



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
CARRERA DE ODONTOLOGÍA

Proyecto de Investigación para obtener el título de Odontóloga

TRABAJO DE TITULACIÓN

**“ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA “IN VITRO” DE ACEITE
ESENCIAL Y EXTRACTO ALCOHÓLICO DE *Mentha piperita*
“HIERBA BUENA” SOBRE *Candida albicans* CEPA ATCC 10231”**

Autora: Br. Karina Fernanda Flores Colcha

Tutora: Ms.C. Silvia Reinoso

RIOBAMBA–ECUADOR

2017

PÁGINA DE REVISIÓN DEL TRIBUNAL

Los miembros del tribunal de graduación del proyecto de investigación del título:
“ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA “IN VITRO” DE ACEITE ESENCIAL Y EXTRACTO ALCOHÓLICO DE *Mentha piperita* “HIERBA BUENA” SOBRE *candida albicans* CEPA ATCC 10231”.

Presentado por Br. FLORES COLCHA KARINA FERNANDA, y dirigido por: Ms.C. Silvia Alexandra Reinoso Ortiz.

Una vez realizado el informe final del proyecto de investigación con fines de graduación escrito en el cual ha conestado el cumplimiento de las observaciones realizadas, el proyecto de investigación está apto para la defensa pública por lo que se remite al coordinador de la Unidad de Titulación Especial de la Carrera de Odontología para que el presente estudiante pueda continuar con su proceso de titulación.

Para constancia de lo expuesto firman:

Dr. Xavier Salazar



Dr. David Guerrero



Dra. Sandra Cruz





UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
CARRERA DE ODONTOLOGÍA

DECLARACIÓN EXPRESA DE TUTORÍA

El suscrito Docente Tutor de la Carrera de Odontología, de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional del Chimborazo. Yo Ms.C Silvia Reinoso, CERTIFICO, que la Srta. Flores Colcha Karina Fernanda, con CI: 1720117876, se encuentra apta para la presentación del proyecto de investigación **“ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA “IN VITRO” DE ACEITE ESENCIAL Y EXTRACTO ALCOHÓLICO DE *Mentha piperita* “HIERBA BUENA” SOBRE *candida albicans* CEPA ATCC 10231”**.

Y, para que conste a los efectos oportunos, expido el presente certificado, a petición de la persona interesada, el 18 de Diciembre del 2017, en la ciudad de Riobamba.

Atentamente,

Ms.C. Silvia Reinoso

**DOCENTE-TUTOR DE LA CARRERA
DE ODONTOLOGÍA**

AUTORÍA DE LA INVESTIGACIÓN

Yo, Karina Fernanda Flores Colcha soy responsable de todo el contenido de este trabajo de investigación, los derechos de autoría pertenecen a la Universidad Nacional de Chimborazo”.



Karina Fernanda Flores Colcha

1720117876

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de Chimborazo, a la Facultad de Ciencias de la Salud, carrera de Odontología y a cada uno de los doctores que no sólo me supieron brindar su conocimiento sino también su amistad.

Agradezco al Ingeniero Félix Falconí por su ayuda y asesoramiento en el Laboratorio de Biología Molecular–Genética Investigación.

Al Ingeniero Edison Bonifáz por la paciencia por sus consejos, apoyo y confianza, así como por su disposición en todo momento para resolver cualquier duda surgida durante la redacción de la misma.

Ingeniero Ms.C. Dennys Tenelanda por estar dispuesto a solventar cualquier duda y, por sus propuestas de mejorar durante el desarrollo de las tesis.

A la Ms.C. Silvia Reinoso por su guía dedicación y tiempo para poder concretar el presente estudio. Finalmente, no puedo dejar de agradecer a Dios por poner a cada una de estas personas en mi vida.

Karina Fernanda Flores Colcha

DEDICATORIA

Dedico este trabajo principalmente a Dios, por haberme dado la vida y permitirme haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional. A mis padres por ser el pilar más importante y por demostrarme siempre su cariño y apoyo incondicional. A mi esposo, quien me brindó su amor, su cariño, su estímulo y su apoyo constante y paciente espera para realizarme profesionalmente, son evidencia de su gran amor. A mi adorado hijo quien me prestó el tiempo que le pertenecía para terminar y me motivó para nunca rendirme y poder llegar a ser un ejemplo para él.

Karina Fernanda Flores Colcha

RESUMEN

El objetivo es comparar la actividad antifúngica “In vitro”, de aceite esencial y extracto alcohólico de *Mentha piperita* (Hierba buena), mediante un estudio microbiológico sobre cepas de *Candida albicans* ATCC 10231. La metodología se realizó una investigación de tipo experimental, comparativa, in vitro, de aceite esencial y extracto alcohólico de *Mentha piperita* (Hierba buena) a diferentes concentraciones, aplicado sobre cepas de *Candida albicans* ATCC 10231 cultivadas en cajas Petri, realizando una siembra de aceite esencial y extracto alcohólico de *Mentha piperita* a través de la técnica de barrido con la ayuda de un hisopo, colocando las cajas Petri en incubadora por 48 horas a 37° C para la posterior lectura del halo de inhibición. Los resultados son la escala de aceites esenciales según Duraffourd se identificó que la *Candida albicans* frente a mayores concentraciones de aceite esencial de *Mentha piperita* presentó una actividad nula. En cuanto al extracto alcohólico de la *Mentha piperita* el promedio del halo de inhibición fue menor a 3 mm. La comparación de la actividad antifúngica derivada del extracto alcohólico y el aceite esencial de la *Mentha piperita*, sobre cepas de *Candida albicans*, demostró que el efecto antifúngico del aceite es mejor que el obtenido con el extracto alcohólico, esto en función del diámetro del halo de inhibición reportado.

