

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL  
DE HUAMANGA**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**Capacidad anti *Candida albicans* de los extractos de  
hojas de *Synadenium grantii* Hook "lechero  
africano". Ayacucho, 2012.**

**TESIS PARA OBTENER TÍTULO PROFESIONAL DE  
BIÓLOGO CON MENCIÓN EN LA ESPECIALIDAD DE  
MICROBIOLOGÍA**

**PRESENTADO POR:**

**Bach. MELGAR RUIZ, PAÚL NICEAS**

**Ayacucho - Perú**

**2014**

## ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS

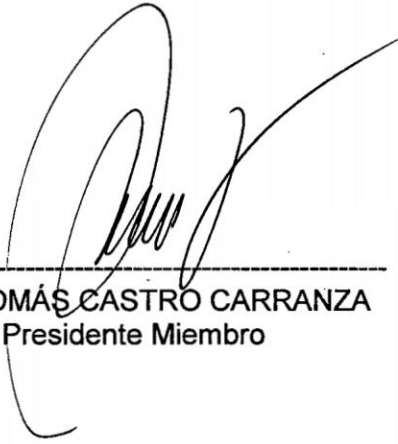
R.D.N° 088-2014-UNSCH-FCB-D

BACH. PAUL NICEAS MELGAR RUIZ

En la ciudad de Ayacucho a los ocho días del mes de agosto del dos mil catorce, siendo las cuatro y quince de la tarde, reunidos en el auditorio de los laboratorios de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, bajo la presencia del Dr. Tomás Castro Carranza y como miembros del jurado calificador los señores docentes el Mg. Serapio Romero Gavilán, Blga. Laura Aucasime Medina, Blga. Edna León Palomino y el Mg. Víctor Luis Cárdenas López, quien también actúa como secretario (e) docente en merito a la R.D.N° 088-2014-UNSCH-FCB-D para recepcionar la sustentación de la tesis titulada: Capacidad anti *Candida albicans* del extracto de hojas de *Synadenium grantii* Hook "lechero africano". Ayacucho 2012. Presentado por el bachiller en Ciencias Biológicas Sr. Paul Niceas Melgar Ruiz quien pretende optar el título profesional de Biólogo con mención en la especialidad de Microbiología. El presidente del jurado calificador solicito al secretario docente dar lectura a la documentación que sustenta el presente acto académico, acto seguido el presidente indico al sustentante que cuenta con el tiempo de cuarenta y cinco minutos tal como señala el reglamento de la Universidad, concluida la exposición del trabajo de investigación el presidente invito a los miembros del jurado a pedir aclaraciones , ampliaciones e interrogantes que crean conveniente, concluida esta etapa el presidente del jurado invito al sustentante y al publico asistente abandonar momentáneamente las instalaciones del auditorium, para que los miembros del jurado calificador puedan deliberar y calificar la sustentación y defensa de la investigación arribándose a los siguientes resultados:

MIEMBRO JURADO	EXPOSICIÓN	RPTA PREGUNTAS	PROMEDIO
Dr. Tomás Castro Carranza	16	16	16
Mg. Serapio Romero Gavilán	16	15	16
Blga. Laura Aucasime Medina	16	15	16
Blga. Edna León Palomino	18	18	18
Mg. Víctor L. Cárdenas López	16	16	16

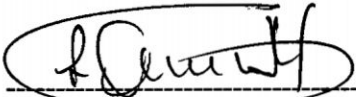
Luego de concluida la etapa de calificación el sustentante obtuvo la calificación promedio de DIECISÉIS de la cual dan Fe los miembros del jurado calificador, estando sus firmas al pie de la presente acta, finalizado el acto de sustentación siendo las cinco y cuarenta y cinco de la tarde , concluyéndose el presente acto académico.



DR. TOMÁS CASTRO CARRANZA  
Presidente Miembro



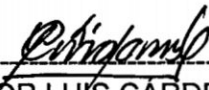
MG. SERAPIO ROMERO GAVILÁN  
Miembro



BLGA. LAURA AUCASIME MEDINA  
Miembro



BLGA. EDNA LEÓN PALOMINO  
Miembro



MG. VÍCTOR LUIS CÁRDENAS LÓPEZ  
Miembro Secretario (E)

## **DEDICATORIA**

A mis queridos padres por su apoyo incondicional durante mi formación profesional.

## **AGRADECIMIENTO**

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, en cuyas aulas adquirí los conocimientos que permitieron mi formación profesional.

A la Facultad de Ciencias Biológicas, a la Escuela de Formación Profesional de Biología y a toda la familia biológica en especial al Área Académica de Microbiología, quienes me brindaron sus sabios conocimientos.

A la Blg. Edna León Palomino responsable del laboratorio de Bromatología y Nutrición de la Escuela de Formación Profesional de Biología por el asesoramiento, apoyo y facilidades brindadas en la realización de la presente investigación.

## ÍNDICE GENERAL

	<b>Página</b>
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE ANEXOS	viii
RESUMEN	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. Estudios farmacológicos de <i>Synadenium grantii</i> Hook	4
2.3. Genero <i>candida</i>	6
2.3.1. Patogenia	7
2.3.2. Manifestaciones clínicas	9
2.3.3. Etiología de <i>Candida albicans</i>	9
2.3.4. Tratamiento	11
2.4. Mecanismos de acción de los antifúngicos	12
2.4.1. Acción del antifúngico sobre la membrana celular del hongo	12
2.4.2. Antifúngicos que actúan sobre la pared celular del hongo	13
2.4.3. Antifúngicos que actúan sobre el núcleo de la célula del hongo	14
2.4.4. Agentes misceláneos	14
2.5. Plantas medicinales	14
2.5.1. Importancia de las plantas medicinales	14
2.5.2. <i>Synadenium grantii</i> Hook “lechero africano”	15
III. MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1. Lugar de ejecución	19
3.2. Muestras biológica	19
3.3. Recolección de la muestra biológica	19
3.4. Cepa	20
3.5. Fármaco de referencia	20
3.6. Diseño metodológico	20
3.6.1. Preparación de la muestra biológica	20
3.6.2. Obtención de extracto acuoso	20

3.6.3. Obtención de extracto etanólico	20
3.6.4. Identificación de los metabolitos secundarios	21
3.6.5. Determinación de la actividad anti <i>Candida albicans</i>	21
3.6.6. Diseño experimental	22
3.6.7. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)	22
3.6.8. Determinación de la concentración fungicida mínima (CMF)	23
3.6.9. Lectura de los resultados	23
3.6.10. Análisis estadístico	23
IV. RESULTADOS	24
V. DISCUSIÓN	30
VI. CONCLUSIONES	34
VII. RECOMENDACIONES	35
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
ANEXOS	38

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Página</b>
Tabla 1. Fármacos antifúngicos usados en las candidiasis cutáneo mucosas.	11
Tabla 2. Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima fungicida de los extractos etanólico y acuoso de las hojas de <i>Synadenium grantii</i> Hook "lechero africano", frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231. Ayacucho, 2014.	29

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura 1. Promedio de los halos de inhibición por efecto del extracto acuoso de las hojas de <i>Synadenium grantii</i> Hook "lechero africano", frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231. Ayacucho, 2014.	25
Figura 2. Porcentaje de inhibición por efecto del extracto acuoso de las hojas de <i>Synadenium grantii</i> Hook "lechero africano", frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231. Ayacucho ,2014.	26
Figura 3. Porcentaje de inhibición por efecto del extracto etanólico de las hojas de <i>Synadenium grantii</i> Hook "lechero africano", frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231. Ayacucho, 2014.	27
Figura 4. Promedio de halos de inhibición por efecto del extracto etanólico de las hojas de <i>Synadenium grantii</i> Hook "lechero africano", frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231. Ayacucho, 2014.	28

## ÍNDICE DE ANEXOS

	<b>Página</b>
Anexo 1. Metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico y acuoso de las hojas de <i>Synadenium grantii</i> Hook "lechero africano". Ayacucho, 2013.	39
Anexo 2. Proceso de recolección de hojas de <i>Synadenium grantii</i> Hook "lechero africano". Ayacucho, 2012.	40
Anexo 3. Proceso de secado de las hojas de <i>Synadeniumx grantii</i> Hook "lechero africano". Ayacucho, 2012.	41
Anexo 4. Proceso de molienda y tamizado de hojas de <i>Synadenium grantii</i> Hook "lechero africano". Ayacucho, 2012.	42
Anexo 5. Tubos de la Escala de Mc Farland, Ayacucho, 2013.	43
Anexo 6. Preparación de placas con agar Mueller Hinton. Ayacucho, 2013.	44
Anexo 7. Cepa Liofilizada de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231. Ayacucho, 2013.	45
Anexo 8. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto acuoso y etanólico. Ayacucho, 2013.	46
Anexo 9. Preparación de los extractos etanólico y acuoso". Ayacucho, 2013.	47
Anexo 10. Halos de inhibición producidos por el extracto acuoso a concentraciones de 10 mg/ml, 5 mg/ml y 1 mg/ml, de las hojas de <i>Synadenium grantii</i> Hook "lechero africano". Ayacucho, 2013.	48
Anexo 11. Halos de inhibición producidos por el control positivo "Ketoconazol" y control negativo "agua destilada". Ayacucho, 2013.	49
Anexo 12. Halos de inhibición producidos por el extracto etanólico a concentraciones de 10 mg/ml, 5 mg/ml y 1 mg/ml de las hojas de <i>Synadenium grantii</i> Hook "lechero africano". Ayacucho, 2013.	50
Anexo 13. Concentración fungicida mínima (CMF) de los extractos de las hojas de <i>Synadenium grantii</i> Hook "lechero africano". Ayacucho, 2013.	51

Anexo 14.	Estudio fitoquímico de los extractos de las hojas de <i>Synadenium grantii</i> Hook "lechero africano". Ayacucho, 2013.	52
Anexo 15.	Características organolépticas de los extractos de las hojas de <i>Synadenium grantii</i> Hook "lechero africano". Ayacucho, 2013	53
Anexo 16.	Diámetro de los halos de inhibición de los extracto etanólico de las hojas de <i>Synadenium grantii</i> Hook "lechero africano", frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231. Ayacucho, 2014.	54
Anexo 17.	Diámetro de los halos de inhibición de los extracto acuoso de las hojas de <i>Synadenium grantii</i> Hook "lechero africano", frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231. Ayacucho, 2014.	55
Anexo 18.	Datos descriptivos de los halos de inhibición producidos por los extractos acuosos de las hojas de <i>Synadenium grantii</i> Hook "lechero africano" frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231. Ayacucho, 2014.	56
Anexo 19.	Datos descriptivos de los halos de inhibición producidos por los extractos etanólicos de las hojas de <i>Synadenium grantii</i> Hook "lechero africano" frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231. Ayacucho, 2014.	57
Anexo 20.	Datos descriptivos del porcentaje de inhibición producido por los extractos acuosos de las hojas de <i>Synadenium grantii</i> Hook "lechero africano" frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231. Ayacucho, 2014.	58
Anexo 21.	Datos descriptivos del porcentaje de inhibición producido por los extractos etanólicos de las hojas de <i>Synadenium grantii</i> Hook "lechero africano" frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231. Ayacucho, 2014.	59
Anexo 22.	Análisis de varianza para el numero de halos de inhibición producidos por los extractos acuosos de las hojas de <i>Synadenium grantii</i> Hook "lechero africano" frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231. Ayacucho, 2014.	60
Anexo 23.	Análisis de varianza para el numero de halos de inhibición producidos por los extractos etanólicos de las hojas de	61

	<i>Synadenium grantii</i> Hook "lechero africano" frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231. Ayacucho, 2014.	
Anexo 24.	Análisis de varianza para el numero de porcentajes de inhibición producidos por los extractos acuosos de las hojas de <i>Synadenium grantii</i> Hook "lechero africano" frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231. Ayacucho, 2014.	62
Anexo 25.	Análisis de varianza para el numero de porcentajes de inhibición producidos por los extractos etanólicos de las hojas de <i>Synadenium grantii</i> Hook "lechero africano" frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231. Ayacucho, 2014.	63
Anexo 26.	Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de los halos de inhibición producidos por los extractos acuosos de las hojas de <i>Synadenium grantii</i> Hook "lechero africano" frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231. Ayacucho, 2014.	64
Anexo 27.	Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de los halos de inhibición producidos por los extractos etanólicos de las hojas de <i>Synadenium grantii</i> Hook "lechero africano" frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231. Ayacucho, 2014.	65
Anexo 28.	Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de los halos de los porcentajes de inhibición producidos por los extractos acuosos de las hojas de <i>Synadenium grantii</i> Hook "lechero africano" frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231. Ayacucho, 2014.	66
Anexo 29.	Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de los halos de los porcentajes de inhibición producidos por los extractos etanólicos de las hojas de <i>Synadenium grantii</i> Hook "lechero africano" frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231. Ayacucho, 2014.	67
Anexo 30.	Protocolo de la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y de la concentración mínima fungicida (CMF). Ayacucho, 2014.	68
Anexo 31.	Certificado de identificación taxonómica de <i>Synadenium grantii</i> Hook "lechero africano". Ayacucho, 2012.	69
Anexo 32.	Matriz de Consistencia	70

## RESUMEN

En nuestro país muchas especies vegetales nativas e introducidas son empleadas empíricamente en el tratamiento de diferentes enfermedades, sin embargo, la veracidad de dicho efecto terapéutico no se ha demostrado experimentalmente aún, como por ejemplo el caso de *Synadenium grantii* Hook. Con el objetivo de evaluar el efecto anti *Candida albicans* de los extractos acuoso y etanólico a las concentraciones de 10 mg/ml, 5 mg/ml y 1 mg/ml de las hojas de *Synadenium grantii* Hook "lechero africano" se realizó el presente trabajo de investigación en los laboratorios de Bromatología y Nutrición y laboratorio de Microbiología de la Escuela de Formación Profesional de Biología. El tipo de investigación fue experimental y la evaluación de la actividad anti *Candida albicans* se realizó por la técnica de difusión en disco, se colocaron discos de papel filtro embebidos en los extractos de la planta, sobre placas Petri conteniendo agar Mueller Hinton sembrado con *Candida albicans* ATCC 10231, para luego observar la formación de los halos de inhibición. Se encontró que los extractos etanólico y acuoso a la concentración de 10 mg/ml presentaron halos de inhibición de 23 mm y 21 mm respectivamente, el de 5 mg/ml con 17 mm y 15 mm y el 1 mg/ml con 12 mm y 8mm, ( $p < 0,05$ ). Concluyendo que el extracto etanólico de 10 mg/ml es el que más se acerca al control positivo Ketoconazol que presentó un halo de 26 mm de diámetro. La CMI del extracto acuoso y etanólico de las hojas de *Synadenium grantii* Hook "lechero africano" a una concentración de 10 mg/ml fueron 0,156 mg/ml y 0,078 mg/ml respectivamente, y la CMF fue de 0,313 mg/ml y 0,156 mg/ml. Los metabolitos secundarios identificados en los extractos (Tabla 3), coinciden con otras investigaciones realizadas en plantas de utilidad empírica por su efecto antimicótico, dentro de estos metabolitos podemos señalar como los posibles responsables a los flavonoides y/o alcaloides, como también a la acción sinérgica de los metabolitos secundarios de dicha planta.

### **Palabras clave:**

*Candida albicans*, *Synadenium grantii*, actividad antifúngica.

## I. INTRODUCCIÓN

Se ha informado de casos de candidiasis en todas partes del mundo, pero el hongo puede encontrarse con tal frecuencia en individuos sanos, y en tal variedad de formas clínicas que es imposible obtener datos exactos respecto a la distribución geográfica de la enfermedad; pueden aislarse especies de *Candida* tan frecuentemente en las materias fecales, vagina y faringe de individuos de apariencia sana que el tratamiento resulta a menudo difícil. También, como invasores secundarios durante el tratamiento con antibióticos de amplio espectro, hormonas suprarrenales y drogas citotóxicas, las especies de *Candida* crean graves problemas en el tratamiento y cuidado del paciente con enfermedad primaria.<sup>1</sup>

Desde la antigüedad el hombre para tratar sus dolencias, usó las plantas aplicándolos de manera directa, sin embargo, con el descubrimiento de los medicamentos sintéticos estas costumbres se fueron dejando de lado. Con el tiempo, por los múltiples efectos secundarios de los medicamentos sintéticos se está volviendo al uso de las planta medicinales.<sup>2</sup>

En nuestro país muchas especies vegetales nativas e introducidas son empleadas empíricamente en el tratamiento de diferentes enfermedades, sin embargo, la veracidad de dicho efecto terapéutico no se ha demostrado experimentalmente

aún, como por ejemplo el caso de *Synadenium grantii*, cuyas sinonimias botánicas son *Synadenium umbellatum* Pax y *Euphorbia umbellata*, nombres con los que existen antecedentes que refieren su empleo dentro de la medicina folklórica de sus lugares de origen. La presente investigación estuvo orientado a evaluar experimentalmente el efecto anti *Candida albicans* del extracto etanólico y acuoso de las hojas de *Synadenium grantii* "lechero africano" cuyos objetivos fueron:

#### **Objetivo general**

- Demostrar la capacidad anti *Candida albicans* del extracto etanólico y acuoso de hojas de *Synadenium grantii* Hook "lechero africano".

#### **Objetivos específicos**

- Determinar la concentración mínima inhibitoria de los extractos etanólico y acuoso de *Synadenium grantii* Hook "lechero africano". Frente a *Candida albicans*.
- Determinar la concentración mínima fungicida de los extractos etanólico y acuoso de *Synadenium grantii* Hook "lechero africano". Frente a *Candida albicans*.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Antecedentes

Durante muchos siglos, la gente ha usado plantas medicinales para el tratamiento de diversas enfermedades. La literatura nos indica que numerosas plantas han sido consideradas como efectivas y no tóxicas. Ellas poseen un gran potencial pero han sido exploradas sólo parcialmente por métodos modernos. En algunos casos, ciertos principios activos han sido aislados aunque éstos necesitan superar pruebas de toxicidad aguda y crónica en animales antes de pasar a estudios clínicos en humanos.<sup>3</sup>

Entre los trabajos realizados en la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, en la Facultad de Ciencias Biológicas Escuela de Formación Profesional de Biología, Farmacia y Bioquímica, temas relacionados con efecto antifúngico y trabajos realizados con *Synadenium grantii* Hook encontramos.

Alvares<sup>4</sup> señala que *Synadenium carinatum* Boiss (Euforbiaceae), posee un gran potencial farmacológico, por el contenido de los metabolitos secundarios careciendo estudios para el aislamiento e identificación de compuestos de interés.

En el ensayo de citotoxicidad revela que el látex del vegetal es potencialmente tóxico en concentraciones altas, causando daños celulares menos severos e impredecibles.

