección, las cuales deberán estar codificadas para luego ser vaciadas a la base de datos en Microsoft Excel, bajo los parámetros dadas por el investigador.

La información recolectada se analizó con el especialista que nos asignen en el aula de tecnología de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica de la

Universidad Inca Garcilaso de la Vega con una nueva versión de acceso. Para lo cual, se llevó a cabo la aplicación de estadística descriptiva para establecer la distribución de los datos recolectados a través de estadística inferencial para las hipótesis de la investigación. Se presentó los resultados en tablas con su respectiva representación gráfica. Para analizar diferencias significativas de medias independientes de los cuestionarios se utilizó la prueba Anova. Se consideró un margen de error estadístico de 5%.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS

4.1. RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN

Los resultados fueron los siguientes:

TABLA 3. Resultados de la prueba de solubilidad.

PRUEBA DE SOLUBILIDAD	
Solventes	Resultado para "Mucura"
Metanol	(+++)
Etanol	(++)
Cloroformo	(+)
Agua	(+++)
Isopropanol	(++)

Donde:

(-) Insoluble

(+) Poco soluble

(++) Soluble

(+++) Muy soluble

En la tabla N° 3 se detalla el análisis de solubilidad realizado a la "Múcura" se observó que es muy soluble en agua y metanol, y resulto ser soluble en alcohol e Isopropanol.

Los resultados fueron los siguientes:

TABLA 4. Resultados de metabolitos primarios y secundarios.

IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS PRIMARIOS		
Metabolitos Primarios	Reactivo de identificación	Resultado para "Mucura"
Glúcidos	Fehling A y B	Precipitado anaranjado ladrillo (+)
Almidón	Lugol	Coloración oscura (-)
Cetonas	2,4 DNPH	Formación de un anillo rojizo (-)
Aminoácidos	Ninhidrina	Color rosado (+)
IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS		
Metabolitos secundarios	Reactivo de identificación	Resultado para "Mucura"
Alcaloides	Mayer	Precipitado blanco (+)
	Wagner	Precipitado marrón (+++)
	Dragendorff	Precipitado rojo o naranja (+++)
	Scheibler	Precipitado o Color blanco (-)
	Sonneschein	Precipitado naranja (-)
	Reineckato	Color rosa (++)
Compuestos fenólicos y Flavonoides	Shinoda	Color rojo (+)
	Cloruro férrico	Color verde (++)
	Gelatina al 1%	Precipitado blanco (+)
	Reacción de Bortranger	Color rojo (-)

Donde:

- (-) La coloración o precipitado no se evidencia
- (+) La coloración o precipitado se evidencia poco
- (++) La coloración o precipitado se evidencia moderadamente
- (+++) La coloración o precipitado se evidencia notablemente

En la tabla N° 4 se observa el análisis de identificación de metabolitos realizados a “Múcura” donde dio positivo la coloración para: Alcaloides, Compuestos fenólicos, Flavonoides y Aminoácidos.

Lectura de Resultados: Concentración del extracto hidroalcohólico de *Petiveria alliacea* “Mucura” 50mg/mL.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, retirar las placas de la incubadora y proceder a medir los diámetros de los halos de inhibición empleando el vernier y proceder con el análisis estadístico de los resultados.

TABLA 5. Resultados de la concentración de extracto al 50mg/mL.

N° DE PLACAS	CONCENTRACIÓN DE EXTRACTO		
	DMSO	Fluconazol 60 mg/mL	Extracto hidroalcohólico de <i>Petiveria alliacea</i> “Mucura” 50 mg/mL
1	0 mm	32.5 mm	20 mm
2	0 mm	32.7 mm	20.1 mm
3	0 mm	33.0 mm	19.7 mm
4	0 mm	32.2 mm	19.9 mm
5	0 mm	34 mm	20.2mm
PROMEDIO:	0 mm	32.88 mm	19.98 mm
DESVIACIÓN:	0	0.69	0.19

En la **tabla N°5:** Se representan los resultados de las 15 placas distribuidas en 5 grupos de 3 placas cada 1 donde se comprobó el efecto del Extracto hidroalcohólico de la *Petiveria alliacea* “Múcura” 50 mg/mL. Se visualiza los halos de Inhibición en mm comparado con el fluconazol llegando a un promedio de 32.88 mm el fluconazol y a 19.98 mm el extracto.

TABLA 6. Análisis estadístico según dosis de 50 mg/mL.

N° Placas	Blanco DMSO	Control Positivo Fluconazol 60 mg/mL	Dosis de 50 mg/mL	Porcentaje
1	0	32.5	20	61.54
2	0	32.7	20.1	61.47
3	0	33.0	19.7	59.70
4	0	32.2	19.9	61.80
5	0	34	20.2	59.41
Promedio	0	32.88	19.98	60.78
Desviación	0	0.69	0.19	1.13

En la tabla **N°6**: Se describe el Análisis estadístico realizado al extracto de mícura a dosis de 50 mg/mL obteniendo como promedio 32.88 mm para fluconazol y 19.98 mm para el extracto, y una desviación de 0.69 mm y 0.19 mm respectivamente.

TABLA 7. Análisis de resultados según su nivel de significancia, según dosis de 50 mg/mL.

DOSIS 50 mg/mL	Control Positivo Fluconazol 60 mg/mL	Control Negativo de Dimetil Sulfoxido (DMSO)	Nivel de Significacia
20	32.5	0	P < 0.05
20.1	32.7	0	P < 0.05
19.7	33	0	P < 0.05
19.9	32.2	0	P < 0.05
20.2	34	0	P < 0.05
19.98	32.88	0	

En la tabla **N°7**: Se detalla el Análisis de resultados según su nivel de significancia, para la dosis de 50 mg/mL obteniendo 19.98 mm para el extracto y 32.88 mm para el fluconazol.

TABLA 8. Análisis de varianza.

Análisis de varianza de un factor				
RESUMEN				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
DOSIS 50 mg/mL	5	99.9	19.98	0.037
Control Positivo Fluconazol 150 mg/mL	5	164.4	32.88	0.477
Control Negativo de Dimetil Sulfoxido (DMSO)	5	0	0	0

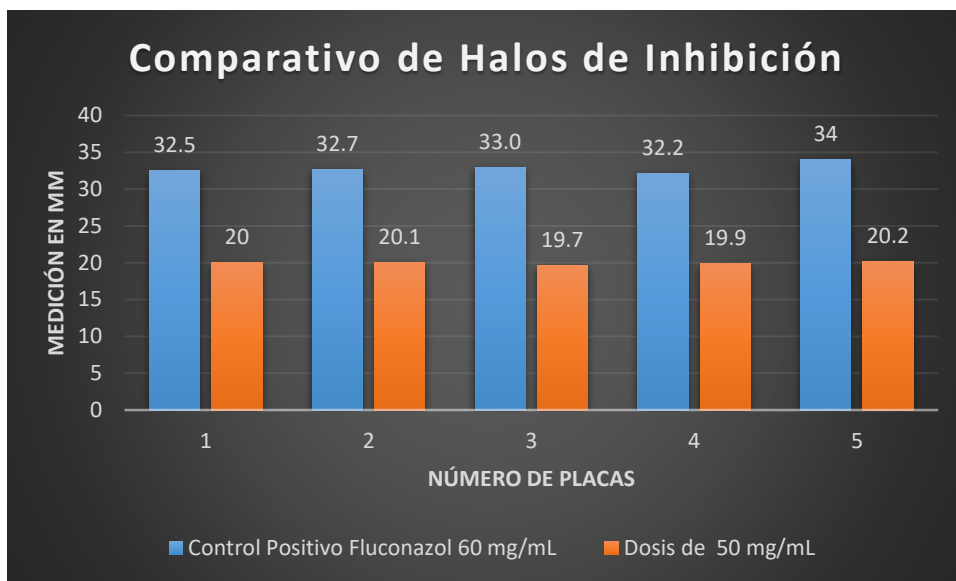


Figura 5. Comparativo de halos de inhibición, según dosis de 50 mg/mL.

En la **tabla 8** y figura **N° 5**. Se visualiza el Análisis de varianza y el análisis Comparativo de halos de inhibición, según dosis de 50 mg/mL, obteniendo la mayor medida de 34 mm para fluconazol y 20, 2 mm para el extracto.

TABLA 9. Resultados de la concentración de extracto al 100mg/mL.

