

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN
CRISTÓBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE
FARMACIA Y BIOQUÍMICA**



Actividad antimicótica del aceite esencial y del extracto

hidroalcohólico de *Satureja brevicalyx* Epl.

“wayra muña” sobre una cepa de *Candida albicans*

ATCC 10231, Ayacucho 2013.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO

PRESENTADO POR:

Bach. MONTES CASAVILCA, EVER ZENÓN

AYACUCHO - PERÚ

2014

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Bach: Ever Zenón Montes Casavilca

R.D.Nº: 078-2014-FCB-D

En la ciudad de Ayacucho siendo las diez de la mañana con quince minutos del día veinticinco de Julio del 2014, en el auditorio, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, reunidos miembros del Jurado Evaluador presidido por el Dr. Víctor Alegría Valeriano encargado mediante memorando N° 258-2014-UNSC-FCB, e integrada por los profesores Mg. Serapio Romero Gavilán, Mg. Marco Rolando Aronés Jara, Mg. Enrique Javier Aguilar Felices y el Dr. Víctor Alegría Valeriano como Presidente y Miembro del Jurado Evaluador, y como secretario Docente el Blgo. Elbert Hermoza Valdivia, con la finalidad de recepcionar la tesis titulada: Actividad antimicótica del aceite esencial y del extracto hidroalcohólico de *Satureja brevicalyx* Epl. "wayra muña" sobre una cepa de *Candida albicans* ATCC 10231, Ayacucho 2013, presentado por el bachiller en Farmacia y Bioquímica Ever Zenón Montes Casavilca, con el que pretende optar el título profesional de Químico Farmacéutico.

Con la finalidad de que pueda dar inicio a la sustentación de su tesis, el Dr. Víctor Alegría Valeriano, habiendo constatado el expediente, dio la respectiva autorización para que exponga su trabajo en un tiempo no mayor a 45 minutos de esta forma el Sr. sustentante da inicio a su exposición.

Concluida la exposición, el Sr. Presidente encargado Dr. Alegría invitó al jurado evaluador para que puedan realizar sus preguntas y solicitar las aclaraciones necesarias que crean convenientes, a lo que el sustentante dio sus respuestas.

Concluido con este capítulo el Dr. Alegría invitó al público asistente y al mismo sustentante para que puedan desocupar el auditorio con la finalidad de realizar


las respectivas discusiones y calificación de la tesis expuesta; de lo que se puede tener el siguiente resultado:

Miembro Jurado	Exposición	Respuestas	Promedio
Dr. Víctor Humberto Alegría Valeriano	17	16	17
Mg. Serapio Romero Gavilán	16	15	16
Mg. Marco Rolando Aronés Jara	17	17	17
Mg. Enrique Javier Aguilar Felices	17	15	16
		Promedio	17

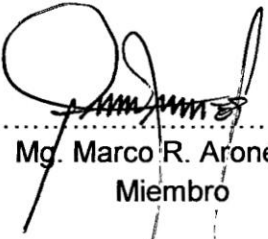
De la calificación realizada se tiene la nota de diecisiete (17) de lo que se desprende que es aprobatoria.

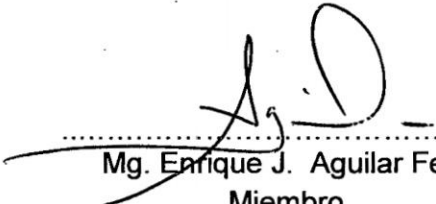
A continuación se invita al sustentante y público para que puedan ingresar al auditorio con la finalidad de que se le dé a conocer el resultado y tomar el juramento de ley.

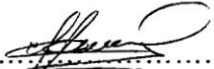
El acto de sustentación termina siendo las 12:20 pm del día, y en fe de lo que se firma al pie en conformidad del resultado.


.....
Dr. Víctor H. Alegría Valeriano
Presidente Miembro


.....
Mg. Serapio Romero Gavilán
Miembro


.....
Mg. Marco R. Aronés Jara
Miembro


.....
Mg. Enrique J. Aguilar Felices
Miembro


.....
Blgo. Ebert Hermoza Valdivia
Sec. docente

DEDICATORIA

Gracias a Dios por esta vida maravillosa.
A mis padres Pablino y Zenaida, a mi
hermana Isabel y a Liliana mi gran amor.

AGRADECIMIENTO

A mi querida Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, por la acogida durante mis estudios universitarios.

A los docentes de la Facultad de Ciencias Biológicas y de la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica que hicieron posible mi formación profesional.

A mis asesores del presente trabajo: Q.F. Marco Aronés Jara y Blgo. Víctor Luis Cárdenas López, gracias por todo el apoyo brindado, por sus consejos y orientaciones.

Y mi eterno agradecimiento a todas las personas que de una u otra manera contribuyeron en la realización del presente trabajo de investigación.

ÍNDICE

	Página
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
ÍNDICE DE TABLAS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE ANEXOS	vii
RESUMEN	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. <i>Satureja brevicalyx</i> Epl.	5
2.3. <i>Candida albicans</i>	7
2.4. Nistatina	9
III. MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.1. Lugar de ejecución	11
3.2. Muestra vegetal	11
3.3. Microorganismo de ensayo	11
3.4. Diseño metodológico para la recolección de datos	11
3.4.1. Recolección y procesamiento de la muestra	11
3.4.2. Preparación del extracto hidroalcohólico	12
3.4.3. Extracción del aceite esencial y determinación del rendimiento	12
3.4.4. Análisis físico del aceite esencial	12
3.4.5. Identificación de los metabolitos secundarios	14
3.4.6. Determinación de la actividad antimicótica	14
3.4.7. Determinación del halo de inhibición	15
3.4.8. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria	16
3.4.9. Determinación de la Concentración Mínima Fungicida	17
3.5. Análisis de datos	17
IV. RESULTADOS	18
V. DISCUSIÓN	25
VI. CONCLUSIONES	30
VII. RECOMENDACIONES	31
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de <i>Satureja brevicalyx</i> Epl, Ayacucho 2013.	19
Tabla 2. Características organolépticas y propiedades físicas del aceite esencial de <i>Satureja brevicalyx</i> Epl, Ayacucho 2013.	20
Tabla 3. Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Fungicida del aceite esencial de <i>Satureja brevicalyx</i> Epl, Ayacucho 2013.	23
Tabla 4. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Fungicida (CMF) del extracto hidroalcohólico de <i>Satureja brevicalyx</i> Epl, Ayacucho 2013.	24

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Porcentaje de inhibición del aceite esencial de <i>Satureja brevicalyx</i> Epl. en comparación con la nistatina, Ayacucho 2013.	21
Figura 2. Porcentaje de inhibición del extracto hidroalcohólico de <i>Satureja brevicalyx</i> Epl. en comparación con la nistatina, Ayacucho 2013.	22

ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
Anexo 1. Certificado de identificación taxonómica de la planta, Ayacucho 2013.	37
Anexo 2. Hojas y tallos de <i>Satureja brevicalyx</i> Epl, Ayacucho 2013.	38
Anexo 3. Cepa liofilizada de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 (GenLab del Perú), Lima 2013.	39
Anexo 4. Análisis físico del aceite esencial de <i>Satureja brevicalyx</i> Epl, Ayacucho 2013.	40
Anexo 5. Esquema del método de difusión por disco, Ayacucho 2013.	41
Anexo 6. Halos de inhibición a las concentraciones de 0,5%; 1%; 3%; 5% y 10% del aceite esencial y del extracto hidroalcohólico de <i>Satureja brevicalyx</i> Epl, Ayacucho 2013.	42
Anexo 7. Esquema del proceso de la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y de la Concentración Mínima Fungicida (CMF), Ayacucho 2013.	43
Anexo 8. Concentración Mínima Fungicida (CMF) del aceite esencial y del extracto hidroalcohólico de <i>Satureja brevicalyx</i> Epl, Ayacucho 2013.	44
Anexo 9. Análisis de varianza de los halos de inhibición del aceite esencial de <i>Satureja brevicalyx</i> Epl, Ayacucho 2013.	45
Anexo 10. Análisis de varianza de los halos de inhibición del extracto hidroalcohólico de <i>Satureja brevicalyx</i> Epl, Ayacucho 2013.	46
Anexo 11. Prueba de comparaciones múltiples de Tukey del porcentaje de los halos de inhibición del aceite esencial de <i>Satureja brevicalyx</i> Epl, Ayacucho 2013.	47
Anexo 12. Prueba de comparaciones múltiples de Tukey del porcentaje de los halos de inhibición del extracto hidroalcohólico de <i>Satureja brevicalyx</i> Epl, Ayacucho 2013.	48
Anexo 13. Matriz de consistencia.	49

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó con la finalidad de determinar la actividad antimicótica del aceite esencial y del extracto hidroalcohólico de las hojas y tallos de *Satureja brevicalyx* Epl. "wayra muña" sobre una cepa de *Candida albicans* ATCC 10231.

La investigación se llevó a cabo en los laboratorios del Área de Farmacia y Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, de julio a noviembre del 2013. La muestra fue recolectada en el distrito de Churcampa, región de Huancavelica a 3240 msnm. La investigación que se desarrolló es del tipo básico-descriptivo.

El ensayo fitoquímico cualitativo del extracto hidroalcohólico se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Miranda y Cuéllar, encontrándose: flavonoides, triterpenos, esteroides, fenoles, taninos y lactonas; y el análisis físico del aceite esencial reportó un rendimiento de 0,14% v/p, una densidad de 0,9542 g/ml, un índice de refracción de 1,468 nD, sólidos totales de 71 Brix% y una rotación óptica de +27,10°.

Para la determinación de la actividad antimicótica se utilizó el método de difusión con discos (Kirby-Bauer) referido a los halos de inhibición, realizando cinco concentraciones para cada prueba y tomando como control positivo la nistatina. Se utilizó el método de dilución en caldo para hallar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Fungicida (CMF). El aceite esencial mostró mayor halo de inhibición a la concentración del 10%, en tanto que el extracto hidroalcohólico a 0,5%, ambos halos resultaron ser menores que la nistatina. La CMI y la CMF para el aceite esencial fueron de 1,198 mg/ml y 2,396 mg/ml respectivamente; en tanto que para el extracto hidroalcohólico la CMI y la CMF fueron de 0,046 mg/ml y 0,093 mg/ml respectivamente.

Por todo esto se concluye que el extracto hidroalcohólico de *Satureja brevicalyx* Epl. "wayra muña" posee mayor actividad antimicótica sobre la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231 que el aceite esencial de dicha planta.

