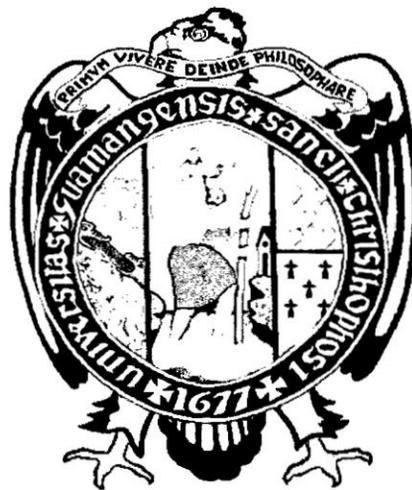


UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL  
DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE FARMACIA Y  
BIOQUÍMICA



Actividad antifúngica del extracto hidroalcohólico de las  
hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. "sillkau" frente a una  
cepa de *Candida albicans* ATCC 10231  
Ayacucho-2013.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICA

PRESENTADO POR:

**Bach. GALINDO YUPA, ISIDORA LEOCADIA**

AYACUCHO - PERÚ

2013

## **ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS**

**R.D. N° 262 – 2013 – UNSCH – FCB – D**

**Bach. ISIDORA LEOCADIA GALINDO YUPA**

En la Ciudad de Ayacucho, a los veintisiete días del mes de diciembre del año Dos mil trece, siendo las diez y cuarenta de la mañana, se reunieron los miembros del Jurado de Evaluación de la Tesis ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LAS HOJAS Y TALLOS DE *Bidens pilosa* L. "sillkau" FRENTE A UNA CEPA DE *Candida albicans* ATCC 10231, presentado por la Bach. ISIDORA LEOCADIA GALINDO YUPA, con la finalidad de evaluar la sustentación de los resultados de la tesis mencionada. El jurado estuvo conformado por el Dr. Víctor Humberto Alegría Valeriano (Presidente – miembro), Mg. Cesar Isaías Magallanes Magallanes (miembro) y Mg. Serapio Romero Gavilán (miembro – secretario (e)), con la presente Tesis la Bach. pretende optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico.

El presidente del jurado calificador Dr. Víctor Humberto Alegría Valeriano dió por iniciado el acto de sustentación de la Tesis dando lectura a la R.D. N° 262 – 2013 – UNSCH – FCB – D, dando autorización a la Bach. para que inicie con la exposición recalcando que tiene un tiempo máximo de cuarenta y cinco minutos.

Culminando la exposición oral del informe de Tesis, el presidente del jurado calificador, solicitó a los miembros del jurado calificador, a fin de que formulen sus preguntas, aclaraciones y observaciones para la evaluación correspondiente. Terminado la participación de los miembros del jurado, el Presidente invitó a la Srta. Sustentante y público asistente a retirarse del local a fin de que el jurado calificador procedan a deliberar las calificaciones correspondientes, cuyos resultados fueron:

JURADO CALIFICADOR	Exposición	Sta. Preguntas	Promedio
Dr. Víctor H. Alegría Valeriano	17	16	17
Mg. Cesar I. Magallanes Magallanes	16	15	16
Mg. Serapio Romero Gavilán	16	16	16

La calificación promedio resultante fue de DIECISÉIS (16) de la que dan fe los miembros del jurado, estampando su firma al pie de la presente acta. La sustentación concluyó a las una de la tarde.



Dr. Víctor H. Alegría Valeriano  
Miembro - Presidente



Mg. Cesar I. Magallanes Magallanes  
Miembro



Mg. Serapio Romero Gavilán  
Miembro

## **DEDICATORIA**

A mis padres Flora y Vicente.

A mi tía Martha y hermanos.

A mi gran amigo.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi *Alma Mater* La Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga por haberme albergado cinco años en sus aulas y haber sido cuna de mi formación profesional.

A la Facultad de Ciencias Biológicas, en especial a la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica, por brindarme las herramientas necesarias para mi desenvolvimiento profesional.

A los profesores de la Facultad de Ciencias Biológicas en especial al Mg. Q.F. Enrique Javier Aguilar Felices y Mg. Blgo. Víctor Luis Cárdenas López, asesores del presente trabajo de investigación, por su valioso apoyo y dedicación prestada.

A todas las personas que de una u otra manera, colaboraron en la realización y conclusión del presente trabajo de investigación.

## ÍNDICE GENERAL

	Página
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
INDICE GENERAL	iv
INDICE DE TABLAS	v
INDICE DE FIGURAS	vi
INDICE DE ANEXOS	vii
RESUMEN	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes del problema de investigación	3
2.2. <i>Bidens pilosa</i>	4
2.2.1. Clasificación taxonómica	4
2.2.2. Descripción botánica	5
2.2.3. Distribución geográfica	6
2.2.4. Composición química	6
2.2.5. Estudios biológicos	7
2.2.6. Propiedades y usos medicinales	9
2.3. Metabolitos secundarios	10
2.4. <i>Candida albicans</i>	10
2.5. Nistatina	13
III. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1. Lugar de ejecución	15
3.2. Materiales	15
3.3. Diseño metodológico para la recolección de datos	16
3.4. Análisis de datos	20
IV. RESULTADOS	21
V. DISCUSIÓN	26
VI. CONCLUSIONES	31
VII. RECOMENDACIONES	32
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
ANEXO	37

## ÍNDICE TABLAS

	Página
Tabla 1: Concentraciones decrecientes de los extractos	19
Tabla 2: Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Fungicida del extracto hidroalcohólico de las hojas y tallos de <i>Bidens pilosa</i> L. "sillkau" Ayacucho-2013.	24
Tabla 3: Metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas y tallos de <i>Bidens pilosa</i> L. "sillkau" Ayacucho-2013.	25

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Promedio de los halos de inhibición (mm) a diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de las hojas y tallos de <i>Bidens pilosa</i> L. "sillkau" frente a una cepa de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 Ayacucho-2013.	22
Figura 2: Porcentaje de inhibición a diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de las hojas y tallos de <i>Bidens pilosa</i> L. "sillkau" frente a una cepa de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 Ayacucho-2013.	23

## ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
Anexo 1: Certificado de la identificación taxonómica de <i>Bidens pilosa</i> L. "sillkau".	38
Anexo 2: Cepa liofilizada de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	39
Anexo 3: Hojas y tallos de <i>Bidens pilosa</i> L. "sillkau", de las riberas del río Huatatas.	40
Anexo 4: Flujograma del proceso de recolección y procesamiento de la muestra de <i>Bidens pilosa</i> L. "sillkau" Ayacucho-2013.	41
Anexo 5: Flujograma de la preparación del extracto etanólico de las hojas y tallos de <i>Bidens pilosa</i> L. "sillkau" Ayacucho-2013	42
Anexo 6: Tubos de ensayo conteniendo los resultados del tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de las hojas y tallos de <i>Bidens pilosa</i> L. "sillkau" Ayacucho-2013.	43
Anexo 7: Diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico las hojas y tallos de <i>Bidens pilosa</i> L. "sillkau" Ayacucho-2013.	44
Anexo 8: Flujograma de la activación de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 Ayacucho-2013.	45
Anexo 9: Nistatina 1000000 UI/ml (Nenistecin), de MKT Pharma	46
Anexo 10: Esquema del Método de Difusión por Disco.	47
Anexo 11: Procesos de la aplicación del Método de Difusión por Disco Ayacucho-2013.	48
Anexo 12: Halos de inhibición a las concentraciones de 0,5%, 1,0%, 3,0%, 5,0% y 10,0% del extracto hidroalcohólico de las hojas y tallos de <i>Bidens pilosa</i> L. "sillkau" Ayacucho-2013.	49
Anexo 13: Esquema de la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y de la Concentración Mínima Fungicida (CMF).	50
Anexo 14: Tubos mostrando la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto hidroalcohólico de las hojas y tallos	51

	de <i>Bidens pilosa</i> L. "sillkau" al 10.0% Ayacucho-2013.	
Anexo 15	Tubos mostrando la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto hidroalcohólico de las hojas y tallos de <i>Bidens pilosa</i> L. "sillkau" al 5,0% Ayacucho-2013.	52
Anexo 16	Tubos mostrando la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto hidroalcohólico de las hojas y tallos de <i>Bidens pilosa</i> L. "sillkau" al 0,5% Ayacucho-2013.	53
Anexo 17:	Concentración Mínima Fungicida (CMF) de las Concentraciones de 0,5%, 5,0% y 10% del extracto hidroalcohólico de las hojas y tallos de <i>Bidens pilosa</i> L. "sillkau" Ayacucho-2013.	54
Anexo 18:	Diámetro de los halos de inhibición (mm) del extracto hidroalcohólico de las hojas y tallos de <i>Bidens pilosa</i> L. "sillkau" Ayacucho-2013.	55
Anexo 19:	Análisis de varianza (ANOVA) de los halos de inhibición del efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de las hojas y tallos de <i>Bidens pilosa</i> L. "sillkau" Ayacucho-2013.	56
Anexo 20	Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de los halos de inhibición del efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de las hojas y tallos de <i>Bidens pilosa</i> L. "sillkau" Ayacucho-2013.	57
Anexo 21	Análisis de varianza del porcentaje de los halos de inhibición del efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de las hojas y tallos de <i>Bidens pilosa</i> L. "sillkau" Ayacucho-2013.	58
Anexo 22	Prueba de comparaciones múltiples de Tukey del porcentaje de los halos de inhibición del efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de las hojas y tallos de <i>Bidens pilosa</i> L. "sillkau" Ayacucho-2013.	59
Anexo 23	Matriz de Consistencia	60

## RESUMEN

Las infecciones micóticas oportunistas son cada vez más preocupantes, particularmente en pacientes inmunodeprimidos. En este contexto, se está en la búsqueda de nuevos agentes antimicóticos para hacer frente a este problema, enfocándose la atención a los productos naturales. Por lo tanto, el presente trabajo de investigación se realizó con la finalidad de determinar la actividad antifúngica del extracto hidroalcohólico de las hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. "sillkau", realizado en los Laboratorios de Farmacognosia y Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, durante los meses de abril a agosto del 2013. La muestra de *Bidens pilosa* L. fue recolectada en las riberas del río Huatatas de la provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho y la cepa de ensayo fue *Candida albicans* ATCC 10231. Se realizó el tamizaje fitoquímico al extracto hidroalcohólico mediante reacciones de coloración y precipitación según el procedimiento descrito por Miranda y Cuéllar (2002) y la actividad antifúngica se determinó por el método Kirby – Bauer a las concentraciones de 0,5%; 1,0%; 3,0%; 5,0% y 10,0%; asimismo la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Fungicida por el método de dilución en caldo. El tamizaje fitoquímico reportó la presencia de cumarinas, triterpenos, esteroides, saponinas, fenoles, taninos, quinonas, flavonoides, cardenolidos, catequinas, alcaloides, azúcares reductores y antocianidinas. A las concentraciones de 5,0% y 10,0% se obtuvo halos de inhibición de 18,0 mm y 21,33 mm respectivamente; mientras que la nistatina obtuvo sólo 17,67 mm. Los porcentajes de inhibición fueron 101,96% y 120,88% a las concentraciones de 5,0% y 10,0% ( $p < 0,05$ ). La CMI y la CMF fueron 0,365 mg/ml y 0,730 mg/ml respectivamente. Se concluye que el extracto de las hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. tienen actividad antifúngica.

**Palabras clave.** *Bidens pilosa* L., sillkau, *Candida albicans* ATCC 10231, Actividad antifúngica.

## I. INTRODUCCIÓN

*Bidens pilosa* L. es originaria de América del Sur y se encuentra en casi todos los países de regiones tropicales y subtropicales, así como en algunas regiones de Europa.<sup>5</sup> Se desarrolla en climas templados y cálidos.<sup>25</sup> Con propiedades cicatrizante, descongestionante hepático, antihemorroidal, antiemética, diurética, antiinflamatoria, estimulante débil de la musculatura lisa (útero), tranquilizante, hemostática, emoliente, antitusiva, antipirética, antiséptica para la irritación de la piel y lavados vaginales.<sup>10</sup> Contiene esteroides, terpenos, flavonoides, saponinas, mucílagos, alcaloides, azúcares reductores, carotenos, taninos y fenoles.<sup>6</sup>

*Bidens pilosa* L. ha sido estudiada como antiulceroso,<sup>10</sup> cicatrizante,<sup>13</sup> diurética,<sup>14</sup> antimalárica,<sup>15</sup> antifúngica,<sup>16</sup> antioxidante, antibacteriana,<sup>17</sup> quimioprotector.<sup>7</sup>

Como vemos *Bidens pilosa* L. fue objeto de estudio de numerosos estudios, sin embargo, son pocos los reportes específicos de la actividad antifúngica.

El extracto hidroalcohólico contiene muchos metabolitos secundarios, con diferentes propiedades biológicas, entre las que se encuentra la de impedir el desarrollo y multiplicación y las que destruyen a los microorganismos. Las metodologías validadas para ese fin figuran en la literatura especializada, como es el método de Kirby – Bauer, diseñada para que los metabolitos o sustancias químicas en general difundan a través del agar e impidan el crecimiento microbiano, el mismo que se aplicó en el presente estudio, evaluando el extracto a concentraciones crecientes.

Mientras que, para determinar exactamente las concentraciones a las cuales ejerce el efecto fungistático y fungicida, el método de dilución en caldo es el más apropiado, realizándose diluciones sucesivas hasta inhibir la formación de turbidez que indica crecimiento del microorganismo. Estos métodos fueron aplicados en la presente investigación, obteniendo resultados interesantes.

En tal sentido se evaluó la actividad antifúngica del extracto hidroalcohólico de las hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. "sillkau", por lo que se plantearon los siguientes objetivos:

#### **OBJETIVO GENERAL**

- Determinar la actividad antifúngica del extracto hidroalcohólico de las hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. "sillkau" frente a una cepa de *Candida albicans* ATCC 10231.

#### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar la concentración antifúngica óptima del extracto hidroalcohólico de las hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. "sillkau"
- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Fungicida Mínima (CFM), del extracto hidroalcohólico de hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. "sillkau" frente a una cepa de *Candida albicans* ATCC 10231.
- Identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. "sillkau"

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Antecedentes del problema de investigación

La actividad antifúngica de extractos vegetales frente a *Cándida* está ampliamente reportada en la literatura científica. Se conoce, la determinación de la actividad antifúngica de los extractos acuosos y butanólicos de *Miconia caudata*, *Miconia sp.*, *Clidemia hirta* y *Hamalia patens* frente a *Candida albicans* por el método de macrodilución en caldos a las concentraciones del 5,0%; 3,0% y 1,0% respectivamente, concluyendo que los extractos acuosos de *Miconia sp.* y *Miconia caudata* al 5,0% y *Clidemia hirta* al 3,0% y 5,0%; y los extractos butanólicos de *Miconia sp.* y *Miconia caudata* al 3,0% y al 5,0% respectivamente; *Clidemia hirta* 5,0% y *Hamalia patens* al 1,0%; 3,0% y 5,0% respectivamente presentaron actividad.<sup>1</sup>

La evaluación de la actividad antifúngica de cuatro plantas usadas en la medicina tradicional peruana mediante el método de difusión en agar, el extracto etanólico de *Psidium acutangulum* fue el más activo contra *Candida albicans*, *Sporothrix schenckii* y *Trychophyton mentagrophytes*. Las Concentraciones Inhibitorias Mínimas realizadas mediante microdilución en caldo, estuvieron en el rango de 16 - 512 µg/mL contra los hongos *Cryptococcus neoformans*, *Sporothrix schenckii* y varias especies de *Candida*.<sup>2</sup>

La determinación de la actividad antifúngica de los extractos metanólicos, etanólicos e hidroalcohólicos de ocho plantas medicinales, mostró mayor actividad los de *Juglans neotropica* Diels, *Psidium guajava* y *Terminalia catappa*; con CMI < 100 µg/ml por el método de microdilución colorimétrico, todos los extractos tuvieron actividad antifúngica con halo de inhibición > 18 mm contra *Candida albicans* ATCC 10231 y ninguno contra *Aspergillus niger* ATCC 16404 por el método de difusión.<sup>3</sup>

La evaluación de la actividad antifúngica *in vitro* por el método de dilución en agar, de los extractos de 10 plantas utilizadas en la medicina popular en Argentina contra 4 cepas de hongos, solo *Larrea divaricata* Cav, *Gnaphalium gaudichaudianum* D.C, *Baccharis trimera* Less y *Schinus terebenthifolius* mostraron actividad.<sup>4</sup>

## **2.2. *Bidens pilosa* L.**

### **2.2.1. Clasificación taxonómica**

División	: Antophyta (Angiospermae)
Clase	: Dicotiledoneae
Sub clase	: Metaclamideas
Orden	: Campanulales
Familia	: Asteráceae
Género	: <i>Bidens</i>
Especie	: <i>Bidens pilosa</i> L.

Nombres vulgar: "silkau", "candillo"

Fuente: Certificado expedido por el jefe del *Herbarium Huamangensis* de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga (Anexo 1).

### 2.2.2. Descripción botánica

Hierba anual, lampiña o algo pubescente de 30 a 100 cm de altura y ramificada. Hojas opuestas a veces alternas en la parte superior pecioladas, 3-partidas, sus segmentos de aovados a lanceolados, de 2 a 8 cm de alto, aserrados, agudos o acuminados. Cabezuelas florales terminales, compuestas por flores tubulares y radiadas de color amarillo intenso y las radicales con sobresalientes pétalos blancos. Aquenio negruzcos, provisto de vilano que presenta dos espinas que le sirve para adherirse a la ropa y a los pelos de los animales, facilitando su diseminación. Involucro campanulado, como de 8 mm de alto, sus brácteas extercares oblongolineales, por lo común mas cortas que las interiores. Receptáculo plano o casi plano.<sup>5</sup>

Tallo erguido, tetragono; hojas pennado-partidas, 1-3-yugadas, raramente simples; inflorescencia en capítulos discoideos, amarillos, con las lígulas lineales, tetragonas, lampiñas o con las pestañitas del margen dirigidas hacia arriba.<sup>6</sup>

**Hoja:** El mesófilo encontrado es de tipo heterogéneo asimétrico, constituido por una epidermis formada por una única capa de célula, presentando muchos pelos pluricelulares, seguido un parénquima palisádico, también con una única capa celular y un parénquima esponjoso, debajo del cual se encuentra una epidermis inferior. La nervadura principal se presenta como una epidermis superior, seguida por un parénquima, en el cual son observadas células colenquimatosas, agrupadas de manera regular. En el interior del parénquima se visualiza un canal excretor. Debajo del parénquima se encuentra una epidermis inferior.<sup>7</sup>

**Tallo:** Presenta epidermis recubierta por cutícula con pelos pluricelulares, debajo de esta se evidencia un colénquima, seguido de parénquima cortical, entre los cuales pueden ser visualizados un canal excretor. Le sigue una endodermis con estrías de Caspary.

Luego, se puede encontrar una formación constituida por fibras floemáticas, cambio del xilema, rodeada por radios medulares. Se evidencia un protoxilema, a partir del cual se establece un parénquima medular.<sup>8</sup>

**Raíz:** Presenta un epidermis con más de una capa celular y se visualizó un parénquima cortical constituido por células aproximadamente cuadrangulares, con espacios intercelulares con forma de losange. Luego fue encontrada la endodermis presentando estrías de Caspary, dentro de las cuales se apreciaba un xilema dispuesto en radios medulares, entre los cuales se encontraban traquídeos irregularmente dispuestos.<sup>8</sup>

### 2.2.3. Distribución geográfica

Es una hierba cosmopolita, se desarrolla en regiones de climas templados y cálidos, crece en riberas de los ríos, en los márgenes de los caminos, en las colinas calcáreas y es invasora común de los campos de cultivos, rastrojos y removidos, crece a una altitud de 2450 a 2750 m.s.n.m.<sup>9</sup>

*Bidens pilosa* L. es originaria de América del Sur y se encuentra en casi todos los países de regiones tropicales y subtropicales, así como en algunas regiones de Europa.<sup>10</sup>

### 2.2.4. Composición química

En el análisis fitoquímico de la planta entera se ha detectado la presencia de aminas, esteroides y esteroides, terpenos, flavonoides (0,60 - 2,31%), glicósidos aurona y chalconas, cuyas geninas más comunes son okanina, lanceolina y buteína, entre las que se encuentran okanina 4'-O-[β-D-glucopiranosil-(1→6)-β-D glucopiranosido]; β-D-glucopiranosiloxi-3-hidroxi-6(E)-tetradecen-8,10,12-triina; (Z)-7-O-β-D-glucopiranosil-6,7,3',4'-tetrahidroxiaurona; (Z)-6-O-(6-p-cumaroil-β-D-glucopiranosil)-6,7,3',4'-tetrahidroxiaurona; (Z)-6-O-(6-O-acetil-β-D-glucopiranosil),7,3',4'- tetrahidroxiaurona.<sup>11</sup>

Otros metabolitos encontrados son saponinas, mucílagos, alcaloides, azúcares (1,76 - 3,94% de azúcar reducida), carotenos, taninos y fenoles. Los polisacáridos se encuentran entre un 3,02 - 5,12%, los más comunes son: D-galacturónico, L-arabinosa; D-galactosa, D-glucosa, L-ramnosa y D-xilosa.<sup>6</sup>

También se han detectado compuestos poliacetilénico benzoides (fenil heptatrina [12,0 - 32,3%] y  $\alpha$ -tertienil), carbonato de sodio, potasio, calcio, cloruro de potasio, fitoesteros ( $\beta$ -sitosterol, estigmasterol) fitosterina B, proteínas (albúmina), un éster con un peso molecular de 74,6; un alcohol alifático (hentrianocontanol) y un aceite esencial. Además se encuentran el ácido nicotínico, ácido tánico, ácido p-cumárico, ácido salicílico, ácido linólico, ácido  $\alpha$ -linolénico e hidrocarburos (C22-C33).<sup>12</sup>

#### **2.2.5. Estudios biológicos**

Se estudió el efecto antiulceroso de una forma farmacéutica, constituida por el residuo acuoso de un extracto hidroalcohólico de *Bidens pilosa* L. a las concentraciones de 40, 60 y 80%; estas disminuyeron significativamente el número y la severidad de las lesiones de la mucosa gástrica inducidas por etanol y estrés, pero no hubo protección contra el daño inducido por indometacina. El extracto al 80% fue la más efectiva.<sup>10</sup>

En el estudio de la actividad cicatrizante de los extractos etanólico, acetato de etilo, acetónico, clorofórmico y metanólico de las hojas y los tallos de *Bidens pilosa* L. "silkau"; muestra los siguientes valores de actividad cicatrizante: el extracto acetónico de tallos 17,26% y hojas 45,15%; el extracto clorofórmico de tallos 21,98% y hojas 54,21%; el extracto metanólico de tallos 52% y hojas 66,97% y el extracto etanólico de tallos 52,55% y hojas 79,50% respectivamente.<sup>13</sup>

El estudio de la evaluación de la actividad diurética del extracto atomizado de planta seca y fresca de *Bidens pilosa* L. "silkau" a concentraciones de 150 mg/kg, 250 mg/kg, 350 mg/kg y 450 mg/kg en cobayos; se observó un mayor efecto diurético en los extractos atomizados de planta seca a la concentración de 350 mg/kg;

mostrando una eficiencia diurética de 54,8% y con el extracto atomizado de la planta fresca a la concentración de 350 mg/kg, se obtiene una eficiencia diurética de 34%, en comparación con la furosemida y la hidroclorotiazida que presentó una eficacia de 127% y 87%, respectivamente.<sup>14</sup>

Se llevó a cabo un estudio antimalárico de *Bidens pilosa*, donde los extractos etanólicos (planta entera, hojas y raíces) y las fracciones de cloroformo y butanol a concentraciones de 50 mg/ml causaron hasta 90% de inhibición del crecimiento de *Plasmodium falciparum in vitro*. *In vivo*, las fracciones causaron reducción parcial de *Plasmodium berghei* en ratones.<sup>15</sup>

Se investigó la actividad antifúngica *in vitro* de doce extractos etanólicos correspondientes a diez plantas medicinales peruanas; donde *Bidens pilosa* L. no fue activa frente a *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida albicans* cepa clínica y *Aspergillus niger* ATCC 16404.<sup>16</sup>

Al evaluar la composición química, la actividad antioxidante, antibacteriana y antifúngica de los aceites esenciales de *Bidens pilosa*, se identificó cuarenta y cuatro componentes, de los cuales  $\beta$ -cariofileno (10,9% y 5,1%) y  $\pi$ -cadineno (7,82% y 6,13%) fueron los principales compuestos en hojas y flores, respectivamente. Los aceites y extractos acuosos de hojas y flores demostraron tener actividades antioxidantes, actividades antibacterianas y antifúngicas.<sup>17</sup>

Al determinar la propiedad antibacteriana de los extractos etanólicos de las hojas secas de *Bidens pilosa*, *Lantana camara*, *Schinus molle* y *Silybum marianum*, frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Los extractos mostraron actividad contra *Staphylococcus aureus*; mostrando mejor actividad *Bidens pilosa* y *Lantana camara*, mientras *Schinus molle* y *Silybum marianum* manifestaron capacidad moderada para inhibir el crecimiento.<sup>18</sup>

Al evaluar el efecto quimioprotector de *Bidens pilosa*, se observó una disminución del desarrollo de adenocarcinoma mamario con los tratamientos de extracto

metanólico y etanólico, siendo mejor con la fracción metanólica; el marcador de estrés oxidativo disminuyó en los grupos que recibieron tratamiento con la planta, siendo significativo con la fracción metanólica; hubo menor número de micronúcleos (genotoxicidad) en los animales que recibieron tratamiento.<sup>19</sup>

#### **2.2.6. Propiedades y usos medicinales**

Es una planta medicinal sialagoga, emenagoga, siendo útil todas sus partes para tratar diferentes dolencias.<sup>5</sup> Las hojas se utilizan tanto en infusión y decocción, también se mastican las mismas para las anginas, en la amigdalitis catarral, para las aftas bucales, afecciones renales, úlceras gastroduodenales, como cataplasma sobre heridas y tumores, para afecciones abdominales y cólicos (enemas), así como para el reumatismo.<sup>10</sup> Las flores, hojas y raíces son empleadas como antiodontálgicas. También las flores se utilizan como antidiarreico y la raíz para el dolor de oídos. Las semillas tostadas para incisiones externas y el zumo de la planta entera como antídoto en casos de envenenamiento.<sup>20</sup>

Además, es descongestionante hepático, antihemorroidal, cicatrizante, antiemética, diurética, antiinflamatoria, estimulante débil de la musculatura lisa (útero), tranquilizante, hemostática, emoliente, antitusiva, antipirética, antiséptica para la irritación de la piel y lavados vaginales.<sup>10</sup>

En la amazonia peruana *Bidens pilosa* L. es usado para aftas bucales, angina, diabetes, desórdenes menstruales, hepatitis, laringitis, lombrices intestinales y para las inflamaciones externas e internas. En Piura, la decocción de las raíces es usada para la hepatitis alcohólica y lombrices. La tribu cuna mezcla hojas machacadas con agua para tratar dolores de cabeza. Cerca de Pucallpa, las hojas son ovilladas y aplicadas para dolor de dientes; las hojas también son usadas para dolor de cabeza.<sup>21</sup>

En la medicina herbaria peruana *Bidens pilosa* L. es empleada para reducir la inflamación, como diurético, y como soporte y protector hepático. Es comúnmente usada para hepatitis, conjuntivitis, abscesos, infecciones fúngicas (el jugo de las hojas), infecciones urinarias, como ayuda para perder peso, y para estimular el parto.<sup>22</sup>

### **2.3. Metabolitos secundarios**

Las plantas medicinales típicamente contienen una mezcla de diferentes compuestos químicos que pueden actuar individualmente, aditivamente o sinérgicamente para mejorar la salud. Una sola planta puede contener, sustancias tánicas que pueden actuar como antibióticos naturales.<sup>23</sup>

Un gran número de compuestos constitutivo de la planta han sido reportados con actividad antifúngica. Ejemplos bien conocidos incluyen: fenoles y glicósidos fenólicos, lactonas insaturadas, compuestos de azufre, saponinas glicósidos cianogénéticos, glucosinolatos, resorcinoles 5-alquilatos y dienos.<sup>16</sup>

### **2.4. *Candida albicans***

Existen más de 100 especies de cándida que son patogénicas para los seres humanos. La mayoría de ellas vive como comensal en la boca, el tracto gastrointestinal, aparato genitourinario y/o en la piel, “esperando” el momento propicio para que aumente su población y entonces generar molestias. Es decir, son patógenos oportunistas que se hacen evidentes cuando el “equilibrio” se rompe o altera por algún factor.<sup>24</sup>

*Candida albicans*, a veces se comporta como un saprofito y su aislamiento no implica por sí solo la presencia de infección, no sobrevive durante mucho tiempo en superficies secas pero su supervivencia es mayor cuando hay humedad y se ha aislado de los cepillos dentales, cremas de manos, cosméticos y ropa.<sup>25</sup>

#### 2.4.1. Ubicación taxonómica

Reino	: Fungi
División	: Mycota
Subdivisión	: Deuteromycotina
Clase	: Deuteromycetes
Subclase	: Blastomycetidae
Familia	: Ctyptocaceae
Género	: <i>Candida</i>
Especie	: <i>albicans</i>
Nombre científico:	<i>Candida albicans</i>
Sinónimos	: Monilia, Oidium <sup>26</sup>