N° DE PLACAS	CONCENTRACIÓN DE EXTRACTO		
	DMSO	Fluconazol 60 mg/mL	Extracto hidroalcohólico de <i>Petiveria alliacea</i> "Mucura" 100 mg/mL
1	0 mm	33.40 mm	23.5 mm
2	0 mm	32.90 mm	23.2 mm
3	0 mm	33.90 mm	23.8 mm
4	0 mm	32.80 mm	24 mm
5	0 mm	32.90 mm	23.4 mm
PROMEDIO:	0 mm	33.18 mm	23.58 mm
DESVIACION:	0 mm	0.47	0.32

En la **tabla N°9**: se representan los resultados de las 15 placas distribuidas en 5 grupos de 3 placas cada 1 donde se comprobó el efecto del Extracto hidroalcohólico de *Petiveria alliacea* "Múcura" 100mg/ml. Se visualiza los halos de Inhibición en mm comparado con el fluconazol llegando a un promedio de 33.18 mm el fluconazol y a 23.58 mm el extracto.

TABLA 10. Análisis de resultados según su nivel de significancia

DOSIS 100 mg/mL	Control Positivo Fluconazol 60 mg/mL	Control Negativo de Dimetil Sulfoxido (DMSO)	Nivel de Significancia
23.5	33.4	0	P < 0.05
23.2	32.9	0	P < 0.05
23.8	33.9	0	P < 0.05
24	32.8	0	P < 0.05
23.4	32.9	0	P < 0.05
23.58	33.18	0	

En la tabla **N°10** se detalla el Análisis de resultados según su nivel de significancia, para la dosis de 100 mg/mL obteniendo 23.58 mm para el extracto y 33.18 mm para el fluconazol.

TABLA 11. Análisis de varianza.

Análisis de varianza de un factor				
RESUMEN				
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
DOSIS 100 mg/mL	5	117.9	23.58	0.102
Control Positivo Fluconazol 150 mg/mL	5	165.9	33.18	0.217
Control Negativo de Dimetil Sulfoxido (DMSO)	5	0	0	0

TABLA 12. Análisis estadístico, según dosis de 100 mg/mL.

N° Placas	Blanco DMSO	Control Positivo Fluconazol 60 mg/mL	Dosis de 100 mg/mL	Porcentaje
1	0	33.40	23.5	70.36
2	0	32.90	23.2	70.52
3	0	33.90	23.8	70.21
4	0	32.80	24	73.17
5	0	32.90	23.4	71.12
Promedio	0	33.18	23.58	71.08
Desviación	0	0.47	0.32	1.22

En la tabla **N°12** se detalla el Análisis estadístico, según dosis de 100 mg/mL obteniendo 23.58 mm para el extracto y 33.18 mm para el fluconazol.

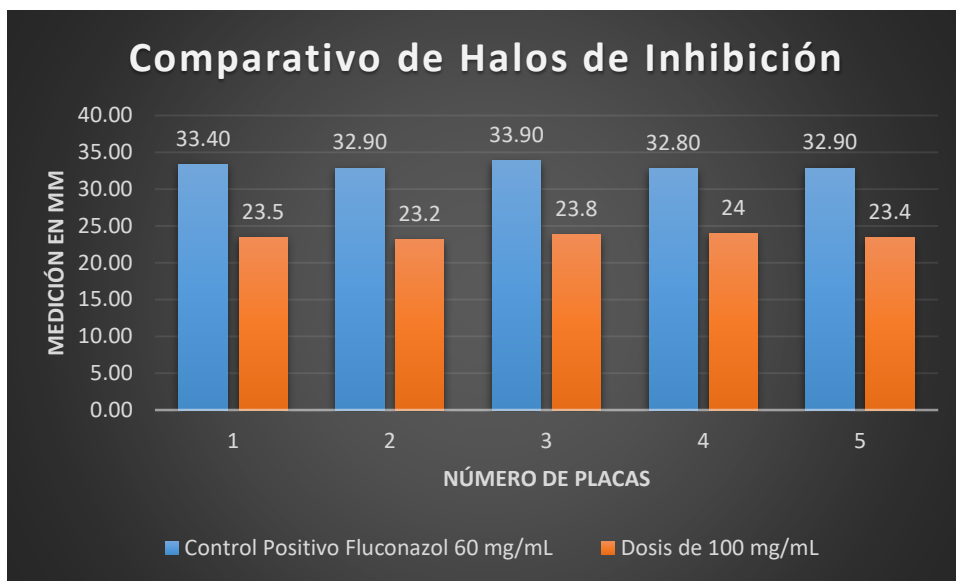


Figura 6. Comparativo de halos de inhibición, según dosis de 100 mg/mL.

En la figura N° 6: Se visualiza el análisis Comparativo de halos de inhibición, según dosis de 100 mg/mL, obteniendo la mayor medida de 33.90 mm para fluconazol y 23.8 mm para el extracto.

TABLA 13. Concentración de extracto al 150mg/mL.

N° DE PLACAS	CONCENTRACIÓN DE EXTRACTO		
	DMSO	Fluconazol 60 mg/mL	Extracto hidroalcohólico de <i>Petiveria alliacea</i> "Múcura" 150 mg/mL
1	0 mm	32.9 mm	30.1 mm
2	0 mm	33.4 mm	29.3 mm
3	0 mm	33.6 mm	29.4 mm
4	0 mm	33.1 mm	29.8 mm
5	0 mm	33.2 mm	28.6 mm
PROMEDIO:	0 mm	33.24 mm	29.44 mm
DESVIACION:	0	0.27	0.57

En la **tabla N°13**: Se representan los resultados de las 15 placas distribuidas en 5 grupos de 3 placas cada 1 donde se comprobó el efecto del Extracto hidroalcohólico de *Petiveria alliacea* "Múcura" 150mg/mL. Se visualiza los halos de Inhibición en mm comparado con el fluconazol, llegando a un promedio de 33.24 mm el fluconazol y a 29.44 mm para el extracto.

TABLA 14. Análisis estadístico, según dosis de 150 mg/mL.

N° Placas	Blanco DMSO	Control Positivo Fluconazol 60 mg/mL	Dosis de 150 mg/mL	Porcentaje
1	0	32.9	30.1	91.49
2	0	33.4	29.3	87.72
3	0	33.6	29.4	87.50
4	0	33.1	29.8	90.03
5	0	33.2	28.6	86.14
Promedio	0	33.24	29.44	88.58
Desviación	0	0.27	0.57	2.14

En la tabla **N°14**: Se detalla el Análisis de resultados según su nivel de significancia, para la dosis de 100 mg/mL obteniendo 29.44 mm para el extracto y 33.24 mm para el fluconazol.

TABLA 15. Análisis de resultados según su nivel de significancia en dosis de 150 mg/mL.

DOSIS 150 mg/mL	Control Positivo Fluconazol 60 mg/mL	Control Negativo de Dimetil Sulfoxido (DMSO)	Nivel de Significancia
30.1	32.9	0	P < 0.05
29.3	33.4	0	P < 0.05
29.4	33.6	0	P < 0.05
29.8	33.1	0	P < 0.05
28.6	33.2	0	P < 0.05
29.44	33.24	0	

En la tabla **N°15**: Se detalla el Análisis de resultados según su nivel de significancia, para la dosis de 150 mg/mL obteniendo 29.44 mm para el extracto y 33.24 mm para el fluconazol.

TABLA 16. Análisis de resultados según su nivel de significancia.