Palabras claves: *Candida albicans* / Biofilm / *Mentha piperita* / Aceite esencial / Extracto alcohólico

ABSTRACT

To compare the antifungal activity "In vitro", of essential oil and alcoholic extract of *Mentha piperita* (Good grass), by means of a microbiological study on strains of *Candida albicans* ATCC 10231. The methodology was carried out an experimental, comparative, in vitro, of essential oil and alcoholic extract of *Mentha piperita* (Good grass) at different concentrations, it was applied on strains of *Candida albicans* ATCC 10231 grown in Petri dishes, making a sowing of essential oil and alcoholic extract of *Mentha piperita* through the scan technique with the help of a swab, placing the Petri dishes in an incubator for 48 hours at 37° C for the subsequent reading of the inhibition halo. The results are the scale of essential oils according to Duraffourd it was identified that the *Candida albicans* against higher concentrations of essential oil of *Mentha piperita* presented a null activity. As for the alcoholic extract of *Mentha piperita*, the average inhibition halo was less than 3 mm. The comparison of the antifungal activity derived from the alcoholic extract and the essential oil of *Mentha piperita*, on strains of *Candida albicans*, it showed that the antifungal effect of the oil is better than the one obtained with the alcoholic extract, this depending on the diameter of the reported inhibition halo.

Keywords: *Candida albicans* / Biofilm / *Mentha piperita* / Essential oil / Alcoholic extract



Reviewed by: Romero, Hugo
Language Center Teacher



ÍNDICE DE CONTENIDO

PORTADA.....	i
REVISIÓN DEL TRIBUNAL.....	ii
DECLARACIÓN EXPRESA DE TUTORÍA.....	iii
AUTORÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
DEDICATORIA.....	vi
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	ix
ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiv
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
3. JUSTIFICACIÓN.....	6
4. OBJETIVOS.....	8
4.1. Objetivo General.....	8
4.2. Objetivos Específicos.....	8
5. MARCO TEÓRICO.....	9
5.1. Micología.....	9
5.2. Candidiasis.....	11
5.3. Plantas medicinales.....	17
5.4. Hierba buena (<i>Mentha piperita</i>).....	21
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28

6.1.	Tipo de investigación	28
6.2.	Tipo de muestreo	28
6.3.	Población del Estudio	29
6.4.	Criterios de Inclusión y Exclusión	29
6.5.	Variables.....	30
6.6.	Recursos	31
6.7.	Materiales	31
6.8.	Procedimientos y Técnicas	33
7.	RESULTADOS	50
7.1.	Susceptibilidad en el caldo de difusión con el aceite esencial de <i>Mentha piperita</i> y la <i>Candida albicans</i>	50
7.2.	Resultados del halo de inhibición del aceite esencial de <i>Mentha piperita</i> sobre la <i>Candida albicans</i>	50
7.3.	Resultados del halo de inhibición del extracto alcohólico de <i>Mentha piperita</i> sobre la <i>Candida albicans</i>	58
8.	DISCUSIÓN.....	65
9.	CONCLUSIONES.....	68
10.	RECOMENDACIONES	69
11.	BIBLIOGRAFÍA	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de <i>Candida albicans</i>	12
Tabla 2. Componentes químicos (%) de los aceites esenciales destilados de <i>Mentha piperita</i>	24
Tabla 3. Operacionalización de las variables independientes	30
Tabla 4. Operacionalización de la variable dependiente.....	31
Tabla 5. Concentraciones del aceite esencial de <i>Mentha piperita</i> (Hierba buena) en DMSO y caldo Saboroud both	41
Tabla 6. Preparación del MIX + Caldo saboraund + <i>Cándida albicans</i>	41
Tabla 7. Cálculos de la preparación de los discos con aceite de Hierba Buena.....	45
Tabla 8. Extracto alcohólico de Hierba Buena.....	48
Tabla 9. Nivel de crecimiento	50
Tabla 10. Nivel Halo R1 del aceite esencial de <i>Mentha piperita</i> sobre la <i>Candida albicans</i>	50
Tabla 11. Nivel Halo R2 del aceite esencial de <i>Mentha piperita</i> sobre la <i>Candida albicans</i>	52
Tabla 12. Nivel Halo R3 del aceite esencial de <i>Mentha piperita</i> en la <i>Candida albicans</i>	54
Tabla 13. Medias y desviación del halo de inhibición del aceite esencial de <i>Mentha piperita</i> en la <i>Candida albicans</i>	55
Tabla 14. Actividad de los aceites esenciales según Duraffourd	56
Tabla 15. Comportamiento del halo de inhibición del aceite esencial de <i>Mentha piperita</i> en la <i>Candida albicans</i> según la escala de Duraffourd	56
Tabla 16. Tabla comparativa entre el control positivo, negativo y los diferentes tratamiento.....	57
Tabla 17. Halo de inhibición R1 del extracto alcohólico de <i>Mentha piperita</i> sobre la <i>Candida albicans</i>	58
Tabla 18. Halo de inhibición R2 del extracto alcohólico de <i>Mentha piperita</i> en la <i>Candida albicans</i>	59
Tabla 19. Halo de inhibición R3 del extracto alcohólico de <i>Mentha piperita</i> en la <i>Candida albicans</i>	60

Tabla 20. Media y desviación estándar del halo de inhibición del extracto alcohólico de <i>Mentha piperita</i> en la <i>Candida albicans</i>	62
Tabla 21. Comparación de las medias del halo de inhibición de los tratamientos con el control positivo y negativo.....	63