#### 2.4.2. Morfología

Todas las especies del género *Candida* se desarrollan como células levaduriformes ovaladas (3 a 5  $\mu\text{m}$ ) que forman yemas o blastoconidias; producen también pseudohifas e hifas verdaderas. Por otra parte, *Candida albicans* genera tubos germinales y clamidoconidias terminales de pared gruesa.<sup>27</sup>

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. *Candida albicans* puede sufrir modificaciones fenotípicas, en las que una cepa de *Candida* 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.<sup>28</sup>

#### 2.4.3. Patogenia y patología

Se ha determinado que las especies del género *Candida* conforman el grupo más importante de hongos patógenos oportunista. Entre 1980 y la actualidad, la

frecuencia de infección por *Candida* se ha incrementado a un ritmo constante en hospitales de cualquier tamaño y en todos los grupos de edades.<sup>27</sup>

El hallazgo de *Candida albicans* en cualquier parte del cuerpo humano no significa enfermedad, ésta sólo se instala apoyada sobre una serie de factores que disminuyen la resistencia orgánica facilitando la infección, tal es el caso en ancianos y recién nacidos que son más propensos a adquirir una candidiasis por cambios metabólicos como hipovitaminosis, síndrome de mala absorción y otros trastornos del aparato digestivo; en casos de infecciones crónicas depauperantes; diabetes melitus, estados de caquexias, acidosis, leucemia y tratamientos radioterapéuticos, uremia, etc., como también a consecuencia de tratamientos prolongados con antibióticos que alteran la flora microbiana. Igualmente influye en este sentido la medicación corticosteroide y citoestática, por su acción represiva sobre los leucocitos. Existen también factores biológicos de importancia, como el embarazo, climaterio, etc., y estados locales de la boca, tales como sepsis bucal, prótesis, alteraciones genéticas, etc.<sup>28</sup>

Las infecciones causadas por *Candida albicans* puede localizarse en la mucosa oral (muguet), vaginales, esofágicas, etc. También puede causar micosis profunda como meningitis, bronconeumonía, fungemia o candidemia.<sup>29</sup>

La candidiasis superficial (cutánea o mucosa), se establece a consecuencia de un incremento en la población local de *Candida* y del daño a la piel o el epitelio, que permite la invasión local por levadura y pseudohifas. Después de la administración de antimicrobiano por vía oral, con frecuencia ocurre un gran incremento de la *Candida* en el intestino y puede penetrar a la circulación a través de la mucosa intestinal.<sup>30</sup>

#### **2.4.4. Epidemiología**

Las especies del género *Candida* colonizan el ser humano y otros animales de sangre caliente, por lo que se encuentra 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 y la uretra, la piel y bajo las uñas del pie y las manos. Se ha detectado la presencia de *Candida albicans*, el principal agente etiológico de enfermedad en el ser humano, en el aire, el agua y el suelo.<sup>27</sup>

Se estima que entre un 25% y un 50% de las personas sanas porta microorganismos de *Candida* en la microflora normal de la cavidad bucal; *Candida albicans* representaría entre el 70% y 80% de las cepas. Las tasas de portadores orales son significativamente mayores en la población pediátrica, los pacientes ingresados, los sujetos infectados con VIH, las personas con dentadura postiza, los diabéticos, los individuos sometidos a quimioterapia antineoplásica o antibioterapia y los niños.<sup>27</sup>

## **2.5. Nistatina**

Es un antibiótico antimicótico producido por *Streptomyces nousei*, no es activo frente a células bacterianas y de mamíferos porque no contiene esteroides en su membrana celular. Tiene una actividad fungistática o fungicida frente a varias cepas de levaduras y hongos. *In vitro*, las concentraciones de aproximadamente 3 µg/ml, inhiben el crecimiento de *Candida albicans*.<sup>31</sup>

Este antibiótico antimicótico no se absorbe en el tubo digestivo y se utiliza sobre todo en forma local para tratar la candidiasis oral o vulvovaginitis. Su toxicidad impide el uso parenteral.<sup>32</sup>

Es activa contra la mayoría de las especies de *Candida* y puede utilizarse para el tratamiento de muguet oral y la candidiasis vaginal.<sup>33</sup>

### **2.5.1. Química de la Nistatina**

Es un antibiótico poliénico, un sistema cíclico muy grande unido a la micosamina, un aminoazúcar. La fórmula empírica es  $C_{46}H_{77}NO_{19}$ . Es muy ligeramente soluble

en agua pero se descompone rápidamente en presencia de agua o de plasma.

Es estable en forma seca.<sup>34</sup>

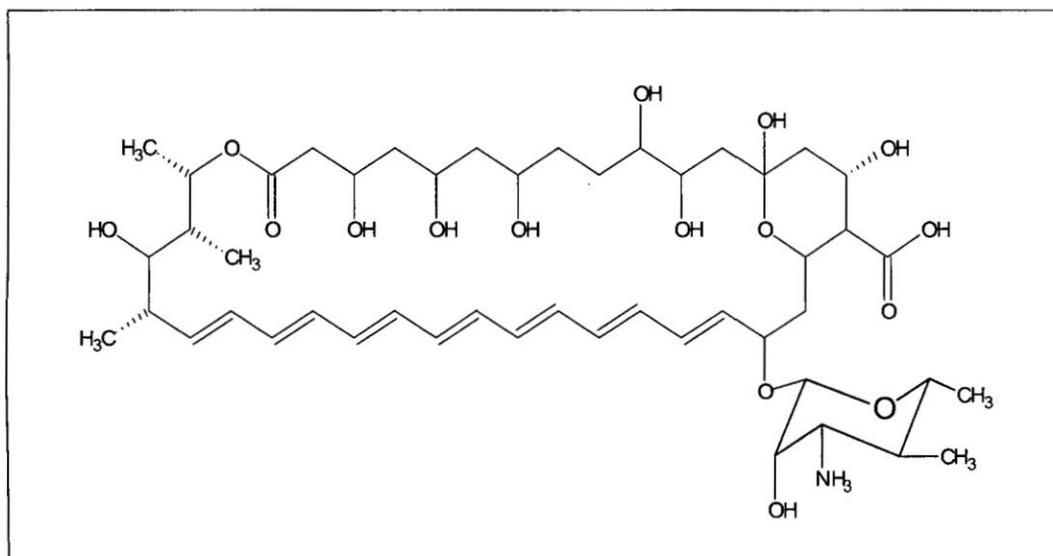


Figura N°1: Estructura química de la nistatina<sup>35</sup>

### 2.5.2. Mecanismo de acción

Como todos los polienos, la nistatina se une de manera irreversible a los esteroides de la membrana presente en las especies susceptibles de *Candida*. Las moléculas de polienos presentan mayor afinidad por los esteroides fúngicos, incluyendo el ergosterol, que por los esteroides humanos, lo que permite una toxicidad selectiva relativa. Esta unión irreversible altera aumentando la permeabilidad de la membrana y posibilita la salida de componentes intracelulares esenciales,<sup>36</sup> le hace perder sustancias vitales para su metabolismo y funciones celulares, como potasio, aminoácidos y purinas<sup>37</sup> y, como consecuencia, la muerte celular. En bajas concentraciones la nistatina es fungistática, mientras que en concentraciones más elevadas tiene actividad fungicida.<sup>36</sup>

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Lugar de ejecución**

La presente investigación se llevó a cabo en los Laboratorios de Farmacognosia y Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga durante los meses de abril - agosto del 2013.

#### **3.2. Materiales**

##### **3.2.1. Población**

Planta de *Bidens pilosa* L. "sillkau", recolectadas antes de la fase de floración durante el mes de febrero del 2013, en las riberas del río Huatatas, en la provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho ubicado a 2725 m.s.n.m.

##### **3.2.2. Muestra**

Dos kg de hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. "sillkau", se seleccionaron las hojas y tallos que no estaban dañadas ni maltratadas. La identificación taxonómica fue emitida por la jefa del *Herbarium Huamangensis* de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga (Anexo 1).

##### **3.2.3. Microorganismo de ensayo**

*Candida albicans* ATCC 10231, contenido en una pastilla liofilizada, sellado dentro de una bolsa laminada, pura, con una recuperación >100 UFC por pastilla, adquirido al laboratorio GenLab del Perú SAC (Anexo 2)

### **3.3. Diseño metodológico para la recolección de datos**

#### **3.3.1. Recolección y procesamiento de la muestra**

Se recolectó las muestras de *Bidens pilosa* L. "sillkau" en horas de la mañana, seleccionando las hojas y tallos según el método dado por Villar del Fresno (1999)<sup>38</sup>. El lavado de las hojas y tallos se realizó con abundante agua. El secado se realizó durante dos semanas a una temperatura ambiente, bajo ventilación y sombra, sobre papel de kraft para mantener sus propiedades químicas y farmacológicas. Finalmente se procedió a la molienda utilizando un molino de martillo, hasta obtener polvo fino (Anexo 4)

#### **3.3.2. Preparación del extracto hidroalcohólico de las hojas y tallos**

Se maceró 800 gr de la muestra en un frasco de color ámbar por dos semanas aproximadamente en etanol al 80°, cubriendo a la muestra por encima de 4 cm, durante el proceso se agitó el frasco periódicamente por 14 días. Se procedió al filtrado con un sistema al vacío y finalmente se concentró en un rotavapor hasta obtener un extracto seco (Anexo 5)

#### **3.3.3. Determinación cualitativa de los metabolitos secundarios**

Se realizó las pruebas de: Baljet, libermann-burchard, espuma, cloruro férrico, bornträger shinoda, kedde, catequina, dragendorff, mayer, Wagner, fehling y antocianidina, para la identificación cualitativa de los principales grupos de metabolitos secundarios, directamente sobre el extracto de la planta con reacciones simples específicas de coloración y precipitación,<sup>39</sup> (Cuadro 1 y Anexo 6)

#### **3.3.4. Determinación de la actividad antimicótica**

Según la técnica de Kirby - Bauer (difusión por disco),<sup>40</sup> para la medir los halos de inhibición, además de determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por el método de dilución en caldo y Concentración Fungicida Mínima (CMF).<sup>41</sup>

#### **3.3.4.1. Activación de *Candida albicans* ATCC 10231**

Para activar la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231, se procedió a inocular en tubo con 10 ml de caldo Sabouraud e incubar a temperatura de 37°C por 48 horas. Para utilizar la cepa se procedió a repicar en agar Sabouraud contenido en tres viales, y se dejó incubar a temperatura de 37°C por 48 horas (Anexo 8)

#### **3.3.4.2. Preparación del inóculo de *Candida albicans***

Se procedió a seleccionar las colonias de los viales, se tocó la colonia de *Candida albicans* ATCC 10231 por arriba con un asa y el crecimiento se transfirió a un tubo con 4 a 5 ml de caldo Sabouraud, se incubó a 37°C por 48 horas. Para obtener una turbidez ópticamente similar al estándar de 0,5 de la escala de McFarland se ajustó con caldo Sabouraud.

#### **3.3.5. Determinación del halo de inhibición**

Esta prueba se basa en la inhibición del crecimiento fúngico, mediante la difusión de las sustancias activas en un medio sólido lo que se evidencia con la formación de halos de inhibición; de forma que cuanto más susceptible sea el microorganismo frente a los tratamientos, más amplia será la zona de crecimiento inhibido.

#### **Procedimiento**

- En cada placa Petri se colocaron 20 ml de agar Sabouraud.
- Se introdujo un hisopo estéril en el inóculo de *Candida albicans*, exprimiendo el exceso de caldo sobre la pared del tubo, luego se inoculó la placa en cuatro direcciones: horizontal, vertical, diagonal, y en forma circular alrededor de la periferia.
- Se impregnó los discos de papel Whatman, de 6 mm de diámetro, con el control positivo y las diferentes concentraciones del extracto.
- Posteriormente se depositaron los discos sobre el agar.

- Se incubaron a 37°C durante 48 horas.
- Transcurrido las 48 horas, para determinar el efecto antimicótico se procedió a medir el diámetro de los halos inhibidos de las diferentes concentraciones de la muestra y el control positivo con una regla milimétrica.<sup>40</sup> (Anexo 10 al 12)

Para el cálculo del porcentaje de inhibición se usó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{Diámetro del halo de inhibición de la muestra}}{\text{Diámetro del halo de inhibición del control}} \times 100$$

### **Diseño experimental**

Se utilizó un diseño totalmente randomizado para cada tratamiento con seis repeticiones para cada uno de ellos, los que fueron sometidos a los siguientes tratamientos:

- Grupo I : Control positivo tratado con Nistatina.
- Grupo II : Tratado con extracto a 0,5% de concentración.
- Grupo III : Tratado con extracto a 1,0% de concentración.
- Grupo IV : Tratado con extracto a 3,0% de concentración.
- Grupo V : Tratado con extracto a 5,0% de concentración.
- Grupo VI : Tratado con extracto a 10,0% de concentración

### **3.3.6. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)**

Se define como la cantidad o la concentración mínima de un agente químico antimicrobiano que se necesita para inhibir el crecimiento de un microorganismo

#### **Procedimiento**

Para hallar la CMI se prepararon 15 tubos previamente esterilizados y rotulados del número 1 al 15:

- A partir del tubo N° 1 hasta el tubo N° 15, se agregó 1 ml del Caldo Sabouraud.
- Posteriormente agregó 1 ml de las concentraciones de los extractos al tubo N° 1, a partir del cual se traspasó 1 ml al tubo N° 2 y así sucesivamente hasta el

tubo N° 14, del tubo N° 14 se extrajo 1 ml y descartó. El tubo N° 15 no recibió extracto, siendo este el control.

- Luego se agregó 1 ml del inóculo de *Candida albicans* ATCC 10231 a todos los tubos y se llevó a incubación a 37°C por 24 horas.<sup>41</sup> (Anexo 13 al 16)

**Tabla 1: Concentraciones decrecientes de las diluciones de los extracto**

Tubos	Extracto de <i>Bidens pilosa</i> L. "sillkau" (mg/ml)		
	0,5%	5,0%	10,0%
1	2,500	25,000	50,000
2	1,250	12,500	25,000
3	0,625	6,250	12,500
4	0,313	3,150	6,250
5	0,156	1,563	3,150
6	0,078	0,781	1,563
7	0,039	0,391	0,781
8	0,020	0,195	0,391
9	0,010	0,098	0,195
10	0,005	0,049	0,098
11	0,002	0,024	0,049
12	0,001	0,012	0,024
13	0,0006	0,006	0,012
14	0,0003	0,003	0,006

### 3.3.7. Determinación de la Concentración Mínima Fungicida (CMF)

Se define como la concentración más baja de antimicótico que produce la muerte del 99,9% del microorganismo probado y solo permite la supervivencia del 0.1% de los microorganismo en cultivo.