Huaraca<sup>5</sup> demostró el efecto hipoglucemiante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Synadenium grantii* Hook "lechero africano" sobre la hiperglucemia en ratas Wistar. El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Synadenium grantii* "lechero africano" a la dosis de 400 mg/kg presentó mejor efecto hipoglucemiante. Atribuyó este efecto a los metabolitos como los posibles responsables del efecto hipoglucemiante a los triterpenoides, flavonoides, taninos, catequinas sustancias fenólicas y alcaloides.

## **2.2. Estudios farmacológicos de *Synadenium Grantii* Hook**

La citotoxicidad, así como la actividad antiparasitaria del extracto clorofórmico de *Synadenium grantii* Hook, se realizó y resultó ser activa. También se evaluaron los efectos depresores sobre el sistema nervioso central (SNC) del extracto etanólico de las hojas de *Synadenium umbellatum* (SEE) y sus fracciones de hexano (FH), cloroformo (CF) y metanol/agua (FM). En varias pruebas se utilizaron ratones machos albinos (*Mus musculus*), entre ellos el sueño inducido por barbitúricos, campo abierto y la prueba de rota-rod. El SEE ha sido probado en dosis de 25, 50 y 100 mg/kg, se ensayó FH a una dosis de 10 mg/kg, la dosis CF de 20 mg/kg y la dosis de FM 25 mg/kg. La SEE y las fracciones de HF y CF, pero no la FM, muestran unos posibles efectos depresivos sobre el SNC, mientras que sí fueron capaces de aumentar el tiempo de reposo y reducir el número de bolos fecales en campo abierto, además de potenciar el sueño inducido por barbitúricos. En la prueba de la rota-rod se observó que el SEE y las fracciones fueron incapaces de causar ataxia motora o la relajación muscular. Por lo tanto, se concluye que el extracto etanólico y las fracciones de la FC y FH de *Synadenium umbellatum* Pax. Pueden tener un efecto depresor sobre el SNC.<sup>6</sup>

Estudiaron la actividad antiulcerosa del látex de *Synadenium grantii*. En este trabajo refieren que *Synadenium grantii* Hook f. Euphorbiaceae, es conocida

popularmente como leitossinha o Janaúba. El látex diluido (18 gotas/l de agua) se utiliza comúnmente en el sur de Brasil para el tratamiento de trastornos gástricos.<sup>7</sup> Estudiaron la eritrodermia secundaria producida por plantas productoras de látex *Synadenium grantii*. Se presentó el caso de una niña de cuatro años de edad que manipuló e ingirió parte de una planta de la familia de las euforbiáceas *Synadenium grantii*.<sup>8</sup>

Purificaron y caracterizaron una glicoproteína del látex (LGP) de *Synadenium grantii* por la combinación de calor y precipitación cromatográfica de permeación de gel. LGP es una proteína estable al calor incluso a 80 °C mostró una única banda fuerte tanto en SDS-PAGE (dodecil sulfato de sodio – poliacrilamida electroforesis en gel), así como en nativo (ácido) PAGE. LGP es una proteína monomérica que aparece como única banda en condiciones reductoras. La purificación y caracterización de una glicoproteína de látex de *Synadenium grantii* se presenta con actividad lítica de fibrinógeno humano (genotipo).<sup>9</sup>

Investigaron la actividad angiogénica del látex de *Synadenium umbellatum Pax*, conocida popularmente como "pegamento nota" es una planta medicinal que crece en regiones tropicales. El látex de esta planta se ha utilizado para tratar varias enfermedades tales como la diabetes, lepra, tripanomiasis, leucemia y diversos tumores malignos. En este estudio, se evaluó la actividad angiogénica del látex de *Synasenum umbellatum* mediante pruebas de la membrana corioalantoica (CAM) de huevos embrionados de pollo. Los resultados mostraron un aumento significativo del sistema vascular ( $p < 0,05$ ) en comparación con el control negativo (H<sub>2</sub>O). El análisis histológico está de acuerdo con los resultados obtenidos. En conclusión, los datos indican que bajo las condiciones experimentales de este estudio, el látex de *Synadenium umbellatum* presentó efecto angiogénico.<sup>10</sup>

El látex presenta, por norma general, un pH prácticamente neutro que oscila entre 7,0 y 7,2 aunque al entrar en contacto con el aire se vuelve ácido. Transcurridas entre doce y veinticuatro horas desde su extracción, el pH desciende a 5,0 sobreviniéndose la coagulación de la sustancia cuando se sitúa con un pH igual o inferior a 4,2.<sup>11</sup>

### **2.3. Genero *Candida***

Las lesiones producidas por *candida* eran conocidas en la antigüedad, descubriéndose el hongo en 1839 por Lagenbek. Dos años más tarde Berg demostró que era la causa de aftas bucales del recién nacido. En 1843 Robín le dio el nombre de *Oídium albicans* (levadura en forma de huevo). En 1923 Berkhont propuso el nombre definitivo a la especie *Candida albicans* termino que sustituyo a los numerosos propuestos con anterioridad. Finalmente Castellani en 1927 describió las características de la candidiasis broncopulmonar e incluyo las levaduras entre los hongos. El género *Candida* pertenece a la división Deuteromicetes o Fungí imperfecti (hongos imperfectos) clase Blastomicitidae familia Cryptococaceae. Se incluye el grupo de las levaduras, formas fúngicas unicelulares que se multiplican por gemación. Se conocen más de 150 especies pero solo tienen importancia como patógenos oportunistas para el hombre *C. albicans*, *C. guillemondii*, *C.krusei*, *C.parapsilosis*, *C. estellatoidea*, *C.tropicalis*, *C.pseudotropicalis*, *C.lucitaneae* y *C. rugosa*. Siendo la primera la que se aísla con mayor frecuencia.<sup>12</sup>

En las diferentes especies predomina la forma unicelular tratándose de células pequeñas (3-5um) y paredes delgadas. La especie *C. albicans* presenta células de morfología oval, usualmente acompañadas de estructuras tubulares (seudohifas) con estrechamiento en los tabiques de los que salen ramificaciones.<sup>13</sup>

La especie de *Candida* son patógenos oportunistas humanos o animales en los cuales viven en estado saprofítico. La cavidad bucal y el resto del tracto

gastrointestinal son territorios preferentes en donde *Candida albicans* se encuentra en el 20 o 100 por ciento de las personas y en proporción menor entre 5 y el 10 por ciento. *C. Krusei*, *C. parapsilosis* y *C. Tropicalis*. El tracto genital femenino es otro lugar de frecuente asentamiento, 10 a 20 por ciento de las mujeres y hasta un 80 por ciento en las embarazadas. Un hecho importante es la práctica ausencia de estos microorganismos en la piel normal, a excepción de porcentajes que no llegan al cinco por ciento de *C. Krusei* y *C. parapsilosis*. Por lo que respecta *Candida albicans* se ha encontrado en el intestino de palomas, vacas y cerdos, habiéndose aislado también en el suelo y alimentos, posiblemente contaminados a partir de las heces de estos animales. El origen de las infecciones es en la mayor parte de los casos, de origen endógeno y el punto de partida del hongo, la mayoría de las veces es el tracto gastrointestinal. Un tratamiento enérgico con antibióticos, por ejemplo conlleva en ocasiones la destrucción de la microbiota comensal, por lo que *Candida* puede multiplicarse intensamente en este nicho ecológico, con lo cual puede producirse una diseminación de mayor o menor intensidad a otros territorios orgánicos normalmente exentos, diseminación que de no ser controlada por los mecanismos defensivos del huésped, puede originar una infección clínica. Aunque el aire parece que no juega un papel alguno en la transmisión, no se puede descartar que la infección pueda adquirirse directamente por contacto interhumano o a través de fómites contaminados, en este caso la piel agrietada o macerada constituye la puerta de entrada del microorganismo.<sup>14</sup>

### **2.3.1. Patogenia**

La especie *C. albicans*, la más frecuente en patogenia humana, puede infectar cualquier tejido aunque la forma más común de candidiasis es la infección superficial de la piel y mucosas. En los tejidos afectados el hongo se detecta en forma levaduriforme y micelio. El carácter invasivo de este último viene dado por

la mayor facilidad de las hifas de penetrar en los tejidos y su mayor resistencia a la fagocitosis. Al igual que en las infecciones bacterianas, el fenómeno de la adherencia, fase previa a la colonización e invasión, parece de suma importancia, habiéndose demostrado la capacidad de adherencia de *C. albicans* a las células epiteliales de la boca y de la vagina, a las células endoteliales, a la fibronectina, coágulos sanguíneos y otras estructuras orgánicas. La adherencia parece estar relacionada directamente con la formación del tubo germinal, puesto que las blastosporas muestran una escasa adherencia a los tejidos, sin embargo la formación del tubo germinal en las blastosporas se acompañan de un notable incremento de su capacidad de adhesión a las células de los tejidos colonizados.<sup>12</sup> Una vez que el microorganismo invade los tejidos o penetra en el torrente circulatorio, los polinucleares, monocitos, macrófagos y eosinófilos actúan como mecanismo de defensa. Los polimorfos nucleares pueden lesionar las pseudohifas y fagocitar las blastosporas, así como los monocitos. Ambos tipos de células constituyen un importante mecanismo de destrucción intracelular del hongo a través de la mieloperoxidasa, el peróxido de hidrogeno y el anión superóxido.<sup>1</sup> Los mecanismos inmunológicos que intervienen en las infecciones por *Candida* son parcialmente conocidos gracias al estudio de pacientes con deficiencias inmunes y candidiasis contaminante. Por lo que se refiere a la respuesta inmune de base humoral, la IgG y otros componentes del suero ejercen una acción opsonizante (marcado para eliminar) sobre *C. albicans* y algunos pacientes con candidiasis diseminada presentan altos títulos de anticuerpos específicos, aunque el posible papel protector de estos continúa sin ser aclarado. Las proteínas séricas fijadoras de hierro inhiben el crecimiento del microorganismo ya que este metal es un importante factor de crecimiento del hongo. Además, existen diferentes sustancias humorales que presentan un efecto inhibitorio de su crecimiento, así

como anticuerpos aglutinantes de las células de *C. albicans*. El papel de todas estas sustancias se encuentra aún por dilucidar.<sup>13</sup>

Los factores pre disponentes más importantes para la infección por hongos oportunistas están relacionadas la implantación de prótesis, sobre todo válvulas cardiacas, las intervenciones quirúrgicas abdominales y las quemaduras graves. Se ha descrito también la presentación de candidiasis en diversos estados que cursan la mayor parte de ellos con alguna alteración de los mecanismos naturales de defensa, entre ellos la mal nutrición intensa, el síndrome de mala absorción, las discrasias sanguíneas, agammaglobulinemias, timoma, hipoparatiroidismo, hipotiroidismo e hipoadrenalismo.<sup>13</sup>

### **2.3.2. Manifestaciones clínicas**

Las especies pertenecientes al género *Candida* pueden originar una gran variedad de cuadros clínicos como resultados de las complejas interacciones entre los microorganismos y el huésped sensible a la infección. Las infecciones por *C. albicans* se puede dividir en tres grupos, el primero la localización es exclusivamente cutáneo mucosa. El segundo está constituido por la candidiasis sistémica en la que las diversas situaciones favorecedoras ya comentadas y la depresión de los mecanismos defensivos del huésped conducen a la diseminación de la infección con afectación de diversas viseras (candidiasis profunda), muchas veces de evolución fatal. El tercer grupo comprende a los pacientes con candidiasis mucocutánea crónica.<sup>12</sup>

### **2.3.3. Etiología de *Candida albicans***

Suele presentarse como una célula oval levaduriforme de dos a cuatro micras, con paredes finas; sin embargo, en tejidos infectados también se han identificado formas filamentosas de longitud variable, con extremos redondos de tres a cinco micras de diámetro y pseudohifas, que son células alargadas de levadura que permanecen unidas entre sí. Las levaduras o blastosporas son microorganismos

eucarióticos, las cuales se reproducen asexualmente por un proceso específico de división celular conocido como gemación. Este proceso de división implica la producción de nuevo material celular proveniente de la superficie de la blastospora. Cuando el brote o yema ha crecido y se encuentra en su tamaño óptimo, se suscita la división celular y se forma un tabique o septo entre las dos células. La forma filamentosa del hongo (hifa), es una estructura microscópica tubular, la cual contiene múltiples unidades celulares divididas por septos y puede surgir a partir de blastosporas o de hifas existentes. Esta crece continuamente por extensión apical. La apariencia microscópica de todas las especies de *Candida* es similar; todas las levaduras son Gram positivas, pero en algunas ocasiones la forma de las blastosporas puede variar de ovoide a elongada o esférica. Microscópicamente *C. albicans* presenta dimorfismo, el cual es una transformación de la forma ovoide de las blastosporas (levaduras) gemantes a hifas.<sup>14</sup>

La composición química de *C. albicans* está representada por 20 a 40% de proteínas y 30 a 50% de polisacáridos, mientras que la proporción de lípidos es variable. La fracción lipídica va a depender de la cepa, edad del cultivo, condiciones ambientales y del origen de la fuente de carbono. La pared celular de *C. albicans* está compuesta principalmente por los polisacáridos Manáno, Glucáno y Quitina. Aunque la síntesis de los componentes de la pared celular está dinámicamente influenciada por las condiciones de crecimiento y por los estadios metabólicos. El polisacárido manáno representa aproximadamente entre 15,2% y 22,9% del peso seco y poco más de 40% de los polisacáridos de la pared celular del hongo. El D-Glucán  $\beta$ -1-3 y el D-Glucán  $\beta$ -1-6 constituyen entre 47% y 60% del peso seco de la pared celular. Otros componentes han sido reportados, tales como proteínas en cantidades que oscilan entre 6% y 25%, lípidos entre 1% y 7% y Quitina entre 0,6% y 9% del peso de la pared celular.<sup>15</sup>

### 2.3.4. Tratamiento

Las candidiasis limitadas a piel o mucosa suelen responder favorablemente a la instauración de una terapéutica antifúngica tópica. La micosis profunda necesita tratamiento específico con antibióticos antifúngicos sistémicos, dada la gravedad de estas infecciones. Sin embargo, en ocasiones su administración se encuentra limitada por los efectos tóxicos secundarios a que pueden dar lugar, dado que las células fúngicas son eucariotas al igual que las humanas, por lo cual los fenómenos de toxicidad son previsibles en mayor o menor grado. Sobre los factores predisponentes favorables a la presentación de las formas graves de candidiasis es difícil influir favorablemente, hecho importante al objeto de no propiciar la diseminación del hongo y su localización posterior en órganos vitales. Salvo en contadas situaciones, como el control riguroso de un paciente diabético o el uso correcto de un antimicrobiano.<sup>12</sup>

Tabla 1. Fármacos antifúngicos usados en las candidiasis cutáneo mucosas.

MICOSIS	ANTIFÚNGICOS
Cutánea	Nistatina, Clotrimazol, Econazol, Miconazol, ketoconazol (Tópica)
Oniquia y paroniquia	Clotrimazol (Tópica)
Muguet	Nistatina, Fluconazol (oral)
Esofagitis	Nistatina, fluconazol (oral) anfotericina B(Intravenosa)
Vulvovaginitis	Nistatina, Clotrimazol (tópica) Fluconazol, Itraconazol(oral)
Candidiasis mucocutanea crónica	Fluconazol, ketoconazol (oral) Anfotericina B (intravenosa)

Fuente: Murray.<sup>15</sup>

En el tratamiento de la candidiasis sistémica se maneja la anfotericina B. por vía endovenosa, sola o combinada con flucitosina oral o bien fluconazol en monoterapia, oral o intravenosos. Todo ellos deben ser administrados durante un

periodo de tiempo largo, generalmente no inferior a las seis semanas. La aparición del fenómeno de la resistencia a los anti fúngicos hace necesario el estudio de la sensibilidad in Vitro, previamente al tratamiento. El inconveniente es que los métodos de estudio no están perfectamente estandarizados, pues se encuentran sujetos a una serie de parámetros (medio de cultivo, pH, inóculo, temperatura, tiempo de incubación) que pueden proporcionar resultados erróneos.<sup>13</sup>

## **2.4. Mecanismos de acción de los antifúngicos**

La gran similitud entre las células mamíferas y fúngicas resulta un problema a la hora de diseñar la molécula antifúngica, pues esta debe ser selectiva de la célula patógena y no de la célula humana sana. Los agentes antifúngicos comúnmente son utilizados ante infecciones de las mucosas de las cuales una de cuatro están relacionadas con hongos patógenos.<sup>16</sup>

### **2.4.1. Acción del antifúngico sobre la membrana celular del hongo**

La membrana celular de la célula humana así como la de los hongos, desempeña una importante función en la división celular y en el metabolismo. Las complejas partículas lipídicas llamadas esterolatos, son aproximadamente el 25% de la membrana celular. Sin embargo, el contenido del esteroles de la célula fúngica y mamífera es diferente. En las células de los mamíferos el colesterol es el esteroles que predomina y en las células fúngicas el primario es el ergosterol. La diferencia del contenido de esterolatos ha sido explotada como blanco de acción en los medicamentos antifúngicos. Dentro de ellos se tiene a los polímeros, azoles y alilaminas.<sup>16</sup>

#### **a. Polieno**

Los medicamentos que se encuentran en este grupo se unen al ergosterol presente en la membrana celular fúngica, donde se forman poros que alteran la permeabilidad de la membrana lo que permite una pérdida de proteínas, glúcidos y cationes monovalentes y divalentes, causas de la muerte celular.<sup>16</sup>

### **b. Azoles**

Estos inhiben a la citocromo P-450-3-A de la célula fúngica, a través de la inactivación de la enzima C-14-alfa-dimetilasa, con lo cual se interrumpe la síntesis del ergosterol en la membrana celular, debido a la falta de ergosterol se comienzan a acumular esteroides tóxicos intermedios, aumenta la permeabilidad de la membrana y se interrumpe el crecimiento del hongo.<sup>16</sup>

### **c. Alilaminas**

Trabajan de forma similar a los azoles, conceptualmente ellas inhiben la síntesis del ergosterol, sin embargo, este grupo actúa en un paso temprano de la síntesis del ergosterol.

Las alilaminas inhiben a la enzima escualeno epoxidasa, de esta forma disminuye la concentración de ergosterol, aumentan los niveles de escualeno, aumenta la permeabilidad de la membrana celular y disminuye el crecimiento del hongo.<sup>16</sup>

## **2.4.2. Antifúngicos que actúan sobre la pared celular del hongo**

**Lipopeptidos.** La pared celular del hongo es fundamental en su viabilidad y patogenicidad. Esta sirve como cubierta protectora, le provee morfología celular, facilita intercambio de iones, la filtración de proteínas y participa en el metabolismo y catabolismo de nutrientes complejos, la ausencia de pared celular es otro de los blancos de acción en la terapia antifúngica.

