

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

“EFICACIA IN VITRO DE LOS EXTRACTOS SUPERCRÍTICOS DEL ORÉGANO (LIPPIA GRAVEOLENS), PERICÓN (TAGETES LUCIDA), AJO (ALLIUM SATIVUM), TOMILLO (THYMUS VULGARIS), APAZOTE (DYSPHANIA AMBROSIOIDES) FRENTE A CÁNDIDA ALBICANS”

Estudio experimental realizado en el Laboratorio Clínico del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala

Tesis

Presentada a la Honorable Junta Directiva
de la Facultad de Ciencias Médicas de la
Universidad de San Carlos de Guatemala

Jennifer Mariela Azmitia Meng
Alex Vareci Mazariegos López

Médico y Cirujano

Guatemala, septiembre de 2017

El infrascrito Decano de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala hace constar que los estudiantes:

1. Jennifer Mariela Azmitia Meng 200842060 1599377792201
2. Alex Vareci Mazariegos López 201021392 2312983150101

Cumplieron con los requisitos solicitados por esta Facultad previo a optar al Título de Médico y Cirujano en el grado de Licenciatura, y habiendo presentado el trabajo de graduación titulado:

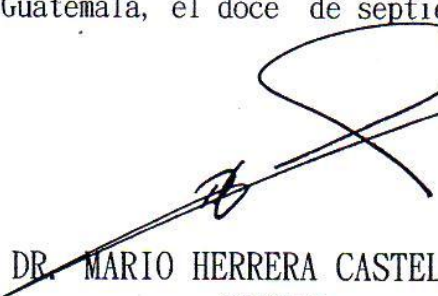
“EFICACIA IN VITRO DE LOS EXTRACTOS SUPERCRÍTICOS DEL ORÉGANO (LIPPIA GRAVEOLENS), PERICÓN (TAGETES LUCIDA), AJO (ALLIUM SATIVUM), TOMILLO (THYMUS VULGARIS), APAZOTE (DYSPHANIA AMBOSIODES) FRENTE A CÁNDIDA ALBICANS”

Estudio experimental realizado en el Laboratorio Clínico del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala

Trabajo asesorado por la Dra. Rosa Elena Solís y revisado por la Dra. Carmen Villagrán de Tercero, quienes avalan y firman conformes. Por lo anterior, se emite, firma y sella la presente:

ORDEN DE IMPRESIÓN

En la Ciudad de Guatemala, el doce de septiembre del dos mil diecisiete


DR. MARIO HERRERA CASTELLANOS
DECANO



El infrascrito Coordinador de la Coordinación de Trabajos de Graduación de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala, hace constar que los estudiantes:

1. Jennifer Mariela Azmitia Meng 200842060 1599377792201
2. Alex Vareci Mazariegos López 201021392 2312983150101

Presentamos el trabajo de graduación titulado:

"EFICACIA IN VITRO DE LOS EXTRACTOS SUPERCRÍTICOS DEL ORÉGANO (LIPPIA GRAVEOLENS), PERICÓN (TAGETES LUCIDA), AJO (ALLIUM SATIVUM), TOMILLO (THYMUS VULGARIS), APAZOTE (DYSPHANIA AMBOSIODES) FRENTE A CÁNDIDA ALBICANS"

Estudio experimental realizado en el Laboratorio Clínico del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala

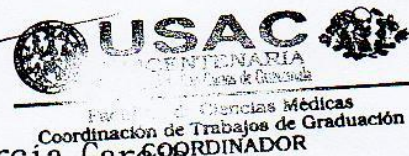
El cual ha sido revisado por la Dra. Ana Liss Perdomo Mendizabal y, al establecer que cumple con los requisitos exigidos por esta Coordinación, se les autoriza continuar con los trámites correspondientes para someterse al Examen General Público. Dado en la Ciudad de Guatemala el doce de septiembre del dos mil diecisiete.

César O. García G.
Doctor en Salud Pública
Colegiado 5,950

"ID Y ENSEÑAD A TODOS"



Dr. C. César Oswaldo García García
Coordinador



Guatemala, 12 de septiembre del 2017

Doctor

César Oswaldo García García

Coordinación de Trabajos de Graduación

Facultad de Ciencias Médicas

Universidad de San Carlos de Guatemala

Presente

Dr. García:

Le informamos que nosotros:

1. Jennifer Mariela Azmitia Meng
2. Alex Vareci Mazariegos López

Azmitia Meng
Alex Vareci

Presentamos el trabajo de graduación titulado:

"EFICACIA IN VITRO DE LOS EXTRACTOS SUPERCRÍTICOS DE ORÉGANO (LIPPIA GRAVEOLENS), PERICÓN (TAGETES LUCIDA), AJO (ALLIUM SATIVUM), TOMILLO (THYMUS VULGARIS), APAZOTE (DYSPHANIA AMBOSIODES) FRENTE A CÁNDIDA ALBICANS"

Estudio experimental realizado en el Laboratorio Clínico del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala

Del cual la asesora y la revisora se responsabilizan de la metodología, confiabilidad y validez de los datos, así como de los resultados obtenidos y de la pertinencia de las conclusiones y recomendaciones propuestas.

Firmas y sellos

Revisora: Dra. Carmen Villagrán de Tercero
Reg. de personal 8800

Asesora: Dra. Rosa Elena Solís

Dra. Carmen Villagrán de Tercero
Médico y Cirujano
Col. 3177

Rosa Elena Solís Aguilar
MEDICO Y CIRUJANO
Colegiado No. 6769

Rosa Elena Solís

Acto que dedico:

A Dios, por darme la sabiduría, por mantenerme con fe y sobre todo por dame la fuerza para seguir cuando el camino se tornaba difícil.

A mis padres, este triunfo es de ustedes, gracias por cada enseñanza, por todas las lecciones de vida, sobre todo por el apoyo, por las palabras de ánimo que nunca faltaron, por ese hombro que todo el tiempo ha estado para mí y mis hermanos; sin ustedes no sería ni la mitad de lo que soy ahora. LO LOGRAMOS

A mis hermanas, son un ejemplo de lucha y de fuerza, gracias por ser incondicionales y siempre apoyarme.

A mis tíos Sandra y Mauro, dos personas importantes en mi vida, que con su ejemplo, consejos y sobretodo su cariño han forjado en mí una persona de bien.

A mis primos Gabriel, Katy, Omar y a mi ángel Mauro, mis compañeros de vida y de batallas, gracias por las palabras de ánimo que siempre tienen para mí.

A mis sobrinas que este logro sea de ejemplo para ustedes.

Estoy segura que Dios pone ángeles en el camino y sin duda puso a una persona muy especial en mi vida, gracias por tu paciencia, apoyo y cariño.

A mis amigos por llenar de risas y buenos momentos todos estos años.

A Brenda, Abner Rodas, Dra. Solís, Dra. De Tercero por sus palabras de ánimo y su gran ayuda para esta investigación.

A todas esas personas que pusieron su granito de arena para que este sueño hoy este hecho realidad.

Jennifer Mariela Azmitia Meng

Acto que dedico:

Acto que dedico a Dios sobre todas las cosas, por brindarme un día más de vida. Y por nunca desampararme ante todas las cosas adversas.

A mis padres Alex Mazariegos y Catalina López, por haberme brindado todos los medios necesarios para poder convertirme en una persona profesional.

A mis hermanos Juan Pablo y Fabiola Mazariegos por apoyarme en los momentos complicados de la carrera universitaria.

A todos mis amigos, que con el pasar del tiempo en esta carrera me brindaron apoyo y consejos para convertirme en aquello que alguna vez vi tan lejano.

Alex Vareci Mazariegos López

De la responsabilidad del trabajo de graduación:

El autor o autores es o son los únicos responsables de la originalidad, validez científica, de los conceptos y de las opiniones expresadas en el contenido del trabajo de graduación. Su aprobación en manera alguna implica responsabilidad para la Coordinación de Trabajos de Graduación, la Facultad de Ciencias Médicas y para la Universidad de San Carlos de Guatemala. Si se llegara a determinar y comprobar que se incurrió en el delito de plagio u otro tipo de fraude, el trabajo de graduación será anulado y el autor o autores deberá o deberán someterse a las medidas legales y disciplinarias correspondientes, tanto de la Facultad, de la Universidad y otras instancias competentes.

RESUMEN

OBJETIVO: Determinar la eficacia *in vitro* de los extractos supercríticos del orégano (*Lippia graveolens*), pericón (*Tagetes lucida*), ajo (*Allium sativum*), tomillo (*Thymus vulgaris*), apazote (*Dysphania ambrosioides*) frente a *Cándida albicans*. **POBLACIÓN Y MÉTODOS:** Estudio experimental realizado en el Laboratorio Clínico del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala, durante junio – julio de 2017; se utilizó el hongo levaduriforme *Cándida albicans* proveniente de un aislado clínico, cultivado en medio agar dextrosa Sabouraud; la eficacia se evaluó por medio de una réplica del método de difusión de Bauer Kirby adaptado con tres técnicas distintas (técnica gota directa, gota fresca en papel filtro y gota seca en papel filtro). **RESULTADOS:** Todos los extractos supercríticos presentaron halos inhibitorios únicamente con la técnica de gota directa, con dicha técnica, el extracto supercrítico que presentó eficacia fue el extracto de orégano en concentraciones a 100% y 50%, y de estas, la concentración al 100% evidenció una diferencia de medias estadísticamente significativa (p valor = >0.0001). **CONCLUSIÓN:** Los extractos supercríticos del orégano (*Lippia graveolens*), pericón (*Tagetes lucida*), ajo (*Allium sativum*), tomillo (*Thymus vulgaris*), apazote (*Dysphania ambrosioides*) presentan actividad antifúngica (halo inhibitorio), solo el orégano presenta eficacia *in vitro* para inhibir a *Cándida albicans* con respecto con su control positivo fluconazol (Hi Media ®) a través de la técnica de gota directa.

Palabras clave: *Cándida albicans*, *in vitro*, eficacia, extractos.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO REFERENCIAL.....	3
2.1 Marco de antecedentes.....	3
2.2 Marco teórico.....	5
2.2.1 Teoría miasmática.....	5
2.2.2 Teoría microbiana de la enfermedad.....	6
2.3. Marco conceptual.....	6
2.3.1 Enfoque de las plantas medicinales.....	6
2.3.2 Historia de las plantas medicinales.....	7
2.3.3 Plantas medicinas.....	7
2.3.3.1 Orégano.....	7
2.3.3.2 Pericón.....	9
2.3.3.3 Ajo.....	10
2.3.3.4 Tomillo.....	11
2.3.3.5 Apazote.....	13
2.3.4 Fluidos supercríticos.....	14
2.3.5 Proceso de extracción supercrítica.....	15
2.3.6 Inóculo.....	15
2.3.7 Eficacia.....	15
2.3.8 Susceptibilidad.....	16
2.3.9 Evaluación de la susceptibilidad a antimicrobianos <i>in vitro</i>	16
2.3.10 Método de difusión.....	17
2.3.11 Hongos.....	17
2.3.11.1 <i>Cándida</i>	18
2.3.11.2 <i>Cándida albicans</i>	18
2.3.11.3 Morfología.....	18
2.3.11.4 Epidemiología.....	19
2.3.11.5 Enfermedades clínicas.....	20
2.3.11.6 Diagnóstico de laboratorio.....	21
2.3.11.7 Tratamiento prevención y control.....	21
2.3.12 Grupos de control científico.....	22

2.3.13 Fluconazol.....	23
2.3.14 Solución salina normal o suero fisiológico.....	24
2.3.15 Halo de crecimiento.....	24
2.3.16 Caja de Petri o placa de Petri.....	24
2.4 Marco geográfico.....	25
2.5 Marco institucional.....	25
2.6 Marco legal.....	25
3. OBJETIVOS.....	27
4. HIPÓTESIS.....	29
5. POBLACIÓN Y MÉTODOS.....	31
5.1 Enfoque y diseño de la investigación.....	31
5.2 Unidad de análisis.....	31
5.3 Población y muestra.....	31
5.4 Selección de estudio.....	32
5.5 Medición de variables.....	33
5.6 Técnicas, procesos e instrumentos.....	36
5.7 Procesamiento de datos.....	40
5.8 Alcance y límites de la investigación.....	43
5.9 Aspectos éticos.....	43
6. RESULTADOS.....	45
7. DISCUSIÓN.....	49
8. CONCLUSIONES.....	53
9. RECOMENDACIONES.....	55
10. APORTES.....	57
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
12. ANEXOS.....	65

1. INTRODUCCIÓN

Cándida albicans es el hongo levaduriforme más frecuentemente aislado como agente causal de infecciones en el ser humano y, el principal productor de candidiasis de la mucosa del tracto gastrointestinal y vaginal siendo el agente más aislado en candidemias en el mundo.¹ La candidiasis se considera una de las infecciones oportunistas más frecuentes en seres humanos. Su incidencia ha aumentado considerablemente en los últimos 20 años.^{1,2}

Existiendo limitaciones al acceso de medicamentos a centros asistenciales, lo que da como resultado directo la complicación del cuadro clínico. Las plantas medicinales representan un recurso coadyuvante importante disponible para los sectores más desfavorecidos, por lo tanto el problema identificado a resolver con el desarrollo de la presente investigación es el desconocimiento de la eficacia *in vitro* de extractos supercríticos de plantas naturales del orégano, pericón, ajo, tomillo y apazote frente a *Cándida albicans*.

En Guatemala se han hecho investigaciones *in vitro* sobre la sensibilidad de varios microorganismos a extractos vegetales acetónicos, acuosos, metanólicos o aceites esenciales.^{3,4} No obstante, dichos extractos tienen la desventaja de presentar residuos de disolventes e impurezas, a diferencia de los extractos supercríticos, ya que el proceso de extracción supercrítica es más efectivo en cuanto a la obtención de compuestos orgánicos, presentando mejor rendimiento de extracción en menor tiempo que otros métodos.^{4,5}

En la Facultad de Ciencias Médicas no existen estudios que comprueben la inhibición *in vitro* de *Cándida albicans* por parte de plantas medicinales, por lo que con base a lo anterior surge la iniciativa de realizar un estudio experimental que compruebe la contribución de las plantas medicinales en la inhibición del crecimiento *in vitro* de *Cándida albicans*.

Se experimentaron dichos extractos por medio de una réplica del método de difusión de Bauer Kirby, adaptado con tres técnicas distintas (gota: directa, fresca en papel filtro y seca en papel filtro) demostrándose que los cinco extractos supercríticos presentan actividad antifúngica *in vitro* contra *Cándida albicans* únicamente con la técnica de gota directa.

2. MARCO REFERENCIAL

2.1 Marco de antecedentes

En Guatemala las etnias indígenas de origen maya han heredado amplia variedad de conocimientos sobre el uso de las plantas medicinales. En los últimos años ha tomado gran importancia el estudio de la medicina natural, con el objetivo de encontrar nuevas alternativas en el abordaje terapéutico ya que se ha observado con más frecuencia la resistencia hacia tratamientos farmacológicos.⁵

2.1.1 Ámbito internacional

En México en el año 2003 se realizó un estudio para demostrar la existencia de actividad antifúngica del extracto metanólico de las semillas de *Annona Cherimolia* (Chirimoya), los resultados obtenidos fueron que a valores de concentraciones mínimas inhibitorias de 4 mg/mL hubo inhibición del crecimiento fúngico para *Trichophyton mentagrophytes*, *Aspergillus niger* y *Cándida albicans*; y 8 mg/mL para *Trichophyton rubrum*.⁶

En Lima, Perú en el año 2005 se realizó la tesis determinar la actividad antifúngica contra *Cándida albicans* y *Aspergillus Niger* de diez plantas medicinales de tres departamentos del Perú, donde los resultados obtenidos fueron que los extractos etanolicos a una concentración de 25 mg/ml de las partes aéreas de *Hipericum laricifolium* (chinchango), corteza de juglans neotropica Diels (nogal), hojas de *Piper Spp* (matico), hojas de *Psidium Guajava L.* (guayaba), corteza e hijos de *Schinus molle L.* (Guaileguay) y planta entera *Spartium Junceum L* (gayomba) tienen actividad antifúngica significativa con un halo de inhibición mayor a 18 mm excepto para la última que es de 15 mm.⁷

En México en el año 2008, se realizó el estudio para determinar la actividad antifúngica de un extracto de *Propóleo* de la abeja *Apis mellifera*, proveniente del estado de México, los resultados concluyeron que el extracto etanólico al 15% de *Propóleo* de la abeja *Apis mellifera* procedente del apiario de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, tuvo un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las levaduras *Cándida albicans* (ATCC 14055) y *Cryptococcus neoformans*, y sobre el hongo filamentoso *Aspergillus fumigatus*, el cual fue demostrado mediante dos pruebas de susceptibilidad: difusión en agar y microdilución, lo cual sugiere el posible potencial del *Propóleo* en el

tratamiento de las enfermedades causadas no solo por hongos levaduriformes, sino, también, por hongos filamentosos.⁸

En el año 2011, en Bolivia se realizó el estudio *in vitro* con objetivo de demostrar la actividad antifúngica de extractos vegetales del género *Baccharis* sobre *Cándida Albicans*. Los resultados obtenidos fueron que de los extractos ensayados, el extracto acuoso de *Baccharis latifolia* (chilca) presenta poca o ninguna turbidez, indicio de que existe una actividad inhibitoria en las primeras concentraciones diluidas. Por otro lado se observó la presencia de poca turbidez para las otras subespecies de *Baccharis*, lo que indica que puede existir cierto porcentaje de inhibición.⁹