#### Procedimiento

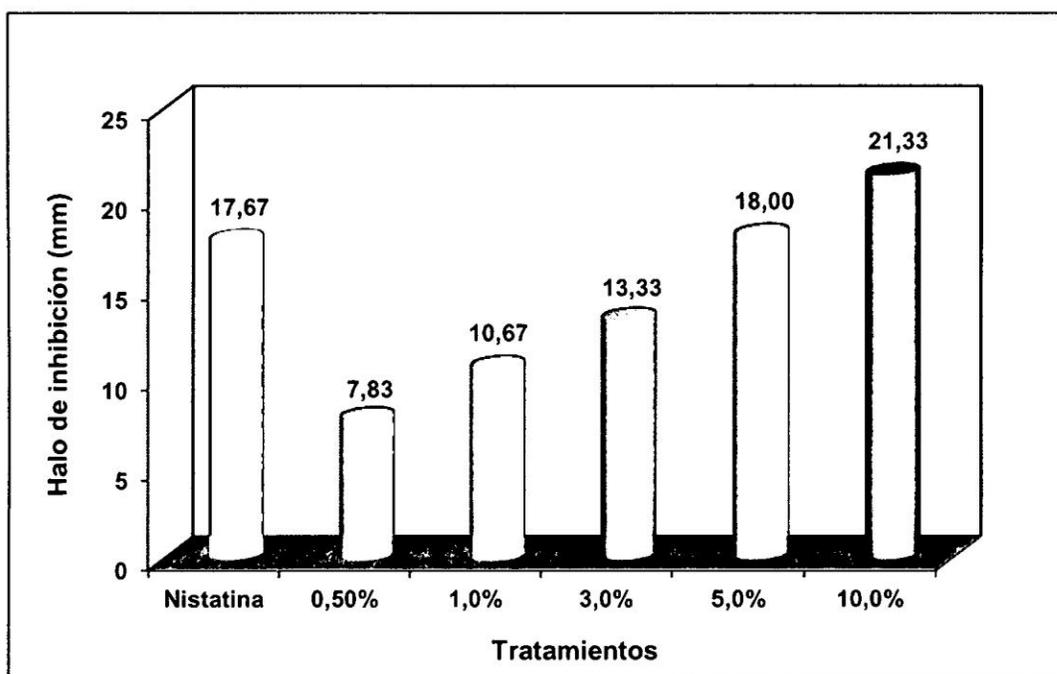
Para determinar la Concentración Mínima Fungicida (CMF) se determino a partir de la Concentración Mínima Inhibitoria, de la siguiente manera:

- Una vez observado la turbidez a simple vista, al determinar la CMI; se procedió a sembrar con la ayuda del asa, los caldos no turbios en las placas con agar Sabouraud.
- Posteriormente se incubó a 37°C por 24 horas.<sup>41</sup> (Anexo 13 y 17)

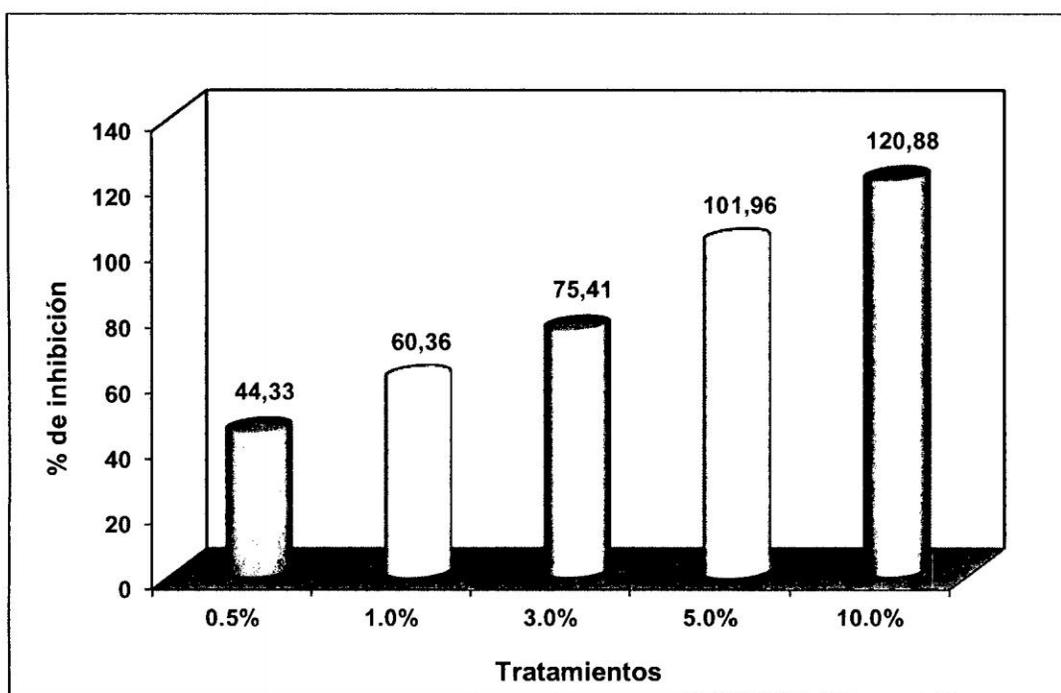
### **3.4. Análisis de datos**

Los resultados se procesaran en cuadros mediante el análisis de varianza (ANOVA) y comparaciones múltiples de Tukey con un nivel de significancia de 0,05.

## **IV. RESULTADOS**



**Figura 1:** Promedio de los halos de inhibición (mm) a diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de las hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. "sillkau" frente a una cepa de *Candida albicans* ATCC 10231 Ayacucho 2013.



**Figura 2:** Porcentaje de inhibición a diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de las hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. "sillkau" frente a una cepa de *Candida albicans* ATCC 10231 Ayacucho-2013.

**Tabla 2:** Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Fungicida del extracto hidroalcohólico de las hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. "sillkau" Ayacucho-2013.

Tubos	Extracto de <i>Bidens pilosa</i> L. "sillkau" (mg/ml)					
	0,5%		5,0%		10,0%	
1	2,500	S	25,000	S	50,000	S
2	1,250	S	12,500	S	25,000	S
3	0,625	S(CMF)	6,250	S	12,500	S
4	0,313	R(CMI)	3,150	S	6,250	S
5	0,156	R	1,563	S	3,150	S
6	0,078	R	0,781	S(CMF)	1,563	S
7	0,039	R	0,391	R(CMI)	0,781	S(CMF)
8	0,020	R	0,195	R	0,391	R(CMI)
9	0,010	R	0,098	R	0,195	R
10	0,005	R	0,049	R	0,098	R
11	0,002	R	0,024	R	0,049	R
12	0,001	R	0,012	R	0,024	R
13	0,0006	R	0,006	R	0,012	R
14	0,0003	R	0,003	R	0,006	R

**LEYENDA:**

- (S) : Sensible
- (R) : Resistente
- (CMI) : Concentración Mínima Inhibitoria
- (CMF) : Concentración Mínima Fungicida

**Tabla 3:** Metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. "sillkau" Ayacucho-2013.

Metabolitos	Ensayo	Resultados	Observaciones
Lactonas y/o cumarinas	Baljet	++	Precipitado rojo
Triterpenos y/o esteroides	Liebermann-Burchard	+++	Coloración verde oscura
Saponinas	Espuma	+++	Formación de espuma
Fenoles y/o taninos	Cloruro férrico	+++	Coloración verde intenso
Quinonas	Bornträger	+++	Coloración roja
Flavonoides	Shinoda	++	Fase amilica de color carmelita
Cardenolidos	Kedde	+	Coloración violáceo
Catequinas	Catequinas	+	Mancha verde carmelita a luz UV
	Dragendorff	+++	Precipitado
Alcaloides	Mayer	++	Turbidez definida
	Wagner	+++	Precipitado
Azucares reductores	Fehling	++	Coloración roja
Flavonoides (secuencia C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> )	Antocianidinas	++	La fase amilica de color marrón

**LEYENDA:**

- (+) : Escasa
- (++) : Regular
- (+++): Abundante

## V. DISCUSIÓN

La utilización de sustancias naturales en el tratamiento de diferentes enfermedades, incluidas las de etiología infecciosa, constituyen en la actualidad un desafío en la medicina y se ofrece como una alternativa, especialmente en aquellas enfermedades para las cuales no existe un tratamiento adecuado. Pero sin duda el reino vegetal es el que ofrece mayor variedad de sustancias potencialmente útiles aplicables a las enfermedades humanas, en concreto a aquellas producidas por microorganismos.<sup>42</sup>

El papel cada vez más importante de los hongos dentro de las enfermedades infecciosas humanas, ha ejercido una fuerte influencia sobre la investigación y el desarrollo de nuevos y variados fármacos, con un mayor espectro de acción y menor toxicidad que los actuales. El aumento de las infecciones por hongos, unida a la resistencia que han empezado a tener estos agentes a los antimicóticos, han llevado a una constante búsqueda de alternativas terapéuticas eficaces que puedan brindar más y mejores opciones en las farmacopeas actuales.<sup>43</sup>

Los compuestos derivados de plantas son de interés en este contexto porque ellos comprenden sustitutos más seguros o más eficaces que los agentes antimicrobianos producidos sintéticamente,<sup>44</sup> los cuales podrían servir como

buenos candidatos para el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos (antifúngicos en particular) que aporten ventajas apreciables respecto a los actuales fármacos; debido a que globalmente las plantas producen más de 100000 productos naturales de bajo peso molecular, también conocido como metabolitos secundarios.<sup>45</sup>

Al analizar los resultados del tamizaje fitoquímico, se observan los diferentes metabolitos secundarios presentes en el extracto de *Bidens pilosa* L. "sillkau" (Tabla 3). Este estudio comprendió un conjunto de ensayos y técnicas sencillas, que aunque no brindan un resultado concluyente, debido a diversos factores influyentes, sí nos dan una idea general sobre la composición química de la planta. Destacando la presencia de: lactonas, cumarinas, triterpenos, esteroides, saponinas, fenoles, taninos, quinonas, flavonoides, cardenolidos, catequinas, alcaloides, azúcares reductores y antocianidinas; corroborados por Lastra *et al.*<sup>7</sup> Resultados que nos hacen suponer que estos metabolitos secundarios ya sean de manera independiente o posiblemente al efecto sinérgico entre ellos, son los responsables de la actividad antifúngica a través de diferentes mecanismos.

En la Figura 1 se observa que los extractos de concentraciones 0,5%, 1,0% y 3,0%, muestran promedios de halos de inhibición de 7,83 mm, 10,67 mm y 13,33 mm respectivamente, siendo valores menores a la nistatina que mostró ser un buen control positivo en todos los ensayos, que tiene un promedio de halo de inhibición de 17,67 mm; sin embargo, las concentraciones de 5,0% y 10% presentaron promedios de halos de inhibición de 18,0 mm y 21,33 mm respectivamente; superior a la nistatina (anexo 12), habiendo diferencias entre los tratamientos ensayados ( $p < 0,05$ ) a un nivel de confianza del 95% (anexo 19). Se realizó las comparaciones múltiples de las medidas de los halos de inhibición con la prueba de Tukey (anexo 20), basado en el grado de parecido

existentes entre sus medias, todos los tratamientos difieren significativamente uno del otro a excepción de la nistatina que no difiere significativamente de la concentración de 5,0%, es decir tienen el mismo comportamiento, pero difiere con los demás tratamientos; la concentración de 10% fue superior a la nistatina.

En la Figura 2, los porcentajes de inhibición de las concentraciones 0,5%, 1,0%, 3,0%, 5,0% y 10,0%, respecto a la nistatina, fueron 44,33%, 60,36%, 75,41%, 101,96% y 120,88%, respectivamente. Al realizar el Análisis de Varianza (ANOVA) presenta un valor estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre los tratamientos (anexo 21), asimismo se realizó la prueba de Tukey (anexo 22), donde los tratamientos difieren significativamente, es decir no tienen el mismo comportamiento inhibitorio.

Una acción antifúngica se considera alta cuando su porcentaje de inhibición es  $>70\%$ , intermedia entre el 50 – 70% y baja cuando es  $< 50\%$  como menciona Ramírez *et al.*<sup>46</sup> En consecuencia, la concentración de 0,5% mostró actividad baja, la concentración de 1,0% actividad intermedia y las concentraciones de 3,0%, 5,0% y 10,0% mostraron actividad alta.

La concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Fungicida (CMF), realizado mediante el método de dilución en caldo, fue demostrada a concentraciones de 0,5%, 5,0% y 10,0%, presentando 0,365 mg/ml y 0,730 mg/ml respectivamente (tabla 2).

De acuerdo con lo descrito por Avellaneda *et al.*,<sup>47</sup> una cepa es muy sensible cuando la sustancia evaluada presenta una CMI inferior a 12,5 mg/ml, de mediana sensibilidad, entre 12,5 y 50 mg/ml y de baja sensibilidad cuando la CMI está entre 50 a 100 mg/ml. Según esta escala *Candida albicans* ATCC

10231 presento alta sensibilidad frente al extracto hidroalcohólico de *Bidens pilosa* L.

Los resultados de este estudio revelan que el extracto posee actividad antifúngica frente a *Candida albicans* ATCC 10231, teniendo una efectividad superior a la Nistatina, fármaco ampliamente utilizado como fungistático o fungicida frente a varias cepas de levaduras y hongos.

Los flavonoides y taninos, cotizados en otra planta han sido reportados por Bernabé *et al.*,<sup>48</sup> y Barapedjo *et al.*,<sup>49</sup> con actividad antifúngica. La actividad de la primera probablemente se debe a que forman complejos con las proteínas solubles y extracelulares y complejos con la pared celular; la quercetina y kaemferol mostraron tener actividad antifúngica contra *Candida albicans*.<sup>50</sup> Los taninos se combinan con las proteínas de la piel y de la mucosa formando compuestos insolubles, eliminando la base de cultivo a bacterias y hongos; por otro lado también se debe a que estos forman complejos con los aminoácidos nucleofílicos, lo que conduce a su inactivación y por tanto a la inhibición de la síntesis de proteínas.<sup>51</sup>

Los compuestos fenólicos explicarían probablemente el efecto del extracto de *Bidens pilosa* L., al ser rico en estos metabolitos secundarios, como lo evidencia lo hallado en la presente investigación; posiblemente debido al lugar y el número de grupos hidroxilo (OH) en el anillo de los compuestos fenólicos, están relacionados directamente con la toxicidad frente los microorganismos, de forma que un aumento en la hidroxilación está ligado a una mayor toxicidad. También parece estar relacionado con la inhibición enzimática de los compuestos oxidados, posiblemente mediante la acción sobre los grupos sulfhidrilo de los aminoácidos o por interacciones no específicas con proteínas.<sup>50</sup>

Otros metabolitos secundarios a los que podríamos atribuir los resultados obtenidos son las quinolonas, cumarinas, saponinas y alcaloides, en vista que estos compuestos tienen propiedades antifúngicas de acuerdo a lo descrito por Arif *et al.*,<sup>50</sup> que actúan por diferentes mecanismos de acción. Las quinonas forman complejos irreversibles con los aminoácidos hidrofílicos de las proteínas y se unen con las enzimas de la membrana, por lo tanto inactivan y anulan sus funciones.<sup>51</sup> Las cumarinas interaccionan con el ADN eucariota.<sup>51</sup> Las saponinas forman complejos con los esteroides en las membranas de los hongos lo cual ocasiona la desintegración de la membrana.<sup>52</sup> A los alcaloides se le atribuye la propiedad de intercalarse a la pared celular y a la doble cadena del ADN lo que ocasiona múltiples efectos en el microorganismo; asimismo pueden penetrar la membrana plasmática combinándola y precipitando las proteínas protoplasmáticas y desnaturalizándolas.<sup>51</sup>

Estos resultados demostraron que los extractos de las hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. tienen actividad antifúngica, lo cual representa una alternativa eficaz para disminuir la infección por *Candida albicans*.