Análisis de varianza de un factor				
RESUMEN				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
DOSIS 150 mg/mL	5	147.2	29.44	0.323
Control Positivo Fluconazol 150 mg/mL	5	166.2	33.24	0.073
Control Negativo de Dimetil Sulfoxido (DMSO)	5	0	0	0

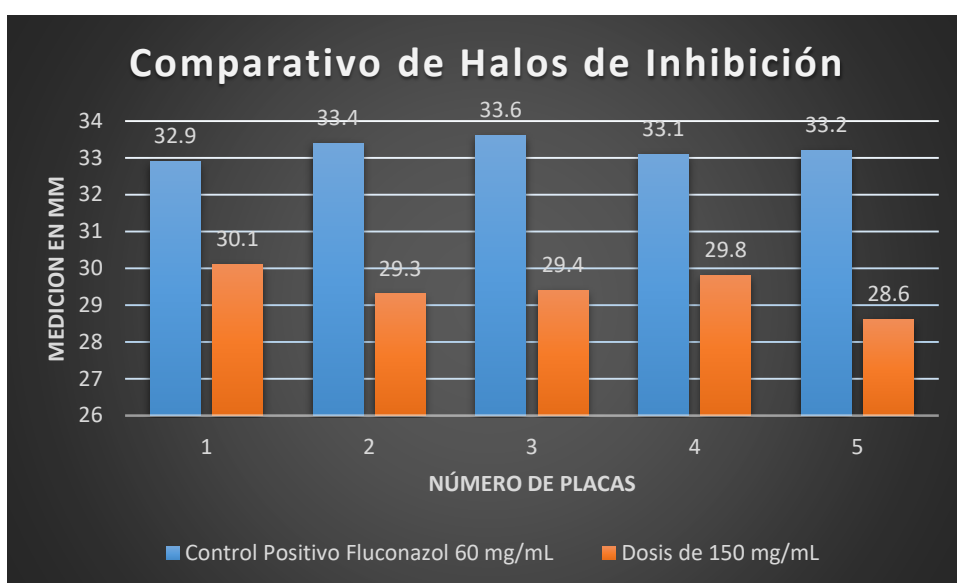


Figura 7. Comparativo de halos de inhibición, según dosis de 150 mg/mL. Porcentaje de inhibición total.

En la figura N° 7: Se visualiza el análisis Comparativo de halos de inhibición, según dosis de 150 mg/mL, obteniendo la mayor medida de 33.6 mm para fluconazol y 30.1 mm para el extracto.

TABLA 17. Comparativo entre las dosis 50, 100 y 150 mg/ mL.

	Dosis 50 mg/mL	Dosis 100 mg/mL	Dosis 150 mg/mL	Control Positivo Fluconazol 60 mg/mL
Porcentajes	60.78	71.08	88.58	100

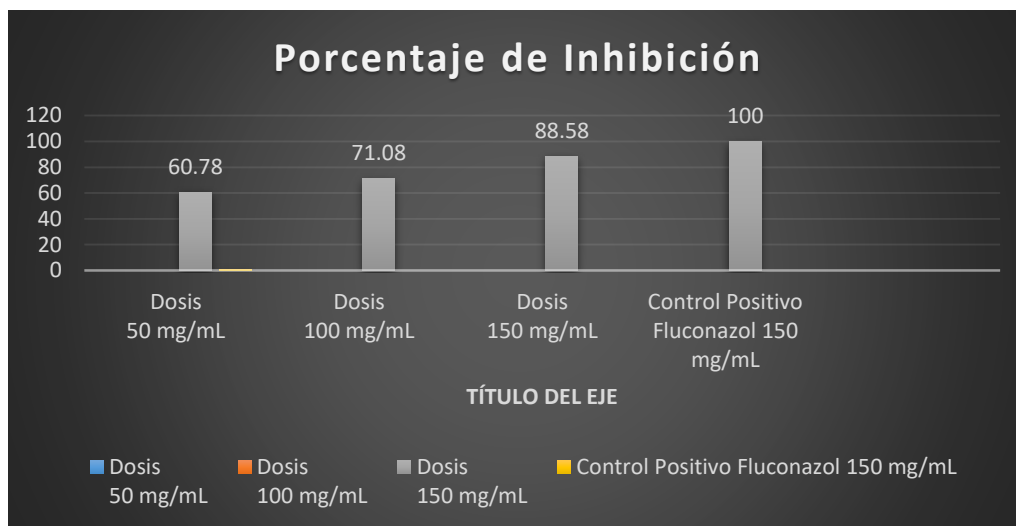


Figura 8. Porcentaje de inhibición.

En la tabla N° 16 y en la figura N° 6 se visualiza un comparativo entre las diferentes dosis de extracto de *Mucura* ensayados, y el fluconazol como medicamento control positivo, se puede evidenciar que el extracto con mayor eficacia fue el de 150 mg/mL obteniendo un porcentaje de 88.58 % mientras que el extracto de 50 mg/mL obteniendo un porcentaje de 60.78 % respectivamente.

4.2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En la presente investigación el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Petiveria alliacea* L. “Mucura”, presenta metabolitos secundarios, tales como: alcaloides, compuestos fenólicos, y flavonoides, posibles responsables del efecto antifúngico frente a cepas de *Candida albicans*.

Se determinó que el extracto hidroalcohólico, en sus concentraciones: 50mg/mL, 100mg/mL y 150mg/mL de las hojas de *Petiveria alliacea* L. “Mucura” presenta efecto antifúngico, la concentración óptima fue el de 150 mg/mL.

En el análisis comparativo de los halos de inhibición, se observó que existe 88.58% de efecto antifúngico comparándose con el fluconazol 100% frente a las cepas de *Candida albicans*.

Ochoa et al (2006). Estandarización preliminar de parámetros de calidad del extracto blando de las hojas de *Petiveria alliacea* L. Realizaron un tamizaje fitoquímico encontrando flavonoides, fenoles y taninos, azúcares reductores, alcaloides, quinonas, cumarinas, triterpenos y esteroides; aminoácidos, saponinas y leucoantocianidinas. Los mismos que evidencian hallazgos similares a nuestra investigación.

Segun *Illnait MT, et al.* (2010) “Efecto antifúngico de un extracto de *Petiveria alliacea* L. La actividad antifúngica *in vitro* fue evaluada mediante procedimientos de difusión en agar y dilución en caldo. La concentración final de células en el medio (Sabouraud con EHAPAL al 0; 0,5; 2,5; 5 y 10 % fue de $0,5 \cdot 10^3$ levadura se definió como concentración mínima inhibitoria (CMI) la menor concentración del extracto que inhibiera al menos el 50 % del crecimiento al compararlo con el control de crecimiento de cada cepa. De las 11 cepas estudiadas, 9 fueron totalmente inhibidas en presencia del extracto al 10 % y seis con él al 7.5. Nuestra investigación se realizó la misma planta *Petiveria alliacea* L. en un extracto hidroalcoholica al 70 %, aplicando diferentes concentraciones 50mg/mL, 100mg/mL y 150mg/mL, la variación fue que *Illnait* trabajo con agua destilada y el nuestro fue Dimetilsulfoxido, en ambos casos se evidencia que el solvente no tuvo actividad inhibitoria, pero fueron buenos diluyentes para las concentraciones propuestas. Hicieron más concentraciones que nosotros, pero más adelante podríamos realizarlas. En ambos trabajos se ha utilizado difusión en agar, en nuestra investigación la concentración óptima fue el de 150 mg/mL.

Ruiz J. (2013) “Actividad antifúngica *in vitro* y concentración mínima inhibitoria mediante microdilución de ocho plantas medicinales” Demostró que una de las extracciones más conocidas son la etanolica o hidroalcoholica y es también favorable para trabajar en la actividad antifúngica en microbiología, aunque ninguna de las plantas es *Mucura*, presentan inhibición, en ambas investigaciones usando el mismo control positivo Fluconazol, dando una inhibición buena para el halo, considerando como controles de susceptibilidades: un blanco Dimetil sulfoxido DMSO para descartar que la actividad inhibitoria fuese por el solvente del extracto hidroalcohólico y un control del efecto antifúngico seleccionando Fluconazol ya que este es uno de los fármacos con actividad antifúngica, para *candidas albicans* que también la hemos trabajado en la tesis.

La escala de Duraffourd utilizada para determinar el efecto inhibitorio *in vitro* según diámetro de inhibición puede ser 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 y sumamente sensible (+++) para un diámetro superior a 20 mm.

Después de realizar el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Petiveria alliacea* L. "Mucura", y probar el efecto antifúngico en cepas de *Candida albicans*, *in vitro*, y haber medido los halos según la escala de Duraffourd se determinó lo siguiente:

El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Petiveria alliacea* L. "Mucura" a una concentración de 50 mg/mL presenta efecto antifúngico con una sensibilidad media.

El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Petiveria alliacea* L. "Mucura" a una concentración de 100 y 150 mg/mL presenta efecto antifúngico con una sensibilidad sumamente sensible.

Estos resultados se manejaron bajo base estadística de análisis de Varianza demostrando que no existe homogeneidad en las dosis tratadas con un nivel de significancia del 95%.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

1. A través del análisis de identificación de metabolitos realizados a “Múcura” se identificó metabolitos secundarios donde dio positivo para: Alcaloides, Compuestos fenólicos y Flavonoides.