En Colombia se han realizado estudios acerca de este ámbito, como lo podemos observar en el artículo publicado en el año 2011, que tuvo como objetivo demostrar la actividad antifúngica contra *Cándida albicans* de aceites esenciales y extractos de plantas medicinales y aromáticas. En los resultados se encontró actividad del 17.57% de las muestras. La mayor actividad se obtuvo con los aceites de *Piper bredemeyeri* Jacq y *Lippia origanoides* Kunth (orégano) y el extracto de *Morinda royoc* L. (piñipiñi). Las tres muestras inhibieron la formación de tubo germinal y la gemación. El aceite de *P. bredemeyeri* Jacq y el extracto de *M. royoc* L mostraron actividad fungicida con dos veces la concentración inhibitoria mínima. Se encontró un efecto sinérgico por la combinación del aceite de *P. bredemeyeri* Jacq e itraconazol, pero no con anfotericina B. Las muestras activas no fueron citotóxicas, excepto el aceite de *P. bredemeyeri* Jacq.¹⁰

En Camerún, en el año 2012, se realizó un estudio con el objetivo de comprobar la actividad antimicrobiana y antioxidante del extracto y compuesto de las hojas de *Hypericum lanceolatum*. Los resultados reportaron que el extracto metanólico de las hojas de *Hypericum lanceolatum* (chinchango) tiene una concentración inhibitoria mínima de 512 µg/mL contra *Cándida albicans* y *Cryptococcus neoformans* y de 64 µg/mL contra *Trichophyton rubrum*.¹¹

En el año 2013 nuevamente en Lima, Perú se evaluaron las siguientes plantas: *Hypericum laricifolium* (chinchango), *Ilex guayusa* loes (guayusa) *Juglans neotropica* (nogal), *Piper spp.* (matico), *Piper lineatum* (luto), *Psidium guayava* (guayaba) *Senna reticulata* willd (retama) y *Terminalia catappa* (castañilla) con el objetivo de demostrar la actividad antifúngica de dichas plantas. Los resultados reportaron que todos los extractos estudiados tuvieron actividad antifúngica (halo de inhibición > 18 mm) contra *Cándida albicans* ATCC 10231 y ninguno contra *Aspergillus niger* ATCC 16404.¹²

En el año 2015, en Quito, Ecuador, realizan la tesis con el objetivo de medir el efecto antifúngico del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano) y *Cymbopogon citratus* (hierba Luisa), sobre cepas de *Cándida albicans* en comparación con la nistatina estudio *in vitro* de la odontóloga Lupe Chamba. En los resultados se observó que a mayor concentración tanto del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (Hierba Luisa) como *Origanum vulgare* (orégano) presentan mayor acción inhibitoria frente a las cepas de *Cándida albicans*.¹² Se pudo comprobar que los dos grupos de aceites esenciales en investigación en las distintas concentraciones “25%, 50%, 75%, 100%” tuvieron un efecto inhibitorio superior al control positivo de la Nistatina.^{13,14}

2.1.2 Ámbito nacional

En Guatemala se han realizado estudios que han confirmado la actividad farmacológica de plantas medicinales de uso común por la población. En el año 2009 se presenta una tesis que tuvo como objetivo determinar la Inhibición de *Gardnerella Vaginalis* y seis especies de *Cándida*, por extractos de plantas utilizadas para el tratamiento de infecciones vaginales” donde en los resultados se encontraron actividad inhibitoria para el género *Cándida* en las especies de *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. stellatoidea*, *C. tropicalis* por parte de las plantas medicinales *Buddleja americana* (salvia santa), *Salvia microphylla* (mirto), *Dioscorea alata* (ñame), *Tagetes lucida* (pericón), *Lippia graveolens* (orégano), *Plantago major* (llantén) propias de las distintas regiones del país.¹³

2.2 Marco teórico

2.2.1 Teoría miasmática

La teoría miasmática de la enfermedad fue una teoría formulada por Thomas Sydenham y Giovanni María Lancisi para ellos los miasmas eran el conjunto de emanaciones fétidas de suelos y aguas impuras, eran la causa de enfermedad.¹⁴

Algunos científicos retoman la teoría de las miasmas, asegurando que la fermentación de la sangre produce gases tóxicos responsables de varias enfermedades, como el cólera, viruela y sífilis; el aire transportaba estos gases que se combinaban con otros provenientes de la descomposición de la materia orgánica en la tierra y eso provocaba las emanaciones del aire.

Se pensaba que los remedios para dispersar los miasmas y reducir la mortalidad eran el desagüe cerrado y los sistemas de alcantarillado complementados por la recolección de basura, baños públicos y saneamiento.¹⁴

2.2.2 Teoría microbiana de la enfermedad

La primera prueba experimental de un agente biológico como causa de una enfermedad epidémica la proporcionó Agostino Bassi (1773-1856), quien estudio la enfermedad de los gusanos de seda calcinaccio o mal del segno, que consiste en que el gusano de seda se cubre de manchas calcáreas de color blanquecino y consistencia dura y finamente granular, especialmente después de que muere; explorando y comprobando la hipótesis de que la causa fuera un "germen externo que entra desde fuera y crece", lo que resultó correcto, Bassi identificó al agente causal como una planta criptógama u hongo parásito.¹⁵

Otro partidario de la teoría infecciosa de las enfermedades contagiosas, fue Jacob Henle (1809-1885), Henle señala que para convencernos de que un agente biológico es la causa de un padecimiento es indispensable que se demuestre de manera constante en todos los casos, que se aislé *in vitro* de los tejidos afectados y que a partir de ese aislamiento se compruebe que es capaz de reproducir la enfermedad. Estos tres procedimientos (identificación, aislamiento y demostración de patogenicidad son lo que se conoce como los postulados de Koch-Henle y que durante años sirvieron de guía (y todavía sirven) a las investigaciones sobre la etiología de las enfermedades infecciosas.¹⁵

2.3 Marco Conceptual

2.3.1 Enfoque de las plantas medicinales

Las plantas constituyen un componente valioso para el sistema de salud, sobre todo en los países en vías de desarrollo. La Organización Mundial de la Salud ha estimado que más del 80% de la población mundial utiliza la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades de atención sanitaria y gran parte de los tratamientos tradicionales implica el uso de extractos de plantas o sus principios activos. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, una planta medicinal es definida como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos.¹⁶

Las plantas medicinales tienen importantes aplicaciones en la medicina de hoy en día, ya que son fuente directa de agentes terapéuticos que se pueden emplear como materia prima para la fabricación de medicamentos semisintéticos más complejos, utilizando la estructura química de sus principios activos los cuales se pueden utilizar como marcadores taxonómicos en la búsqueda de nuevos medicamentos.¹⁶

2.3.2 Historia de las plantas medicinales

Los conocimientos sobre las plantas medicinales, antes del nacimiento de la escritura se realizaban oralmente. El primer texto escrito sobre plantas medicinales tiene unos 4.000 años de antigüedad y aparece en una tablilla de arcilla en la cultura de los sumerios, antiguo pueblo que equivale al actual Iraq.¹⁷

En la india, han dejado referencias escritas del uso de plantas medicinales que data desde el año 800 a.C (antes de Cristo) que se encuentran incluidos dentro del Ayurveda. En el año 460 a.C el físico griego Hipócrates padre de la medicina, se considera el autor del aforismo “deja que la comida sea tu medicina y tu medicina tu comida” donde hacen uso de plantas para curar enfermedades y mantener un buen estado de salud. En los años 40 -90 d.C (después de Cristo) a Dioscórides se le atribuye el primer escrito de naturaleza científica titulado materia médica, obra que sirvió de referencia hasta el siglo XV en donde hace énfasis en las plantas medicinales revisando más de 682 especies.¹⁷

2.3.3 Plantas medicinales

2.3.3.1 Orégano

- Taxonomía

Reino: *Plantae*, División: *Magnoliophyta*, Clase: *Magnoliopsida*, Orden: *Lamiales*, Familia: *Verbenaceae*, Subfamilia: *Nepetoideae*, Tribu: *Mentheae*, Genero: *Origanum*, Especie: *Lippia graveolens*. Nombre científico: *Lippia graveolens*¹⁸

- Nombre común: orégano ¹⁸

Bajo el nombre de orégano se conocen más de 53 plantas, en Guatemala hay dos tipos distintos: *Origanum vulgare* y *lippia graveolens*.¹⁸

- Descripción

Es una planta perene, de 20 a 30 cm de alto, ramificada en su parte superior, aromática y con cierto tinte rojizo. La planta forma un pequeño arbusto achaparrado (grueso y bajito) de unos 45 cm de alto. Los tallos, que a menudo adquieren una tonalidad rojiza, se ramifican en la parte superior y tienden a deshojarse en las partes más inferiores. Las hojas surgen opuestas, ovales y anchas de entre 2-5 cm, con bordes enteros o ligeramente dentados y con vello en el haz. Toda la planta posee unas pequeñas glándulas donde está contenida la esencia aromática, de color amarillo limón, compuesta por un

estearopteno y dos tipos de fenoles, principalmente carvacrol y en menor proporción timol. Las raíces contienen estaquiosa y los tallos sustancias tánicas.¹⁸

- Origen

Originaria de Mesoamérica. En Guatemala se cultiva principalmente en Chiquimula, Zacapa, El progreso, Jutiapa, Jalapa e Izabal.

- Composición química

Se compone principalmente de monoterpenoides y monoterpenos, Se han identificado más de 60 compuestos diferentes, siendo los principales el carvacrol y timol, que van desde cero hasta más del 80%, mientras que los compuestos abundantes menores incluyen p-cimeno, γ terpineno, cariofileno, spathulenol, germacreno-D, alcohol β -fenchyl y δ -terpineol. El carvacrol se ha encontrado como un inhibidor para el crecimiento de la levadura candidiasis. La alta actividad antioxidante es debido al alto contenido de ácidos fenólicos y flavonoides. El flavonol retusin se puede encontrar en *Lippia graveolens*.¹⁸

- Propiedades medicinales

Entre sus propiedades destacan:

Propiedades antibacteriana: Estudios realizados demuestran que la tintura e infusión de las hojas tienen inhibición bacteriana de amplio espectro.¹⁸

Propiedades antifúngicas: El extracto etanólico es activo contra gran variedad de hongos.¹⁸

Propiedades digestivas: Se ha comprobado su utilidad antiespasmódica y tónica.¹⁸

Propiedades respiratorias: La infusión de orégano ha sido utilizada como un auxiliar en el tratamiento de la tos y como expectorante.¹⁸

2.3.3.2 Pericón

- Taxonomía

Reino: *Plantae*, División: *Magnoliophyta*, Clase: *Magnoliopsida*, Orden: *Asterales*, Familia: *Asteraceae*, Tribu: *Tageteae*, Genero: *Tagetes*, Especia: *Tagetes Lucida*. Nombre científico: *Tagetes lucida*.^{19, 20}

- Nombre común: Pericón o yerbanís.^{19,20}

- Descripción

Tiene hojas pequeñas y verdes, muy aromáticas, y flores amarillas en verano.^{19, 20}

- Origen

Se encuentra en los llanos, campos y al lado de las carreteras en los bosques de pino-encino templados de México y de Guatemala.

- Composición Química

Las hojas y flores contienen aceite esencial (limoneno, 16.5%; β -ocimeno, 14%; β -cariofileno, 28%; mirceno; anetol, alilanol, esdragol, metieugenol, linalool), alcaloides cuaternarios, flavonoides (quercetagina, patuletina), saponinas, taninos, leucoantocianinas, poliacetilenos, glicósidos cianogénicos, cumarinas (herniarina o 7-metoxicumarina), derivados de tiofeno, α -tertienilo, goma, dextrina, grasas, pectina, resinas acídicas y sales minerales.^{19, 20}

- Propiedades medicinales

Entre sus propiedades destacan

Propiedades antibióticas: Se ha detectado actividad inhibitoria contra *Salmonella pyogenes*.^{19, 20}

Propiedades digestivas: Principalmente para dolores de estómago, también se le emplea en cólico estomacal.^{19, 20}

Propiedades ginecológicas: Disminuye cólicos menstruales.^{19, 20}

Propiedades antifúngicas: Se señala que la planta es efectiva cuando se utiliza en procesos infecciosos que involucran a estos organismos y relacionados con *Cándida albicans*.^{19, 20}

2.3.3.3 Ajo

- Taxonomía

Reino: *Plantae*, División: *Magnoliophyta*, Clase: *Liliopsida*, Orden: *Asparagales*, Familia: *Amaryllidaceae*, Subfamilia: *Alloideae*, Tribu: *Allieae*, Genero: *Allium*, Especie: *Allium sativum*. Nombre científico: *Allium sativum*.²⁰

- Nombre común: Ajo

- Descripción

Es una planta perenne con hojas planas y delgadas, de hasta 30 cm de longitud. Las raíces alcanzan fácilmente profundidades de 50 cm o más. El bulbo, de piel blanca, forma una cabeza dividida en gajos que comúnmente son llamados dientes. Cada cabeza puede contener de 6 a 12 dientes, cada uno de los cuales se encuentra envuelto en una delgada capa de color blanco o rojizo. Cada uno de los dientes puede dar origen a una nueva planta de ajo, ya que poseen en su base una yema terminal que es capaz de germinar incluso sin necesidad de plantarse previamente. Este brote comienza a aparecer luego de los tres meses de cosechado, dependiendo de la variedad y condiciones de conservación. Las flores son blancas, y en algunas especies el tallo también produce pequeños bulbos o hijuelos. Un par de semanas antes de que el ajo esté dispuesto para ser cosechado, brota un vástago redondo que tiende a enroscarse conocido por porrino; este porrino es una delicia gastronómica. Una característica particular del bulbo es el fuerte olor que emana al ser cortado. Esto se debe a dos sustancias altamente volátiles, la alicina y el disulfuro de alilo.²⁰

- Origen

Se cree que es originario del Asia central, llegó a América durante la colonización en el siglo XV, en Guatemala se cultiva principalmente en Huehuetenango y Sololá.²⁰

- Composición química

Está formado por Agua 70%, Hidratos de carbono 23% (fibra 1%), Proteínas 5%, Lípidos 0,3%, Potasio 400 mg/100 g, Sodio 30 mg/100 g, Fósforo 140 mg/100 g, Calcio 14 mg/100 g, Hierro 1,5 mg/100 g, Vitamina C 11 mg/100 g, Vitamina A 60 microgramos/100 g, Vitamina B1 0,2 mg/100 g. También contiene sustancias altamente volátiles llamadas alicina y disulfuro de alilo.²⁰

- Propiedades Medicinales

Entre sus propiedades destacan

Propiedades nutricionales: El ajo contiene pocas calorías, pero es muy rico en vitamina C, vitamina B6 y manganeso.

Propiedades digestivas: ayuda a procesar mejor los alimentos. Prevenir las inflamaciones estomacales e intestinales, e incluso puede eliminar bacterias dañinas en los intestinos.

Propiedades antifúngicas: ayudan a combatir las infecciones por Candidiasis.²⁰

2.3.3.4 Tomillo

- Taxonomía

Reino: *Plantae*, División: *Magnoliophyta*, Clase: *Magnoliopsida*, Orden: *Lamiales*, Familia: *Lamiaceae*, Subfamilia: *Nepetoideae*, Tribu: *Mentheae*, Genero: *Thymus*. Nombre científico: *Thymus*.²⁰

- Nombre común: Tomillo
- Descripción

Arbusto enano muy aromático. Tallos rígidos y leñosos, cubiertos de pelos blancos. Las hojas son estrechas y diminutas, de margen recurvado. Las flores pueden ser de blancas a purpuras, con tubo petalino recto y estambres salientes, se agrupan en racimos terminales muy densos.²⁰

- Origen

Son nativas de las regiones templadas de Europa, África del Norte y Asia.