Palabra clave: *Satureja brevicalyx* Epl, actividad antimicótica, *Candida albicans*.

I. INTRODUCCIÓN

Durante la última década se ha observado un incremento de las enfermedades micóticas, sobre todo la de tipo oportunista con la aparición de nuevas formas clínicas de micosis, y el número de agentes antimicóticos desarrollados ha sido relativamente escaso comparando con los antibacterianos empleados en terapéutica pues eran menos comunes que las causadas por bacterias; sin embargo, debido al uso frecuente de antibióticos, adrenocorticoides, inmunosupresores, radioterapia y a otros factores, se ha incrementado el número de individuos susceptibles a micosis secundarias severas.^{1,2}

Recientemente el uso de aceites esenciales y extractos vegetales como bactericidas y fungicidas ha cobrado mayor importancia. Los aceites esenciales son uno de los grupos más prometedores, reconocidos por presentar actividad contra un gran número de microorganismos, incluyendo especies resistentes a los antibióticos y antifúngicos. Entre las innumerables especies vegetales que crece de forma silvestre con ancestral aplicación medicinal esta la *Satureja brevicalyx* Epl. "wayra muña", usados popularmente como analgésico, antiinflamatorio, antimicrobiano y para afecciones gastrointestinales.^{3,4}

Diversos estudios han demostrado su actividad antiinflamatoria y analgésica, antiespasmódica, antioxidante, hepatoprotectora, antibacteriana, explorándose los metabolitos presentes en su aceite esencial y extracto hidroalcohólico.^{4,5,6,7,8}

Sin embargo, se desconoce su actividad antimicótica sobre la *Candida albicans*, teniendo como antecedentes diversas especies del género *Satureja* que han mostrado tener dicha actividad en varios tipos de hongos especialmente en el género *Candida*. Además se sabe que el aceite esencial y el extracto hidroalcohólico de *Satureja brevicalyx* Epl. poseen diferente composición debido al distinto tipo de extracción que se realiza para cada uno de ellos. Todo esto motivó a realizar la presente investigación tanto del aceite esencial como del extracto hidroalcohólico de *Satureja brevicalyx* Epl. "wayra muña" planteando los siguientes objetivos:

Objetivo General

- Determinar la actividad antimicótica del aceite esencial y del extracto hidroalcohólico de *Satureja brevicalyx* Epl. "wayra muña" sobre una cepa de *Candida albicans* ATCC 10231.

Objetivos específicos

- Identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de *Satureja brevicalyx* Epl. "wayra muña".
- Determinar las características organolépticas y propiedades físicas del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* Epl. "wayra muña".
- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Fungicida (CFM) del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* Epl. "wayra muña".
- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria y la Concentración Mínima Fungicida del extracto hidroalcohólico de *Satureja brevicalyx* Epl. "wayra muña".
- Comparar la actividad antimicótica del aceite esencial con el extracto hidroalcohólico de *Satureja brevicalyx* Epl. "wayra muña".

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

En el 2005, Dilek e investigadores de Turquía realizaron un estudio de la actividad antibacteriana y antifúngica *in vitro* de seis aceites esenciales del género *Satureja* y de sus componentes principales. La actividad antifúngica de estos aceites esenciales se evaluó frente a *Candida albicans* (OGU) la cual fue inhibido por todos los aceites esenciales. El carvacrol fue el componente principal de los aceites de *S. macrantha*, *S. cuneifolia* y *S. thymbra*. El aceite esencial de *S. hortensis* (2) contenía 43,4% de timol y los aceites de *S. hortensis* (1) contenía 40,6% de timol; *S. aintabensis* contenía como componente principal 59% de p-cimeno.⁹

En el 2006, López investigó la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* "ruyaq muña" frente a *Helicobacter pylori*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi* y *Pseudomonas aeruginosa*. Los porcentajes de inhibición comparados con ciprofloxacino fueron: *H. pylori* 177,27%; *S. dysenteriae* 126,11%; *S. typhi* 63,44% y *P. aeruginosa* 42,29%. Además se detectó la presencia de fenoles. Estos resultados validaron la actividad antimicrobiana, debido a los componentes del aceite esencial.⁸

En el 2007, Carhuapoma realizó un estudio de la composición química del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* Epl. y del efecto antibacteriano frente al

Helicobacter pylori; donde reportó 35 compuestos al 97,1%; entre estas tenemos a: pulegona, linalol, mentona, isomentona, cis-isopulegona, trans-isopulegona, carvacrol, timol, α -terpineol, biciclogermacreno, β -cariofileno, bicicloelemeno, p-cimeno, limoneno, γ -terpineno, y el espatulenol. Y utilizando el método de difusión de discos, obtuvo un halo de inhibición de 33,33% en comparación con la amoxicilina a una concentración de 10 μ g/ml, obteniendo una CMI de 1 μ g/ml y una CMB de 2 μ g/ml.¹⁰

En el 2011, Urcuhuaranga estudió la actividad antifúngica del extracto hidroalcohólico de *Lepechinia meyenii* (Walp) Epl. "pacha salvia" frente a *Candida albicans* y *Candida glabrata* donde reportó que a 50 mg/ml, tiene actividad antifúngica similar a la nistatina cuya CMI para *Candida glabrata* fue de 12,5 mg/ml y su CMF fue de 25 mg/ml y para *Candida albicans* la CMI fue de 25 mg/ml y su CMF fue de 50 mg/ml.¹¹

En el 2012, Maraví estudió el efecto antibacteriano y antifúngico *in vitro* del aceite esencial de: *Mentha piperita* "menta", *Origanum vulgare* "orégano" y *Cymbopogon citratus* "hierba luisa" sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 10746 y *Candida albicans* ATCC 90028. El aceite esencial de "orégano" y "hierba luisa" obtuvieron mayor efectividad antibacteriana y antifúngica que los controles positivos: clorhexidina al 0,12% y nistatina, a excepción de la "menta" que al 50% obtuvo menor acción que los controles positivos.¹²

En el 2012, Diva y otros estudiosos realizaron una investigación en la Universidad de Ciencias Médicas de Urmia en Irán, demostrando que el extracto alcohólico de *Satureja hortensis* fue capaz de inhibir el crecimiento *in vitro* de algunos aislados clínicos de *Candida* incluyendo *Candida albicans* y tres especies de *Aspergillus*, y a concentraciones más altas fue capaz de producir la muerte de estos.¹³

2.2. *Satureja brevicalyx* Epl.

2.2.1. Clasificación taxonómica

División : Magnoliophyta
Clase : Magnoliopsida
Sub clase : Asteridae
Orden : Lamiales
Familia : Lamiaceae
Género : *Satureja*
Especie : *Satureja brevicalyx* Epl.

Nombre vulgar: "wayra muña"

Fuente: Certificado expedido por el *Herbarium Huamangensis* de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga; 2013 (Anexo 1).

2.2.2. Descripción botánica

La "wayra muña" es una planta de porte arbustiva perennifolia, erguida de 1 a 1,5 metros de altura, es aromática y pubescente. Tiene hojas muy pequeñas, espatuladas, sésiles, verticiladas y opuestas, de margen entero. Con flores blancas, solitarias, axilares, tetrámeras, bilabiadas; cáliz gamosépalo; corola gamopétala; androceo con estambres didínamos; gineceo con ovario súpero, estilo apical y estigma simple. Florece en primavera y verano.¹⁴

2.2.3. Distribución geográfica

En el Perú *Satureja brevicalyx* Epl. crece en territorios alto andinos mayormente entre los 3500 y 3800 msnm. Su hábitat es de clima frío, creciendo de manera silvestre en las montañas y faldas de los cerros. Se desarrolla y crece en Cuzco, Apurímac, Huancavelica, Junín y en su mayor cantidad y siendo vernácula y aborígen del departamento de Ayacucho.¹⁵

2.2.4. Antecedentes etnobotánicas y etnofarmacológicas

La “wayra muña” es usada para resolver problemas gastrointestinales y para la corrección de desórdenes menstruales. Es digestivo, es usado contra la gastritis, flatulencia y antiespasmódica. También es usado como analgésico, en caso de dolores musculares y tortícolis.^{4,14,16}

2.2.5. Composición química

El extracto hidroalcohólico de *Satureja brevicalyx* Epl. evidenció los siguientes metabolitos: resinas, azúcares reductores, catequinas, lactonas sesquiterpénicas, triterpenos, esteroides, saponinas, taninos, flavonoides y aceite esencial.⁴

La composición química del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* Epl. presentó 35 compuestos al 97,1% entre estas tenemos: monoterpenos oxigenados (74,8%) como componentes mayoritarios la pulegona, linalol, mentona, isomentona, cis-isopulegona, trans-isopulegona, carvacrol, timol y α -terpineol; hidrocarburos sesquiterpénicos (16%) destacando bicilogermacreno, β cariofileno y bicicloelemeno; hidrocarburos monoterpénicos (4,1%) con el p cimeno, limoneno y γ -terpineno; y sesquiterpenos oxigenados (1,5%) con el espatulenol.¹⁰

2.2.6. Investigaciones farmacológicas

Soto estudió la actividad analgésica del extracto hidroalcohólico de *S. brevicalyx* en 400 mg/kg de peso, aproximando tal actividad a la del ácido acetilsalicílico y estando por debajo del ketorolaco.⁴

Diez *et al*, estudiaron la actividad antiespasmódica sobre el intestino aislado de cobayo de una infusión acuosa al 5% de hojas y sumidades floridas de *Satureja brevicalyx*, mostrando una ligera acción antiespasmódica comparado con la N-butilbromuro de hioscina.⁵

Aguilar logró aislar dos flavonoides de las hojas de *Satureja brevicalyx* Epl. identificados como la apigenina y la naringenina demostrando tener actividad antioxidante mayor al 90%, superior a la rutina y ligeramente inferior a la vitamina C; asimismo los flavonoides demostraron tener actividad antiinflamatoria a la dosis de 200 mg/kg similar al diclofenaco.¹⁷

2.3. *Candida albicans*

La especie *Candida albicans* es la más importante de su género. Puede crecer en muchos medios a 37°C. Aunque presenta dimorfismo es frecuente su crecimiento levaduriforme. Cuando crece en medios adversos (falta de humedad, oxígeno, etc.) lo hace formando hifas. En tejidos infectados pueden observarse las dos formas de crecimiento.¹⁸

2.3.1. Clasificación taxonómica

Reino : Fungi
División : Mycota
Subdivisión: Deuteromycotina
Clase : Deuteromycetes
Subclase : Blastomycetidae
Familia : Cryptococcaceae
Género : *Candida*
Especie : *Candida albicans*¹⁹

