UNIVERSIDAD REGIONAL AUTÓNOMA DE LOS ANDES

UNIANDES

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN FARMACIA CLÍNICA Y HOSPITALARIA

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL GRADO ACADÉMICO DE MAGISTER EN FARMACIA CLÍNICA Y HOSPITALARIA

TEMA:

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA IN VITRO DE MENTHA FRENTE A CANDIDA ALBICANS

AUTOR: **DR. BUCAY MOROCHO LUIS CARLOS**

ASESORES: DR. VITERI RODRÍGUEZ JUAN ALBERTO, MSc.
ING. OÑA CISNEROS FABIAN, MSc. PhD(c)

AMBATO - ECUADOR

2018

APROBACIÓN DE LOS ASESORES DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

CERTIFICACIÓN

Quienes suscribe, legalmente CERTIFICAN QUE: El presente Trabajo de Titulación realizado por el señor **Luis Carlos Bucay Morocho**, Maestrante del Programa de Maestría de Farmacia Clínica y Hospitalaria, Facultad de Ciencias Médicas, con el tema: **"EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA IN VITRO DE MENTHA FRENTE A CANDIDA ALBICANS"**, ha sido prolijamente revisado, y cumple con todos los requisitos establecidos en la normativa pertinente de la Universidad Regional Autónoma de los Andes -UNIANDES-, por lo que apruebe su presentación.

Ambato, mayo de 2018

.....

DR. VITERI RODRÍGUEZ JUAN ALBERTO, MSc.

ASESOR

.....

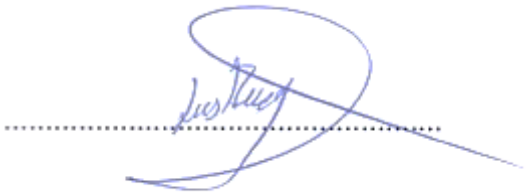
ING. OÑA CISNEROS FABIAN, MSc. PhD.

ASESOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, **Luis Carlos Bucay Morocho**, maestrante del Programa de Maestría de Farmacia Clínica y Hospitalaria, Facultad de Ciencias Médicas, declaro que todos los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, previo a la obtención del Grado Académico de **MAGÍSTER EN FARMACIA CLÍNICA Y HOSPITALARIA**, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas, por lo que son de mi exclusiva responsabilidad.

Ambato, mayo de 2018



Dr. Luis Carlos Bucay Morocho

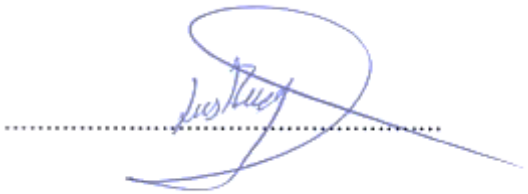
CI 0603205303

AUTOR

DERECHOS DE AUTOR

Yo, **Luis Carlos Bucay Morocho**, declaro que conozco y acepto la disposición constante en el literal d) del Art. 85 del Estatuto de la Universidad Regional Autónoma de Los Andes, que en su parte pertinente textualmente dice: El Patrimonio de la UNIANDES, está constituido por: La propiedad intelectual sobre las Investigaciones, trabajos científicos o técnicos, proyectos profesionales y consultaría que se realicen en la Universidad o por cuenta de ella;

Ambato, mayo de 2018



Dr. Luis Carlos Bucay Morocho

CI. 0603205303

AUTOR

DEDICATORIA

Una vez más me permito plasmar en una página de este trabajo de grado, la dedicatoria especialmente a Dios, por haberme bendecido con salud, sabiduría, constancia y perseverancia, para lograr uno más de mis objetivos.

A mi esposa por ser siempre un apoyo durante mi vida, a mis hijos por ser el motor impulsor hacia todas mis metas y a todas aquellas personas que forman parte especial de mi vida, seres que dan amor, paz bienestar, tranquilidad y seguridad incondicional.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad "Uniandes" por buscar y ampliar el desarrollo de los conocimientos a nivel profesional. A los asesores, con quienes se realizó un trabajo de esfuerzo conjunto; por compartir sus conocimientos en el desarrollo y ejecución de la investigación, su paciencia y dedicación.

RESUMEN

El uso de la medicina natural tradicional es actualmente una parte importante relacionada con la salud, en algunos países de Latinoamérica se la conoce como medicina complementaria, la cual históricamente se ha utilizado para mantener la salud, prevenir y tratar enfermedades crónicas.

En el presente proyecto de investigación se propuso determinar si existe algún efecto antimicrobiano significativo contra el microorganismo *Cándida albicans* en el extracto alcohólico o aceite esencial obtenidos a partir de la planta menta. La investigación comprendió tres etapas: el estudio etnofarmacológico, el análisis fitoquímico y el análisis de actividad antimicrobiana.

Al concluir la primera etapa se estableció que las plantas de acuerdo al nivel de uso significativo (UST%), presentan los siguientes valores: menta (29,41%), sábila (23,08%) y manzanilla (21,72%).

En el análisis fitoquímico se determinó la presencia de ciertos metabolitos secundarios de la planta medicinal menta como los terpenoides y compuestos fenólicos (cumarinas, flavonoides, lignina y taninos).

Dentro del análisis microbiológico, se presentó mayor efectividad a una concentración de 100%, obteniéndose halos promedio de 17,67mm y 16,67mm para aceite esencial y extracto etanólico respectivamente. La prueba de varianzas realizada como análisis estadístico determinó que alguna de las medias de las distribuciones de la variable cuantitativa (halos de inhibición) en los extractos y aceites de menta es diferente (15,907 con un valor de $p < 0,05$), afirmando que existen efecto antimicrobiano de la menta sobre *Cándida albicans.*

Palabra claves: Evaluación de la actividad antimicrobiana, Planta medicinal menta, Cándida albicans

ABSTRACT

The use of traditional medicine is currently an important part related to health care, in some countries of Latin America is known as complementary medicine, which historically has been used to maintain the health, preventing and treating chronic diseases.

In the present research project was to determine if there are any significant antimicrobial effect against the organism Candida albicans in the alcoholic extract or essential oil obtained from the plant mint. The research consisted of three stages: the ethnopharmacological study, the phytochemical analysis and the analysis of antimicrobial activity.

At the end of the first stage, it was established that the plants according to the level of significant use (UST%), present the following values: mint (29.41%), Aloe Vera (23.08%) and chamomile (21.72%).

In the phytochemical analysis determined the presence of certain metabolites of the medicinal plant Mentha as terpenoids and phenolic compounds (coumarins, flavonoids, lignin, and tannins).

Within the microbiological analysis was presented greater effectiveness at a concentration of 100%, obtaining an average of 17,67mm halos and 16,67mm for ethanolic extract and essential oil, respectively. The test of variances as statistical analysis determined that some of the means of the distributions of the quantitative variable (halos of inhibition) in the extracts and oils of peppermint are different (15.907 with a value of $p < 0.05$), asserting that there is the anti-microbial effect of Mentha on Candida albicans.

Keywords: Evaluation of the antimicrobial activity, a medicinal plant mint, Candida albicans

ABREVIATURAS

MTC	Medicina tradicional y complementaria
NCCLS	Standards for Antimicrobial. Susceptibility Tests
CCC	Candidiasis cutánea congénita
DIM	Dosis infectiva mínima
ESCOP	The European Scientific Cooperative on Phytotherapy
MBC	Concentración mínima bactericida
MIC	Concentración mínima inhibitoria
OMS	Organización Mundial de la Salud
PMN	Leucocitos polimorfonucleares
SNC	Sistema nervioso central.
UCI	Unidad de cuidados intensivos
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana

ÍNDICE GENERAL

PORTADA

APROBACIÓN DE LOS ASESORES DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

DERECHO DE AUTOR

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTO

RESUMEN

ABSTRACT

ABREVIATURAS

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN 1

Planteamiento del problema 5

Formulación del problema 6

Delimitación del problema 6

Identificación de la línea de investigación 6

Objetivos 7

Objetivo General 7

Hipótesis 7

Variables de la investigación 7

Justificación del tema 7

CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO 9

1.1 PLANTA MEDICINAL MENTA 9

1.1.1 Generalidades 9

1.1.2 Composición 10

1.1.3 Aplicaciones medicinales 10

1.1.4 Farmacología, interacciones y reacciones adversas 11
1.1.5 Efectos de la planta 13
1.2 FITOQUÍMICA DE LAS PLANTAS MEDICINALES 13
1.2.1 Metabolismo primario 13
1.2.2 Metabolismo secundario 14
1.2.3 Análisis fitoquímico 17
1.2.3.1 Recolección y preparación del material vegetal objeto de estudio 17
1.2.3.2 Screening fitoquímico 18
1.2.3.3 Caracterización de los constituyentes químicos 19
1.3 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA 20
1.3.1 Generalidades 20
1.3.2. Agente microbiano 21
1.3.3 Metodologías para evaluar la actividad antimicrobiana 21
1.4 MICOSIS 26
1.4.1 Aspectos generales 26
1.4.2 Clasificación 27
1.5 CANDIDA ALBICANS 29
1.5.1 Aspectos generales 29
1.5.2 Viabilidad, propagación y transmisión 30
1.5.3 Efectos en la salud 30
1.5.4 Prevención y control 31
1.6 CANDIDIASIS 31
1.6.1 Definición 31
1.6.2 Agentes etiológicos 32
1.6.3 Epidemiología 32
1.6.4 Patogenia 32

1.6.5 Factores desencadenantes de la enfermedad 34
1.6.6 Formas Clínicas de Candidiasis 35
1.6.7 Diagnóstico de laboratorio 37
1.6.8 Tratamiento 38
1.7. Conclusiones parciales del capítulo 39
CAPÍTULO II. MARCO METODOLÓGICO 41
2.1. Caracterización del Sector 41
2.2. Descripción del procedimiento metodológico 41
2.2.1. Diseño de la investigación 43
2.2.2. Población y muestra 44
2.2.3 Metodología a emplear 45
2.2.4. Técnicas 46
2.2.5. Instrumentos 46
2.2.6. Plan de recolección de datos 46
2.2.7. Diseño estadístico 46
CAPÍTULO III. EVALUACIÓN DE RESULTADOS 47
3.1. Procedimiento de la Aplicación de los Resultados de la Investigación 47
3.2. Análisis de los resultados 47
3.3 Conclusiones parciales del capítulo 56
CONCLUSIONES GENERALES 58
RECOMENDACIONES 59
BIBLIOGRAFÍA
ANEXOS

INTRODUCCIÓN

El uso de la medicina natural tradicional es actualmente una parte importante relacionada con la salud, en algunos países de Latinoamérica se la conoce como medicina complementaria, la cual históricamente se ha utilizado para mantener la salud, prevenir y tratar enfermedades crónicas, tal es así que su uso a través del tiempo, ha provocado que a nivel mundial, la Organización mundial de la salud (OMS) en su publicación "Estrategias de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023", proponga a las autoridades sanitarias encontrar soluciones que favorezcan el mejoramiento de la salud y la autonomía de los pacientes, en base a dos objetivos principales: prestar apoyo a los Estados Miembros para que aprovechen la posible contribución de la MNT (Medicina Natural Tradicional) en la salud y promover la utilización segura y eficaz de la MNT mediante la reglamentación de productos, prácticas y profesionales (1).

En el Ecuador la Medicina Alternativa (Acupuntura, Homeopatía y Terapia Neural) así como las terapias alternativas (Neuropatía, la Fitoterapia y Terapia Floral), ya se han regularizado, por la mayor frecuencia de uso (2).

La literatura acerca del uso de las plantas indica que existen pruebas de que los hombres del Neandertal usaban las plantas con fines medicinales, así mismo, a lo largo de la historia existen otros ejemplos bien documentados, como son las figuras de Hipócrates en la medicina griega, Avicena en la árabe y Paracelso en la centroeuropea, que fueron auténticos especialistas en la aplicación de las plantas en medicina. En la actualidad el uso de sustancias naturales de las plantas en el tratamiento de diferentes enfermedades, incluidas las de etiología infecciosa constituye un desafío en la medicina, especialmente en aquellas para las que no existe tratamiento adecuado (3).

En este contexto la Menta piperita dentro de la fitoterapia es una planta aromática, perteneciente a la familia de las Lamiáceas, conocida como black mint en Inglaterra, peppermint en Estados Unidos, y hierbabuena, menta de brandy, menta de caramelo, menta de cordero, menta de bálsamo, o paparaminta en Latinoamérica (3), cuyas propiedades medicinales son utilizadas de varias formas: como droga seca, agua de menta, aceite esencial

puro, mentol y sus derivados, con el fin de tratar enfermedades respiratorias, cardiovasculares, digestivas, e infecciosas (4)

La misma se encuentra de forma silvestre en casi todo el centro sur de Europa, África del Norte y Latinoamérica, siendo una planta muy utilizada en la industria de cosméticos, alimentos y la medicina en esta, es utilizada de varias formas: como droga seca, agua de menta, aceite esencial puro, mentol y sus derivados, con el fin de tratar enfermedades respiratorias, cardiovasculares, digestivas, infecciosas (4).

Con respecto a la actividad antimicrobiana, de las plantas la utilización de sustancias naturales en el tratamiento de diferentes enfermedades, incluidas las de etiología infecciosa constituye en la actualidad un desafío en la medicina, especialmente en aquellas para las que no existe un remedio adecuado (3).

A decir de esto, los aceites esenciales y extractos obtenidos de material vegetal como hierbas, flores, hojas, semillas, ramas, cortezas, han ganado un creciente interés debido a su posible uso como agentes antimicrobianos y antioxidantes dentro de la fitoterapia (5).

Esto ha llevado a dar énfasis en el entendimiento de la palabra natural, que según el Diccionario de la Real Academia Española define, como aquello perteneciente o relativo a la naturaleza, produciendo interés en los elementos naturales que forman la tabla periódica, las sustancias sintetizadas por individuos del reino animal y el reino vegetal, el cual ha sido muy útil en la prestación de sustancias potencialmente útiles y aplicables a las enfermedades producidas por microorganismos (4) .

Numerosas son las investigaciones que se han realizado encaminados hacia la evaluación de actividades de cualidad antimicrobianas en extractos y aceites esenciales de plantas medicinales y aromáticas que podrían conducir a nuevas formas de tratamiento a base de hierbas, especialmente contra las enfermedades infecciosas como la candidiasis, como una búsqueda alternativa de actividades farmacológicas dentro del reino vegetal. Estas investigaciones son puestas de manifiesto en numerosos estudios que se enuncian a continuación:

Un estudio realizado en Colombia buscó establecer el efecto y la posible actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos a partir de *Bauhinia sp., Sambucus nigra, Eichhornia crassipes y Taraxacum officinale* con potencial antimicrobiano frente a siete bacterias y una levadura de importancia clínica en ese país. Las pruebas antimicrobianas se realizaron con diferentes concentraciones de los extractos de las plantas, según las indicaciones de Clinical and Laboratory Standars Institute. Los microorganismos utilizados fueron *Enterococos faecium resistente a vancomicina, Estreptococos pneumoniae, Klebsiella pneumoniae presencia de cepas de K. pneumoniae productoras de carbapenemasa, Providencia rettgeri con presencia de betalactamasas de espectro extendidos, Pseudomonas aeruginosa, Enterobacter cloacae, Escherichia coli, Staphylococcus aureus β-lisina y Candida albicans*. El estudio concluyó que los extractos presentaban diversos grados de inhibición frente a los microrganismos de estudio, siendo el más eficaz los tallos de *T. officinale*, y que los extractos vegetales podrían ser una alternativa de tratamiento para infecciones nosocomiales (6).

Otro estudio realizado en Perú cuyo objetivo fue determinar el efecto antibacteriano y antifúngico invitro del aceite esencial de: *Menta piperita* (Menta), *Origanum vulgare* (Orégano) y *Cymbopogon citratus* (Hierba Luisa) mediante el método de difusión en agar con disco, sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 10746 y *Cándida albicans* ATCC 90028. Los aceites esenciales de dichas plantas se obtuvieron por el método de arrastre por vapor de agua. Para realizar el análisis microbiológico, se utilizó el aceite esencial de Menta al 50 y 100%, Orégano al 50 y 100% y Hierba Luisa al 50% y 90%, asimismo, para obtener concentraciones al 50% y 90%, éstas se diluyeron en agua destilada y DMSO (dimetilsulfóxido). Al realizar las pruebas de sensibilidad invitro se obtuvieron los siguientes resultados: De los tres aceites esenciales el que tuvo mayor efecto sobre *Streptococcus mutans* fue el orégano, frente a *Lactobacillus acidophilus* y *Candida albicans* fue la Hierba Luisa. El aceite esencial de orégano y hierba luisa tienen mayor efectividad antibacteriana y antifúngica que los controles positivos: Clorhexidina al 0.12% y Nistatina, a excepción de la *Menta piperita* (Menta) al 50% que su acción fue menor que los controles positivos (7).

Otra investigación realiza en Perú que investigó la actividad antimicrobiana in vitro de los extractos metanólicos, etanólicos e hidroalcohólicos de cuatro plantas del nor-oriente

peruano, la *cassia reticulata* (planta entera), *Ilex guayusa* Loes (hojas), *Piper lineatum* (hojas), y *menta piperita* (hojas), cuyas especies fueron recolectadas en el departamento de Cajamarca, excepto la menta piperita. Los microorganismos utilizados fueron las bacterias *Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Pseudomonas aeruginosa, Bacillus subtilis y Escherichia coli;* y los hongos *Candida albicans, Aspergillus niger* y *Microsporum canis*. El estudio concluyó que los extractos con la mejor actividad antimicrobiana fueron el *Piper lineatum*, el extracto hidroalcohólico de *Cassia reticulata* y la *menta piperita* (8).

En un estudio realizado en Ecuador sobre la actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos obtenidos, de varios ejemplares de las especies vegetales *Lippia citriodora K* (cedrón), *Ambrosia artemisifolia L* (altamisa), *Taraxacum officinale Weber* (diente de león), *Ageratum conyzoides L*(mastrante), *Piper carpunya Ruiz & Pav* (guaviduca), *Borago officinalis L*(borraja), *Coriandrum sativum L* (cilantro), *Melissa officinalis L* (toronjil), *Cymbopogon citratus S* (hierba luisa), *Artemisia absinthium L* (ajenjo), *Momordica charantia L* (achochilla) y *Moringa oleífera Lam* (moringa), las cuales se probaron frente a cepas de bacterias Gram positiva (*Staphyloccocus aureus*) y Gram negativa (*Escherichia coli y P. aeruginosa*), y una cepa del hongo (*Candida albicans*). Este estudio concluyó que la mayoría de las especies vegetales estudiadas exhibieron un efecto antibacteriano y antifúngico significativo contra las cepas de bacterias Gram (+) y Gram (-), y hongo ensayado (*C. albicans*). Así mismo, todos los extractos analizados, a excepción de los de *L. citriodora y A. conyzoides*, exhibieron una acción bactericida contra todas las cepas bacterianas ensayadas, lo cual refleja la importancia de estas especies en la producción de fitofármacos antibióticos (9).

Se estima que en la parte aérea de las plantas, la filosfera, y especialmente en las hojas, existen alrededor de 106-107 células/cm2 o por mencionar otra medida (108 células/g) de microorganismos, principalmente bacterias, formando parte de la ecología vegetal. Globalmente las plantas producen más de 100.000 productos naturales de bajo peso molecular, también conocidos como metabolitos secundarios, que se diferencian de los primarios en que no son esenciales para la vida de la planta. Esta diversidad tan rica resulta, en parte, de un proceso evolutivo conducido por la selección para adquirir una defensa mejorada frente a los ataques de microorganismos, insectos y otros animales (4).

Así la gran mayoría de los antibióticos utilizados en la medicina moderna son o han sido producidos por microorganismos, tipo levaduras u hongos, que pertenecen al reino vegetal.

Planteamiento del problema

La resistencia a los antibióticos está aumentando en todo el mundo y el Ecuador no escapa a esta problemática. Día tras día están apareciendo y propagándose en todo el planeta nuevos mecanismos de resistencia que ponen en peligro la capacidad para tratar las enfermedades infecciosas comunes. En contraste no hay evidencia científica de los activos de la plantas en especial de la menta que sustente que existe algún efecto antimicrobiano significativo contra la Candida albicans.

Las especies del género *Candida* pertenecen a la familia *Phylum Ascomycotina* clase *Saccharomycetes* que son organismos eucariotas los cuales tienen la particularidad de formar levaduras, pseudohifas e hifas, que tienen la característica de los hongos patógenos para invadir tejido (10) .

Se han identificado aproximadamente 150 especies de *Candida* de las cuales hasta el momento se conocen 15 especies principales causantes de candidemias en el mundo (11) .

Las candidiasis invasoras son un problema médico importante desde hace décadas por su alta mortalidad (30-50%) que se asocia tanto al mal estado de salud de los pacientes como a la virulencia de este hongo. La mayoría de los enfermos que padecen una candidiasis invasora padecen enfermedades previas graves que se suelen acompañar de inmunodeficiencia. La incidencia anual varía entre países pero se estima que entre 20 y 200 pacientes sufren candidiasis invasora por cada millón de habitantes. Esta incidencia es mayor en países como España, Dinamarca o Estados Unidos (12).

En este contexto la *Candida albicans* produce infecciones superficiales que afectan a piel, uñas y mucosas. La piel húmeda y las mucosas oral y vaginal son lugares donde la infección candidiásica es frecuente, sin embargo, las candidiasis más graves (candidiasis diseminadas) se observan en personas inmuno-suprimidas o con enfermedades subyacentes que predisponen a sufrir esta infección, así mismo durante el embarazo, la vejez o la infancia

son frecuentes las candidiasis superficiales, lo mismo que en personas portadoras de prótesis dentales y en diabéticos (13).

Siendo esta la especie más patógena cuya virulencia se debe a un conjunto de atributos relacionados con su habilidad para evadir a los mecanismos de defensa del hospedador, de resistir al tratamiento antifúngico, o de lesionar las células y tejidos que invade (13).

El MSP del Ecuador señala que las infecciones vaginales producidas por la Candida albicans, constituyen una de las razones más frecuentes de consultas prenatales; y son corresponsables de un importante porcentaje de morbilidad materna y morbimortalidad perinatal, sobre todo en lugares de escasos recursos (14).

Formulación del problema

Existe de algún efecto antimicrobiano significativo contra la *Candida albicans* en los extractos y aceite esencial obtenidos a partir de la planta menta.