## VI. CONCLUSIONES

1. El extractos hidroalcohólico de las hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. "sillkau" tiene actividad antifúngica frente a una cepa de *Candida albicans* ATCC 10231.
2. El extracto hidroalcohólico de las hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. "sillkau" al 5,0% y 10,0% presentaron mayor actividad antifúngica, respecto a los demás concentraciones, con halos de inhibición de 18,0 mm y 21,33 mm respectivamente; superior a la nistatina que presentó un halo de inhibición de 17,67 mm.
3. La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Fungicida (CMF) del extracto hidroalcohólico fue 0,365 mg/ml y 0,730 mg/ml respectivamente frente a *Candida albicans* ATCC 10231.
4. El extracto hidroalcohólico de las hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. "sillkau" contiene: lactonas, cumarinas, triterpenos, esteroides, saponinas, fenoles, taninos, quinonas, flavonoides, cardenolidos, catequinas, alcaloides, azúcares reductores y antocianidinas;

## VII. RECOMENDACIONES

1. Continuar el trabajo de investigación de *Bidens pilosa* L. "sillkau" con la finalidad de determinar si tiene efecto en otras especies de hongos.
2. Realizar bioensayos en animales de experimentación para determinar la toxicidad de *Bidens pilosa* L. "sillkau".
3. Aislar los principios activos que le confiere la actividad antifúngica a *Bidens pilosa* L. "sillkau" para un mejor estudio y elaboración de una forma farmacéutica.
4. Realizar el estudio antifúngico de *Bidens pilosa* L. utilizando como control positivo otros antimicóticos como: terbinafina, fluconazol, clotrimazol, etc.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Duque N. Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos de *Miconia caudata*, *Miconia sp*, *Clidemia hirta* y *Hamelia patens*; frente a los hongos *Aspergillus niger* y *Candida albicans*. [Tesis de pregrado]. Colombia - Pereira: Programa de Tecnología Química. Facultad de Tecnología. Universidad Tecnológica de Pereira; 2008.
2. Wen L, Haddad M, Fernández I, Espinoza G, Ruiz C, Neyra E. et al. Actividad antifúngica de cuatro plantas usadas en la medicina tradicional peruana. Aislamiento de 3' - Formil - 2',4',6' - trihidroxidihidrochalcona, principio activo de *Psidium acutangulum*. Rev Soc Quím Perú [revista en internet] 2011 [acceso 05 de noviembre de 2013]; 77 (3): 199-204. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rsqp/v77n3/a05v77n3.pdf>
3. Ruiz JR. Actividad Antifúngica *in vitro* y Concentración Mínima Inhibitoria mediante Microdilución de ocho plantas medicinales [Tesis de maestría]. Lima - Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Unidad de Post-Grado; 2013.
4. Davicino R, Mattar M, Casali Y, Correa S, Pettenati E, Micalizz B. Actividad antifúngica de extractos de plantas usadas en medicina popular en Argentina. Rev. peru. Biol [revista en internet] 2007 [acceso 9 de noviembre de 2013]; 14(2): 247-251. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rpb/v14n2/a11v14n02.pdf>
5. Roig J. Diccionario Botánico de nombres vulgares cubanos. La Habana - Cuba: Revolucionaria; 1988.
6. Lastra H, Ponce de León H. *Bidens pilosa* Linné. Rev Cubana Plant Medm [revista en internet] 2001 [acceso 5 de octubre de 2012]; (1): 28-33. Disponible en: [http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol6\\_1\\_01/pla07101.pdf](http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol6_1_01/pla07101.pdf)
7. Vasquez de Vasquez C. Contribuição ao estudo do picão. Arq Bras Med [revista en internet] 1986 [acceso 5 de octubre de 2012]; 60(4): 283-87. Disponible en: <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScrip>
8. Sarg T. Macro and micromorphological study of *Bidens pilosa*. Egypt Pharm Sci [revista en internet] 1993 [acceso 5 de octubre de 2012]; 34(1-3): 329-54, 355-86. Disponible en: <http://agris.fao.org/agris-search/search/display.do?f=1998%2FEG%2FEG98>
9. Cornejo V. Las plantas medicinales y su correcta utilización. Ayacucho - Perú: Facultad de Ciencias Biológicas. UNSCH. 1986.
10. Álvarez A, Montero M, Pomar F, Sánchez E. Actividad antiulcerosa de un extracto etanólico de *Bidens pilosa* L. var. *radiata* Schult. Bip. en ratas. Rev. Cubana Plant Med [revista en internet] 1998 [acceso 10 de octubre de 2012]; 3(3): 12-7. Disponible en: [http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol3\\_3\\_98/pla03398.pdf](http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol3_3_98/pla03398.pdf)
11. González A. Biological screening of uruguayan medicinal plants. J Ethnopharmacol [revista en internet] 1993 [acceso 10 de octubre de 2012]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/037887419390040C>
12. Biswas R. Ultraviolet mediated cytotoxic activity of Phenylheptatryine from B.P.J. Nat Prod [revista en internet] 1979 [acceso 10 de octubre de 2012]; 42(1): 103-11. Disponible en: <http://www.htdocs/scieloOrg/php/common.pdf>
13. Meneses J. Evaluación de la actividad cicatrizante de tallos y hojas de *Bidens pilosa* "sillkau". [tesis de pregrado]. Ayacucho - Perú: Escuela de Farmacia y Bioquímica. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2001.

14. Gonzáles V. Evaluación de la actividad diurética del extracto atomizado de *Bidens pilosa* "sillkau" en cobayos. [tesis de pregrado]. Ayacucho - Perú: Escuela de Farmacia y Bioquímica. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2003.
15. Brandão M, Krettli A, Soares L, Nery C, Marinuzzi H. Antimalarial activity of extracts and fractions from *Bidens pilosa* and other *Bidens* species (Asteraceae) correlated with the presence of acetylene and flavonoid compounds. Rev. Ethnopharmacol [revista en internet] 2004 [acceso 10 de octubre de 2012]; 93: 39-42. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9254115>
16. Huamaní M, Ruiz J. Determinación de la actividad antifúngica contra *Candida albicans* y *Aspergillus niger* de 10 plantas medicinales de 3 departamentos del Perú. [Tesis de pregrado]. Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2005.
17. Deba F, Xuan T, Yasuda M, Tawata S. Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. var. *radiata*. Food Control [revista en internet] 2007 [acceso 9 de noviembre de 2013]; 19: 346 - 352. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713507000825>.
18. Cruz A, Rodríguez N, Rodríguez C. Evaluación *in vitro* del efecto antibacteriano de los extractos de *Bidens pilosa*, *Lantana cámara*, *Schinus molle* y *Silybum marianum*. Rev. U.D.CA Act. & Div. Cient. [revista en internet] 2010 [acceso 9 de noviembre de 2013]; 13(1):117-124. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rudca/v13n2/v13n2a14.pdf>
19. Arroyo J, Bonilla P, Raez E, Barreda A, Huamán O. Efecto quimioprotector de *Bidens pilosa* en el cáncer de mama inducido en ratas. An Fac med. [revista en internet] 2010 [acceso 10 de octubre de 2012]; 71(3):153-9. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/379/37911344002.pdf>
20. Álvarez A, Corrales A, Díaz J, Cabrera M, Fuentes V, García M. Fitomed II. La Habana - Cuba: Ciencias Médicas; 1995.
21. Palacios J. Plantas Medicinales Nativas del Perú. Tomo II. Lima - Perú: CONCYTEC; 1996.
22. Taylor L. En The Healing Power of Rainforest Herbs. Carson City, NV: Raintree Nutrition [revista en internet] 2005 [acceso 10 de octubre de 2012]. Disponible en: <http://www.rain-tree.com>.
23. Lock de Ugaz O. Investigación Fitoquímica: Métodos en el estudio de Productos Naturales. 2da ed. Lima - Perú: Fondo Editorial de la PUCP; 1994.
24. Ciudad A. Infecciones vaginales por candida: Diagnóstico y tratamiento. Rev. Per Ginecol Obstet. [revista en internet] 2007 [acceso 10 de octubre de 2012]; 53: 159-166. Disponible en: [http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/ginecologia/vol53\\_n3/pdf/04v53n3.pdf](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/ginecologia/vol53_n3/pdf/04v53n3.pdf)
25. Berkhout R. *Candida albicans*. Revista Iberoam Micol [revista en internet] 2002 [acceso 10 de octubre de 2012]; 25-26. Disponible en: <http://hongos-alergenicos.reviberoammicol.com/files/025.PDF>
26. Mural R. El Manual de Microbiología Clínica. 6ta ed. Washington: Ellen J. La Biblioteca de Congreso; 1995.
27. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. Microbiología Médica. 6ta ed. Barcelona - España: Elsevier; 2009.
28. Sandner M, Mata M. *Candida albicans* como saprofita de la Mucosa lingual. Trabajo presentado en la VIII Reunión Anual de la Sociedad Venezolana de Dermatología. Valencia - España. 1972.

29. De La Rosa M, Prieto J. Microbiología en la Ciencia de la Salud. 2da. ed. Madrid - España: Elsevier; 2003.
30. Brooks G, Butel J, Morse S. Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 17ava ed. México: El Manual Moderno; 2002.
31. Herndon D. Tratamiento Integral de Quemaduras. 3era ed. Barcelona - España: Elsevier; 2009.
32. Forbes B, Sahn D, Weissfeld A. Diagnostico Microbiológico. Undécima ed. Buenos Aires - Argentina: Médica Panamericana; 2004.
33. Rémington, G. Farmacia. Tomo I y II. 20ava ed. Buenos Aires - Argentina: Médica Panamericana; 2003.
34. Meyers F, Jawetz E, Goldfien A. Farmacología Clínica. 5ta ed. México: El Manual Moderno; 1982.
35. Velázquez B. Farmacología Básica y Clínica. 18ava ed. Buenos Aires - Argentina: Médica Panamericana; 2008.
36. Fitzpatrick P. Dermatología en Medicina General. Tomo IV. 7ma ed. Buenos Aires - Argentina: Médica Panamericana; 2010.
37. Litter M. Compendio de Farmacología. 3era ed. Buenos Aires - Argentina: El Ateneo; 1988.
38. Villar del Fresno A. Farmacognosia General. 1era ed. España: Síntesis S.A.; 1999.
39. Miranda M, Cuellar A. Manual de Prácticas de Laboratorio, Farmacognosia y Productos Naturales. Instituto de Farmacia y Alimentos. La Habana - Cuba; 2000.
40. Lozina L, Boehringer S, Acosta O. Extrapolación en una Forma Posológica de valores obtenidos *in vitro* sobre Actividad Anti fúngica del propóleo. Argentina. Universidad Nacional del Noreste Comunicaciones Científicas y Tecnológicas [revista en internet] 2005 [acceso 10 de octubre del 2012]; Resumen: V-018; 2005. Disponible en: <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/com2005/4-Veterinaria/V-018.pdf>
41. Acharte D. Actividad antimicótica del aceite esencial de *Citrus aurantium* L. "naranja" frente a una cepa de *Candida albicans* ATCC 10231. [tesis de pregrado]. Ayacucho - Perú: Escuela de Farmacia y Bioquímica. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2010.
42. Domingo D, López M. Plantas con acción antimicrobiana. Madrid - España. Rev Esp Quimioterap [revista en internet] 2003 [acceso 9 de noviembre de 2013]; Vol. 16 (Nº 4): 385-393. Disponible en: <http://www.seq.es/seq/0214-3429/16/4/385.pdf>
43. Mesa A, Bueno J, Betancur L. Productos naturales con actividad antimicótica. Rev Esp Quimioterap [revista en internet] 2004 [acceso 01 de noviembre de 2013]; Vol. 17 (Nº 4): 325-331. Disponible en: <http://www.seq.es/seq/0214-3429/17/4/325.pdf>
44. Maoz M, Neeman I. Antimicrobial effects of aqueous plant extracts on the fungi *Microsporum canis* and *Trichophyton rubrum* and on three bacterial species. Letters in Applied Microbiology [revista en internet] 1998 [acceso 01 de noviembre de 2013]; 26: 61-63. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1472-765X.1998.00277.x/pdf>
45. Dixon A. Natural products and plant disease resistance. Nature [revista en internet] 2001 [acceso 01 de noviembre de 2013]; 411: 843-847. Disponible en: <http://www.nature.com/nature/journal/v411/n6839/pdf/411843a0.pdf>
46. Ramírez I, Díaz M. Actividad antibacteriana de extractos y fracciones del ruibarbo (*Rumex conglomeratus*). Scientia et Technica [revista en internet] 2007 [acceso 01 de noviembre de 2013]; 13(33): 397-400. Disponible en:

- <http://recursosbiblioteca.utp.edu.co/dspace/bitstream/11059/172/1/Actividad%20antibacteriana%20de%20extractos%20y%20fracciones%20del%20ruibarbo.pdf>
47. Avellaneda S, Rojas N, Cuéllar A, Fonseca R. Actividad antibacteriana de *Diphysa minutifolia* Rose. Rev Cubana de Plant Med. [revista en internet] 2005 [acceso 01 de noviembre de 2013]; 10(2): 42-47. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v10n2/pla04205.pdf>
  48. Barnabas CG, Nagarajan S. Antimicrobial activity flavonoids of some medicinal plants Flavonoides. Fitoterapia [revista en internet] 1988 [acceso 01 de noviembre de 2013]; 3: 508-10. Disponible en: [http://www.idpublications.com/journals/PDFs/IJA/ANTAGE\\_MostCited\\_1.pdf](http://www.idpublications.com/journals/PDFs/IJA/ANTAGE_MostCited_1.pdf).
  49. Burapedjo S, Bunchoo A. La actividad antimicrobiana de los taninos de *Terminalia citrina*. Planta Medica [revista en internet] 1995 [acceso 01 de noviembre de 2013]; 61: 365-6. Disponible en: <https://www.thieme-connect.com/ejournals/abstract/10.1055/s-2006-958103>
  50. Arif T, Bhosale J, Kumar N, Mandal T, Bendre R, Lavekar G, Dabur R. Natural products – antifungal agents derived from plants. Rev. Journal of Asian Natural Products Research [revista en internet] 2009 [acceso 01 de noviembre de 2013]; Vol. 11, No. 7, 621-638. Disponible en: [http://www.trnres.com/ebook/uploads/tiwari/T\\_1302158768Tiwari-9.pdf](http://www.trnres.com/ebook/uploads/tiwari/T_1302158768Tiwari-9.pdf)
  51. Murphy M. Plant Products as Antimicrobial Agents. Miami - EEUU. Rev. Clin. Microbiol [revista en internet] 1999 [acceso 01 de noviembre de 2013]; Vol. 12, No. 4. Disponible en: <http://www.emersonhemp.com/Documents/AntimicrobialHemp.pdf>
  52. Montes R. Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos. Rev. Mexicana de micología [revista en internet] 2009 [acceso 01 de noviembre de 2013]; 29: 73-82. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmm/v29/v29a10.pdf>

## **ANEXOS**

## ANEXO 1

Certificado de la identificación taxonómica de *Bidens pilosa* L. "sillkau".