2. Se determinó que el extracto hidroalcohólico, en sus concentraciones: 50mg/mL, 100mg/mL y 150mg/mL de las hojas de *Petiveria alliacea* L. “Mucura” presenta efecto antifúngico, la concentración óptima fue el de 150 mg/mL.

3. En el análisis comparativo de los halos de inhibición, se observó que existe 88.58% de efecto antifúngico comparándose con el fluconazol 100% frente a las cepas de *Candida albicans*.

5.2. RECOMENDACIONES

1. Se desarrollen nuevas investigaciones a partir de estos resultados a fin de que se pueda corroborar el efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Petiveria alliacea* "Mucura."
2. Realizar otros estudios, considerando nuevas técnicas y procedimientos que corroboren el nivel de concentración óptimo del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Petiveria alliacea* (Múcura), que permitan más adelante su utilidad como componentes de medicamentos antifúngicos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Hurley R. Infección recurrente por Candida. Clin Obstet Gynecol; 1981; 8: 209-13.
2. Sobel J. Vulvovaginal candidosis. Lancet 2007; 369: 1961-71.
3. Achkar JM, Fries BC. Infecciones por Candida del tracto genitourinario. Clin Microbiol Rev 2010; 23(2):253-73.
4. Gonçalves B, Ferreira C, Alves CT, Henriques M, Azeredo J, Silva S. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiología, microbiología y factores de riesgo. Crit Rev Microbiol 2015; 21:1-23
5. Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia. Diagnóstico y tratamiento de las infecciones vulvovaginales. Prog Obstet Ginecol. 2016; 59:350-362.
6. Zaa C, Valdivia M, Marcelo A. Efecto antiinflamatorio y antioxidante del extracto hidroalcohólico de *Petiveria alliacea*. Rev Peru Biológica. 2012; 19(3): 329 – 334.
7. Ruiz J. Actividad antifúngica in vitro y concentración mínima inhibitoria mediante microdilución de ocho plantas medicinales (tesis para obtener el grado de magíster) Perú; Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2013.
8. Soto M. Metabolitos secundarios y efectos antibacteriano in vitro de extracto hidroetanólico de *Cantua*. Arnaldoa. 2014; 21(1): 81-90.
9. Batista A, Urdaneta I, Colón M. Efecto protector de *Petiveria alliacea L.* (Anamú) sobre la inmunosupresión inducida por fluoruracilo en ratones. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 2011;10(3):256-264. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85618379009>.
10. Illnait MT, Illnait J y Blanco A. “Efecto anti fúngico de un extracto de *Petiveria alliacea L.*” Revista CENIC Ciencias Biológicas, 2010; 41(1): 79-82.
11. María T. Illnait-Z J, Illnait-F* y Blanco A. Efecto antifúngico de un extracto de *Petiveria alliacea L.* Cuba: Laboratorio de Micología del Instituto “Pedro Kourí: 2009.

12. Ronald Selvin Salmerón Altamirano Utilización de la Planta de Anamú (*Petiveria alliacea*), en el tratamiento de la mastitis caprina, en la Finca Santa Rosa de la Universidad Nacional Agraria (UNA). Septiembre, 2006 Managua, tesis Nicaragua.
13. Espiritugaiacom. Espiritugaiacom. [En línea]. Disponible en: <http://www.espiritugaia.com/Pasiflora.htm> [Consultado el 14 de enero de 2018].
14. Muñoz I. Evaluación de los contenidos metabólicos en cultivos de células de *Petiveria alliacea* L (Tesis para obtener el título de magíster). Colombia: Universidad de Colombia; 2011.
15. Pappas PG. Invasive candidiasis. *Infect Dis Clin N Am*. 2006; 20: 485-506.
16. Pappas PG, Rex JH, Lee J, Hamill RJ, Larsen RA, Powderly W, et al. Un estudio observacional prospectivo de la candidemia: epidemiología, terapia e influencias sobre la mortalidad en pacientes adultos y pediátricos hospitalizados. *Clin Infect Dis*. 2003; 634-643.
17. Pittet D, Garbino J. Infecciones fúngicas en la enfermedad crítica. *Curr Opin Crit Care*. 1995; 1: 369-380.
18. Smith P, Steinbach W, Benjamin DK Jr. Candidiasis neonatal. *Infect Dis Clin North A*. 2005; 19: 603-615.
19. Reissa E, Lasker B, Iqbal N, James M, Arthington-Skaggs B. Epidemiología molecular de la sepsis por *Candida parapsilosis* a partir de investigaciones de brotes en unidades de cuidados intensivos neonatales. *Infect Genet Evol*. 2008; 8: 103-109.
20. Pappas P, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK Jr, Calandra T, Edwards Jr, et al. Pautas de práctica clínica para el tratamiento de Candidiasis. *Clin Infect Dis*. 2009; 48(5): 503-535.
21. Rippon, JW *Micología Médica; Hongos y Actinomicetos patógenos*. (3ra ed.). México: Mc Graw Hill; 1990.
22. Pontón J. El diagnóstico Microbiológico independiente del cultivo en la Candidiasis Invasora. Importancia de los marcadores fúngicos. *Rev Iberoam Micol* 2006; 23: 20-25.
23. Pittet D, Monod M, Suter PM, Frenk E, Auckenthaler R. *Candida* colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients. *Ann Surg* 1994; 220: 751-58.

24. Goodman J, Winston D, Greenfield R, et al. A controlled trial of fluconazole to prevent fungal infections in patients undergoing bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 1992; 326: 845-51.
25. Denning DW, Baily GG, Hood SV. Azole resistance in *Candida*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997; 16: 261-
26. Prvademecum.com. PR Vademecum. [Online]. Available from: <http://mx.prvademecum.com/producto/> [Accessed 4 abril 2018].
27. Carrión J, García C. Preparación de extractos vegetales: determinación de eficiencia de metódica (Tesis para la obtención de título de Bioquímica y Farmacéutica). Ecuador: Universidad de Cuenca; 2010.
28. Selles E, Sánchez J, Solán C, Suiñe J, Tico J. Tratado de Farmacia Galénica, Madrid, 1992.
29. Diccionario Oxford. Estados Unidos: University Press; 2018. Taxonomía.
30. Chambi E. Actividad Antiflamatoria del extracto hidroalcohólico de la raíz de *Altea (Acaulimalva rhizantha)* en ratas inducidas a cistitis (Tesis para obtener título de Químico Farmacéutico y Bioquímico). Lima: Universidad Garcilazo de la Vega; 2018.
31. Martin KW, Ernst E. Hierbas medicinales para el tratamiento de infecciones fúngicas: una revisión sistemática de ensayos clínicos controlados. *Mycosis*. 2004; 47:87-92.