- Composición química

Los principales componentes activos del tomillo: Ácidos: ácido nicótico, cafeico, oleanólico, ursólico, rosmarínico. Minerales: aluminio, cobalto, calcio, magnesio y hierro. Vitaminas: tiamina, niacina, vitamina C. Flavonoides: cirsilineol, timonina, narnigenina, erodictol, apigenina, luteolina, quercetina y rutina, taninos, betacarotenos. El aceite esencial contiene: timol, linalol, carvacrol, p-cimeno, gammaterpineno, alfa-terpineol, aneol y borneol.^{21,22}

- Propiedades medicinales

Entre sus propiedades destacan

Propiedades digestivas: Es una planta estimulante del aparato digestivo, contrarresta espasmos intestinales. También es una planta estimulante del apetito, siendo recomendada en casos de anorexia o falta de apetito. ^{21, 22, 23}

Propiedades carminativas: El timol y el carvacrol ayudan a expulsar el gas acumulado en el aparato digestivo, puede ser de ayuda para tratar la flatulencia. ^{21, 22, 23}

Propiedades nutricionales: Planta rica en hierro y otras vitaminas, su alto contenido en hierro hace que sea una planta adecuada para tratar problemas de anemia o para casos de dietas bajas en dicho mineral. ^{21, 22, 23}

Propiedades analgésicas: También puede aliviar el dolor de garganta en caso de tener anginas. Esta planta puede reducir ligeramente los dolores relacionados con la menstruación y facilitar el vaciado evitando problemas que pueden originar dolor de cabeza, gastritis, retención de líquidos y cambios de humor. ^{21, 22, 23}

Propiedades antisépticas: El timol proporciona al tomillo propiedades desinfectantes que lo convierten en un potente antiséptico para el aparato respiratorio, siendo capaz de eliminar gérmenes además de reducir síntomas (como la fiebre o el malestar) relacionados con las infecciones que estos producen. ^{21, 22, 23}

Propiedades tranquilizantes: Se considera al tomillo como un relajante natural. También puede ser eficaz en caso de cansancio o pesadez gracias a su contenido en lisina, que es un aminoácido imprescindible en el organismo y cuya falta puede provocar síntomas como cansancio o pesadez. ^{21, 22, 23}

Propiedades antifúngicas: Las propiedades antimicóticas del tomillo unidas a sus propiedades antisépticas hacen que sea una planta adecuada para tratar casos de vaginitis e infecciones por *Cándida albicans*. ^{21, 22, 23}

2.3.3.5 Apazote

- Taxonomía

Reino: *Pantae*, Clase: *Magnoliopsida*, Orden: *Caryophyllales*, Familia: *Amaranthaceae*, Subfamilia: *Chenopodioideae*, Genero: *Dysphania*, Especia: *Dysphania Ambrosioides*. Nombre científico: *Dysphania ambrosioides* ^{23, 24}

- Nombre común: Apazote, epazote o paico en países hispanoamericanos. ^{23, 24}

- Descripción

Tiene un tallo estriado de color verde oscuro con manchitas rojizas, sus hojas son ovaladas, y presentan ondulaciones irregulares en las orillas. El epazote florece en verano y en otoño, sus florecillas son pequeñas y verdosas, y están agrupada en pequeños racimos con hojas a los lados. ^{23, 24}

- Origen

México y muchos otros países de Hispanoamérica, como Argentina, Bolivia, Chile, Colombia, Ecuador, Guatemala, El Salvador, Paraguay, Perú y Venezuela, así como en el sur de los Estados Unidos. ^{23, 24}

- Composición química

Contiene aceite esencial (0,8-1%), los frutos contienen hasta un 1%. Contiene un peróxido terpénico, el ascaridol (60-80%), p-cymol (22%), carburos terpénicos (cimeno, limoneno, alfa terpineno), d-alcanfor, salicilato de metilo, safrol. Saponinas, leucina. ^{23, 24}

- Propiedades medicinales

Entre sus propiedades destacan

Propiedades antiparasitarias: destaca como antihelmíntico, especialmente efectivo frente a ascaris y anquilostoma, menos frente a oxiuros. Emenagogo, antiespasmódico. Indicado para parásitos intestinales: ascaridiasis, anquilostomiasis. ^{23, 24}

Propiedades digestivas: Comúnmente se cree que previene la flatulencia. ^{23, 24}

Propiedades respiratorias: disminuye la tos y controla el asma. ^{23, 24}

Propiedades Nerviosas: contrarresta histeria y corea. ^{23, 24}

Propiedades ginecológicas: se utiliza en tratamientos de amenorrea, dismenorrea.

^{23, 24}

2.3.4 Fluidos supercríticos (Extracto natural)

Tradicionalmente se conocen los tres estados clásicos de la materia: gas sólido y líquido. Así como los distintos procesos físicos por los cuales la materia cambia de estado. Sin embargo desde mediados del siglo XIX se conoce otra fase de la materia el estado supercrítico. Este estado se obtiene al mantener una sustancia a una temperatura y presión por encima de su punto crítico (de lo que deriva su nombre).^{5, 25,}

Los fluidos supercríticos ofrecen recursos para alcanzar propiedades propias de un gas y un líquido sin alterar la estructura química del compuesto con el que se trabaja. Esto es debido a que en un fluido sometido a estado supercrítico la línea de separación de fases líquido gas se interrumpe. Esto implica la formación de una sola fase en la que el fluido tiene características intermedias entre las de un gas y un líquido. Específicamente las características supercríticas son una alta densidad (como la de los líquidos) y una gran dilucididad (tal como los gases).^{5, 25,}

Al igual que los gases los fluidos supercríticos poseen densidad enormemente variable en relación a su temperatura y presión sin embargo a diferencia de los gases alcanzan densidades muy cercanas a los líquidos. De modo que la principal característica de los fluidos supercríticos es el amplio rango de densidades que pueden presentar en dependencia de las condiciones de temperatura o presión a los que estén sometidos.^{5, 25,}

Dada la relación directa que existe entre la densidad de un fluido con su capacidad de actuar como solvente los fluidos supercríticos son excelentes solventes a través de pequeñas variaciones en la presión o temperatura.^{5, 25}

El uso de fluidos supercríticos como solventes para la extracción de metabolitos orgánicos, ha recibido especial atención en los últimos años debido a su mayor eficiencia; menor tiempo de extracción y utilización de menor cantidad de materia prima. Los fluidos supercríticos (FSC) más utilizados son: óxido nitroso (N_2O), amoníaco (NH_3), hexafluoruro de azufre (SF_6) y dióxido de carbono (CO_2).^{5, 25, 27}

Sin embargo en su mayor parte se utiliza dióxido de carbono para extraer compuestos orgánicos esto es debido a su nula toxicidad y bajo costo. Además de presentar un punto crítico de temperatura y presión razonables (31.1 grados centígrados y 7382 Kpa) Asimismo el CO_2 supercrítico tienen la habilidad de solventar un gran rango de compuestos orgánicos no polares y de baja polaridad. Pero no es efectivo como solvente de compuestos polares razón por la que se utiliza etanol al 95% como co-solvente. De modo que el extracto

obtenido presenta todos los metabolitos orgánicos tanto polares como no polares de la muestra vegetal.^{25, 26, 27}

2.3.5 Proceso de extracción supercrítica

El proceso de extracción se lleva a cabo mediante un extractor supercrítico con CO₂ el cual consta de un cilindro de dióxido de carbono la celda de extracción (con su tapa y termómetro). Dos manómetros (uno en la celda y otro en el tanque de CO₂), cuatro válvulas (una de entrada, una de escape y dos de salida) un recipiente colector (probeta de vidrio) y una banda calefactora externa eléctrica.^{26, 27}

El proceso típico de extracción consiste en un reactor en el que se introduce el substrato original y una cantidad de dióxido de carbono. El sistema se presuriza y se calienta hasta alcanzar condiciones supercríticas con el que el Dióxido de Carbono disuelve los compuestos a extraer. A continuación se transfiere el fluido a otra cámara donde se despresuriza la mezcla resultando la liberación del soluto y la eliminación del dióxido de carbono como gas.²⁶

Se toma la muestra vegetal su muele y se coloca en la celda de extracción. A continuación se agrega etanol al 95% y se cierra el sistema. Se eleva la temperatura en el interior de la celda hasta 45 grados centígrados utilizando el calefactor eléctrico externo al alcanzar la temperatura se presuriza el interior de la celda con CO₂ a 8963 Kpa. Permanece el sistema bajo estas condiciones por una hora luego de la cual se recupera el extracto por las válvulas de salida en la parte inferior de la celda y se colecta en una probeta.^{26,27}

2.3.6 Inóculo

Término colectivo para referirse a los microorganismos o sus partes (esporas, fragmentos miceliales, etc.) capaces de provocar infección o simbiosis cuando se transfieren a un huésped. El término también se usa para referirse a los organismos simbióticos o patógenos transferidos por cultivo.²⁷

2.3.7 Eficacia

La eficacia es la capacidad de alcanzar el efecto que espera o se desea tras la realización de una acción. Eficiencia, se refiere al uso racional de los medios para alcanzar un objetivo predeterminado.²⁷

2.3.8 Susceptibilidad.

El principal objetivo de las pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos (PSA) *in vitro* es el proporcionar una guía para el manejo terapéutico de las enfermedades infecciosas a través de la sensibilidad o resistencia de bacterias patógenas aerobias y anaerobias facultativas a diferentes compuestos antimicrobianos. Debido a que es imposible predecir la susceptibilidad de una bacteria responsable de una determinada infección a los antimicrobianos, las PSA efectuadas en el laboratorio microbiológico se convierten en un instrumento esencial para el manejo terapéutico de los pacientes.²⁸

Existen diferentes técnicas de laboratorio que pueden ser utilizadas para evaluar *in vitro* la resistencia de las bacterias a diferentes agentes antimicrobianos. Entre estas técnicas, la prueba de susceptibilidad de difusión en disco (técnica de Kirby Bauer) es la más común, así como las pruebas de macrodilución en caldo y agar.²⁸

Para obtener unos resultados fiables y uniformes, las técnicas utilizadas, los medios y los procedimientos empleados deben estar normalizados. Hoy en día, el Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI) es responsable de la actualización y modificación del procedimiento original de Kirby y Bauer a través de un proceso de consenso global. Esto asegura la uniformidad de la técnica y la reproducibilidad de los resultados.²⁸

Este método normalizado implica la colocación de un disco de papel cargado de una concentración conocida de un antibiótico sobre la superficie del agar en el que los microorganismos han sido sembrados. De esta forma, se produce un gradiente de concentración y la sensibilidad de los microorganismos se indica según el tamaño del halo de inhibición. El uso de medios de cultivo estandarizados y el control de las condiciones durante la prueba son requisitos fundamentales en el ensayo microbiológico de antibióticos a la hora de lograr resultados satisfactorios.²⁸

2.3.9 Evaluación de la susceptibilidad a antimicrobianos *in vitro*

Los métodos más utilizados para la evaluación de la actividad antimicrobiana de las plantas medicinales han sido los de difusión y dilución. En ambos casos existen factores tales como: composición del medio de cultivo, microorganismos de prueba, métodos de extracción y pH. Estas variaciones se han minimizado trabajando en condiciones estándar.²⁸

En algunos estudios se han introducido ciertas modificaciones a los métodos con el fin de mejorar los resultados pero los principios básicos continúan siendo los mismos.²⁸

2.3.10 Método de difusión

Se utilizan generalmente discos de papel filtro impregnado con las soluciones antimicrobianas a ensayar. Estos se aplican sobre placas de agar inoculadas con el microorganismo de prueba. Al ponerse en contacto los discos con el agar absorben agua del medio con lo cual se disuelve la solución y empieza a difundir a través de la capa de agar. El mismo tiempo que el antibiótico y/o antifúngico que va difundiendo está sucediendo la multiplicación bacteriana y/o fúngica, durante la fase de crecimiento logarítmico en la que la multiplicación bacteriana ocurre más rápidamente que la difusión del antibiótico las bacterias que no han sido inhibidas seguirán multiplicándose hasta formar un halo alrededor del disco que puede visualizarse luego de cierto tiempo de incubación. No habrá crecimiento en el área donde el antibiótico este en concentraciones inhibitorias por lo tanto mientras más susceptibles sea el microorganismo el diámetro del halo será mayor.

Se han utilizado diferentes medios: agar Muller Hinton y Sabourou, algunos utilizan el aditivo emulsionante Tween-80 (polisorbato 80) con diferentes cepas en papel filtro con diámetro de poro diferente. Han concluido que las variables que influyen son: la concentración y tipo de antibiótico el medio el tiempo de preparación de la placa, la profundidad del agar, la conservación y manipulación de los discos y la metodología utilizada.²⁹

2.3.11 Hongos

Los hongos, también conocidos como eumycotas, son organismos pertenecientes al Reino Fungí, agrupando a todos los eucariotas heterótrofos, unicelulares y multicelulares, y su nutrición se realiza por absorción a través de la pared celular. Durante mucho tiempo, los hongos fueron clasificados con las plantas (Reino Plantea), pero al ser estudiados exhaustivamente se observó que poseían características tan diferentes a cualquier otro organismo que ahora se clasifican en un reino independiente. Su nutrición es heterótrofa, no sólo con respecto al carbono y al nitrógeno, sino también a otras sustancias. Los hongos son heterótrofos saprófagos; es decir, que adquieren su alimento por descomposición y adsorción de la materia orgánica a través de la membrana y pared celulares. Sus células no suelen estar desnudas, salvo en los grupos inferiores, sino cubiertas por una membrana protectora que suele ser de quitina (polímero de N-acetilglucosamina), y se agrupan para formar talos filamentosos denominados hifas, cuya reunión constituye a su vez un micelio, o cuerpo vegetativo, que penetra el sustrato.³⁰

2.3.11.1 *Cándida*

La *Cándida* es un hongo unicelular, una levadura que forma parte de la flora comensal o normal, de la piel y de la mucosa. Dentro de ellas, las más aisladas como agentes causales de infecciones en el hombre son: *Cándida albicans* y otras especies del género (se han descrito más de 190 especies) como por ejemplo *Cándida parapsilosis*, *Cándida tropicalis*, *Cándida glabrata*, *Cándida krusei*, *Cándida dubliniensis*.³⁰

2.3.11.2 *Cándida albicans*

Se ha determinado que las especies del género *Cándida* conforman el grupo más importante de hongos patógenos oportunistas. Las especies incluidas en este género constituyen la cuarta causa más frecuente de infecciones nosocomiales septicémicas y superan a cualquier patógeno gramnegativo individual.³⁰

Cándida albicans es la especie aislada con mayor frecuencia a partir de muestras clínicas y generalmente representa entre un 90% y un 100% en muestras aisladas en mucosas, entre un 50% y 70% de las cepas procedentes de pacientes con fungemias. Alrededor de un 95% de estas últimas, corresponde a cuatro especies *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*.³⁰

2.3.11.2.1 Morfología

Todas las especies del género *Cándida* se desarrollan como células levaduriformes ovaladas (3 a 5 μ m) que fueron yemas o blastoconidias. Con excepción de *C. glabrata*, las especies de *Cándida* producen también pseudohifas e hifas verdaderas. Por otra parte *C. albicans* genera tubos germinales de pared grueso, hifas verdaderas en la mayoría de las condiciones.³⁰

En condiciones *in vitro*, casi todas las especies de este género dan lugar a colonias lisas en forma de domo de color blanco a crema. *C. albicans* y otras especies pueden sufrir modificaciones fenotípicas, en las que una cepa de *Cándida* se transforma de manera reversible en alguna de varias morfologías diferentes que comprenden desde la típica colonia lisa blanca, formada principalmente por células levaduriformes de gemación a colonias muy peludas o vellosas, compuestas fundamentalmente por pseudohifas o hifas.³⁰

2.3.11.2.2 Epidemiología

La especie del género *Cándida* coloniza al ser humano y otros animales de sangre caliente, por lo que se encuentran tanto en las personas como en los ambientes naturales. El lugar primario de colonización es el tubo digestivo desde la cavidad bucal hasta el recto. También se desarrollan como comensales en la vagina, la uretra la piel, bajo las uñas del pie y mano.³⁰

Se ha detectado la presencia de *Cándida albicans*, el principal agente etiológico de enfermedad en el ser humano en el aire el agua y el suelo, además del ser humano y los animales. Se estima que entre un 25% y un 50% de las personas sanas, porta microorganismos de *Cándida* en la microflora normal de la cavidad bucal. *C. albicans* representaría entre un 70% y un 80% de las cepas. Las tasas de portadores orales son significativamente mayores, en la población pediátrica, los pacientes ingresados, los sujetos infectados por el VIH, las personas con dentaduras postizas, los diabéticos, los individuos sometidos a quimioterapia antineoplásica o antibioticoterapia y los niños. Prácticamente todos los seres humanos pueden albergar uno o dos especies de *Cándida*, en su tubo digestivo y los niveles del estado del portador sano pueden aumentar hasta niveles de enfermedad detectables u otras situaciones de alteración de los mecanismos de defensa del organismo anfitrión.³⁰

La principal fuente de infección causada por las especies de *Cándida* (desde la enfermedad mucosa y cutánea superficial hasta la diseminación hematógena) es el propio paciente, es decir la mayoría de los tipos de candidiasis representa una infección endógena en la que la microflora comensal, aprovecha la oportunidad para producir una infección. Para ello debe existir alguna diferencia en las barreras del anfitrión frente a *Cándida*. Por ejemplo la transferencia del microorganismo desde la mucosa digestiva, hasta el torrente circulatorio exige la proliferación excesiva de las levaduras en su nicho comensal, junto a un fallo de la integridad de la mucosa digestiva. La transmisión exógena de *Cándida* también ocasiona una proporción de ciertos tipos de candidiasis. Como por ejemplos de tal transmisión se encuentran el uso de soluciones de irrigación líquidos de nutrición parenteral, transductores de presión vascular, válvulas cardíacas y corneas contaminadas.