La estructura de la pared celular de los hongos está compuesta de un complejo proteico y polisacárido cuya composición varía en dependencia de la especie de hongo. La distribución de las proteínas y carbohidratos en la matriz esta en relación con la función de la pared celular y los procesos de osmosis y lisis, los antifúngicos inhiben la síntesis de los glucanos a través de la inactivación de la enzima 1,3 - beta- glucano-sintetaza. La falta de glucanos en la pared celular la vuelve débil e incapaz de soportar el estrés osmótico, por lo que el hongo sufre la muerte.<sup>16</sup>

### **2.4.3. Antifúngicos que actúan sobre el núcleo de la célula del hongo**

**Antimetabolitos.** Un clásico antimetabolito es la flucitosina o 5-fluorocitosina. Este fármaco es transportado por la citosina permeasa en el citoplasma de la célula fúngica, donde se convierte en 5- fluorouracil (5-fu) por la citosina diaminasa. El 5-fu es fosforilado e incorporado dentro del ARN convirtiéndose en el dexosinucleotido, el cual inhibe a la timidilato sintetasa y de esta forma impide la síntesis de proteínas de la célula. También inhibe la síntesis de la proteína fúngica, reemplazando el uracil con 5-fu en el ARN fúngico.<sup>16</sup>

### **2.4.4. Agentes misceláneos**

En esta clase se encuentra el griseoflavin, el cual inhibe la mitosis celular, al destruir el huso mitótico, necesario para efectuar la división celular.<sup>16</sup>

## **2.5. Plantas medicinales**

Las plantas medicinales son aquellas que elaboran unos productos llamados principios activos, que son sustancias que ejercen una acción farmacológica beneficiosa o perjudicial para el organismo vivo. Su uso data desde la más remota antigüedad, de acuerdo a diversos testimonios históricos pertenecientes a distintas civilizaciones y culturas que han ido sucediendo en nuestro planeta, padeciendo aun de un estudio científico.<sup>1</sup>

### **2.5.1. Importancia de las plantas medicinales**

El Perú, país con abundancia de recursos vegetales cuenta con gran variedad de especies, de las cuales las plantas medicinales constituyen en gran porcentaje, siendo así una fuente inagotable de investigación, nuestro país posee grandes y variados recursos vegetales que presentan gran interés para todos los medios científicos del mundo, esto debido a su posición geográfica, a su compleja geografía, a la gran variedad de climas y de suelos.<sup>17</sup> la actividad antifúngica de las plantas ha sido muy estudiada por la resistencia de las micosis a los distintos tratamientos, despertando el interés de varios científicos.<sup>2</sup>

## 2.5.2. *Synadenium grantii* Hook “lechero africano”

### Comentario histórico

La planta conocida como lechero africano, planta de la vida, planta divina oriunda de Sudáfrica fue descubierto por el científico norteamericano Grant Hook. Posteriormente viajeros lo introdujeron en el sur de América, llegando a Brasil, luego a Perú por el río Amazonas durante el siglo XX; conociéndose entonces como la planta que cura el cáncer, por oriundos de algunos pueblos. En las investigaciones se descubrió que la planta poseía un compuesto denominado Phorbol, cuyos esteres tienen la capacidad de actuar en tumores neoplásicos, impidiendo la proliferación de células cancerígenas y regenerando tejidos destruidos por el cáncer.<sup>3</sup>

**Clasificación taxonómica** (según el sistema de clasificación de Cronquist A. 1988).

<b>División</b>	:	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	:	Magnoliopsida
<b>Orden</b>	:	Euphorbiales
<b>Familia</b>	:	Euphorbiaceae
<b>Género</b>	:	<i>Synadenium</i>
<b>Especie</b>	:	<i>Synadenium grantii</i> Hook.
<b>Nombre vulgar</b>	:	"lechero africano"

**Fuente:** Certificado del *Herbarium Huamanguensis*, UNSCH, 2012.

### Hábitat y adaptabilidad climática

La planta es de clima tropical donde su desarrollo es a plenitud, siempre que cuente con abundante sol y terrenos drenados; en climas templados también desarrolla bien, sólo que se observa un poco de retraso en su crecimiento, no es de climas fríos, puesto que el abundante látex que contiene, se congela y no hay circulación normal, estancándose su crecimiento.<sup>3</sup>

### **Nombres vernaculares**

Lechero africano, planta de la vida, planta milagrosa, planta de sanación, planta divina.<sup>3</sup>

### **Descripción botánica**

Es un arbusto suculento que puede alcanzar los cinco metros de altura, con hojas ovaladas, peciolo cortos y flores rojo oscuras. Cuando las ramas y corteza se quitan, la planta libera un látex blanco que es altamente irritante.<sup>3</sup>

**Tamaño de la planta.** En África su crecimiento máximo promedio es de 4,50 m de altura, en Perú se experimentó un crecimiento de 4,00 m de altura, a los ocho años, tiene abundante follaje con abundantes ramas que abarca una circunferencia de hasta 2,5 m de diámetro se observó también que en terrenos arcillosos alcanza una altura mayor.<sup>3</sup>

**Tallo.** La planta de la vida o lechero africano, es un arbusto o arbolito monoico con el tallo cilíndrico, verde inerme en suelos con abundante nutrientes cuando la planta es tierna, con marca en las hojas, tornándose leñoso con el tiempo, con abundante látex, corteza grisácea escamosa en planta adulta y en plantas tiernas la corteza es verde en suelos ricos y purpúrea en suelos pobres, tiene abundante ramas que brotan desde la altura de las primeras hojas.<sup>3</sup>

**Hojas.** Las hojas son elíptica de 5 cm a 17 cm de largo y de 2 cm de ancho, liza, alterna con base atenuada, margen entero, color verde en el haz y a veces purpúreas en el envés, de textura gruesa peciolo de unos 5 mm a 8 mm de largo contiene también látex se mantienen verdes y no se desprenden fácilmente, cuando el arbolito es robusto y está en suelos ricos y amarillento en suelos pobres.<sup>3</sup>

**La flor.** Según el sistema de ramificación la inflorescencia es de tipo cimosa, según su ubicación es axilar de 5 a 10 cm de largo, sobre pedúnculos de 3 a 5 cm de longitud, según el número de flores pluríforas, el involucro de 5 mm a 6 mm de

diámetro de color rojo oscuro. Las flores carecen de pétalo sépalo a los que se le denomina (aclamideas), el pistilo posee un estilo muy reducido el cual se encuentra rodeada de cinco grupos de estambres; el ovario de la flor es de tipo trilobular pubescente; fruto trilobado de unos 8 mm a 10 mm de largo conteniendo semillas de 2,5 mm de largo. Además una de las características más importantes de la inflorescencia es que el 99,9 % de las plantas en cultivos expansivos, tienen flor en poca cantidad mientras que un 0,1% la floración es total cubriéndose todo el árbol de flor sin la presencia de una sola hoja, esto ocurre a la edad de dos años aproximadamente.<sup>3</sup>

**Raíz.** Las raíces de la planta son ramificadas no cuenta con raíz principal, los pelos absorbentes son abundantes en cada ramificación o raíz secundaria, en terrenos ricos en nutrientes.<sup>3</sup>

### **Composición química**

Se aislaron cuatro antocianinas, cianidina 3-O-(2''-(5'''-(Ep-cumaroil)-beta-apiofuranosil)-beta-xilopiranosido)-5-O-beta-glucopiranosido. cianidina 3-O-(2''-(5'''-(Ep-cumaroil)-beta-apiofuranosyl)-beta-xilopiranosido), cianidina 3-O-(2''-(5'''-(E-ácido cafeico)-beta-apiofuranosyl)-beta-xilopiranosido) y cianidina 3-O-(2''-(5'''-(E-feroil)-beta-apiofuranosil)-beta-xilopiranosido) a partir del látex de las hojas del arbusto africano, (*Synadenium grantii* Hook, Euphorbiaceae) junto con la conocida cianidina 3-O-beta-xilopiranosido-5-O-beta-glucopiranosido y cianidina 3-O-beta-xilósido. Los cuatro pigmentos anteriores son las primeras antocianinas reportadas que contienen el monosacárido apiosa, y las tres subunidades 5'''-cinamoilo -2''-(beta-apiosil)-beta-xilósido no han sido previamente informados para cualquier compuesto lo mismo para *Synadenium grantii* Hook.<sup>4</sup>

En otro estudio encontraron que el látex de *Synadenium grantii* Hook. f. (Euphorbiaceae) produjo una irritación de la piel y el nuevo, 12-O-tigloil-4-desoxiforbol-13-isobutirato (I). La identidad del alcohol primario diterpeno y las

posiciones relativas de los grupos esterificantes se establecieron por análisis espectral y experimentos que conducen a la hidrólisis y acetilación del compuesto (I). (I) es el primer derivado de forbol del género *Synadenium* en ser informado.

Aislaron dos nuevos forbol-ésteres de tipo diterpeno a partir del extracto de cloroformo de las hojas de *Synadenium grantii* Hook. Y lo identificaron como 3,4,12,13-tetraacetilforbol-20-fenilacetato y 4 - desoxiforbol-12, 13 - ditiglato para los que se adoptaron los nombres triviales Synagrantol A y B, respectivamente. Por otra parte, dos triterpenos conocidos fueron aislados.<sup>18</sup>

La cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) demostró la presencia de esteres del diterpeno tigliano en el látex, identificados como 12-desoxiforbol-13 - (2-metilpropionate) y forbol 12,13,20 – triacetato.<sup>19</sup>

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Lugar de ejecución**

El presente trabajo se realizó en los laboratorios de Bromatología y Nutrición, y Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga.

El trabajo de investigación se realizó durante los meses de noviembre del 2012 febrero del 2013.

#### **3.2. Muestra biológica**

Hojas de *Synadenium grantii* Hook "lechero africano" muestreo por conveniencia.

#### **3.3. Recolección de Muestra biológica**

La cantidad de la muestra fue de 3 kg de hojas *Synadenium grantii* Hook "lechero africano" recolectadas en la ciudad de Ayacucho, en horas de la mañana, entre las 6 a 7 AM; antes que los rayos solares iluminen la planta, se introdujeron en bolsas de papel para evitar su transpiración durante su traslado, se escogieron las hojas de buen estado, libre de polvo, tierra y partes de la planta que no utilizados.<sup>20</sup>

Una parte de la muestra, específicamente una rama con hojas e inflorescencia sirvió para la identificación botánica, realizada en el *Herbarium Huamangensis* de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga por la Bióloga Laura Aucasime Medina.

### **3.4. Cepa**

*Candida albicans* ATCC 10231, proporcionada por el Área Académica de Microbiología de la Escuela de Formación Profesional de Biología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga.

### **3.5. Fármaco de referencia**

Ketoconazol. Tabletas de 200 mg. (Fuente. Laboratorio Farminustria).

### **3.6. Diseño metodológico**

#### **3.6.1. Preparación de la muestra biológica**

##### **Molienda**

Las hojas fueron sometidas a molienda en mortero de porcelana, luego se tamizaron con malla de 3 mm, de diámetro obteniéndose partículas no mayores de 3 mm.

#### **3.6.2. Obtención de extracto acuoso**

Se pesó 10 g de hojas de *Synadenium grantii* Hook pulverizadas y se añadió a 100 ml de agua destilada hirviendo obteniéndose un extracto por infusión de 10 mg/ml de la cual se obtuvo las concentraciones de 5 mg/ml y 1 mg/ml.

#### **3.6.3. Obtención de extracto etanólico**

Las hojas pulverizadas de *Synadenium grantii* Hook "lechero africano" fueron sometidas a la extracción utilizando etanol, se macero durante cinco días, en frascos de color ámbar con agitaciones permanentes, seguidamente se filtró y luego se concentró en baño maría, procediendo a secar en estufa a no más de 50C°, hasta obtener un extracto semisólido de color marrón verdusco en su forma más estable.

Se pesó 100 mg del extracto etanólico obtenido, luego se diluyó en 10 ml de agua destilada estéril, siendo esta la solución madre de 10 mg/ml de la cual se extrajo 1 ml con una pipeta para verterlo en tubo conteniendo una determinada cantidad de agua destilada estéril, para así obtener concentraciones de 5 mg/ml y 1 mg/ml.

### **3.6.4. Identificación de los metabolitos secundarios**

Las reacciones de identificación de los diferentes metabolitos secundarios presentes en los extractos etanólico y acuoso de las hojas de *Synadenium grantii* Hook "lechero africano" se realizaron siguiendo los procedimientos propuestos por Miranda y Cuellar.<sup>21</sup> el cual se realizó en el laboratorio de Farmacia y Bioquímica.

### **3.6.5. Determinación de la actividad anti *Candida albicans***

#### **Preparación del inóculo**

1. Se tomó la cepa de *Candida albicans* con el asa de siembra.
2. Luego se resuspendió en un tubo de vidrio con solución salina fisiológica 0,85%.
3. Se homogenizó y ajustó a la turbidez de 0,5 en la escala de McFarland que equivale a  $15 \times 10^8$  UFC).
4. Se realizó este paso visualmente, teniendo en cuenta la luz adecuada, comparando así el inóculo con el estándar de 0,5 de McFarland contra un fondo blanco, el cual se usó inmediatamente.<sup>21</sup>

#### **Determinación de halo de inhibición**

##### **Método de difusión en disco**

1. Se preparó placas Petri con agar Mueller Hinton.
2. Se sembró con la ayuda de un hisopo estéril embebido en el inóculo, dejándose secar en la estufa por un espacio de 5 minutos para que se absorba la humedad.
3. Se incorporaron discos de papel filtro especial de 5 mm de diámetro embebidos en los extractos acuoso y etanólico de las hojas de *Synadenium grantii* Hook.
4. Se incubaron a 37°C para así observar la formación de halos de inhibición a las 48 horas y determinar la actividad antimicótica.<sup>22</sup>

## **Utilización de controles**

### **Control negativo**

Se utilizó como control negativo al agua destilada.

### **Control positivo**

Se utilizó como control positivo al Ketoconazol (antifúngico).

### **3.6.6. Diseño experimental**

Para el presente trabajo, se formó ocho grupos de cinco repeticiones.

Grupo I : Control Negativo con agua destilada.

Grupo II : Control positivo con Ketoconazol.

Grupo III : Administrado con extracto acuoso a 10 mg/ml de concentración.

Grupo IV : Administrado con extracto acuoso a 5 mg/ml de concentración.

Grupo V : Administrado con extracto acuoso a 1 mg/ml de concentración.

Grupo VI : Administrado con extracto etanólico a 10 mg/ml de concentración.

Grupo VII : Administrado con extracto etanólico a 5 mg/ml de concentración.

Grupo VIII : Administrado con extracto etanólico a 1 mg/ml de concentración.

### **3.6.7. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)**

El cultivo de *Candida albicans* ATCC 10231 fue ajustado al estándar de 0,5 de la escala de McFarland. Para hallar la CMI se prepararon quince tubos previamente esterilizados y rotulados del número uno al quince. A continuación se detalla:

1. A partir del tubo número uno hasta el tubo quince se agregó 1 ml del caldo nutritivo.
2. Posteriormente se agregó 1 ml de extracto al tubo número uno a partir del cual se traspasó al tubo número dos y así sucesivamente hasta el tubo número catorce de este se extrajo 1 ml y se descartó.
3. El tubo número quince no recibió extracto siendo este el control.
4. 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>23</sup>

### **3.6.8. Determinación de la concentración fungicida mínima (CMF)**

Para la determinación de la concentración mínima fungicida (CMF) se procedió a partir de la concentración mínima inhibitoria (CMI), realizándose de la siguiente manera:

1. Se observó la turbidez de los tubos para la determinación de la CMI a simple vista.
2. Se procedió a sembrar con la ayuda del asa de Kolle, los caldos de los tubos no turbios en las placas con Agar Saboraud.
3. Posteriormente se incubo a 37°C por 24 horas.<sup>23</sup>

### **3.6.9. Lectura de los resultados**

Los resultados para el ensayo de "Test difusión en disco", se reportaron en función al diámetro del halo que se forma por acción de los extractos representado en milímetros. El diámetro del halo se midió en cuatro direcciones, tomando como resultado el promedio de estas mediciones.

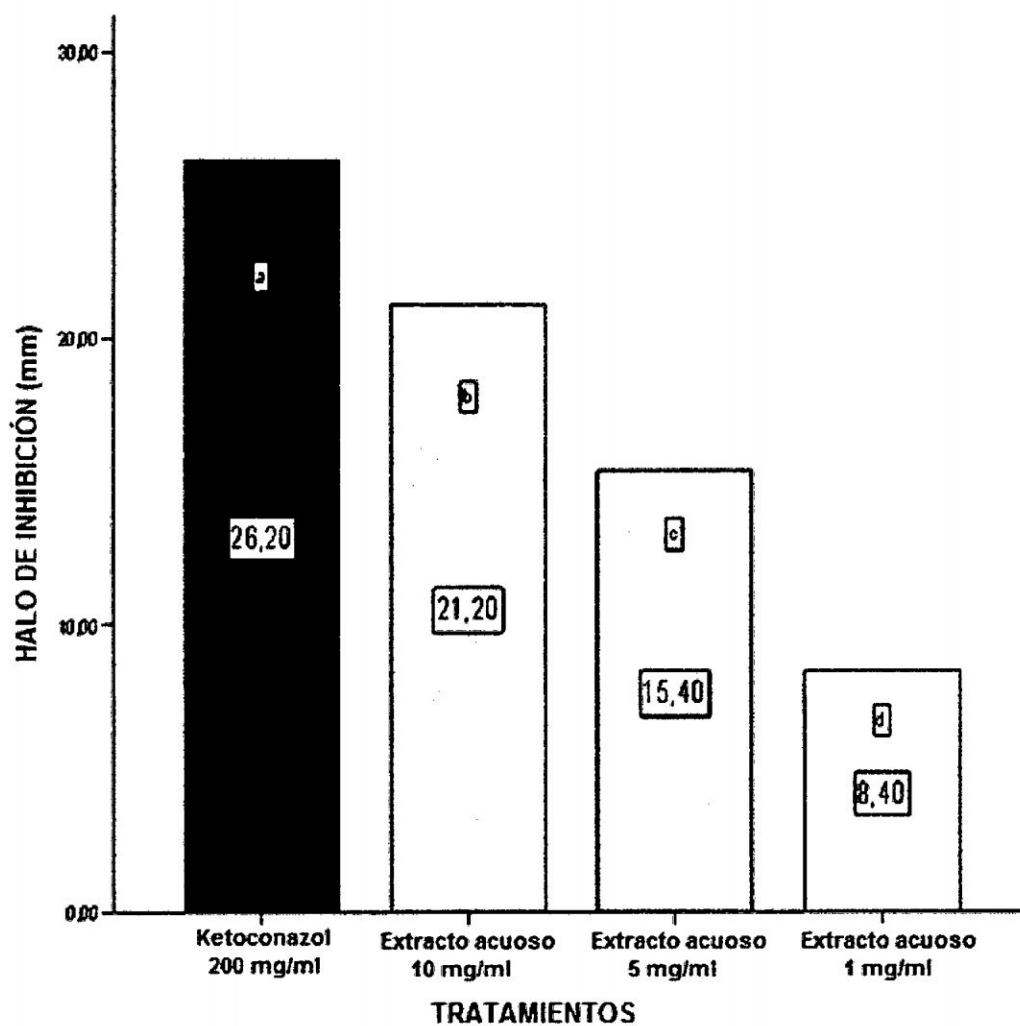
Para el cálculo de porcentaje de inhibición se usó la siguiente formula. Tomando como patrón al antifúngico ketoconazol.