ANEXOS

Anexo 1: Matriz de consistencia

Efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Petiveria alliacea</i> L. (Mucura) frente a cepas de <i>Candida albicans</i> <i>in vitro</i> .						
PROBLEMA GENERAL	OBJETIVO GENERAL	HIPOTESIS GENERAL	VARIABLES	DIMENSIONES	INDICADORES	METODOLOGIA
¿El extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Petiveria alliacea</i> L. (Mucura) tendrá efecto antifúngico sobre cepas de <i>Candida albicans</i> <i>in vitro</i> ?	Determinar el efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Petiveria alliacea</i> L. (Mucura) en cepas de <i>Cándida albicans</i> <i>in vitro</i> .	Existe efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Petiveria alliacea</i> L. (Mucura) en cepas de <i>Cándida albicans</i> , <i>in vitro</i> .	V.I Extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Petiveria alliacea</i> L. (Mucura).	V.I. Fitoquímica y Microbiológico	V.I. Identificación de metabolitos secundarios. Concentración: 50, 100 y 150 mg/mL	Diseño: Experimental Tipo: Aplicada Nivel: Explicativo Población: 50 arbustos de <i>Petiveria alliacea</i> L. (Mucura). Muestra: Extracto hidroalcohólico de <i>Petiveria alliacea</i> L. (Mucura). Instrumento: ficha de observación ad-hoc Instrumento de recolección de datos Técnica: Observación estructurada no participante de laboratorio. Procesamiento y análisis de datos: Análisis descriptivo e inferencial con los programas Excel mediante pruebas: -Anova.
PROBLEMAS ESPECIFICOS	OBJETIVOS ESPECIFICOS	HIPOTESIS ESPECIFICAS	VARIABLES	VARIABLES	VARIABLES	
<p>1. ¿El extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Petiveria alliacea</i> L. (Mucura) presentará metabolitos secundarios?</p> <p>2. ¿Cuál será la concentración óptima del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Petiveria alliacea</i> L. (Mucura) que posee efecto antifúngico <i>in vitro</i> por el método de difusión en Agar?</p> <p>3. ¿Cómo será el efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Petiveria alliacea</i> L. (Mucura) <i>in vitro</i> por el método de difusión en Agar comparado con el fármaco Fluconazol?</p>	<p>1. Identificar la presencia de metabolitos secundarios en el extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Petiveria alliacea</i> L. (Mucura).</p> <p>2. Determinar la concentración óptima del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Petiveria alliacea</i> L. (Mucura) que posee efecto antifúngico <i>in vitro</i> por el método de difusión en Agar.</p> <p>3. Determinar el efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Petiveria alliacea</i> L. (Mucura) <i>in vitro</i> por el método de difusión en Agar comparado con el fármaco Fluconazol.</p>	<p>1. Existen algunos metabolitos secundarios en el extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Petiveria alliacea</i> L. (Mucura)</p> <p>2. Existe una concentración óptima del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Petiveria alliacea</i> L. (Mucura) que posee efecto antifúngico <i>in vitro</i> por el método de difusión en Agar.</p> <p>3. Existe relación del efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Petiveria alliacea</i> L. (Mucura) <i>in vitro</i> con la acción antifúngica de fármaco Fluconazol,</p>	V.D Efecto antifúngico en cepas de <i>Candida Albicans</i> .	V.D Tamizaje Fitoquímico. Solubilidad. Cromatografía en capa fina. Halo inhibitorio frente a la cepa de <i>Candida albicans</i> .	V.D Cambios en el diámetro del Halo inhibitorio, medido con un vernier.	

Anexo 2: Testimonio fotográfico

Hojas de *Petiveria alliacea* “Mucura”



Secado de las hojas de *Petiveria alliacea* “Mucura” en la estufa a 40 °C



Triturado y macerado de las hojas de *Petiveria alliacea* “Mucura”



Filtrado del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Petiveria alliacea* "Mucura"



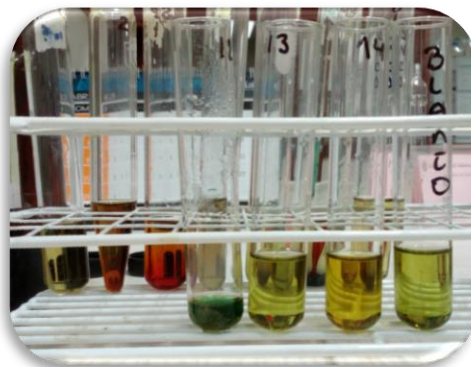
La muestra filtrada en el Rotavapor y luego en la Estufa



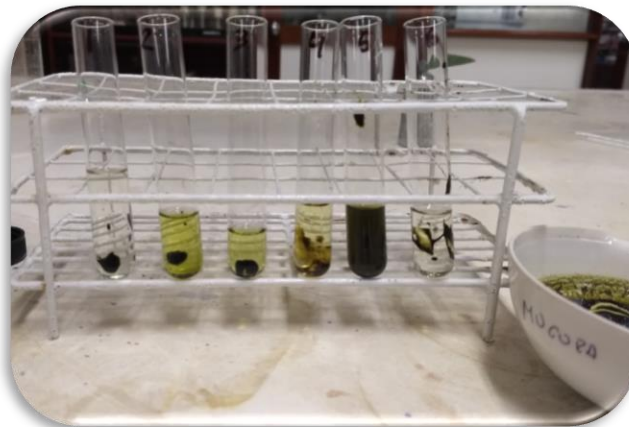


Screening Fitoquímico del extracto de las hojas de *Petiveria alliacea* "Mucura"



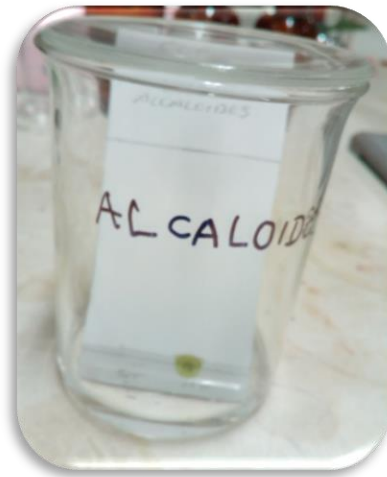
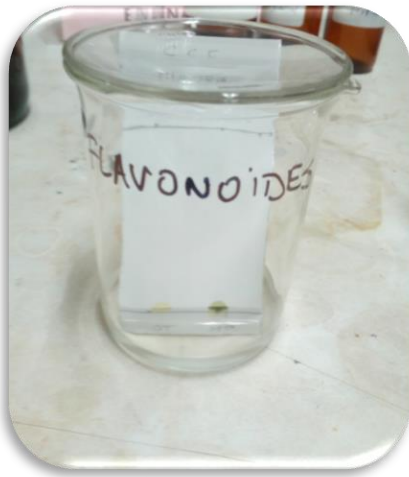


Prueba de Solubilidad



Cromatografía en capa fina de las hojas de la Taya – (Flavonoides y Alcaloides)



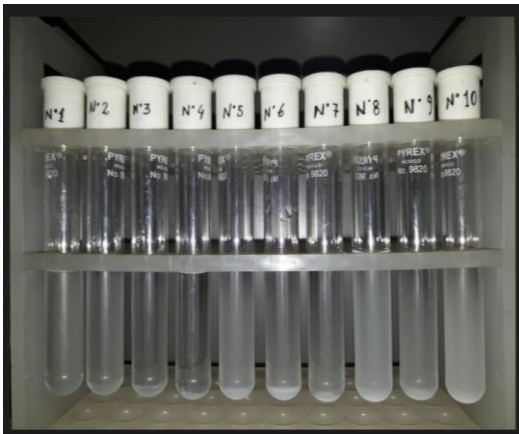


Reactivación de los cultivos de cepa *Candida albicans*



La cepa de *Candida albicans* sembrado en Agar Sabouraud por 24 h a 37 °C.

Preparación y estandarización de los inóculos de cepa *Candida albicans*

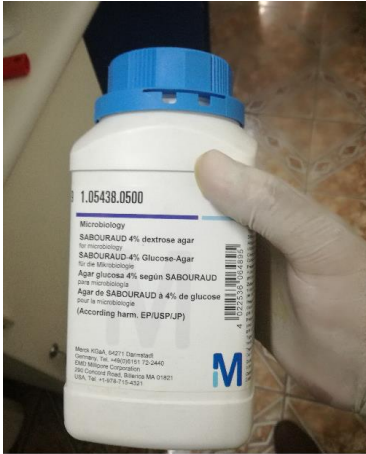


Nefelómetro de Mac Farland



Cepa suspendidas en caldo Tioglicolato, a partir de este se realizó una dilución con solución salina fisiológica estéril

Preparación del medio de cultivo



Medio de Agar Sabouraud



Colocar el medio de cultivo Agar Sabouraud en un Erlenmeyer 250 ml



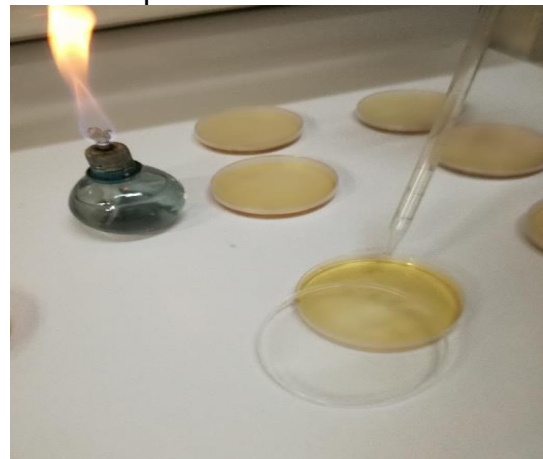
4,5 g de medio Agar Sabouraud por cada 100 ml de agua destilada, homogenizar.



Autoclavar del medio de cultivo a 121°C y 15 lb de presión por un periodo de 15 minutos.