Delimitación del problema

Con esta investigación se pretende proporcionar información para el personal de salud en general acerca de la planta medicinal denominada menta, en especial el uso adecuado en la fitoterapia conociendo sus límites y posibilidades, poniendo a disposición los posibles efectos frente a la enfermedad infecciosa causada por el microorganismo *Candida albicans*. Dando a conocer los principios activos de la planta que permiten la capacidad antimicrobiana, utilizando como campo de acción: estudio etnofarmacológico, análisis fitoquímico y efecto antimicrobiano significativo contra las cepas de bacterias *Candida albicans.*

Identificación de la línea de investigación

Estudios microbiológicos

Objetivos

Objetivo General

Evaluar la actividad antimicrobiana en vitro de extractos y aceites de mentha frente a la Candida albicans.

Objetivos específicos

- Determinar los índices Valor de Uso (IVU) y Nivel de Uso Significativo (UST) de las plantas representativas empleadas como medicinales en la ciudad de Riobamba a través de una encuesta.
- Identificar los metabolitos secundario presentes en los extractos vegetales causantes de la inhibición en el crecimiento de microorganismos
- Obtener extracto y aceite esencial de plantas de mentha y probar su actividad antimicrobiana del microorganismo *Candida albicans*.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria de extracto y aceite esencial de plantas de mentha ante *Candida albicans.*

Hipótesis

¿Existen importantes metabolitos secundarios en el extracto acuoso y aceite esencial de *Mentha piperita* que tengan efecto antimicrobiano sobre *Candida albicans*?

Variables de la investigación

- **Variable independiente:** Actividad antimicrobiana en los extractos y aceite esencial obtenidos a partir de la planta menta.
- **Variable Dependiente:** Efecto antimicrobiano contra Candida albicans.

Justificación del tema

La utilización de sustancias naturales en el tratamiento de diferentes enfermedades, incluidas las de etiología infecciosa, constituye en la actualidad un desafío en la medicina, las cuales

ofrecen como una alternativa de tratamiento. Un número creciente de personas recurren a sus propiedades curativas basándose en su uso tradicional, no obstante, ciertas plantas medicinales no han mostrado las propiedades que les atribuye la medicina popular, e incluso han resultado peligrosas; es así que esta investigación favorecerá en evaluar el efecto antimicrobiano de la menta (menta piperita) contra la *candida albicans* causante de diversas micosis humanas, que originan infecciones oportunistas y nosocomiales. Comprender la actividad antimicrobiana y su aplicación terapéutica, permitirá científicamente validar su uso y así contribuir a la fitoterapia. Para los usuarios lo resultados de esta investigación evitarán la automedicación y prevención de eventuales toxicidades.

Adicional a eso, los farmacéuticos tendrán información relevante acerca de la planta, la cual ayudará en el conocimiento fitoterapéutico, de modo que puedan adicionar un elemento más para enfrentar las enfermedades infecciosas, indicando un tratamiento medicamentoso natural y alternativo.

CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO

1.1 PLANTA MEDICINAL MENTA

1.1.1 Generalidades

Según la mitología griega, la ninfa Mintha fue transformada en planta por Proserpina, que celosa de ella la transformó en flor. El nombre de la especie, piperita, proviene del latín moderno piperitus que significa "picante". Al final la planta de menta tomo el nombre científico de *Menta piperita* y fue adherida a la familia de las labiadas, originaria de Europa (15).

Esta planta por naturaleza se originó por una hibridación espontánea entre la *menta viridis* y la *Menta aquatica*, se propaga con mucha facilidad a partir de esquejes o estolones o por invasión por contigüidad del rizoma, por lo que se puede hallar en casi todas las zonas templadas del planeta, bien sea a partir de áreas donde se cultivó con anterioridad o, mas raramente, por propagación espontánea (16).

Físicamente se trata de una planta vivaz, con un fuerte olor a mentol, de tallos violáceos ramificados, no mayores de 60-70 cm. que surgen a partir de una raíz muy extendida, sus hojas son de color verde oscuro, son ovaladas y opuestas, insertadas en los tallos por un pecíolo, con bordes dentados y superficie finamente vellosa, sus flores son de color variable (rosa, lila, violáceo), las cuales aparecen en la segunda mitad de la estación cálida (15).

En sur américa esta planta presenta dos variedades que son:

- La menta negra (*Menta piperita var vulgaris*), que se caracteriza por ser de mayor altura, tallos rojizo-violaceos, hojas verde oscuro y flores violetas. Es la que se cultiva principalmente en país de mayor altitud, debido a su mayor rusticidad y contenido de aceite esencial.
- La menta blanca (Menta piperita var officinalis), tienen menor desarrollo, tallos verdes, hojas verde claro y flores blancas. se cultiva en países de menor altitud por su menor rusticidad (16).

1.1.2 Composición

En el conjunto de toda la planta, se puede encontrar un aceite esencial que contiene del 50 al 85 % de diversas sustancias (mentol, mentona, alcoholes, aldehídos, taninos, amargos, etc.) (17).

Los componentes fenólicos de las hojas incluyen el ácido rosmarínico(3,7%), el ácido caféico(0,05%) y varios flavonoides, como eriocitrina(38%), rutinósido de luteolina(3,5%), hesperidina(2,9%), isorhoifolina(0,6%), diosmina(0,8%), glucósido de eriodictiol y narirutina(0,3%) (18). El luteolin 7-O-beta-glucurónido y el ácido litospérmico son unas de las últimas sustancias incorporadas a la lista de integrantes de la menta (19). Las hojas contienen además ácido ursólico, oleanóico, azulenos, coleno y carotenos.

Aceite esencial

El aceite esencial contiene mentol(37-40%), mentona (13-30%), mentil-acetato(17,4%), 1,8-cineol, limoneno, alfa y betapineno, betamirceno, carvona, betacariofileno, linalil-acetato, p-menta-2-en-ol, pulegona, mentofurano, mentilacetato, isomentona, neomentol, isomentol, neoisomentol, piperitoles, piperitenol, isopiperitenol. Además, en la menta hay otros derivados monoterpénicos, como neomentona, neoisomentona, piperitona, piperitonona e isopiperitonona (20), (21), (22).

Las infusiones de menta son ricas en polifenoles. La cantidad total de una bolsa para infusión puede contener hasta 182 mg de estos compuestos (19).

1.1.3 Aplicaciones medicinales

Se atribuyen a la menta las propiedades digestiva, carminativa, diurética, diaforética, sedante, antiséptica, antiviral, antiespasmódica, colagoga, tónica, estimulante, excitante y, a dosis elevada, afrodisíaca (15).

Tanto el aceite esencial como los flavonoides tendrían también una acción antipruriginosa, antiflatulenta, analgésica superficial de mucosas y antiemética (23).

El aceite esencial se viene administrando internamente en casos de estados de agitación nerviosa, insomnio, vértigo y vómitos originados por estados nerviosos, dolores espasmódicos, tos nerviosa, jaqueca y otros procesos de tipo digestivo. Externamente se emplea en afecciones respiratorias agudas (sinusitis, bronquitis, catarros vías altas y bajas) (24).

La infusión se emplea en trastornos digestivos, como antiemético y antiespasmódico. En la medicina tradicional se emplea en infusión para trastornos digestivos o hepáticos; al ayudar a la digestión, como antiemético y estimulante, y como antiespasmódico para el caso de dolores musculares o calambres sistémicos (25).

La Comisión Europea/alemana autoriza el uso de las hojas internamente para espasmos gastrointestinales, de la vesícula biliar y de las vías biliares, externamente, se puede usar para mialgias y neuralgias. El British Herbal Compendium indica las hojas de la planta para dispepsias, cólicos intestinales, flatulencia y trastornos de las vías biliares, mientras que el aceite esencial lo indica para espasmos digestivos, colon irritable, infecciones respiratorias e inflamaciones de la mucosa oral. La The European Scientific Cooperative on Phytotherapy (ESCOP) indica el aceite esencial para el colon irritable, tos y resfriados. Tópicamente, para toses, enfriamientos, molestias reumáticas, picores, urticaria y dolor en dermatitis irritativas (26).

En muchos lugares del mundo se utiliza la menta piperita como antihelmíntico y para diversos problemas gastrointestinales en medicina veterinaria (27).

La planta se utiliza en diversas preparaciones de la medicina popular tradicional para la indigestión, cólicos intestinal o biliar y como antigripal o anticatarral. Las hojas de la planta se aplican habitualmente en infusión (16).

1.1.4 Farmacología, interacciones y reacciones adversas

El principal efecto farmacológico del aceite esencial de la menta es el efecto antiespasmódico sobre la musculatura lisa, que está originado por su interferencia con el desplazamiento del ión calcio a través de la membrana celular (28).

Autores como Sharma et al; Akdoganet al; Nair realizaron estudios de toxicidad aguda determinando que el aceite esencial de menta fue escasamente tóxico, sin embargo se han detectado lesiones de aspecto quístico en el cerebelo de los animales de experimentación. Con respecto al extracto de *Menta piperita* determinaron que este, parece ejercer un efecto protector hepático frente a la toxicidad inducida por el arsénico en animales de laboratorio. Paradójicamente, tanto la *menta piperita* como la spicata pueden producir lesiones hepáticas a determinadas dosis. No se demostró lesiones en el riñón a consecuencia de la administración de menta (29), (30), (31).

A decir de otros autores como Benito et al; Fleming y Forsyth, en sus estudios indicaron que la menta puede presentar reacciones alérgicas cruzada, además que el mentol puede dar lugar a dermatitis alérgicas de contacto (32), (33),.

El aceite esencial de *Menta piperita* inhibe las contracciones producidas sobre el músculo liso produciendo un efecto antiespasmódico, este también produce efectos antiparasitarios tanto como repelente como ovicida, larvicida y peliculicida sobre distintos ectoparásitos (34), (35), (36).

El aceite esencial también produce un efecto protector sobre la irradiación en distintos órganos, como los testículos, médula ósea, hígado, bazo, etc. relacionando este efecto con el contenido de fenólicos de la planta (37) (38), (39).

La menta tiene un efecto preventivo sobre la formación de biofilms dentales, mayor incluso que la clorhexidina (40), (41).

Con respecto al efecto antimicrobiano observaciones in vitro detectaron efectos sobre algunos microorganismos, como *candida albicans* y otras especies afines, *estafilococo dorado, Escherichia coli, Shigella sonei y Micrococcus flavus*, estas observaciones señalan que el efecto antifúngico sería, comparativamente mayor que el bifonazol y que el efecto antibacteriano podría, estar relacionado con el contenido en mento (42), (43), (44).

Un trabajo experimental (45), concluyó que la menta piperita posee un efecto virulicida frente al herpes simple in vitro, dicha acción afectaría al virus antes de la adsorción, pero no

después de la penetración intracelular. La planta resultaría activa también sobre cepas resistentes al ciclo de vida.

La menta parece proteger del cáncer de pulmón experimental inducido por benzopireno en el ratón suizo albino y que también tiene un efecto antigenotóxico, que se debería a las propiedades antioxidantes de los derivados de la planta (46), (47). También se ha descrito efectos antiinflamatorio y antinociceptivo en los derivados de la menta piperita (48).

1.1.5 Efectos de la planta

La inhalación de mentol puede provocar apnea y laringoconstricción en individuos susceptibles. El mentol puede ocasionar ictericia en recién nacidos (25).

La inhalación excesiva de productos mentolados puede producir efectos indeseables reversibles, tales como: náuseas, anorexia, alteraciones cardíacas, ataxia y otros trastornos del SNC, probablemente debido a la presencia de mentol. El aceite esencial puede producir, en personas sensibles, nerviosismo e insomnio (24).

Las formas no encapsuladas de dosificación del aceite esencial pueden ocasionar pirosis en personas con reflujo gastroesofágico. Los pacientes con aclorhidria sólo pueden tomar el aceite esencial en comprimidos entéricos. Excepcionalmente, el aceite esencial, puede originar dermatitis de contacto (23).

1.2 FITOQUÍMICA DE LAS PLANTAS MEDICINALES

1.2.1 Metabolismo primario

Los glúcidos son constituyentes universales de los organismos vivos, a estos se les conoce comúnmente como hidratos de carbono, los cuales se caracterizan por ser compuestos principalmente orgánicos carbonílico, polihidroxilados. Dentro de estos se encuentran sus derivados oxidados (ácidos urónicos, polioles), sus ásteres, éteres, y sus derivados aminados (osaminas). Así los glúcidos se encuentran en los vegetales como: elementos de sostén (celulosa y otros polisacáridos de la pared); reserva energética (por ejemplo el almidón);constituyentes de diversos metabolitos ácidos nucleicos y coenzimas, así como de

múltiples heterósidos y como precursores forzosos de todos los demás metabolitos: formados inicialmente durante la fotosíntesis a partir de dióxido de carbono y de agua, son la base de todos los compuestos orgánicos del mundo vivo (49).

Clásicamente se distinguen en: Osas simples, de fórmula general Cn(H20), se caracterizan por la presencia de una función carbonilo aldehídica (aldosas) o cetónica {celosas) y de (n-1) funciones alcohol. Ósidos, que resultan de la combinación, por intermedio de uniones denominadas osídicas, de diversas moléculas de osas (holósidos), o de osas con compuestos no glucídicos (heterósidos), que es el caso de la mayoría de los innumerables heterósidos específicos del reino vegetal (saponósidos, flavonoides, glicoalcaloides, etc.) (49).

1.2.2 Metabolismo secundario

Las plantas destinan una cantidad significativa del carbono asimilado y de la energía de la síntesis, las cuales no participan en funciones directas de la planta (procesos fotosintéticos, respiratorios etc), a esto se denominan metabolitos secundarios, también denominados productos secundarios o productos naturales. Se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, encontrándose en determinado género de plantas, familias o incluso solo en algunas especies (50).

Los productos del metabolismo secundario tienen funciones ecológicas específicas como atrayentes o repelentes de animales, muchos son pigmentos que proporcionan color a flores y frutos, otros tienen funciones protectoras frente a predadores, actuando como repelentes, proporcionando a la planta sabores amargos, haciéndolas indigestas o venenosas. También intervienen en los mecanismos de defensa de las plantas frente a diferentes patógenos, actuando como pesticidas naturales (49).

Tienen un importante y significativo valor medicinal, tanto así, que un gran número de productos naturales en base a estos componentes, se usan actualmente en el mundo a través de las industrias: cosmética, alimentaria y farmacéutica.

Se agrupan en cuatro clases principales.

- Terpenos: entre los que se encuentran hormonas, pigmentos o aceites esenciales.
- Compuestos fenólicos: cumarinas, flavonoides, lignina y taninos.
- Glicósidos: saponinas, glicósidos cardiacos, cianogénicos y glucosinolatos.
- Alcaloides (50)

Terpenos o Terpenoides

Constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios (más de 40.000 moléculas diferentes). La ruta biosintética de estos compuestos da lugar tanto a metabolitos primarios como secundarios de gran importancia para el crecimiento y supervivencia de las plantas.

Muchos terpenoides son comercialmente interesantes por su uso como aromas y fragancias en alimentación y cosmética, o por su importancia en la calidad de productos agrícolas. Otros compuestos terpenoides tienen importancia medicinal por sus propiedades anticarcinogénicas, antiulcerosas, antimalariales, antimicrobianas, etc (50).

Muchas plantas (limón, menta, eucalipto o tomillo) producen mezclas de alcoholes, aldehídos, cetonas y terpenoides denominadas aceites esenciales, responsables de los olores y sabores característicos de estas plantas, algunos de los cuales actúan como repelentes de insectos o insecticidas. Los terpenos que se encuentran en los aceites esenciales son generalmente monoterpenos, como el limoneno y el mentol, principales monoterpenos constituyentes de los aceites de limón y menta, respectivamente (49).

Compuestos fenólicos

Las plantas sintetizan una gran variedad de productos secundarios que contienen un grupo denominado fenol, estas sustancias reciben el nombre de compuestos fenólicos, polifenoles o fenilpropanoides que se derivan del mismo. Son un grupo muy diverso que comprende desde moléculas sencillas como los ácidos fenólicos hasta polímeros complejos como los taninos y la lignina. En el grupo también se encuentran pigmentos flavonoides (49).

Dentro de estos compuestos se encuentran las cumarinas, que actúan como agentes antimicrobianos y como inhibidores de germinación. Entre los compuestos fenólicos se

hallan los derivados del ácido benzoico (vainillina y el ácido salicílico) pueden actuar como reguladores del crecimiento vegetal, implicado en la resistencia de la planta frente a patógenos. También se encuentran los flavonoides (antocianinas, pigmentos, flavonas), y los taninos (50)

Estos generalmente son toxinas debido a su capacidad de unirse a proteínas, actúan como repelentes alimenticios de muchos animales.

Glicósidos

Los glicósidos son metabolitos vegetales de gran importancia, su nombre hace referencia al enlace glicosídico que se forma cuando una molécula de azúcar se condensa con otra que contiene un grupo hidroxilo, existen tres grupos de glicósidos de particular interés: saponinas, glicósidos cardiacos y glicósidos cianogénicos (51).

Las saponinas se encuentran como glicósidos esteroideos, glicósidos esteroideos alcaloides o bien glicósidos triterpenos, son por tanto triterpenoides o esteroides que contienen una o más moléculas de azúcar en su estructura. La adición de un grupo hidrofílico (azúcar) a un terpenoide hidrofóbico da lugar a las propiedades surfactantes o detergentes similares al jabón que presentan las saponinas (50).

Alcaloides

Los alcaloides son una gran familia de más de 15.000 metabolitos secundarios que tienen en común tres características: son solubles en agua, contienen al menos un átomo de nitrógeno en la molécula, y exhiben actividad biológica. La mayoría son heterocíclicos aunque algunos son compuestos nitrogenados alifáticos (no cíclicos) como la mescalina o la colchicina (49).

En humanos, los alcaloides generan respuestas fisiológicas y psicológicas la mayoría de ellas consecuencia de su interacción con neurotransmisores. A dosis altas, casi todos los alcaloides son muy tóxicos. Sin embargo, a dosis bajas tienen un alto valor terapéutico como relajante muscular, tranquilizante, antitusivos o analgésicos (51).

Se sintetizan normalmente a partir de lisina, tirosina y triptófano, aunque algunos como la nicotina y compuestos relacionados derivan de la ornitina. Los alcaloides se clasifican en función de los anillos presentes en la molécula y pueden ser:

- Quinolina: quinina
- Isoquinolina: papaverina, morfina, codeína
- Indol: vinblastina, vindolina
- Tropano: cocaína, atropina
- Quinolizidina: lupanina, citisina
- Piperidina: nicotina, coniína
- Purina: cafeína (50)

1.2.3 Análisis fitoquímico

Se basa en pruebas preliminares que permiten detectar cualitativamente la presencia de determinados grupos de compuestos. Se ayudan de la micro química para evidenciar estos grupos de constituyentes mediante formación de precipitados, coloraciones, etc

El estudio fitoquímico comprende tres etapas fundamentales: Recolección y preparación del material vegetal objeto de estudio, screening fitoquímico, y la última etapa la caracterización de los constituyentes químicos.

1.2.3.1 Recolección y preparación del material vegetal objeto de estudio

Si bien hay diversas maneras de proceder, un protocolo de recolección de general aplicación podría ser el siguiente. Se recogerán diferentes partes de la planta que, según la información etnobotánica, sean susceptibles de ser utilizados y que, atendiendo a los datos bibliográficos, puedan tener compuestos que presenten actividad biológica.

Las muestras recolectadas pueden corresponder a la parte aérea (hojas, tallos, flores, frutos) o a las partes hipogeas (raíz, rizomas, tubérculos, bulbos), introduciéndolas a continuación en bolsas con cierre hermético.

La mitad de la cantidad recolectada de cada muestra se guardará en congelador a (20 °C) hasta su análisis para evitar las pérdidas de los compuestos más volátiles. La otra mitad se secará a temperatura ambiente para poder cuantificar la pérdida de ciertos componentes volátiles y determinar cuáles son más susceptibles de perderse en el proceso de secado.

Los pliegos testigo recolectados de cada espécimen se prepararán y etiquetarán como es habitual en la preparación para su inclusión en el herbario.

1.2.3.2 Screening fitoquímico

El screening fitoquímico es un estudio cualitativo capaz de mostrar características muy importantes acerca de la composición química y la presencia de determinados metabolitos secundarios responsables de la actividad biológica. Se define como la determinación de la presencia de las diferentes sustancias del metabolismo secundario a las que pueda deberse la actividad biológica del material vegetal objeto de estudio. Se deben seguir una serie de pasos que comprenden:

- La preparación del extracto de partida: una pequeña parte del material vegetal, 5 g, se seca a 60 °C durante 12 h. El material seco se extrae con etanol al 80 por ciento, 10 ml, y se incuba 15 min a 45 °C, se filtra y se lleva a pH 4 con ácido clorhídrico (HCl) 3N, obteniéndose, así, el denominado extracto etanólico (EE).

- La realización de diferentes test para determinar la presencia/ausencia de diferentes sustancias: para esta parte se utiliza diferentes ensayos, según la sospecha de presencia de estos en la planta de estudio (52). Ver Cuadro N 1.

Cuadro N 1. Marchas Fitoquímicas

Ensayos	Principios activos
Ensayo de Drangendorff, Mayer o Wagner	Alcaloides
Ensayo de Shinoda	Flavonoides
Ensayo de Liberman-Buchard	Triterpenos y/o esteroides
Ensayo de Borntrager	Quinonas
Ensayo de Baljet	Cumarinas
Ensayo de espuma	Saponinas
Ensayo de Cloruro Férrico	Compuestos fenólicos y/o taninos
Ensayo de Fehling	Azúcares reductores
Ensayo de Mucilagos	Estructura tipo polisacárido.

Fuente: Puelles, M., Gómez, V., Gabriel, J., & Moris, G. (2010). Las plantas medicinales etnobotánica y viabilidad comercial. Madrid: Editorial Catarata.