2.3.2. Etiología y morfología

La *Candida* es un género de hongos levaduriformes, unicelulares, de forma ovoide, con o sin brote, que miden de 3 a 6 µm de diámetro. Existen más de 150 especies de *Candida*; no obstante son muy pocas las que causan infecciones en el hombre. Los cultivos del género *Candida* presentan colonias cremosas, blanco-amarillentas, lisas y brillantes que crecen en forma óptima en frascos para hemocultivo y en placas de agar con medios azucarados, y no

requieren medios especiales para su cultivo. Su desarrollo se torna visible a las 48 horas de incubación a 37°C. La *Candida albicans* presenta algunas características morfológicas especiales que permiten identificarla con rapidez, como la formación de clamidosporos terminales globosos o la presencia de un tubo germinativo que se produce cuando la levadura se incuba en suero y albúmina a 37°C durante 2 horas.²⁰

2.3.3. Patogenia

La *Candida* posee reconocidos mecanismos de acción patógena: adherencia a células de los tejidos del hospedero, capacidad invasiva a causa de la formación del pseudomicelio (filamentización), elaboración de enzimas hidrolíticas (proteinasas, fosfolipasas) que favorecen el ingreso de la levadura a la célula hospedera por la degradación de sustancias tisulares que utilizan como nutrientes y capacidad de cambiar el fenotipo (variabilidad fenotípica). Los hongos del género *Candida* pueden originar micosis superficiales y profundas. Las micosis superficiales se caracterizan por producir inflamación y formación de pseudomembranas en la superficie de las mucosas, o dermatitis eritomatosa en la piel. Las candidiasis profundas tienen como vía de acceso el tubo digestivo o la interrupción de la barrera cutáneo-mucosa. Cuando las levaduras proliferan en la luz intestinal, los elementos que brotan pueden atravesar los espacios intercelulares de la pared intestinal y llegar a los espacios linfáticos mesentéricos y al torrente sanguíneo. El ingreso a la circulación general también puede originarse en forma directa, a través de catéteres o mediante intervenciones quirúrgicas.²⁰

2.3.4. Epidemiología

La mayoría de infecciones causadas por *Candida* son de origen endógeno, aunque también pueden producirse la transmisión directa interhumana y la transmisión intrahospitalaria. Cuando el equilibrio entre *Candida* y el resto de la

microbiota del hospedero se altera, el hongo prolifera en forma excesiva y adopta un rol de patógeno oportunista, lo cual genera la enfermedad. 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. La *Candida albicans* se detecta como comensal en las mucosas: digestiva, genital y respiratoria. El lugar primario de colonización es el tubo digestivo desde la cavidad bucal hasta el recto. También se desarrollan como comensales en la piel y bajo las uñas del pie y las manos. Se estima que entre un 25% y un 50% de las personas sanas porta microorganismos de *Candida* en la microbiota normal de la cavidad bucal; *C. 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 individuos sometidos a quimioterapia antineoplásica o antibioterapia.²¹

2.4. Nistatina

La nistatina es un antimicótico de aplicación tópica exclusivamente, producido por la bacteria *Streptomyces noursei*. Tiene estructura poliénica y posee acción fungistática y fungicida, según la concentración. Carece de actividad frente a bacterias, virus y protozoos. Aunque su espectro cubre varios géneros de hongos, el hecho de que no se pueda administrar por vía parenteral debido a su toxicidad obliga a restringir su acción terapéutica a las infecciones mucocutáneas producidas por las distintas especies de *Candida* en boca, esófago y vagina. Apenas se absorbe en el tracto gastrointestinal, por lo que administrada por vía oral aparece en las heces. Las reacciones adversas por esta vía son infrecuentes: náuseas, vómitos y diarrea. Por vía tópica produce en ocasiones irritación. Se utiliza en las candidiasis de localización bucofaríngea, esofágica,

intestinal y vaginal. En las vaginitis y estomatitis suele aplicarse localmente mediante la fórmula galénica apropiada.²²

2.4.1. Mecanismo de acción

La nistatina siendo un antimicótico poliénico se une firmemente a los esteroides de las membranas celulares del hongo, principalmente al ergosterol, esta interacción de los polienos con los esteroides produce poros o canales en las membranas celulares, de este modo aumenta la permeabilidad celular y se pierden los componentes intracelulares principalmente cationes y daño celular irreversible. Las bacterias no son sensibles porque carecen de ergosterol, que es esencial para que el agente antimicótico se una a la membrana.²³

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Docencia, Investigación y Producción de Farmacia y Bioquímica y en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

3.2. Muestra vegetal

Se utilizó 5 kilos de hojas y tallos de *Satureja brevicalyx* Epl. "wayra muña", recolectadas en el mes de febrero del 2013 en la provincia de Churcampa, región Huancavelica ubicado a 3240 msnm.

3.3. Microorganismo de ensayo

Se utilizó la *Candida albicans* ATCC 10231, contenido en una pastilla liofilizada, sellado dentro de una bolsa laminada, pura, con una recuperación >1000 UFC por pastilla, adquirido al laboratorio GenLab del Perú SAC (Anexo 2).

3.4. Diseño metodológico para la recolección de datos

3.4.1. Recolección y procesamiento de la muestra

Se procedió a recolectar las hojas y tallos de *Satureja brevicalyx* Epl. "wayra muña" en horas de la mañana, luego se distribuyó en una habitación ventilada sobre papel de kraft para su secado, removiendo diariamente por dos

semanas, finalmente se procedió a la molienda haciendo uso de un molino obteniéndose partículas finas.²⁴

3.4.2. Preparación del extracto hidroalcohólico

Se maceró 400 g de la muestra seca en un frasco ámbar con alcohol 80° por un periodo de 14 días con agitación diaria. Luego se procedió al filtrado con un sistema al vacío y finalmente se realizó la concentración utilizando el rotavapor para la eliminación del disolvente.²⁴

3.4.3. Extracción del aceite esencial y determinación del rendimiento

La extracción del aceite esencial de “wayra muña” se realizó mediante destilación por arrastre de vapor, para lo cual, se empleó un equipo destilador adecuado con capacidad suficiente para 5 kg de hojas y tallos frescos. El proceso duró dos horas y media. El hidrolato obtenido se separó en una pera de decantación para obtener finalmente el aceite esencial el cual fue almacenado en un frasco de vidrio color ámbar herméticamente cerrado.²⁵

Para la determinación del porcentaje de rendimiento del aceite esencial (%RAE) se utilizó el método gravimétrico, para lo cual se empleó la siguiente fórmula:

$$\%RAE = \frac{\text{Volumen del AE obtenido(ml)}}{\text{Peso de la muestra(g)}} \times 100$$

3.4.4. Análisis físico del aceite esencial

3.4.4.1. Características organolépticas

Se realizó a través de un análisis directo, se confirmó las características propias del aceite esencial en cuanto a su aspecto, color, sabor y olor.

3.4.4.2. Determinación de la densidad relativa

Se determinó por picnometría, mediante este método se midió la relación entre la masa de un volumen de la sustancia a ensayar a 20°C y la masa de un volumen igual de agua a la misma temperatura, este término equivale a peso específico, para lo cual se pesó el picnómetro vacío y seco a 20°C, luego se llenó con el

aceite esencial de *Satureja brevicalyx* Epl, manteniéndolo a temperatura constante se ajustó el líquido al nivel definido, el picnómetro con la porción de ensayo se pesó cuidadosamente; después el picnómetro se limpió y secó para luego repetir la operación con el agua destilada a 20°C.²⁵ Se realizó tres repeticiones. La densidad relativa a 20°C se calculó por la siguiente fórmula:

$$D_{20} = \frac{M_1 - M}{M_2 - M}$$

Donde:

M₁: peso del picnómetro con la muestra (g).

M₂: peso del picnómetro con el agua (g).

M: peso del picnómetro vacío (g).

3.4.4.3. Determinación del índice de refracción y sólidos totales

El índice de refracción se determinó por refractometría y los sólidos totales mediante cotejo de valores con la tabla de equivalencia del índice de refracción para sólidos totales; El índice de refracción es una constante característica de cada sustancia. Para su determinación se empleó el refractómetro digital ABBE DR-A1 (manual de instrucción cat. N° 1310), el cual se acondicionó seleccionando la zona del espectro visible; su calibración se realizó con agua destilada, se buscó la intersección del retículo sobre la línea límite de los campos claro y oscuro, moviendo el compensador cromático, en seguida se presionó el botón "set". Después del ajuste del refractómetro, se colocó una gota del aceite esencial sobre el prisma de medición, se esperó unos segundos y se prosiguió a la lectura. Se hizo tres lecturas y se calculó el promedio de las mismas.²⁶

Para la determinación de los sólidos totales se utilizó el refractómetro de mano MASTER-3a/3T, siguiendo las instrucciones del manual, se puso una gota de aceite esencial de *Satureja brevicalyx* Epl. en el prisma de medición, se cerró la tapa y con el terminal frontal apuntando a la luz fluorescente se realizó la lectura

correspondiente. Los valores obtenidos de las lecturas en el refractómetro de mano se cotejaron con los valores de la tabla de equivalencia del índice de refracción para sólidos totales, referido en el manual del refractómetro digital ABBE DR-A1.

3.4.4.4. Determinación de la rotación óptica

Se determinó por polarimetría, haciendo uso del polarímetro POLAX 2L (Manual de instrucciones cat. N° 5223), se determinó la medida de rotación del plano de polarización de la luz, a una longitud de onda definida correspondiente a la línea del sodio, al atravesar un espesor determinado de aceite esencial; para su calibración se llenó el tubo de observación con agua destilada, luego se colocó en la parte central del sitio designado para el tubo, con los interruptores se igualó el brillo de los campos, mientras se observaba a través del ocular, en seguida se pulsó el interruptor de ajuste a cero; para la medición del ángulo de rotación óptica de la muestra, se usó el tubo de observación de 200 mm (10 ml), se cargó con el aceite esencial, se colocó en el sitio indicado para la muestra, mientras se observaba el campo a través del ocular se igualó el brillo de los semicírculos derecho e izquierdo con los interruptores designados para este fin, en el momento que se logró la igualdad se anotó el valor que aparece en el tablero.²⁷

3.4.5. Identificación de los metabolitos secundarios

Las reacciones de identificación cualitativa se realizaron por coloración y precipitación para los principales grupos de metabolitos secundarios, siguiendo la metodología propuesta por Miranda y Cuéllar.²⁴

3.4.6. Determinación de la actividad antimicótica

La actividad antimicótica se realizó utilizando el método de difusión con discos (Kirby-Bauer) que sirvió para la determinación de los halos de inhibición; y por el método de dilución en caldo para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Fungicida (CMF).^{28,29,30,31}

3.4.6.1. Preparación de *Candida albicans* ATCC 10231

Se inoculó la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231 en un tubo con 10 ml de caldo sabouraud previamente esterilizado y se incubó a 37°C por 48 horas. Luego se repicó en agar sabouraud contenido en tres viales y se dejó incubar a 37°C por 48 horas. Las colonias de *Candida albicans* ATCC 10231 de los viales fueron transferidos con un asa de Kolle estéril a un tubo con 5 ml de caldo sabouraud, y se incubó a 37°C por 48 horas. La turbidez del caldo se ajustó con caldo sabouraud estéril, obteniéndose una turbidez visualmente similar al estándar de la escala de Mc Farland (Anexo 5).