30

2.3.11.2.3 Enfermedades clínicas

En el marco adecuado las especies del genero *Cándida*, pueden producir una infección clínica en prácticamente cualquier sistema orgánico. El espectro de infecciones abarca desde la enfermedad mucosa y cutánea superficial, hasta la diseminación hematógena extensa con afectación de órganos diana, como el hígado, el bazo, el riñón, el corazón y el cerebro. Las infecciones mucosas debidas a *Cándida* (conocidas como muguet), pueden limitarse a la bucofaringe o bien extenderse hacia el esófago y el tubo digestivo. En la mujer la mucosa vaginal, también constituye un lugar frecuente de infección. Generalmente estas infecciones se observan en sujetos con una inmunosupresión local, o generalizada, o bien en condiciones que favorecen la proliferación de estas levaduras. Estas infecciones suelen manifestarse con maculas blancas, semejantes al requesón en la superficie de la mucosa afectada. Se han descrito también otras presentaciones como el tipo pseudomembranoso, en el que el raspado revela una superficie hemorrágica heterogénea: el tipo eritematoso formado por áreas aplanadas de color rojizo que pueden presentar escozor en algunas ocasiones: la leucoplasia candidiasica un engrosamiento epitelial que no se desprende blanco causado por *Cándida* y la queilitis angular, fisuras irritadas en las comisuras de la boca. Las especies del genero *Cándida*, pueden originar infecciones cutáneas localizadas en zonas en las que la superficie cutánea esta obstruida o húmeda (ejemplo: ingle, axilas, espacios interdigitales de los pies pliegues mamarios) estas infecciones debutan con un exantema prurítico, con lesiones vesiculopustulosas eritematosas. El paciente portador de una microflora mixta, que contenga especies de *cándida* puede desarrollar unicomicosis y paroniquia.³⁰

La candidiasis mucocutánea crónica, es un trastorno infrecuente caracterizado por una deficiencia en la capacidad de respuesta de los linfocitos T frente a *Cándida*. Los pacientes presentan lesiones mucocutaneas crónicas por *Cándida* entre las que se encuentran la afectación ungueal extensa y la vaginitis. Las lesiones pueden adoptar un tamaño relativamente grande y un aspecto granulomatoso deformante. La afectación del aparato genitourinario por *Cándida* comprende desde la colonización asintomática de la vejiga, hasta abscesos renales, derivados de la diseminación hematógena. La colonización vesical por las especies del género *Cándida* se produce casi exclusivamente en sujetos que requieren una sonda vesical permanente, padecen diabetes, presentan obstrucción urinaria o se han sometido a alguna intervención urinaria previamente.³⁰

La candidiasis hematológica puede ser aguda o crónica y suele comportar la diseminación de la infección a tejidos profundos, como las vísceras abdominales, el corazón, los ojos, los huesos y las articulaciones y el cerebro. La candidiasis hepatoesplénica crónica se produce con posterioridad a un episodio de fungemia manifiesta o inadvertida y se manifiesta como un proceso indolente caracterizado por la fiebre, la elevación de la fosfatasa alcalina y la numerosa presencia de lesiones en el hígado y el bazo. La candidiasis del sistema nervioso central puede tener lugar como consecuencia de una enfermedad hematológica o bien asociarse a intervenciones neuroquirúrgicas y derivaciones ventrículo peritoneal. Este proceso puede remedar la meningitis bacteriana y su evolución puede ser indolente o crónica. La mayor parte de los casos de afectación cardíaca por *Cándida*, se debe a diseminación hematológica de la infección a una prótesis valvular o una válvula cardíaca dañada, el miocardio o el espacio pericárdico. El ojo se ve afectado de manera frecuente en sujetos con candidiasis hematológica el trastorno se manifiesta con coriorretinitis y endoftalmitis. Por ello todos los pacientes que estén en riesgo de presentar candidemia, deben someterse a exploraciones oftalmológicas minuciosas y frecuentes. También es posible observar una queratitis traumática.³⁰

2.3.11.2.4 Diagnóstico de laboratorio

Para el diagnóstico de laboratorio de la candidiasis es necesaria la obtención de material clínico adecuado para su estudio mediante microscopia directa y cultivo. Las muestras de raspado de las lesiones mucosas o cutáneas se pueden examinar directamente después de ser tratadas con hidróxido de potasio (KOH) al 10% o el 20% que contenga blanco calcofluor. Las formas levaduriformes en gemación y las pseudohifas se detectan con facilidad por medio de la microscopia de fluorescencia. Los cultivos en medios micológicos estándar se emplean con la finalidad de aislar el microorganismo para su posterior identificación a nivel de especie. Con una frecuencia en constante estas muestras se inoculan directamente en un medio cromogénico selectivo como el CHRO-M agar, el cual hace posible la detección de la presencia de cada especie de *Cándida* en la muestra y la rápida identificación de *C. albicans* (colonias verdes) y *C. tropicalis* (colonias azules) en función de sus características morfológicas.³⁰

2.3.11.2.5 Tratamiento prevención y control

Las infecciones mucosas y cutáneas se tratan por medio de diversas cremas tópicas lociones pomadas y supositorios que contienen distintos fármacos antifúngicos del grupo de los azoles. El tratamiento sistémico por vía oral se basa en la administración de

fluconazol o itraconazol. La colonización vesical o la cistitis se tratan mediante la instilación de anfotericina B directamente en la vejiga (lavado vesical) o la administración por vía oral de fluconazol.³⁰

2.3.12 Grupos de control científico

Es una parte del método científico necesaria para comparar conceptos. Su finalidad es controlar tantas variables y atributos de los datos como sea posible, modificándolos de a uno por vez, para evitar confundirlos. En lenguaje llano, podríamos decir que un control permite al investigador afirmar que "dos situaciones eran idénticas hasta que se introdujo el factor X, por lo que este resultado debió ser consecuencia de éste".³¹

Los grupos de control tienen como objetivo demostrar la certeza de los resultados de la manipulación de las variables en un experimento. Además de eliminar otras variables, los grupos de control científicos ayudan al investigador a mostrar que el diseño experimental es capaz de generar resultados. Existen dos tipos principales de control, positivo y negativo, y ambos brindan a los investigadores formas de aumentar la validez estadística de sus datos.³¹

- Grupo de control científico positivo

Los grupos de control científicos positivos son aquellos en donde se espera que el grupo de control brinde un resultado positivo y permiten al investigador demostrar que el armado fue capaz de producir resultados. En general, un investigador utilizará un procedimiento de control positivo, el cual es similar al diseño real con un factor que se sabe que funciona. Los grupos de control científico positivos reducen las posibilidades de falsos negativos.³¹

- Grupo de control científico negativo

El control científico negativo es el proceso que consiste en utilizar el grupo de control para asegurarse de que ninguna variable de confusión haya afectado los resultados o eliminar las posibles fuentes de sesgo. Se utiliza una muestra que no se espera que funcione.³¹

Un control negativo también puede ser una forma de establecer un punto de referencia. Un control positivo permite demostrar al investigador que el experimento fue capaz de arrojar resultados y el control negativo determina una posible desviación de resultados.³¹

2.3.13 Fluconazol

Absorción, distribución y excreción: El fluconazol, siendo familia de los tiazoles se absorbe casi por completo en el tubo digestivo. Las concentraciones plasmáticas son básicamente las mismas aunque el fármaco se administre por vía oral o intravenosa y su disponibilidad no se altera con el alimento o la acidez gástrica. Las concentraciones plasmáticas máximas son de 4 a 8 ug/ml después de dosis repetidas de 100mg. La excreción renal contribuye a más del 90% de la eliminación y su eliminación es de 25 a 30 horas. El fluconazol se difunde con facilidad hacia los líquidos corporales, lo que comprende leche materna, esputo y saliva; las concentración en el líquido cefalorraquídeo pueden alcanzar 50 a 90% de los valores simultáneos en el plasma. ^{32, 33}

Interacción farmacológica: El fluconazol es un inhibidor de las isoenzimas CYP3A4 y CYP2C9.³²

Indicaciones de su uso: en candidosis y candidemias, coccidioidomicosis no sistémica, criptococosis meníngea, terapia de mantenimiento en la criptococosis meníngea con sida y dermatofitosis. El fluconazol es el fármaco de elección para el tratamiento de la meningitis por coccidioides debido a su buena penetración en el líquido cefalorraquídeo y mucha menor morbilidad que con la anfotericina B intratecal. ^{32, 33}

Usos terapéuticos y dosis: Candidosis: El fluconazol, en dosis de 200mg en el primer día y luego 100mg al día durante un mínimo de dos semanas, es eficaz en la candidosis bucofaríngea. Se han utilizado dosis de 100mg a 200mg al día para disminuir la candiduria en los pacientes de alto riesgo. Una sola dosis de 150mg es eficaz en la candidosis vaginal no complicada. Una dosis de 400mg al día disminuye la frecuencia de candidosis profunda en los receptores de alotrasplante de medula ósea y es útil para tratar la candidemia de los no inmunodeficientes. En los pacientes que no han recibido profilaxis con fluconazol se ha utilizado satisfactoriamente el fármaco como tratamiento empírico de la neutropenia febril en pacientes que no responden a los antibacterianos y que parecen tener un alto riesgo de infecciones por hongos. ^{32, 33}

Efectos secundarios: los efectos secundarios en los pacientes que reciben el fármaco durante más de siete días, sea cual sea la dosis son los siguientes: náusea, 3.7%; cefalea, 1.9%; exantema, 1.8%; vómito, 1.7%; dolor abdominal, 1.7% y diarrea 1.5%. El empleo de dosis altas puede ser limitado por la náusea. La alopecia reversible puede presentarse con el tratamiento prolongado en dosis de 400mg al día. Se han comunicado casos infrecuentes de muertes debidas a insuficiencia hepática o síndrome de Stevens-

Johnson. El fluconazol es teratígeno en roedores y se ha relacionado con deformidades óseas y cardíacas en por lo menos tres lactantes nacidos de dos mujeres que tomaban altas dosis durante el embarazo. El fluconazol corresponde a la categoría C, es decir, se debe evitar durante el embarazo a menos que el beneficio potencial justifique el posible riesgo para el feto.³²

2.3.14 Solución salina normal o suero fisiológico.

El suero fisiológico o solución fisiológica es una disolución acuosa de sustancias compatibles con los organismos vivos debido a sus características definidas de osmoticidad, pH y fuerza iónica.³⁴

Está compuesto de agua, electrolitos y, a veces, distintas sustancias, como por ejemplo la glucosa, fuente de carbono y energía para el organismo, y de algunos polisacáridos expansores. Contiene 154 mEq / L de Na⁺ y Cl⁻. Tiene un grado ligeramente mayor de la osmolaridad (es decir, más solutos por litro) que en la sangre. Sin embargo, si se tiene en cuenta el coeficiente osmótico, una corrección para soluciones no ideales, entonces la solución salina es mucho más cercana a lo isotónico.³⁴

2.3.15 Halo de crecimiento

Zona alrededor de un disco de antibiótico o antimicótico en un antibiograma en el que no se produce crecimiento bacteriano o fúngico en una placa de agar inoculada con el germen. Es una medida de la potencia del antibiótico o frente al germen.³⁵

2.3.16 Caja Petri o placa de Petri

Fue construida en el año de 1877 por el bacteriólogo alemán Julius Richard Petri. Es un instrumento de laboratorio el cual puede ser de cristal o de plástico, que consta de una base circular, y las paredes son de una altura baja aproximadamente de 1 cm; y una cubierta de la misma forma pero algo más grande de diámetro para que encaje como una tapa. Los hay de diferentes diámetros, los más utilizados en el laboratorio son los de 10 cm de diámetro. Se utiliza en los laboratorios principalmente para el cultivo de bacterias, hongos y otros microorganismos, solándose cubrir el fondo con distintos medios de cultivo (por ejemplo agar). Si se quieren observar colonias, durante el tiempo de incubación del microorganismo sembrado en la placa ésta se mantiene boca abajo, es decir, apoyada sobre la tapa. De este modo, el agar queda en la parte superior y al condensarse el vapor de agua que generan los microorganismos por su metabolismo, cae sobre la tapa, evitando que los microorganismos se diluyan, manteniéndose fijo al sustrato.³⁶

2.4 Marco geográfico

Centro Universitario Metropolitano (CUM), zona 11 de la ciudad capital de Guatemala.

2.5 Marco Institucional

2.5.1 Centro de Investigaciones Biomédicas de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala

El Centro de Investigaciones Biomédicas de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala inicio sus labores en el año 2012. La Dirección de Investigación se encarga de dirigir estudios científicos, tecnológicos, biomédicos y educativos en la Facultad de Ciencias Médicas. El laboratorio clínico brinda servicios de diagnósticos rutinarios y especializados como lo son: Hematología, urología, coprológica, inmunología, microbiología clínica y bioquímica, patología y biología molecular. Cuenta con laboratorios microbiológicos debidamente equipados para el cultivo y realización de pruebas *in vitro* de bacterias y hongos. Así mismo tiene un cepario exclusivo donde se cultivan diferentes clases de bacterias y hongos.³⁷

2.6 Marco Legal

2.6.1 Código de salud

Artículo 34: Promoción de la investigación: El Ministerio de Salud promoverá e impulsará el desarrollo de políticas de investigación en salud y el desarrollo tecnológico con la participación de las instituciones que integran el sector.³⁸

Artículo 35: Políticas de investigación: Las instituciones que conforman el sector en coordinación con otras instituciones que el Estado haya creado para tales fines, formular políticas nacionales de investigación en salud.³⁸

Artículo 36: Capacidad en investigación: El estado fortalecerá la capacidad de las instituciones que conforman el sector, en investigación y desarrollo tecnológico, fomentando el desarrollo de centros de investigación, mejorando la infraestructura existente, facilitando la gestión, administración y ejecución de proyectos así como formando y capacitando recursos humanos.³

2.6.2 Código deontológico

Artículo 88: Investigación en Humanos: El avance en la medicina está fundado en la investigación y por ello no se puede prescindir en muchos casos, de una experimentación sobre seres humanos, siendo la salud de éstos prioritaria para el médico-investigador, quien debe respetar la dignidad de la persona por encima de la ciencia y la tecnología. ³⁹

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Determinar mediante el método de difusión en agar dextrosa Sabouraud la eficacia *in vitro* de los extractos supercríticos del orégano (*Lippia graveolens*), pericón (*Tagetes lucida*), ajo (*Allium sativum*), tomillo (*Thymus vulgaris*), apazote (*Dysphania ambrosioides*) frente a *Cándida albicans* en el Laboratorio Clínico del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala, durante los meses de junio – julio de 2017

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Demostrar cuál de los cinco extractos supercríticos presenta actividad antifúngica (halo inhibitorio).

3.2.2 Determinar a qué concentración surge mayor actividad antifúngica (halo inhibitorio).

3.2.3 Evidenciar cuál de los cinco extractos supercríticos es eficaz para la inhibición *in vitro* de *Cándida albicans* con respecto al control positivo.

3.2.4 Calcular la diferencia de la media de los extractos supercríticos entre las diferentes concentraciones.

4. HIPÓTESIS

4.1 Hipótesis de investigación

Ho. Ninguno de los extractos supercríticos de orégano, pericón, ajo, tomillo y apazote a tres diferentes concentraciones es eficaz para la inhibición *in vitro* de *Cándida albicans*.

Ha. Al menos uno de los extractos supercríticos naturales del orégano, pericón, ajo, tomillo y apazote es eficaz para la inhibición *in vitro* de *Cándida albicans*.

4.2 Hipótesis estadística

Ho. No hay cambios entre las medias de los extractos supercríticos a diferentes concentraciones.

Ha. Hay cambios entre las medias de los extractos supercríticos a diferentes concentraciones.

$$H_0 = \bar{X}_1 = \bar{X}_2 = \bar{X}_3 = \bar{X}_4 = \bar{X}_5$$

$$H_a = \bar{X}_1 \neq \bar{X}_2 \neq \bar{X}_3 \neq \bar{X}_4 \neq \bar{X}_5$$

Dónde:

$\bar{X}$ = Media aritmética.

5. POBLACIÓN Y MÉTODOS

5.1 Enfoque y diseño de la Investigación

5.1.1. Enfoque: Cuantitativo.

5.1.2. Diseño: Experimental.

5.2 Unidad de análisis

5.2.1 Unidad de Análisis

Registro de los distintos diámetros de los halos inhibitorios en los cultivos, medidos en milímetros y su porcentaje de efecto inhibitorio.

5.2.2 Unidad de Información

Antibiogramas del extracto supercrítico en cajas de Petri con agar dextrosa Sabouraud donde se inoculó *Cándida albicans* y su comparación con el control positivo.

5.3 Población y muestra

5.3.1 Población

Cándida albicans, proveniente de aislado clínico y cultivada en el cepario del laboratorio Clínico del Centro de Investigaciones de Biomédicas de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

5.3.2 Muestra

Cinco cajas de Petri con *Cándida albicans* por tres técnicas distintas (técnica gota directa, gota fresca con papel filtro y gota seca con papel filtro) y tres repeticiones por cada técnica, fueron cultivadas y aisladas del cepario del Laboratorio Clínico del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

5.3.2.1 Marco muestral

Cuarenta y cinco cajas de Petri con *Cándida albicans* cultivada.

5.4 Selección de estudio

5.4.1 Criterios de Inclusión

Cándida albicans de aislado clínico en el cepario del Laboratorio Clínico del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

5.4.2 Criterios de exclusión

Se excluyó toda muestra contaminada.