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Nivel Halo R1 del aceite esencial de <i>Mentha piperita</i> sobre la <i>Candida albicans</i>	51
Gráfico 2. Nivel Halo R2 del aceite esencial de <i>Mentha piperita</i> sobre la <i>Candida albicans</i>	53
Gráfico 3. Nivel Halo R3 del aceite esencial de <i>Mentha piperita</i> en la <i>Candida albicans</i>	54
Gráfico 4. Halo de inhibición R1 del extracto alcohólico de <i>Mentha piperita</i> sobre la <i>Candida albicans</i>	58
Gráfico 5. Halo de inhibición R2 del extracto alcohólico de <i>Mentha piperita</i> en la <i>Candida albicans</i>	59
Gráfico 6. Halo de inhibición R3 del extracto alcohólico de <i>Mentha piperita</i> en la <i>Candida albicans</i>	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso de Filtrado	34
Figura 2. Proceso de calentamiento en Baño de María.....	34
Figura 3. Método de arrastre por corriente de vapor.....	35
Figura 4. Muestra de <i>Candida albicans</i>	35
Figura 5. Se retiró la superficie <i>Candida albicans</i> para colocarlo en un tubo esterilizado	36
Figura 6. Vortex para que sea una mezcla homogénea.....	36
Figura 7. Inoculación de la <i>Candida albicans</i> en la Placa Petri.....	37
Figura 8. Incubadora 37 °C por 24 horas	37
Figura 9. 2,4 g de agar Saboraud.....	38
Figura 10. 500 ml Agua + 2,4 agar	38
Figura 11. Hierba para mezcla homogénea.....	39
Figura 12. Llevar al esterilizador	39
Figura 13. Preparación medios de cultivo.....	40
Figura 14. Proceso de Siembra	40
Figura 15. Resultados de la Placas Petri en la Incubadora.....	42
Figura 16. Preparación del fluconazol para el control positivo y negativo.....	43
Figura 17. Medio de cultivo agar Sabouraud chloramphenicol + AGUA	44
Figura 18. Medio de cultivo y cajas en el esterilizador.....	44
Figura 19. Placas con agar Saboraud	45
Figura 20. Discos embebidos con aceite y extracto alcohólico hierba buena.....	46
Figura 21. Control positivo con fluconazol.....	46
Figura 22. Control negativo con agua destilada.....	47
Figura 23. Resultados difusion de los discos del aceite de Hierba Buena	47
Figura 24. Resultados del extracto alcohólico de Hierba Buena	48
Figura 25. Control positivo y negativo del extracto alcohólico de Hierba buena.....	48

1. INTRODUCCIÓN

Los miembros de las especies de *Cándida* causan problemas de salud significativos, induciendo varios tipos de micosis superficiales y profundas en humanos. Con el fin de prevenir de *Cándida albicans*, en la actualidad la comunidad científica está desarrollando aceites esenciales, debido a las propiedades antifúngica, de baja toxicidad si se usan adecuadamente y biodegradabilidad. Además, las especies de *Cándida* son actualmente la causa más común de infecciones por hongos en todo el mundo, siendo el patógeno fúngico más frecuente. Entre los factores que contribuyen al potencial patogénico de *Cándida albicans* está la producción de adhesinas e invasinas, que median la adhesión e invasión de células huésped, la secreción de enzimas hidrolíticas, la transición de levadura a hifa, la detección de contacto y el tigmotropismo, la formación de biofilm, conmutación fenotípica y adaptación metabólica. Debido al aumento de la resistencia y la resistencia cruzada a los antibióticos de *Cándida albicans* aislados y el 25-60% de mortalidad de los pacientes con candidemia, existe un interés creciente en el uso de productos naturales derivados de plantas medicinales como agentes antifúngicos.⁽¹⁾

Estos han demostrado ser una fuente abundante de compuestos biológicamente activos, muchos de los cuales han sido la base para el desarrollo de nuevos productos químicos para productos farmacéuticos. Debido a que hay aproximadamente 500 000 especies de plantas en todo el mundo, de las cuales sólo el 1% ha sido investigado fitoquímicamente, existe un gran potencial para descubrir nuevos compuestos bioactivos. En particular, los extractos de plantas medicinales tradicionales o fitoquímicos que han demostrado inhibir el crecimiento de patógenos orales, reducir el desarrollo de la placa dental, influir en la adhesión de las bacterias a las superficies y reducir los síntomas de las enfermedades bucales serán discutidos posteriormente.⁽²⁾

Entre estos extractos está el aceite esencial de *Mentha piperita*, para el cual han encontrado una gama considerable de aplicaciones debido al amplio espectro de actividades, menos efectos secundarios, menor toxicidad si se usan apropiadamente y biodegradabilidad superior en comparación con los productos químicos.

Sin embargo, el uso en terapia puede estar limitado debido a reacciones de alergia irritantes y de contacto. La toxicidad de este depende claramente de la concentración, composición y vía de administración, y las reacciones adversas pueden evitarse mediante el uso de concentraciones más bajas.⁽¹⁾

Es por ello que se plantea la presente investigación con el aceite esencial y extracto alcohólico del *Mentha piperita* (Hierba buena), mediante un estudio microbiológico sobre cepas de *Candida albicans* ATCC 10231, mediante un estudio in vitro, experimental, usando aceite esencial y extracto alcohólico de *Mentha piperita*, sustancias obtenidas directamente de la planta, recolectada en la provincia de Chimborazo, cantón Riobamba del Ecuador, la cual fue procesada por el método de arrastre por corriente de vapor. Los productos obtenidos de la *Mentha piperita* en distintas concentraciones, conjuntamente con el control positivo (fluconazol) y el control negativo (agua destilada), fue procesado en incubadora por 48 horas a una temperatura de 37°C para su posterior lectura.