3.4.7. 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 solido 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 una de las placas de Petri se colocaron 20 ml de agar sabouraud previamente esterilizado y se dejó solidificar el medio.
- Con un hisopo estéril se introdujo en el inóculo contenido en el tubo de ensayo y se sembró directamente en la placa de Petri, evitando dejar marcas sobre la superficie del agar sabouraud para luego dejarlo reposar.
- Utilizado una pinza estéril, se impregnó los discos esterilizados de papel whatman, de 6 mm de diámetro, con las concentraciones de la muestra y con el control positivo para luego depositar los discos sobre el agar.
- Se Incubó a 37°C y se observó los halos de inhibición después de 48 horas.
- Se realizó seis repeticiones para cada grupo, tanto para el aceite esencial como para el extracto hidroalcohólico, distribuidos de la siguiente manera:

- Grupo I : Control positivo tratado con nistatina.
- Grupo II : Tratado con muestra al 0,5% de concentración.
- Grupo III : Tratado con muestra al 1% de concentración.
- Grupo IV : Tratado con muestra al 3% de concentración.
- Grupo V : Tratado con muestra al 5% de concentración.
- Grupo VI : Tratado con muestra al 10% de concentración.
- **Lectura:** La actividad antimicótica se determinó mediante la medida del diámetro del halo inhibición del crecimiento del hongo utilizando una regla milimétrica. La formación de dicho halo significó sensibilidad (S) y la no formación resistencia (R).¹⁸
- **Determinación del porcentaje de inhibición:** Se procedió a medir el diámetro de los halos de inhibición de las diferentes concentraciones de la muestra y el control positivo, lo que permitió determinar la concentración ideal que mostró una mayor eficacia antimicótica en relación a la nistatina tomado como patrón. Para el cálculo del porcentaje de inhibición se usó la siguiente fórmula:

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

3.4.8. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria

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 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se preparó 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 de caldo sabouraud.
- Posteriormente se agregó 1ml de las concentraciones de las muestras 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 se descartó. El tubo N° 15 no recibió extracto, siendo éste 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 (Anexo 5).
- **Lectura:** Se observó el crecimiento del hongo mediante la aparición de turbidez en el medio, o mediante cambio de color. Por lo que el punto final de la CMI, se definió a simple vista por la falta de turbidez en el caldo, para ello se comparó el tubo con el control de crecimiento. La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) es la menor concentración de antimicótico capaz de inhibir el crecimiento, anotándose la concentración de dicho tubo.

3.4.9. Determinación de la Concentración Mínima Fungicida

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 dicho microorganismo en cultivo.¹⁸

Procedimiento:

Para la determinación de la Concentración Mínima Fungicida (CMF), se procedió a partir de la CMI, realizándose de la siguiente manera:

- Una vez observado la turbidez a simple vista, se procedió a sembrar con la ayuda del asa de kolle estéril, los caldos no turbios en las placas con agar sabouraud.
- Posteriormente se incubó a 37°C por 24 horas (Anexo 7).
- **Lectura:** Se determinó la CMF verificando si hubo o no crecimiento del hongo en las placas sembradas.

3.5. Análisis de datos

Los resultados se procesaron en cuadros mediante el análisis de varianza (ANOVA) y comparaciones múltiples de Tukey con un nivel de significancia de 0,05 para esto se usó el programa SPSS versión 21.

IV. RESULTADOS

Tabla 1. Metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de *Satureja brevicalyx* Epl, Ayacucho 2013.

Metabolitos secundarios	Ensayos	Resultados	Observaciones
Fenoles y taninos	Ensayo de Cl ₃ Fe	+++	Coloración rojovino
Flavonoides	Ensayo de shinoda	+	Coloración amarilla
Lactonas	Ensayo de Baljet	++	Coloración roja
Triterpenoides – esteroides	Ensayo de Lieberman-Burchard	+++	Coloración verde oscuro

Leyenda:

- (+) : Escaso
- (++) : Moderado
- (+++): Abundante

Tabla 2. Características organolépticas y propiedades físicas del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* Epl, Ayacucho 2013.

Características organolépticas	
Color	Amarillento translúcido
Olor	Fuerte
Sabor	Ligeramente amargo
Aspecto	Líquido fluido
Propiedades físicas	
Densidad relativa 20°C	0,9542 g/ml
Índice de refracción 21.4 °C	1,468 nD
Sólidos totales 19 °C	71 Brix%
Rotación óptica 20 °C	+27,10°
Porcentaje de rendimiento	0,14% v/p

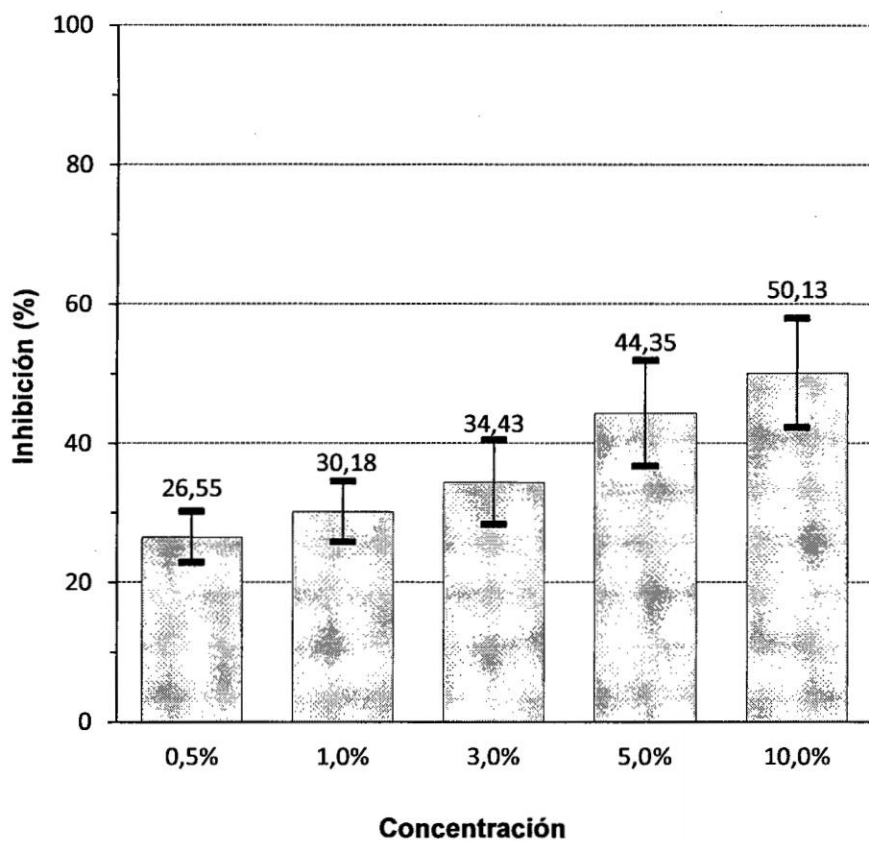


Figura 1. Porcentaje de inhibición del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* Epl. en comparación con la nistatina, Ayacucho 2013.

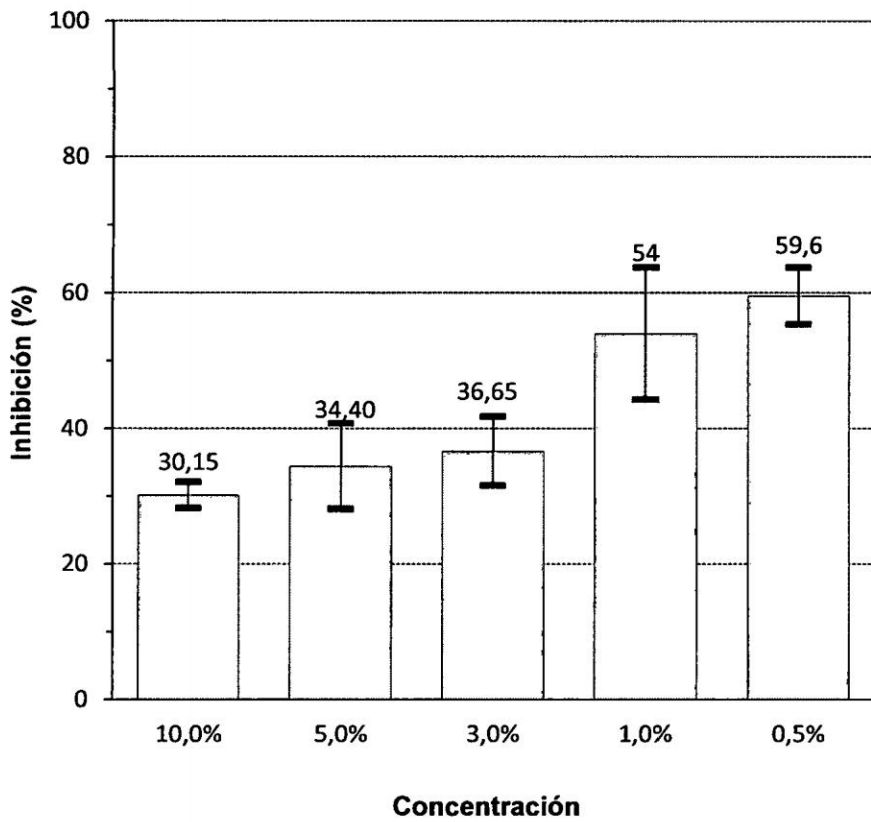


Figura 2. Porcentaje de inhibición del extracto hidroalcohólico de *Satureja brevicalyx* Epl. en comparación con la nistatina, Ayacucho 2013.