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

### **3.6.10. Análisis estadístico**

Los datos obtenidos en el presente trabajo de investigación se evaluaron estadísticamente por el diseño completamente aleatorizado (ANVA) y comparaciones múltiples de Tukey con un nivel de significancia de 0,05 para esto se usó el Software SPSS 15,0.<sup>24</sup>

## **IV. RESULTADOS**



ANVA  $p < 0,05$

Figura 1. Promedio de los halos de inhibición por efecto del extracto acuoso de las hojas de *Synadenium grantii* Hook "lechero africano", frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Ayacucho, 2014.

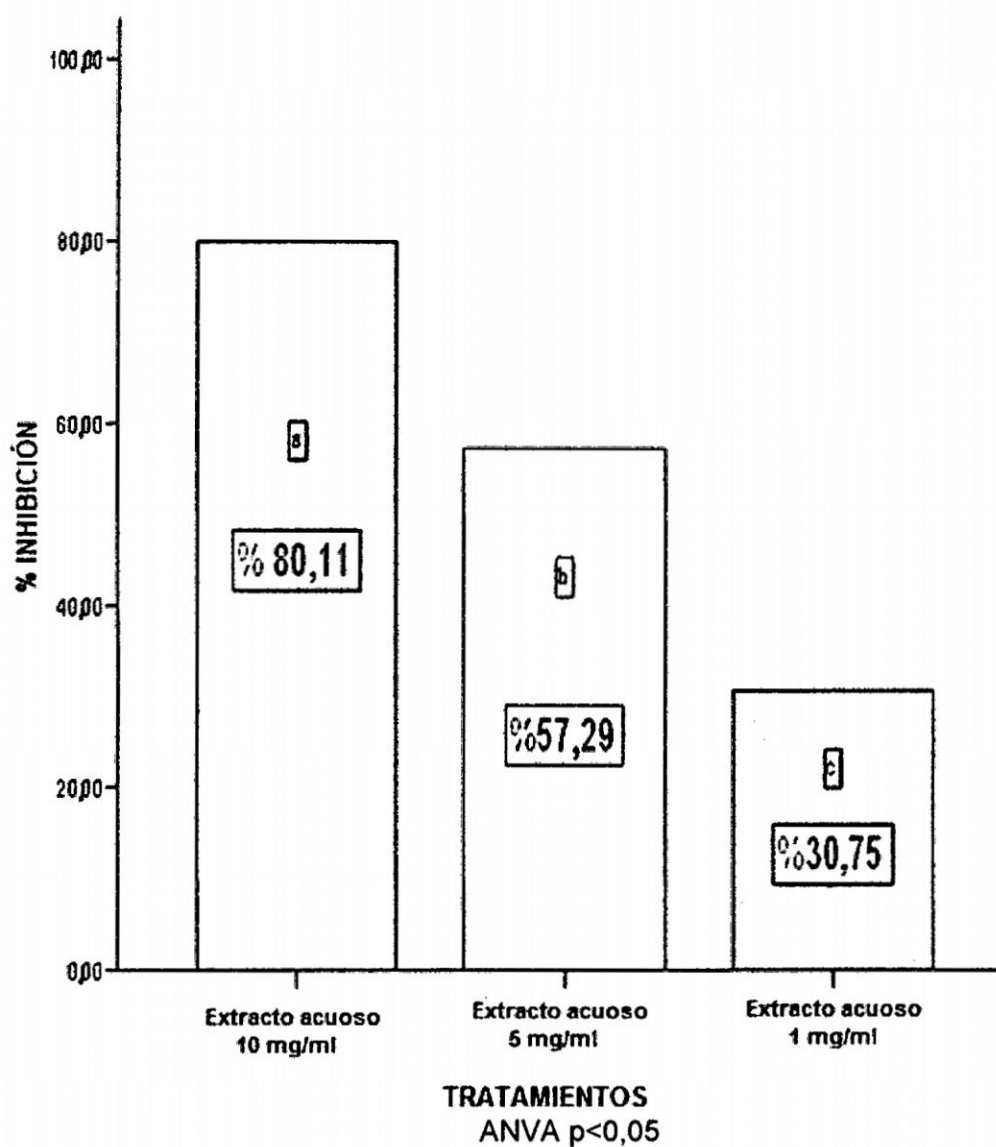
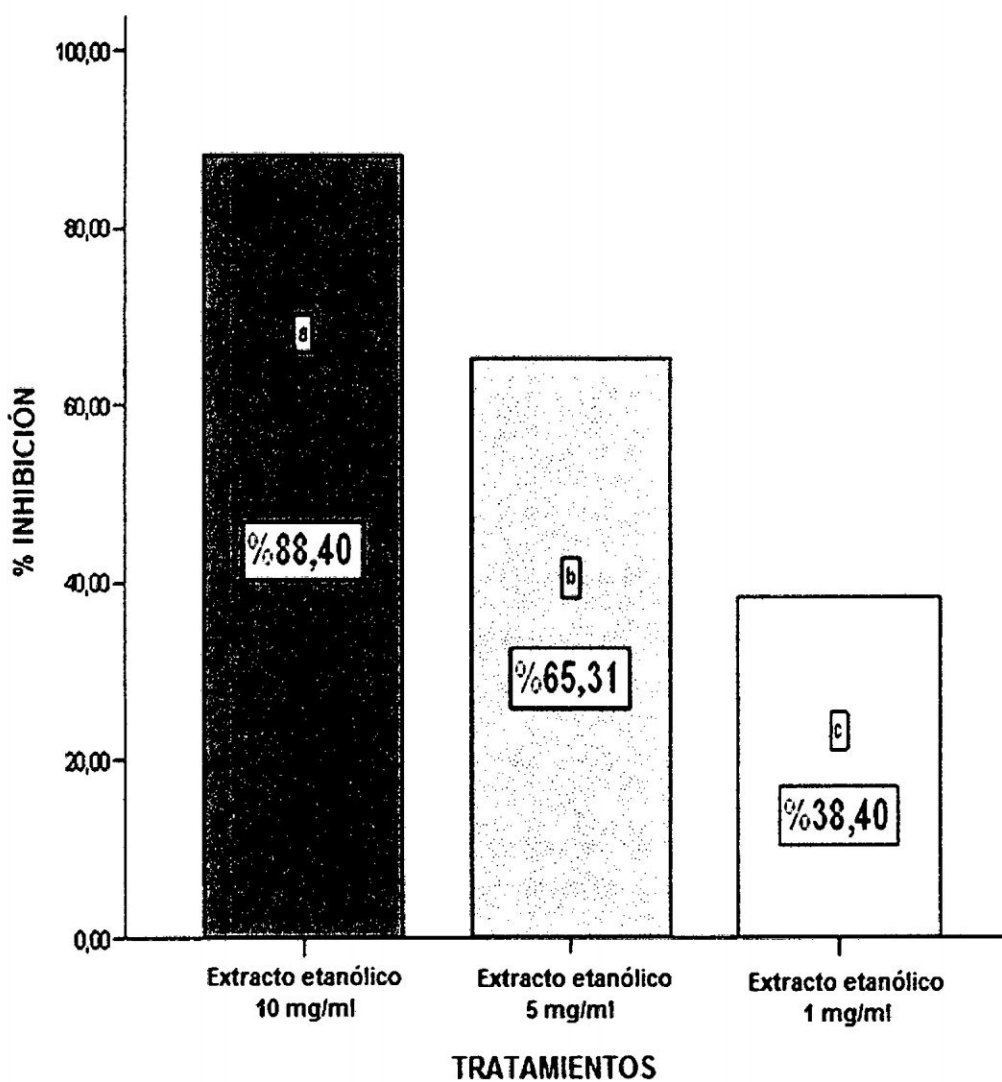
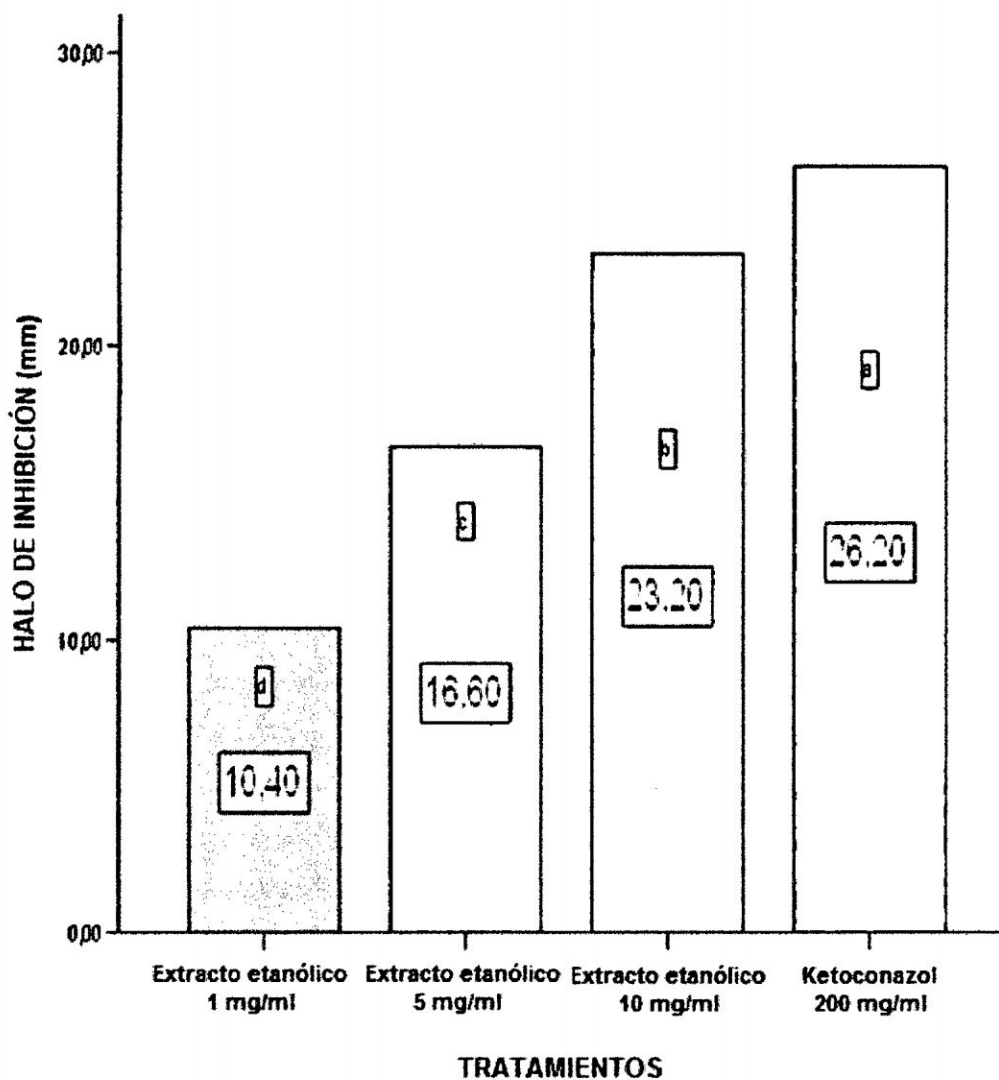


Figura 2. Porcentaje de inhibición por efecto del extracto acuoso de las hojas de *Synadenium grantii* Hook "lechero africano", frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Ayacucho, 2014.



ANVA  $p < 0,05$

Figura 3. Porcentaje de inhibición por efecto del extracto etanólico de las hojas de *Synadenium grantii* Hook "lechero africano", frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Ayacucho, 2014.



ANVA  $p < 0,05$

Figura 4. Promedio de halos de inhibición por efecto del extracto etanólico de las hojas de *Synadenium grantii* Hook "lechero africano", frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Ayacucho, 2014.

Tabla 2. Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima fungicida de los extractos etanólico y acuoso de las hojas de *Synadenium grantii* Hook "lechero africano", frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Ayacucho, 2014.

Tubos	Extracto acuoso (mg/ml)	Tubos	Extracto Etanólico (mg/ml)
1	5	1	5
2	2,5	2	2,5
3	1,25	3	1,25
4	0,625	4	0,625
5	0,313	5	0,313
6	0,156	6	0,156
7	0,078	7	0,078
8	0,039	8	0,039
9	0,02	9	0,02
10	0,01	10	0,01
11	0,005	11	0,005
12	0,0024	12	0,0024
13	0,0012	13	0,0012
14	0,0006	14	0,0006

**S:** Sensible

**R:** Resistente

## V. DISCUSIÓN

El uso de las plantas tradicionales en nuestro país en su gran mayoría es empírico, por lo que existen vacíos en la veracidad de sus efectos terapéuticos, con este trabajo se pretende dar valor y veracidad a los efectos antimicóticos que posee los extractos de las hojas del *Synadenium grantii* Hook "lechero africano" los metabolitos secundarios identificados en los extractos coinciden las encontradas en otras investigaciones realizadas en plantas de utilidad empírica por su efecto antimicótico, dentro de estos metabolitos podemos señalar como los posibles responsables a los flavonoides y/o alcaloides, como también a la acción sinérgica de los metabolitos secundarios de dicha planta, en el estudio fitoquímico que se realizó se determinó la presencia de fenoles, cardenolidos, flavonoides, esteroides, saponinas, catequinas, lactonas, aminoácidos, alcaloides y resinas, de las cuales en mayor concentración los flavonoides y alcaloides.

Las características organolépticas de los extractos acuoso y etanólico de las hojas de *Synadenium grantii* Hook "lechero africano" es de color caramelo, de olor y sabor suigeneris.

Según Bidart.<sup>16</sup> muchas especies de plantas han sido utilizadas etnofarmacológicamente para tratar enfermedades micóticas donde cada vez más, la gente recurre a terapias complementarias y alternativas para poder solucionar problemas de salud, pues los obstáculos que enfrentan las familias de

bajos recursos impiden que tengan acceso a productos farmacéuticos y servicios sanitarios.

Las medias de los halos de inhibición producidos por el extracto acuoso a diferentes concentraciones de las hojas de *Syandenum grantii* Hook "lechero africano" muestran que el de 1 mg/ml generó 8 mm de halo, el 5 mg/ml (15 mm) y el de 10 mg/ml (21 mm) son menores al Ketoconazol (26 mm).

Las medias de los halos de inhibición producidos por el extracto etanólico a diferentes concentraciones de las hojas de *Syandenum grantii* Hook "lechero africano" muestran que el de 1 mg/ml generó 10 mm de halo, el 5 mg/ml (17 mm) y el de 10 mg/ml (23 mm) son menores al Ketoconazol (26 mm), siendo estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ).

El extracto acuoso de *Syandenum grantii* Hook "lechero africano" a una concentración de 1 mg/ml presenta una media de halo de inhibición de  $8,4 \pm 0,55$  mm, el de 5 mg/ml una media de  $15,4 \pm 0,55$  mm, y el de 10 mg/ml generó una media de  $16,6 \pm 0,45$  mm, tal como muestra el análisis de comparaciones múltiples de Tukey (Anexo 22) y en los datos descriptivos (Anexo 14).

El extracto etanólico de *Syandenum grantii* Hook "lechero africano" a una concentración de 1 mg/ml presenta una media de halo de inhibición de  $10,4 \pm 0,55$  mm, el de 5 mg/ml una media de  $16,6 \pm 0,55$  mm, y el de 10 mg/ml generó una media de  $23 \pm 0,45$  mm, tal como muestra el análisis de comparaciones múltiples de Tukey (Anexo 23) y en los datos descriptivos (Anexo 15).

Los porcentajes de inhibición producidos por el extracto acuoso a diferentes concentraciones de las hojas de *Syandenum grantii* Hook "lechero africano" muestran que el de 1 mg/ml tubo un porcentaje de 30,76%, el de 5 mg/ml (57,69%) y el de 10 mg/ml (80,76%) siendo esta última concentración la que más se acerca al control positivo que fue el antifúngico Ketoconazol.

Los porcentajes de inhibición producidos por el extracto etanólico a diferentes concentraciones de las hojas de *Syandenum grantii* Hook "lechero africano" correspondientes a las concentraciones 1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, respecto al Ketoconazol, fueron el 38,46%, 65,38% y 88,46% respectivamente. Siendo estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ).

En el análisis de comparaciones múltiples de Tukey (Anexo 22) y datos descriptivos (Anexo 16), la media del porcentaje de inhibición producida por el extracto acuoso de *Syandenum grantii* Hook "lechero africano" fueron para a una concentración de 1 mg/ml presenta un porcentaje de inhibición de  $30,75 \pm 0,23\%$ , el de 5 mg/ml un porcentaje de  $57,30 \pm 0,39\%$ , y el de 10 mg/ml generó un porcentaje de  $80,11 \pm 0,63\%$ , determinando así que a mayor concentración el porcentaje de inhibición es mayor.

El extracto etanólico de *Syandenum grantii* Hook "lechero africano" a una concentración de 1 mg/ml presenta porcentaje de inhibición de  $38,40 \pm 0,10\%$ , el de 5 mg/ml un porcentaje de  $65,31 \pm 0,12\%$ , y el de 10 mg/ml generó un porcentaje de  $88,39 \pm 0,11\%$ , tal como muestra el análisis de comparaciones múltiples de Tukey (Anexo 23) y en los datos descriptivos (Anexo 17).

La concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima fungicida (CMF) son datos de laboratorio muy importantes que en la actualidad no se toma mucho en cuenta, esto genera el uso indiscriminado de los antifúngicos y medicamentos, propiciando la aparición de resistencia de los microorganismos que inutilizan a medicamentos valiosos, y que por otras causas como la falta de regulación en su compra y venta, la automedicación y la ignorancia, favorece la aparición de cepas de microorganismos resistentes. Gracias al uso del CMI y la CMF se puede dar mayor valor a los medicamentos, tanto en su dosificación y costo beneficio para el paciente.