En base a esto surge la necesidad en esta investigación de evaluar el efecto antifúngico que poseen plantas medicinales como Hierba buena sobre cepas de *Candida albicans*, para de esta manera crear nuevos medicamentos que permitan controlar las diversas patologías, eliminar los agentes causales y mejorar las propiedades ofrecidas por los agentes antimicóticos tradicionales.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los trastornos de sistema inmune y en patologías graves, las infecciones causadas por hongos son un factor importante en las tasas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, siendo las variadas especies de *Candida*, los hongos más representativos y comunes, particularmente en el caso de micosis y aunque formen parte de la flora microbiana normal, incluyendo la microflora bucal, pertenecen al grupo de 10 especies causantes de enfermedades en los seres humanos. ⁽³⁾

En investigaciones realizadas a nivel latinoamericano con el objetivo de determinar la frecuencia y distribución de especies de *Candida* detectadas en muestras clínicas, tanto a nivel de salud general como estomatológico, así como analizar las características clínicas de la población involucrada y determinar los factores de riesgo para esta especie, se ha obtenido como resultado que en los últimos años, la cual se ha transformado en un microorganismo emergente hospitalario y la causa más común de infecciones fúngicas invasivas, alcanzando entre el 70% y 90% de todas las micosis invasivas. ⁽⁴⁾

En el caso de la *Candida albicans* el Ministerio de Salud Pública del Ecuador, publicó en el 2007 estadísticas que indicaban un total de 15.277 casos de trastornos no inflamatorios en todo el país, siendo significativo el número de patologías marcándose en los cuadros de morbilidad, además de representar una alta cifra de las patologías que se presentan en las consultas médicas diarias, atacando principalmente y en mayor medida a las mujeres, presentando con mayor énfasis micosis vaginales, determinándose que de la totalidad del género femenino, el 75% son afectadas en alguna ocasión por infección causada por este hongo microscópico. Evidenciándose también presencia de muguet o candidiasis oral, que representa una infección causada por hongos de la especie cándida que causa manchas blancuzcas en la boca, afectando también los labios, la lengua y el paladar. ⁽⁵⁾

Por otra parte, a nivel mundial la producción de aceites esenciales se ha mantenido como una tendencia creciente, existiendo en el Ecuador investigaciones sobre el tema, con el fin de aprovechar la ubicación geográfica del país, para obtener esta materia prima y darle uso en lo medicinal, casera o con las industrias farmacéutica, alimenticia y cosmética. A nivel de provincias, la ubicación de algunas con el clima que poseen, favorece el cultivo y desarrollo de muchas especies vegetales. ⁽⁶⁾

La incorporación en el área odontológica de aceites esenciales se fundamenta en la existencia de investigaciones que establecen la actividad antibacteriana que poseen, lo que plantea la importancia de implementarlos en la prevención de caries dental, enfermedades periodontales y otras patologías orales causadas por hongos, tal como la candidiasis bucal. ⁽⁷⁾

En la presente investigación, se pretende evaluar la actividad antifúngica del aceite esencial y extracto alcohólico de *Mentha piperita*, por medio de un estudio microbiológico aplicado en cepas de *Candida albicans*, debido a ser esta una microflora común en humanos y una infección fúngica oportunista, que a menudo aparece en los sistemas inmunológicos comprometidos y el crecimiento excesivo de esta levadura causa la candidiasis. El tratamiento de hongos patógenos implica medicamentos antifúngicos, que incluyen varios grupos. Sin embargo, las células humanas son similares a nivel molecular y por lo tanto es difícil identificar medicamentos que sean dirigidos a hongos sin que afecten las células humanas. En consecuencia, los efectos de estos medicamentos incluyen reacciones alérgicas, daño hepático y niveles alterados de estrógeno. Varios estudios han investigado productos naturales y aceites esenciales con efectos antifúngicos con el objetivo de determinar la actividad antimicrobiana in-vitro de algunas plantas medicinales sobre ciertos microorganismos patógenos, obteniendo como resultado un alto crecimiento inhibitorio de estos después del tratamiento con aceites de plantas, incluyendo la *Cándida albicans*. ⁽⁸⁾

También se conoce que muchos aceites son volátiles y poseen propiedades antifúngicas potencialmente aplicables como agentes antimicóticos, siendo la *Mentha piperita* (Hierba buena) tradicionalmente utilizada como antiséptico, estimulante, carminativo y adicionalmente como agente aromatizante en agentes cosméticos y las industrias farmacéuticas en todo el mundo. Por tanto, al estudiar la eficacia del aceite esencial de *Mentha piperita* frente a *Candida albicans* cepa ATCC 10231, se busca hallar la actividad inhibidora in vitro y los principales constituyentes contra esta cepa. ^(9,10)