5.5 MEDICIÓN DE VARIABLES

Macro variables	Variables	Descripción conceptual	Descripción operacional	Tipo de Variable	Escala de medición	Criterio de calificación
Extracto supercrítico de planta natural	Orégano	Es una planta perene de 20 a 30cm de alto, ramificada en su parte superior, aromática. Perteneciente al reino plantae, conocida científicamente con el nombre de <i>Lippia graveolens</i>	Halo inhibitorio medido en milímetros sobre la caja de Petri.	N Numérica	R Razón	M Milímetro
	Pericón	Es una planta con hojas pequeñas y verdes muy aromáticas, flores amarillas en el verano. Perteneciente al grupo plantae, conocida científicamente con el nombre de <i>Tagetes lucida</i> .	Halo inhibitorio medido en milímetros sobre la caja de Petri.	N Numérica	R Razón	M Milímetro
	Ajo	Es una planta cuyo bulbo es de piel blanca, forma una cabeza dividida en gajos que comúnmente son llamados dientes. Cada cabeza puede contener de 6 a 12 diferentes. Perteneciente al reino plantae, conocida científicamente con el nombre de <i>Allium sativum</i> .	Halo inhibitorio medido en milímetros sobre la caja de Petri.	N Numérica	R Razón	M Milímetro
	Tomillo	Es una planta cuyos arbustos pequeños muy son muy aromáticos, posee tallos rígidos y leñosos llenos cubiertos de pelos blancos. Perteneciente al reino plantae, conocida científicamente con el nombre de <i>Thymus</i> .	Halo inhibitorio medido en milímetros sobre la caja de Petri.	N Numérica	R Razón	M Milímetro

Macro variables	Variables	Descripción conceptual	Descripción operacional	Tipo de variable	Escala de medición	Criterio de clasificación
	Apazote	Plante que posee tallo estriado de color verde oscuro con manchas rojizas, sus hojas son ovaladas. Perteneciente al reino plantae conocida científicamente con el nombre de Dysphania ambrosioides.	Halo inhibitorio medido en milímetros sobre las cajas de Petri.	Númerica	Razón	Milímetro
Concentración de los extractos supercríticos	Concentración	Extractos de plantas medicinales a diferentes concentraciones (100%, 50%, 25%) obtenido con la técnica de extracción supercrítica con CO ₂ a 45°C y 8963 kPa y etanol al 95% como cosolvente.	Halo inhibitorio a diferentes concentraciones (100%, 50%, 25%) de los extractos supercríticos de las plantas medicinales.	Dicotómica	Nominal	Si No
Grupo de control científico	Control positivo (fluconazol)	Fármaco con acción antifúngica, de la familia de los triazólicos, inhibe la síntesis de esteroides en la membrana celular fúngica.	Halo inhibitorio medido en milímetros sobre las cajas de Petri.	Númerica	Razón	Milímetro
	Control negativo (solución salina fisiológica al 0.9%)	Solución isotónica, está compuesta por agua y electrolitos cuyo componente principal es el cloruro de sodio.	Halo inhibitorio medido en milímetros sobre las cajas de Petri.	Númerica	Razón	Milímetro
	Porcentaje de efecto inhibitorio	Relación entre el halo inhibitorio de cada extracto según su concentración (100%, 50%, 25%) contra el halo inhibitorio del control positivo (fluconazol).	% Efecto inhibitorio = $\frac{[(\text{Diámetro del Halo inhibitorio del extracto en mm}) - (\text{Diámetro del halo inhibitorio del control positivo en mm})]}{100} \times 100$	Númerica	Razón	Milímetro

Macro variables	Variables	Descripción conceptual	Descripción operacional	Tipo de variable	Escala de medición	Criterio de clasificación
Técnica de difusión	Gota directa.	Colocación de una gota directamente a la caja de Petri previamente preparada con dextrosa Sabourou e inoculada con <i>Cándida albicans</i> .	Presencia de halo inhibitorio del extracto supercrítico por gota directa.	Dicotómica	Nominal	Si No
	Gota fresca en papel filtro.	Colocación de una gota en disco de papel filtro. Se espera 20 minutos y luego se coloca en caja de Petri previamente preparada con dextrosa Sabourou e inoculada con <i>Cándida albicans</i> .	Presencia de halo inhibitorio del extracto supercrítico por gota fresca en papel filtro.	Dicotómica	Nominal	Si No
	Gota seca en papel filtro.	Colocación de una gota en disco de papel filtro. Se espera 24 horas y se coloca en horno a 37 grados centígrados y luego se coloca en caja de Petri previamente preparada con dextrosa Sabourou e inoculada con <i>Cándida albicans</i> .	Presencia de halo inhibitorio del extracto supercrítico por gota seca en papel filtro.	Dicotómica	Nominal	Si No

5.6 Técnicas, procesos e instrumentos a utilizar en la recolección de datos

5.6.1 Técnicas de recolección de datos

Se realizaron pruebas de actividad antifúngica con los extractos supercríticos por medio de una réplica del método de difusión de Bauer Kirby adaptado con tres técnicas distintas (técnica gota directa, gota fresca en papel filtro y gota seca en papel filtro) en el medio de agar dextrosa Sabuoraud.

5.6.2 Proceso de recolección de datos

A- Proceso de selección de plantas.

Para la selección de plantas que se han incluido en el estudio, se realizó una breve encuesta a habitantes de comunidades. Y se eligieron las cinco plantas medicinales más frecuentes utilizadas.

Las plantas que se tomaron en cuenta para el estudio provinieron de las distintas regiones del país, el personal técnico de laboratorio llevaron las plantas a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala donde fueron identificadas taxonómicamente por el Licenciado en Biología Max Samuel Mérida Reyes Colegiado 3901.

B- Proceso de extracción supercrítico

Los extractos fueron proporcionados por el Laboratorio Ambiental del Centro Universitario del Oriente (CUNORI) los cuales fueron fabricados por el método de extracción supercrítica utilizando CO₂ como fluido supercrítico solvente y etanol al 95% como cosolvente.

Acto seguido, se agregó el CO₂ hasta alcanzar la presión supercrítica de 8,963kPa, luego se procedió a calentar el sistema a 45°C. Pasado una hora. Se recolectó el extracto en una probeta, obteniéndose un litro de extracto y luego, para asegurar su esterilidad, se filtró, bajo condiciones estériles en una campana de flujo laminar, utilizando guantes estériles, cofia, mascarilla y material estéril. Dicho filtrado se realizó con un filtro estéril de nylon de 45 micras y se almaceno el extracto filtrado en un tubo de vacío estéril de vidrio marca Vacutainer. Y de esta manera se obtuvo concentraciones al 100%, 50%, 25% de cada extracto.

C- Proceso de selección del hongo

El hongo que se utilizó fue un aislado clínico, identificado y cultivado en el cepario del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

D- Preparación del inóculo

Para la preparación de la suspensión del inóculo, se utilizó el microorganismo crecido en agar dextrosa Sabouraud de 24 horas para *Cándida albicans*. Se suspendió los microorganismos en solución triptasa (5 ml) y se ajustó la turbidez al equivalente al tubo cinco de la escala de Mcfarland para *Cándida albicans*.

E- Preparación de las placas.

El medio agar dextrosa de Sabouraud previamente reconstituido, esterilizado, enfriado y mantenido a 45 °C, se distribuyó de una manera homogenizada en placas Petri de vidrios estériles de 90 mm de diámetro, a razón de 20 ml por placa. Se dejó solidificar y se rotulo con el nombre del microorganismo testigo (*Cándida albicans*).

F- Método de Impregnación de extracto supercrítico en papel filtro.

Se fabricaron discos de papel filtro utilizando un sacabocados de 6 mm de diámetro marca Korff Honsberg, dichos discos fueron esterilizados en autoclave. Luego bajo condiciones estériles se impregnaron los distintos extractos supercríticos a diferentes concentraciones 100%, 50%, 25%. Para realizar la impregnación se utilizaron jeringas desechables estériles de tres mililitros, con jeringas calibre 22 G de 30 milímetros de largo marca nipro. El volumen depositado sobre el disco para impregnarlo fue de una gota.

Se utilizó como control positivo fluconazol (Hi Media ®) impregnado y como control negativo una gota de solución salina estéril.

G- Cuantificación del peso de la gota de extracción supercrítica.

Para cuantificar el peso exacto de la gota de cada extracto supercrítico, se pesó el papel filtro no impregnado en una balanza analítica marca Ragwag modelo AS 220, luego se pesó el mismo disco ya impregnado con una gota del extracto, de modo que se obtuvo por medio de una substracción el peso de la gota (ver anexo 10).

H- Colocación del inóculo en caja de Petri con agar dextrosa Sabouraud.

De la preparación del inóculo, se empapo un hisopo estéril en el caldo de Sabouraud, con el cual se sembró la caja de Petri con agar en sentido horizontal, vertical y diagonal. Se dejó secar de tres a cinco minutos. De esta manera se cultivaron las cajas de Petri.

I- Colocación de los extractos supercríticos en caja de Petri

Se realizaron tres técnicas para la impregnación de la gota del extracto supercrítico en la caja de Petri de la siguiente manera:

Técnica 1. Gota Directa

Se procedió a colocar una gota de 20 ul directa del extracto supercrítico en la caja de Petri previamente preparada con dextrosa Sabouraud e inoculada con *Cándida albicans*.

La colocación del extracto supercrítico en la caja de Petri se realizó de la siguiente manera:

Según las horas del reloj: a las 12 horas = concentración al 100%, a las 3 horas = concentración al 50%, a las 6 horas = concentración al 25%, a las 9 horas = control positivo (fluconazol) y al centro de la caja de Petri el control negativo (solución salino estéril).

Al colocar el extracto supercrítico en la caja de Petri previamente preparada e inoculada, se dejó reposar por 30 min, luego se incubó a 37 grados centígrados de 24 a 48 horas. Pasadas las 24 a 48 horas se midió los halos inhibitorios con el instrumento vernier y se anotó cada medición realizada.

Técnica 2. Gota fresca.

Se procedió a colocar una gota de 20 ul del extracto supercrítico en el disco de papel filtro previamente esterilizado. Se esperó por 20 minutos y luego se colocó el disco de papel filtro impregnado en la caja de Petri previamente preparada con dextrosa Sabouraud e inoculada con *Cándida albicans*.

Técnica 3. Gota seca.

Se procedió a colocar una gota de 20 µl del extracto supercrítico en el disco de papel filtro previamente esterilizado. Una vez colocado la gota del extracto supercrítico se esterilizó el disco impregnado por 24 horas en incubadora a 37 grados centígrados. Pasadas las 24 horas se colocó el disco de papel filtro impregnado en la caja de Petri previamente preparada con dextrosa Sabouraud e inoculada con *Cándida albicans*.

Se realizaron tres repeticiones por cada método.

J- Colocación de cajas de Petri en horno incubadora.

Se colocaron a diferentes niveles de altitud en horno incubadora (alto, medio y bajo). Con el fin de bloquear el gradiente de posición y tener una mejor homogeneidad de las variables.

K- Medición del porcentaje de efecto inhibitorio

Por último, a cada extracto supercrítico se midió el porcentaje de efecto inhibitorio por medio de la fórmula propuesta por Martínez y colaboradores.

% Efecto Inhibitorio= [(Diámetro del Halo inhibitorio del extracto en mm)/ (Diámetro del halo inhibitorio del control positivo en mm)] x 100 ³⁷

7.6.2.1 Instrumentos de medición

El instrumento que se utilizó fue una hoja de recolección de datos, estructurada con las variables a investigar. Esta hoja de recolección de datos se encuentra rotulada con un encabezado que contiene los datos de la Universidad de San Carlos de Guatemala, facultad de Ciencias Médicas y los logotipos correspondientes a cada institución. Seguido del encabezado con el título del estudio.

La hoja de recolección de datos constó de la siguiente sección:

Sección No. 1. Extracto de planta natural.

Esta sección permitió describir los cinco extractos supercríticos y estudiarlos. La hoja de recolección de datos consta de los siguientes incisos: halo inhibitorio, el porcentaje a la cual se inhibe el crecimiento fúngico, y su relación con el control positivo y negativo.

5.7 Procesamiento de datos

5.7.1 Procesamiento de datos

La información que se obtuvo de las tablas de recolección de datos de los anexos No. 1-9 fue evaluada por los investigadores para establecer si los distintos extractos de plantas naturales presentan características antifúngicas. Se realizó una base de datos con el programa Microsoft Excel 2016 y también se realizó tablas de recolección de datos y luego graficas en la cual se representan los resultados obtenidos en la investigación. Luego se exporto los datos al programa InfoStat versión 2017 con el fin de observar la normalidad de la distribución de los datos por medio de la prueba Shapiro Wilk y su significancia respectiva.

5.7.2 Análisis de datos

Objetivo 1. Demostrar cuál de los cinco extractos supercríticos presenta actividad antifúngica (halo inhibitorio).

Para el análisis del objetivo No. 1 se procedió a llenar las tablas recolección de datos que se presenta en los anexos del uno al nueve, luego se extrajo los datos de la media de los halos inhibitorios por concentración y se procedió a llenar la tabla 7.1.

Tabla 7.1

Media de los halos inhibitorios de los extractos supercríticos

Guatemala, Junio – julio 2017

Extracto supercrítico	Concentraciones de extracto supercrítico medidas en milímetros			Control positivo medido en milímetros	Control negativo medido en milímetros
	100%	50%	25%		
Orégano					
Pericón					
Ajo					
Tomillo					
Apazote					

Objetivo 2. Determinar a qué concentración surge mayor actividad antifúngica (halo inhibitorio)

Para el análisis del objetivo No. 2 se tomó de base la tabla 7.1, se realizaron pruebas estadísticas para determinar si los resultados son significativos, continuando con los siguientes pasos:

A. Se realizó la prueba de Shapiro Wilk mediante el software estadístico InfoStat versión 2017 para observar si los datos de los extractos supercríticos obtenidos de la tabla 7.1 presentan normalidad en su distribución.

B- Los datos de los extractos supercríticos fueron analizados mediante el software estadístico InfoStat versión 2017, haciendo inferencia estadística y prueba de hipótesis a través de un análisis de varianza (ANDEVA) mediante modelos lineales generales y mixtos, el nivel de significación α a utilizar es de 0.01.

C- Para el cumplimiento del objetivo No. 2 se encontró diferencias estadísticamente significativas, por lo de cumplir con esto se aplicó la prueba de medias de Fisher LSD con un nivel de significancia α de 0.05 para determinar el tratamiento con mayor actividad antifúngica.

D- Se procedió a llenar la tabla 7.2.

Tabla 7.2

Media de los halos inhibitorios de los extractos supercríticos y su P valor por concentración, Guatemala, junio – julio 2017

Extracto supercrítico	Extracto supercrítico Halo inhibitorio en milímetros			Control positivo en milímetros	Valor P de las concentraciones al 100%	Valor P de las concentraciones al 50%	Valor p de las concentraciones al 25%
	100 %	50 %	25 %				
Orégano							
Pericón							
Ajo							
Tomillo							
Apazote							

Objetivo No 3. Evidenciar cuál de los cinco extractos supercríticos es eficaz para la inhibición *in vitro* de *Cándida albicans* con respecto al control positivo.

Objetivo No 4. Calcular el cambio de la media de los extractos supercríticos a tres diferentes concentraciones.

Para el análisis del objetivo No. 3 y 4 se procedió a extraer los datos de mayor halo inhibitorio luego se comparó con los datos del control positivo y se realizaron pruebas estadísticas para determinar si los resultados son significativos.

A. Se realizó la prueba de Shapiro Wilk mediante el software estadístico InfoStat versión 2017 para observar si todos los datos obtenidos en la tabla 7.1 (incluyendo el control positivo) presentan normalidad en su distribución.

B- Todos los datos (incluyendo el control positivo) fueron analizados mediante el software estadístico InfoStat versión 2017, haciendo inferencia estadística y prueba de hipótesis a través de un análisis de varianza (ANDEVA) mediante modelos lineales generales y mixtos, el nivel de significación α a utilizar es de 0.01.

C- Para el cumplimiento del objetivo 3 debe encontrarse diferencias estadísticamente significativas, por lo de cumplir con esto se aplicó la prueba de medias de Fisher LSD con un nivel de significancia α de 0.05 para determinar el tratamiento con mayor actividad antifúngica con respecto al control positivo.

D- Se procedió a llenar la tabla 7.3

Tabla 7.3

**Media de los halos inhibitorios de los extractos supercríticos y su significancia
Guatemala, junio – julio 2017**

Extracto supercrítico	Extracto supercrítico Halo inhibitorio en milímetros			Control positivo en milímetros	Valor P de las concentraciones al 100%	Valor P de las concentraciones al 50%	Valor p de las concentraciones al 25%
	100 %	50 %	25 %				
Orégano							
Pericón							
Ajo							
Tomillo							
Apazote							

5.7 Alcance y límites de la investigación

5.8.1 Obstáculos (límites)

El hongo utilizado fue *Cándida albicans*, por lo que, aunque se demuestre actividad antifúngica, no se puede confirmar con certeza que los extractos presentan actividad contra otras especies fúngicas.

5.7.2 Alcances de la Investigación

Se investigó los extractos supercríticos del orégano, pericones, ajo, tomillo y apazote si presentaban actividad antifúngica, la cual fueron evaluados *in vitro* en *Cándida albicans*.

5.8 Aspectos éticos

La presente investigación fue realizada manipulando el hongo *Cándida albicans* en un estado *in vitro*. Por tal motivo no hubo dilemas morales y no se violó ningún principio ético (Beneficencia, justicia, autonomía, no maleficencia) en seres humano ni animales. El presente estudio se clasifica como tipo de categoría dos de riesgo para los seres humanos.

6. RESULTADOS

El presente estudio fue realizado para determinar la eficacia *in vitro* de los extractos supercríticos del orégano (*Lippia graveolens*), pericón (*Tagetes lucida*), ajo (*Allium sativum*), tomillo (*Thymus vulgaris*), apazote (*Dysphania ambrosioides*) frente a *Cándida albicans*, se realizó por medio de una réplica del método de difusión de Bauer Kirby con tres técnicas de distintas (técnica gota directa, gota fresca en papel filtro y gota seca en papel filtro) en el medio de cultivo agar dextrosa Sabuoraud. Al utilizarse las técnicas que incluyen disco de papel filtro (gota fresca y gota seca en papel filtro) no se observó halo inhibitorio en ningún extracto supercrítico, a diferencia de los resultados obtenidos con la técnica de gota directa los cuales fueron ampliamente analizados.

Para el análisis de los resultados se realizaron pruebas de normalidad, de varianza y de comparación de medias por medio de la prueba de Fisher de los extractos supercríticos y así determinar si los resultados poseen significancia estadísticamente. Una vez definido el extracto supercrítico con mayor halo inhibitorio, se estudiaron con el control positivo para determinar si de igual manera si presentaban eficacia en relación al control positivo fluconazol (Hi Media ®).

Tabla 6.1

Media aritmética de los halos de inhibición según el método de difusión de los extractos supercríticos del orégano (*Lippia graveolens*), pericón (*Tagetes lucida*), ajo (*Allium sativum*), tomillo (*Thymus vulgaris*), apazote (*Dysphania ambrosioides*) frente a *Cándida albicans*.