1.2.3.3 Caracterización de los constituyentes químicos

Para la caracterización de los metabolitos secundarios son necesarios tres pasos:

- Extracción de los metabolitos secundarios implicados: a lo largo de la historia del estudio de los aceites esenciales se han utilizado numerosas técnicas de extracción: extracción con disolventes orgánicos, extracción con grasa en frío o en caliente, destilación en corriente de vapor. De todas ellas, esta última es la más utilizada en todos los trabajos sobre aceites esenciales y la recomendada por las principales farmacopeas, ya que evita los inconvenientes que puedan presentar los otros métodos citados.
- Análisis cualitativo y cuantitativo: los aceites esenciales se analizan mediante cromatografía de gases (GC) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).
- Identificación estructural: en esta etapa se debe considerar los diferentes casos de componentes novedosos, así como la concentración elevada en el aceite esencial, de esto, se puede recurrir a su separación por cromatografía preparativa o posteriormente realizar un estudio por resonancia magnética nuclear de protón y carbono-13, así como la realización del espectro de masas del compuesto aislado (50).

Después de realizar los estudios anteriores, quedaría establecida la relación estructura actividad del compuesto o los compuestos responsables de la actividad biológica de la planta analizada. Una vez concluidos los análisis anteriores, si la actividad farmacológica del compuesto natural activo lo indicara, es recomendable comenzar el desarrollo de los estudios clínicos desde la fase I hasta la fase IV que responderían a las preguntas: ¿es seguro? ¿funciona? ¿es más eficaz que lo que tenemos actualmente? ¿existen otros usos o beneficios?. Esto permitiría el desarrollo de fármacos de origen natural con actividad farmacológica validada, sin embargo, la tendencia a nivel mundial es llegar hasta la caracterización total de los extractos vegetales y su aplicación como suplemento natural con actividad biológica (50).

1.3 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

1.3.1 Generalidades

Desde la antigüedad las plantas han sido empleadas para diferentes fines, principalmente en la medicina enfocados a curar o prevenir diversas enfermedades, con el uso de productos naturales tales como los extractos de plantas y/o sus compuestos puros los cuales pueden proveen nuevas drogas para el control microbiano. A este respecto, se origina la farmacognosia de las plantas que particularmente comienza con la identificación de los principios activos, para después utilizar diversos ensayos biológicos y obtener información sobre la capacidad antimicrobiana del compuesto de interés de la planta, ya sea obteniendo la concentración mínima inhibitoria o la concentración mínima bactericida (53).

En este contexto, existen pruebas estandarizadas que se llevan a cabo con el fin de poder valorar la actividad antimicrobiana, estas, utilizan diferentes métodos in vitro los cuales son desarrollados en laboratorios a fin de establecer a qué microorganismos son sensibles o muestran una resistencia (bacterias, hongos y protozoos) Estas pruebas estandarizadas son de vital importancia, debido a que con ellas se pueden establecer una terapia alterna, una vez que el extracto vegetal ha sido evaluado en diferentes concentraciones, considerando sus propiedades antimicrobianas y tóxicas (54).

1.3.2. Agente microbiano

Un agente antimicrobiano inhibe o mata la replicación de microorganismos; si lo produce otro microorganismo entonces hablamos de antibiótico. Las sulfonamidas y quinolonas por tanto no son antibióticos. Aquellos compuestos inorgánicos que matan la mayoría de microorganismos (excluyendo las esporas) y que pueden usarse en piel se les conocen como antisépticos (sin embargo, no son seguros para uso interno). Los desinfectantes son antimicrobianos muy fuertes (agentes corrosivos o caústicos) que no se pueden usar sobre tejidos vivos y se emplean para tratar superficies y utensilios de cirugía (55).

En general se conoce los siguientes agentes microbianos

- Antimicrobiano : inhibe o mata bacterias
- Antibiótico: lo produce un microorganismo e inhibe ó mata bacterias.
- Antiséptico: antimicrobiano inorgánico que si pueden usarse en piel
- Desinfectante: antimicrobiano de uso en objetos inanimados (55)

1.3.3 Metodologías para evaluar la actividad antimicrobiana

Diferentes métodos de laboratorio pueden ser usados para determinar In vitro la susceptibilidad de bacterias ante agentes microbianos, pero estos no son igualmente sensibles o no se basan en los mismos principios, permitiendo que los resultados sean influenciados por el método seleccionado, los microorganismos usados y el grado de solubilidad de cada compuesto evaluado (56).

Los métodos para evaluar la actividad antimicrobiana están clasificados, en tres grupos principales:

- Métodos de difusión,
- Métodos de dilución
- Y bioautografía (56).

En general se usa los métodos de difusión (en papel o en pozo) para estudiar compuestos polares, y los métodos de dilución para sustancias polares y no polares (56).

Las metodologías aplicadas siempre consideran la estandarización de la concentración bacteriana a utilizar, con el ánimo de evitar un crecimiento exhaustivo, que impida el análisis de los resultados o proporcione resultados errados lo cual puede variar significativamente la respuesta del extracto vegetal o aceite, indicando la necesidad de utilizar concentraciones mayores de éste para inhibir el crecimiento del microorganismo. Así la concentración de bacterias usada para el estudio de susceptibilidad en el laboratorio ha sido estandarizado en 5×10^5 unidades formadoras de colonias (ufc)/mL, lo cual equivale a un patrón de 0.5 en la escala de Mac Farland (57).

Los medios de cultivo más utilizados en dichas técnicas son el agar Mueller Hinton y agar tripticasa soya, ya que sus componentes facilitan el crecimiento de diferentes cepas bacterianas y mayor difusión de las muestras (57).

Métodos de difusión

La técnica está basada en el método originalmente descrito por Bauer et al., (método de Kirby-Bauer). Este método de difusión en disco o en pozo fue estandarizado y es actualmente recomendado por el Subcomité de Ensayos de Susceptibilidad de NCCLS, de Estados Unidos. El fundamento de esta determinación es establecer, en forma cuantitativa, el efecto de un conjunto de sustancias, ensayados individualmente, sobre las cepas bacterianas que se aíslan de procesos infecciosos (58)

El método se basa en la relación entre la concentración de la sustancia necesaria para inhibir una cepa bacteriana y el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa de agar con un medio de cultivo adecuado y sembrado homogéneamente con la bacteria a ensayar y sobre la cual se ha depositado un disco de papel filtro de 6 mm de diámetro, o se ha sembrado en pozo impregnado con una cantidad conocida de la sustancia (59).

En el caso particular de evaluar varias sustancias los discos de papel filtro o los pozos deben ponerse en forma equidistante. A continuación, se procede a su incubación a la temperatura

adecuada por 24 horas, luego se mide el halo de inhibición y se comparan los efectos de las distintas sustancias sobre el microorganismo estudiado, con el antibiótico control. La lectura de los resultados representa la actividad In vitro de la sustancia (60).

Es necesario señalar que el tamaño del halo de inhibición es influenciado por varios factores, entre ellos; medio de cultivo en que se realiza la prueba, capacidad de difusión del compuesto, cantidad de inoculo, tiempo de generación del microorganismo, sensibilidad al antibiótico, y período de incubación. Cualquier variación de estos factores puede afectar el resultado de la prueba, sin embargo, al emplear un procedimiento estándar es posible obtener resultados confiables (58).

Cuadro N 2. Métodos para el estudio de susceptibilidad antimicrobiana

Método	Categorías	MICMg/ml
Difusión en agar (discos)	S, I, R	No
Dilución en agar	S, I, R	Sí
Dilución en caldo	S, I, R	Sí
Métodos automatizados	S, I, R	Sí
E-test	S, I, R	Sí

Fuente: Cavalieri, y otros (2012). Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.
Abreviaciones: S, susceptible; I, Intermedio; R, resistente; CIM, concentración inhibitoria mínima.

Métodos de dilución

El método de dilución en agar o en caldo como test de susceptibilidad microbiana es utilizado para determinar la concentración mínima bactericida (MBC) y la concentración mínima inhibitoria (MIC), la cual es definida como la concentración más baja de sustancia que puede inhibir el crecimiento visible de un microorganismo después de incubar por 24 horas, y la (MBC) como la concentración más baja que puede prevenir el crecimiento de un organismo después de subcultivar en un medio libre del compuesto evaluado, estas variables son una herramienta para investigar nuevos antimicrobianos (58).

En la técnica de dilución en caldo, son utilizados tubos o microplacas (microdilución) que contienen concentraciones crecientes del extracto vegetal. El organismo en estudio es

inoculado en los diferentes tubos o pozos de las microplacas y la MIC es determinada después de la incubación (61).

En el método de dilución en agar, las cajas se siembran por profundidad con una determinada concentración de extracto vegetal, luego se inoculan con el microorganismo en estudio y se incuban por 24 horas, después de ésta, se examina si el microorganismo crece o no en cada una de las cajas, la principal desventaja de este método es la cantidad necesaria de muestra a evaluar (59).

Los métodos de microdilución en caldo son una técnica útil para determinar MIC, en un gran número de muestras. La ventaja sobre los métodos de difusión radica en un aumento de la sensibilidad para cantidades pequeñas, lo cual es importante cuando se trabaja con productos naturales, además permite diferenciar entre un efecto bactericida o bacteriostático (62).

Determinación de la MIC

La cuantificación de la actividad in vitro de los antimicrobianos se evalúa habitualmente mediante algunas de las variantes de los métodos de dilución. La MIC se ha establecido como " gold Standard' frente a otros métodos que evalúan susceptibilidad antimicrobiana; además de confirmar resistencias inusuales, da respuestas definitivas cuando el resultado obtenido por otros métodos es indeterminado (55).

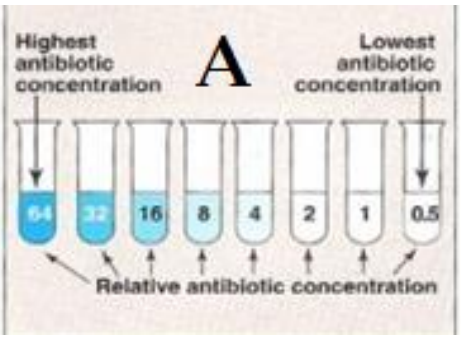
La potencia viene dada por:

- Concentración mínima inhibitoria (MIC): es la menor concentración de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento de 105 bacterias en 1 mL de medio de cultivo, tras 18-24 horas de incubación.
- Concentración mínima bactericida (MBC): es la menor concentración capaz de destruir o matar 105 bacterias en 1 ml de medio de cultivo, tras 18¬24 horas de incubación (55).

Determinación de la Concentración mínima inhibitoria (MIC) y Concentración mínima bactericida (MBC) se procede de la siguiente manera:

Como se muestra en la figura 1 se inoculan tubos con diluciones conocidas del antimicrobiano. Luego se determina cual inhibe el crecimiento bacteriano al cabo de 24 horas. Para calcular la concentración bactericida (MBC) lo que se hace es que, de aquellos tubos en que no hubo crecimiento y para calcular la MIC, se hace un subcultivo en medio libre de antibiótico e incuba por otras 24 horas. En los tubos donde no hay crecimiento bacteriano es debido a que anteriormente se habían muerto todas. Así se puede deducir que un fármaco bactericida es bacteriostático a menores concentraciones (55).

Figura 1 Determinación de la Concentración mínima inhibitoria (MIC) y Concentración mínima bactericida (MBC)



Fuente: Villar, D. (2010). Sistemas Organicos III: Farmacología de antimicrobianos

Una vez establecida cual es la MIC (in vitro), se comparan con las concentraciones plasmáticas que se alcanzan in vivo a las dosis terapéuticas normalmente prescritas para cada antimicrobiano y se reporta el resultado como: Susceptible (S), intermedio (I) y resistente (R) (55).

Cuadro N 3. Interpretación de los resultados en el antibiograma

Susceptibilidad (S)	Cepa es inhibida a las concentraciones normales alcanzadas en tejidos
Intermedio (I)	Evitarse si existen otros antimicrobianos mas efectivos
Resistente (R)	Cepa no es inhibida a las concentraciones normales en tejidos

Fuente: Villar, D. (2010). Sistemas Organicos III: Farmacología de antimicrobianos.

La MIC es un buen indicador de potencia, nos permite evaluar la eficacia y periodo de actividad antimicrobiana que va a desarrollar en el organismo. En los antibiogramas, la MIC

entonces se compara con la concentración que se obtiene en plasma o tejido del paciente y eso permite establecer cuál sería el fármaco de elección para tratar la infección (55).

La concentración eficaz en el órgano/tejido afectado debe ser al menos igual a la MIC, para ello debe tenerse una idea de cuánto va a penetrar el fármaco en cada tejido y también si las bacterias son intracelulares (micobacterias, brucelas, clamidias, rickettsias, bartonellas) (55).

1.4 MICOSIS

1.4.1 Aspectos generales

Los hongos como parte de una disciplina científica, han sido estudiados formalmente en América Latina a parir del siglo XIX, donde se abarco dos ramas principales que atrajeron la atención de los investigadores: la taxonomía y la fitopatología (63).

En los últimos treinta años, una serie de hongos han sido descritos como agentes de síndromes nuevos o raros, por ejemplo, durante los años 60 y 70, las infecciones debidas a *Aspergillus fumigatus, Aspergillus flavus, y Rhizopus arrhizus* se hicieron más frecuentes como complicaciones terminales de enfermedades varias, los hongos dematiáceos, responsables de infecciones sistémicas y subcutáneas, por nombrar algunos, de esta forma el abanico de hongos potencialmente patógenos para humanos se ha expandido a más de 270 especies en las últimas décadas (64).

Es así que en este entorno comienza a manejarse el término micosis referida como las distintas afecciones o enfermedades causadas por hongos microscópicos, esta puede tomar el nombre de onicomicosis (parte del organismo que invaden), o coccidioidomicosis (hongo que las causa) (65).

Los agentes de las micosis son alrededor de 100 y pueden ser de origen endógeno o exógeno. Los hongos endógenos se encuentran en mucosas o tegumentos de individuos sanos, y sólo en estados especiales del huésped (enfermedades crónicas) se convierten en patógenos, por ejemplo, el Candida (64).

Los hongos exógenos viven fuera del humano o de los animales; algunos son parásitos obligatorios (dermatofitos) y otros son saprobios (*Aspergillus, Mucorales*) y de modo excepcional se convierten en patógenos, estos, junto con algunas levaduras, constituyen el grupo de los oportunistas o patógenos facultativos (63).

La mayor parte de los hongos exógenos penetran por vía aérea o cutánea, algunos son cosmopolitas y otros están delimitados a zonas endémicas (histoplasma, coccidioides immitis) (65).

1.4.2 Clasificación

Según su localización, las micosis se clasifica en cuatro grandes grupos: superficiales, subcutáneas, sistémicas y oportunistas. Las micosis subcutáneas y sistémicas también pueden agruparse en las micosis profundas (65).

Micosis Superficiales

Las micosis superficiales o externas son las más frecuentes y menos graves, producen infecciones localizadas en el pelo, las uñas, la piel o las mucosas (membranas, tipos de piel), que se trasmiten casi siempre por contacto con una persona infectada, estas a su vez se dividen en dermatofíticas o dermatofitosis y no dermatofíticas (63).

Micosis Semiprofundas o Subcutáneas

Se producen por implantación de esporas o micelio en tejido subcutáneo directamente: esporotricosis (por hongo dimórfico), feohifomicosis, lobomicosis, cromomicosis, micetomas eumicóticos (hongos saprofíticos), rinosporidiosis (hongos saprofíticos) (64).

La vía de penetración es la piel. Provoca procesos inflamatorios con lesiones típicas. Su transmisión se da por contacto de heridas, hincadas o solución de continuidad para que se introduzca el agente causal por traumatismos en la piel. No se contagian, excepto las Esporotricosis (65), (63).

Micosis Profundas o Sistémicas

Las Micosis Profundas Sistémicas son enfermedades producidas por hongos, en la mayoría de los casos, los agentes etiológicos penetran al organismo por vía inhalatoria, afectando inicialmente el Pulmón, desde donde se diseminan produciendo variedad de manifestaciones clínicas, motivado a que pueden afectar diversos Aparatos y Sistemas del organismo. Ellas son: Paracoccidioidomicosis, Histoplasmosis, Coccidioidomicosis, Criptococosis, Aspergilosis y Candidosis Sistémica (65). Algunas Micosis Sistémicas Importantes son:

- *Candida albicans*: Candida es un miembro inocuo de la flora normal de las membranas mucosas (tejidos epiteliales) de los tractos respiratorio, gastrointestinal y genital femenino. En pacientes debilitados puede producir una enfermedad sistémica o lesiones localizadas en la piel, boca, vagina o pulmones. La mayoría de las personas albergan este microorganismo, por lo que la transmisión no es un factor de la enfermedad.
- *Cryptococcus neoformans:* La infección se produce por vía respiratoria. La manifestación clínica más común es una meningitis crónica que puede ir acompañada de lesiones en la piel y en los pulmones. Los casos sin tratar conducen a la muerte.
- *Paracoccidioido*: Su agente es el Paracoccidioides brasiliensis, es un deuteromyceto que tiene reproducción asexual y es de característica dimorfo, es decir, se desarrolla en dos fases saprofítica y parasitaria.
- *Histoplasmosis*: Su agente causal es el histoplasma capsulatum, también es un deuteromyceto, su reproducción es asexual y posee la característica del hongo dimorfo. Este hongo puede ser un hongo oportunista que se encuentra en mayor parte en los pacientes con SIDA. Además, es el causante de una infección pulmonar lenta y crónica (65).

Micosis Oportunistas

Estas patologías se dan en huéspedes inmunodeprimidos (con trastornos endócrinos, inmunodeficiencias, enfermedades oncohematológicas, alteraciones metabólicas y anatómicas, drogadictos endovenosos, pacientes bajo tratamiento prolongado con corticoides o citostáticos, sometidos a cirugía, dializados, quemados, trasplantados y

cateterizados) y son causadas por hongos saprófitos del ambiente o comensales de cuerpo humano (65). En otras palabras, tiene que existir una enfermedad que deteriore el sistema inmunitario, ejemplo: VIH, cáncer, diabetes, tuberculosis, etc. Muchas de las micosis profundas pueden pasar a la modalidad de micosis oportunista, cuando el huésped (paciente) contrae alguna enfermedad que deteriore su sistema inmunitario. Entre las más importantes se encuentran:

- Criptococosis
- Condidiasis: Se la conoce como Moniliasis, está conformada por todo un género de hongos llamado Candida (como característica principal asimilan azúcares) que puede ser el agente causal, por ejemplo: *Candida Albicans, Candida Brumpti, Candida Krusei, Candida Guillermondi, Candida Tropicales, Candida Scudotropicalis.*

1.5 CANDIDA ALBICANS

1.5.1 Aspectos generales

Candida albicans es un hongo dimórfico, es decir, se desarrolla de forma distinta en función de la temperatura de crecimiento, como levadura, normalmente a 37°C en el huésped, y como hongo de aspecto filamentoso, a 25°C en la naturaleza, pertenece al filo Ascomycota y se reproduce de forma asexual por gemación (63).

En forma de levadura presenta un aspecto de células redondas u ovaladas, de 3-8 x 2-7 micras de tamaño, agrupadas en pequeños grupos, mientras que, en forma de hongo filamentoso, las células se alargan y se diversifican tomando la apariencia de filamentos, pseudo-hifas o pseudo-micelio (64).

El *Candida albicans* está asociada ecológicamente a seres vivos de sangre caliente. Su temperatura óptima de crecimiento es 37 °C. Los tractos digestivo y respiratorio, junto con la mucosa genital (vagina), son los reservorios más importantes en los seres humanos y origen de candidiasis endógenas. En estas localizaciones se comporta como un saprobio y su aislamiento no implica por sí solo la presencia de infección. Candida albicans no sobrevive durante mucho tiempo en superficies secas pero su supervivencia es mayor cuando

hay humedad y se ha aislado de los cepillos dentales, cremas de manos, cosméticos y ropa (63), (64).

1.5.2 Viabilidad, propagación y transmisión

- Reservorio: Humano (microflora de la piel, la cavidad oral, el tracto gastrointestinal, el sistema genitourinario y las heces o las deyecciones del hombre).
- Hospedadores: Humanos.
- Dosis infectiva mínima (DIM): se desconoce en la actualidad.
- Supervivencia ambiental: sobrevive fuera del huésped, normalmente en zonas húmedas y oscuras.
- Formas de resistencia: no presenta formas de resistencia.
- Mecanismo de propagación y transmisión: endógena por contacto a través de la piel y las mucosas y por inoculación accidental o mordedura. Es responsable de casos de enfermedad nosocomial.
- Vías de entrada: dérmica. Mucosas. Parenteral.
- Distribución geográfica: mundial (63).

1.5.3 Efectos en la salud

En general el Candida albicans puede producir infecciones superficiales que afectan a piel, uñas y mucosas. Sin embargo, las candidiasis más graves (candidiasis diseminadas) se observan en personas inmuno-suprimidas o con enfermedades subyacentes que predisponen a sufrir esta infección (63).

Particularmente sobre sus efectos se puede mencionar lo siguiente:

- **Infecciones:** Puede producir infecciones superficiales que aparecen principalmente en individuos con las defensas bajas, afectando a la piel (intertrigo), a las mucosas (oral, genitourinaria o digestiva) y a las uñas (paroniquia o perionixis). Los síntomas son leves como: enrojecimiento, picazón y malestar. En personas con cáncer, trasplantados o con SIDA la infección puede hacerse sistémica (candidemia), y puede llegar a ser mortal.

- **Efectos alérgicos:** La asociación entre *Candida albicans* y alergia es controvertida a excepción de los cuadros alérgicos que con escasa frecuencia se observan en pacientes con colonización o infección cutaneomucosa, sin embargo, las pruebas de reactividad cutánea con extractos de Candida albicans son positivas en un elevado número de personas y las pruebas de provocación bronquial han mostrado reactividad clínica en algunos pacientes.
- **Efectos en la maternidad:** En este periodo puede producir Candidiasis cutánea congénita (CCC) que es una infección intrauterina congénita muy poco frecuente, adquirida por vía ascendente desde el tracto genital de la madre que se manifiesta de forma sistémica o cutánea en los seis primeros días de vida. También puede producir la candidiasis cutánea neonatal que es una infección adquirida durante el parto al pasar por el canal del parto o posnatalmente; se caracteriza por la candidiasis oral y la dermatitis del pañal (63).

1.5.4 Prevención y control

Para el tratamiento correcto de las candidiasis se debe intentar eliminar o controlar las enfermedades subyacentes y erradicar la infección mediante el empleo de antifúngicos apropiados. La nistatina y los azoles tópicos, como miconazol, clotrimazol o econazol, son productos útiles en el tratamiento de las candidiasis superficiales, mientras que anfotericina B, fluconazol e itraconazol son más eficaces en el tratamiento de las candidiasis invasoras (64).