3. JUSTIFICACIÓN

Desde las últimas tres décadas, las infecciones por hongos específicamente las especies de *Candida albicans* han surgido como una causa importante de la enfermedad, principalmente en pacientes inmunocomprometidos y han contribuido significativamente a la morbilidad y la mortalidad relacionada con los hongos. El aumento de la resistencia a los fármacos antimicóticos debido al uso excesivo de antibióticos, junto con la toxicidad y los efectos secundarios desfavorables de los fármacos ya disponibles, ha causado serios problemas. Los polienos causan grave toxicidad para el huésped, mientras que los azoles son fungistáticos y el uso prolongado contribuye al desarrollo de resistencia a los fármacos en la *Candida albicans*. Esto ha fomentado la búsqueda de moléculas nuevas y menos tóxicas que pueden desarrollarse como antifúngicos. La patogenicidad de las especies se atribuye a ciertos factores de virulencia, tales como: la capacidad de evadir las defensas del huésped, la adherencia, la formación de hifas y la secreción de las enzimas hidrolíticas que dañan los tejidos como las proteasas y las fosfolipasas. El efecto antifúngico de los aceites esenciales de muchas plantas aromáticas ha sido descrito en varios estudios. La actividad anticandidal específica para varios de estos aceites y las moléculas componentes también está bien establecida para la *Mentha piperita*, esta planta es una hierba perenne aromática cultivada en la mayor parte del mundo, tradicionalmente se ha utilizado en la medicina popular. Las hojas de hierba buena se utilizan con frecuencia en el té de hierbas y con fines culinarios para agregar sabor y aroma.⁽¹¹⁾

El aceite esencial de hierba buena también contiene mentona y ésteres de mentilo, en particular menthilo acetato. La menta seca típicamente tiene 0.3-0.4% de aceite volátil que contiene mentol (7-48%), mentona (20-46%), acetato de mentilo (3-10%), mentofurano (1-17%), y 1,8-cineol (3-6%). El aceite de *Mentha piperita* también contiene cantidades de muchos compuestos adicionales incluyendo limoneno, pulegona, eucaliptol, cariofilina y pineno. Este aceite esencial tiene una alta concentración de pesticidas, principalmente polygone y menthone, en estudios se ha demostrado que la

Mentha piperita posee actividad antimicótica, incluso en comparación con los fungicidas.⁽¹²⁾

En relación a todas estas características el aceite esencial de hierba buena es un compuesto natural que por la diversidad que posee se hace relevante estudiar la actividad antifúngica “In vitro”, de aceite esencial y extracto alcohólico del *Mentha piperita*, “Hierba buena”, mediante un estudio microbiológico sobre cepas de *Candida albicans*.⁽¹³⁾

Esta investigación es factible principalmente porque la Universidad Nacional de Chimborazo facilitó la cepa a través del laboratorio de biología molecular-genética investigación, las instalaciones de laboratorio, los recursos humanos y económicos. Además, tiene importancia teórica y social, por el aporte científico de la existencia de plantas medicinales que poseen propiedades antibacterianas y antifúngicas, que son alternativas de prevención y tratamiento de las enfermedades más usuales a nivel bucal, como la caries dental y candidiasis oral. Facilitando la elaboración de medicamentos, con variedad de productos de origen natural y dando acceso a la población de bajos recursos a tratamientos con menor costo.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Evaluar la actividad antifúngica “In vitro”, de aceite esencial y extracto alcohólico de *Mentha piperita* (Hierba buena), mediante un estudio microbiológico sobre cepas de *Candida albicans* ATCC 10231.

4.2. Objetivos Específicos

- Det el efecto antifúngico del aceite esencial a diferentes concentraciones (2500, 4500, 6500, 8500, 10500 y 12500 ppm) de *Mentha piperita* “Hierba buena”, sobre cepas de *Candida albicans*.
- Evaluar el efecto antifúngico del extracto alcohólico de la *Mentha piperita* “Hierba buena” a las diferentes concentraciones (50000, 40000, 30000, 20000, 10000, 5000 ppm), sobre cepas de *Candida albicans*.
- Identificar estadísticamente qué produce mayor efecto antifúngico sobre cepas de *Candida albicans* entre el extracto y el aceite esencial de la *Mentha piperita*.

5. MARCO TEÓRICO

5.1. Micología

Se define la micología como el área de la ciencia que se encarga de conocer y estudiar los hongos y todo lo concerniente a estos, tal como las formas que presentan y los modos de aparición y desarrollo, debido a que estos son considerados factores parasitarios, que se originan fundamentalmente en ambientes poco saludables. Los hongos son organismos vivos vitales para el equilibrio dentro de la naturaleza, debido a la capacidad que poseen de secar y absorber los químicos producidos por el material orgánico de desecho, convirtiéndolos en minerales o proteínas para ser consumidos por otros animales sin causar daño en la salud o el sistema digestivo. En el área médica la micología es la rama de la microbiología, que se interrelaciona con todas las especialidades médicas que tiene como finalidad el estudio de las patologías ocasionadas por hongos y las variedades de hongos que las causan. ⁽¹⁴⁾

5.1.1. Micosis

Las infecciones originadas por hongos son las patologías de la piel que se presentan con más frecuencia a nivel médico, siendo mayormente leves, sin embargo, en ocasiones pueden convertirse en infecciones graves de carácter invasor que se pueden extender a tejidos profundos. En el caso de micosis que afecta el área bucal, la más común es la candidiasis, la cual es producida por un hongo unicelular conocido como *Candida albicans*, que se detectan en forma de placas sobre las membranas mucosas que conforman la cavidad bucal. ⁽¹⁵⁾

5.1.2. Tipos de micosis

Los tipos de micosis que se presentan en la piel son del tipo: superficial, subcutáneas y profundas. ⁽¹⁶⁾

- **Micosis Superficial**

Este tipo de micosis es muy común en personas de todas las edades, presentándose de manera superficial en: el cuero cabelludo, la piel, las uñas y otras mucosas, siendo estas zonas parasitadas por los dermatófitos. La micosis superficial se clasifica en: tiñas, pitiriasis versicolor y candidiasis o candidosis.⁽¹⁶⁾

Estas *tinea* son producidas por tres causas distintas⁽¹⁷⁾:

- a. Contacto directo del suelo
- b. Por transmisión por especies animales (perro, ganado vacuno, gato, etc.)
- c. Por contacto de un ser humano a otro (antropofílicas).