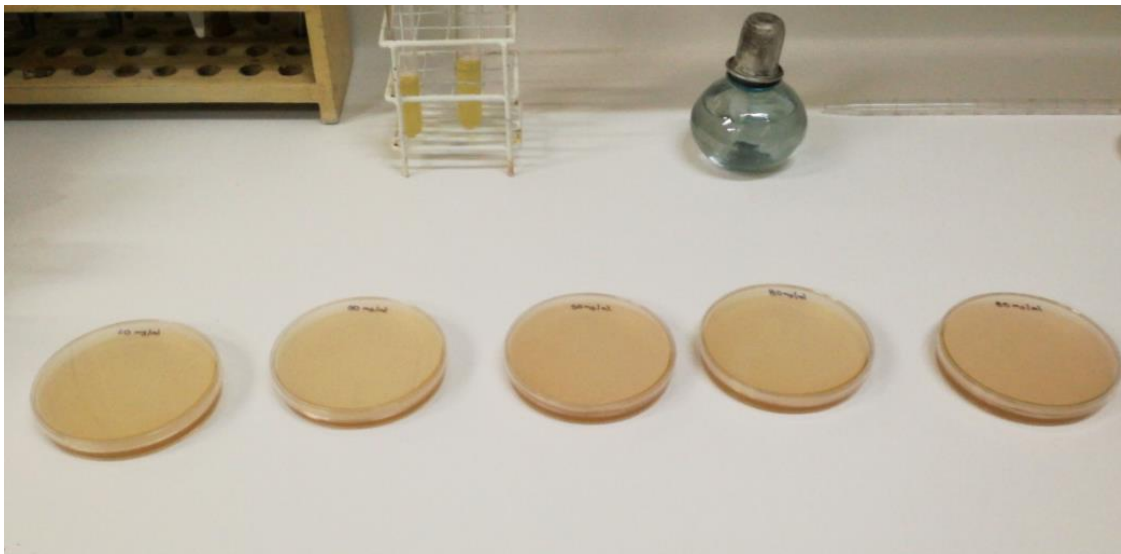


Empleando la micropipeta un volumen de 100 μ L del inóculo estandarizado de



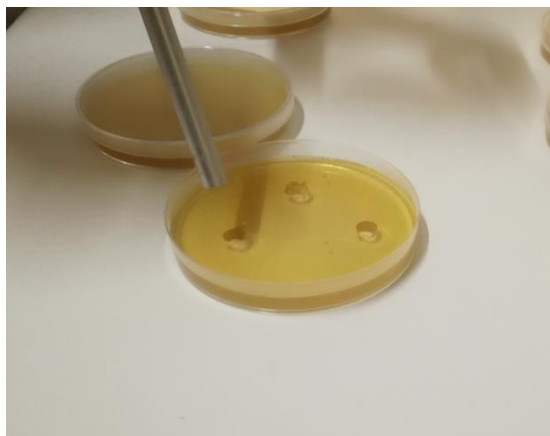
Empleando una pipeta de 25 ml depositamos el Agar Sabouraud que

Candida albicans por cada 100 mL de agar preparado, homogenizando con movimientos circulares. contiene el inóculo estandarizado de *Cándida albicans* en una placa Petri.

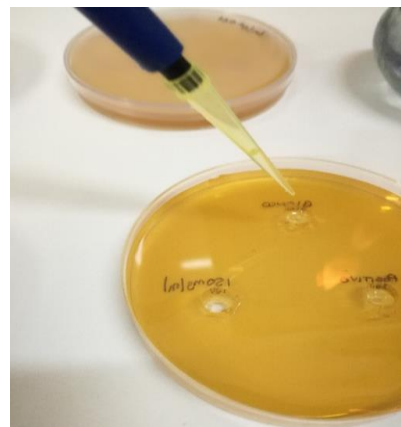


Dejar solidificar por un lapso mínimo de 10 minutos a temperatura ambiente.

Determinación de la actividad Antibacteriano

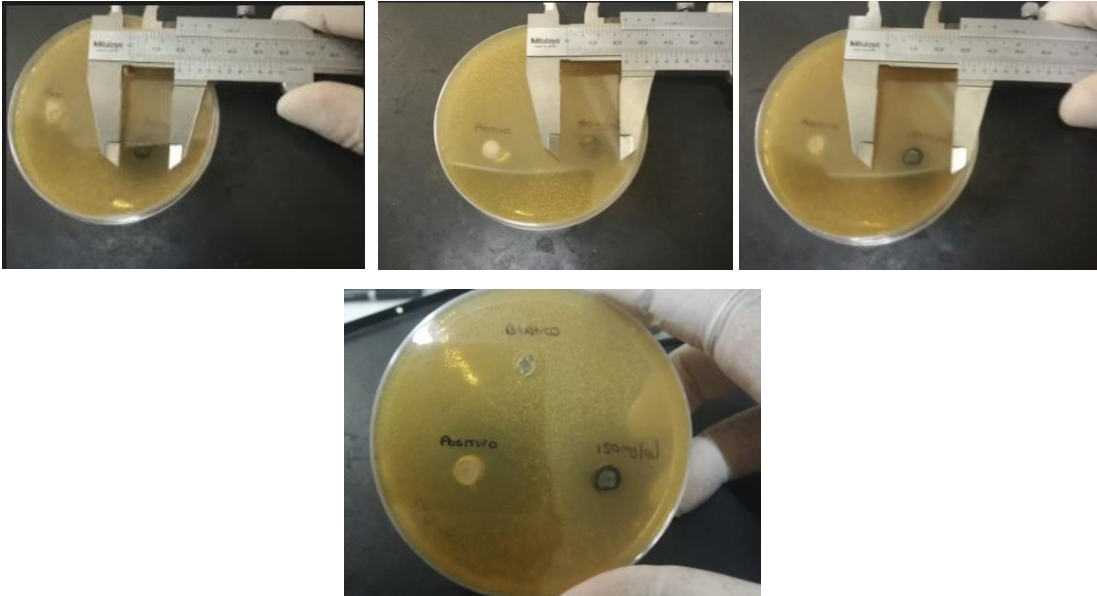


Se hicieron excavaciones en número de tres por cada placa de 8mm de diámetro y 8 mm de profundidad empleando un sacabocado estéril.



Inoculación del extracto hidroalcohólico de las hojas de la *Petiveria alliacea* "Mucura" (concentraciones de 50%, 100% y 150%), Dimetil Sulfoxido DMSO y Fluconazol, Rotular cada una de las placas y proceder a incubar las placas a 37°C por un periodo de 24 horas.

Lectura de Resultados



Una vez transcurrido el tiempo de incubación, retirar las placas de la incubadora y proceder a medir los diámetros de los halos de inhibición empleando el vernier.

Preparación del Medio de Cultivo “Agar Sabouraud”

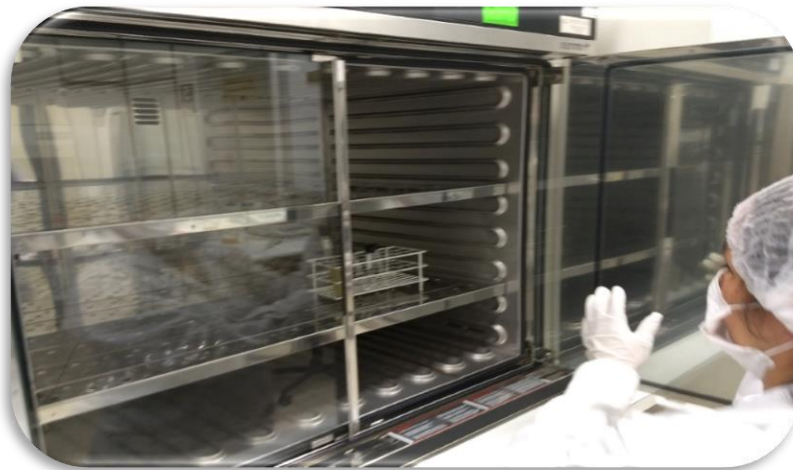




Autoclavar el medio de cultivo a 121°C por un tiempo de 15 minutos



Estandarización de la cepa de *Candida albicans*



Se verte 100 μ L de la cepa estandarizada por cada 100 mL de medio de cultivo, y se homogeniza.