Tabla 3. Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Fungicida del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* Epl, Ayacucho 2013.

Aceite esencial	Concentración Mínima Inhibitoria	Concentración Mínima Fungicida
<i>Satureja brevicalyx</i> Epl.	1,198 mg/ml	2,396 mg/ml

Tabla 4. Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Fungicida del extracto hidroalcohólico de *Satureja brevicalyx* Epl, Ayacucho 2013.

Extracto hidroalcohólico	Concentración Mínima Inhibitoria	Concentración Mínima Fungicida
<i>Satureja brevicalyx</i> Epl.	0,046 mg/ml	0,093 mg/ml

V. DISCUSIÓN

Los resultados de la identificación de los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas y tallos de *Satureja brevicalyx* Epl. "wayra muña" se reportan en la Tabla 1, donde se encontraron: fenoles, taninos, flavonoides, lactonas, triterpenos, esteroides; los cuales podemos corroborar en el tamizaje fitoquímico realizado por Soto, Sulca y Palomino quienes reportan similares metabolitos en extracto etanólico, acuoso liofilizado y clorofórmico respectivamente.^{4,32,33}

Carhuapoma reportó 35 componentes químicos del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* dotándole una alta bioactividad farmacológica al extracto vegetal en conjunto, actuando de forma sinérgica. Mencionando que el carvacrol junto con el timol son los marcadores químicos del género *Satureja* siendo estos los metabolitos más potentes desde el punto de vista antimicrobiano que se han estudiado hasta el momento con respecto a los aceites esenciales. También destaca a la pulegona como un potente antiséptico y biocida, y al linalol como un antimicrobiano moderado. El resto de los metabolitos elucidados, estarían actuando en sinergismo con los componentes mayoritarios, éstos reforzarían la actividad biológica del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* Epl.¹⁰

Cano demostró los efectos antimicóticos del aceite esencial de *Minthostachys mollis* frente a cepas de *Candida albicans* y frente a ciertos

dermatofitos relacionando dicho efecto con la presencia de cuatro metabolitos en mayor proporción: pulegona (36,68%), mentona (24,24%), limoneno (0,77%) y mentol en trazas. Estos compuestos también se encuentran presentes en la *Satureja brevicalyx* Epl. lo que podría reforzar la actividad antimicótica sobre la *Candida albicans* ya que ambos pertenecen a la misma familia taxonómica.³⁴

Después del proceso de extracción por arrastre de vapor se logró un rendimiento de 0,14% v/p a comparación de lo reportado por Cano y Carhuapoma que utilizando el mismo proceso para la extracción del aceite esencial obtuvieron valores de 0,21% v/p y de 1,8 % v/p respectivamente, mencionando éste último autor que los valores de rendimiento mayores y/o iguales a 1% de aceite esencial las categorizan a las especies aromáticas en excepcionalmente interesantes y promisorias.^{33,10} Esta diferencia de rendimiento principalmente se debería posiblemente al tipo de muestra utilizada en la extracción, ya que Carhuapoma utiliza una muestra seca a comparación de la muestra fresca utilizada para esta investigación.

Las características organolépticas del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* Epl. descritas en la Tabla 2, se aproximan a los reportados por Carhuapoma quien obtuvo que dicho aceite esencial resultó ser menos denso que el agua e inmisible, de olor fuerte y persistente, de color amarillento y translucido.¹⁰ Y con respecto a las constantes físicas del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* se obtuvieron valores similares a lo reportado por Carhuapoma, a diferencia de la rotación óptica quien obtuvo un valor de -2° a $+4^{\circ}$, a comparación con lo registrado en este trabajo que fue de $+27,10^{\circ}$; esto podría deberse a la variación metabólica de la planta determinando una variación en la composición química, además podría ser debido a la estación del año en la que se recolectó.¹⁰ La rotación óptica podría también variar con la temperatura, la longitud de onda de

la luz incidente, el disolvente utilizado, la naturaleza de la sustancia y su concentración.³⁵

En la Figura 1, los porcentajes de inhibición del aceite esencial alcanzaron un valor máximo de 50,12% y en la Figura 2, los porcentajes de inhibición del extracto hidroalcohólico alcanzaron un valor máximo de 59,58%. Aunque en ambos casos los porcentajes de inhibición resultaron ser inferiores a la nistatina, Palomino señala que la existencia de un halo de inhibición aunque sea pequeña cuando se trabaja con material vegetal, determina cierta actividad antibacteriana del extracto, que puede ser mejorada con el uso de nuevas técnicas de extracción con el propósito de obtener mayor concentración de principios activos y alcanzar mejores resultados.³⁶

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Fungicida (CMF), realizado mediante el método de dilución en caldo, para el aceite esencial fue demostrado a concentraciones de 1%, 5% y 10% resultando valores de 1,198 mg/ml y 2,396 mg/ml respectivamente (Tabla 3). Y para el caso del extracto hidroalcohólico fue demostrado a concentraciones de 0,5 %, 1% y 3% resultando valores de 0,046 mg/ml y 0,093 mg/ml respectivamente (Tabla 4).

Los resultados de este estudio revelan que tanto el aceite esencial como el extracto hidroalcohólico poseen actividad antimicótica sobre la *Candida albicans* ATCC 10231, que fueron comparados con la nistatina, medicamento ampliamente utilizado como fungistático o fungicida.

En la acción antimicótica de los metabolitos secundarios, intervendría el carácter lipofílico e hidrofílico de sus grupos funcionales y la polaridad que poseen, para poder tener propiedades antisépticas, antimicrobianas y antimicóticas, siendo esta actividad biológica de mayor a menor en fenoles, aldehídos, cetonas, alcoholes y éteres. Los esfuerzos para encontrar una correlación entre la composición y bioactividad de los aceites esenciales no han sido totalmente

dilucidados. Se presume que la actividad biológica de estos aceites esenciales no está determinada por la cantidad de monoterpenos, sino más bien por su tasa de proporcionalidad.^{37,38}

Cano menciona que la actividad antimicótica del aceite esencial, dependen de sus propiedades lipofílicas o hidrofílicas. Los terpenoides presentes en el aceite esencial pueden servir como un ejemplo de agentes liposolubles, los cuales afectarían la actividad de las enzimas catalizadoras a nivel de membrana actuando como desacopladores, los cuales interfieren en la translocación de protones sobre la membrana y subsecuentemente interrumpir por la fosforilación del ADP.^{34,37}

En cuanto al mecanismo de acción del aceite esencial se podría fundamentar en: la destrucción de la pared del hongo y la membrana citoplasmática los cuáles resultan en el rompimiento de la membrana y coagulación del citoplasma; en la inhibición de la síntesis de ADN, ARN, proteínas y polisacáridos en los hongos, evocando cambios similares a los obtenidos a los antimicóticos de acción tópica.^{34,37}

Estudios recientes reportan otros efectos como cambios en la morfología del hongo que incluyen daños sobre estructuras como conidias, macroconidias e hifas, así como la disminución en la producción de micotoxinas.³⁹

Diferentes estudios *in vitro* han demostrado la actividad antimicótica de aceites esenciales de plantas de la familia Lamiaceae como: *Mentha piperita*, *Minthostachys mollis*, *Lepechinia conferta*, *Oreganum vulgare*, *Lepechinia meyenii* (walp) Epl., contra aislados clínicos de *C. albicans*, empleadas en la medicina tradicional.^{2,11,12,34}

Más aún, en tres investigaciones realizadas en distintos lugares del medio oriente evaluaron la actividad antimicótica frente a la *Candida albicans* de los extractos alcohólicos y aceites esenciales de varias especies del género *Satureja*

confirmándose en todas estas investigaciones la inhibición satisfactoria, obteniéndose diversos valores de Concentración Mínima Inhibitoria. Además los análisis cromatográficos mostraron que presentan en su composición al carvacrol, al timol y al p-cimeno como componentes principales de los aceites esenciales de estas especies. Otros componentes importantes identificados fueron: borneol, germacreno D, γ -cariofileno y óxido de cariofileno. Mencionando que dicha actividad antimicótica no sólo son resultado de la acción del carvacrol o del timol sino más bien de un conjunto de compuestos. Estas investigaciones se relaciona mucho al presente trabajo con lo que se podría atribuir la actividad antimicótica sobre la *Candida albicans* debido a la presencia de estos compuestos mencionados.^{9,13,40}

Finalmente todos estos resultados demostraron que tanto el aceite esencial como el extracto hidroalcohólico de las hojas y tallos de *Satureja brevicalyx* Epl. presentaron actividad antimicótica, lo cual representa una alternativa para disminuir la infección por *Candida albicans*.

VI. CONCLUSIONES

- El aceite esencial y el extracto hidroalcohólico de *Satureja brevicalyx* Epl. "wayra muña" presentaron actividad antimicótica sobre una cepa de *Candida albicans* ATCC 10231.
- El extracto hidroalcohólico de *Satureja brevicalyx* Epl. "wayra muña" contiene: fenoles, taninos, flavonoides, lactonas, triterpenos y esteroides.
- El aceite esencial de *Satureja brevicalyx* Epl. "wayra muña" es un líquido fluido de color amarillento translúcido, de olor fuerte, de sabor amargo, menos denso que el agua, presentó un rendimiento de 0,14% v/p, un índice de refracción de 1,468 nD, sólidos totales de 71 Brix% y una rotación óptica de +27,10°.
- La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Fungicida (CMF) del aceite esencial fue de 1,198mg/ml y 2,396 mg/ml respectivamente frente a *Candida albicans* ATCC 10231.
- La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Fungicida (CMF) del extracto hidroalcohólico fue de 0,046 mg/ml y 0,093mg/ml respectivamente frente a *Candida albicans* ATCC 10231.
- El extracto hidroalcohólico de *Satureja brevicalyx* Epl. "wayra muña" presentó mejor actividad antimicótica al 0,5% a comparación de su aceite esencial.