EL JEFE DEL HERBARIUM HUAMANGENSIS DE LA FACULTAD DE  
CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN  
CRISTÓBAL DE HUAMANGA

### C E R T I F I C A

Que, la Bach. En Farmacia y Bioquímica, **Srta. Isidora Leocadia, GALINDO YUPA**, ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.

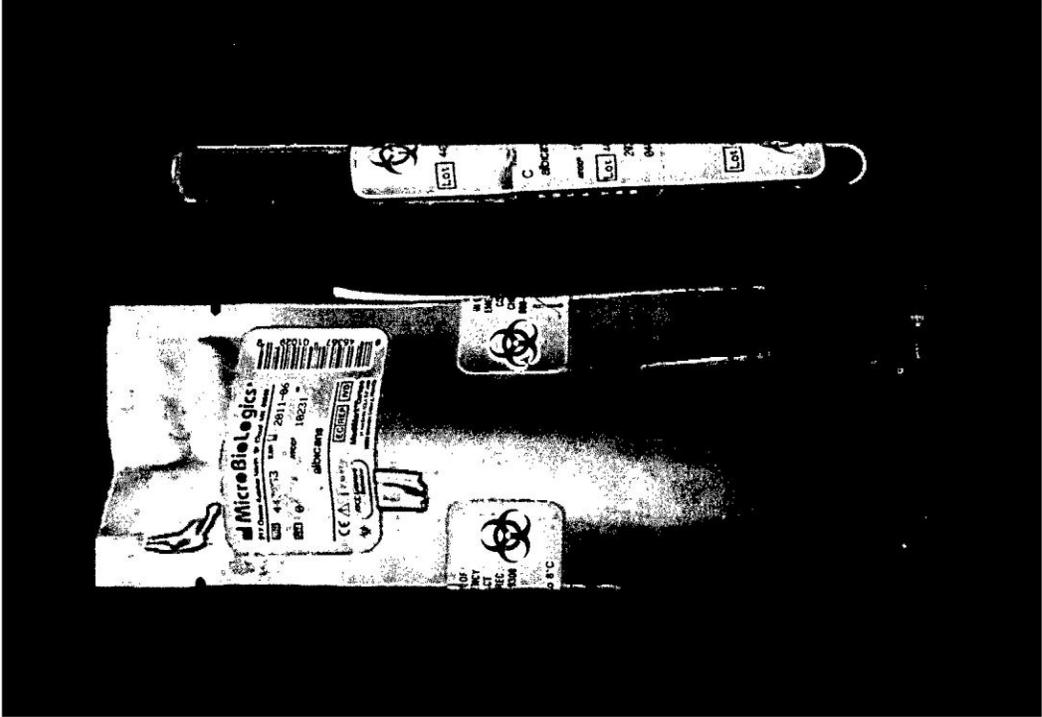
Dicha muestra ha sido estudiada y determinada según el Sistema de Clasificación de Engles and Prantl, modificada por Melchior en 1904 y es como sigue:

DIVISIÓN : ANTOPHYTA (ANGIOSPERMAE)  
CLASE : DICOTILEDONEAE  
SUB CLASE : METACLAMIDEAS  
ORDEN : CAMPANUNALES  
FAMILIA : ASTERACEAE  
GENERO : *Bidens*  
ESPECIE : *Bidens pilosa* L.  
N.V. : "sillkau"

Se expide la certificación correspondiente a solicitud de la interesada para los fines que estime conveniente.

Ayacucho, 21 de Febrero del 2013

ANEXO 2



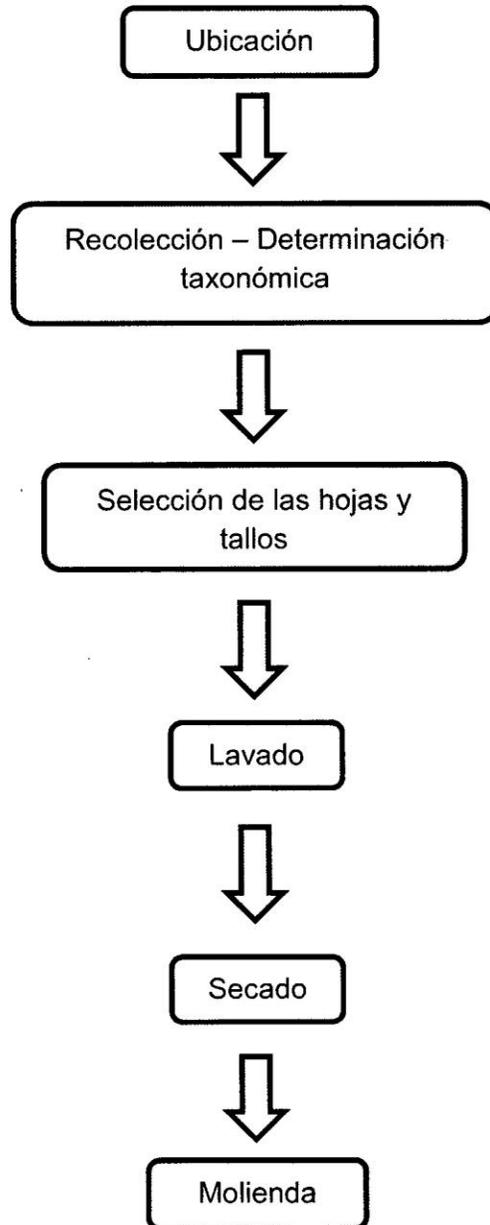
### ANEXO 3

Hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. "sillkau", de las riberas del río Huatatas.



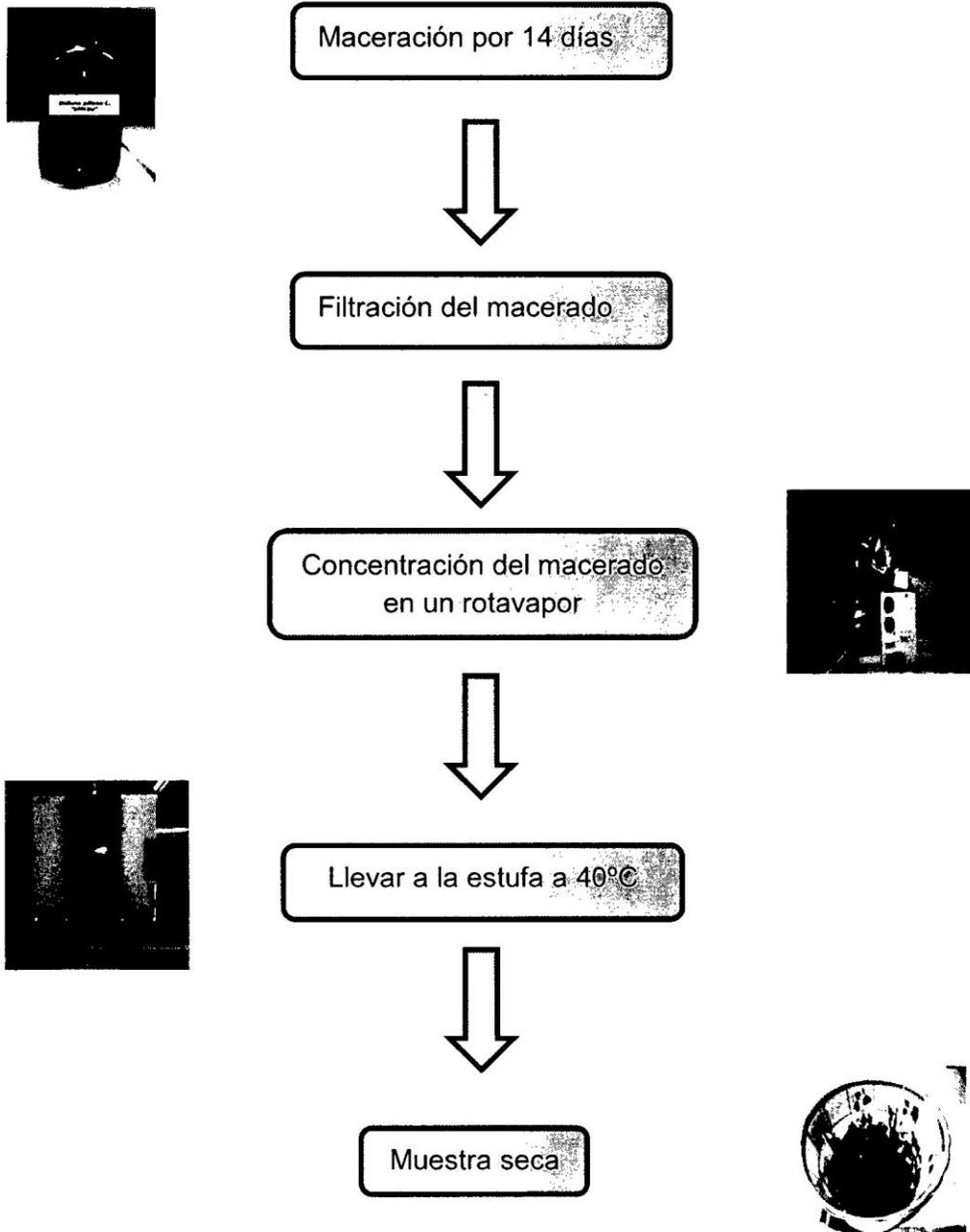
#### ANEXO 4

Flujograma del proceso de recolección y procesamiento de la muestra de *Bidens pilosa* L. "sillkau" Ayacucho-2013.



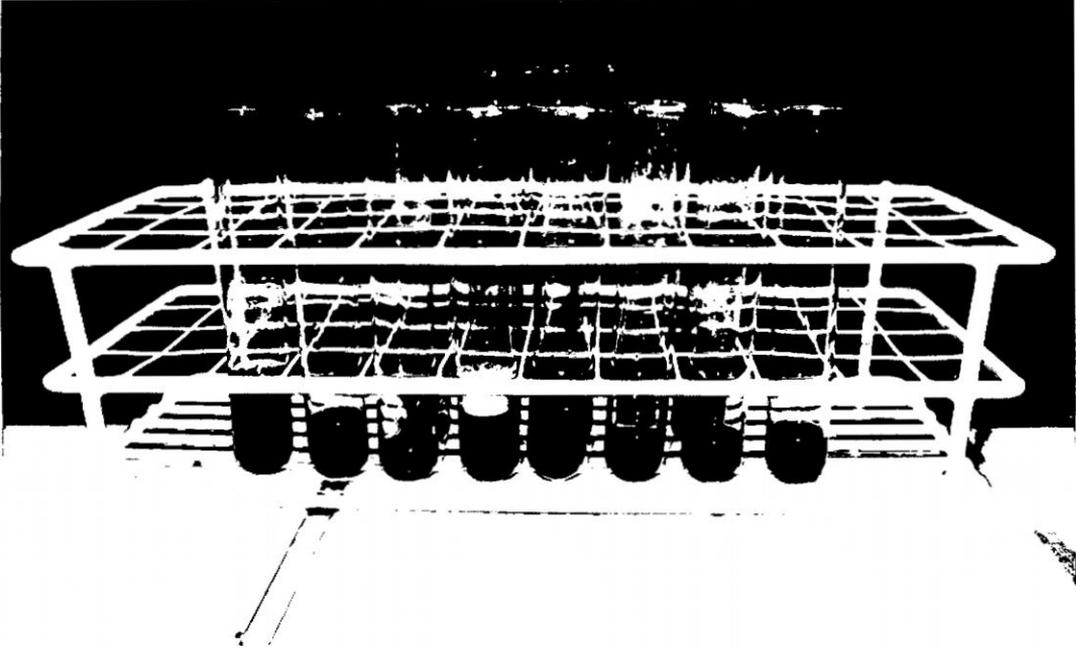
## ANEXO 5

Flujograma de la preparación del extracto hidroalcohólico de las hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. "sillkau" Ayacucho-2013.



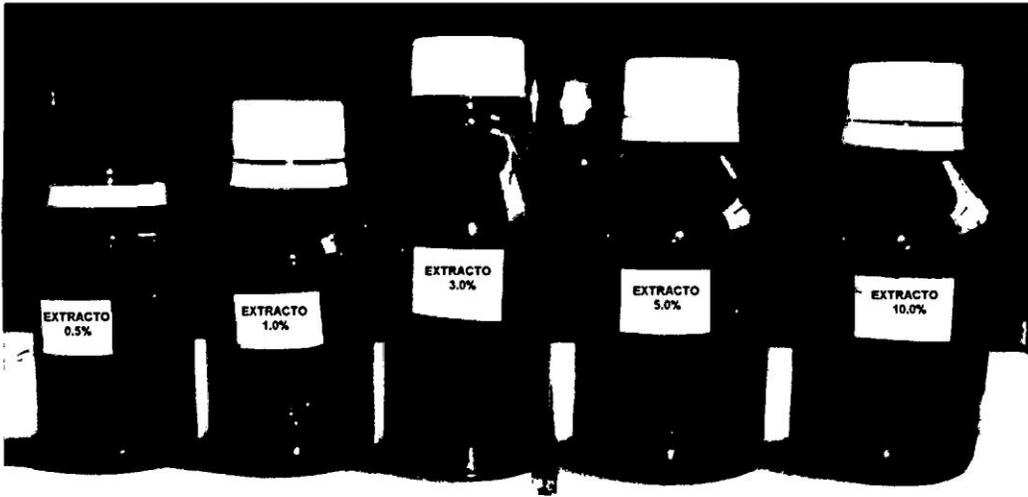
## ANEXO 6

Tubos de ensayo conteniendo los resultados del tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de las hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. "sillkau" Ayacucho-2013.