1.6 CANDIDIASIS

1.6.1 Definición

Micosis causada por diversas especies de levaduras oportunistas del género Candida, en especial *Candida albicans*; presenta una variedad de cuadros clínicos; afecta en particular mucosas (boca, vagina, etc.), piel, uñas y de manera excepcional otros órganos como pulmones e intestino. En la actualidad estas enfermedades, lejos de desaparecer, se incrementan día con día (65).

1.6.2 Agentes etiológicos

Es producida por diversas especies del género Candida; en la actualidad clasificado con base en su secuencialización genética, dentro de la clase *Ascomycetes* y familia *Saccharomycetes*. Las especies más frecuentes son las siguientes: *C. albicans* (40-85%), *C. tropicalis, C. glabrata, C. dubliniensis, C. parapsilosis (sensu stricto), C. orthopsilosis, C. metapsilosis, C. krusei, C. famata, C. guilliermondii y C. lusitaniae* (63).

1.6.3 Epidemiología

Es mundial y se considera una de las infecciones oportunistas más frecuentes en humanos. La incidencia se ha elevado durante los últimos 30 años. Entre las micosis, abarca 7.45% y constituye 25% de las micosis superficiales. Afecta a individuos de cualquier edad, grupo étnico o sexo. No tiene relación con el clima, la situación geográfica ni el estado socioeconómico; sin embargo, se han encontrado algunas diferencias regionales, por ejemplo, la candidiasis interdigital de los pies es más frecuente en lugares tropicales y la onicomicosis sin paroniquia, en los más fríos (63), (64).

Se presenta en 4 a 18% de los recién nacidos; se han comunicado las modalidades congénitas en prematuros de menos de 1 500 g al nacer; la forma bucal predomina en menores de 10 años de edad y en mayores de 60, en especial en mujeres (66).

C. albicans, la especie más importante, es parte de la flora normal de las vías gastrointestinales, las mucosas bucales (31 a 55%) y vaginal (13% de mujeres), así como de la piel periorificial de individuos sanos (25 a 50%). Candida vive en equilibrio con otros microorganismos del cuerpo humano, y coexiste como comensal, pero cuando este equilibrio se pierde, se torna patógena y causa afección mucocutánea (67).

1.6.4 Patogenia

La candidiasis es considerada como una clásica enfermedad producida por hongos patógenos oportunistas, que requiere forzosamente de factores predisponentes; la mayor parte de las veces se origina de manera endógena, casi siempre atribuible a dos procesos: uno el desequilibrio de la flora microbiana, que favorece el incremento de levaduras de Candida, el

otro debido a enfermedades o procesos que influyan en la respuesta inmune, sobre todo a nivel celular, por ejemplo defectos en el número o función de leucocitos polimorfonucleares (PMN) y linfocitos T y B (63).

Los casos exógenos siempre se inician por el ingreso al organismo de grandes cantidades de levaduras (vía cateterismo o drogadicción), en los que se inoculan los microorganismos de manera directa al torrente circulatorio. En el desarrollo del padecimiento influyen una serie de factores que actúan de manera coordinada, los más importantes son los siguientes:

- Adaptación al pH: las diversas especies de Candida tienen una gran adaptación a diversos medios y sustratos; así, la capacidad de soportar los cambios del pH es el mejor ejemplo.
- Adhesinas: son una serie de sustancias que influyen en la adaptación o adhesión de la levadura; su presencia está bien comprobada en *C. albicans y C. glabrata*. Las más importantes son las manoproteínas, las mananas.
- Enzimas; se han reportado como factores de virulencia de las especies de Candida a diversas enzimas; las más importantes son: queratinasas, peptidasas, hemolisinas, proteasas y hialuronidasas.
- Transición morfológica: es la capacidad que tienen estas levaduras de cambiar morfológicamente de blastoconidio a seudohifa e hifa. Este cambio es estimulado por las condiciones ambientales y se considera uno de los factores de patogenicidad o virulencia más significativos.
- Switching fenotípico: entendido como la capacidad que tienen estas levaduras de hacer grandes cambios fenotípicos, como son diferencias en la macromorfología colonial (colonias lisas, rugosas), y cambios en la antigenicidad, como aumento o disminución en la producción de enzimas y toxinas. Este fenómeno de cambio fenotípico se da a manera de una estrategia del agente frente a las diferentes células que ataca y medios que soporta.
- Formación de biopelículas o biofilms: es una propiedad de patogenicidad, la cual presentan diversos agentes, como las bacterias *Staphylococcus aureus, Pseudomonas sp.* y otras levaduras. Una biopelícula es una comunidad de microorganismos adheridos a una superficie que permanecen unidos con fuerza por sustancias poliméricas secretadas por ellos mismos. Esta conformación le da alta capacidad

defensiva, persistencia y mayor resistencia al ataque de los antibióticos y antimicóticos. *C. albicans y C. parapsilosis* son las dos especies con mayor capacidad de formar estas películas. Las localizaciones donde se ha estudiado este fenómeno son: mucosa oral, vaginal e incluso catéteres; se calcula que en promedio 50% de las infecciones tiene origen en una biopelícula (63).

1.6.5 Factores desencadenantes de la enfermedad

Debido a que *Candida albicans* y otras especies oportunistas son parte integral de la flora habitual, en general van a provocar enfermedades endógenas favorecidas por algún factor de predisposición del paciente; sin embargo, hay ocasiones en que la candidiasis se adquiere en forma exógena, por ejemplo, por introducción de grandes inóculos de levaduras a través de catéteres y de jeringas no estériles (por drogadicción), o bien por cateterismo; *C. glabrata y C. parapsilosis* (sensu stricto) pueden generar infecciones exógenas nosocomiales, en especial en niños hospitalizados (63). En pacientes masculinos, la balanitis por Candida muchas veces es consecuencia de las relaciones sexuales, de manera que este tipo de candidiasis se considera exógena y adquirida por transmisión sexual (64).

Los factores de predisposición puede ser cualquiera de los ya mencionados, sin embargo los más frecuentes y específicos son:

- Factores fisiológicos: cambios de pH, de manera notable en vagina y boca, embarazo y prematurez.
- Enfermedades o procesos debilitantes: diabetes, tuberculosis, absceso hepático amibiano y desnutrición.
- Inmunodeficiencias primarias o adquiridas: leucemias, linfomas, enfermedad de Hodgkin, infección por VIH-SIDA.
- Iatrogénicos: tratamientos prolongados con antibióticos, corticoesteroides y citotóxicos; tratamientos anticonceptivos orales y dispositivos intrauterinos. Cateterismo y procesos quirúrgicos invasivos.
- Misceláneo: dermatosis inflamatorias previas (dermatitis por contacto y del área del pañal), traumatismos ungueales, mal estado de la dentadura, prótesis dentales mal adaptadas y humedad (63).

1.6.6 Formas Clínicas de Candidiasis

La candidiasis es una de las infecciones más frecuentes y polimórficas que atacan al hombre; su nivel de profundidad y gravedad no depende tanto del agente etiológico en sí, sino del factor de predisposición con el que se asocie (63). Su forma clínica se puede mencionar las siguientes:

Candidiasis mucocutánea

- Candidiasis oral: llamada comúnmente algodoncillo, trush o muguet. La forma aguda es frecuente en niños recién nacidos por la falta de regulación de pH y se contrae por un fuerte inóculo adquirido a través del canal del parto, sobre todo cuando la madre ha presentado candidiasis vaginal en el último trimestre del embarazo, que se calcula ocurre en 30% de los embarazos. En los adultos se manifiesta ya sea de forma aguda o crónica, por lo regular en diabéticos o después de tratamientos antibacterianos prolongados.
- Candidiasis genital: es la infección más frecuente, recurrente y molesta que afecta el aparato genital de la mujer (en promedio 50% de las vaginitis); ocurre por lo común en la edad reproductiva, aunque es posible verla en niñas recién nacidas, lo cual es atribuible a los altos niveles hormonales heredados de la madre y a la colonización de las mucosas durante el parto.
- Candidiasis del tracto gastrointestinal: se puede presentar a través de todo el tracto gastrointestinal, se divide en a) Esofagitis,b) Gastritis,c) Peritonitis. d) Candidosis entérica. .
- Candidiasis respiratorias: se divide en Candidosis broncopulmonar que es una enfermedad crónica y frecuente en pacientes inmunodeprimidos (leucémicos, linfomatosos, etc y Candidosis pulmonar es menos frecuente que la bronquial, con un curso más agudo y grave (63), (64).

Candidiasis cutánea

- Candidiasis intertriginosa: es más rara que la de mucosas; influyen algunos factores para que se presente, como son maceración y humedad de la piel. La candidiasis

cutánea se presenta con menor frecuencia fuera de las zonas de pliegues, por ejemplo en pacientes postrados por largo tiempo, en parapléjicos y ocasionalmente se asocia a las úlceras por decúbito.

- Candidiasis del área del pañal: se origina de la dermatitis del área del pañal debido a que la orina mantiene húmeda esta zona; además se genera irritación de la piel ya que la urea, al degradarse por la flora bacteriana, se transforma en amoniaco, sustancia muy alcalina.
- Onicomicosis por *Candida:* aparece en las uñas de las manos en un mayor porcentaje (85%); es frecuente que se origine por diabetes, traumatismos (manicura y pedicura), uñas postizas adheridas con poliacrilatos y exceso de humedad en las manos.
- Pustulosis candidósica: es una entidad nueva y rara que se presenta sobre todo en pacientes adultos jóvenes adictos a las drogas, en particular las administradas por vía intravenosa, como la heroína, o bien en individuos hospitalizados muy inmunosuprimidos (63), (64).

Candidiasis sistémica o profunda

Este grupo de enfermedades se observa poco y se asocia con factores de predisposición muy severos, en general presenta mala respuesta a la terapia. Los tipos más comunes se mencionan a continuación.

- Candidiasis del tracto urinario: se asocia sobre todo a pacientes con corticoterapia, diabéticos y con cateterismo. El tracto urinario se ve afectado en forma de microplacas blanquecinas y, en pocas ocasiones, llega hasta los riñones, produciendo pielonefritis.
- Endocarditis candidósica: es común en drogadictos heroinómanos que se administran la droga por vía intravenosa con jeringas no estériles, después de cuadros de candidemia y en pacientes con cateterismo crónico.
- Meningitis candidósica: es rara y se presenta en pacientes leucémicos, diabéticos o tratados con corticoesteroides sistémicos. La meningitis candidósica es similar a la bacteriana y se manifiesta con intensa cefalea, rigidez de nuca, fiebre intermitente y hemiparesia.

- Candidemia (fungemia o septicemia candidósica): es una entidad que se ha incrementado en los últimos años; en el medio hospitalario puede representar entre 10 a 20% de todas las candidiasis y hasta 10% de las infecciones del torrente sanguíneo; en especial es propia de pacientes muy inmunosuprimidos que se encuentran en unidades de cuidados intensivos (UCI) y de manera especial en niños prematuros con catéteres venosos centrales (63), (64).

1.6.7 Diagnóstico de laboratorio

Toma de muestra

Es variable, ya que la candidiasis puede presentarse en todas las partes del cuerpo, así que los productos que se recolectan son exudado, escamas, sangre, esputo, orina, LCR, etcétera (64).

Examen directo

El material obtenido se coloca entre portaobjetos y cubreobjetos con un aclarante, de preferencia hidróxido de potasio (KOH) de 10 a 20%. Se pueden realizar también tinciones como Gram, Wright, Giemsa, PAS e incluso Papanicolaou. Al microscopio se observan grandes cúmulos de blastoconidios de aproximadamente 2 a 4 μm de diámetro y seudohifas cortas o largas e hifas, que determinan el estado patógeno y virulento de la levadura y confirman el diagnóstico (64), (63).

Cultivos

Las diversas especies de Candida crecen en la mayor parte de medios de cultivo habituales, como son: Sabouraud agar, gelosa sangre, infusión de cerebro, corazón y extracto de levadura. Es importante saber que *C. albicans y C. dubliniensis* crecen en los medios de Sabouraud más antibióticos; sin embargo, algunas otras especies son inhibidas por la cicloheximida (*C. tropicalis, C. parapsilosis, C. krusei y C. zeylanoides*), por lo que se recomienda hacer las siembras a la par en medios Sabouraud agar y extracto de levadura agar (64).

Las características de las colonias en la mayor parte de medios son similares, crecen en 2 a 3 días a 28 o 37°C, dando colonias blanquecinas, lisas (en ocasiones rugosas), húmedas, limitadas, opacas y en algún momento se observan seudomicelio y micelio dentro del agar (63).

Hay medios de cultivo selectivos para el género Candida, como el Biggy (Nickerson), que contiene gran cantidad de citratos que eliminan la flora bacteriana, así como sulfitos que son reducidos a sulfuros; de esta manera las colonias se ven de color café claro u oscuro, lo que las hace distinguibles de otros hongos levaduriformes y se considera un excelente medio de primo-aislamiento, por lo que es muy útil para el trabajo rutinario (65).

En la actualidad ha surgido una serie de medios de cultivo cromogénicos que permiten hacer una identificación desde los primeros aislamientos; por ejemplo, el medio pionero de CHROMagar-Candida está hecho a base de sales cromógenas y enzimas, que permiten el desarrollo de las especies más comunes de Candida y otros hongos levaduriformes (*Geotrichum, Trichosporon*), mediante la formación de colonias coloridas, perfectamente diferenciadas: *C. albicans* (verde-claro); *C. dubliniensis* (verde-oscuro); *C. tropicalis* (azul-gris); *C. krusei* (rosa pálido); *C. glabrata* (rosa intenso); *Candida sp.* (blanco-crema); *Trichosporon sp*. (azul-gris) *y Geotrichum candidum* (púrpura) (64).

1.6.8 Tratamiento

Depende del tipo de candidiasis y del factor predisponente al que esté ligado; por tanto, a veces la terapia es muy sencilla y sólo requiere tratamientos tópicos, mientras que en otras situaciones es necesario que sea por vía sistémica y por tiempo prolongado (64).

Tratamiento tópico

Algunos son tan sencillos que su único objetivo es corregir el pH; por ejemplo, las soluciones ácidas (una cucharada de vinagre blanco en un litro de agua) son muy útiles para lavados vaginales y en la candidiasis del área del pañal (63). Se utilizan soluciones básicas (solución saturada de bicarbonato de sodio), para hacer colutorios (para candidiasis oral asociada a prótesis dentales) (64). Los fármacos más empleados para el tratamiento de la candidiasis

son: bifonazol, clotrimazol, econazol, fenticonazol, flutrimazol, isoconazol, ketoconazol, miconazol, oxiconazol y sertaconazol (63), (64).

De los derivados carbamilados, el tolnaftato prácticamente no tiene acción contra Candida; en cambio, el tolciclato tiene una efectividad similar a la de los imidazoles tópicos. Otros medicamentos que presentan buena acción son la terbinafina tópica (crema, gel o solución); la ciclopiroxolamina y la amorolfina (64).

Tratamiento sistémico

En muchos casos el tratamiento sistémico es la terapia de elección para la mayoría de las candidiasis; se emplea en casos muy extensos, crónicos y rebeldes a tratamientos tópicos; incluso en aquellos granulomatosos y sistémicos. Los fármacos más usados son: ketoconazol, itraconazol, fluconazol, voriconazol, posaconazol y ravuconazol (64).

1.7. Conclusiones parciales del capítulo

- La planta menta es cultivada principalmente en países de mayor altitud. La misma se utiliza en diversas preparaciones de la medicina popular tradicional como antigripal o anticatarral.

- Los metabolitos secundarios no participan en funciones directas de la planta (procesos fotosintéticos, respiratorios etc); estos se originan cuando las plantas destinan una cantidad significativa del carbono asimilado y de la energía de síntesis.

- Existen pruebas estandarizadas que se llevan a cabo con el fin de poder valorar la actividad antimicrobiana, estas, utilizan diferentes métodos in vitro los cuales son desarrollados en laboratorios a fin de establecer a qué microorganismos son sensibles o muestran una resistencia (bacterias, hongos y protozoos).

- Diferentes métodos de laboratorio pueden ser usados para determinar fuera del organismo la susceptibilidad de bacterias ante agentes microbianos, pero estos no son igualmente sensibles o no se basan en los mismos principios, permitiendo que

los resultados sean influenciados por el método seleccionado, los microorganismos usados y el grado de solubilidad de cada compuesto evaluado.

- El *Candida albicans* está asociada ecológicamente a seres vivos de sangre caliente, siendo los tractos digestivo y respiratorio, junto con la mucosa genital (vagina), los reservorios más importantes en los seres humanos y origen de candidiasis endógenas.

- La candidiasis es una micosis causada por diversas especies de levaduras oportunistas del género *Candida*, en especial *Candida albicans*; presenta una variedad de cuadros clínicos; afecta en particular mucosas (boca, vagina, etc.), piel, uñas y de manera excepcional otros órganos como pulmones e intestino.

CAPÍTULO II. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Caracterización del Sector

El cantón Riobamba está situado a 2.750 metros sobre el nivel del mar, a 1º 41´ 46" latitud Sur; 0º 3´ 36" longitud Occidental del meridiano de Quito. Se encuentra a 188 km. al sur de la ciudad de Quito, en la región Sierra Central y constituye la capital de la Provincia de Chimborazo. Consta de cinco parroquias urbanas: Maldonado, Veloz, Lizarzaburu, Velasco y Yaruquíes; y de once parroquias rurales: San Juan, Licto, Calpi, Quimiag, Cacha, Flores, Punín, Cubijíes, Licán, San Luis y Pungalá (68).

2.2. Descripción del procedimiento metodológico

La investigación comprendió tres etapas: el estudio etnofarmacológico, el análisis fitoquímico y el análisis de actividad antimicrobiana, dentro de las mismas se efectuó otras sub-etapas las cuales se detallan a continuación:

Primera etapa. Estudio etnofarmacológico

En la primera etapa de esta investigación se identificó dentro de los 11 mercados del cantón Riobamba, los lugares donde se utiliza la medicina Andina, en estas localidades se aplicó la encuesta a las personas que asistían por estos servicios. Ver Anexo N **1**

Segunda etapa. Análisis fitoquímico

Recolección y preparación del material vegetal objeto de estudio

Para esta sub-etapa se consideró las directrices de la OMS sobre buenas prácticas agrícolas y de recolección (BPAR) de plantas medicinales (69) (Ver Anexo N 2), en general con la información de la primera etapa, el estudio etnofarmacológico se eligió la planta medicinal menta que, según la información obtenida es susceptible de ser utilizada y atendiendo a los datos bibliográficos de la misma, esta puede tener compuestos que presenten actividad antimicrobiana. Las muestras recolectadas fueron introducidas en bolsas con cierre hermético, la mitad de la cantidad recolectada de cada muestra se guardó en congelador a

(20 °C) hasta su análisis para evitar las pérdidas de los compuestos más volátiles. La otra mitad fueron secadas a temperatura ambiente para poder cuantificar la pérdida de ciertos componentes volátiles y determinar cuáles son más susceptibles de perderse en el proceso de secado.

Screening fitoquímico

Para la determinación de la presencia de las diferentes sustancias del metabolismo secundario en la planta medicinal menta se realizaron varias pruebas estándares para detectar cualitativamente la presencia de determinados grupos de compuestos, así el Screening fitoquímico se encuentra detallado en el Anexo N 3.

Caracterización de los constituyentes químicos

Para la caracterización de los metabolitos se realizaron tres pasos: la extracción de los metabolitos secundarios implicados se utilizo la destilación en corriente de vapor por ser la más utilizada en todos los trabajos sobre aceites esenciales y la recomendada por las principales farmacopeas, ya que evita los inconvenientes que puedan presentarse en otros métodos de extracción. Ver Anexo N 4. Posteriormente el análisis cualitativo y cuantitativo de los aceites esenciales se analizó mediante cromatografía de gases (GC) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Finalmente se realizo la identificación estructural.

Tercera etapa. Análisis de actividad antimicrobiana

Para la ejecución de esta etapa se consideró lo que indica Cañedo y Ames (70) en su manual de laboratorio técnica de Mitscher para el manejo de hongos entomopatógenos. Así se tomó en cuenta lo siguiente:

- El medio de cultivo utilizado en micología debe contener los nutrientes suficientes para asegurar el desarrollo y reproducción de los hongos (carbono, nitrógeno, vitaminas, oligoelementos, etc.) y un pH ligeramente ácido (5 – 5.8) para facilitar su crecimiento e inhibir al mismo tiempo el desarrollo de otros microorganismos.

- Para conseguir un medio sólido se debe agregar una sustancia solidificante como el agar (gelatina vegetal) o el agar (polisacáridos provenientes de algas), el cual no tiene valor nutritivo sino que sirve simplemente para mantener la humedad por un tiempo más o menos prolongado.
- La humedad es fundamental para el desarrollo de los hongos, porque cuando ésta comienza a disminuir, la formación de micelio también disminuye y el hongo tiene que asegurar superpetuidad formando estructuras propagativas (esporas, conidias) y de conservación (clamidosporas).
- El agar empieza a derretirse a partir de 80 grados centígrados y soporta temperaturas altas sin descomponerse, solidificándose entre los 35 y 50 grados centígrados.
- Los medios de cultivo se vierten en placas Petri o en tubos inclinados. Los primeros ofrecen la ventaja de tener mayor superficie para el desarrollo del hongo y se utilizan para trabajos rutinarios de aislamientos, aspecto del cultivo, velocidad de crecimiento, etc. sin embargo, son más fáciles de contaminarse. Los tubos, a pesar de tener una superficie mucho más reducida, ofrecen seguridad en su manipulación y buena resistencia a la deshidratación y a la contaminación. Se utilizan para conservar cultivos por tiempo más o menos prolongado.
- Los medios se seleccionan en base al tipo de muestra que queremos reproducir. El pH recomendado para el cultivo de hongos en el laboratorio es de alrededor de 7, un pH neutro o ligeramente ácido (5.8).
- Para seguridad del que opera y evitar contaminaciones, los medios de cultivo se deben manipular en campanas de flujo laminar.