VII. RECOMENDACIONES

1. Continuar con la investigación sobre el estudio de la *Satureja brevicalyx* Epl. “wayra muña” con la finalidad de determinar si tiene actividad en otras especies de hongos.
2. Aislar los principios activos que le confiere la actividad antimicótica a *Satureja brevicalyx* Epl. “wayra muña” para un mejor estudio y elaborar una forma farmacéutica.
3. Obtener aceite esencial de *Satureja brevicalyx* Epl. “wayra muña” a partir de muestras secas ya que evidenciaría mejor rendimiento.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Guevara M, Urcia F, Casquero J. Manual de procedimientos y técnicas de laboratorio para la identificación de los principales hongos oportunistas causantes de micosis humana. Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud; 2007.
2. Sanabria A, Ramón MJ. Actividad antifúngica de plantas superiores colombianas. Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Farmacia; 2006.
3. Moura MJ, Sarmento GF, De Oliveira PF, Pereira J, Nogueira TV y De Oliveira LE. Actividad antifúngica del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* sobre cepas de *Candida tropicalis* de aislados clínicos. Brasil. Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat [revista en internet] 2012 [acceso febrero 2014]; 11(3): 208 – 217. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85622739002>.
4. Soto M. Estudio fitoquímico y determinación de la actividad analgésica en diferentes extractos de la *Satureja brevicalyx* Epl. "wayra muña". [Tesis de pregrado]. Ayacucho: Escuela de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 1999.
5. Díez MJ. Efecto antiespasmódico de la *Satureja brevicalyx* Epl. "wayra muña" sobre íleon aislado de rata. Ayacucho: Instituto de Investigación de la Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2003.
6. Palomino R. Efecto antioxidante del extracto acuoso liofilizado de las hojas de las *Satureja brevicalyx* Epl. "wayra muña". [Tesis de pregrado]. Ayacucho: Escuela de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2005.
7. Mendoza J. Efecto hepatoprotector del extracto acuoso de las hojas de *Satureja brevicalyx* Epl. "wayra muña" en ratas. [Tesis de pregrado]. Ayacucho: Escuela de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2007.
8. López GS. Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* "ruyaq muña". [Tesis de pregrado]. Ayacucho: Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2006.
9. Dilek A, Kürkcüoğlu M, Satil F, Hüsnü K, Baser C, and Tümen G. *In vitro* antimicrobial activity and chemical composition of some *Satureja* essential oils. Turquía: Flavour and Fragrance Journal; 2005.
10. Carhuapoma YM. Composición química, actividad anti-*Helicobacter pylori* y antioxidante del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* Epling "urqu muña". [Tesis Doctoral]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2007.
11. Urcuhuaranga L. Actividad anti-*Candida* del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lepechinia meyenii* (walp) Epl. "pacha salvia". [Tesis de pregrado].

- Ayacucho: Escuela de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2011.
12. Maraví IG. Efecto antibacteriano y antifúngico del aceite esencial de: *Mentha piperita* "menta", *Origanum vulgare* "oregano" y *Cymbopogon citratus* "hierba luisa" sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 10746 y *Candida albicans* ATCC 90028. [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Privada Norbert Wiener; 2012.
 13. Diba K, Ghabaie K, Heshmatian B and Sharbatkhori M. Antifungal activity of *Satureja hortensis* alcoholic extract against *Aspergillus* and *Candida* species. *Journal of Medicinal Plants Research*. Iran: Urmia University of Medical; 2012. Disponible en la web: http://academicjournals.org/article/article1380797729_Diba%20et%20al.pdf.
 14. Carhuapoma YM. Taxonomía de las plantas medicinales aromáticas nativas de la provincia de Huamanga y sus perspectivas económicas. [Tesis de pregrado]. Ayacucho: Escuela de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2002.
 15. Magallanes C. y otros. Estudio ecológico y etnobotánico de las plantas medicinales y altoandinas de Quinoa y Chiara. Ayacucho: Facultad de Ciencias Biológicas. Área de Botánica. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 1994.
 16. Chumacero A, Iparraguirre D, Riofrío O, Salas E. Género *Satureja* (Lamiaceae) en la etnomedicina andina. Lima: Facultad de Biología. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2003.
 17. Aguilar FE. Actividad antioxidante y antiinflamatoria de los flavonoides aislados de las hojas de *Satureja brevicalyx* Epl. "wayra muña". *Revista Farmacia e Investigación*. Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica. Ago 2010; 3(1).
 18. Granados PR, Villaverde PC. Microbiología tomo II: bacteriología, medios de cultivo y pruebas bioquímicas. *Micología general, Parasitología general*. 2ª ed. España: Thompson Editores Spain Paraninfo S.A; 2007.
 19. Kreger van Rij N. *The yeast. A taxonomy study*. 3ª ed. Amsterdam: Elsevier Sci Publ BV; 1984.
 20. Cecchini E, Silvia E, González A. *Infectología y enfermedades infecciosas*. Madrid: Journal; 2007.
 21. Murray P, Rosenthal K, y Pfaüer M. *Microbiología Médica*. 6ª ed. Barcelona: Elsevier; 2009.
 22. Flores, J. *Farmacología Humana*. 3ª ed. Barcelona: Masson S.A; 2003.
 23. Malgor LA, Valsecia ME. *Farmacología Médica*. 2ª ed; 2000. Disponible en: <http://med.unne.edu.ar/farmaco.html>
 24. Miranda M, y Cuellar A. *Manual de Prácticas de Laboratorio, Farmacognosia y Productos Naturales*. La Habana: Instituto de Farmacia y Alimentos; 2000.
 25. Bandoni A. *Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica, su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores*. Buenos Aires: UNLP-CYTED; 2000.

26. Atago C, LTD. Digital Abbe Refractometer DR-A1. Instruccion manual cat. N° 1310. Japan.2008.
27. Atago C, LTD. Polarimeter POLAX-2L. Instruccion manual cat. N° 5223. Japan.2008.
28. Salcedo D. La Microbiología Clínica y el Laboratorio Bioquímico. Perú: Samel Graf; 1993.
29. Instituto Nacional de Salud. "Manual de Procedimientos para prueba de sensibilidad Antimicrobiana". Lima: Boletín N° 30; 2002.
30. Taroco R, Seija V, Vignoli R. Temas de Bacteriología y Virología Médica: Método de estudio de la sensibilidad antibiótica; 2008.
31. Lozina, L, Boehringer, S. y Acosta, O. Extrapolación en una forma posológica de valores obtenidos *in vitro* sobre actividad antifúngica del propóleo. Argentina. Universidad Nacional del Noreste Comunicaciones Científicas y Tecnológicas [revista en internet] 2005 [Acceso octubre 2012]; Resumen: V-018. Disponible en: <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/com2005/4-Veterinaria/V-018.pdf>.
32. Sulca PF. Validación de la actividad analgésica de tres plantas medicinales utilizadas por los pobladores de Huamanguilla. [Tesis de pregrado]. Ayacucho: Escuela de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2002.
33. Palomino MC. Efecto antiespasmódico del extracto clorofórmico de las hojas de *Satureja brevicalyx* Epling "wayra muña" en íleon aislado de cobayo. [Tesis de pregrado]. Ayacucho: Escuela de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2012.
34. Cano PC. Actividad antimicótica *in vitro* y elucidación estructural del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* "muña". [Tesis de maestría] Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2007.
35. Ricciardi G, Lorenzo D, Dellacassa E, Ricciardi A. Impacto de los componentes quirales en el aceite esencial de *Aloysia gratissima* var. *gratissima* (Gillies & Hook.) Universidad de Santiago de Chile. Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat [revista en internet]. 2007 [Acceso febrero 2014]; 6(5): 270–271. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85617508069>.
36. Palomino J. Actividad antibacteriana de *Punica granatum* "granado" en cepas de *Vibrio cholerae* y *Escherichia coli*, aislados de pacientes con enfermedad diarreica aguda (EDA). [Tesis de pregrado]. Ayacucho: Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2000.
37. D. Kalembe and A. Kunicka. Institute of General Food Chemistry, Technical University of Lodz, Poland Institute of Fermentation Technology & Microbiology, Technical University of Lodz, Poland. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils Current Medicinal Chemistry, 2003. 10, 813-829. Disponible en: <http://www.ingentaconnect.com/content/ben/cmc/2003/00000010/00000010/art00002>.

38. Mesa A, Bueno S, Betancur G. Productos naturales con actividad antimicótica. *Rev Esp Quimioterap.* 2004; 17(4): 325-31. Disponible en: <http://www.seq.es/seq/0214-3429/17/4/325.pdf>
39. Park MJ, Gwaka KS, Yang KW, Kim EB, Jeung JW, Chang IG, Choi A. Effect of citral, eugenol, nerolidol and α -terpineol on the ultrastructural changes of *Trichophyton mentagrophytes*. *Fitoterapia.* 2009; 80, 290–296. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X09000690>
40. Azaza D, Demircib F, Satıla F, Kürkc,üog̃ M and Hüsnü K. Antimicrobial activity of some Satureja essential oils. Medicinal and Aromatic Plant and Drug Research Centre (TBAM). Faculty of Science and Letters, Department of Biology, Balıkesir University Turkey; 2002.

ANEXOS

Anexo 1



EL JEFE DEL HERBARIUM HUAMANGUENSIS 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, el Bach. en Farmacia y Bioquímica, Sr. Ever Zenón, **MONTES CASAVILCA**, 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 Cronquist. A. 1988 y es como sigue:

DIVISION	: MAGNOLIOPHYTA
CLASE	: MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	: ASTERIDAE
ORDEN	: LAMIALES
FAMILIA	: LAMIACEAE
GENERO	: Satureja
ESPECIE	: <i>Satureja brevicalyx</i> Epl.
N.V.	: "wayra muña"

Se expide la certificación correspondiente a solicitud del interesado para los fines que estime conveniente.

Ayacucho, 29 de Mayo del 2013.

Figura 3. Certificado de identificación taxonómica de la planta, Ayacucho 2013.

Anexo 2

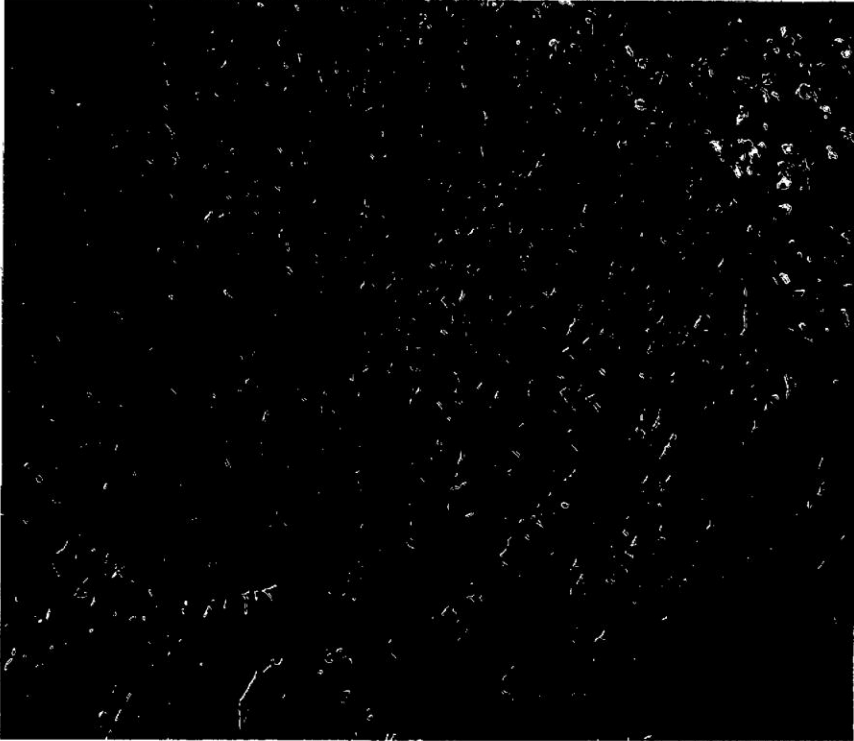


Figura 4. Hojas y tallos de *Satureja brevicalyx* Epl "wayra muña", Ayacucho 2013.