En la Tabla 2, se determinó de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos acuoso y etanólico de las hojas de *Synadenium grantii* Hook "lechero africano". Utilizando la concentración de 10 mg/ml tanto para el extracto acuoso y etanólico, a esta concentración los extractos generaron mayor inhibición acercándose más al control positivo "Ketoconazol", esto se realizó con la finalidad de determinar la concentración mínima del extracto (antifúngico) que se requiere para inhibir el crecimiento de *Candida albicans* ATCC 10231, el cual resultó para el extracto acuoso de 0,156 mg/ml, y para el extracto etanólico de 0,078 mg/ml. De igual modo se determinó la concentración mínima fungicida (CMF) el cual nos permite determinar la cantidad mínima del extracto (acuoso, etanólico) que se requiere para matar a *Candida albicans* ATCC 10231 *in vitro*, los cuales resultaron de la siguiente manera para el extracto acuoso la CMF fue de 0,313 mg/ml y el extracto etanólico la CMF fue 0,156 mg/ml.

## VI. CONCLUSIONES

- El extracto acuoso y etanólico de las hojas *Synadenium grantii* Hook "lechero africano" a la concentración de 10 mg/ml presentaron mayor actividad anti *Candida albicans* con 21 y 23 mm de diámetro respectivamente, respecto a las demás concentraciones, con halos de inhibición de 15 y 17 mm para el extracto de 5 mg/ml y para el extracto de 1 mg/ml generaron halos de 8 y 10 mm; el control positivo Ketoconazol que generó un halo de 26 mm, siendo estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ).
- La concentración mínima inhibitoria, frente a *Candida albicans* ATCC 10231, producido por el extracto acuoso y etanólico de las hojas *Synadenium grantii* Hook "lechero africano" fue de 0,156 y 0,078 mg/ml, respectivamente.
- La concentración mínima fungicida, frente a *Candida albicans* ATCC 10231, producido por el extracto acuoso y etanólico de las hojas *Synadenium grantii* Hook "lechero africano" fue de 0,313 y 0,156 mg/ml, respectivamente.

## VII. RECOMENDACIONES

- Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se recomienda realizar estudios, así como separar los metabolitos secundarios de los extractos y de esta forma verificar los responsables de dicha actividad farmacológica.
- Proseguir con el estudio del *Synadenium grantii* Hook "lechero africano" con la finalidad de determinar si tiene efecto en otras especies de hongos, como también otras propiedades medicinales.
- Incentivar el estudio de plantas usadas en medicina tradicional, sobre todo en relación a propiedades antimicóticas.
- Realizar estudios de toxicidad de los metabolitos secundarios encontrados en la planta de *Synadenium grantii* Hook "lechero africano" con el objeto de poder realizar pruebas pre clínicas y clínicas.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fitzpatrick R. Dermatología en Medicina General. Vol 4. 7<sup>ma</sup> ed. Buenos Aires - Argentina: Médica Panamericana; 2010.
2. Font Quer P. Plantas Medicinales. Barcelona - España: Labor.S.A; 2009.
3. Grandez G. La planta de la vida. Lima- Perú: Altragarf S.A; 2010.
4. Alvares A. Contribución al estudio fitoquímicos y citotóxicos *Synadenium carinatum* Boiis (Euforbiaceae), [revista en internet] 2011 [acceso 10 diciembre 2013]; Vol. (III). Disponible en: <http://www.revistas.ufg.br/index.php/REF/article/view/14932>.
5. Huaraca L. Efecto hipoglucemiante del extracto hidroalcohólico de *Synadenium grantii* Hook "planta de la vida" en ratones [Tesis pregrado]. Ayacucho-Perú, UNSCH; 2010.
6. Borges R, Mariano M, Campos M, Realino J, Alves E, Carlos L. Avaliação dos efeitos depressores centrais do extrato etanólico das folhas de *Synadenium umbellatum* Pax. E de suas frações em camundongos albinos, revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, [revista en internet] 2008 [acceso 12 octubre de 2013]; 44(3). 485-91. Disponible en: <http://www.hindawi.com/journals/ecam/2013/715650/>
7. Hassan E, Mohammed M, Mohamed S. Two New Phorbol-Type Diterpene Esters from *Synadenium*. Rec. Nat. Prod, [revista en internet] 2012; [acceso 20 de noviembre 2013]; 6(3). 255-262. Disponible en: <http://www.acgpubs.org/RNP/2012/Volume%206/Issue%201/36-RNP-1102-510.pdf>
8. Docampo Pc, Cabrerizo S, Paladino N, Parreño I, Ruffolo V, Mutti O. Erythroderma secondary to latex-producing plants (*Synadenium grantii*) Revista Argentina, [revista en internet] 2010; [acceso 25 noviembre 2013]; de108 (6). Disponible en: <http://europepmc.org/abstract/MED/21132237/reload=0;jsessionid=ckeQMW40X0JmxRcvfFJN.20>
9. Rajesh R, Shivaprasad V, Gowda C, Nataraju A, Dhananjaya B, Vishwanath S. Comparative study on plant latex proteases and their involvement in hemostasis: a special emphasis on clot inducing and dissolving properties. Planta Med; [revista en internet] 2007; [acceso 10 diciembre 2013]; 73(10). Disponible en: <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/s-2007-981575>
10. MeloReis P, Andrade L, Silva C, Araújo L, Pereira M, Mrue F, et al. Angiogenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax latex. Braz. J. Biol. [revista en internet] 2010; [acceso 16 diciembre 2013]; vol. 70, no. 1 189-194. Disponible en: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1519-0000100026&script=sci\\_arttext&tlng=ES](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1519-0000100026&script=sci_arttext&tlng=ES)
11. León E. Caracterización bromatológica del látex de *Synadenium grantii* HOOK para formulaciones terapéuticas: trabajo de investigación de la Facultad de Ciencias Biológicas UNSCH. Ayacucho - Perú; 2011.
12. Huerta J. El género *Candida albicans* y su importancia en patología bucal: trabajo de investigación de la Facultad de odontología de la Universidad de Chile. Santiago – Chile; 2010.
13. Brooks G, Butel J, Morse S. Microbiología Medica. 19<sup>ava</sup> ed. México: El Manual Moderno; 2004.
14. Brook T, Madigan M. Biología de los microorganismos. 10<sup>ma</sup> ed. México D.F: Prentice Hall Hispanoamericana S.A; 2003.
15. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. Microbiología Medica. 6<sup>ta</sup> ed. Barcelona –España: Elsevier; 2009.

16. Bidart T. Lo antiguo y lo nuevo en antifúngicos y antivirales. Vol. 2. 2<sup>da</sup> ed. Chile: Chilena; 2004.
17. Acharte A. Actividad antimicótica del aceite esencial de *Citrus aurantium* L "naranja" frente a una cepa de *Candida* ATCC 10231. [Tesis pregrado]. Ayacucho – Perú, UNSCH, 2010.
18. Andersen M, Jordheim M, Byamukama R, Mbabazi A, Ogweng G, Skaar I. *et al.* Anthocyanins with unusual furanose sugar (apiose) from leaves of *Synadenium grantii* (Euphorbiaceae). *Phytochemistry*. [Revista en internet] 2010, [acceso 20 de noviembre 2013] 71(13). Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942210002190>
19. Costa L, David V, Pinto R, Minozzo B, Vitoldo A, Kozłowski J. *et al.* Anti-ulcer activity of *Synadenium grantii* latex. *Braz. J. Pharmacogn*, [revista en internet] 2012; [acceso 5 de diciembre de 2013]. 84(5). Disponible en: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-50&script=sci\\_arttext&lng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-50&script=sci_arttext&lng=pt)
20. Katzung, B. Farmacología básicos y clínicos. 10<sup>ma</sup> ed. México: Manual Moderno; 2007.
21. Miranda M, Cuellar A. Manual de Prácticas de Laboratorio: Farmacognosia y Productos Naturales. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad La Habana - Cuba; 2000.
22. Moreno S. Efecto antifúngico de extractos de *Larrea tridentina* L, "Gobernadora", sobre cultivos invitro de *Aspergillus flavus* y *Penicillium sp*, 2011. [Tesis pregrado]. Santiago- Chile: Intercambio científico; 2010.
23. Palomino M, Uribe C. Determinación de la actividad antimicrobiana in vitro de los extractos etanólico e hidroalcoholico de las semillas de *Carica papaya* L. "papaya". [Tesis pregrado]. Ica – Perú, Universidad Nacional San Luis Gonzaga; 2007.
24. Norman H, Nie C, Hadlai H, Dale H, Bent. SPSS 15, 0. Para Windows. 10<sup>ma</sup> ed. Chicago: Microsoft; 2009.
25. Velásquez M. Farmacología Básica y Clínica. 18<sup>ava</sup> ed. Buenos Aires – Argentina: Médica Panamericana S.A; 2008.
26. Vilata J. Micosis Cutáneas. Madrid – España: Médica Panamericana S.A; 2006.

## **ANEXOS**

## Anexo 1

Tabla 3. Metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico y acuoso de las hojas de *Synadenium grantii* Hook "lechero africano". Ayacucho, 2013.

METABOLITOS SECUNDARIOS	ENSAYOS	EXTRACTO ACUOSO	EXTRACTO ETANÓLICO	OBSERVACIÓN
Fenoles y/o taninos	Cloruro Férrico	+++	+++	Coloración Marrón Oscuro
Lactonas y/o Cumarinas	Baljet	++	+++	Formación de Precipitado
Flavonoides	Shinoda	++	+++	Coloración Rojo Rosado Formación de dos fases
Saponinas	Espuma	+++	-	Formación de Espuma
Aminas	Ninhidrina	-	+++	Coloración Azul Violáceo
Resina	Resina	++	+++	Formación de Precipitado
Alcaloides	Dragendorff	+	+++	Formación de Precipitado
	Mayer	-	++	Formación de Precipitado

### Leyenda:

(-)	:	Ausente
(+)	:	Escaso
(++)	:	Buena
(+++)	:	Excelente

## Anexo 2



Figura 5. Proceso de recolección de hojas de *Synadenium grantii* Hook "lechero africano". Ayacucho, 2012.

### Anexo 3



Figura 6. Proceso de secado de las hojas de *Synadenium grantii* Hook "lechero africano". Ayacucho, 2012.

#### Anexo 4



Figura 7. Proceso de molienda y tamizado de hojas de *Synadenium grantii* Hook "lechero africano". Ayacucho, 2012.

Anexo 5

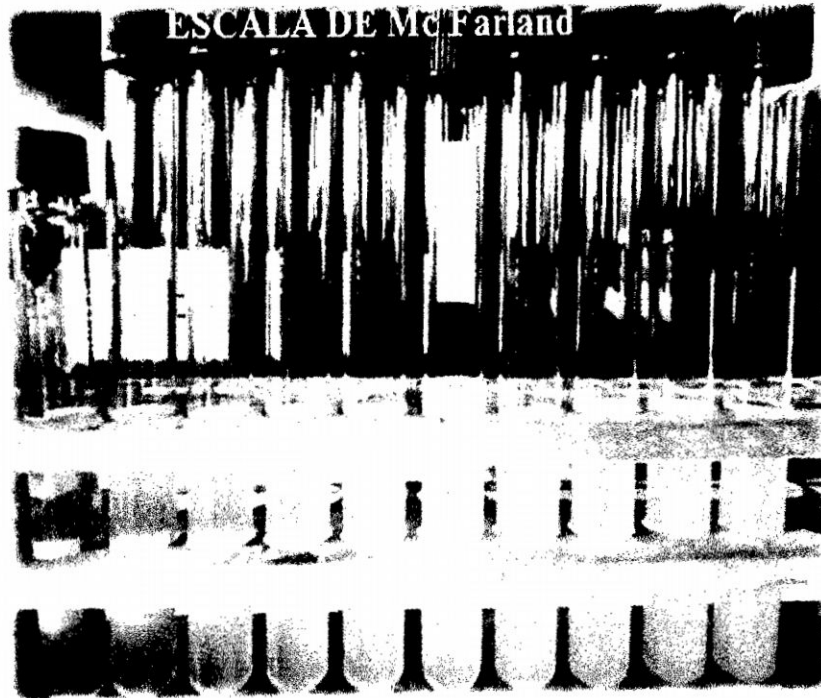


Figura 8. Tubos de la Escala de Mc Farland. Ayacucho, 2013.

## Anexo 6



Figura 9. Preparación de placas con agar Mueller Hinton. Ayacucho, 2013.

Anexo 7

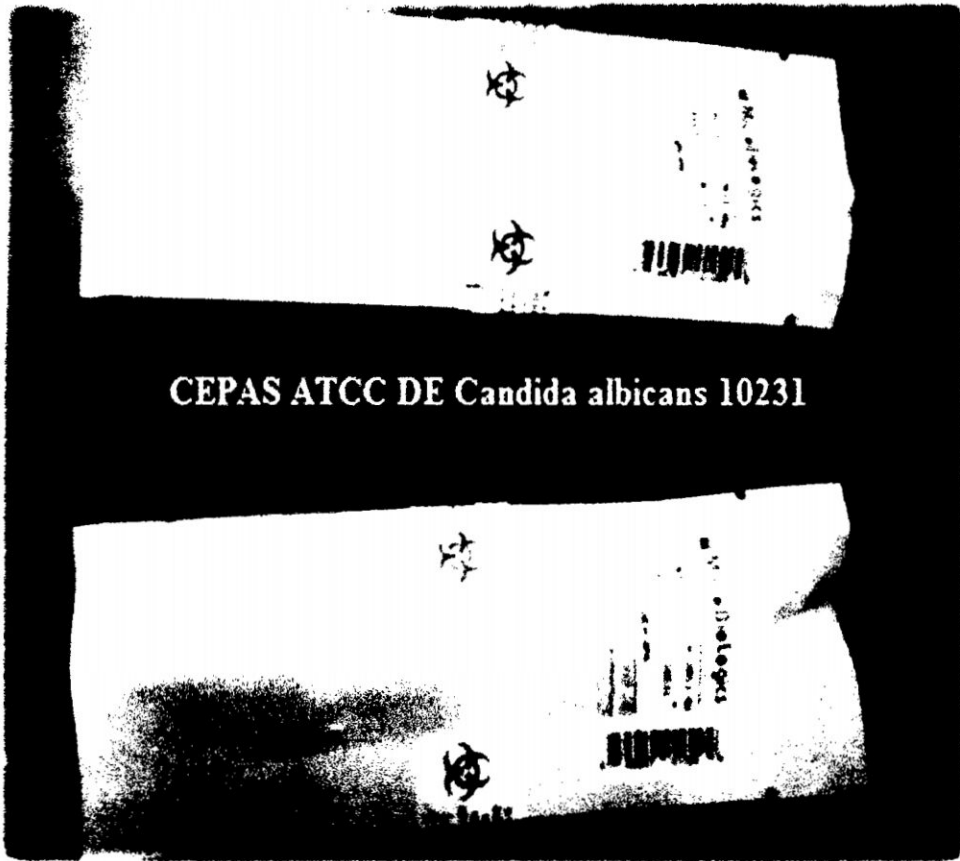
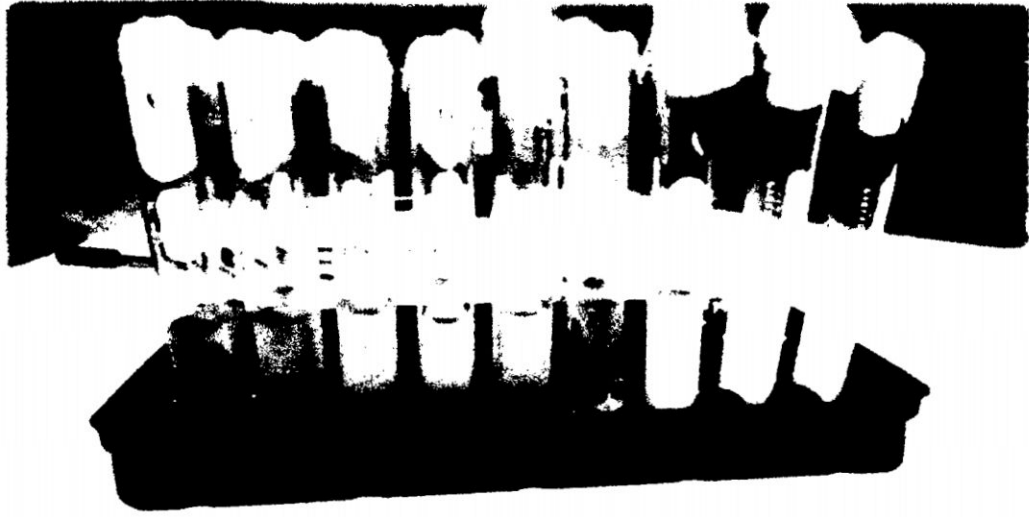


Figura 10. Cepa liofilizada de *Candida albicans* ATCC 10231. Ayacucho, 2013.

Anexo 8



EXTRACTO ACUOSO (CAM)



EXTRACTO ETANÓLICO

Figura 11. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto acuoso y etanólico. Ayacucho, 2013.

Anexo 9



Figura 12. Preparación de los extractos etanólico y acuoso. Ayacucho, 2013.

## Anexo 10

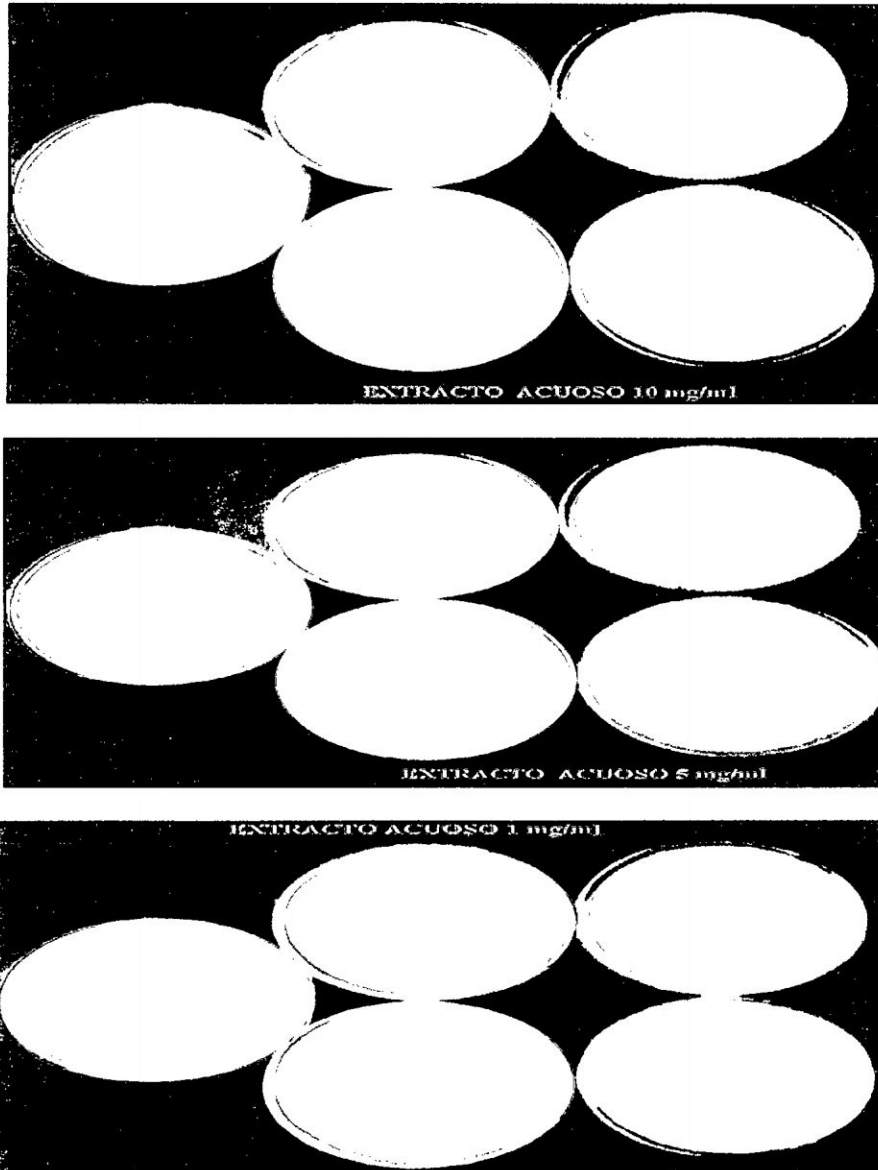


Figura 13. Halos de inhibición producidos por el extracto acuoso a concentraciones de 10 mg/ml, 5 mg/ml y 1 mg/ml, de las hojas de *Synadenium grantii* Hook "lechero africano". Ayacucho, 2013.