Con estos fundamentos, en el Anexo N 5 se detalla el medio de cultivo utilizado y el procedimiento realizado para el análisis de actividad antimicrobiana

2.2.1. Diseño de la investigación

Se planteó un estudio cuasi experimental para determinar la existencia de algún efecto antimicrobiano significativo contra la *Candida albicans* en los extractos y aceite esencial obtenidos a partir de la planta menta.

2.2.2. Población y muestra

Para la primera etapa de esta investigación, tomando en cuenta que el objetivo de la investigación no fue realizar un estudio etnofarmacológico en su totalidad, en esta parte se visitó 10 mercado y se determinó que en promedio 70 personas compran plantas medicinales en un fin de semana, en cada mercado, dando un universo de 700 personas que se eligió con fines de saber si la planta menta es más usada de 153 plantas que se encuentran en Riobamba. También se determinó que el 70% adquiere para uso medicinal mientras que el 30 le da otro uso. Así se utilizó la siguiente formula:

$$n= \frac{k^{\wedge}2*p*q*N}{(e^{\wedge}2*(N-1))+k^{\wedge}2*p*q}$$

n: 700
K: 1.96 nivel de confianza es del 95%
p: proporción esperada en este caso es del 70%
q: 1-p (en este caso 30%)
e: error del 5%

$$n = \frac{(700) \text{ x } (1.96)2 \text{ x } (0.70) \text{ x } (0.30)}{(0.03)2\ (700-1)\ +\ (\ 1.96)2 \text{ x } (0.70) \text{ x } (0.30)}$$

n= 221,09

Entonces este fue el número de personas que se determinó encuestar.

Para la segunda etapa correspondiente al Análisis fitoquímico se utilizo lo siguiente:

Peso de la planta seca y molida		Extracto etéreo		Extracto alcohólico		Extracto acuoso	
Planta	Peso (gramos)	Volumen (ml)	Peso (gramos) planta seca	Volumen (ml)	Peso (gramos) planta seca	Volumen (ml)	Peso (gramos) planta seca
Menta	12,9	100	10,5	50	9,1	42,4	7,9

Mientras que para a tercera etapa correspondiente al análisis de actividad antimicrobiana, las cepas utilizadas fueron cultivadas en agar Sabouraud e incubadas a 37 °C durante 48 h. De

cada cultivo se tomaron 5 colonias de aproximadamente 1 mm de diámetro y se resuspendieron en tubos con 5 mL de agua destilada estéril, hasta alcanzar una turbidez equivalente a la del tubo 0,5 de la escala de McFarland (106 células/mL).

2.2.3 Metodología a emplear

La investigación utilizó el análisis documental, como método empírico, considerado como un conjunto de operaciones encaminadas a representar un documento y su contenido bajo una forma diferente de su forma original, con la finalidad de posibilitar su recuperación posterior e identificarlo. Así se buscó, compiló y estudió la información relacionada a la evaluación de la actividad antimicrobiana en vitrio de menta frente a cándida albicans, usando fuentes bibliográficas como: libros, revistas científicas, artículos científicos, para conocer y evaluar la realidad existente.

Dentro de los métodos teóricos la investigación utilizó el método analítico–sintético, el cual estudia los hechos, a partir de la descomposición del objeto de estudio en cada una de sus partes para estudiarlas en forma individual (análisis) y luego se integran dichas partes para estudiarlas de manera holística e integral (síntesis), el mismo, que permitió entender la problemática planteada y ayudó a sintetizar el efecto antimicrobiano significativo contra las cepas de bacterias *Candida albicans* producto de la actividad antimicrobiana en los extractos obtenidos a partir de la planta medicinal conocida como menta.

Así mismo se utilizó el método histórico – lógico el cual se refiere que los diversos problemas o fenómenos no se presentan de manera incierta sino que es el resultado de un largo proceso que los origina, motiva o da lugar a su existencia. Esta evolución de otra parte no es rigurosa o repetitiva de manera similar, sino que va cambiando de acuerdo a determinadas tendencias o expresiones que ayuda a interpretarlos de una manera secuencial. Este método permitió realizar un análisis histórico-lógico de la problemática de investigación, el cual posibilitó establecer aspectos más notables de la actividad antimicrobiana de la planta medicinal menta en relación a la Cándida albicans.

Los métodos que se utilizó para la determinación de la actividad antimicrobiana fueron la técnica de Mitscher y el tamizaje fitoquímico.

2.2.4. Técnicas

Como parte de la técnica de recopilación y análisis de información, se utilizó la encuesta como técnica en la primera fase correspondiente al estudio etnofarmacológico, mientras que en las restantes fases se utilizó la observación estructurada.

2.2.5. Instrumentos

Se utilizó el cuestionario etnofarmacológico en la primera etapa de la investigación, con el objetivo de obtener información etnofarmacológica que indique el uso tradicional de las plantas medicinales que dan los habitantes del cantón Riobamba (Ver Anexo 6). La segunda etapa se utilizó como instrumento ficha de recolección del análisis fitoquímico (Ver Anexo 7); y en la tercera etapa se uso la ficha de recolección del análisis antimicrobiano (Ver Anexo 8), las cuales fueron destinadas a registrar ordenadamente la información correspondiente a cada etapa.

2.2.6. Plan de recolección de datos

Con la información obtenida de la encuesta aplicada en la primera etapa y la observación estructurada en las restantes etapas de la investigación se elaboró una base de datos que contuvo los resultados obtenidos del estudio etnofarmacológico, fitoquímico y antimicrobiano, estos datos fueron clasificados y validados con el apoyo del software Excel 2016, para su posterior análisis estadístico con la utilización del software estadístico SPSS versión 22, donde fueron analizados y generados datos estadísticos para su interpretación y análisis.

2.2.7. Diseño estadístico

Se realizó el análisis descriptivo aplicando estadígrafos para variables cualitativas (porcentajes), variables cuantitativas (promedio, desviación estándar y rango) y particularmente para la comprobación de la hipótesis se realizó un análisis de varianza ANOVA, para comparar las medias de las distribuciones de la variable cuantitativa (halos de inhibición) en los extractos y aceites de menta.

CAPÍTULO III. EVALUACIÓN DE RESULTADOS

3.1. Procedimiento de la Aplicación de los Resultados de la Investigación

Con los datos de la encuesta y la información de la observación estructurada realizada en los análisis fitoquímicos y actividad antimicrobiana se realizó un análisis univariado donde se obtuvo frecuencias y porcentajes de las variables de estudio, La información obtenida de las encuestas se contrastaron con estudios realizados acerca del tema. Los datos de observación estructurada fueron contrastados con las diferentes pruebas que se realizaron en la investigación.

3.2. Análisis de los resultados

Primera etapa. Estudio etnofarmacológico

Para esta etapa se utilizó dos índices, el nivel de uso significativo (UST%), para estimar el nivel de uso significativo para cada especie y verificar su aceptación cultural, se utilizó la metodología propuesta por Germosén Robineau (1995), la cual expresa que aquellos usos medicinales que son citados con una frecuencia superior o igual al 20%, por las personas encuestadas que usan plantas como primer recurso para un determinado problema de salud, (Infecciones superficiales o graves producidas por la *Candida albicans en esta investigación*) pueden considerarse significativos desde el punto de vista de su aceptación cultural y, por lo tanto, merecen su evaluación y validación científica (71).

El UST se calculó dividiendo el número de citaciones de uso para cada especie (s), entre el número de informantes encuestados, se propone la siguiente ecuación:

$$UST = \frac{\text{Uso Especie(s) } 100}{\text{Nis}}$$

Donde:
Uso Especie (s) = número de citaciones para cada especie.
Nis = número de informantes encuestados.

Y el otro fue el índice de valor de uso (IVU), que se utilizó para evaluar las preferencias del pueblo hacia las plantas utilizadas, se empleó el concepto de Valor de Uso (Philips y Gentry,

1993). Esta valoración muestra la cantidad de usos que se otorga a una determinada planta. Para determinar esta valoración se realizaron entrevistas a 221 usuarios de la medicina andina de Chimborazo, cada vez que un informante indicaba un uso se catalogaba como evento (72). La fórmula es la siguiente:

$$VUs = \frac{\Sigma VUis}{ns}$$ Donde: VUis= es el valor de uso atribuido a una especie particular (s) por un informante (i). ns= número total de informantes entrevistados acerca de una especie particular (s).

Para la investigación el valor de se obtuvo de la pregunta N 1, del cuestionario presentado en el Anexo N 6 de este documento y el ns fue de 221 entrevistados. Mediante lo indicado anteriormente se obtuvo los siguientes datos:

Tabla N 1. Lista de índices de plantas representativas empleadas como medicinales en las infecciones superficiales o graves producidas por la *Candida albicans*

Planta	Scientific Name	1. Infecciones superficiales o graves	2. Otros usos médicos	3. otros usos (Limpias, purificaciones etc)	4. Nivel de uso significativo (UTS %)	5 Índice de valor de uso (IVU)
Menta	*Menta piperita*	65	155	1	29,41	0,02
Sábila	*Liliaceae Aloe vera L*	51	181	0	23,08	0,02
Manzanilla	*Matricaria recutita* L.	48	172	1	21,72	0,02
Cola de caballo	*Equisetum arvense*	10	210	1	4,52	0,01
Ortiga	*Urtica Dioica* L.	5	66	150	2,26	0,01
Ruda	*Ruta graveolens*	2	111	108	0,90	0,01
Malva	*Malva sylvestris*	1	170	50	0,45	0,01
Eucalipto	*Eucalyptus obliqua*	0	180	41	0,00	0,01
Llanten	*Plantago major*	0	216	5	0,00	0,01
Borraja	*Borago officinalis*	0	214	7	0,00	0,01

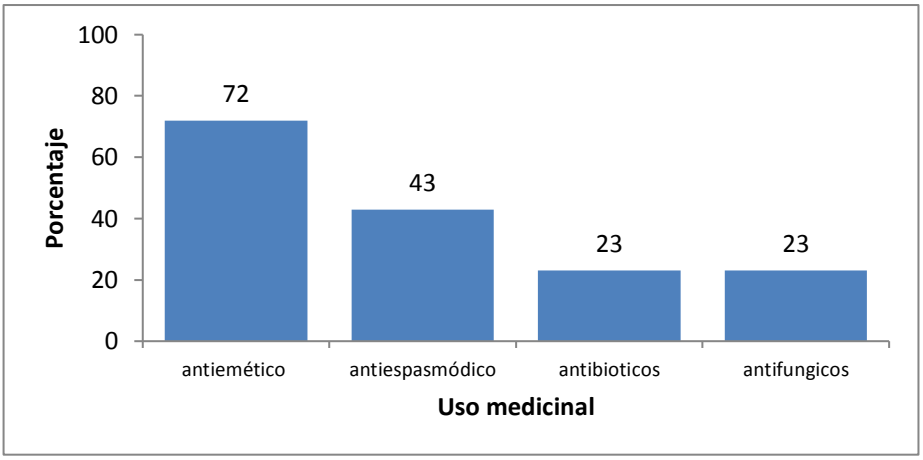
Fuente: Encuesta realizadas en cantón Riobamba, 2018

El índice de Nivel de uso significativo (UTS %) indicó que las plantas que usan como primer recurso para las infecciones superficiales o graves producidas por la *Candida albicans son: la Menta piperita* (29,41), *Sabila; Liliaceae Aloe vera L*(23,08) *y la manzanilla Matricaria recutita* (21,72). En contrate se puede mencionar que no existen estudios a nivel local que evalúen la planta *Mentha piperita* vs *Candida albicans.* Existe un estudio etnobotánico (73) señala que diez son las plantas medicinales que se usan contra diversas enfermedades dentro de la medicina Andina del cantón Riobamba. En efecto la investigación reveló que la mayoría usa el grupo de plantas en trastornos digestivos, ayudar a la digestión (antiemético);

como estimulante para el caso de dolores musculares o calambres (antiespasmódico).para la gripe, la tos, otros usos (limpias, purificaciones etc). Sin embargo una considerable cantidad la usan para tratar infecciones superficiales como: piel (intertrigo), mucosas (oral, genitourinaria o digestiva) y uñas (paroniquia o perionixis).

A continuación, se presenta la información etnofarmacológica más relevante encontrada con la aplicación de las encuestas

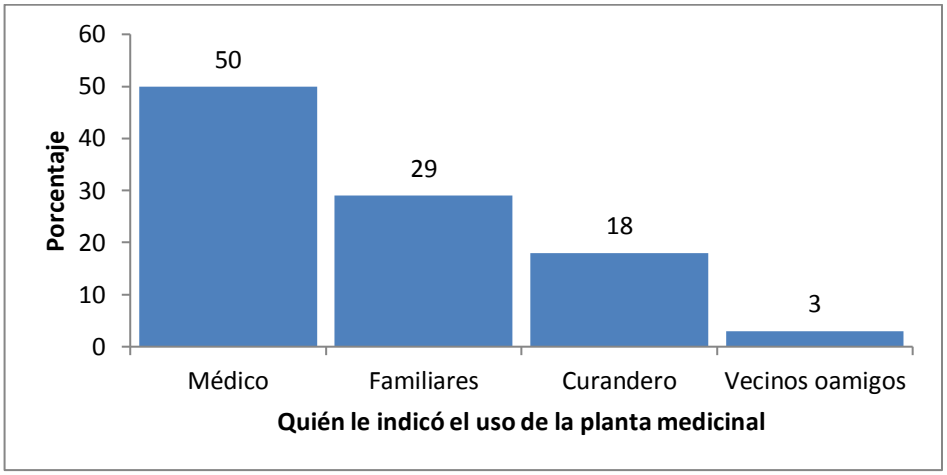
Gráfico N 1. Uso medicinal



Fuente: Encuesta realizadas en los Centros de comercialización del cantón Riobamba

Se evidenció que en la medicina Andina del cantón Riobamba mayormente se utiliza las plantas medicinales para trastornos digestivos, ayudar a la digestión (antiemético); como estimulante para el caso de dolores musculares o calambres (antiespasmódico). Se usa para la gripe, la tos, hasta para infecciones de vías urinarias; datos que corroboran lo referido del sistema de Atención de Salud Cantonal por el GAD Riobamba (68) acerca de los problemas de salud que sufren los habitantes, como es: parasitosis intestinal, infecciones en vías urinarias, venas varicosas, diarrea gastrointestinal.

Gráfico N 2. Personas que prescriben el uso de plantas medicinales



Fuente: Encuesta realizadas en los Centros de comercialización del cantón Riobamba

Las plantas y los conocimientos de sus indicaciones terapéuticas los obtienen mayormente de los médicos seguidos los familiares y curanderos en menos frecuencia de los vecinos. Con respecto a lo reportado debido a factores culturales, los profesionales de la salud han tenido que adaptarse a las diversas formas de atención curativa como: aromaterapia, medicina Andina (uso de plantas medicinales) entre las principales presentes en el cantón Riobamba (68). por lo que intervienen más o recomiendan el uso de plantas medicinales.

Gráfico N 3. Mejora en la salud con el uso de plantas medicinales

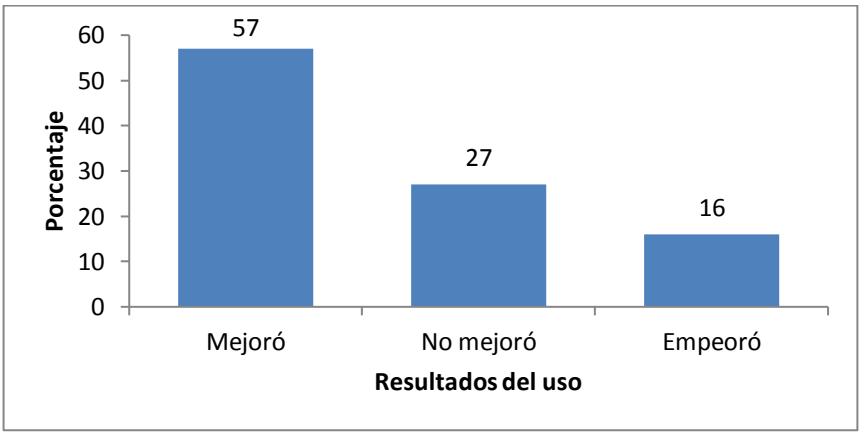
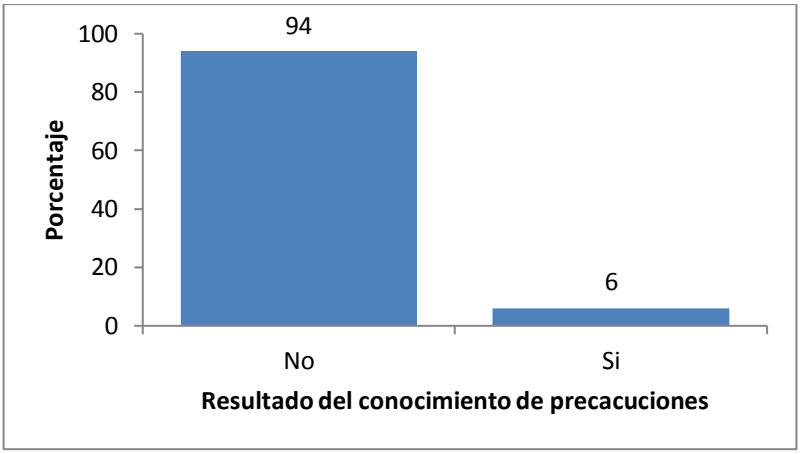


Gráfico N 4. Conocimiento de precauciones ante el uso de plantas medicinales



La encuesta realizada reveló que los habitantes de Riobamba consideran que las plantas medicinales si mejoran su salud al usarlas, pero no consideran las contraindicaciones (Gráfico N 4 y 5), seguramente porque unas pocas plantas tienen contraindicaciones y toxicidad grave según varios autores. (73) (16) (52).

Segunda etapa. Análisis fitoquímico

Tabla N 2. Resultado del análisis fitoquímico en extractos etéreos

Metabolitos secundarios	Método	Resultado
Alcaloides	Ensayo de Dragendorff	-
	Ensayo de Mayer	-+
	Ensayo de Wagner	+
Terpenoides	Ensayo de Lieberman- Burchard	++ (Verde intenso)
Cumarinas	Ensayo De Baljet	-
Compuestos Grasos	Ensayo de Sudan III	-
Interpretación de resultados: (-) Negativo, (+) Baja evidencia o intensidad de reacción para ese metabolito, (++) Evidencia o intensidad moderada de reacción, (+++) Alta evidencia o intensidad de reacción a ese metabolito.		

Fuente: Análisis fitoquímico

Según los resultados obtenidos mediante el análisis fitoquímico en extractos etéreos, se evidenció que los componentes activos en la planta medicinal menta, en estudio son los Terpenoides; seguido por los alcaloides por los ensayos realizados para este compuesto, pero

en menor cantidad. No existe evidencia acerca de la presencia de cumarinas y compuestos Grasos.

Tabla N 3. Resultado del análisis fitoquímico en extractos alcohólicos

Metabolitos secundarios	Método	Resultado
Alcaloides	Ensayo de Dragendorff	+
	Ensayo de Mayer	+
	Ensayo de Wagner	+
Terpenoides	Ensayo de Lieberman- Burchard	+++ (verde oscuro negro)
Quininas	Ensayo de Borntrager	-
Cumarinas	Ensayo De Baljet	++
Catequinas	Ensayo de Catequinas	-
Resinas	Ensayo de Resinas	++
Saponinas	Ensayo de la Espuma	-
Taninos	Ensayo de Cloruro Férrico	++ (verde intenso)
Azúcares Reductores	Ensayo de Fehling	+++
Flavonoides	Ensayo de Shinoda	-
Antocianidinas	Ensayo de Antocianidinas	-
Interpretación de resultados: (-) Negativo, (+) Baja evidencia o intensidad de reacción para ese metabolito, (++) Evidencia o intensidad moderada de reacción, (+++) Alta evidencia o intensidad de reacción a ese metabolito.		

Según los resultados obtenidos mediante el análisis fitoquímico en extractos alcohólicos, se evidenció que los componentes activos en la planta medicinal menta, en estudio son los Terpenoides, taninos; Azúcares Reductores, seguido por las Cumarinas, Resinas por los ensayos realizados para estos compuestos, No existe evidencia acerca de la presencia de Quininas, Flavonoides, Antocianidinas.

Tabla N 4. Resultado del análisis fitoquímico en Extractos acuosos

Metabolito secundario	Método	Resultado
Alcaloides	Ensayo de Dragendorff	+
	Ensayo de Mayer	-
	Ensayo de Wagner	+
Saponinas	Ensayo de la Espuma	-
Taninos	Ensayo de Cloruro Férrico	+ (Rosado)
Azúcares Reductores	Ensayo de Fehling	++
Flavonoides	Ensayo de Shinoda	-
Mucílagos	Ensayo de mucilagos	-

Interpretación de resultados: (-) Negativo, (+) Baja evidencia o intensidad de reacción para ese metabolito, (++) Evidencia o intensidad moderada de reacción, (+++) Alta evidencia o intensidad de reacción a ese metabolito.

Fuente: Análisis fitoquímico

Según los resultados obtenidos mediante el análisis fitoquímico en extractos acuosos, se evidenció que los componentes activos en la planta medicinal menta, en estudio son los azúcares reductores, seguido por las Taninas, alcaloides por los ensayos realizados para estos compuestos, No existe evidencia acerca de la presencia de Saponinas, Flavonoides Mucílagos

En relación a los resultados obtenidos en las Tablas N 1, 2,3 se puede mencionar lo siguiente, varios estudios (9), (8), (7), (6), realizados demuestran que los metabolitos, en su mayoría secundarios, tales como alcaloides, flavonoides, taninos, y otros compuestos de naturaleza fenólica son responsables de las actividades antimicrobianas en plantas superiores, compuestos que se encuentran en la planta medicinal menta piperita analizada en esta investigación. Los terpenoides también han sido informados como antimicrobianos debido a la capacidad que poseen de causar una desestabilización en la integridad y permeabilidad de la membrana, al interferir con la disipación de la fuerza de los protones (7). Por lo tanto, la presencia de terpenoides y compuestos fenólicos (cumarinas, flavonoides, lignina y taninos), podrían explicar la actividad antimicrobiana que se pueda observar en el posterior análisis de la actividad antimicrobiana realizado en la tercera etapa de este estudio.