- **Micosis Subcutánea**

Este tipo de infecciones son ocasionadas por hongos que se introducen directamente en la dermis a través de un daño intenso como la punzada de una espina. Estas se dividen en: esporotricosis, micetomas, cromoblastomicosis, lobomicosis y rinosporidiosis.⁽¹⁶⁾

- **Micosis Profunda**

Son generadas por una diversidad de especies de hongos que no solamente dañan la capa córnea de la piel, la hipodermis, órganos internos y osamenta. En el caso de estas patologías ocurren con mayor incidencia de los países de América Latina y algunas zonas de África.⁽¹⁶⁾

5.2. Candidiasis

Conocido como la infección más frecuente del área bucal, a excepción de las caries y las patologías periodontales, producidas por un hongo de género *Cándida*, perteneciente a la familia *Cryptococcaceae*, de la cual la especie *albicans* es la considerada altamente patógena por ocasionar enfermedades. ⁽¹⁸⁾

5.2.1. Definición

Se conoce como candidiasis o candidosis oral a la patología infecciosa producida por el desarrollo y crecimiento de las colonias de *Cándida*, las cuales penetran en los tejidos orales en aquellos casos en que las barreras inmunológicas del huésped se encuentran alteradas o debilitadas, constituyendo la infección micótica bucal con mayor prevalencia. Por ser la especie *Candida albicans* la que generalmente ocasiona esta patología, de acuerdo a los estudios clínicos, es considerado que la candidiasis es sinónimo de infección por *Candida albicans*. ⁽¹⁹⁾

5.2.2. Tipos de candidiasis bucal

Puede ser ocasionada por factores sistémicos como los son: alteraciones nutricionales, hormonales e inmunológicas. De igual manera, por factores locales tales como: alteraciones en la saliva, la barrera de la mucosa y transformaciones en el epitelio oral. En relación a estos factores los tipos de candidiasis bucal son los siguientes: agudas (pseudomembranosa y atrófica) y crónicas (estomatitis subprotésica e hiperplásica). ⁽²⁰⁾

5.2.3. *Candida albicans*

Se conoce como *Candida albicans* al hongo unicelular, contaminante, el cual se puede detectar con forma de células ovaladas o redondeadas y de levaduras, con un tamaño que oscila entre 2 y 4 micras, cuando se encuentra en estado saprófito. En forma de levadura tiene aspecto de células ovaladas o redondas, agrupadas en grupos pequeños, mientras que en forma de hongo filamentoso, se representa por células alargadas que se

diversifican con apariencia de filamentos pseudo-micelio o pseudo-hifas. También presenta paredes muy delgadas y se reproduce de manera asexual, por medio de blastoporas que se forman por gemación simple o por brotes. El dimorfismo que presenta le otorga la capacidad de evitar los mecanismos de defensa de la inmunidad celular del huésped, resultando que en forma de levadura se comporta como saprofita, en simbiosis con el huésped, por el contrario, en forma de hongo filamentoso, se comporta como parásito patógeno ocasionando síntomas en el huésped. ⁽²¹⁾

La infección que causa la *Candida albicans* no es transmisible, debido a que este elemento fúngico se encuentra en los individuos en circunstancias normales, siendo las zonas más frecuentes de contaminación las zonas cutáneas húmedas de pliegues submamarios e inguinales, área anogenital, zona entre los dedos de pies y manos, donde aparecen lesiones eccematosas, así como mucosas húmedas de la vagina, boca y tubo digestivo. ⁽¹⁸⁾

Tabla 1. Taxonomía de *Candida albicans*

Reino	Fungi
Phylum	Ascomycota
Subphylum	Ascomycotina
Clase	Ascomicetes
Orden	Saccharomycetales
Familia	Saccharomycetaceae
Género	Candida

Fuente: Cooprende Ecuador ⁽⁵⁾

Autor: Karina Fernanda Flores Colcha

- **Clínica**

Dentro de los aspectos clínicos de la candidiasis se puede mencionar ⁽²²⁾:

- Generalmente no produce molestias.
- Utilizar antibióticos causa modificaciones en el ecosistema que conforma la mucosa oral y, por lo tanto, ocasiona que el individuo presente mayor susceptibilidad a la aparición y desarrollo de candidas.

- La virulencia que presentan las cepas de *Candida* no es igual en todas las especies.
- Se ha determinado una relación frecuente entre la xerostomía o sequedad bucal y la *Candida*.⁽²²⁾

- **Síntomas**

Los síntomas de la candidiasis dependerán de la zona donde se localice la infección. Dermatológicamente los tipos de candidiasis más predominante son las de mucosas y las cutáneas, para el primer caso, la candidiasis de las mucosas se presenta en forma de placas cremosas y blanquecinas que se acumulan en el dorso de la lengua, velo del paladar, mucosa gingival y genital, las cuales al desprenderse queda la mucosa roja y congestiva al descubierto. En otros casos se presentan como una lengua roja, brillante y dolorosa, afectando las comisuras bucales a manera de placas triangulares, fisuradas en el centro y escamosas, así como también los labios, que aparecen con escamas adheridas en la zona inferior, erosionados y de color grisáceo.⁽²³⁾

- **Patogenia**

La *Candida*, principal causante de la candidiasis posee una alta cantidad de moléculas superficiales que son las responsables de la adherencia a los tejidos del organismo huésped, entre estas moléculas se tiene:⁽²³⁾

- Un receptor homólogo de la integrina humana CR 3, que se complementa con los grupos argininaglicina-ácido aspártico (RGD) de C₃Bi, laminina, fibronectina y fibrinógeno.
- Un tipo de lectina que se combina con los azúcares presentes en las células epiteliales.
- Proteínas con manosa que se combinan con las moléculas semejantes a la lectina presente en las células epiteliales.