Empleando la pipeta de 25 mL se deposita el Agar que contiene el inóculo estandarizado de *Candida albicans* en la placa Petri y se deja reposar por 10 minutos.




Se hacen las excavaciones con el Sacabocado estéril, se verte 100 μ L de la muestra así como del Fluconazol y se lleva a Incubar.



Anexo 3. Reporte por espectrofotometría Uv- Vis.

COPIA CONTROLADA

	SERVICIO DE CONTROL DE CALIDAD	Código y Versión: FQ-FR-035.00
	ÁREA DE ANÁLISIS FÍSICOS Y QUÍMICOS	Fecha de Emisión: 2016-01-11
	REPORTE DE CONTENIDO POR ESPECTROFOTOMETRÍA Uv- Vis	Página 1 de 1

DATOS DEL PRODUCTO:			
Nombre:	EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DE MUCURA	Fabricante:	*****
Presentación:	Muestra Líquida	Fecha de Vencimiento:	S/F
Lote:	*****	Norma Técnica:	Técnica Interna SCC-UPCH
Código SCC-UPCH:	*****	Fecha de análisis:	2018-04-09

SISTEMA ESPECTROFOTOMETRICO:			
Equipo:	ESPECTROFOTOMETRO UV-VIS	Código:	EQ-FQ-32
Longitud de onda:	415 nm		

DATOS DEL ESTÁNDAR:			
Nombre:	QUERCITINA	Primario:	<input checked="" type="checkbox"/>
LOTE:	A104792 812	Secundario:	<input type="checkbox"/>
Working Std:	<input type="checkbox"/>	Fecha de Vencimiento:	*****
Potencia:	100.0	% T/C	
Peso molecular en forma de Sal:	-	Código:	***
Peso molecular en forma de Base:	-	Humedad:	*** %
Peso:	50.0	mg	
Volumen enrase:	50	ml	

Diluciones de la curva:			
24 ug /ml.	Vol. dilución 1:	1.2 ml.	100 ug /ml.
	Vol. enrase 1:	50 ml.	Vol. dilución 1:
			5 ml.
			200 ug /ml.
			Vol. dilución 1:
			10 ml.
			Vol. enrase 1:
			50 ml.

mg/mL	Factor de corrección	(mg/mL) Corregido	Absorbancia
0.02400	1	0.02400	0.10840
0.02400	1	0.02400	0.11027
0.02400	1	0.02400	0.11304
0.10000	1	0.10000	0.53547
0.10000	1	0.10000	0.53755
0.10000	1	0.10000	0.53879
0.20000	1	0.20000	1.12840
0.20000	1	0.20000	1.12970
0.20000	1	0.20000	1.13010

$y = bx + a$

ECUACIÓN DE LA RECTA: $Y = 5.796 x - 0.034$

a: -0.034
b: 5.796

DATOS DE LA MUESTRA EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DE MUCURA			
Peso molecular en forma de Base:	-		
Peso:	50.0	mg	Volumen enrase: 50 ml.

Diluciones de la curva:			
24 ug /ml.	Vol. dilución 1:	1.2 ml.	100 ug /ml.
	Vol. enrase 1:	50 ml.	Vol. dilución 1:
			5 ml.
			200 ug /ml.
			Vol. dilución 1:
			10 ml.
			Vol. enrase 1:
			50 ml.

mg/mL	Factor de corrección	(mg/mL) Corregido	Absorbancia
0.02400	1	0.02400	0.10840
0.02400	1	0.02400	0.11027
0.02400	1	0.02400	0.11304
0.10000	1	0.10000	0.53547
0.10000	1	0.10000	0.53755
0.10000	1	0.10000	0.53879
0.20000	1	0.20000	1.12840
0.20000	1	0.20000	1.12970
0.20000	1	0.20000	1.13010

$y = bx + a$

ECUACIÓN DE LA RECTA: $Y = 5.796 x - 0.034$

a: -0.034
b: 5.796

DATOS DE LA MUESTRA EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DE MUCURA			
Peso o volumen de muestra:	0.20	(ml)	Volumen de enrase: 20 (ml)

CÁLCULOS:					
MUESTRA		ABSORBANCIA			
MUESTRA A1		1.45730	1.46130	1.45890	
MUESTRA		mg / mL		RSD	
MUESTRA		24.5667	24.6357	24.5943	0.1412
					PROMEDIO
					24.60

RESULTADOS:	24.60 mg de Quercitina/ ml. de extracto
ESPECIFICACIONES/ OBSERVACIONES:	Los Flavonoides Totales se expresan en mg equivalentes de Quercitina /ml. de extracto
CONCLUSIÓN:	*****

E. OLIVAR ANALISTA	2018-04-09 FECHA DE REPORTE
-----------------------	--------------------------------



Anexo 4. Certificado botánico de *Petiveria alliacea* L. (*Mucura*)

Hamilton W. Beltrán S.
Consultor Botánico
Calle Natalio Sánchez 251- Jesús María
hamiltonbeltran@yahoo.com

CERTIFICACION BOTANICA

El Biólogo colegiado y autorizado por el Inrena según RD. N° 334-2013-MINAGRI-DGFFS/DGEFFS, con Registro N° 37, certifica que la planta proporcionada por, MERY ISABEL PRADO HENOSTROZA y JENNY JANET LOPEZ ASTOCONDOR, ha sido estudiada científicamente y determinada como *Petiveria alliacea* y de acuerdo al Sistema de Clasificación de Cronquist 1981, se ubica en las siguientes categorías:

Reino: Plantae
División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Subclase: Caryophyllidae
Orden: Caryophyllales
Familia: PHYTOLACCACEAE
Especie: *Petiveria alliacea* L.

Se expide la presente certificación a solicitud de las interesadas para los fines que estime conveniente.

Lima, 27 febrero 2018


Blgo. Hamilton Beltrán

Hamilton Wilmer Beltrán Santiago
Biólogo - Botánico
CRP. 2719

Anexo 5. Ficha de observación ad- hoc de la marcha fitoquímica.

FICHA DE OBSERVACION AD-HOC DE LA MARCHA FITOQUIMICA

EFFECTO ANTIFUNGICO DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DE LAS HOJAS DE MUCURA (*Petiveria alliacea*) FRENTE A CEPAS DE *Candida albicans* IN VITRO

INSTRUCCIONES

Antes de iniciar con la observación, procure encontrarse en un estado de equilibrio emocional y somático.

Si se siente cansado, estresado o enfermo, suspenda la observación.

Procure realizar todas las mediciones bajo las mismas condiciones de comodidad.

En el caso de no tener certeza sobre la medición de alguna unidad de análisis, descarte su evaluación.

Registre los datos sin borrones ni enmendaduras.

Los espacios en los que no pueda registrar información, táchelos con una línea

MARCHA FITOQUÍMICA DE LA MUCURA (<i>Petiveria alliacea</i>)				
Nº	Metabolito	Reactivo de Reacción	Reacción Positiva	Resultado
1.	CARBOHIDRATOS	Fehling A y Fehling B	Precipitado anaranjado ladrillo	+
2.	ALMIDÓN	Lugol	Coloración oscura	-
3.	CETONAS	2,4 DNPH	Formación de anillo rojizo	-
4.	ALCALOIDES	Mayer	Precipitado blanco	+
		Wagner	Precipitado marrón	+++
		Dragendorff	Precipitado rojo o naranja	+++
		Scheibler	Precipitado blanco	-
		Sonneschein	Precipitado naranja	-
		Reineckato	Coloración rosa	++
5.	COMPUESTOS FENÓLICOS	FeCl ₃	Coloración verde	++
6.	TANINOS	Gelatina 1%	Precipitado denso blanco	+
7.	FLAVONOIDES	Shinoda	Flavanoles: Rojo a magenta	+
8.	AMINOÁCIDOS	Ninhidrina	Color rosado	+
9.	NAFTAQUINONAS, ANTRAQUINONAS Y ANTRANONAS	Bortranger (NaOH 5%)	Coloración roja	-

Leyenda:

(-) : La coloración o precipitado no se evidencia. (++) : La coloración o precipitado se evidencia moderadamente.