Tercera etapa. Análisis de actividad antimicrobiana

Tabla N 5. Resultados del análisis microbiológico aceite esencial sobre sobre agar saboroud de menta piperita (menta)

Concentración	Inhibición		
	1	2	3
25	negativa	negativa	negativa
50	positiva	positiva	positiva
75	positiva	positiva	positiva
100	positiva	positiva	positiva

Fuente: Análisis de actividad antimicrobiana
Positiva: no existe crecimiento de *Candida albicans*
Negativa: en el agar se presenta en el halo de inhibición el crecimiento de *Candida albicans*

El análisis de actividad antimicrobiana realizado en la tercera etapa de esta investigación determinó que la concentración mínima inhibitoria de aceite esencial de la planta medicinal menta ante *Candida albicans* fue la concentración de 50%.

Tabla N 6. Resultados del análisis microbiológico extracto alcohólico sobre agar saboroud de menta piperita (menta)

Concentración	Inhibición		
	1	2	3
25	negativa	negativa	negativa
50	negativa	negativa	negativa
75	positiva	positiva	positiva
100	positiva	positiva	positiva

Fuente: Análisis de actividad antimicrobiana
Positiva: no existe crecimiento de *Candida albicans*
Negativa: en el agar se presenta en el halo de inhibición el crecimiento de *Candida albicans*

También el análisis de actividad antimicrobiana determino que la concentración mínima inhibitoria de extracto alcohólico de la planta medicinal menta ante *Candida albicans* fue la concentración de 75%.

Tabla N 7. Prueba de sensibilidad halos de inhibición (mm)

Concentración	**Aceite (prueba de sensibilidad halos de inhibición (mm))**			
	P1	P2	P3	Promedio
100	17	18	18	17,67
75	16	16	15	15,67
50	15	14	15	14,67
25	0	0	0	0
Concentración	**Extracto (prueba de sensibilidad halos de inhibición (mm))**			
100	16	16	18	16,67
75	15	14	12	13,67
50	0	0	0	0
25	0	0	0	0
Ketoconazol	13	0	0	13
Agua Destilada	0	0	0	0

Fuente: Análisis de actividad antimicrobiana

Tabla N 8. Valores estadísticos

	Aceite	Extracto
Media	16,00	10,11
Mediana	16,00	14,00
Desviación estándar	1,414	7,753
Rango	4	18
Mínimo	14	0
Máximo	18	18

Fuente: SPSS V 22 Análisis de actividad antimicrobiana

El análisis de sensibilidad realizado determinó que el aceite esencial de la menta piperita demostró ser efectivo a una concentración de 50 con una inhibición de 14,67mm ante la Candida albicans, mientras que en los extractos se observó a una concentración de 75% con una inhibición de 13,67mm.

Comprobación de la hipótesis

Tabla N 9. Valores estadísticos prueba ANOVA (Análisis de varianza)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	304,762	1	304,762	15,907	,000
Dentro de grupos	1168,667	61	19,158		
Total	1473,429	62			

Fuente: SPSS V 22 Análisis de actividad antimicrobiana

La prueba de varianzas determinó que alguna de las medias de las distribuciones de la variable cuantitativa (halos de inhibición) en los extractos y aceites de menta es diferente, para llevar a cabo el contraste se recurrió al estadístico F de Snedecor, que el caso de investigación es de 15,907 con un valor de $p < 0,05$. Por tanto, se acepta la hipótesis como verdadera, afirmando que: existen importantes metabolitos secundarios en el extracto acuoso y aceite esencial de *Mentha piperita* que tengan efecto antimicrobiano sobre *Candida albicans*

3.3 Conclusiones parciales del capítulo

Se estableció que las plantas de acuerdo al nivel de uso significativo (UST%), presentan los siguientes valores: menta (29,41%), sábila (23,08%) y manzanilla (21,72%).

En el análisis fitoquímico se determinó la presencia de ciertos metabolitos secundarios de la planta medicinal menta como los terpenoides y compuestos fenólicos (cumarinas, flavonoides, lignina y taninos).

El aceite esencial de la menta al 50% es la concentración mínima inhibitoria frente a *Cándida albicans*

El extracto alcohólico de la mentha al 75% es la concentración mínima inhibitoria frente a *Cándida Albicans*

Dentro del análisis microbiológico, se presentó mayor efectividad a una concentración de 100%, obteniéndose halos promedio de 17,67mm y 16,67mm para aceite esencial y extracto etanólico respectivamente.

La prueba de varianzas realizada como análisis estadístico determinó que alguna de las medias de las distribuciones de la variable cuantitativa (halos de inhibición) en los extractos y aceites de mentha es diferente (15,907 con un valor de $p < 0,05$), afirmando que existen efecto antimicrobiano de la mentha sobre *Cándida albicans.*

CONCLUSIONES GENERALES

- La investigación teórica aportó relevante información acerca de la planta mentha, la fitoquímica y actividad antimicrobiana de las plantas que ayudó como complemento en las diferentes etapas realizadas en esta investigación.

- La parte metodológica nos permitió establecer claramente tres etapas favoreciendo el desarrollo del objetivo planteado en esta investigación, con la prueba estadística realizada, se logró establecer la existencia de un efecto antimicrobiano significativo contra la *Cándida albicas* en los extractos y aceite esencial obtenidos a partir de la *Mentha Piperita*

- Al realizar la evaluación de los resultados obtenidos en esta investigación llevaron a concluir que la planta mentha en su presentación de aceite o extractos posee efectos antimicrobianos sobre *Cándida albicans,* resultando ser de gran interés por los índices Valor de Uso (IVU) y Nivel de Uso Significativo (UST) que le dan los habitantes de la ciudad de Riobamba a la mentha

RECOMENDACIONES

- Es recomendable que se realice un estudio similar con las otras plantas que se usan como primer recurso para las Infecciones superficiales o graves producidas por la Candida albicans que son la sábila; y la manzanilla

- Es importante realizar estos ensayos con microdiluciones en tubo para observar si hay actividad con menores concentraciones o se mantienen los mismos resultados a los obtenidos en difusión por agar.

- Se recomienda facilitar la información científica que se obtuvo de esta investigación con el fin de mejorar el conocimiento de los usuarios acerca de los extractos y aceite de la planta medicinal (mentha), que podrían utilizarse como medicamento contra las infecciones causadas por el microorganismo *Candida albicans.*

BIBLIOGRAFÍA

1. OMS. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. [Internet].; 2013. Disponible en: http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s21201es/s21201es.pdf.
2. Veletanga J. La Medicina Alternativa gana terreno en Ecuador. Redacción Médica. [Internet].; 2016. Disponible en: https://www.redaccionmedica.ec/secciones/profesionales/la-medicina-alternativa-gana-terreno-en-ecuador-88136.
3. Punit P, Shah P, D'Mello M. A review of medicinal uses and pharmacological effects of Mentha piperita. Natural Product Radiance; 3(4).; 2004.
4. Domingo M, López M. Plantas con acción antimicrobiana. Rev. Esp.Quimioterapia; 16(4): pp 385-393.; 2004.
5. Reyes F, Palou E, López A. Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y de determinación de los componentes químicos de los aceites esenciales. Rev. Ingeniería de Alimentos; 8(1):pp 68- 8.; 2014.
6. Rodríguez C, Zarate A, Sánchez L. Actividad antimicrobiana de cuatro variedades de plantas frente a patógenos de importancia clínica en Colombia. Rev. NOVA; 15 (27): 119-129. [Internet].; 2017. Disponible en: http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v15n27/1794-2470-nova-15-27-00119.pdf.
7. Maraví G. [Tesis Cirujía]. Lima. UNIVERSIDAD PRIVADA NORBERT WIENER. [Internet].; 2012. Disponible en: http://repositorio.uwiener.edu.pe/bitstream/handle/123456789/48/018%20EAP%20ODONTOLOGIA%20TESIS%20-%20MARAV%C3%8D%20INGA.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
8. Ruiz J, Roque M. Actividad antimicrobiana de cuatro plantas del nor-oriente peruano.Rev.Ciencia e Investigación Farmacia y Bioquímica; 12(1): pp 41-47.; 2009.
9. Azuero A, Jaramillo C, San Martin D, Armas H. Análisis del efecto antimicrobiano de doce plantas medicinales de uso ancestral en Ecuador. Revista Ciencia UNEMI; 98(20):pp. 11-18. [Internet].; 2016. Disponible en: http://ojs.unemi.edu.ec/index.php/cienciaunemi/article/view/342/295.

10. Pontón J, Moragues D, Gené J, Guarro J. Hongos y actinomicetos alergénicos México: Iberoamericana ; 2010.
11. World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. [Internet].; 2014. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf.
12. Nucci M, Queiroz F, Alvarado T, Tiraboschi I, Cortes J, Zurita J, et al. Epidemiology of Candidemia in Latin America: A Laboratory-Based Survey. [Internet].; 2013. Disponible en: http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0059373.
13. Bial J, Arístegui M. Candida albicans. Rev Iberoam Micol; 9(18):90-123. [Internet].; 2002. Disponible en: http://hongos-alergenicos.reviberoammicol.com/files/025.PDF.
14. MSP. Diagnóstico y tratamiento de la infección vaginal en obstetricia 2014: Guía de Práctica Clínica (GPC). [Internet].; 2014. Disponible en: http://instituciones.msp.gob.ec/documentos/Guias/guias%202014/GPC%20Infeccion_vaginal_obstetrica.pdf.
15. World Health Organization. WHO Monographs on Selected Medicinal Plants. Vol 2. Geneva. [Internet].; 2002. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42052/2/9241545372.pdf.
16. Castro D, Díaz J, Serna R, Denis M. Cultivo y producción de plantas aromáticas y medicinales Colombia: Editorial Rionegro; 2013.
17. Yang S, Jeon S, Lee E, Shim C. Comparative study of the chemical composition and antioxidant activity of six essential oils and their components. Nat Prod Res;24(2): pp 140-51.; 2010.
18. McKay D, Blumberg J. A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (Mentha piperita L.).Phytother Res;20(7):519-30.; 2006.
19. Fecka I, Turek S. Determination of water-soluble polyphenolic compounds in commercial herbal teas from Lamiaceae: peppermint, melissa, and sage. J Agric Food Chem;55(26): pp 10908-17.; 2007.
20. Sokovic M, Vukojevic J, Marin P, Brkic D. Chemical composition of essential oils of Thymus and Mentha species and their antifungal activities. Molecules;14(1): pp 238-49.; 2009.

21. Behnam S, Farzaneh M, Ahmadzadeh M. Composition and antifungal activity of essential oils of Mentha piperita and Lavendula angustifolia on post-harvest phytopathogens. Commun Agric Appl Biol Sci;71(3): pp 1321-6.; 2006.
22. Gherman C, Culea M, Cozar O. Comparative analysis of some active principles of herb plants by GC/MS.Talanta;53(1): pp 253-62.; 2000.
23. Pérez D. Vademécum de Fitoterapia. [Internet].; 2010. Disponible en: http://plantas-medicinales.servidor-alicante.com/docs/vademecum-fitoterapia.pdf.
24. De Río M. Fitoterapia. [Internet].; 2008. Disponible en: http://plantas-medicinales.servidor-alicante.com/docs/Manual_de_Fitoterapia.pdf.
25. Hall V, Rocha P, Rodríagez E. Plantas medicinales. [Internet].; 2012. Disponible en: http://plantas-medicinales.servidor-alicante.com/docs/Manual_de_Fitoterapia.pdf.
26. ESCOP. Regulatory assessment of herbal medicinal products on a European level: The Herbal Medicinal Products Working Party (HMPWP). Phytomedicine; 9: p 673.; 2002.
27. Lans C, Turner N, Khan T. Ethnoveterinary medicines used to treat endoparasites and stomach problems in pigs and pets in British Columbia, Canada.Vet Parasitol;148(3-4): pp 325-40.; 2007.
28. Grigoleit H, Grigoleit P. Pharmacology and preclinical pharmacokinetics of peppermint oil.Phytomedicine;12(8): pp 612-6.; 2005.
29. Sharma A, Sharma M, Kumar M. Protective effect of Mentha piperita against arsenic-induced toxicity in liver of Swiss albino mice. Basic Clin Pharmacol Toxicol;100(4): pp 249-57.; 2007.
30. Akdogan M, Kilinc I, Oncu M, Karaoz E. Investigation of biochemical and histopathological effects of Mentha piperita L. and Mentha spicata L. on kidney tissue in rats. Hum Exp Toxicol;22(4): pp 213-9.; 2003.
31. Nair B. Final report on the safety assessment of Mentha Piperita (Peppermint) Oil, Mentha Piperita (Peppermint) Leaf Extract, Mentha Piperita (Peppermint) Leaf, and Mentha Piperita (Peppermint) Leaf Water. Int J Toxicol;20(3):pp 61-73.; 2001.
32. Benito M, Jorro G, Morales C, Peláez A, Fernández A. Labiatae allergy: systemic reactions due to ingestion of oregano and thyme. Ann Allergy Asthma Immunol;76(5): pp 416-8.; 2000.

33. Fleming C, Forsyth A. D5 patch test reactions to menthol and peppermint.Contact Dermatitis;38(6): p 337.; 1988.
34. De Sousa A, Soares P, De Almeida A, Maia A, De Souza E. Antispasmodic effect of Mentha piperita essential oil on tracheal smooth muscle of rats. J Ethnopharmacol;130(2): pp 433-6.; 2010.
35. Khater H, Ramadan M. Lousicidal, ovicidal and repellent efficacy of some essential oils against lice and flies infesting water buffaloes in Egypt. Vet Parasitol;164(4): pp 257-66.; 2009.
36. Samarasekera R, Weerasinghe I, Hemalal K. Insecticidal activity of menthol derivatives against mosquitoes. Pest Manag Sci;64(3): pp 290-5.; 2008.
37. Samarth, RM. Protection against radiation-induced testicular damage in Swiss albino mice by Mentha piperita (Linn.). Basic Clin Pharmacol Toxicol;104(4): pp 329-34.; 2009.
38. Jagetia G. Radioprotective Potential of Plants and Herbs against the Effects of Ionizing Radiation. J Clin Biochem Nutr;40(2): pp 74-81.; 2007.
39. Samarth, RM. Protection against radiation induced hematopoietic damage in bone marrow of Swiss albino mice by Mentha piperita (Linn). J Radiat Res;48(6): pp 523-8.; 2007.
40. Rasooli I, Shayegh S, Taghizadeh M, Astaneh S. Phytotherapeutic prevention of dental biofilm formation. Phytother Res;22(9): pp 1162-7.; 2008.
41. Shayegh S, Rasooli I, Taghizadeh M, Astaneh S. Phytotherapeutic inhibition of supragingival dental plaque.Nat Prod Res;22(5): pp 428-39.; 2008.
42. Mohsenzadeh M. Evaluation of antibacterial activity of selected Iranian essential oils against Staphylococcus aureus and Escherichia coli in nutrient broth medium. Pak J Biol Sci;10(20): pp 3693-7.; 2007.
43. Mimica N, Bozin B, Sokovic M, Mihajlovic B. Antimicrobial and antioxidant activities of three Mentha species essential oils. Planta Med; 69(5): pp 413-9.; 2003.
44. Iscan G, Kirimer N, Kürkcüoglu M, Baser K. Antimicrobial screening of Mentha piperita essential oils. J Agric Food Chem;50(14): pp 3943-6.; 2002.

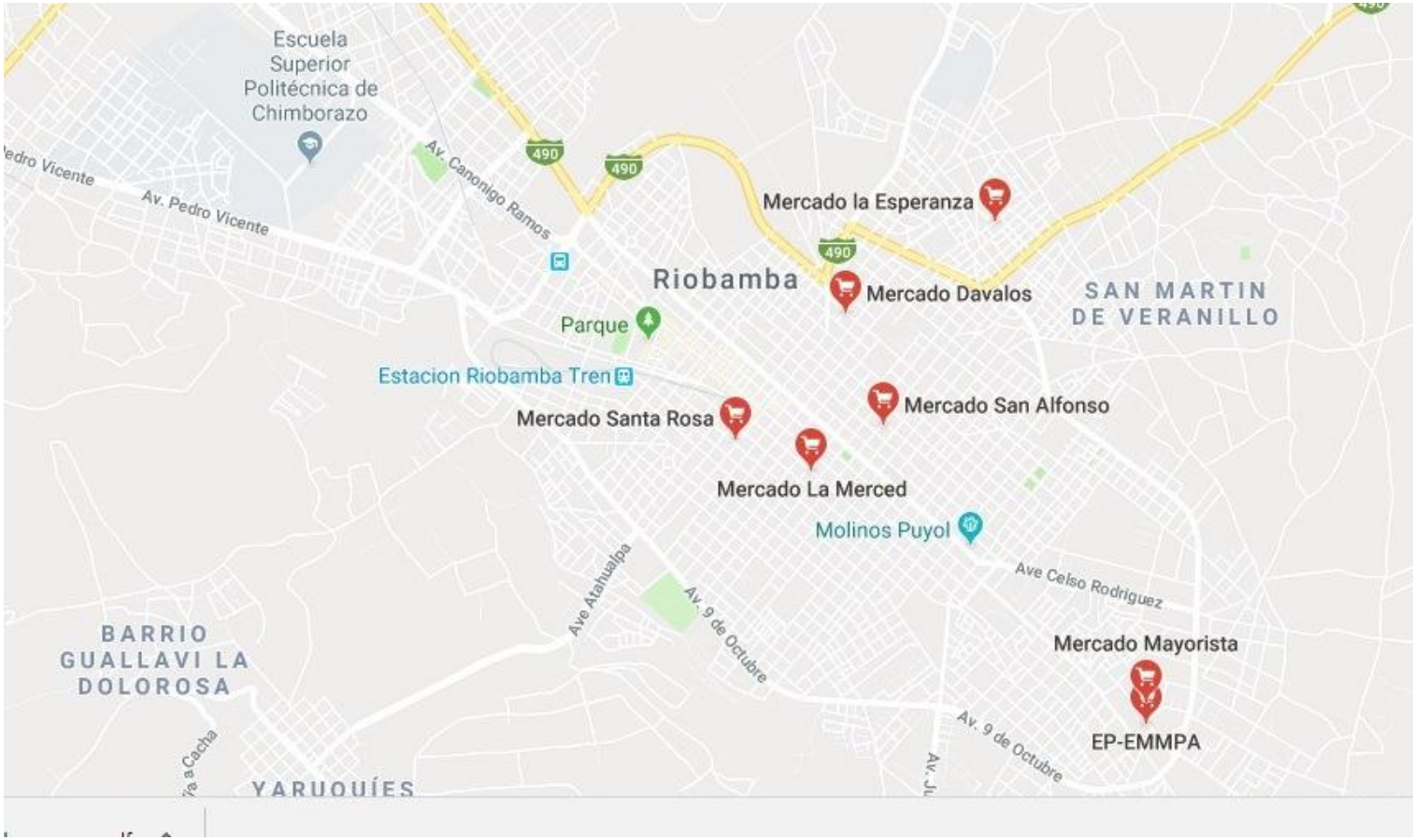
45. Schuhmacher A, Reichling J, Schnitzler P. Virucidal effect of peppermint oil on the enveloped viruses herpes simplex virus type 1 and type 2 in vitro. Phytomedicine;10(6-7): pp 504-10.; 2003.
46. Samarth R, Panwar M, Kumar M, Kumar A. Protective effects of Mentha piperita Linn on benzo[a]pyrene-induced lung carcinogenicity and mutagenicity in Swiss albino mice. Mutagenesis;21(1): pp 61-6.; 2006.
47. Samarth, RM; Panwar, M; Kumar, A. Modulatory effects of Mentha piperita on lung tumor incidence, genotoxicity, and oxidative stress in benzo[a]pyrene-treated Swiss albino mice. Environ Mol Mutagen;47(3): pp 192-8.; 2006.
48. Atta A, Alkofahi A. Anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of some Jordanian medicinal plant extracts. J Ethnopharmacol;60(2): pp117-24.; 1988.
49. Bruneton J, Villar A. Farmacognosia: Fitoquímica de las Plantas medicinales. 2nd ed. Zaragoza: Editorial Acribia; 2010.
50. Ávalos A, Pérez E, Carril U. Metabolismo secundario de plantas. Reducá. Serie Fisiología Vegetal; 2 (3): pp 119-145.; 2009.
51. Orozco R. Los principios activos de las plantas medicinales. [Internet].; 2010. Disponible en: http://www.viverochimalxochipan.com.mx/files/Los-Principios-Activos-de-las-plantas-medicinales.pdf.
52. Puelles M, Gómez V, Gabriel J, Moris G. Las plantas medicinales etnobotánica y viabilidad comercial Madrid : Editorial Catarata; 2010.
53. García E, Castillo S, García P. Actividad antimicrobiana. Investigation en plantas de importancia médica. Barcelona, España: OmniaScience. 77-100.; 2016.
54. Bakht N, Humaira F, Madiha A, Haq I. Recent Trends and Methods in Antimicrobial Drug Discovery from Plant Sources. Austin J Mi¬crobiol;1(1): p 1002.; 2015.
55. Villar D. Sistemas Organicos III: Farmacología de antimicrobianos. [Internet].; 2010. Disponible en: http://aprendeenlinea.udea.edu.co/lms/moodle/pluginfile.php/269568/mod_page/content/3/Antimicrobianos/Antimicrobianos-apuntes-mayo-2010.pdf.
56. Ramírez L, Marin D. Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. Scientia et Technica. Universidad Tecnológica de Pereira. ISSN 0122-1701.; 2009.

57. European Committee forAntimicrobial SusceptibilityTesting. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution. Clinical Microbiology and Infection;6(9): pp 509-2000.; 2009.
58. Cavalieri S, Rankin I, Harbeck R, Sautter R, McCarter Y, Sharp S, et al. Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. [Internet].; 2012. Disponible en: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=22691&Itemid=270&lang=en.
59. Sacsaquispe R, Velásquez J. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de Disco Difusión. [Internet].; 2002. Disponible en: http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/manual%20sensibilidad%202.pdf.
60. Valgas S, D Souza E, Smania A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. Brazilian Journal of Microbiology; 38: pp 369-2007.; 2007.
61. Wilkinson J. Methods for Testing the Antimicrobial Activity of Extracts. Modern Phytomedicine;34: pp157-171.; 2007.
62. Langfield R, Scarano F, Heitzman M, Kondo M, Hammond G. Use of a modified microplate bioassay method to investigate antibacterial activity in the Peruvian medicinal plant Peperomia galiodes. J. Ethnopharmacol; 94(2-3): pp 279-2004.; 2007.
63. Arenas R. Micología médica Ilustrada Madrid: Mcgraw-hill interamericana editores, S.A. de C.V.; 2014.
64. Bonifaz J. Micología médica básica Madrid: Mcgraw-hill interamericana editores, S.A. de C.V; 2012.
65. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. Microbiología médica Barcelona: Elsevier España, S.L.; 2014.
66. Leroy O, Gangneux J, Montravess P. Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive Candida infections in critical care: A multicenter, prospective, observational study in France (2005-2006). Crit Care Med; 37(5): pp 1612-1618.; 2009.
67. Owen M, Clenney T. Management of vaginitis. Am Fam Phys; 70(11):pp 2125-2132.; 2004.