Existen otros elementos de virulencia como la aspartilproteínasa, la cual interviene en la invasión tisular al causar la degradación de las proteínas de la matriz extracelular, así como una adenosina secretada que impide la producción de radicales de O₂ en los neutrófilos y la degranulación. Además, la transición de formas levaduriformes a hifas es fundamental para el nivel de virulencia del hongo, debido a que se ha evidenciado que las hifas brotan fuera de las células, siendo absorbidas por estas.⁽²³⁾

Así como, también se reconoce como un patógeno sagaz. La situación fisiológica del anfitrión es el principal factor manda la etiología de la candidiasis, las levaduras presentes se transforman en patógenos, ocasionando infecciones cuando existe cambios en el estado de la candidiasis. Por otra parte, la *Cándida albicans*, tiene la capacidad de sobrevivir como huésped en las diferentes situaciones, sometiéndose a una diversidad de presiones ambientales. Por esta destreza incrementa la gama de enfermedades ocasionadas por *Cándida albicans* y otros géneros de *Cándida*, teniendo mayor ocurrencia que la de otros microorganismos presentes.⁽²⁴⁾

- **Virulencia**

La *cándida* tiene la capacidad de producir diversos factores de virulencia que favorecen la acción invasora al organismo. Entre los principales factores se pueden mencionar las proteinasas aspárticas secretadas (PAS), que tienen la capacidad de producir lesiones en el tejido de las mucosas y favorecen la invasión y proliferación del hongo. Existen diversos genes que pueden codificar hasta 10 tipos diferentes de estas proteinasas que se expresan en mayor o menor medida que dependerá de las características del medio, especialmente el pH. Estas proteinasas son vitales para la patogenia de la *Candida albicans*, además de ser claves en la activación de los diversos elementos receptores de respuesta inmunitaria del huésped.⁽²⁵⁾

Además, la *Candida albicans*, expresa varios factores de virulencia que contribuyen a la patogénesis. Estos factores incluyen biomoléculas de reconocimiento de huéspedes (adhesinas), morfogénesis (la transición reversible entre células de levadura unicelulares y formas de crecimiento filamentosas), aspartil proteasas secretadas y fosfolipasas. Además, la «conmutación fenotípica» se acompaña de cambios en la expresión de

antígenos, morfología de colonias y afinidades de tejidos en *Candida albicans* y otras especies de la misma. ⁽²⁴⁾

Las adhesinas constituyen un factor importante entre los elementos de virulencia por poseer alta capacidad de adaptación y favorecer la unión del hongo con los epitelios, favoreciendo la virulencia de *Candida albicans* la capacidad de formar biofilms en algunas superficies, de modificar la morfología o las propiedades de la superficie celular o bioquímicas, existiendo dudas acerca de la influencia que tiene sobre la virulencia de la cándida la capacidad de modificar la morfología de levadura a pseudohifa. ⁽²⁵⁾

- **Tipos de candidiasis**

Generalmente la candidiasis se clasifica en profundas y superficiales. La candidiasis bucal es una de las formas superficiales que se presenta distintas formas clínicas siendo la más frecuente la pseudomembranosa o muguet, afectando la mucosa de la boca y la faringe, normalmente se presenta en neonatos y adultos mayores. En relación a la candidiasis profunda crean lesiones crónicas afectando a uno o más órganos que pueden terminar en una septicemia, llamándose candidosis sistémica. ⁽²⁴⁾

- **Diagnóstico**

Básicamente el diagnóstico de la candidiasis se fundamenta en los signos y síntomas clínicos que presentan las diversas etapas de manifestación de la patología. Siendo un método muy aplicado el de la citología exfoliativa, el cual identifica hasta en un 95% la presencia de pseudohifas de la infección por cándida, diagnostico que usualmente es confirmado por medio de cultivos en cualquiera de las modalidades. Además, se puede preparar frotis por raspado de piel, de vagina, de uñas y de la mucosa bucal, que son confirmados por procedimientos de intradermorreacción e inmunofluorescencia a la candidina. ⁽²²⁾

- **Tratamientos**

Generalmente cuando la candidiasis se presenta en forma leve no es necesario tratamiento alguno, debido a que esta patología se resuelve por si sola en un lapso de dos semanas. Sin embargo, para el tratamiento de la candidiasis bucal hay que considerar los siguientes aspectos:⁽²²⁾

- Si posterior al tratamiento con antibióticos se desarrolla algún caso leve de candidiasis, es recomendable el consumo de yogur o la toma de cápsulas de acidófilos.
- Emplear un cepillo de dientes suave.
- Enjuagar la boca con solución diluida al 3% con agua oxigenada varias veces al día.
- En los casos de pacientes diabéticos es suficiente regular y controlar el nivel de glucemia para combatir la infección ocasionada por candidiasis bucal.
- En los casos de candidiasis bucal severo con presencia de un sistema inmunitario debilitado es recomendable utilizar enjuague bucal antimicótico por unos 5 o 10 días.
- En el caso de pacientes inmunodeprimidos se recomienda aplicar tratamiento sistémico previo.⁽²²⁾