Anexo 11

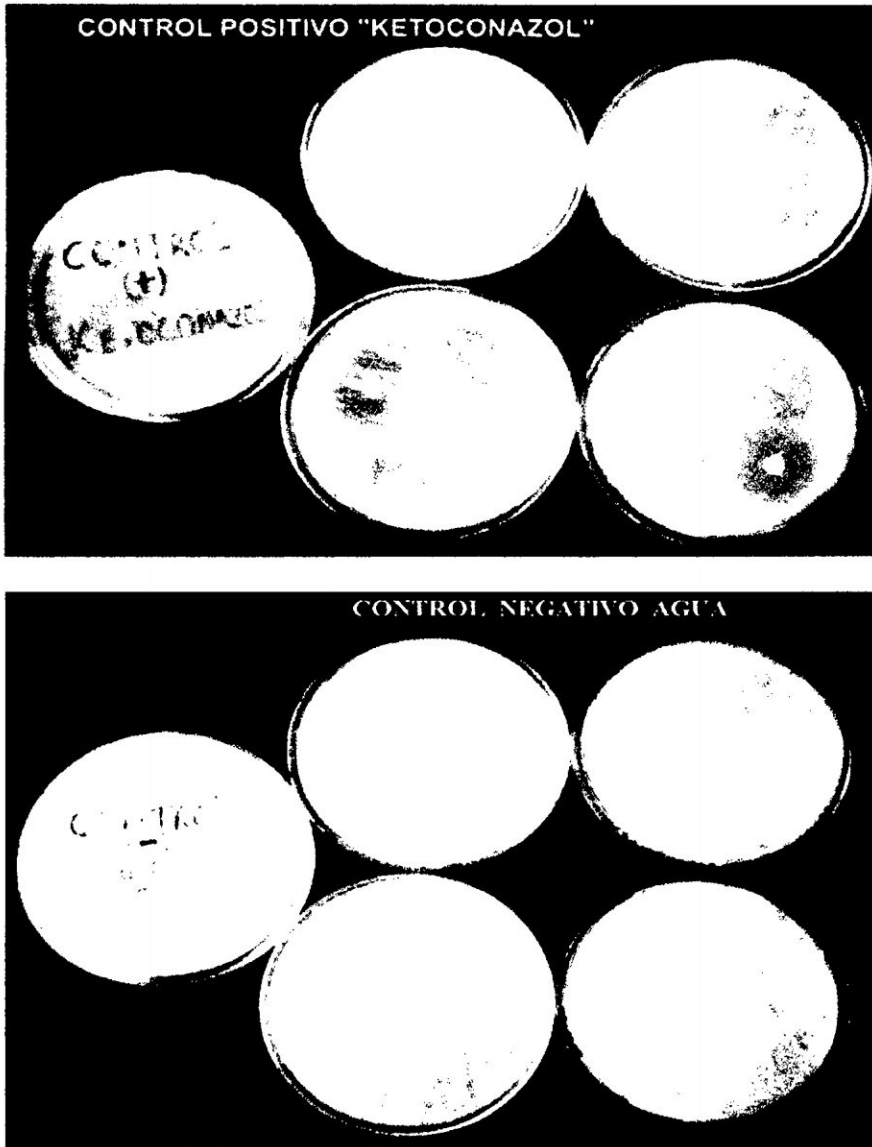


Figura 14. Halos de inhibición producidos por el control positivo "Ketoconazol" y control negativo "agua destilada". Ayacucho, 2013.

## Anexo 12

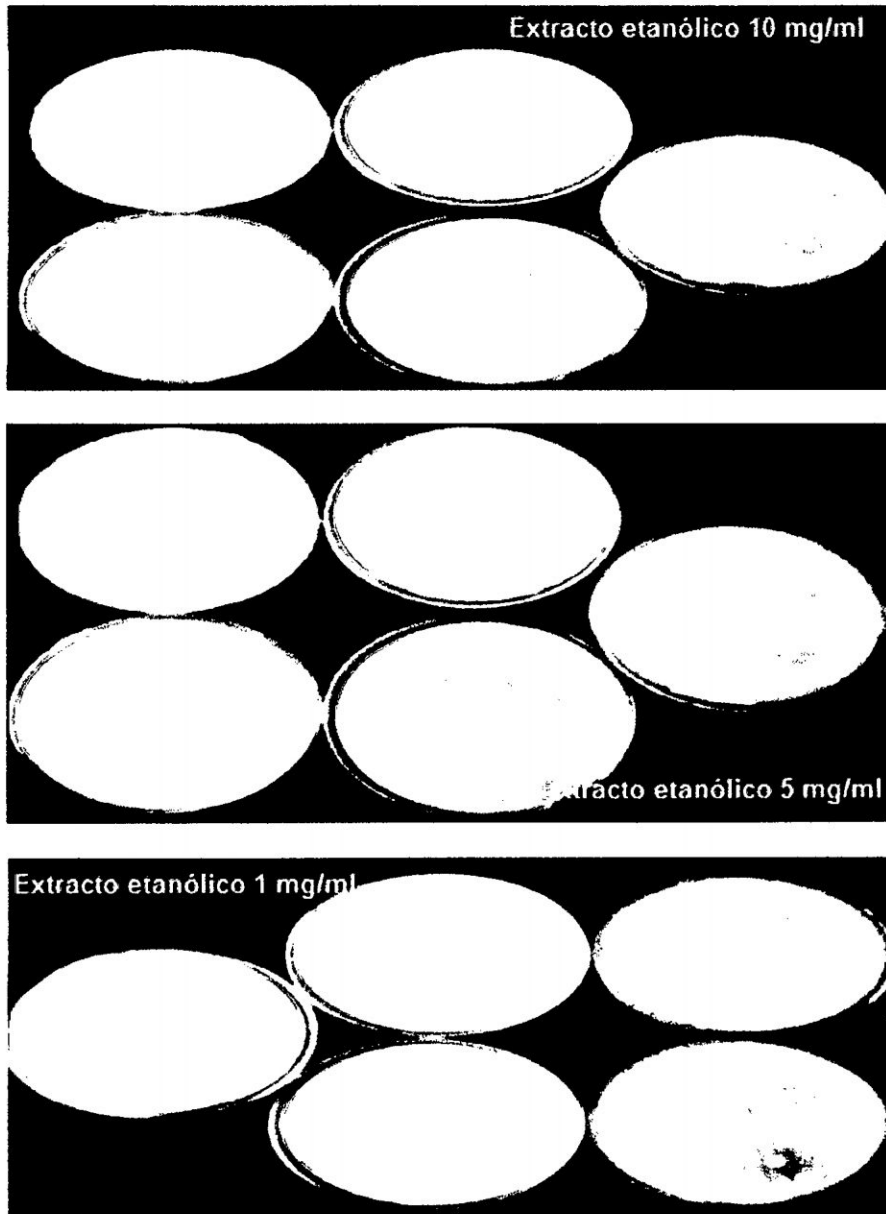


Figura 15. Halos de inhibición producidos por el extracto etanólico a concentraciones de 10 mg/ml, 5 mg/ml y 1 mg/ml de las hojas de *Synadenium grantii* Hook "lechero africano". Ayacucho, 2013.

Anexo 13



Figura 16. Concentración fungicida mínima (CMF) de los extractos de las hojas de *Synadenium grantii* Hook "lechero africano". Ayacucho, 2013.

Anexo 14

ACUOSO

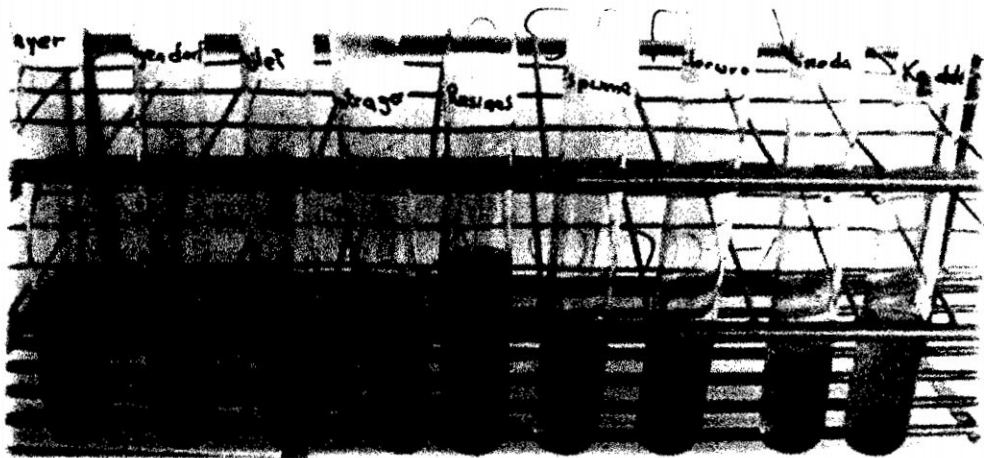
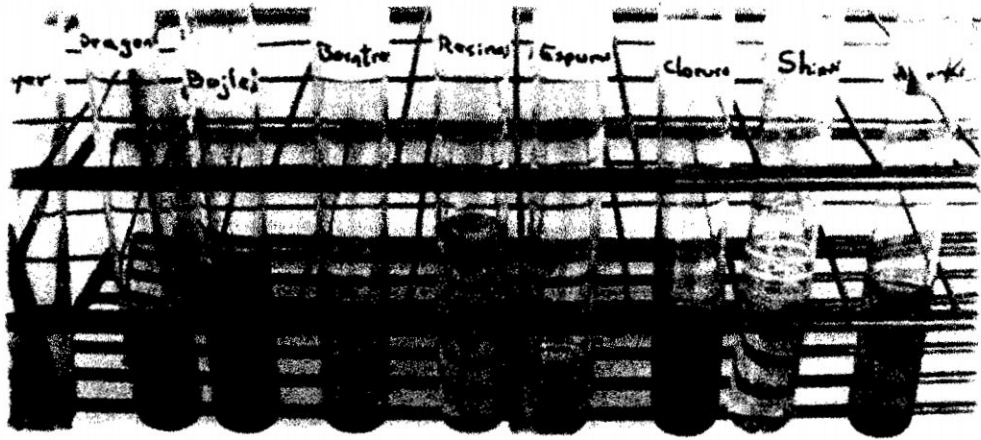


Figura 17. Estudio fitoquímico de los extractos de las hojas de *Synadenium grantii* Hook "lechero africano". Ayacucho, 2013.

## Anexo 15

Tabla 4. Características organolépticas de los extractos de las hojas de *Synadenium grantii* Hook "lechero africano". Ayacucho, 2013.

---

**Características organolépticas de los extractos de las hojas de  
*Synadenium grantii* Hook "lechero africano"**

---

**Aspecto:** Líquido y Viscoso

**Color:** Caramelo

**Olor:** Característico

**Sabor:** Característico (ácido)

---

## Anexo 16

Tabla 5. Diámetro de los halos de inhibición de los extracto etanólico de las hojas de *Synadenium grantii* Hook "lechero africano", frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Ayacucho, 2014.

DIAMETROS DE HALOS DEL EXTRACTO ETANÓLICO																				
Numero PLACA	10 mg /ml (mm)					5 mg/ml(mm)					1 mg/ml(mm)					control (+)(mm) KETOCONAZOL				
1	24	24	22	23	23	18	16	17	17	17	10	9	10	10	10	25	26	25	26	26
2	23	22	23	23	23	16	18	18	17	17	11	11	9	10	10	26	25	26	26	26
3	23	22	23	23	23	15	15	17	16	16	10	9	12	10	10	27	26	27	27	27
4	24	23	24	22	23	16	16	15	15	16	11	10	12	10	11	26	26	26	27	26
5	23	23	22	23	23	17	17	16	16	17	10	11	10	11	11	27	27	25	26	26
<b>Media</b>	23					17					10					26				

### Anexo 17

Tabla 6. Diámetro de los halos de inhibición de los extracto acuoso de las hojas de *Synadenium grantii* Hook "lechero africano", frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Ayacucho, 2014.

DIAMETROS DE HALOS DEL EXTRACTO ACUOSO																				
NUMERO PLACA	control (+)mm KETOCONAZOL					10 mg/ml(mm)					5 mg/ml (mm)				1 mg/ml(mm)					
1	25	26	25	26	26	21	20	21	21	21	14	15	15	14	15	8	8	8	9	8
2	26	25	26	26	26	23	21	21	22	22	15	16	15	14	15	9	8	9	8	9
3	27	26	27	27	27	22	21	20	21	21	16	17	15	16	16	8	8	8	8	8
4	26	26	26	27	26	21	20	22	20	21	17	16	14	15	16	9	9	8	9	9
5	27	27	25	26	26	21	19	20	22	21	16	14	15	14	15	8	8	8	9	8
<b>Media</b>						26					21				15				8	

## Anexo 18

Tabla 7. Datos descriptivos de los halos de inhibición producidos por los extractos acuosos de las hojas de *Synadenium grantii* Hook "lechero africano" frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Ayacucho, 2014.

Tratamientos	N	Media	Desviación típica	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
Control positivo "ketoconazol"	5	26,2000	,44721	25,6447	26,7553	26,00	27,00
Extracto acuoso 10 mg/ml	5	21,2000	,44721	20,6447	21,7553	21,00	22,00
Extracto acuoso 5 mg/ml	5	15,4000	,54772	14,7199	16,0801	15,00	16,00
Extracto acuoso 1 mg/ml	5	8,4000	,54772	7,7199	9,0801	8,00	9,00
Total	20	17,8000	6,82565	14,6055	20,9945	8,00	27,00

## Anexo 19

Tabla 8. Datos descriptivos de los halos de inhibición producidos por los extractos etanólicos de las hojas de *Synadenium grantii* Hook "lechero africano" frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Ayacucho, 2014.

Tratamientos	N	Media	Desviación típica	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
Control positivo "ketoconazol"	5	26,2000	,44721	25,6447	26,7553	26,00	27,00
Extracto etanólico 10 mg/ml	5	23,2000	,44721	22,6447	23,7553	23,00	24,00
Extracto etanólico 5 mg/ml	5	16,6000	,54772	15,9199	17,2801	16,00	17,00
Extracto etanólico 1 mg/ml	5	10,4000	,54772	9,7199	11,0801	10,00	11,00
Total	20	19,1000	6,28197	16,1599	22,0401	10,00	27,00

## Anexo 20

Tabla 9. Datos descriptivos del porcentaje de inhibición producido por los extractos acuosos de las hojas de *Synadenium grantii* Hook "lechero africano" frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Ayacucho, 2014.

Tratamientos	N	Media	Desviación típica	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
Extracto acuoso 10 mg/ml	5	80,1077	,62559	79,3309	80,8845	79,40	80,77
Extracto acuoso 5 mg/ml	5	57,2869	,38712	56,8062	57,7676	56,90	57,69
Extracto acuoso 1 mg/ml	5	30,7477	,22815	30,4644	31,0310	30,50	31,10
Total	15	56,0474	20,88219	44,4833	67,6116	30,50	80,77

## Anexo 21

Tabla 10. Datos descriptivos del porcentaje de inhibición producido por los extractos etanólicos de las hojas de *Synadenium grantii* Hook "lechero africano" frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Ayacucho, 2014.

Tratamientos	N	Media	Desviación típica	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
Extracto etanólico 10 mg/ml	5	88,3969	,11326	88,2563	88,5376	88,20	88,46
Extracto etanólico 5 mg/ml	5	65,3108	,12339	65,1576	65,4640	65,10	65,38
Extracto etanólico 1 mg/ml	5	38,4009	,08330	38,2975	38,5044	38,30	38,46
Total	15	64,0362	21,14799	52,3248	75,7476	38,30	88,46

## Anexo 22

Tabla 11. Análisis de varianza para el número de halos de inhibición producidos por los extractos acuosos de las hojas de *Synadenium grantii* Hook "lechero africano" frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Ayacucho, 2014.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	881,200	3	293,733	1174,933	,000
Intra-grupos	4,000	16	,250		
Total	885,200	19			

### Anexo 23

Tabla 12. Análisis de varianza para el número de halos de inhibición producidos por los extractos etanólicos de las hojas de *Synadenium grantii* Hook "lechero africano" frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Ayacucho, 2014.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	745,800	3	248,600	994,400	,000
Intra-grupos	4,000	16	,250		
Total	749,800	19			

## Anexo 24

Tabla 13. Análisis de varianza para el número de porcentajes de inhibición producidos por los extractos acuosos de las hojas de *Synadenium grantii* Hook "lechero africano" frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Ayacucho, 2014.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	6102,546	2	3051,273	15429,222	,000
Intra-grupos	2,373	12	,198		
Total	6104,920	14			

## Anexo 25

Tabla 14. Análisis de varianza para el número de porcentajes de inhibición producidos por los extractos etanólicos de las hojas de *Synadenium grantii* Hook "lechero africano" frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Ayacucho, 2014.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	6261,184	2	3130,592	268394,539	,000
Intra-grupos	,140	12	,012		
Total	6261,324	14			

## Anexo 26

Tabla 15. Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de los halos de inhibición producidos por los extractos acuosos de las hojas de *Synadenium grantii* Hook "lechero africano" frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Ayacucho, 2014.