68. GAD Riobamba. Plan de desarrollo y ordenamiento territorial 2015-2019. [Internet].; 2015 [cited 2018 03 06. Disponible en: http://app.sni.gob.ec/sni-link/sni/PORTAL_SNI/data_sigad_plus/sigadplusdocumentofinal/0660000360001_Plan%20de%20Desarrollo%20Cantonal%202014-2019_15-03-2015_12-35-54.pdf.
69. OMS. Directrices de la OMS sobre buenas prácticas agrícolas y de recolección (BPAR) de plantas medicinales. [Internet].; 2005. Disponible en: http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/s5527s/s5527s.pdf.
70. Cañedo V, Ames T. Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos Lima: Editorial CIP; 2004.
71. Germosén Robineau L. Hacia una Farmacopea Vegetal Caribeña. 7th ed. Caribe: UAG & Universidad de Antioquia.; 1995.
72. Phillips O, Gentry AH. The useful plants of Tambopata, Peru: I.Statistical hypothesis tests with a new quantitative technique. Economic Botany;47: pp. 15-32.; 1993.
73. Morales F, Padilla S, Falconí F. Medicinal plants used in traditional herbal medicine in the province of Chimborazo, Ecuador. Afr J Tradit Complement Altern Med;14 (1): PP 10-15.; 2017.

ANEXOS

Anexo N 1. Localización de los centros de comercialización del cantón Riobamba



Fuente: Google map 2018

Anexo 2. Directrices de la OMS sobre buenas prácticas agrícolas y de recolección (BPAR) de plantas medicinales (69)

Prólogo

El documento Buenas prácticas agrícolas y de recolección de plantas medicinales proporciona orientación técnica para la producción de materias vegetales medicinales como materias primas para medicamentos no elaborados, medicamentos no elaborados y acabados.

Introducción

Durante los procesos de producción, incluidos el cultivo y la recolección de las plantas medicinales y el procesado poscosecha de las partes de éstas, las materias primas utilizadas en la producción de medicamentos campo y medicamentos no elaborados deben mantenerse, en la mayor medida posible, libres de contaminantes microbianos y de otros contaminantes y residuos, como plaguicidas.

Para producir materias primas de calidad alta, deben considerarse los siguientes procedimientos: Las materias primas deben lavarse adecuadamente, por si contienen contaminantes. En caso necesario y pertinente, las materias primas deben pelarse y secarse a una temperatura baja con objeto de evitar posibles cambios de color y olor.

Cultivo

No deben cultivarse plantas medicinales en zonas en las que las condiciones del terreno o el suelo sean peligrosas. Por «condiciones peligrosas» del terreno o el suelo se entiende aquellas que constituyen un riesgo alto de contaminación por sustancias peligrosas, como metales pesados, sustancias químicas agrícolas y otros residuos industriales.

Las condiciones preferidas para el cultivo de plantas medicinales son las de los suelos con un drenaje correcto y regados adecuadamente. Las plantas medicinales deben plantarse en tierras en las que pueden crecer las malas hierbas, ya que su presencia puede ser un indicador de que las condiciones son adecuadas para el cultivo. Únicamente deben manipular plaguicidas y herbicidas los trabajadores con experiencia. El rociado de estos agentes químicos debe realizarlo personal capacitado, con una antelación suficiente al período de cosecha y teniendo en cuenta la persistencia efectiva del producto utilizado.

Cosechado

- El cosechado no debe realizarse cuando el cultivo está mojado (rocío o lluvia) ni en condiciones de humedad ambiental alta; siempre que sea posible, debe realizarse en condiciones secas y de humedad baja.
- Los equipos de cosechado deben estar limpios y en buen estado.
- Cuando se utilizan segadoras o cosechadoras mecánicas, las partes de las máquinas en contacto con el cultivo y su caja deben limpiarse de forma periódica y mantenerse libre de materia vegetal y otros restos.
- Las cuchillas deben ajustarse para evitar que recojan tierra.
- Todos los recipientes utilizados en la recolección primaria del cultivo deben mantenerse libres de restos anteriores de materia vegetal y cuando no están siendo utilizados deben guardarse en un lugar seco, libre de insectos e inaccesible a los animales de granja y domésticos.
- Los productos dañados o deteriorados de la cosecha deben apartarse y desecharse.
- Los productos cosechados no deben acumularse sobre el suelo, sino que deben recogerse en sacos, cestos, remolques o tolvas secos.

Deben evitarse los daños mecánicos, la compactación excesiva y las formas de almacenamiento que favorezcan la descomposición:

- No deben utilizarse sacos de plástico en el cosechado.
- Los sacos no deben llenarse en exceso.
- Debe evitarse la compactación en el almacenamiento en altura.

El período desde el cosechado al transporte de la cosecha hasta el lugar de secado debe ser lo más corto que sea razonablemente factible.
La cosecha debe protegerse de las plagas y de los animales de granja y domésticos.

Secado

- La cosecha debe descargarse lo antes que sea posible tras su recepción en la instalación de secado.
- No debe dejarse expuesta a la luz solar directa durante períodos prolongados y debe protegerse de la lluvia.
- Los edificios en los que se realiza el secado de la cosecha deben estar adecuadamente ventilados y nunca deben utilizarse para animales de granja.
- El edificio se debe construir de forma que proteja a la cosecha de las aves y los insectos y de los animales de granja y domésticos.
- Los estantes de secado deben mantenerse limpios y revisarse de forma periódica.
- La cosecha debe distribuirse en capas delgadas, sobre estantes de reja metálica separados del suelo para permitir la libre circulación del aire, y debe voltearse de forma periódica para asegurar un secado uniforme e impedir la descomposición.
- No se recomienda el secado sobre el suelo con exposición a la luz solar directa.
- Una vez secos, los productos de la cosecha deben inspeccionarse y tamizarse o aventarse para retirar los productos con alteraciones del color, enmohecidos o dañados, así como la tierra, las piedras y otras materias extrañas. Los tamices deben mantenerse limpios y revisarse de forma periódica.
- Deben disponerse cubos de basura claramente señalados y deben vaciarse y limpiarse a diario.
- Los productos de la cosecha secos y en proceso de secado deben protegerse de las plagas y de los animales de granja y domésticos.
- Los productos de la cosecha secos deben envasarse lo antes que sea posible para su protección y para reducir el riesgo de infestación por plagas.

Envasado

- Tras retirar los productos deteriorados y la materia extraña, el producto de la cosecha seco y sano debe envasarse en sacos, bolsas o cajas limpios y secos, preferiblemente nuevos.
- Los materiales de envasado deben almacenarse en un lugar limpio y seco, libre de plagas e inaccesible a los animales.
- Los materiales de envasado reutilizables, como los sacos de yute, las bolsas de plástico, etc., deben limpiarse y secarse adecuadamente antes de sureutilización.
- Los productos envasados deben almacenarse en un lugar seco separado de la pared y del suelo y deben protegerse de las plagas y de los animales de granja y domésticos.
- Siempre que sea posible, el proveedor y el comprador deben acordar los materiales de envasado que se utilizarán.

Almacenamiento y transporte

Los productos secos envasados deben almacenarse en un edificio seco, aireado adecuadamente, con una variación mínima de la temperatura diurna y con una ventilación del aire correcta
Las ventanas y las puertas deben protegerse con mallas metálicas para impedir la entrada de plagas y de animales de granja y domésticos.

Se recomienda el almacenamiento de los productos cosechados secos envasados: en un edificio con suelos de hormigón (concreto),sobre palés, alejados de las paredes y con una separación adecuada de otros productos cosechados.
Para las entregas a granel, es muy recomendable utilizar recipientes ventilados para el transporte y el almacenamiento temporal, con el fin de reducir al mínimo los riesgos de contaminación. De forma alternativa, se recomienda el uso de vehículos de transporte ventilados e instalaciones de almacenamiento temporales adecuados.
Siempre que sea posible, el proveedor y el comprador deben acordar las condiciones del transporte y del almacenamiento temporal.

Equipos

- Los equipos utilizados para la producción y manipulación de las cosechas se deben poder limpiar fácilmente para reducir al mínimo la contaminación. Se recomienda la limpieza en seco, pero si es imprescindible utilizar agua los equipos deben secarse lo antes que sea posible.
- Todos los equipos se deben instalar de forma que permita un acceso fácil a los mismos. Deben mantenerse en buen estado y limpiarse de forma periódica.
- Debe evitarse siempre que sea posible el uso de madera.
- Si se utilizan equipos de madera (como palés, tolvas, etc.), no se deben
- someter a tratamientos químicos, como fungicidas químicos, por ejemplo clorofenoles, que pudieran ser una fuente de contaminación.

Personal

Los trabajadores que manipulen materias vegetales medicinales deben:

- mantener un alto grado de higiene personal, disponer de vestuarios y aseos adecuados, con lavabos para lavarse las manos.
- No se debe permitir que trabajen en la zona de manipulación de materias herbarias las personas que padezcan o sean portadoras de enfermedades transmisibles por las materias vegetales medicinales, incluida la diarrea.
- Los trabajadores que tengan heridas o llagas abiertas o infecciones cutáneas deben ser transferidos a zonas alejadas de las de manipulación de materias herbarias hasta su completa curación.

Anexo N 3 Screening fitoquímico

Introducción.

Para la presente investigación se realiza un tamizaje fitoquímico que nos permite contrastar los componentes que se encuentran presentes en la planta con los resultados del análisis microbiológico.

Parte experimental.

Materiales y reactivos

- Gradillas
- Éter etílico
- Tubos de ensayo
- Etanol.
- Agua destilada
- Reactivos del tamizaje.

Procedimiento:

La planta fresca, seca o el residuo de una extracción; es sometida a tres extracciones sucesivas según el esquema de la Fig. N 1, a cada extracto I, II y III, se le mide el volumen obtenido y se le calcula su concentración, esto es, gramos de sustancias extraídas por mL de extracto. Para ello tome una alícuota de 5 mL y páselo a una cápsula previamente tarada, evapore a sequedad en baño de agua y pese nuevamente. Se procede de igual forma que la técnica descrita para la determinación de sustancias solubles.

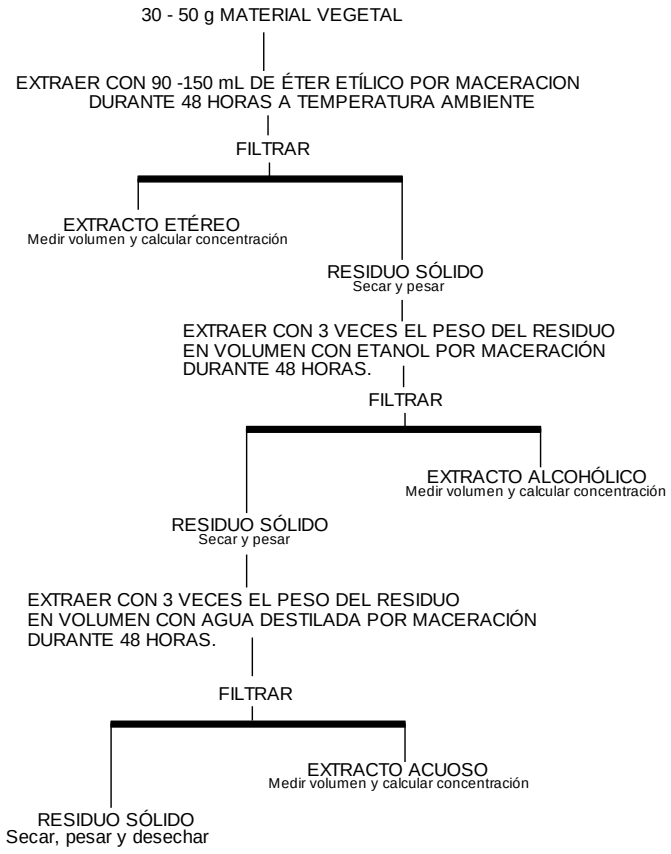


Fig. N 1. Extracción sucesiva del material vegetal para la aplicación de técnicas de Tamizaje Fitoquímico.

Posteriormente en cada extracto por separado se procede de acuerdo a los esquemas representados en las Figuras N 2; N 3; N 4.

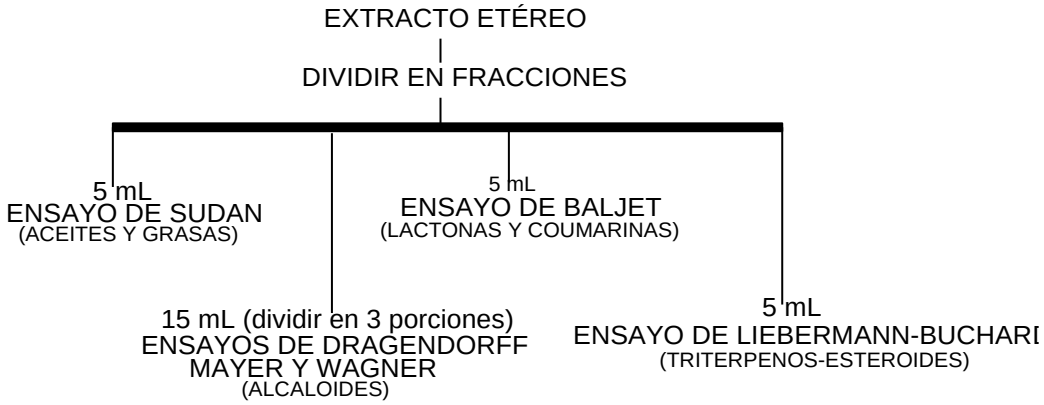


Fig. N 2 Esquema de las reacciones a realizar en el extracto de éter etílico

La presencia de compuestos grasos se considera positiva si aparecen gotas o una película coloreada de rojo en el seno del líquido o en las paredes del tubo de ensayos respectivamente.

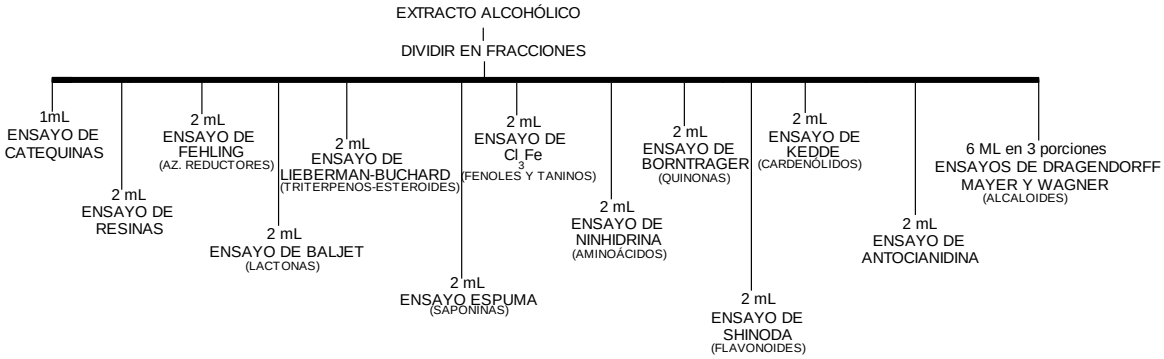


Fig. N 3 Esquema de las reacciones a realizar en el extracto alcohólico

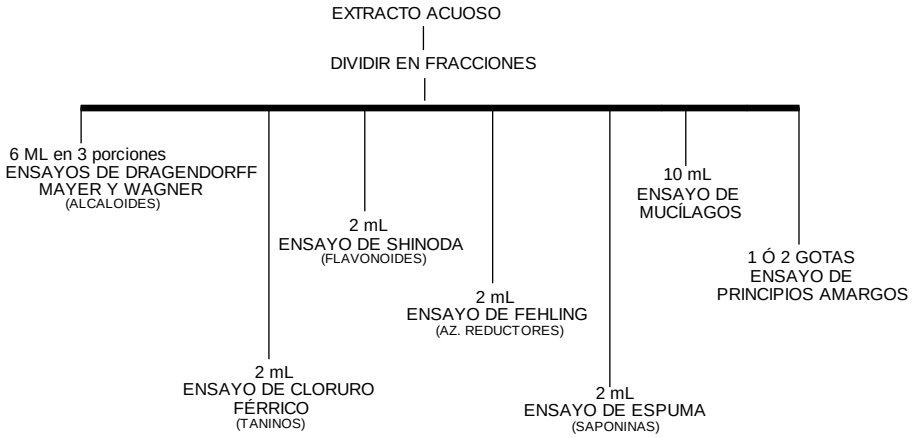


Fig. N 4 Esquema de las reacciones a realizar en el extracto acuoso

Se considero el siguiente cuadro para identificar los metabolitos secundarios

Ensayos	Principios activos
Ensayo de Drangendorff, Mayer o Wagner	Alcaloides
Ensayo de Shinoda	Flavonoides
Ensayo de Liberman-Buchard	Triterpenos y/o esteroides
Ensayo de Borntrager	Quinonas
Ensayo de Baljet	Cumarinas
Ensayo de espuma	Saponinas
Ensayo de Cloruro Férrico	Compuestos fenólicos y/o taninos
Ensayo de Fehling	Azúcares reductores
Ensayo de Mucilagos	Estructura tipo polisacárido.

A continuación, se presenta el procedimiento para cada uno de los ensayos realizados:

Ensayo de Sudan: Permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos grasos, para ello, a la alícuota de la fracción en el solvente de extracción, se le añade 1 mL de una solución diluida en agua del colorante Sudan III o Sudan IV. Se calienta en baño de agua hasta evaporación del solvente.

Ensayo de Dragendorff: Permite reconocer en un extracto la presencia de alcaloides, para ello, si la alícuota del extracto está disuelta en un solvente orgánico, este debe evaporarse en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de ácido clorhídrico al 1 % en agua. Si el extracto es acuoso, a la alícuota se le añade 1 gota de ácido clorhídrico concentrado, (calentar suavemente y dejar enfriar hasta acidez). **Análisis de resultados**: Con la solución acuosa ácida se realiza el ensayo, añadiendo 3 gotas del reactivo de Dragendorff, si hay opalescencia se considera (+), turbidez definida (++), precipitado (+++).

Ensayo de Mayer: Proceda de la forma descrita anteriormente, hasta obtener la solución ácida. Añada una pizca de cloruro de sodio en polvo, agite y filtre. Añada 2 ó 3 gotas de la solución reactiva de Mayer. **Análisis de resultados:** si se observa opalescencia (+), Turbidez definida (++), precipitado coposo (+++). En el caso de alcaloides cuaternarios y/o amino-óxidos libres, éstos solo se encontrarán en el extracto acuoso y para considerar su presencia la reacción debe ser (++) ó (+++), en todos los casos, ya que un resultado (+), puede provenir de una extracción incompleta de bases primarias, secundarias o terciarias.

Ensayo de Wagner: Se parte al igual que en los casos anteriores de la solución ácida, añadiendo 2 ó 3 gotas del reactivo, clasificando los resultados de la misma forma.

Ensayo de Baljet: Permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, en particular Coumarinas, aunque otros compuestos lactónicos pueden dar positivo al ensayo. Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en alcohol, debe evaporarse el solvente en baño de agua y redisolverse en la menor cantidad de alcohol (1 mL). En estas condiciones se adiciona

1mL del reactivo. **Análisis de resultados:** un ensayo positivo la aparición de coloración o precipitado rojo (++ y +++) respectivamente.

Ensayo de Hidroxamato férrico para coumarinas: Una gota del extracto se coloca en una placa de porcelana y se añade una gota de clorhidrato de hidroxilamina disuelto en etanol al 10 %. Se añaden unas gotas de hidróxido de potasio al 10% en etanol y se calienta a la llama hasta burbujeo, se añaden unas gotas de ácido clorhídrico 0.5 mol/L y una gota de cloruro férrico al 1% en agua.

El reactivo de Baljet se prepara de la siguiente forma:

Solución 1: Hidróxido de sodio al 10 % en agua.

Solución 2: Ácido pícrico al 1 % en etanol.

Las soluciones se tienen preparadas de forma independiente y se mezcla igual cantidad en volumen de cada una de ellas justo en el momento de realizar el ensayo. Dicha mezcla es la que se adiciona la alícuota a evaluar. **Análisis de resultados**: El desarrollo de una coloración violeta (+), claro (++), intenso (+++).

Ensayo de Borntrager: Permite reconocer en un extracto la presencia de quinonas. Para ello si la alícuota del extracto no se encuentra en cloroformo, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de cloroformo. Se adiciona 1 mL de hidróxido de sodio, hidróxido de potasio ó amonio al 5 % en agua. Se agita mezclando las fases y se deja en reposo hasta su ulterior separación. **Análisis de resultados:** Si la fase acuosa alcalina (superior) se colorea de rosado o rojo, el ensayo se considera positivo. Coloración rosada (++), coloración roja (+++).

Ensayo de Liebermann-Burchard: Permite reconocer en un extracto la presencia de triterpenos y/o esteroides, por ambos tipos de productos poseer un núcleo del androstano, generalmente insaturado en el anillo B y la posición 5-6. Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en cloroformo, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de cloroformo. Se adiciona 1 mL de anhídrido acético y se mezcla bien. Por la pared del tubo de ensayos se dejan resbalar 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar. **Análisis de resultados**: Un ensayo positivo se tiene por un cambio rápido de coloración:

1- Rosado-azul muy rápido.

2- Verde intenso-visible aunque rápido.

3- Verde oscuro-negro-final de la reacción.

A veces el ensayo queda en dos fases o desarrollo de color. Muy pocas veces puede observarse el primer cambio. El tercer cambio generalmente ocurre cuando el material evaluado tiene cantidades importantes de estos compuestos.

Ensayo de catequinas: Para ello, tome de la solución alcohólica obtenida una gota, con la ayuda de un capilar y aplique la solución sobre papel de filtro. Sobre la mancha aplique solución de carbonato de sodio. **Análisis de resultados**: La aparición de una mancha verde carmelita a la luz UV, indica un ensayo positivo.