Anexo 3

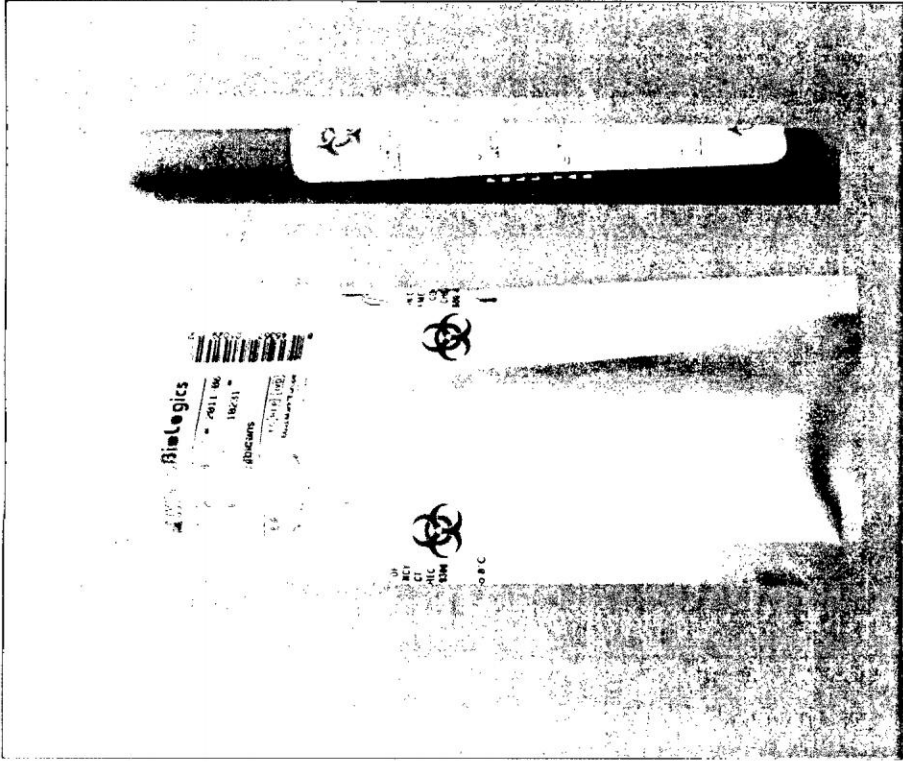


Figura 5. Cepa liofilizada de *Candida albicans* ATCC 10231 (GenLab del Perú), Lima 2013.

Anexo 4

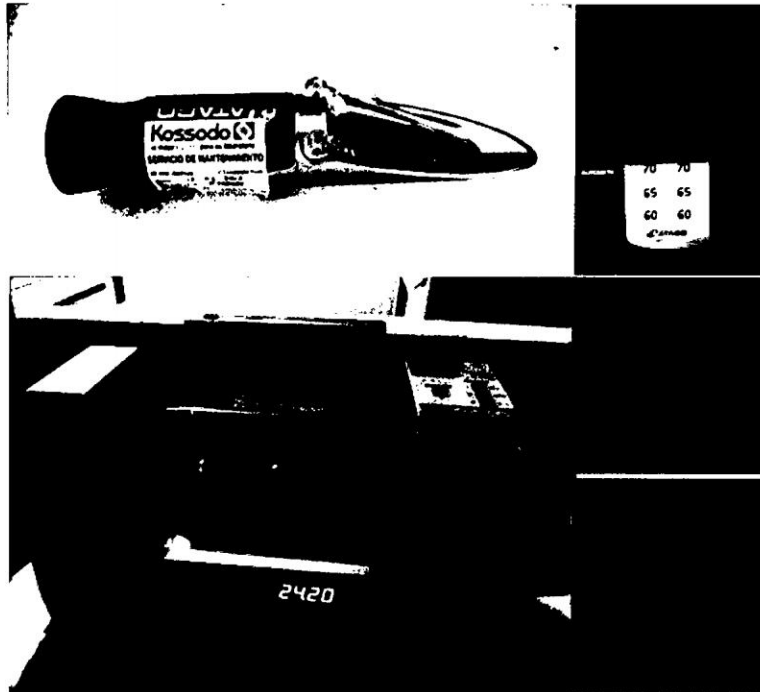


Figura 6. Análisis físico del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* Epl, Ayacucho 2013.

Anexo 5

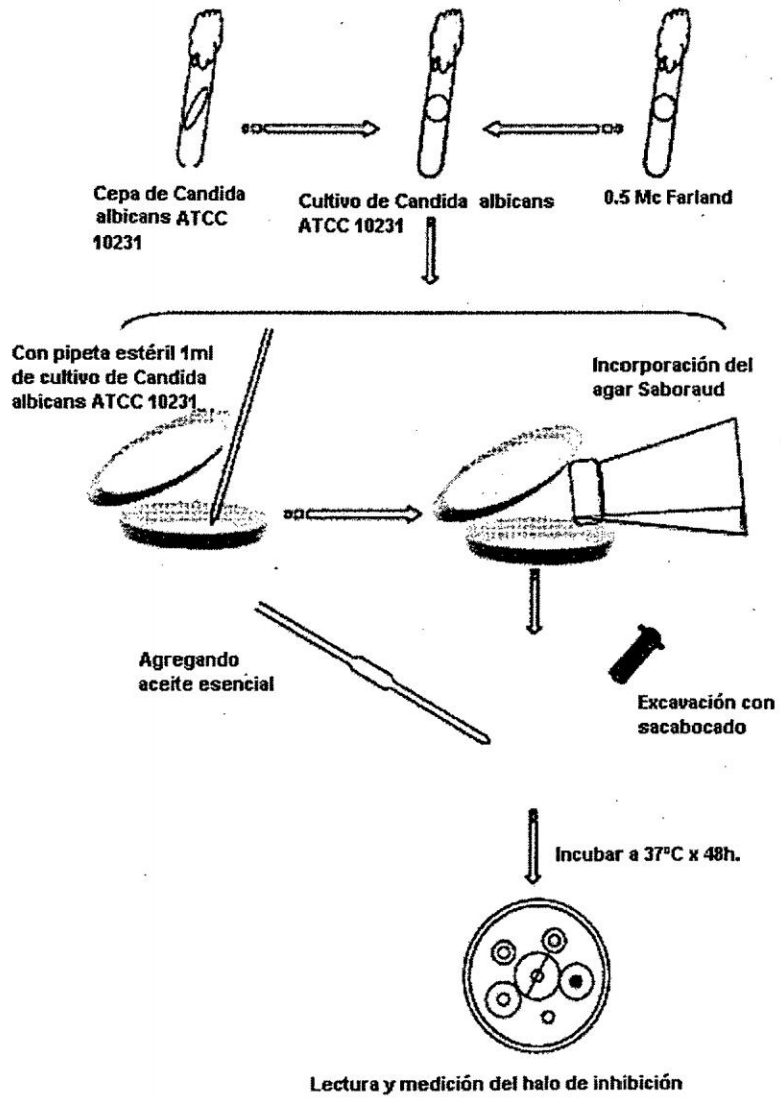


Figura 7. Esquema del Método de Difusión por Disco, Ayacucho 2013.

Anexo 6

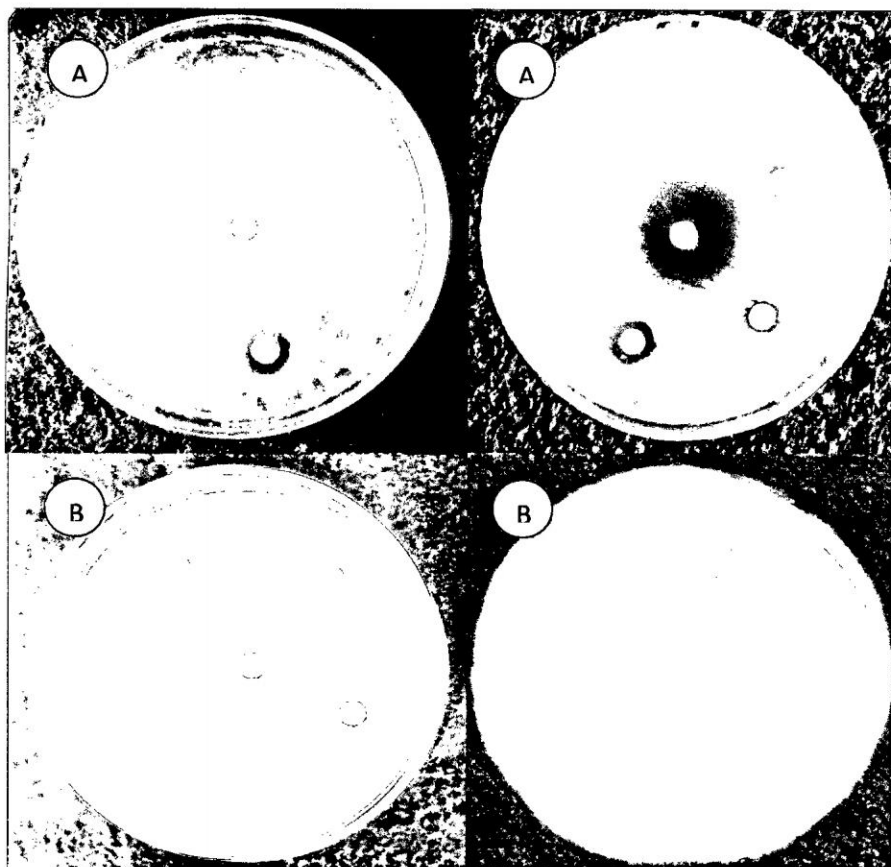


Figura 8. Halos de inhibición a las concentraciones de 0.5%, 1%, 3%, 5% y 10% del aceite esencial (A) y del extracto hidroalcohólico (B) de *Satureja brevicalyx* Epl, Ayacucho 2013.