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = ,05			
		1	2	3	4
Extracto acuoso 1 mg/ml	5	8,4000			
Extracto acuoso 5 mg/ml	5		15,4000		
Extracto acuoso 10 mg/ml	5			21,2000	
Control positivo "ketoconazol"	5				26,2000
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

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

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 5,000.

## Anexo 27

Tabla 16. Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de los halos de inhibición producidos por los extractos etanólicos de las hojas de *Synadenium grantii* Hook "lechero africano" frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Ayacucho, 2014.

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = ,05			
		1	2	3	4
Extracto etanólico 1 mg/ml	5	10,4000			
Extracto etanólico 5 mg/ml	5		16,6000		
Extracto etanólico 10 mg /ml	5			23,2000	
Control positivo "ketoconazol"	5				26,2000
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

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

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 5,000.

## Anexo 28

Tabla 17. Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de los halos de los porcentajes de inhibición producidos por los extractos acuosos de las hojas de *Synadenium grantii* Hook "lechero africano" frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Ayacucho, 2014.

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = ,05		
		1	2	3
Extracto acuoso 1 mg/ml	5	30,7477		
Extracto acuoso 5 mg/ml	5		57,2869	
Extracto acuoso 10 mg/ml	5			80,1077
Sig.		1,000	1,000	1,000

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

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 5,000.

## Anexo 29

Tabla 18. Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de los halos de los porcentajes de inhibición producidos por los extractos etanólicos de las hojas de *Synadenium grantii* Hook "lechero africano" frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Ayacucho, 2014.

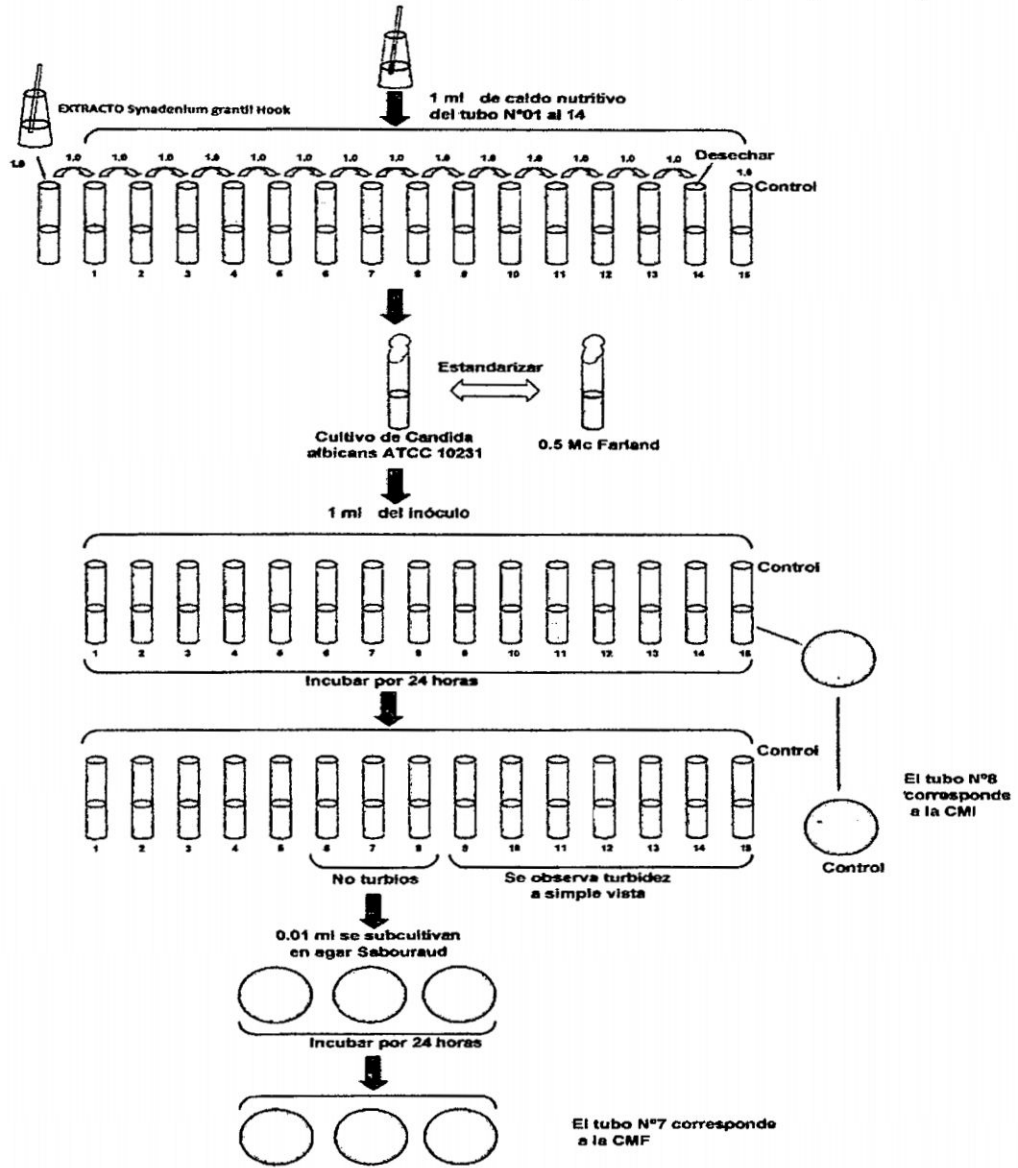
Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = ,05		
		1	2	3
Extracto etanólico 1 mg/ml	5	38,4009		
Extracto etanólico 5 mg/ml	5		65,3108	
Extracto etanólico 10 mg/ml	5			88,3969
Sig.		1,000	1,000	1,000

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

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 5,000.

### Anexo 30

Figura 18. Protocolo de la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y de la concentración mínima fungicida (CMF). Ayacucho, 2014.



## Anexo 31

Figura 19. Certificado de identificación taxonómica de *Synadenium grantii* Hook "lechero africano". Ayacucho, 2012.



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, el Bach. en Biología, Sr. **Paúl Niceas, MELGAR RUIZ**, 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:

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	ROSIDAE
ORDEN	:	EUPHORBIALES
FAMILIA	:	EUPHORBIACEAE
GENERO	:	<i>Synadenium</i>
ESPECIE	:	<b><i>Synadenium grantii</i> Hook.</b>
N.V.	:	"árbol de la vida"

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

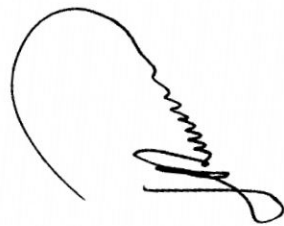
Ayacucho, 14 de Diciembre del 2012

UNIVERSIDAD NACIONAL DE  
SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
HERBARIUM HUAMANGENSIS  
  
Dña. Laura Perceval Medina  
2012

Anexo 32

Tabla 19. Matriz de Consistencia

TÍTULO	PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEÓRICO	HIPÓTESIS	VARIABLES E INDICADORES	TIPO DE INVESTIGACIÓN	DISEÑO METODOLÓGICO
Capacidad anti <i>Candida albicans</i> de los extractos de hojas del <i>Synadenium grantii</i> Hook "lechero africano" sobre Ayacucho, 2012.	¿Tendrá efecto anti <i>Candida albicans</i> los extractos de las hojas de <i>Synadenium grantii</i> Hook "lechero africano"?	<p><b>General.</b> Demostrar capacidad anti <i>Candida albicans</i> del extracto etanólico y acuoso de hojas de <i>Synadenium grantii</i> Hook "lechero africano"</p> <p><b>Específicos.</b> Determinar concentración mínima inhibitoria de los extractos etanólico y acuoso de <i>Synadenium grantii</i> Hook "lechero africano". Frente a <i>Candida albicans</i>.</p> <p>Determinar la concentración mínima inhibitoria de los extractos etanólico y acuoso de <i>Synadenium grantii</i> Hook "lechero africano". Frente a <i>Candida albicans</i>.</p>	<p>La frecuencia de infecciones invasoras causadas por <i>Cándida</i> ha aumentado en forma importante en las últimas décadas, constituyendo actualmente la candidemia un importante agente de infección intrahospitalaria como también constituye la segunda causa de vaginitis en mujeres en edad fértil así como en adolescentes. Provocando patologías relacionadas con afección vaginal (vaginitis), de la cavidad oral (muguet), del intestino o de la piel. Esto se debe en gran parte a avances de la medicina, con la incorporación de nuevas modalidades terapéuticas. Algunas de ellas, como tratamientos antimicrobianos de amplio espectro, uso de nutrición parenteral, uso de catéteres intravenosos e intubación endotraqueal entre otros, como también por consecuencia del aumento de poblaciones de mayor riesgo ya sea por su condición de inmuno-supresión, o por malas prácticas higiénicas básicas; y la utilización de procedimientos diagnósticos, terapéuticos invasores.</p> <p>El propósito de este trabajo es determinar el efecto anti <i>Candida albicans</i> del extracto de hojas de <i>Synadenium grantii</i> Hook "lechero africano" ya que la medicina tradicional como parte importante de la cultura de los pueblos ha sido durante siglos el sistema utilizado en la restauración de la salud de las generaciones pasadas en todo el mundo donde las plantas medicinales han cumplido un rol importante y fundamental como medio para curar las enfermedades de las personas.<sup>14</sup></p>	<p>Uno de los extractos de las hojas de <i>Synadenium grantii</i> Hook, tiene efecto anti <i>Candida albicans</i></p>	<p><b>Variable Independiente:</b> Tipo de extractos, (acuoso, etanólico) hojas de <i>Synadenium grantii</i> Hook Diferentes concentraciones de los extractos de hojas de <i>Synadenium grantii</i> Hook</p> <p><b>Variable dependiente:</b> Efecto anti <i>Candida albicans</i></p> <p><b>Indicadores:</b> Tamaño del inóculo Tamaño de halo de inhibición Concentración mínima inhibitoria</p>	<p>Experimental</p> <p><b>Muestra</b> Comprendida en 3 kg de hojas <i>Synadenium grantii</i> Hook "lechero africano" que se recolectaran en la provincia Huamanga, departamento de Ayacucho que se encuentra ubicado a 2760 msnm, la muestra debe de ser libre de polvo, tierra partes de la planta que no serán utilizados</p>	



# Capacidad anti *Candida albicans* del extracto de hojas de *Synadenium grantii* Hook "lechero africano". Ayacucho, 2012.

Melgar Ruiz, Paúl Niceas<sup>1</sup> Blga. León

Palomino, Edna<sup>1</sup>

Área de Microbiología<sup>1</sup>: Facultad de Ciencias Biológicas.

## RESUMEN

En nuestro país muchas especies vegetales nativas e introducidas son empleadas empíricamente en el tratamiento de diferentes enfermedades, sin embargo, la veracidad de dicho efecto terapéutico no se ha demostrado experimentalmente aún, como por ejemplo el caso de *Synadenium grantii* Hook. Con el objetivo de evaluar el efecto anti *Candida albicans* de los extractos acuoso y etanólico a las concentraciones de 10 mg/ml, 5 mg/ml y 1 mg/ml de las hojas de *Synadenium grantii* Hook "lechero africano" se realizó el presente trabajo de investigación en los laboratorios de Bromatología y Nutrición y laboratorio de Microbiología de la Escuela de Formación Profesional de Biología. El tipo de investigación fue experimental y la evaluación de la actividad anti *Candida albicans* se realizó por la técnica de difusión en disco, se colocaron discos de papel filtro embebidos en los extractos de la planta, sobre placas Petri conteniendo agar Mueller Hinton sembrado con *Candida albicans* ATCC 10231, para luego observar la formación de los halos de inhibición. Se encontró que los extractos etanólico y acuoso a la concentración de 10 mg/ml presentaron halos de inhibición de 23 mm y 21 mm respectivamente, el de 5 mg/ml con 17 mm y 15 mm y el 1 mg/ml con 12 mm y 8mm, ( $p < 0,05$ ). Concluyendo que el extracto etanólico de 10 mg/ml es el que más se acerca al control positivo Ketoconazol que presentó un halo de 26 mm de diámetro. La CMI del extracto acuoso y etanólico de las hojas de *Synadenium grantii* Hook "lechero africano" a una concentración de 10 mg/ml fueron 0,156 mg/ml y 0,078 mg/ml respectivamente, y la CMF fue de 0,313 mg/ml y 0,156 mg/ml. Los metabolitos secundarios identificados en los extractos, coinciden las encontradas en otras investigaciones realizadas en plantas de utilidad empírica por su efecto antimicótico, dentro de estos metabolitos

podemos señalar como los posibles responsables a los flavonoides y/o alcaloides, como también a la acción sinérgica de los metabolitos secundarios de dicha planta.

## Palabras clave:

*Candida albicans*, *Synadenium grantii*, actividad antifúngica.

## SUMMARY

In our country many native and introduced plant species are used empirically in the treatment of different diseases, however, the veracity of this therapeutic effect has not yet been demonstrated experimentally, such as the case of *Synadenium grantii* Hook. In order to evaluate the anti *Candida albicans* 5 mg / ml 1 mg / ml effect of aqueous and ethanol extracts at the concentrations of 10 mg / ml, and leaves *Synadenium grantii* Hook "African dairy" the present research was conducted in laboratories of Food Science and Nutrition and laboratory of Microbiology, Vocational School of Biology. The research was experimental and evaluation of the anti *Candida albicans* was performed by the disk diffusion method, embedded filter paper discs were placed in the plant extracts on petri plates containing Mueller Hinton agar seeded with *Candida albicans* ATCC 10231, and then observe the formation of inhibition halos. It was found that the ethanol and aqueous extracts to a concentration of 10 mg / ml showed zones of inhibition of 23 mm and 21 mm respectively, the 5 mg / ml with 17 mm and 15 mm and 1 mg / ml to 12 mm and 8mm, ( $p < 0.05$ ). Concluding that the ethanol extract of 10 mg / ml is the closest to the positive control Ketoconazole presented a halo of 26 mm in diameter. The MIC of the aqueous and ethanolic extract of leaves of *Synadenium grantii* Hook "African dairy" to a concentration of 10 mg / ml were 0.156 mg / ml and 0.078 mg / ml respectively, and the CPM was 0.313 mg / ml and 0.156 mg / ml. Identified in the extracts, secondary metabolites match those found in other investigations in plants empirical usefulness for its antifungal effect within these metabolites we note the possible responsible to flavonoids and / or alkaloids, as well as the synergistic action of the secondary metabolite of the plant

## Key words:

*Candid albicans*, *Synadenium grantii*, activity antifúngica.

## INTRODUCCIÓN

Se ha informado de casos de candidiasis en todas partes del mundo, pero el hongo puede encontrarse con tal frecuencia en individuos sanos, y en tal variedad de formas clínicas que es imposible obtener datos exactos respecto a la distribución geográfica de la enfermedad; pueden aislarse especies de *Candida* tan frecuentemente en las materias fecales, vagina y faringe de individuos de apariencia sana que el tratamiento resulta a menudo difícil. También, como invasores secundarios durante el tratamiento con antibióticos de amplio espectro, hormonas suprarrenales y drogas citotóxicas, las especies de *Candida* crean graves problemas en el tratamiento y cuidado del paciente con enfermedad primaria.<sup>1</sup>

Desde la antigüedad el hombre para tratar sus dolencias, usó las plantas aplicándolos de manera directa, sin embargo, con el descubrimiento de los medicamentos sintéticos estas costumbres se fueron dejando de lado. Con el tiempo, por los múltiples efectos secundarios de los medicamentos sintéticos se está volviendo al uso de las plantas medicinales.<sup>2</sup>

En nuestro país muchas especies vegetales nativas e introducidas son empleadas empíricamente en el tratamiento de diferentes enfermedades, sin embargo, la veracidad de dicho efecto terapéutico no se ha demostrado experimentalmente aún, como por ejemplo el caso de *Synadenium grantii*, cuyas sinonimias botánicas son *Synadenium umbellatum* Pax y *Euphorbia umbellata*, nombres con los que existen antecedentes que refieren su empleo dentro de la medicina folklórica de sus lugares de origen. La presente investigación estuvo orientado a evaluar experimentalmente el efecto anti *Candida albicans* del extracto etanólico y acuoso de las hojas de *Synadenium grantii* “lechero africano” cuyos objetivos fueron:

### Objetivo general

- Demostrar la capacidad anti *Candida albicans* del extracto etanólico y acuoso de hojas de *Synadenium grantii* Hook “lechero africano”.

### Objetivos específicos

- Determinar la concentración mínima inhibitoria de los extractos etanólico y acuoso de *Synadenium grantii* Hook “lechero africano”. Frente a *Candida albicans*.
- Determinar la concentración mínima fungicida de los extractos etanólico y acuoso de *Synadenium grantii* Hook “lechero africano”. Frente a *Candida albicans*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Lugar de ejecución

El presente trabajo se realizó en los laboratorios de Bromatología y Nutrición, y Microbiología de

la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga.

El trabajo de investigación se realizó durante los meses de noviembre del 2012 febrero del 2013.

### Muestra biológica

Hojas de *Synadenium grantii* Hook “lechero africano” muestreo por conveniencia.

### Recolección de Muestra biológica

La cantidad de la muestra fue de 3 kg de hojas *Synadenium grantii* Hook “lechero africano” recolectadas en la ciudad de Ayacucho, en horas de la mañana, entre las 6 a 7 AM; antes que los rayos solares iluminen la planta, se introdujeron en bolsas de papel para evitar su transpiración durante su traslado, se escogieron las hojas de buen estado, libre de polvo, tierra y partes de la planta que no utilizados.<sup>3</sup>

Una parte de la muestra, específicamente una rama con hojas e inflorescencia sirvió para la identificación botánica, realizada en el *Herbarium Huamangensis* de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga por la Bióloga Laura Aucasime Medina.

### Cepa

*Candida albicans* ATCC 10231, proporcionada por el Área Académica de Microbiología de la Escuela de Formación Profesional de Biología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga.

### Fármaco de referencia

Ketoconazol. Tabletas de 200 mg. (Fuente. Laboratorio Farminustria).

### Diseño metodológico

### Preparación de la muestra biológica

### Molienda

Las hojas fueron sometidas a molienda en mortero de porcelana, luego se tamizaron con malla de 3 mm, de diámetro obteniéndose partículas no mayores de 3 mm.

### Obtención de extracto acuoso

Se pesó 10 g de hojas de *Synadenium grantii* Hook pulverizadas y se añadió a 100 ml de agua destilada hirviendo obteniéndose un extracto por infusión de 10 mg/ml de la cual se obtuvo las concentraciones de 5 mg/ml y 1 mg/ml.

### Obtención de extracto etanólico

Las hojas pulverizadas de *Synadenium grantii* Hook “lechero africano” fueron sometidas a la extracción utilizando etanol, se macero durante cinco días, en frascos de color ámbar con agitaciones permanentes, seguidamente se filtró y luego se concentró en baño maría, procediendo a secar en estufa a no más de 50C°, hasta obtener un extracto semisólido de color marrón verdusco en su forma más estable.