Guatemala, junio – julio 2017

Extracto supercrítico	Gota Directa					Gota fresca con papel filtro					Gota seca con papel filtro				
	Concentraciones de extractos supercríticos en milímetros					Concentraciones de extractos supercríticos en milímetros					Concentraciones de extractos supercríticos en milímetros				
	100 %	50%	25%	Control* (+)	Control** (-)	100 %	50 %	25 %	Control* (+)	Control** (-)	100 %	50 %	25 %	Control* (+)	Control** (-)
Orégano	27.4	25.7	17.93	25.5	-	-	-	-	28.3	-	-	-	-	28.4	-
Pericón	17.33	19.3	20.47	287	-	-	-	-	28	-	-	-	-	29	-
Ajo	13.4	15.93	16.8	29	-	-	-	-	29.2	-	-	-	-	25.6	-
Tomillo	17.23	17.87	18.6	28.7	-	-	-	-	25.6	-	-	-	-	29	-
Apazote	17.17	17.7	18.43	29	-	-	-	-	26.9	-	-	-	-	28	-

*Control (+) = Fluconazol

**Control (-) = SSN

Tabla 6.2

Media aritmética, significancia y eficacia de los halos inhibitorios de los extractos supercríticos de orégano (*Lippia graveolens*), pericón (*Tagetes lucida*), ajo (*Allium sativum*), tomillo (*Thymus vulgaris*), apazote (*Dysphania ambrosioides*), encontrados en la técnica de gota directa con relación al control positivo.
Guatemala, Junio – julio de 2017.

Extracto supercrítico	Concentraciones de extracto supercrítico medidas en milímetros			Control positivo medido en milímetros	P valor para concentración al 100%	P valor para concentración al 50%	P valor para concentración al 25%	Eficacia	S/Ns
	100%	50%	25%						
Orégano	27.40	25.70	17.93	25.50	> 0.0001	> 0.0001	= 0.0001	E	S
Pericón	17.33	19.30	20.47	28.70	< 0.0001	< 0.0001	= 0.0001	-	Ns
Ajo	13.40	15.93	16.80	29.00	< 0.0001	< 0.0001	= 0.0001	-	Ns
Tomillo	17.23	17.87	18.60	28.70	< 0.0001	< 0.0001	= 0.0001	-	Ns
Apazote	17.17	17.70	18.43	29.00	< 0.0001	< 0.0001	= 0.0001	-	Ns

E= Eficacia.

S= Significativo

Ns= No significativo

7. DISCUSIÓN

En los últimos años se ha observado un aumento de enfermedades por *Cándida albicans* sobre todo en pacientes inmunocomprometidos¹. Hoy en día, la medicina alternativa se encuentra en ascenso, ampliando sus bases científicas con estudios que evidencian sus propiedades y efectos hacia ciertos microorganismos.

Se han realizado múltiples estudios en diferentes países, con diferentes formas de procesamiento de las plantas medicinales. En México⁷, Ecuador¹², Colombia⁹ y Perú⁶ utilizaron extractos etanólicos o aceites esenciales e hicieron énfasis en el orégano, donde demostraron que tiene actividad antifúngica y que es directamente proporcional a la concentración del orégano utilizado.

La presente investigación se realizó con el fin de evidenciar la eficacia de los extractos supercríticos y respaldar las propiedades antifúngicas de manera *in vitro* frente a *Cándida albicans*.

Se relacionan las propiedades químicas de cada extracto supercrítico con los resultados obtenidos en el estudio. El orégano es rico en carvacrol y timol, dos sustancias altamente fungicidas; el pericón es rico en alcaloides cuaternarios, flavonoides (quercetagina, patuletina), saponinas, metabolitos que poseen acciones tóxicas que rompen la membrana de las células;^{19, 20} el ajo es rico en alicina y disulfuro de alilo, sustancias altamente volátiles, que poseen actividades que ayudan a prevenir infecciones contra hongos y levaduras;²⁰ el tomillo es rico en timol, carvacrol y linalol, la cual posee enzimas que degradan la membrana de las células ^{21,22} y el apazote es rico en peróxido terpénico, ascaridol, carburos terpénicos y saponinas, que son moléculas con actividad enzimática con peculiar efecto antifúngico. Se correlacionan los resultados obtenidos con el extracto de orégano y sus propiedades químicas, ya que por ser una molécula de pequeño tamaño, difunde con facilidad en el medio de cultivo, propagando de mejor manera sus metabolitos y sustancias.¹⁸

Surgió mayor actividad antifúngica (halo inhibitorio) en las concentraciones 100% y 50% del extracto de orégano, también se evidenció que fue el extracto de orégano en su concentración al 100%, el único extracto supercrítico con eficacia para la inhibición *in vitro* de *Cándida albicans* con respecto al control positivo.

Este estudio fue elaborado por medio de una réplica del método de Bauer Kirby adaptado a tres técnicas de difusión distintas (técnica de gota directa, gota fresca en papel filtro, y gota seca en papel filtro) en el medio agar dextrosa Sabouraud.

Se observó que con las técnicas en las que se utilizó papel filtro no hubo halo inhibitorio, todo lo contrario sucedió con la técnica de gota directa con la cual todos los extractos supercríticos presentaron actividad antifúngica (halos inhibitorios), cumpliendo así al primero objetivo planteado. Se infirió que probablemente el material del papel filtro no cumplió con las características que permitieran la difusión del extracto y así resaltar sus propiedades antifúngicas por lo que no mostraron halos inhibitorios.

Al efectuar la técnica de gota seca, se colocó una gota del extracto supercrítico en el papel filtro dejándolo reposar por 24 horas a 37°C en horno incubadora, no se descarta la posibilidad de desnaturalización o evaporación de los extractos supercríticos por la temperatura a la que fueron sometidos.

Al realizar la técnica con gota fresca en papel filtro, se colocó una gota del extracto supercrítico en papel filtro, se esperó por 20 minutos y luego se colocó en el medio agar dextrosa Sabouraud con *Cándida albicans* previamente inoculado, a las 24 horas se reevaluó y no se observó halo inhibitorio, por lo que se considera que el papel filtro no permitió difundir el extracto natural en el medio inoculado.

Al momento de evaluar el peso de la gota del extracto supercrítico, se esperaba que hubiera mayor peso en el papel filtro con gota impregnada, ya que teóricamente el papel filtro debe retener los metabolitos de los extractos naturales y con lo cual tener mayor peso, pero, en ningún caso se observó lo esperado. De hecho, el papel filtro con el extracto supercrítico impregnado peso menos que solo el papel filtro (ver anexo 10). Por lo que se descartó que el papel filtro fuera el idóneo para este método ya que absorbe el extracto y no permite su difusión en el medio inoculado.

El análisis fue realizado únicamente con los resultados obtenidos con la técnica de gota directa. Se analizaron los extractos supercríticos en tres concentraciones (100%, 50% y 25%), todos los datos presentaron normalidad de distribución según la fórmula de Shapiro Wilks. Se procedió a realizar análisis de varianza con el fin de determinar cuál extracto supercrítico presentó mayor eficacia y significancia, cumpliendo así con el último objetivo planteado.

Entre las debilidades presentes en la investigación se encuentran que no se obtuvo halos inhibitorios con las técnicas que involucran el uso de papel filtro, ya sea por influencia de la temperatura o por características del papel filtro. También una tendencia importante que se observó al evaluar los datos, es, que a menor concentración de los extractos supercríticos, mayor halo de inhibitorio; relacionamos este fenómeno a la intervención del etanol, no teniendo bases científicas ni estudios que respalden este fenómeno queda la propuesta para la realización de más investigaciones que involucren el etanol y otros disolventes para corroborar si existe o no influencia de los disolventes en la acción inhibitoria de los extractos.

Entre las fortalezas de la investigación se encuentran que todos los extractos supercríticos presentaron halos inhibitorios con la técnica de gota directa y que se obtuvo la mayor actividad antifúngica (halo inhibitorio) en las concentraciones 100% y 50% del extracto supercrítico de orégano y se le atribuye al extracto de orégano en su concentración al 100% como el único extracto eficaz con respecto al control positivo (fluconazol).

8. CONCLUSIONES

- 8.1 Todos los extractos supercríticos presentan actividad antifúngica (halo inhibitorio) con la técnica de gota directa.
- 8.2 Surgió mayor actividad antifúngica (halo inhibitorio) en el orégano en su concentración al 100%, pericón en su concentración al 25%, ajo en su concentración al 25%, tomillo en su concentración al 25% y apazote en su concentración al 25%.
- 8.3 De los cinco extractos supercríticos, el extracto de orégano presenta eficacia en sus concentraciones 100% y 50%.
- 8.4 Se evidencio una diferencia de medias estadísticamente significativa en el extracto de orégano en su concentración al 100%.

9. RECOMENDACIONES

9.1 A la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala:

- Se debe de continuar estudiando las propiedades antifúngicas del orégano (*Lippia graveolens*), para determinar cuál o cuáles de sus metabolitos son los que presentan actividad antifúngica.
- Se exhorta a continuar con estudios experimentales con el extracto supercrítico de orégano (*Lippia graveolens*), sobre otras especies de hongos, así como a distintas concentraciones.

9.2 Al Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social:

- Agregar a las Guías de Atención Primaria en Salud, tratamientos con medicina alternativa de origen natural basándose en evidencia científica, tal como la presentada en este estudio.

10. APORTES

Se pudo comprobar que los cinco extractos supercríticos estudiados presentan actividad antifúngica (halo inhibitorio) y que únicamente el extracto supercrítico de orégano en su concentración al 100% presenta eficacia en la inhibición *in vitro* de *Cándida albicans*, con lo cual se brinda un aporte al conocimiento de las propiedades de las plantas estudiadas. Así mismo la presente investigación forma parte de un informe detallado que contiene un método estandarizado para el cultivo de *Cándida albicans*, el cual quedará a disposición del Laboratorio Clínico del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala como material de apoyo para la elaboración de futuras investigaciones.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Biasoli M. Candidiasis [Blog en línea]. Argentina: Marisa Biasoli. Jun 2013 [citado 19 Abr 2017]. Disponible en: http://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/file.php/118/MATERIALES_2013/TEORICOS_2013/CANDIDIASIS_2013-1.pdf
- 2 Guatemala. Instituto Nacional de Estadística [en línea]. Guatemala: INE; 2015 [citado 24 Mayo 2017]; Caracterización República de Guatemala; [aprox. 37 pant.]. Disponible en: <https://www.ine.gob.gt/sistema/uploads/2014/02/26/L5pNHMXzy5FFWmk9NHCrK9x7E5Qqvvy.pdf>
- 3 Cano López JO. Susceptibilidad bacteriana in vitro a extractos de vegetales utilizados popularmente en el tratamiento de infecciones gastrointestinales: utilización de veinticinco extractos vegetales y determinación de su actividad in vitro contra los entero patógenos gram negativo más frecuentes implicados en el proceso diarreico [tesis Médico y Cirujano]. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Médicas; 1985.
- 4 World Health Organization. Quality control methods for medicinal plant materials. Ginebra: WHO; 1998.
- 5 Cruz S M. Medicina tradicional y fitoterapia una alternativa para el mejoramiento de la salud en Guatemala. Ciencia Tecnología y Salud [en línea]. 2016 [citado 24 Abr 2017]; 3 (1): 81-90. Disponible en: <file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/99-940-2-PB.pdf>
- 6 Loaiza Salguero ES. Extracción supercrítica con CO₂. [tesis Licenciado en Química]. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia; 1994.
- 7 Navarro García VM, González A, Fuentes M, Avilés M, Ríos MY, Zepeda G, et al. Antifungal activities of nine traditional Mexican medicinal plants. J Ethnopharmacol. [en línea]. 2003 [citado 24 Mayo 2017]; 87 (1): 85-88. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12787958>

- 8 Huamani Achata ME, Ruiz Quiroz JR, Determinación de la actividad antifúngica contra *Cándida Albicans* y *Apergillus Niger* de 10 plantas medicinales de 3 departamentos del Perú. [tesis Químico Farmacéutico en línea]. Lima-Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica; 2005. [citado 24 Mayo 2017]. Disponible en: http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/1278/1/Huamani_am.pdf
- 9 Londoño Orozco A, Pérez Carrillo JG, García Tovar CG, Carrillo M, Quintero More ML, García Vásquez SE, et al. Estudio de la actividad antifúngica de un extracto de propóleo de la abeja *Apis mellifera* proveniente del estado de México. Tecnología en Marcha [en línea]. 2008 [citado 5 Abr 2017]; 21 (1): 49-55. Disponible. file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/DialnetEstudioDeLaActividadAntifungicaDeUnExtractoDePropo-4835689.pdf
- 10 Martínez S, Mollinedo P, Mamani O, Almanza G, Terrazas E. Estudio in vitro de la actividad antifúngica de extractos vegetales del género *Baccharis* sobre *Cándida albicans*: Estudio experimental descriptivo. Revista Boliviana de Química [en línea]. 2011 [citado 5 Abr 2017]; 28 (1): 35-40. Disponible en: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S025054602011000100006
- 11 Rath G, Potterat O, Mavi S, Hostettamann K. Xanthones from *Hypericum roeperanum*. Phytochemistry [en línea]. 1996 [citado 24 Mayo 2017]; 43 (2): 513-520. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8862040>
- 12 Tangarife Castaño V, Correa Royero J, Zapata Londoño B, Duran C, Stanshenko E, Mesa Arango AC. Actividad contra *Cándida albicans*, citotoxicidad e interacción con antifúngicos de aceites esenciales y extractos de plantas medicinales y aromáticas. Infectio [en línea]. 2011 [citado 5 Abr 2017]; 15 (3): 160-167. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S012393922011000300004
- 13 Tchakam PD, Lunga PK, Kowa TK, Lonfouo AH, Wabo HK, Tapondjou LA, et al. Antimicrobial and antioxidant activities of the extracts and compounds from the leaves of *Psorospermum aurantiacum* Engl. and *Hypericum lanceolatum* Lam. BMC Complement Altern Med [en línea]. 2012 [citado 13 Mayo 2017]; 12(136): [aprox. 10 pant.]. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1186/1472-6882-12-136>

- 14 Ruiz Quiroz JR. Actividad antifúngica *in vitro* y concentración mínima inhibitoria mediante microdilución de ocho plantas medicinales [tesis de Maestría en línea]. Lima-Perú: Universidad Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Postgrado; 2013. [citado 11 Mayo 2017]. Disponible en: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/5653>
- 15 Chamba Pascal LM. "Efecto antifúngico del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano) y *Cymbopogon citratus* (hierba Luisa), sobre cepas de *Cándida albicans* en comparación con la nistatina estudio *in vitro*". [tesis Odontólogo en línea]. Quito: Universidad Central del Ecuador, Facultad de Odontología; 2015. [citado 11 Mayo 2017]. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec:8080/bitstream/25000/3538/1/T-UCE-0015-93.pdf>
- 16 Barrascout López WM. Inhibición de *Gardnerella vaginalis* y seis especies de *Cándida* por extractos de plantas utilizadas para el tratamiento de infecciones vaginales. [tesis Químico Farmacéutico]. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia; 2009.
- 17 Enrich M. Historia de las plantas medicinales [Blog en línea]. Texas: Miles Enrich. Feb 2017 [citado 15 Abr 2017]. Disponible en: <http://www.botanical-online.com/medicinalesprincipioshistoria.htm>
- 18 Hernández M. Teoría miasmática [Blog en línea]. California: Miles Hernández. Sep 2010 [citado 9 Abr 2017]. Disponible en: <https://experimentemos.wordpress.com/2010/12/11/teoria-miasmatica/>
- 19 Astacio S. Teoría microbiana de la enfermedad [Blog en línea]. República Dominicana: Stefania Astacio. Feb 2011 [citado 9 Abr 2017]. Disponible en: <http://medicgeneral.blogspot.com/2011/12/la-teoria-microbiana-de-la-enfermedad.html>
- 20 Ruiz Quiroz JR. Actividad Antifúngica *in vitro* y concentración mínima inhibitoria mediante microdilución de ocho plantas medicinales [tesis de Maestría en línea]. Lima-Perú; Universidad Mayor de San Marcos; Facultad de Farmacia y Bioquímica Unidad de Postgrado; 2013. [citado 9 Abr 2017]. Disponible en: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/2590>.
- 21 Bermúdez A, Oliveira Miranda M A, Velázquez, D. La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: Una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. *Revista de Ciencia y Tecnología de América* [en línea]. 2005. [citado 9 Abr 2017]; 30 (8): 453-459. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/339/33910703.pdf>

- 22 Cáceres A. Plantas de uso medicinal en Guatemala. Guatemala: Editorial Universitaria; 1996.
- 23 Cáceres A. Vademecum nacional de plantas medicinales. Guatemala: Editorial Universitaria; 2003.
- 24 Flores R. Atlas de plantas medicinales y curativas. 5 ed. Madrid: Cultura; 1998.
- 25 Canel Monterroso L Y. Actividad antibacteriana de plantas de uso medicinal en Guatemala. [Tesis Química Bióloga en línea]. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia; 2011. [citado 5 Abr 2017] Disponible en: http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_3225.pdf
- 26 Cáceres A, Samayoa B, Fletes L. Actividad antibacteriana de plantas usadas en Guatemala para el tratamiento de infecciones [en línea]. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación; 1991. [citado 5 Abr 2017]. Disponible en: http://biblioteca.usac.edu.gt/folleto/USAC/digi/USAC_F_569.pdf
- 27 Álvarez González LJ. Extracción de metabolitos solubles en dióxido de carbono en condiciones supercríticas a partir de hojas deshidratadas de espinaca (Spinacea oleracea). [tesis Ingeniería Química en línea]. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de ingeniería; 2011. [citado 5 Abr 2017]. Disponible en: http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/08/08_1185_Q.pdf
- 28 International Centre for Science and High Technology. Extraction technologies for medicinal and aromatic plants [en línea]. Trieste: ICS-UNIDO; 2008. [citado 13 Jun 2017]. Disponible en: file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/Extraction_technologies_for_medicinal_and_aromatic_plants.pdf
- 29 Jorgensen J H, Turnidge J D. Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods. En: Manual of clinical microbiology [en línea]. Washington D.C.: ASM; 2007 [citado 13 Jun 2017]; p. 1152–1172.
- 30 Rico Martínez GA. Actividad antimicrobiana de cinco plantas de la familia Compositae nativas de Guatemala [tesis Químico Biólogo]. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia; 1997.
- 31 Murray PR, Rosenthal KN, Pfaller MA. Microbiología médica. 6 ed. Barcelona: Elsevier; 2009. Capítulo 6. Micosis oportunistas; p. 751-761.