Ensayo de resinas: Para detectar este tipo de compuesto, adicione a 2 mL de la solución alcohólica, 10 mL de agua destilada. **Análisis de resultados:** La aparición de un precipitado, indica un ensayo positivo.

Ensayo de Fehling: Permite reconocer en un extracto la presencia de azúcares reductores. Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en agua, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1-2 mL de agua. Se adicionan 2 mL del reactivo y se calienta en baño de agua 5-10 minutos la mezcla. **Análisis de resultados**: El ensayo se considera positivo si la solución se colorea de rojo o aparece precipitado rojo. El reactivo se prepara de la siguiente forma:

- Solución A: Se pesan 35 g de sulfato cúprico hidratado cristalizado y se disuelven con agua hasta un volumen total de 1000 mL.
- Solución B: Se pesan 150 g de tartrato de sodio y potasio y 40 g de hidróxido de sodio y se disuelven con agua hasta un volumen total de 1000 mL.

Las soluciones se tienen preparadas de forma independiente y se mezcla igual cantidad en volumen de cada una de ellas justo en el momento de realizar el ensayo. Dicha mezcla es la que se adiciona la alícuota a evaluar.

Ensayo de la espuma: Permite reconocer en un extracto la presencia desaponinas, tanto del tipo esteroidal como triterpénica. De modo que si la alícuota se encuentra en alcohol, se diluye con 5 veces su volumen en agua y se agita la mezcla fuertemente durante 5-10 minutos. **Análisis de resultados:** El ensayo se considera positivo si aparece espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm de altura y persistente por mas de 2 minutos.

Ensayo del cloruro férrico: Permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos en un extracto vegetal. Si el extracto de la planta se realiza con alcohol, el ensayo determina tanto fenoles como taninos. A una alícuota del extracto alcohólico se le adicionan 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5 % en solución salina fisiológica (cloruro de sodio al 0.9 % en agua). Si el extracto es acuoso, el ensayo determina fundamentalmente taninos. A una alícuota del extracto se añade acetato de sodio para neutralizar y tres gotas de una solución de tricloruro férrico al 5 % en solución salina fisiológica. **Análisis de resultados:** un ensayo positivo puede dar la siguiente información general:

- Desarrollo de una coloración rojo-vino, compuestos fenólicos en general.
- Desarrollo de una coloración verde intensa, taninos del tipo pirocatecólicos.
- Desarrollo de una coloración azul, taninos del tipo pirogalotánicos.

Ensayo de la ninhidrina: Permite reconocer en los extractos vegetales la presencia de aminoácidos libres o de aminas en general. Se toma una alícuota del extracto en alcohol, o el residuo de la concentración en baño de agua, si el extracto se encuentra en otro solvente orgánico, se mezcla con 2 mL de solución al 2 % de ninhidrina en agua. La mezcla se calienta 5-10 minutos en baño

de agua. **Análisis de resultados**: Este ensayo se considera positivo cuando se desarrolla un color azul violáceo.

Ensayo de Shinoda: Permite reconocer la presencia de flavonoides en un extracto de un vegetal. Si la alícuota del extracto se encuentra en alcohol, se diluye con 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de cinta de magnesio metálico. Después de la reacción se espera 5 minutos, se añade 1 mL de alcohol amílico, se mezclan las fases y se deja reposar hasta que se separen. Si la alícuota del extracto se encuentra en agua, se procede de igual forma, a partir de la adición del ácido clorhídrico concentrado. **Análisis de resultados**: El ensayo se considera positivo, cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo; intensos en todos los casos.

Ensayo de Kedde: Permite reconocer en un extracto la presencia de glicósidos cardiotónicos. Una alícuota del extracto en etanol se mezcla con 1 mL del reactivo y se deja reposar durante 5-10 minutos. **Análisis de resultados**: Un ensayo positivo es en el que se desarrolla una coloración violáceo, persistente durante 1-2 horas. El reactivo de Kedde se prepara de la siguiente forma:

- Solución 1: Ácido 3.5 dinitrobenzóico al 2 % en metanol.
- Solución 2: Hidróxido de potasio al 5.7 % en agua.

Las soluciones se tienen preparadas de forma independiente y se mezcla igual cantidad en volumen de cada una de ellas justo en el momento de realizar el ensayo. Dicha mezcla es la que se adiciona a la alícuota a evaluar.

Ensayo de antocianidinas: Permite reconocer en los extractos vegetales la presencia de estas estructuras de secuencia C6-C3-C6 del grupo de los flavonoides. Se calientan 2 mL del extracto etanólico 10 min. con 1 mL de HCL conc. Se deja enfriar y se adiciona 1 mL de agua y 2 mL de alcohol amílico. Se agita y se deja separar las dos fases. **Análisis de resultados**: La aparición de color rojo a marrón en la fase amílica, es indicativa de un ensayo positivo.

Ensayo de mucílagos: Permite reconocer en los extractos de vegetales la presencia de esta estructura tipo polisacárido, que forma un coloide hidrófilo de alto índice de masa que aumenta la densidad del agua donde se extrae. Para ello una alícuota del extracto en agua se enfría a 0-5 ºC. **Análisis de resultados:** si la solución toma una consistencia gelatinosa el ensayo es positivo.

Ensayo de principios amargos y astringentes: El ensayo se realiza saboreando 1 gota del extracto acuoso o del vegetal y reconociendo el sabor de cada uno de estos principios, bien diferenciados al paladar. También pueden realizarse otros ensayos no comprendidos en este esquema de tamizaje, para la detección de otros compuestos. A continuación expondremos algunos de estos ensayos.

- **Glicósidos cianogenéticos**: Coloque unos 5 g de material vegetal en un erlenmeyer de 125 mL y adicione suficiente agua para humedecer la muestra. Prepare un papel de picrato de sodio

sumergiendo una tira de papel de filtro en una solución recién preparada de picrato de sodio (5 g de carbonato de sodio + 0.5 g de ácido pícrico y cantidad suficiente de agua para 1000 mL); conserve esta solución en frasco seco. Aproximadamente 1mL de cloroformo se añade a la muestra humedecida para resaltar la actividad enzimática. Inserte el papel de picrato de sodio en el recipiente con la muestra, colocándolo de forma tal que no toque las paredes del mismo. Tape el recipiente y caliente a 35 ºC por unas 3 horas. Observe los cambios de coloración del papel, si en 3 h no se produce variación, puede afirmarse la ausencia de los glicósidos cianogenéticos, pero si en 15 min. el papel cambia de amarillo a diferentes tonos rojos, indica la presencia de HCN en cantidades apreciables.

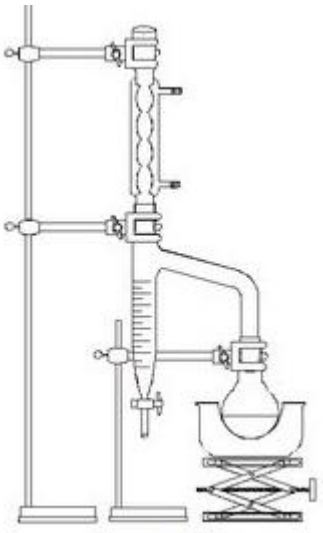
- **Aceites, hidrocarburos y carotenos:** En un embudo de separación al cual se le coloca un pedacito de algodón en el orificio interior, se adicionan 5 g de droga en polvo y 15 mL de solvente de baja polaridad (éter de petróleo o tetracloruro de carbono). Tape el embudo para evitar la evaporación del disolvente y déjelo en reposo 6 h como mínimo. Abra la llave del embudo y obtenga de esta forma el extracto.

Ensayo de aceite fijo, secante o esencial: Tome 5 mL del extracto y déjelo evaporar sobre un vidrio reloj o placa petri a temperatura ambiente. La aparición de un líquido oleoso después de la evaporación, si deja mancha de grasa sobre el papel de filtro indica presencia de aceite fijo. Si al evaporarse el disolvente aparece una película fina resinosa, indica presencia de aceite secante. **Análisis de resultados:** Si al evaporarse el disolvente aparece un líquido oleoso aromático que no deja mancha de grasa sobre el papel de filtro indica la presencia de aceite esencial.

Ensayo de hidrocarburos: Tome 10 mL del extracto y déjelo evaporar al aire, disuelva el residuo obtenido en acetona calentando suavemente sobre baño de agua si fuera necesario. Deje algunas horas en el refrigerador. La aparición de un precipitado, indica la presencia de hidrocarburos.

Anexo N 4 Destilación en corriente de vapor

Materiales



Cant.	Equipo y Cristalería
1	Soporte universal
1	Pinzas Fisher
1	Reververo
4	Mangueras de hule
1	Balon de fondo plano de 500 ml.
1	dean stark
1	Balanza

Procedimiento

1.- Se arma el sistema como se muestra en la Figura .

2.- Se agrega 300 ml. de agua en el matraz de 500 ml con 200g de muestra vegetal fresca.

3.- Se coloca los núcleos de ebullición dentro del matraz generador de vapor.

4.- Se colocan las mangueras para el paso del agua.

5.- Se calienta el matraz y el material recolectado en el dean stark se separa por división en fases.

Cálculos

$$\%\ de\ rendimiento = \frac{volumen\ de\ aceite\ ecencial}{peso\ de\ la\ muestra} * 100$$

$$\%\ de\ rendimiento = \frac{0.7}{200} * 100$$

	CANTIDAD DE MUESTRA(g)	ml	% de rendimiento
Menta	200	0.7	0,35

Anexo N 5. Análisis de actividad antimicrobiana

Medio de cultivo

Sabouraud Glucose Agar es un medio de uso general para el cultivo de dermatofitos, hoy en día se utiliza para el aislamiento y cultivo de todos los hongos. Las peptonas en Sabouraud Glucose Agar son fuentes de factores de crecimiento nitrogenoso. La glucosa aporta una fuente de energía para el crecimiento de microorganismos. La alta concentración de glucosa presenta una ventaja para el crecimiento de hongos (estables osmóticamente), mientras que la mayoría de las bacterias no tolera la alta concentración de azúcar. Además, el bajo pH es óptimo para los hongos pero no para muchas bacterias. Sabouraud Glucose Agar es sólo levemente selectivo frente a las bacterias.

Composición

Digerido enzimático de caseína	10,0 g
Dextrosa	40,0 g
Agar	15,0 g
Agua destilada c.s.p.	1000 mL

pH final 5,6 ± 0,2

Procedimiento

Preparación del material de vidrio

Se envuelven individualmente las placas de petri y las pipetas con papel tipo manteca.

Los tubos de ensayo se tapan con torundas de algodón o tapas de metal y se esterilizan en estufa de calor seco a 150ºC durante 1.5 hs.

Preparación Del Agar

Suspender 65 g de medio deshidratado en un litro de agua destilada. Calentar agitando frecuentemente y dejar hervir durante 1 minuto para disolver completamente los ingredientes. Evitar el sobrecalentamiento. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Distribuir y enfriar a temperatura ambiente antes de su utilización. En las muestras positivas se observa el crecimiento de hongos y levaduras con su morfología colonial típica o confluencia de colonias.

Preparación del inóculo

Las cepas fueron cultivadas en agar Sabouraud e incubadas a 37 °C durante 48 h. De cada cultivo se tomaron 5 colonias de aproximadamente 1 mm de diámetro y se resuspendieron en tubos con 5 mL de agua destilada estéril, hasta alcanzar una turbidez equivalente a la del tubo 0,5 de la escala de McFarland (106 células/mL).

Inoculación de las placas

Se tomó una cantidad de la disolución que se preparó con el inoculo de candida albicans y con el uso de un isopo esteril se recubrió toda la placa como se muestran en la figura N 1, para garantizar el crecimiento uniforme de las colonias.

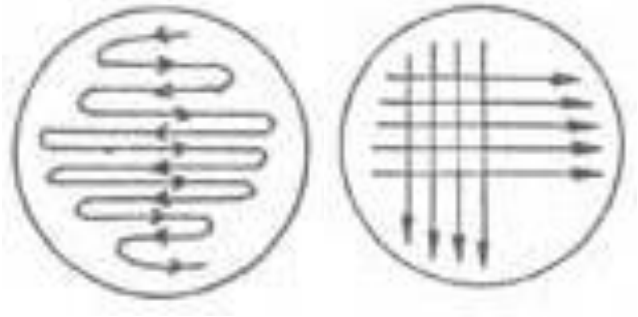


Figura N 1 Inoculación de las placas

Preparación de los discos de papel filtro (extractos alcohólicos)

Se utilizó discos de papel filtro con peso de 30 ± 4 mg /cm^2 y con un diámetro de 6.35 mm, se pueden obtener con una perforadora de papel. Se separó los discos en cuatro grupos y cargarlos de los extractos alcohólicos de Tomillo en las siguientes concentraciones. 25%, 50%, 75%, 100%.

Con el uso de una micropipeta se procede a colocar en cada papel filtro la disolución respectiva del extracto y aceite escencial. Con el uso de una perforadora se cortó pedazos de papel filtro para colocar las diferentes concentraciones sobre ellos y medir el halo de inhibición. Figura N 2

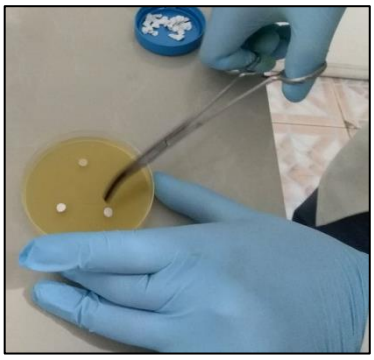


Figura N 2 Colocación de las diferentes concentraciones

Diluciones del extracto

Se tomaron 25 50 75 y 100 ul del extracto alcohólico de la planta para medir la capacidad antifungica mínima. Siendo sus concentraciones de 25 50 75 y 100% respectivamente. Figura N 3

Figura N 3 Diluciones del extracto

Controles

Para el ensayo se usaron como controles positivos ketoconazol y alcohol absoluto. Las pruebas se realizaron por triplicado.

Lecturas e interpretación de resultados

Se observaron las zonas claras de inhibición de crecimiento (halos). Los diámetros se miden en milímetros. Considerar actividad anti fúngica significativa a un halo de inhibición mayor al de control (ketoconazol. Luego de 7 días de crecimiento a temperatura ambiente se procedió al reporte de resultados según el crecimiento de las colonias. Figura N 4

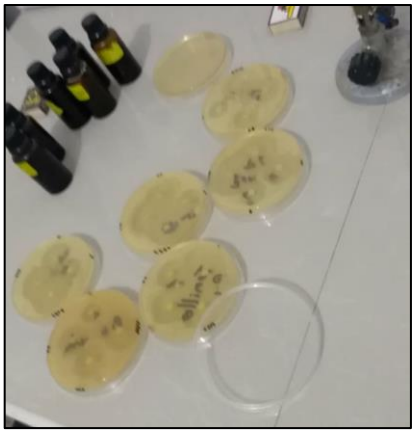


Figura N 4 Crecimiento de las colonias

Se realizaron pruebas de sensibilidad a antifúngicos con ketoconazol y alcohol absoluto, estas pruebas de sensibilidad tuvieron como objetivo conocer si los microorganismo ensayados son sensibles o resistentes a los antimicrobianos, y sirven para elegir de forma óptima el tratamiento anti fúngico. Así se procedió considerando el siguiente procedimiento:

- Se inocula el microorganismo en la superficie del agar.
- Se deposita un disco con una concentración conocida da antimicrobiano.
- Disco de ketoconazol en la parte superior y de alcohol absoluto en la parte inferior
- Incubar a temperatura de 37ºC
- Observar el aparecimiento de la zona de inhibición de crecimiento alrededor del disco.
- Dependiendo del tamaño de la zona se puede determinar si el microorganismo es sensible, intermedio, indeterminado o resistente al antimicrobiano. Fig. N 4

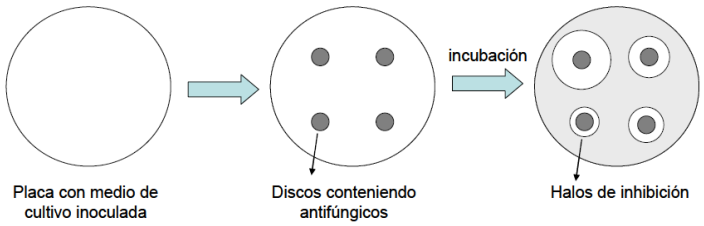


Figura N 4 Pruebas de sensibilidad

Anexo N 6 Cuestionario etnofarmacológico

La Universidad Regional Autónoma de los Andes (UNIANDES), se encuentra desarrollando un proceso de investigación sobre el uso tradicional de las plantas medicinales por la población ecuatoriana, es por ello que, teniendo en cuenta la experiencia acumulada por usted al respecto le solicitamos su valiosa cooperación, la cual se materializará llenando el siguiente cuestionario.

1.- ¿Ud ha utilizado las siguientes plantas alguna vez?

					Indicación de uso					
Menta	SI		NO		1		2		3	
Sábila	SI		NO		1		2		3	
Manzanilla	SI		NO		1		2		3	
Cola de caballo	SI		NO		1		2		3	
Ortiga	SI		NO		1		2		3	
Ruda	SI		NO		1		2		3	
Malva	SI		NO		1		2		3	
Eucalipto	SI		NO		1		2		3	
Llantén	SI		NO		1		2		3	
Borraja	SI		NO		1		2		3	

Donde:
1. Usado para trata Infecciones superficiales como: piel (intertrigo), a las mucosas (oral, genitourinaria o digestiva) y a las uñas (paroniquia o perionixis). Infecciones mas graves candidemias
2. Otros usos médicos (para trastornos digestivos, ayudar a la digestión (antiemético); como estimulante para el caso de dolores musculares o calambres (antiespasmódico).para la gripe, la tos.
3. otros usos (Limpias, purificaciones etc)

2.- ¿Quién se la indicó o le sugirió su uso?
a) Médico___ b) Curandero ___ c) Familiares ___ d) Vecinos o amigos ___

3-¿En qué forma la ha utilizado? (Modo de uso)
a) ___Infusión b) ___Cocimiento c) ___Planta cruda d)
___Otra forma ¿Cuál? _____

4.- ¿Durante qué tiempo la utilizó? (Duración del tratamiento)
a) ___ Un día b) ___ Menos de una semana c) ___ Más de una semana
d) ___ Un mes e) ___ Varios meses f) ___ Un año g) ___ Más de un año

5.- ¿Qué resultados obtuvo con su empleo?
a) ___ Mejoró b) ___ No mejoró c) ____ Empeoró

7¿Conoce alguna precaución que debe tomarse durante el tratamiento? (Contraindicaciones) Si: ___ No: ___
¿Cuál (s)?_____, _____, _____

8- En qué personas las ha usado:
En niños: ___
En adultos: ___
En ancianos: ___

OBSERVACIONES:……
……..

GRACIAS

Anexo N 7 Ficha de recolección del análisis fitoquímico

Extractos etéreos

Metabolitos secundarios	Método	Resultado
Alcaloides	Ensayo de Dragendorff	
	Ensayo de Mayer	
	Ensayo de Wagner	
Terpenoides	Ensayo de Lieberman- Burchard	
Cumarinas	Ensayo De Baljet	
Compuestos Grasos	Ensayo de Sudan III	

Interpretación de resultados: (-) Negativo, (+) Baja evidencia o intensidad de reacción para ese metabolito, (++) Evidencia o intensidad moderada de reacción, (+++) Alta evidencia o intensidad de reacción a ese metabolito.

Extractos alcohólicos

Metabolitos secundarios	Método	Resultado
Alcaloides	Ensayo de Dragendorff	
	Ensayo de Mayer	
	Ensayo de Wagner	
Terpenoides	Ensayo de Lieberman- Burchard	
Quininas	Ensayo de Borntrager	
Cumarinas	Ensayo De Baljet	
Catequinas	Ensayo de Catequinas	
Resinas	Ensayo de Resinas	
Saponinas	Ensayo de la Espuma	
Taninos	Ensayo de Cloruro Férrico	
Azúcares Reductores	Ensayo de Fehling	
Flavonoides	Ensayo de Shinoda	
Antocianidinas	Ensayo de Antocianidinas	

Interpretación de resultados: (-) Negativo, (+) Baja evidencia o intensidad de reacción para ese metabolito, (++) Evidencia o intensidad moderada de reacción, (+++) Alta evidencia o intensidad de reacción a ese metabolito.

Continuación Ficha de recolección del análisis fitoquímico

Extractos acuosos

Metabolito secundario	Método	Resultado
Alcaloides	Ensayo de Dragendorff	+
	Ensayo de Mayer	-
	Ensayo de Wagner	+
Saponinas	Ensayo de la Espuma	-
Taninos	Ensayo de Cloruro Férrico	+ (Rosasdo)
Azúcares Reductores	Ensayo de Fehling	++
Flavonoides	Ensayo de Shinoda	-
Mucílagos	Ensayo de mucilagos	-

Interpretación de resultados: (-) Negativo, (+) Baja evidencia o intensidad de reacción para ese metabolito, (++) Evidencia o intensidad moderada de reacción, (+++) Alta evidencia o intensidad de reacción a ese metabolito.

Continuación Ficha de recolección del análisis fitoquímico

Resumen general de los ensayos

METABOLITO SECUNDARIO	MÉTODO UTILIZADO	CAMBIOS OBSERVADOS	INTERPRETACIÓN	RESULTADO
Alcaloides	1. 2. 3.			
Antocianidinas	1. 2. 3.			
Azúcares Reductores	1. 2. 3.			
Catequinas	1. 2. 3.			
Compuestos Grasos	1. 2. 3.			
Cumarinas	1. 2. 3.			
Flavonoides	1. 2. 3.			
Quininas	1. 2. 3.			
Resinas	1. 2. 3.			
Saponinas	1. 2. 3.			
Taninos	1. 2. 3.			
Terpenoides	1. 2. 3.			

Anexo 8 Ficha de recolección del análisis de actividad antimicrobiana

Resultados del análisis

Concentración	Inhibición	Observación	Resultado
25%			
50%			
75%			
100%			
125%			
150%			

Variación (diámetros mm) de los halos de inhibición

Concentración	Inhibición	Diámetro (mm)	Observación	Resultado
25%				
50%				
75%				
100%				
125%				
150%				