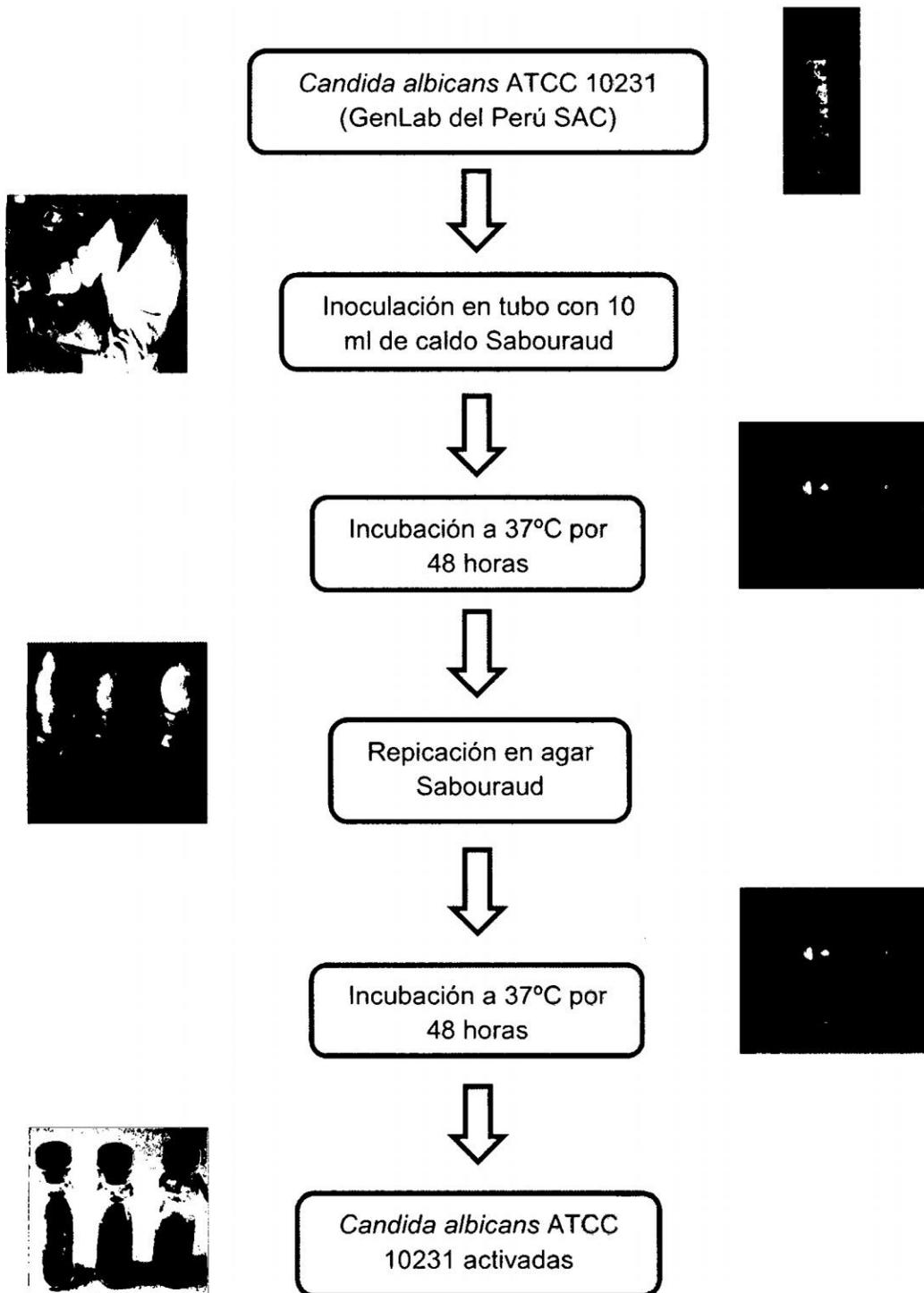
## ANEXO 7

Diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico las hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. "sillkau" Ayacucho-2013.



## ANEXO 8

Flujograma de la activación de *Candida albicans* ATCC 10231 Ayacucho-2013.



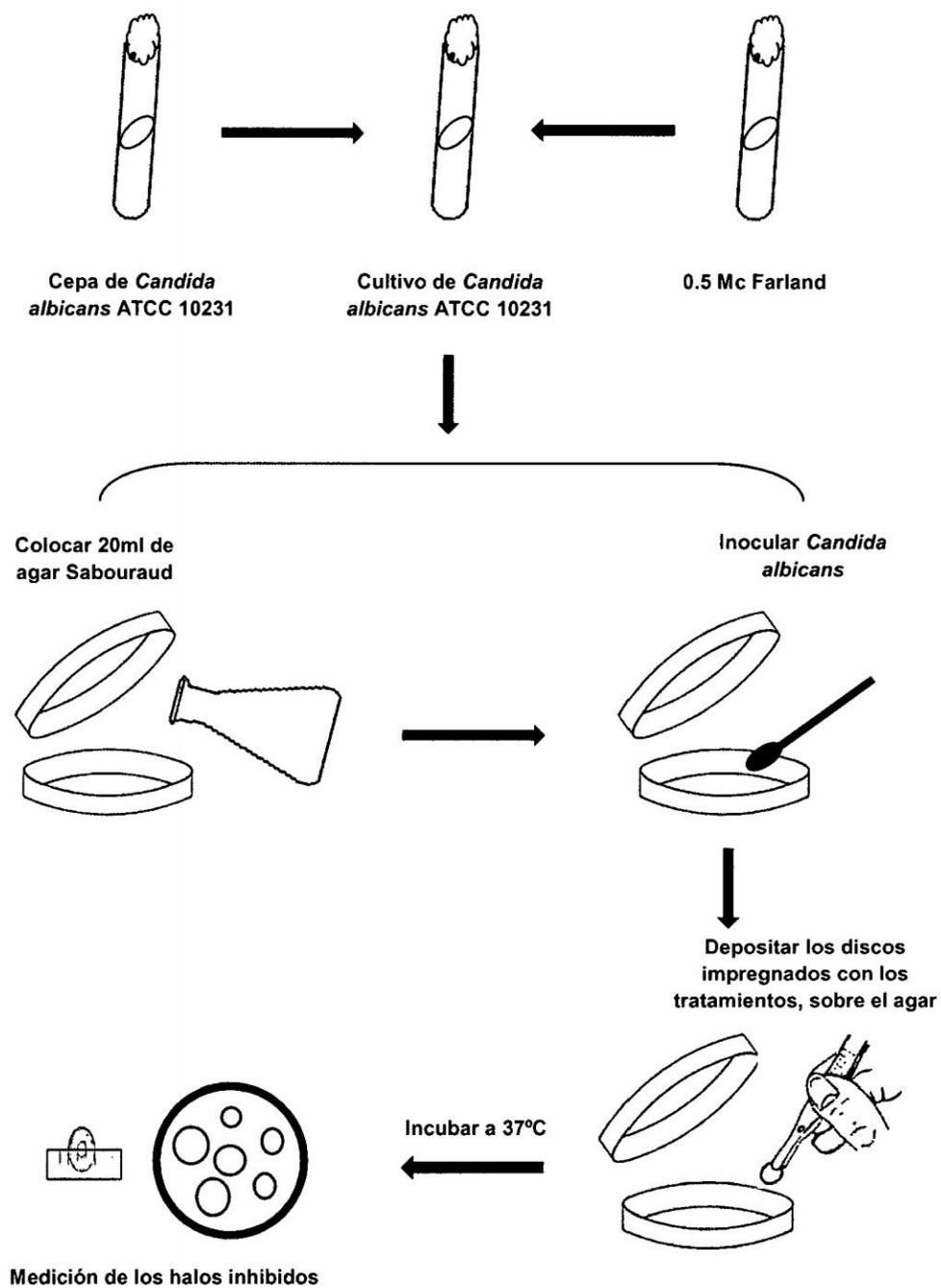
## ANEXO 9

Nistatina 100000 UI/ml (Nenistecin®), del laboratorio MKT Pharma.



## ANEXO 10

Esquema del Método de Difusión por Disco.



## ANEXO 11

Procesos de la aplicación del Método de Difusión por Disco Ayacucho-2013.



Plaqueando agar Sabouraud



Inoculando *la Candida albicans*



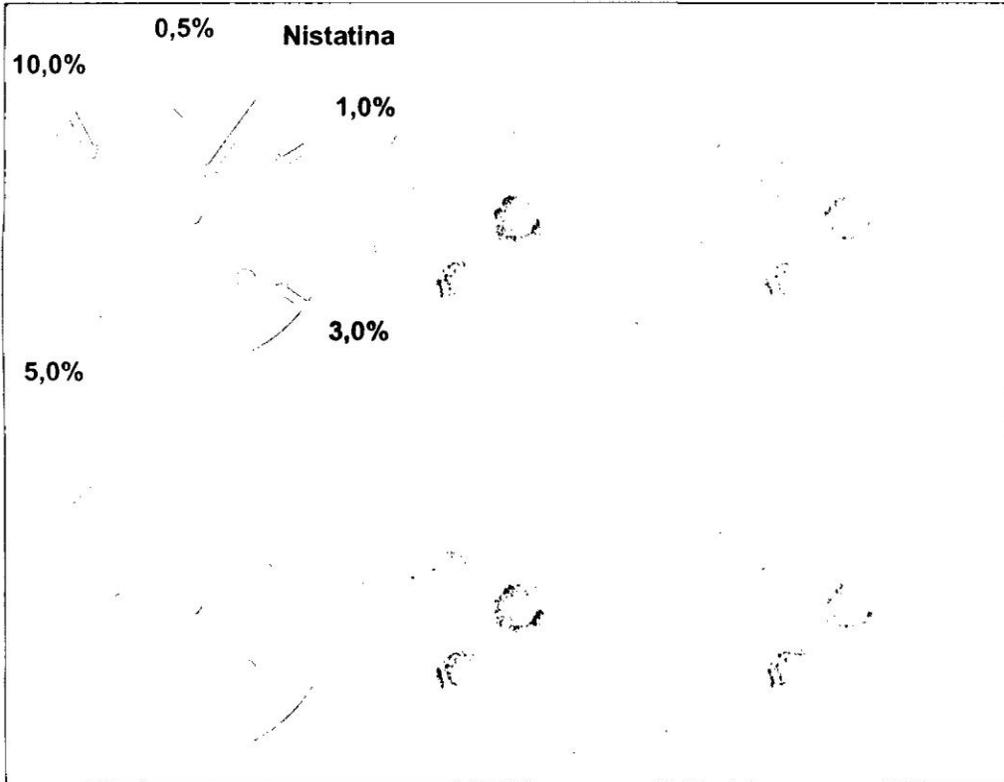
Impregnando los discos con los  
tratamientos



Colocando los discos

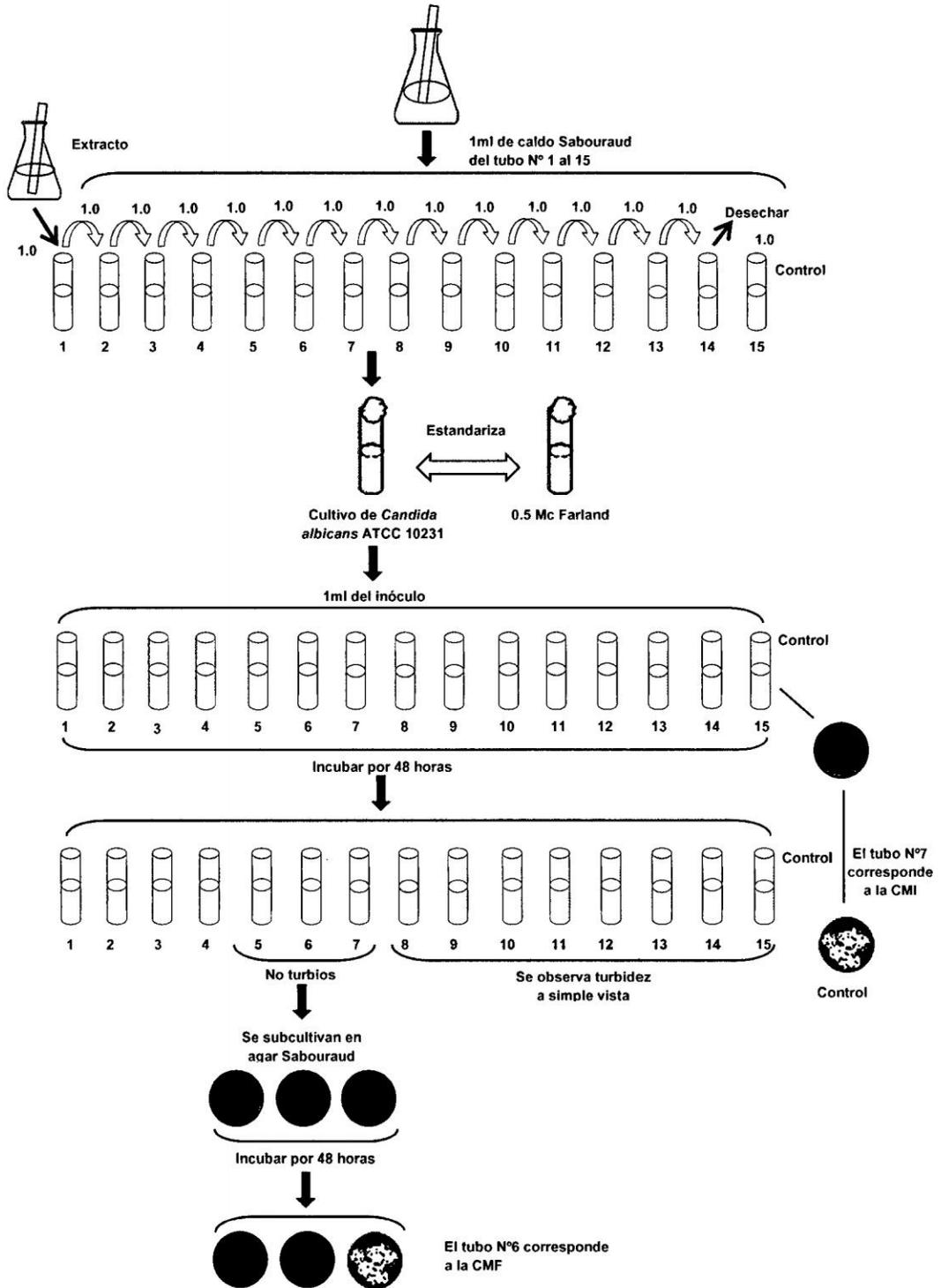
## ANEXO 12

Halos de inhibición a las concentraciones de 0,5%, 1,0%, 3,0%, 5,0% y 10,0% del extracto hidroalcohólico de las hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. "sillkau" Ayacucho-2013.