- 32 Shuttleworth M. Explorable [Blog en línea]. California: Martyn Shuttleworth. Jun 2010 [citado 27 Apr 2017] Disponible en: <https://explorable.com/es/grupo-de-control-cientifico>.
- 33 Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 12ª ed. California: McGrawHill; 2012.
- 34 González M A, Lopera W D, Arango Á. Fundamentos de medicina: manual de terapéutica. 16ª ed. Medellín: CIB; 2014.
- 35 Gata M. Sueroterapia en urgencias. España: Gerencia del Área de Salud de Badajoz; 2012. [citado 15 Abr 2017]. Disponible en: <https://es.scribd.com/mobile/doc/191476533/sueroterapia-urgencias>
- 36 García Q. Microbiología [Blog en línea]. México: Quistián García. Oct 2014. [citado 15 Abr 2017]. Disponible en: <http://microbiologia3bequipo5.blogspot.com/2014/10/halos-de-inhibicion.html>
- 37 De La Rosa D. Laboratorio de Química [Blog en línea]. México: Doris De La Rosa. Feb 2017. [citado 10 Jun 2017]. Disponible en: <http://laboratorio-quimico.blogspot.com/2009/04/caja-petri.html>
- 38 Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Médicas, Centro de Investigaciones Biomédicas. Guatemala: USAC. FCCM, CIB. 2017.
- 39 Guatemala. Congreso de la República de Guatemala. Código de salud. Guatemala: El Congreso; 1997.
- 40 Colegio de Médicos y Cirujanos de Guatemala. Código deontológico. Guatemala: El Colegio; 2008.
- 41 Guerra López C A, Robles Gonzales L G. "Actividad antibacteriana de los extractos supercríticos del ajo (*Allium sativum* L), chichipin (*Hamelia patens* Jacq), orégano (*Lippia graveolens* Kunth) y té de limón (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf) sobre el crecimiento *in vitro* de *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aureginosa*". [tesis Médico y Cirujano]. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Médicas; 2014.

12. ANEXOS



UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
UNIDAD DE TRABAJOS DE GRADUACIÓN



Anexo 1

Técnica gota directa

“Eficacia *in vitro* de extractos supercríticos del orégano (*Lippia graveolens*), pericón (*Tagetes lucida*), ajo (*Allium sativum*), tomillo (*Thymus vulgaris*), apazote (*Dysphania ambrosioides*) a *Cándida albicans*”, Guatemala, Junio – julio 2017

Repetición No 1

Extracto supercrítico	Dimensional	Concentración de extracto supercrítico						Control positivo fluconazol		Control negativo	
		100%		50%		25%					
Ajo	Halo inhibitorio	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
	Unidad en milímetro	13.1 mm		16.11 mm		17 mm		29 mm		0 mm	
	Porcentaje de inhibición	45.17%		55.55%		58.62%		100%		0%	
Orégano	Halo Inhibitorio	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
	Unidad en milímetro	27.3 mm		26.7 mm		17.3 mm		25.5 mm		0 mm	
	Porcentaje de inhibición	107.06 %		104.71%		67.84%		100%		0%	
Apazote	Halo Inhibitorio	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
	Unidad en milímetro	17.8 mm		17.9 mm		18 mm		29 mm		0 mm	
	Porcentaje de inhibición	61.38%		61.72%		62.07%		100%		0%	
Tomillo	Halo Inhibitorio	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
	Unidad en milímetro	17 mm		17.7 mm		18.2 mm		28.7 mm		0 mm	
	Porcentaje de inhibición	59.23%		61.67%		63.41%		100%		0%	
Pericón	Halo Inhibitorio	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
	Unidad en milímetro	17.3 mm		19 mm		20 mm		28.7 mm		0 mm	
	Porcentaje de inhibición	60.27%		66.20%		69.60%		100%		0%	

Anexo 2

Técnica gota directa

“Eficacia *in vitro* de extractos supercríticos del orégano (*Lippia graveolens*), pericón (*Tagetes lucida*), ajo (*Allium sativum*), tomillo (*Thymus vulgaris*), apazote (*Dysphania ambrosioides*) a *Cándida albicans*”. Guatemala, Junio – julio 2017

Repetición No 2

Extracto supercrítico	Dimensional	Concentración de extracto supercrítico						Control positivo fluconazol		Control negativo	
		100%		50%		25%					
Ajo	Halo Inhibitorio	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
	Unidad en milímetro	13 mm		16.5 mm		17.4 mm		29 mm		0 mm	
	Porcentaje de inhibición	44.83%		56.90%		60.00%		100%		0%	
Orégano	Halo Inhibitorio	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
	Unidad en milímetro	27.0 mm		25.7 mm		17.90 mm		25.5 mm		0 mm	
	Porcentaje de inhibición	106%		100.78%		70.20%		100%		0%	
Apazote	Halo Inhibitorio	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
	Unidad en milímetro	17.3 mm		17.4 mm		18.70 mm		29 mm		0 mm	
	Porcentaje de inhibición	59.65%		60.00%		64.48%		100%		0%	
Tomillo	Halo Inhibitorio	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
	Unidad en milímetro	16.8 mm		17.90 mm		18.9 mm		28.7 mm		0 mm	
	Porcentaje de inhibición	58.54%		62.37%		65.85%		100%		0%	
Pericón	Halo Inhibitorio	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
	Unidad en milímetro	17.39 mm		19.9 mm		20.5 mm		28.7 mm		0 mm	
	Porcentaje de inhibición	60.59%		69.33%		71.42%		100%		0%	

Anexo 3
Técnica gota directa

“Eficacia *in vitro* de extractos supercríticos del orégano (*Lippia graveolens*), pericón (*Tagetes lucida*), ajo (*Allium sativum*), tomillo (*Thymus vulgaris*), apazote (*Dysphania ambrosioides*) a *Cándida albicans*”. Guatemala, Junio – julio 2017

Repetición No 3

Extracto supercrítico	Dimensional	Concentración de extracto supercrítico						Control positivo fluconazol		Control negativo	
		100%		50%		25%					
Ajo	Halo Inhibitorio	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
	Unidad en milímetro	14.1 mm		15.18 mm		16 mm		29 mm		0 mm	
	Porcentaje de inhibición	48.62%		52.34%		55.17%		100%		0%	
Orégano	Halo Inhibitorio	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
	Unidad en milímetro	27.9 mm		24.7 mm		18.6 mm		25.5 mm		0 mm	
	Porcentaje de inhibición	109.41%		96.89%		72.94%		100%		0%	
Apazote	Halo Inhibitorio	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
	Unidad en milímetro	16.4 mm		17.8 mm		18.6 mm		29 mm		0 mm	
	Porcentaje de inhibición	56.55%		61.38%		61.14%		100%		0%	
Tomillo	Halo Inhibitorio	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
	Unidad en milímetro	17.9 mm		18.0 mm		18.7 mm		28.7 mm		0 mm	
	Porcentaje de inhibición	62.37%		62.72%		65.16%		100%		0%	
Pericón	Halo Inhibitorio	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
	Unidad en milímetro	17.3 mm		19 mm		20.90 mm		28.7 mm		0 mm	
	Porcentaje de inhibición	60.27%		66.20%		72.82%		100%		0%	

Anexo 4
Técnica gota fresca en papel filtro

“Eficacia *in vitro* de extractos supercríticos del orégano (*Lippia graveolens*), pericón (*Tagetes lucida*), ajo (*Allium sativum*), tomillo (*Thymus vulgaris*), apazote (*Dysphania ambrosioides*) a *Cándida albicans*”. Guatemala, Junio – julio 2017

Repetición No 1

Extracto supercrítico	Dimensional	Concentración de extracto supercrítico						Control positivo fluconazol		Control negativo	
		100%		50%		25%					
Ajo	Halo inhibitorio	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
	Unidad en milímetro	0 mm		0 mm		0 mm		29.2 mm		0 mm	
	Porcentaje de inhibición	0%		0%		0%		100%		0%	
Orégano	Halo inhibitorio	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
	Unidad en milímetro	0 mm		0 mm		0 mm		28.3 mm		0 mm	
	Porcentaje de inhibición	0%		0%		0%		100%		0%	
Apazote	Halo Inhibitorio	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
	Unidad en milímetro	0 mm		0 mm		0 mm		26.9 mm		0 mm	
	Porcentaje de inhibición	0%		0%		0%		100%		0%	
Tomillo	Halo Inhibitorio	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
	Unidad en milímetro	0 mm		0 mm		0 mm		25.6 mm		0 mm	
	Porcentaje de inhibición	0%		0%		0%		100%		0%	
Pericón	Halo Inhibitorio	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
	Unidad en milímetro	0 mm		0 mm		0 mm		28 mm		0 mm	
	Porcentaje de inhibición	0%		0%		0%		100%		0%	

Anexo 5

Técnica 2. Gota fresca en papel filtro

“Eficacia *in vitro* de extractos supercríticos del orégano (*Lippia graveolens*), pericón (*Tagetes lucida*), ajo (*Allium sativum*), tomillo (*Thymus vulgaris*), apazote (*Dysphania ambrosioides* a *Cándida albicans*)”. Guatemala, Junio – julio 2017

Repetición No 2

Extracto supercrítico	Dimensional	Concentración de extracto supercrítico						Control positivo fluconazol		Control negativo	
		100%		50%		25%					
Ajo	Halo Inhibitorio	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
	Unidad en milímetro	0 mm		0 mm		0 mm		29.2 mm		0 mm	
	Porcentaje de inhibición	0%		0%		0%		100%		0%	
Orégano	Halo Inhibitorio	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
	Unidad en milímetro	0 mm		0 mm		0 mm		28.3 mm		0 mm	
	Porcentaje de inhibición	0%		0%		0%		100%		0%	
Apazote	Halo Inhibitorio	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
	Unidad en milímetro	0 mm		0 mm		0 mm		26.9 mm		0 mm	
	Porcentaje de inhibición	0%		0%		0%		100%		0%	
Tomillo	Halo Inhibitorio	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
	Unidad en milímetro	0 mm		0 mm		0 mm		25.6 mm		0 mm	
	Porcentaje de inhibición	0%		0%		0%		100%		0%	
Pericón	Halo Inhibitorio	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
	Unidad en milímetro	0 mm		0 mm		0 mm		28 mm		0 mm	
	Porcentaje de inhibición	0%		0%		0%		100%		0%	

Anexo 6
Técnica 2. Gota fresca en papel filtro

“Eficacia *in vitro* de extractos supercríticos del orégano (*Lippia graveolens*), pericón (*Tagetes lucida*), ajo (*Allium sativum*), tomillo (*Thymus vulgaris*), apazote (*Dysphania ambrosioides*) a *Cándida albicans*”. Guatemala, Junio – julio 2017

Repetición No 3

Extracto supercrítico	Dimensional	Concentración de extracto supercrítico						Control positivo fluconazol		Control negativo	
		100%		50%		25%					
Ajo	Halo Inhibitorio	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
	Unidad en milímetro	0 mm		0 mm		0 mm		29.2 mm		0 mm	
	Porcentaje de inhibición	0%		0%		0%		100%		0%	
Orégano	Halo Inhibitorio	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
	Unidad en milímetro	0 mm		0 mm		0 mm		28.3 mm		0 mm	
	Porcentaje de inhibición	0%		0%		0%		100%		0%	
Apazote	Halo Inhibitorio	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
	Unidad en milímetro	0 mm		0 mm		0 mm		26.9 mm		0 mm	
	Porcentaje de inhibición	0%		0%		0%		100%		0%	
Tomillo	Halo Inhibitorio	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
	Unidad en milímetro	0 mm		0 mm		0 mm		25.6 mm		0 mm	
	Porcentaje de inhibición	0%		0%		0%		100%		0%	
Pericón	Halo Inhibitorio	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
	Unidad en milímetro	0 mm		0 mm		0 mm		28 mm		0 mm	
	Porcentaje de inhibición	0%		0%		0%		100%		0%	

Anexo 7

Técnica 3. Gota seca en papel filtro

“Eficacia *in vitro* de extractos supercríticos del orégano (*Lippia graveolens*), pericón (*Tagetes lucida*), ajo (*Allium sativum*), tomillo (*Thymus vulgaris*), apazote (*Dysphania ambrosioides*) a *Cándida albicans*”. Guatemala, Junio – julio 2017

Repetición No 1

Extracto supercrítico	Dimensional	Concentración de extracto supercrítico						Control positivo fluconazol		Control negativo	
		100%		50%		25%					
Ajo	Halo Inhibitorio	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
	Unidad en milímetro	0 mm		0 mm		0 mm		25.6 mm		0 mm	
	Porcentaje de inhibición	0%		0%		0%		100%		0%	
Orégano	Halo Inhibitorio	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
	Unidad en milímetro	0 mm		0 mm		0 mm		28.4 mm		0 mm	
	Porcentaje de inhibición	0%		0%		0%		100%		0%	
Apazote	Halo Inhibitorio	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
	Unidad en milímetro	0 mm		0 mm		0 mm		28 mm		0 mm	
	Porcentaje de inhibición	0%		0%		0%		100%		0%	
Tomillo	Halo Inhibitorio	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
	Unidad en milímetro	0 mm		0 mm		0 mm		29 mm		0 mm	
	Porcentaje de inhibición	0%		0%		0%		100%		0%	
Pericón	Halo Inhibitorio	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
	Unidad en milímetro	0 mm		0 mm		0 mm		29 mm		0 mm	
	Porcentaje de inhibición	0%		0%		0%		100%		0%	

Anexo 8

Técnica 3. Gota seca en papel filtro

“Eficacia *in vitro* de extractos supercríticos del orégano (*Lippia graveolens*), pericón (*Tagetes lucida*), ajo (*Allium sativum*), tomillo (*Thymus vulgaris*), apazote (*Dysphania ambrosioides*) a *Cándida albicans*”. Guatemala, Junio – julio 2017

Repetición No 2

Extracto supercrítico	Dimensional	Concentración de extracto supercrítico						Control positivo fluconazol		Control negativo	
		100%		50%		25%					
Ajo	Halo Inhibitorio	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
	Unidad en milímetro	0 mm		0 mm		0 mm		25.6 mm		0 mm	
	Porcentaje de inhibición	0%		0%		0%		100%		0%	
Orégano	Halo Inhibitorio	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
	Unidad en milímetro	0 mm		0 mm		0 mm		28.4 mm		0 mm	
	Porcentaje de inhibición	0%		0%		0%		100%		0%	
Apazote	Halo Inhibitorio	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
	Unidad en milímetro	0 mm		0 mm		0 mm		28 mm		0 mm	
	Porcentaje de inhibición	0%		0%		0%		100%		0%	
Tomillo	Halo Inhibitorio	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
	Unidad en milímetro	0 mm		0 mm		0 mm		29 mm		0 mm	
	Porcentaje de inhibición	0%		0%		0%		100%		0%	
Pericón	Halo Inhibitorio	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
	Unidad en milímetro	0 mm		0 mm		0 mm		29 mm		0 mm	
	Porcentaje de inhibición	0%		0%		0%		100%		0%	

Anexo 9
Técnica 3. Gota seca en papel filtro

“Eficacia *in vitro* de extractos supercríticos del orégano (*Lippia graveolens*), pericón (*Tagetes lucida*), ajo (*Allium sativum*), tomillo (*Thymus vulgaris*), apazote (*Dysphania ambrosioides*) a *Cándida albicans*”. Guatemala, Junio – julio 2017

Repetición No 3

Extracto supercrítico	Dimensional	Concentración de extracto supercrítico						Control positivo fluconazol		Control negativo	
		100%		50%		25%					
Ajo	Halo Inhibitorio	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
	Unidad en milímetro	0 mm		0 mm		0 mm		25.6 mm		0 mm	
	Porcentaje de inhibición	0%		0%		0%		100%		0%	
Orégano	Halo Inhibitorio	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
	Unidad en milímetro	0 mm		0 mm		0 mm		28.4 mm		0 mm	
	Porcentaje de inhibición	0%		0%		0%		100%		0%	
Apazote	Halo Inhibitorio	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
	Unidad en milímetro	0 mm		0 mm		0 mm		28 mm		0 mm	
	Porcentaje de inhibición	0%		0%		0%		100%		0%	
Tomillo	Halo Inhibitorio	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
	Unidad en milímetro	0 mm		0 mm		0 mm		29 mm		0 mm	
	Porcentaje de inhibición	0%		0%		0%		100%		0%	
Pericón	Halo Inhibitorio	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
	Unidad en milímetro	0 mm		0 mm		0 mm		29 mm		0 mm	
	Porcentaje de inhibición	0%		0%		0%		100%		0%	

Anexo 10

Cuantificación de gota del extracto supercrítico

	Orégano			Pericón			Ajo			Tomillo			Apazote				SSF
	100%	50%	25%	100%	50%	25%	100%	50%	25%	100%	50%	25%	100%	50%	25%	25%	
Papel filtro	0.0022	0.0022	0.0021	0.0021	0.0021	0.0026	0.0024	0.0025	0.002	0.0024	0.0022	0.0022	0.0025	0.0022	0.002	0.002	0.0023
Papel filtro + gota fresca	0.0132	0.0152	0.0161	0.0201	0.0161	0.0154	0.0134	0.015	0.0145	0.018	0.0138	0.0134	0.0135	0.0145	0.014	0.014	0.0183
Papel filtro + gota seca	0.002	0.002	0.0015	0.002	0.0017	0.0025	0.002	0.0018	0.0018	0.002	0.002	0.0021	0.0019	0.002	0.0019	0.0019	0.021
Gota fresca	0.011	0.013	0.014	0.018	0.014	0.0128	0.011	0.0125	0.0125	0.0156	0.0116	0.0112	0.011	0.0123	0.012	0.012	0.016
Gota seca	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Porcentaje de sólidos en papel filtro	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Peso en gramos

Anexo 11

Media aritmética de los halos inhibitorios del orégano (*Lippia graveolens*), pericón (*Tagetes lucida*), ajo (*Allium sativum*), tomillo (*Thymus vulgaris*), apazote (*Dysphania ambrosioides*), por la técnica gota directa en relación al control positivo.