Se pesó 100 mg del extracto etanólico obtenido, luego se diluyó en 10 ml de agua destilada estéril, siendo esta la solución madre de 10 mg/ml de la cual se extrajo 1 ml con una pipeta para verterlo en tubo conteniendo una determinada cantidad de agua destilada estéril, para así obtener concentraciones de 5 mg/ml y 1 mg/ml.

#### **Identificación de los metabolitos secundarios**

Las reacciones de identificación de los diferentes metabolitos secundarios presentes en los extractos etanólico y acuoso de las hojas de *Synadenium grantii* Hook “lechero africano” se realizaron siguiendo los procedimientos propuestos por Miranda y Cuellar,<sup>4</sup> el cual se realizó en el laboratorio de Farmacia y Bioquímica.

#### **Determinación de la actividad anti *Candida albicans***

##### **Preparación del inóculo**

1. Se tomó la cepa de *Candida albicans* con el asa de siembra.
2. Luego se resuspendió en un tubo de vidrio con solución salina fisiológica 0,85%.
3. Se homogenizó y ajustó a la turbidez de 0,5 en la escala de McFarland que equivale a  $15 \times 10^8$  UFC).
4. Se realizó este paso visualmente, teniendo en cuenta la luz adecuada, comparando así el inóculo con el estándar de 0,5 de McFarland contra un fondo blanco, el cual se usó inmediatamente.<sup>4</sup>

##### **Determinación de halo de inhibición**

##### **Método de difusión en disco**

1. Se preparó placas Petri con agar Mueller Hinton.
2. Se sembró con la ayuda de un hisopo estéril embebido en el inóculo, dejándose secar en la estufa por un espacio de 5 minutos para que se absorba la humedad.
3. Se incorporaron discos de papel filtro especial de 5 mm de diámetro embebidos en los extractos acuoso y etanólico de las hojas de *Synadenium grantii* Hook.
4. Se incubaron a 37°C para así observar la formación de halos de inhibición a las 48 horas y determinar la actividad antimicótica.<sup>5</sup>

##### **Utilización de controles**

##### **Control negativo**

Se utilizó como control negativo al agua destilada.

##### **Control positivo**

Se utilizó como control positivo al Ketoconazol (antifúngico)

##### **Diseño experimental**

Para el presente trabajo, se formó ocho grupos de cinco repeticiones.

Grupo I : Control Negativo con agua destilada.

Grupo II : Control positivo con Ketoconazol.

Grupo III : Administrado con extracto acuoso a 10 mg/ml de concentración.

Grupo IV : Administrado con extracto acuoso a 5 mg/ml de concentración.

Grupo V : Administrado con extracto acuoso a 1 mg/ml de concentración.

Grupo VI : Administrado con extracto etanólico a 10 mg/ml de concentración.

Grupo VII : Administrado con extracto etanólico a 5 mg/ml de concentración.

Grupo VIII : Administrado con extracto etanólico a 1 mg/ml de concentración.

##### **Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)**

El cultivo de *Candida albicans* ATCC 10231 fue ajustado al estándar de 0,5 de la escala de McFarland. Para hallar la CMI se prepararon quince tubos previamente esterilizados y rotulados del número uno al quince. A continuación se detalla:

1. A partir del tubo número uno hasta el tubo quince se agregó 1 ml del caldo nutritivo.
2. Posteriormente se agregó 1 ml de extracto al tubo número uno a partir del cual se traspasó al tubo número dos y así sucesivamente hasta el tubo número catorce de este se extrajo 1 ml y se descartó.
3. El tubo número quince no recibió extracto siendo este el control.
4. 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>6</sup>

##### **Determinación de la concentración fungicida mínima (CMF)**

Para la determinación de la concentración mínima fungicida (CMF) se procedió a partir de la concentración mínima inhibitoria (CMI), realizándose de la siguiente manera:

1. Se observó la turbidez de los tubos para la determinación de la CMI a simple vista.
2. Se procedió a sembrar con la ayuda del asa de Kolle, los caldos de los tubos no turbios en las placas con Agar Sabouraud.
3. Posteriormente se incubó a 37°C por 24 horas.<sup>6</sup>

##### **Lectura de los resultados**

Los resultados para el ensayo de “Test difusión en disco”, se reportaron en función al diámetro del halo que se forma por acción de los extractos representado en milímetros. El diámetro del halo se midió en cuatro direcciones, tomando como resultado el promedio de estas mediciones.

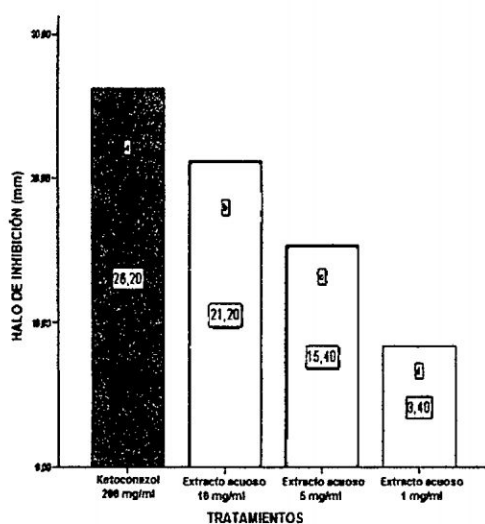
Para el cálculo de porcentaje de inhibición se usó la siguiente fórmula. Tomando como patrón al antifúngico ketoconazol.

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

### Análisis estadístico

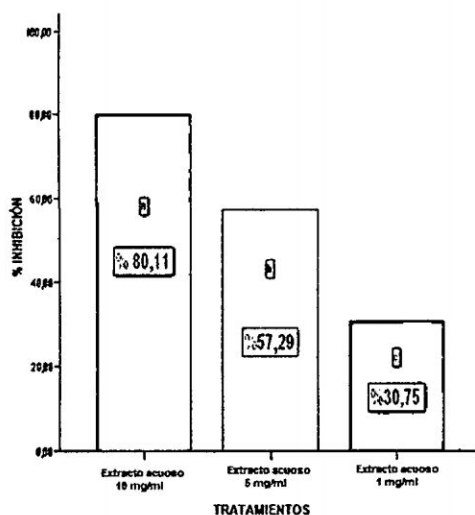
Los datos obtenidos en el presente trabajo de investigación se evaluaron estadísticamente por el diseño completamente aleatorizado (ANVA) y comparaciones múltiples de Tukey con un nivel de significancia de 0,05 para esto se usó el Software SPSS 15,0.<sup>7</sup>

### RESULTADOS



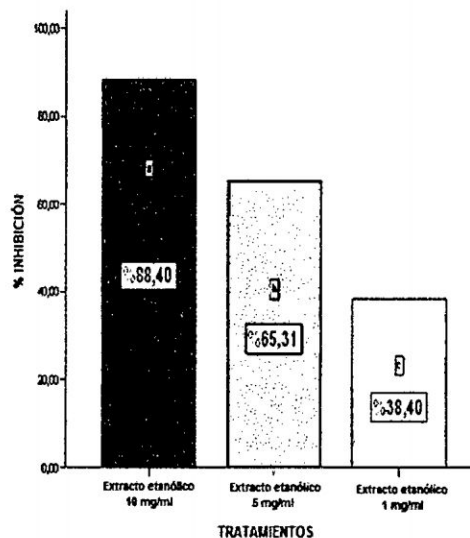
ANVA p<0,05

Figura 1. Promedio de los halos de inhibición por efecto del extracto acuoso de las hojas de *Synadenium grantii* Hook “lechero africano”, frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Ayacucho, 2014.



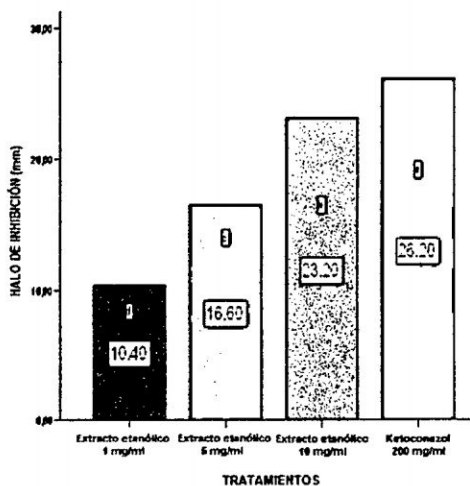
ANVA p<0,05

Figura 2. Porcentaje de inhibición por efecto del extracto acuoso de las hojas de *Synadenium grantii* Hook “lechero africano”, frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Ayacucho, 2014.



ANVA p<0,05

Figura 3. Porcentaje de inhibición por efecto del extracto etanólico de las hojas de *Synadenium grantii* Hook “lechero africano”, frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Ayacucho, 2014.



ANVA p<0,05

Figura 4. Promedio de halos de inhibición por efecto del extracto etanólico de las hojas de *Synadenium grantii* Hook “lechero africano”, frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Ayacucho, 2014.

Tabla 1. Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima fungicida de los extractos etanólico y acuoso de las hojas de *Synadenium grantii* Hook “lechero africano”, frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Ayacucho, 2014.

Tubos	Extracto acuoso (mg/ml)	Tubos	Extracto Etanólico (mg/ml)
1	5	1	5
2	2,5	2	2,5
3	1,25	3	1,25
4	0,625	4	0,625
5	0,313	5	0,313
6	0,156	6	0,156
7	0,078	7	0,078
8	0,039	8	0,039
9	0,02	9	0,02
10	0,01	10	0,01
11	0,005	11	0,005
12	0,0024	12	0,0024
13	0,0012	13	0,0012
14	0,0006	14	0,0006

S: Sensible

R: Resistente

### DISCUSIÓN

El uso de las plantas tradicionales en nuestro país en su gran mayoría es empírico, por lo que existen vacíos en la veracidad de sus efectos terapéuticos, con este trabajo se pretende dar valor y veracidad a los efectos antimicóticos que posee los extractos de las hojas del *Syandenum grantii* Hook "lechero africano" los metabolitos secundarios identificados en los extractos coinciden las encontradas en otras investigaciones realizadas en plantas de utilidad empírica por su efecto antimicótico, dentro de estos metabolitos podemos señalar como los posibles responsables a los flavonoides y/o alcaloides, como también a la acción sinérgica de los metabolitos secundarios de dicha planta, en él estudió fitoquímico que se realizó se determinó la presencia de fenoles, cardenolidos, flavonoides, esteroides, saponinas, catequinas, lactonas, aminoácidos, alcaloides y resinas, de las cuales en mayor concentración los flavonoides y alcaloides.

Las características organolépticas de los extractos acuoso y etanólico de las hojas de *Syandenum grantii* Hook "lechero africano" es de color caramelo, de olor y sabor suigeneris.

Según Bidart,<sup>8</sup> muchas especies de plantas han sido utilizadas etnofarmacológicamente para tratar enfermedades micóticas donde cada vez más, la gente recurre a terapias complementarias y alternativas para poder solucionar problemas de salud, pues los obstáculos que enfrentan las familias de bajos recursos impiden que tengan acceso a productos farmacéuticos y servicios sanitarios.

Las medias de los halos de inhibición producidos por el extracto acuoso a diferentes

concentraciones de las hojas de *Syandenum grantii* Hook "lechero africano" muestran que el de 1 mg/ml generó 8 mm de halo, el 5 mg/ml (15 mm) y el de 10 mg/ml (21 mm) son menores al Ketoconazol (26 mm).

Las medias de los halos de inhibición producidos por el extracto etanólico a diferentes concentraciones de las hojas de *Syandenum grantii* Hook "lechero africano" muestran que el de 1 mg/ml generó 10 mm de halo, el 5 mg/ml (17 mm) y el de 10 mg/ml (23 mm) son menores al Ketoconazol (26 mm), siendo estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ).

El extracto acuoso de *Syandenum grantii* Hook "lechero africano" a una concentración de 1 mg/ml presenta una media de halo de inhibición de  $8,4 \pm 0,55$  mm, el de 5 mg/ml una media de  $15,4 \pm 0,55$  mm, y el de 10 mg/ml generó una media de  $16,6 \pm 0,45$  mm, tal como muestra el análisis de comparaciones múltiples de Tukey.

El extracto etanólico de *Syandenum grantii* Hook "lechero africano" a una concentración de 1 mg/ml presenta una media de halo de inhibición de  $10,4 \pm 0,55$  mm, el de 5 mg/ml una media de  $16,6 \pm 0,55$  mm, y el de 10 mg/ml generó una media de  $23 \pm 0,45$  mm, tal como muestra el análisis de comparaciones múltiples de Tukey.

Los porcentajes de inhibición producidos por el extracto acuoso a diferentes concentraciones de las hojas de *Syandenum grantii* Hook "lechero africano" muestran que el de 1 mg/ml tubo un porcentaje de 30,76%, el de 5 mg/ml (57,69%) y el de 10 mg/ml (80,76%) siendo esta última concentración la que más se acerca al control positivo que fue el antifúngico Ketoconazol.

Los porcentajes de inhibición producidos por el extracto etanólico a diferentes concentraciones de las hojas de *Syandenum grantii* Hook "lechero africano" correspondientes a las concentraciones 1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, respecto al Ketoconazol, fueron el 38,46%, 65,38% y 88,46% respectivamente. Siendo estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ).

En el análisis de comparaciones múltiples de Tukey. La media del porcentaje de inhibición producida por el extracto acuoso de *Syandenum grantii* Hook "lechero africano" fueron para a una concentración de 1 mg/ml presenta un porcentaje de inhibición de  $30,75 \pm 0,23\%$ , el de 5 mg/ml un porcentaje de  $57,30 \pm 0,39\%$ , y el de 10 mg/ml generó un porcentaje de  $80,11 \pm 0,63\%$ , determinando así que a mayor concentración el porcentaje de inhibición es mayor.

El extracto etanólico de *Syandenum grantii* Hook "lechero africano" a una concentración de 1 mg/ml presenta porcentaje de inhibición de

38,40 ± 0,10 %, el de 5 mg/ml un porcentaje de 65,31 ± 0,12%, y el de 10 mg/ml generó un porcentaje de 88,39 ± 0,11%, tal como muestra el análisis de comparaciones múltiples de Tukey. La concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima fungicida (CMF) son datos de laboratorio muy importantes que en la actualidad no se toma mucho en cuenta, esto genera el uso indiscriminado de los antifúngicos y medicamentos, propiciando la aparición de resistencia de los microorganismos que inutilizan a medicamentos valiosos, y que por otras causas como la falta de regulación en su compra y venta, la automedicación y la ignorancia, favorece la aparición de cepas de microorganismos resistentes. Gracias al uso del CMI y la CMF se puede dar mayor valor a los medicamentos, tanto en su dosificación y costo beneficio para el paciente.

En la Tabla 1, se determinó de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos acuoso y etanólico de las hojas de *Synadenium grantii* Hook "lechero africano". Utilizando la concentración de 10 mg/ml tanto para el extracto acuoso y etanólico, a esta concentración los extractos generaron mayor inhibición acercándose más al control positivo "Ketoconazol", esto se realizó con la finalidad de determinar la concentración mínima del extracto (antifúngico) que se requiere para inhibir el crecimiento de *Candida albicans* ATCC 10231, el cual resultó para el extracto acuoso de 0,156 mg/ml, y para el extracto etanólico de 0,078 mg/ml. De igual modo se determinó la concentración mínima fungicida (CMF) el cual nos permite determinar la cantidad mínima del extracto (acuoso, etanólico) que se requiere para matar a *Candida albicans* ATCC 10231 *in vitro*, los cuales resultaron de la siguiente manera para el extracto acuoso la CMF fue de 0,313 mg/ml y el extracto etanólico la CMF fue 0,156 mg/ml.

#### CONCLUSIONES

- El extracto acuoso y etanólico de las hojas *Synadenium grantii* Hook "lechero africano" a la concentración de 10 mg/ml presentaron mayor actividad anti *Candida albicans* con 21 y 23 mm de diámetro respectivamente, respecto a las demás concentraciones, con halos de inhibición de 15 y 17 mm para el extracto de 5 mg/ml y para el extracto de 1 mg/ml generaron halos de 8 y 10 mm; el control positivo Ketoconazol que generó un halo de 26 mm, siendo estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ).
- La concentración mínima inhibitoria, frente a *Candida albicans* ATCC 10231, producido por el extracto acuoso y etanólico de las hojas

*Synadenium grantii* Hook "lechero africano" fue de 0,156 y 0,078 mg/ml, respectivamente.

- La concentración mínima fungicida, frente a *Candida albicans* ATCC 10231, producido por el extracto acuoso y etanólico de las hojas *Synadenium grantii* Hook "lechero africano" fue de 0,313 y 0,156 mg/ml, respectivamente.

#### RECOMENDACIONES

- Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se recomienda realizar estudios, así como separar los metabolitos secundarios de los extractos y de esta forma verificar los responsables de dicha actividad farmacológica.
- Proseguir con el estudio del *Synadenium grantii* Hook "lechero africano" con la finalidad de determinar si tiene efecto en otras especies de hongos, como también otras propiedades medicinales.
- Incentivar el estudio de plantas usadas en medicina tradicional, sobre todo en relación a propiedades antimicóticas.
- Realizar estudios de toxicidad de los metabolitos secundarios encontrados en la planta de *Synadenium grantii* Hook "lechero africano" con el objeto de poder realizar pruebas pre clínicas y clínicas.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fitzpatrick R. Dermatología en Medicina General. Vol 4. 7<sup>ma</sup> ed. Buenos Aires - Argentina: Médica Panamericana; 2010.
2. Font Quer P. Plantas Medicinales. Barcelona - España: Labor.S.A; 2009.
3. Katzung, B. Farmacología básicos y clínicos. 10<sup>ma</sup> ed. México: Manual Moderno; 2007.
4. Miranda M, Cuellar A. Manual de Prácticas de Laboratorio: Farmacognosia y Productos Naturales. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad La Habana - Cuba; 2000.
5. Moreno S. Efecto antifúngico de extractos de *Larrea tridentata* L, "Gobernadora", sobre cultivos invitro de *Aspergillus flavus* y *Penicillium sp*, 2011. [Tesis pregrado]. Santiago- Chile: Intercambio científico; 2010.
6. Palomino M, Uribe C. Determinación de la actividad antimicrobiana in vitro de los extractos etanólico e hidroalcoholico de las semillas de *Carica papaya* L."papaya".[Tesis pregrado].Ica – Perú, Universidad Nacional San Luis Gonzaga; 2007.
7. Norman H, Nie C, Hadlai H, Dale H, Bent. SPSS 15, 0. Para Windows. 10<sup>ma</sup> ed. Chicago: Microsoft; 2009.
8. Bidart T. Lo antiguo y lo nuevo en antifúngicos y antivirales. Vol. 2. 2<sup>da</sup> ed. Chile: Chilena; 2004.