Anexo 7

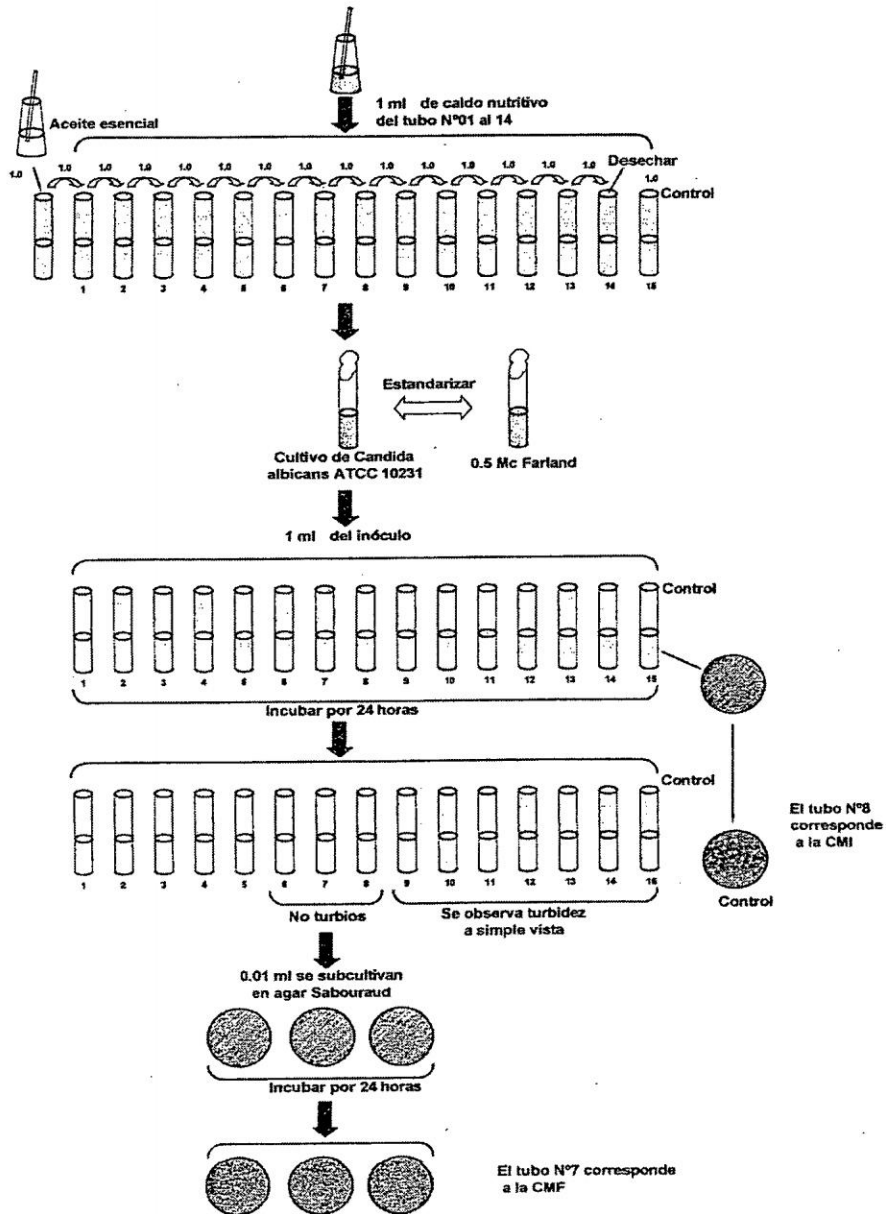


Figura 9. Esquema del Proceso de la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y de la Concentración Mínima Fungicida (CMF), Ayacucho 2013.

Anexo 8

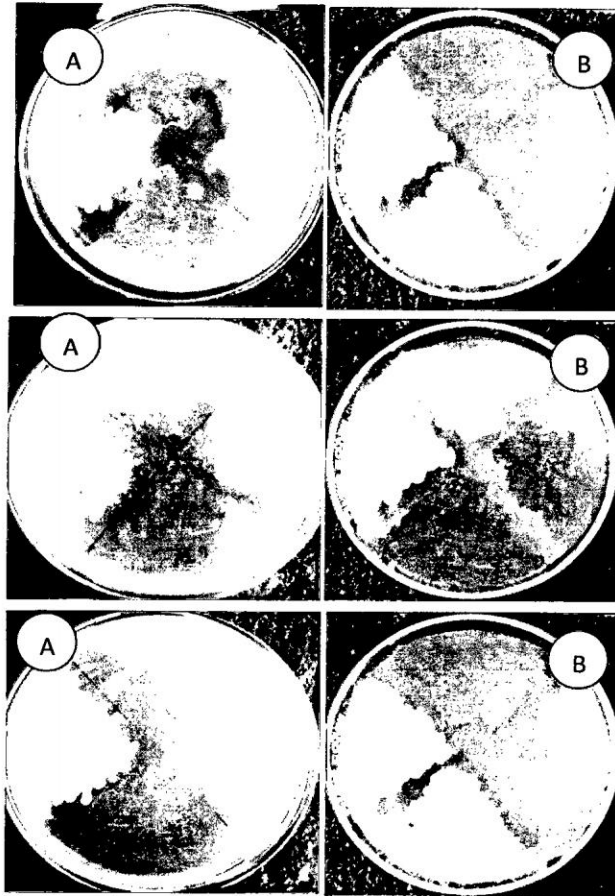


Figura 10. Concentración Mínima Fungicida (CMF) del aceite esencial (A) y del extracto hidroalcohólico (B) de *Satureja brevicalyx* Epl, Ayacucho 2013.

Anexo 9

Tabla 5. Análisis de varianza de los halos de inhibición del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* Epl, Ayacucho 2013.

ANOVA de un factor					
INHIBICIÓN					
	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	1196,472	5	239,294	120,653	,000
Intra-grupos	59,500	30	1,983		
Total	1255,972	35			

Anexo 10

Tabla 6. Análisis de varianza de los halos de inhibición del extracto hidroalcohólico de *Satureja brevicalyx* Epl; Ayacucho 2013.

ANOVA de un factor					
INHIBICIÓN					
	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	969,313	5	193,863	118,995	,000
Intra-grupos	48,875	30	1,629		
Total	1018,188	35			

Anexo 11

Tabla 7. Prueba de comparaciones múltiples de Tukey del porcentaje de los halos de inhibición del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* Epl, Ayacucho 2013.

% DE INHIBICIÓN				
HSD de Tukey ^a				
TRATAMIENTOS	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
AE 0,5%	6	26,5392		
AE 1%	6	30,1756		
AE 3%	6	34,4359	34,4359	
AE 5%	6		44,3407	44,3407
AE 10%	6			50,1212
Sig.		,167	,051	,446

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

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,000.

Anexo 12

Tabla 8. Prueba de comparaciones múltiples de Tukey del porcentaje de los halos de inhibición del extracto hidroalcohólico de *Satureja brevicalyx* Epl, Ayacucho 2013.

% DE INHIBICIÓN			
HSD de Tukey ^a			
TRATAMIENTOS	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Extr 10%	6	30,1430	
Extr 5%	6	34,3819	
Extr 3%	6	36,6413	
Extr 1%	6		54,0153
Extr 0,5%	6		59,5811
Sig.		,314	,465

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

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,000.

Anexo 13
Matriz de Consistencia

TÍTULO	PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEÓRICO	HIPÓTESIS	VARIABLES	DISEÑO METODOLÓGICO
Actividad antimicótica del aceite esencial y del extracto hidroalcohólico de <i>Satureja brevicalyx</i> Epl. "wayra muña" sobre una cepa de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231, Ayacucho 2013.	¿Cuál es actividad antimicótica del aceite esencial y del extracto hidroalcohólico de <i>Satureja brevicalyx</i> Epl. "wayra muña" sobre una cepa de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231?	<p>Objetivo General</p> <ul style="list-style-type: none"> Determinar la actividad antimicótica del aceite esencial y del extracto hidroalcohólico de <i>Satureja brevicalyx</i> Epl. "wayra muña" sobre una cepa de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231. <p>Objetivos específicos</p> <ul style="list-style-type: none"> Identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de <i>Satureja brevicalyx</i> Epl. "wayra muña". Determinar las características organolépticas y propiedades físicas del aceite esencial de <i>Satureja brevicalyx</i> Epl. "wayra muña" Determinar la CMI y la CFM del aceite esencial de <i>Satureja brevicalyx</i> Epl. "wayra muña". Determinar la CMI y la CFM del extracto hidroalcohólico de <i>Satureja brevicalyx</i> Epl. "wayra muña". Comparar la actividad antimicótica del aceite esencial con el extracto hidroalcohólico de <i>Satureja brevicalyx</i> Epl. "wayra muña". 	Varios aceites esenciales del género <i>Satureja</i> han mostrado experimentalmente tener propiedades antimicóticas. Además el extracto hidroalcohólico contiene metabolitos con gran potencial antimicótica. De esta forma poder ampliar el recurso de la fitoterapia antimicótica.	El aceite esencial y el extracto hidroalcohólico de <i>Satureja brevicalyx</i> Epl. "wayra muña" tienen actividad antimicótica sobre una cepa de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.	<p>Variable independiente</p> <p>Concentraciones al 0,5%; 1%; 3%; 5% y 10% del aceite esencial y del extracto hidroalcohólico de <i>Satureja brevicalyx</i> Epl. "wayra muña".</p> <p>Variable dependiente</p> <p>Actividad antimicótica del aceite esencial y del extracto hidroalcohólico de <i>Satureja brevicalyx</i> Epl. "wayra muña".</p>	<p>Tipo de Investigación</p> <p>Básico-Descriptivo.</p> <p>Muestra vegetal</p> <p>Se utilizó 5 kg de hojas y tallos de <i>Satureja brevicalyx</i> Epl. "wayra muña".</p> <p>Microorganismo de ensayo</p> <p><i>Candida albicans</i> ATCC 10231.</p> <p>Determinación de la actividad antimicótica</p> <p>La metodología se basó en el método de difusión por disco (Kirby Bauer).</p> <p>Análisis Estadístico</p> <p>Los resultados se procesaron en cuadros mediante el análisis de varianza (ANOVA) y comparaciones múltiples de Tukey con un nivel de significancia de 0,05.</p>