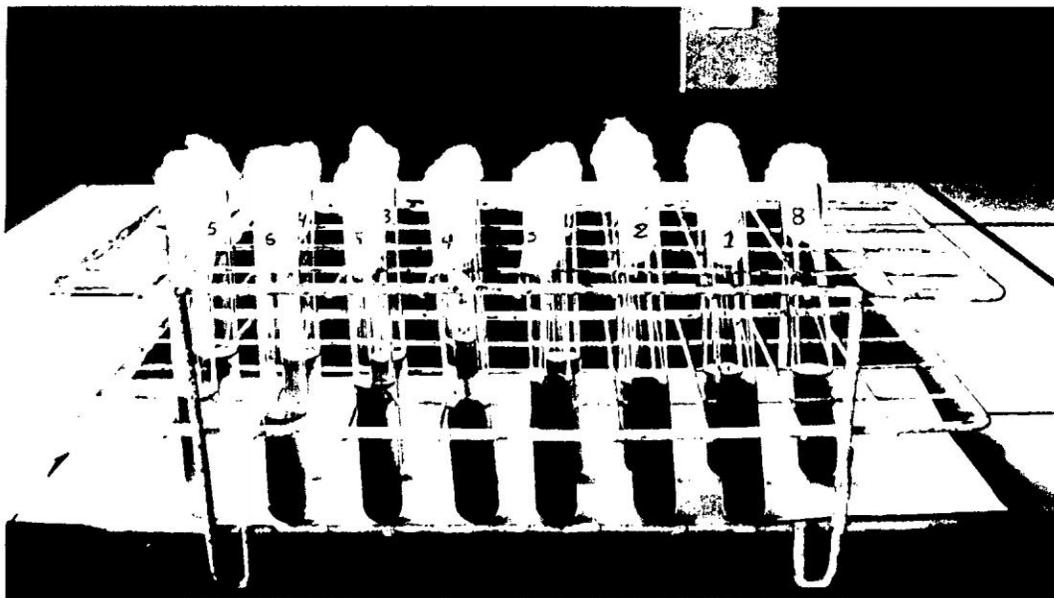
## ANEXO 13

Esquema del Proceso de la Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y de la Concentración Mínima Fungicida (CMF)



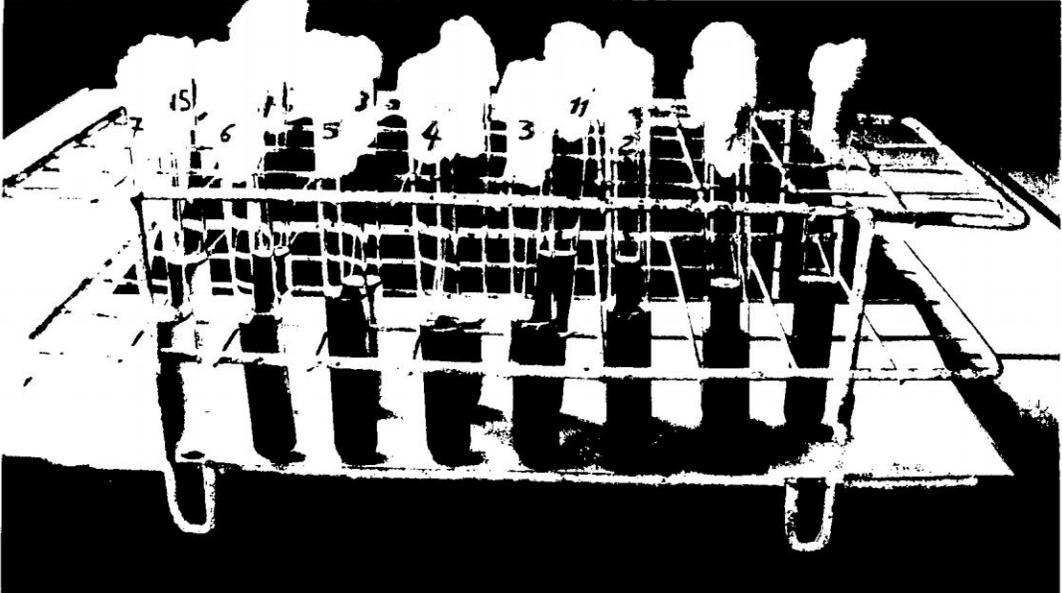
## ANEXO 14

Tubos mostrando la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto hidroalcohólico de las hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. "sillkau" al 10% Ayacucho-2013.



## ANEXO 15

Tunos mostrando la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto hidroalcohólico de las hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. "sillkau" al 5,0% Ayacucho-2013.



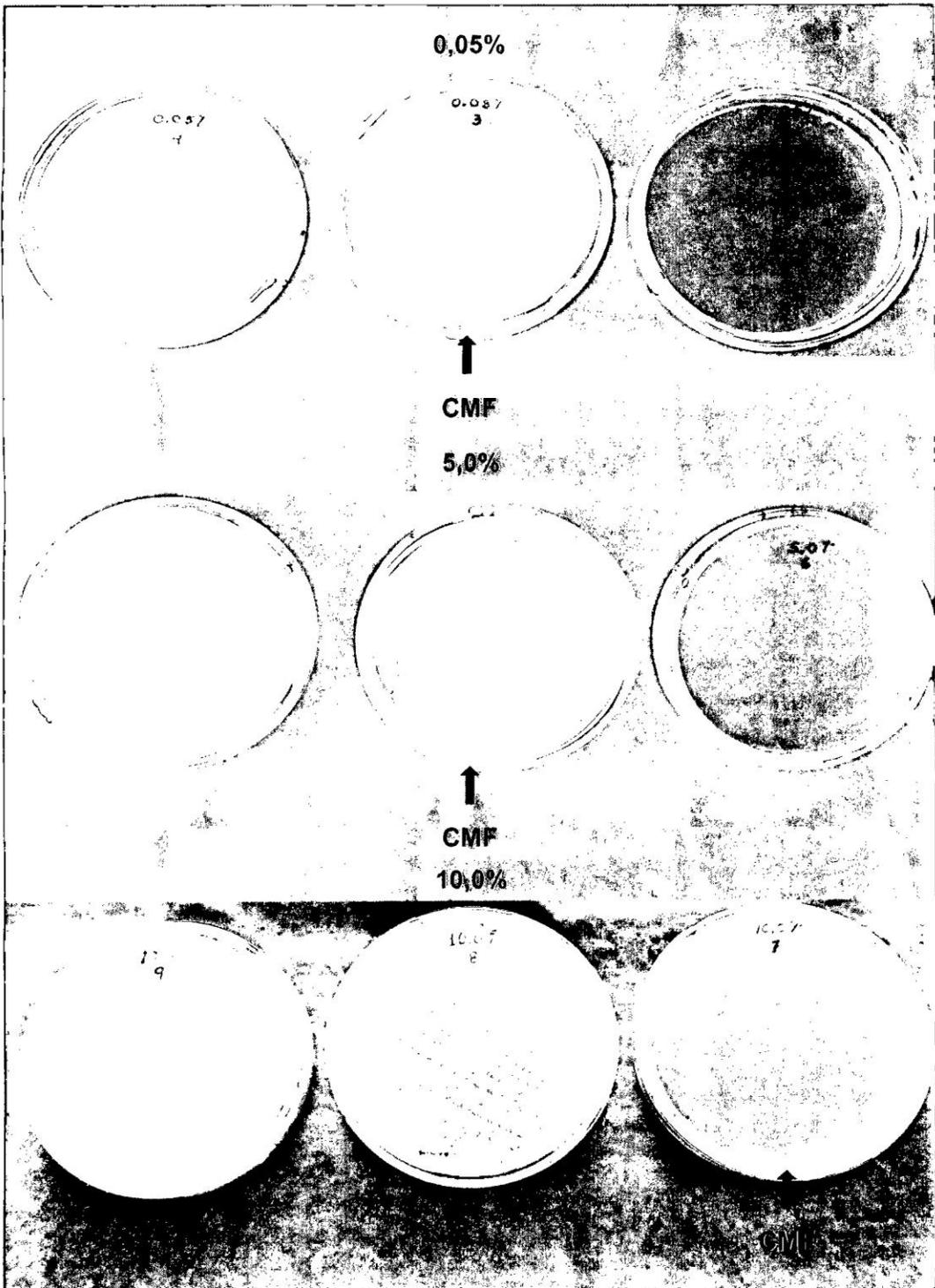
## ANEXO 16

Tubos mostrando la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto hidroalcohólico de las hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. "sillkau" al 0,5% Ayacucho-2013.



## ANEXO 17

Concentración Mínima Fungicida (CMF) de las Concentraciones de 0,5%, 5,0% y 10% del extracto hidroalcohólico de las hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. "sillkau" Ayacucho-2013.



## ANEXO 18

Diámetro de los halos de inhibición (mm) del extracto hidroalcohólico de las hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. "sillkau" Ayacucho-2013.

Repeticiones	Control	Concentraciones				
	(Nistatina)	0,5%	1,0%	3,0%	5,0%	10,0%
Diámetro de los Halos (mm)						
1	17	7	10	12	18	21
2	18	7	10	13	17	22
3	18	8	11	14	19	21
4	19	9	12	15	19	22
5	17	9	10	13	18	21
6	17	7	11	13	17	21
<b>Media</b>	<b>17,67</b>	<b>7,83</b>	<b>10,67</b>	<b>13,33</b>	<b>18,00</b>	<b>21,33</b>

## ANEXO 19

Análisis de varianza (ANOVA) de los halos de inhibición del efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de las hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. "sillkau" Ayacucho-2013.

### ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Halo de Inhibición (mm)	Inter-grupos	773,472	5	154,694	209,361	,000
	Intra-grupos	22,167	30	,739		
	Total	795,639	35			

Si: Sig. > 0.05: todos los tratamientos son estadísticamente similares.

Si: Sig. < 0.05: Por lo menos uno de los tratamientos es diferente del resto.

## ANEXO 20

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de los halos de inhibición del efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de las hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. "sillkau" Ayacucho-2013.

### Halo de inhibición (mm)

HSD de Tukey<sup>a</sup>

Tratamientos	Subset for alpha = ,05					
	N	1	2	3	4	5
0,5%	6	7,8333				
1,0%	6		10,6667			
3,0%	6			13,3333		
Nistatina	6				17,6667	
5,0%	6				18,0000	
10,0%	6					21,3333
Sig.		1,000	1,000	1,000	,984	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subgrupos homogéneos.

a. Uses harmonic Mean Sample Size = 6,000

## ANEXO 21

Análisis de varianza del porcentaje de los halos de inhibición del efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de las hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. "sillkau" Ayacucho-2013.

### ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Halo de Inhibición (mm)	Inter-grupos	22982,537	4	5745,634	345,244	,000
	Intra-grupos	416,057	25	16,642		
	Total	23398,593	29			

Si: Sig. > 0.05: todos los tratamientos son estadísticamente similares.

Si: Sig. < 0.05: Por lo menos uno de los tratamientos es diferente del resto.

## ANEXO 22

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey del porcentaje de los halos de inhibición del efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de las hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. "sillkau" Ayacucho-2013.

### % de Inhibición

HSD de Tukey<sup>a</sup>

Tratamientos	Subset for alpha = ,05					
	N	1	2	3	4	5
0,5%	6	44,3333				
1,0%	6		60,3633			
3,0%	6			75,4133		
5,0%	6				101,9600	
10,0%	6					120,8800
Sig.		1,000	1,000	1,000	,984	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subgrupos homogéneos.

a. Uses harmonic Mean Sample Size = 6,000

**ANEXO 23**  
**MATRIZ DE CONSISTENCIA**

TÍTULO	PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEÓRICO	HIPÓTESIS	VARIABLES	METODOLOGÍA
<p>Actividad antifúngica del extracto hidroalcohólico de las hojas y tallos de <i>Bidens pilosa</i> L. "sillkau" frente a una cepa de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231. Ayacucho, 2013.</p>	<p>¿Cuál es actividad antifúngica del extracto hidroalcohólico de las hojas y tallos de <i>Bidens pilosa</i> L. "sillkau" frente a una cepa de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231. Ayacucho, 2013.</p>	<p><b>Objetivo General</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Determinar la actividad antifúngica del extracto hidroalcohólico de las hojas y tallos de <i>Bidens pilosa</i> L. "sillkau" frente a una cepa de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.</li> </ul> <p><b>Objetivos específicos</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Determinar la concentración óptima antifúngica del extracto hidroalcohólico de hojas y tallos de <i>Bidens pilosa</i> L. "sillkau"</li> <li>Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Fungicida (CFM), del extracto hidroalcohólico de hojas y tallos de <i>Bidens pilosa</i> L. "sillkau".</li> <li>Identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas y tallos de <i>Bidens pilosa</i> L. "sillkau"</li> </ul>	<p>1. Antecedentes 2. <i>Bidens pilosa</i> L. • Clasificación taxonómica • Descripción botánica • Distribución geográfica • Composición química. • Propiedades y usos medicinales. 3. Metabolitos secundarios 4. <i>Candida albicans</i> • Ubicación taxonómica. 5. Nistatina</p>	<p>El extracto hidroalcohólico de las hojas y tallos de <i>Bidens pilosa</i> L. "sillkau" tiene actividad antifúngica frente a una cepa de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.</p>	<p><b>Variable independiente</b></p> <p>El extracto hidroalcohólico de las hojas y tallos de <i>Bidens pilosa</i> L. "sillkau"</p> <p><b>Indicadores</b></p> <p>Concentraciones:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 0,5 %</li> <li>- 1,0 %</li> <li>- 3,0 %</li> <li>- 5,0 %</li> <li>- 10,0 %</li> </ul> <p><b>Variable dependiente</b></p> <p>Actividad antifúngica del extracto hidroalcohólico de las hojas y tallos de <i>Bidens pilosa</i> L. "sillkau".</p> <p><b>Indicadores</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Halos de inhibición</li> <li>Concentración Mínima Inhibitoria</li> <li>Concentración Fungicida Mínima</li> </ul>	<p><b>Tipo de Investigación</b> Experimental</p> <p><b>Muestra biológica</b> Dos kg de hojas y tallos de <i>Bidens pilosa</i> L. "sillkau" recolectadas durante el mes de febrero del 2013, en las riberas del río Huatatas, en la provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho ubicado a 2 725 m.s.n.m.</p> <p><b>Microorganismo de ensayo</b> <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.</p> <p><b>Determinación de la actividad antifúngica:</b> La metodología empleada para la determinación de la actividad antifúngica se basó en el Método de Difusión por disco.</p> <p><b>Análisis Estadístico:</b> Los resultados se procesaran en cuadros mediante el análisis de varianza (ANOVA) y comparaciones múltiples de Tukey con un nivel de significancia de 0,05.</p>