(+) : La coloración o precipitado se evidencia poco. (+++) : La coloración o precipitado se evidencia notablemente

Anexo 6. Validación del instrumento

CUESTIONARIO AD-HOC DE RECOLECCION DE DATOS

EFFECTO ANTIFUNGICO DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DE LAS HOJAS DE MUCURA (*Petiveria alliacea*) FRENTE A CEPAS DE *Candida albicans* IN VITRO

Después de revisado el instrumento, es valiosa su opinión acerca de lo siguiente:

- MENOS DE**
50 – 60 – 70 – 80 – 90 – 100
1. ¿En qué porcentaje estima que con este instrumento se lograrán los objetivos propuestos?.....() () () () () (x)

 2. ¿En qué porcentaje considera que los ítems están referidas a los conceptos del tema?.....() () () () () (x)

 3. ¿Qué porcentaje de un ítems planteados cree que son suficientes para lograr los objetivos?.....() () () () (x) ()

 4. ¿En qué porcentaje estima que los ítems del instrumento son de fácil comprensión?.....() () () () () (x)

 5. ¿Qué porcentaje de los ítems considera usted que siguen una secuencia lógica?.....() () () () () (x)

 6. ¿En qué porcentaje valora usted que con este instrumento se obtendrán datos similares si se explicara en otras muestras?.....() () () () () (x)

SUGERENCIAS

1. ¿Qué ítems considera usted que deberían agregarse?

Considero que los ítems propuestos son los indicados

2. ¿Qué ítems estima que deberían eliminarse?

Considero que los ítems propuestos son los indicados

3. ¿Qué ítems considera que deberán reformularse o precisarse mejor?

Considero que el ítem para Flavonoides debería de ser más detallada con reactivos más específicos.

Fecha: 2018-06-27

Validado por: Erik Olivar Gallegos

Anexo 7. Ficha de observación ad-hoc de la prueba de solubilidad.

**FICHA DE OBSERVACION AD-HOC DE PRUEBA DE
SOLUBILIDAD**

EFFECTO ANTIFUNGICO DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DE LAS HOJAS DE
MUCURA (*Petiveria alliacea*) FRENTE A CEPAS DE *Candida albicans* IN VITRO

INSTRUCCIONES

Antes de iniciar con la observación, procure encontrarse en un estado de equilibrio emocional y somático.

Si se siente cansado, estresado o enfermo, suspenda la observación.

Procure realizar todas las mediciones bajo las mismas condiciones de comodidad.

En el caso de no tener certeza sobre la medición de alguna unidad de análisis, descarte su evaluación.

Registre los datos sin borrones ni enmendaduras.

Los espacios en los que no pueda registrar información, táchelos con una línea

PRUEBA DE SOLUBILIDAD DE LA MUCURA (<i>Petiveria alliacea</i>)			
N°	Solventes	Identificación	Resultado
1.	Alcohol de 96°	Soluble o insoluble	++
2.	Metanol	Soluble o insoluble	+++
3.	Etanol	Soluble o insoluble	++
4.	Cloroformo	Soluble o insoluble	+
5.	Agua	Soluble o insoluble	+++
6.	Isopropanol	Soluble o insoluble	++

Leyenda:

(-) : Insoluble.

(++) : Soluble.

(+) : Poco Soluble.

(+++): Muy Soluble.

Anexo 8. Validación del instrumento

HOJA DE VALIDACION DEL INSTRUMENTO CUSTIONARIO AD-HOC DE RECOLECCION DE DATOS

EFFECTO ANTIFUNGICO DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DE LAS HOJAS DE MUCURA (*Petiveria alliacea*) FRENTE A CEPAS DE *Candida albicans* IN VITRO

Después de revisado el instrumento, es valiosa su opinión acerca de lo siguiente:

- MENOS DE**
50 – 60 – 70 – 80 – 90 – 100
7. ¿En qué porcentaje estima que con este instrumento se lograrán los objetivos propuestos?.....() () () () () (x)
-
8. ¿En qué porcentaje considera que los ítems están referidas a los conceptos del tema?.....() () () () () (x)
-
9. ¿Qué porcentaje de un ítems planteados cree que son suficientes para lograr los objetivos?.....() () () () (x) ()
-
10. ¿En qué porcentaje estima que los ítems del instrumento son de fácil comprensión?.....() () () () () (x)
-
11. ¿Qué porcentaje de los ítems considera usted que siguen una secuencia lógica?.....() () () () () (x)
-
12. ¿En qué porcentaje valora usted que con este instrumento se obtendrán datos similares si se explicara en otras muestras?.....() () () () () (x)

SUGERENCIAS

4. ¿Qué ítems considera usted que deberían agregarse?

Considero que los ítems propuestos son los indicados, ya que otros pueden muy tóxicos y fiscalizados.

5. ¿Qué ítems estima que deberían eliminarse?

Considero que los ítems propuestos son los indicados.

6. ¿Qué ítems considera que deberán reformularse o precisarse mejor?

Considero que hay que tener cuidado con el Cloroformo y con el Metanol este último por ser controlado, pero con mayor accesibilidad.

Fecha: 2018-06-27

Validado por: Erik Olivar Gallegos

Anexo 9. Ficha de observación para determinar el efecto antifúngico

FICHA DE OBSERVACION AD-HOC DE RECOLECCIÓN DE DATOS PARA DETERMINAR EL EFECTO ANTIFUNGICO DE *Petiveria alliacea* (MUCURA) FRENTE A *Candida albicans*

EFECTO ANTIFUNGICO DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DE LAS HOJAS DE MUCURA (*Petiveria alliacea*) FRENTE A CEPAS DE *Candida albicans* IN VITRO

INTRUCCIONES

Antes de iniciar con la observación, procure encontrarse en un estado de equilibrio emocional y somático.

Si se siente cansado, estresado o enfermo, suspenda la observación.

Procure realizar todas las mediciones bajo las mismas condiciones de comodidad.

En el caso de no tener certeza sobre la medición de alguna unidad de análisis, descarte su evaluación.

Registre los datos sin borrones ni enmendaduras.

Los espacios en los que no pueda registrar información, táchelos con una línea

TABLA

Efecto antifúngico de *Petiveria alliacea* (Mucura) frente *Candida albicans* por el método de difusión en agar (excavación en placa) en 100 µl

Nº DE PLACA	Concentración (mg/mL) del extracto hidroalcohólico de <i>Petiveria alliacea</i> (Mucura) 100 µl				CONTROLES	
					(+) Fluconazol 150 mg/mL	(-) Dimetil Sulfoxido
	Longitud del Halo de Inhibición (mm)					
	10 mg/mL	50 mg/mL	100 mg/mL	150 mg/mL	1 µl	100 µl
1	0	20	23.5	30.1	32.5	0
2	0	20.1	23.2	29.3	32.7	0
3	0	19.7	23.8	29.4	33	0
4	0	19.9	24	29.8	32.2	0
5	0	20.2	23.4	28.6	34	0

Anexo 10. Validación del instrumento

HOJA DE VALIDACION DEL INSTRUMENTO CUSTIONARIO AD-HOC DE RECOLECCION DE DATOS

EFFECTO ANTIFUNGICO DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DE LAS HOJAS DE MUCURA (*Petiveria alliacea*) FRENTE A CEPAS DE *Candida albicans* IN VITRO

Después de revisado el instrumento, es valiosa su opinión acerca de lo siguiente:

MENOS DE

50 – 60 – 70 – 80 – 90 – 100

13. ¿En qué porcentaje estima que con este instrumento se lograran los objetivos propuestos?.....() () () () () (x)
-
14. ¿En qué porcentaje considera que los ítems están referidas a los conceptos del tema?.....() () () () () (x)
-
15. ¿Qué porcentaje de un ítems planteados cree que son suficientes para lograr los objetivos?.....() () () () () (x)
-
16. ¿En qué porcentaje estima que los ítems del instrumento son de fácil comprensión?.....() () () () () (x)
-
17. ¿Qué porcentaje de los ítems considera usted que siguen una secuencia logica?.....() () () () () (x)
-
18. ¿En qué porcentaje valora usted que con este instrumento se obtendrán datos similares si se explicara en otras muestras?.....() () () () () (x)

SUGERENCIAS

7. ¿Qué ítems considera usted que deberían agregarse?

Considero que los ítems propuestos son los indicados.

8. ¿Qué ítems estima que deberían eliminarse?

Considero que los ítems propuestos son los indicados.

9. ¿Qué ítems considera que deberán reformularse o precisarse mejor?

Considero que se tomaron las medidas para que el trabajo abarque lo esperado.

Fecha: 2018-06-27

Validado por: Erik Olivar Gallegos