Guatemala, Junio – julio de 2017.

Extracto supercrítico	Concentraciones de extracto supercrítico medidas en milímetros			Control positivo medido en milímetros	Control negativo medido en milímetros
	100%	50%	25%		
Orégano	27.40	25.70	17.93	25.50	0.00
Pericón	17.33	19.30	20.47	28.70	0.00
Ajo	13.40	15.93	16.80	29.00	0.00
Tomillo	17.23	17.87	18.60	28.70	0.00
Apazote	17.17	17.70	18.43	29.00	0.00
Shapiro Wilk	0.1223	0.1978	0.8387	-	-
Anova P Valor	<0.0001	<0.0001	0.0001	-	-

Anexo 12

Prueba de normalidad de los halos inhibitorios del orégano (*Lippia graveolens*), pericón (*Tagetes lucida*), ajo (*Allium sativum*), tomillo (*Thymus vulgaris*), apazote (*Dysphania ambrosioides*), por la técnica gota directa en relación al control positivo.

Guatemala, Junio – julio de 2017

Shapiro-Wilks				
Variable	n	D.E.	W*	P valor
Concentración al 100%	5	5.24	0.81	0.1223
Concentración al 50%	5	3.77	0.84	0.1978
Concentración al 25%	5	1.33	0.96	0.8387

Anexo 13

Análisis de varianza de los halos inhibitorio de las concentraciones al 100% del orégano (Lippia graveolens), pericón (Tagetes lucida), ajo (Allium sativum), tomillo (Thymus vulgaris), apazote (Dysphania ambrosioides), por la técnica gota directa en relación al control positivo. Guatemala, Junio – julio de 2017

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
Halos	15	0.99	0.99	2.89	
F.V.	SC	GI	CM	F	p-valor
Modelo.	329.91	4	82.48	288.51	<0.0001
Concentración al 100%	329.91	4	82.48	288.51	<0.0001
Error	2.86	10	0.29		
Total	332.77	14			

Anexo 14

Análisis de varianza de los halos inhibitorios de las concentraciones al 50% del orégano (Lippia graveolens), pericón (Tagetes lucida), ajo (Allium sativum), tomillo (Thymus vulgaris), apazote (Dysphania ambrosioides), por la técnica gota directa en relación al control positivo. Guatemala, Junio – julio de 2017

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
Halos	15	0.98	0.97	3.13	
F.V.	SC	GI	CM	F	p-valor
Modelo.	170.79	4	42.7	117.1	<0.0001
Concentración al 50%	170.79	4	42.7	117.1	<0.0001
Error	3.65	10	0.36		
Total	174.44	14			

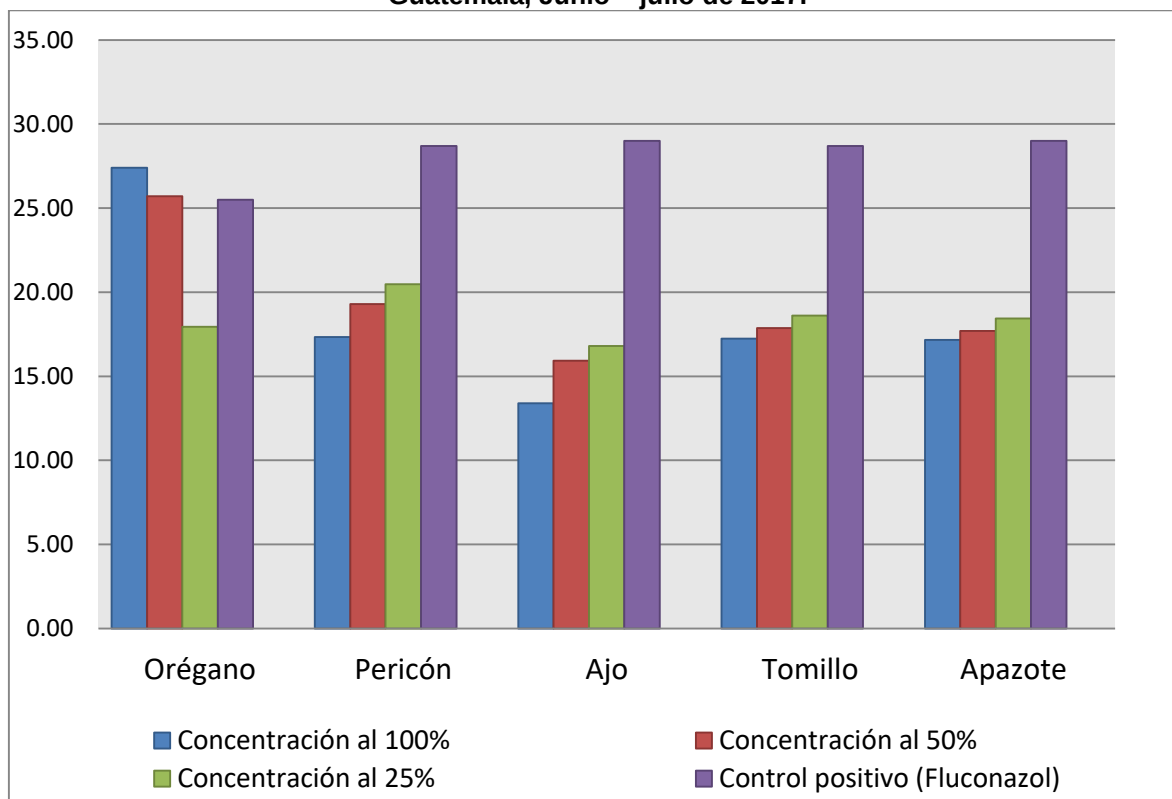
Anexo 15

Análisis de varianza de los halos inhibitorios de las concentración al 25% del orégano (*Lippia graveolens*), pericón (*Tagetes lucida*), ajo (*Allium sativum*), tomillo (*Thymus vulgaris*), apazote (*Dysphania ambrosioides*), por la técnica gota directa en relación al control positivo. Guatemala, Junio – julio de 2017

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
Halos	15	0.88	0.83	2.89	
F.V.	SC	GI	CM	F	p-valor
Modelo.	21.24	4	5.31	18.69	0.0001
Concentración al 25%	21.24	4	5.31	18.69	0.0001
Error	2.84	10	0.28		
Total	24.08	14			

Anexo 16

Media de los halos inhibitorios de los extractos supercríticos del orégano (*Lippia graveolens*), pericón (*Tagetes lucida*), ajo (*Allium sativum*), tomillo (*Thymus vulgaris*), apazote (*Dysphania ambrosioides*), por la técnica gota directa en relación al control positivo. Guatemala, Junio – julio de 2017.



Anexo 17

Prueba de Fisher de los extractos supercríticos con concentración al 100% del orégano (*Lippia graveolens*), pericón (*Tagetes lucida*), ajo (*Allium sativum*), tomillo (*Thymus vulgaris*), apazote (*Dysphania ambrosioides*), por la técnica gota directa en relación al control positivo. Guatemala, Junio – julio de 2017

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.97271						
Error: 0.2859 gl: 10						
Tra100%	Medias	n	E.E.			
Ajo	13.4	3	0.31	A		
Apazote	17.17	3	0.31		B	
Tomillo	17.23	3	0.31		B	
Pericón	17.33	3	0.31		B	
Orégano	27.4	3	0.31			C
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)						

Anexo 18

Prueba de Fisher de los extractos supercríticos con concentración al 50% del orégano (*Lippia graveolens*), pericón (*Tagetes lucida*), ajo (*Allium sativum*), tomillo (*Thymus vulgaris*), apazote (*Dysphania ambrosioides*), por la técnica gota directa en relación al control positivo. Guatemala, Junio – julio de 2017

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=1.09858							
Error: 0.3646 gl: 10							
Tra50%	Medias	n	E.E.				
Ajo	15.93	3	0.35	A			
Apazote	17.7	3	0.35		B		
Tomillo	17.87	3	0.35		B		
Pericón	19.3	3	0.35			C	
Orégano	25.7	3	0.35				D
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)							

Anexo 19

Prueba de Fisher de los extractos supercríticos con concentración al 25% del orégano (*Lippia graveolens*), pericón (*Tagetes lucida*), ajo (*Allium sativum*), tomillo (*Thymus vulgaris*), apazote (*Dysphania ambrosioides*), por la técnica gota directa en relación al control positivo. Guatemala, Junio – julio de 2017

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.96952						
Error: 0.2840 gl: 10						
Tra25%	Medias	n	E.E.			
Ajo	16.8	3	0.31	A		
Orégano	17.93	3	0.31		B	
Apazote	18.43	3	0.31		B	
Tomillo	18.6	3	0.31		B	
Pericón	20.47	3	0.31			C
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)						

Anexo 20

Prueba de Fisher del extracto supercrítico de orégano con concentración al 100%, 50% y fluconazol.

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=1.26883					
Error: 0.4033 gl: 6					
Tratamiento	Medias	n	E.E.		
Fluconazol	25.5	3	0.37	A	
Orégano 50	25.7	3	0.37	A	
Orégano 100	27.4	3	0.37		B
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)					

Anexo 21

Media de porcentaje de efecto inhibitorio por concentración de los extractos supercríticos del orégano (*Lippia graveolens*), pericón (*Tagetes lucida*), ajo (*Allium sativum*), tomillo (*Thymus vulgaris*), apazote (*Dysphania ambrosioides*), por la técnica gota directa con relación al control positivo. Guatemala, junio – julio de 2017.

Extracto supercrítico	Porcentaje de efecto inhibitorio por concentraciones de extracto supercrítico			Control positivo
	100%	50%	25%	
Orégano	107.49%	100.79%	70.33%	100%
Pericón	60.38%	67.24%	71.31%	100%
Ajo	46.21%	54.93%	57.93%	100%
Tomillo	60.06%	62.25%	64.81%	100%
Apazote	59.19%	61.03%	62.56%	100%
Shapiro Wilk	0.0536	0.0682	0.6049	-
ANDEVA P Valor	<0.0001	<0.0001	<0.0001	-

Anexo 22

Prueba de normalidad de los porcentajes de inhibición del orégano (*Lippia graveolens*), pericón (*Tagetes lucida*), ajo (*Allium sativum*), tomillo (*Thymus vulgaris*), apazote (*Dysphania ambrosioides*) por la técnica gota directa en relación al control positivo (fluconazol). Guatemala, Junio – julio de 2017

Shapiro-Wilks					
Variable	n	Media	D.E.	W*	p
Concentración al 100%	5	0.67	0.24	0.78	0.0536
Concentración al 50%	5	0.69	0.18	0.79	0.0682
Concentración al 25%	5	0.65	0.06	0.92	0.6049

Anexo 23

Análisis de varianza de los porcentajes inhibitorios de los extractos supercríticos con concentración al 100% del orégano (*Lippia graveolens*), pericón (*Tagetes lucida*), ajo (*Allium sativum*), tomillo (*Thymus vulgaris*), apazote (*Dysphania ambrosioides*) por la técnica gota directa en relación al control positivo Guatemala, Junio – julio de 2017

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
Porcentaje	15	0.99	0.99	2.81	
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0.67	4	0.17	473.89	<0.0001
Concentración al 100%	0.67	4	0.17	473.89	<0.0001
Error	3.50E-03	10	3.50E-04		
Total	0.67	14			

Anexo 24

Análisis de varianza de los porcentajes inhibitorios de los extractos supercríticos con concentración al 50% del orégano (*Lippia graveolens*), pericón (*Tagetes lucida*), ajo (*Allium sativum*), tomillo (*Thymus vulgaris*), apazote (*Dysphania ambrosioides*) por la técnica gota directa en relación al control positivo Guatemala, Junio – julio de 2017

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
Porcentaje	15	0.99	0.98	3.24	
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0.4	4	0.1	197.13	<0.0001
Concentración al 50%	0.4	4	0.1	197.13	<0.0001
Error	0.01	10	5.00E-04		
Total	0.4	14			

Anexo 25

Análisis de varianza de los porcentajes inhibitorios de los extractos supercríticos con concentración al 25% del orégano (*Lippia graveolens*), pericón (*Tagetes lucida*), ajo (*Allium sativum*), tomillo (*Thymus vulgaris*), apazote (*Dysphania ambrosioides*) por la técnica gota directa en relación al control positivo Guatemala, Junio – julio de 2017

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
Porcentaje	15	0.9	0.87	3.04	
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0.04	4	0.01	23.47	<0.0001
Concentración al 25%	0.04	4	0.01	23.47	<0.0001
Error	3.90E-03	10	3.90E-04		
Total	0.04	14			

Anexo 26

Prueba de Fisher de los extractos supercríticos con concentración al 100% del orégano (*Lippia graveolens*), pericón (*Tagetes lucida*), ajo (*Allium sativum*), tomillo (*Thymus vulgaris*), apazote (*Dysphania ambrosioides*) por la técnica gota directa en relación al control positivo Guatemala, Junio – julio de 2017

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.03413						
Error: 0.0004 gl: 10						
Tra100	Medias	n	E.E.			
Ajo	0.46	3	0.01	A		
Apazote	0.59	3	0.01		B	
Tomillo	0.6	3	0.01		B	
Pericón	0.6	3	0.01		B	
Orégano	1.07	3	0.01			C
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)						

Anexo 27

Prueba de Fisher de los extractos supercríticos con concentración al 50% del orégano (*Lippia graveolens*), pericón (*Tagetes lucida*), ajo (*Allium sativum*), tomillo (*Thymus vulgaris*), apazote (*Dysphania ambrosioides*) por la técnica gota directa en relación al control positivo. Guatemala, Junio – julio de 2017

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.04078							
Error: 0.0005 gl: 10							
Tra50	Medias	N	E.E.				
Ajo	0.55	3	0.01	A			
Apazote	0.61	3	0.01		B		
Tomillo	0.62	3	0.01		B		
Pericón	0.67	3	0.01			C	
Orégano	1.01	3	0.01				D
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)							

Anexo 28

Prueba de Fisher de los extractos supercríticos con concentración al 25% del orégano (*Lippia graveolens*), pericón (*Tagetes lucida*), ajo (*Allium sativum*), tomillo (*Thymus vulgaris*), apazote (*Dysphania ambrosioides*), por la técnica gota directa en relación al control positivo. Guatemala, Junio – julio de 2017

Test: LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.03613						
Error: 0.0004 gl: 10						
Tra25	Medias	n	E.E.			
Ajo	0.58	3	0.01	A		
Apazote	0.63	3	0.01		B	
Tomillo	0.65	3	0.01		B	
Orégano	0.7	3	0.01			C
Pericón	0.71	3	0.01			C
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)						

Anexo 29

Guatemala, 17 de abril de 2017

A QUIEN INTERESE

Por este medio se hace constar que realicé la determinación taxonómica de 5 especies vegetales las cuales son objetivo de estudio de la tesis titulada “Eficacia *in vitro* de los extractos supercríticos del orégano (*Lippia graveolens*), pericón (*Tagetes lucida*), ajo (*Allium sativum*), tomillo (*Thymus vulgaris*), apazote (*Dysphania ambrosioides*) frente a *Cándida albicans*”. La cual está siendo realizada por los bachilleres Jennifer Mariela Azmitia Meng con número de DPI: 1599377792201 y Alex Vareci Mazariegos López con número de DPI: 2312983150101, para optar al título universitario de Medico y Cirujano en el grado académico de Licenciatura.

Se describen abajo los nombres comunes, los nombres científicos y la familia botánica a la que pertenecen las especies vegetales analizadas:

Ajo	<i>Allium sativum</i> L.	AMARYLLIDACEAE
Orégano	<i>Lippia graveolens</i> Kunth	VERBENACEAE
Apazote	<i>Dysphania ambrosioides</i> (L.) Mosyakin & Clemants	AMARANTHACEAE
Tomillo	<i>Thymus vulgaris</i> L.	LAMIACEAE
Pericón	<i>Tagetes Lucida</i> Cav.	ASTERACEAE

Sin más que hacer constar, se extiende la presente nota en el mismo lugar y fecha arriba indicados.

Atentamente,

“ID Y ENSEÑAD A TODOS”


Lic. Max Samuel Mérida Reyes
Biólogo
Colegiado 3901

Lic. Max Samuel Mérida R.
Biólogo
Colegiado No. 3901