El tratamiento exitoso de pacientes con candidosis oral requiere identificación y cuando sea posible la corrección de factores de predisposición subyacente específica en cada paciente. Sin este reconocimiento, el tratamiento posterior con antifúngicos sólo puede dar como resultado el alivio temporal de infección, con inevitables recaídas si no se siguen instrucciones sobre la práctica de higiene oral adecuada. El uso de inhaladores de esteroides debe ser acoplado con el enjuague de la boca con agua después de la administración. Todos los pacientes deben ser informados sobre la importancia de reducción o cese de cualquier hábito de fumar como las prácticas de higiene bucal son también esencial en la eliminación de biofilms cándida en el huésped superficies y prótesis orales. Cualquier deficiencia nutricional identificada debe ser corregido y asesoramiento sobre hábitos alimenticios tales como según sea necesario, la ingesta de carbohidratos. Sin embargo, a pesar de estas intervenciones, se presentan situaciones en

las que causa subyacente no puede resolverse, como el VIH una infección o una terapia inmunosupresora órgano o trasplante de médula ósea. En estas circunstancias, Tratamiento de la candidosis oral se basa en el uso de terapia antifúngica. ⁽²⁴⁾

- **Tratamiento farmacológico**

Los fármacos antifúngicos típicos y los regímenes de tratamiento utilizado específicamente para la candidosis oral. El fluconazol es el agente de primera elección para candidosis oral aparte de eritematosis crónica por la eficacia clínica de los agentes que sólo se pueden administrar tópicamente, como anfotericina o nistatina, es limitada debido a problemas en mantener suficientes niveles de fármaco en el lugar de la infección. El sabor de los agentes tópicos estimula la secreción salival, que diluyen y eliminan rápidamente el agente antifúngico agente de la boca. En vista de ello, el uso es limitado. El fluconazol tiene un buen perfil de seguridad cuando se administra sistemáticamente, con pocas contraindicaciones o efectos secundarios. Interacciones importantes ocurren con anticoagulantes cumarínicos y sulfonilureas antidiabéticas agentes. Resistencia adquirida a los antifúngicos azoles ha surgido en los últimos años y cierta *Cándida* también son inherentemente resistentes a estos agentes. ⁽²⁴⁾

5.3. Plantas medicinales

Desde los orígenes de la humanidad se ha planteado como objetivo establecer las condiciones más favorables para vivir mejor, minimizar enfermedades y mejorar la calidad de vida, usándose desde la antigüedad las plantas como métodos terapéuticos que apoyan la medicina tradicional. Estos métodos incluyen terapias con medicación fundamentadas con hierbas por la posibilidad que ofrecen de ser aplicadas y usadas en la atención primaria de salud. Es por ello, que la Organización Mundial de la Salud ha declarado que el 80% de la población mundial utiliza plantas medicinales como principal remedio medicinal. Por lo tanto, el empleo de las plantas medicinales es una tendencia común en la población mundial, a pesar que la mayoría de las veces se desconocen total o parcialmente las propiedades que poseen, así como las formas y modos de aplicación. De tal manera que para obtener avances en el conocimiento de la

gestión tradicional de los recursos naturales de origen vegetal y de las relaciones entre las sociedades de individuos y las plantas, se han realizado estudios etnobotánicos, así como en fitoterapia y fitoquímica, que han hecho grandes aportes en las últimas décadas, tanto en la práctica como en lo académico, para el tratamiento y obtención de fármacos de origen vegetal útiles en el tratamiento de las patologías que más afectan a las comunidades. ⁽²⁶⁾

Además, los productos naturales derivados de plantas medicinales han demostrado ser una fuente abundante de compuestos biológicamente activos, muchos de los cuales han sido la base para el desarrollo de nuevos productos químicos de plomo para productos farmacéuticos. Con respecto a las enfermedades causadas por microorganismos, la creciente resistencia en muchos patógenos comunes a agentes terapéuticos actualmente utilizados, tales como antibióticos y agentes antivirales, ha llevado a un interés renovado en el descubrimiento de nuevos compuestos antiinfecciosos. Debido a que hay aproximadamente 500 000 especies de plantas en todo el mundo, de las cuales sólo el 1% ha sido investigado fitoquímicamente, existe un gran potencial para descubrir nuevos compuestos bioactivos. En particular, los extractos de plantas medicinales tradicionales o fitoquímicos que han demostrado inhibir el crecimiento de patógenos orales, reducir el desarrollo de la placa dental, influir en la adhesión de las bacterias a las superficies y reducir los síntomas de las enfermedades bucales serán discutidos posteriormente. ⁽²⁾

5.3.1. Definición

Se definen como plantas medicinales a todas aquellas que contienen en alguna de las partes, principios activos que, al ser administrados en dosis suficientes, producen efectos curativos en las enfermedades humanas. Se ha determinado que, de la totalidad de plantas existentes, el 10% son consideradas medicinales, cifra que es susceptible de variar por el desconocimiento de la totalidad real de la flora, por lo tanto, se encuentran mencionados dentro de los tratados médicos del área fitoterapéutica, tanto moderna como ancestrales, por poseer algún uso terapéutico. El estudio de los componentes de las plantas medicinales se concentra en las sustancias que producen un efecto

farmacológico sobre los individuos, conocidos como principios activos, los cuales generalmente son sustancias simples, tales como los alcaloides, o sustancias complejas, tales como resinas y aceites esenciales, siendo los componentes más comunes los azúcares y heterósidos, que constituye un azúcar más un compuesto sin azúcar, que puede ser galactosidos y glucósidos. Otros componentes activos de estas plantas son los alcaloides, gomas, lípidos, mucilagos, taninos, principios amargos, oleorresinas, ácidos orgánicos, bálsamos, enzimas y vitaminas. ⁽²⁷⁾

5.3.2. Historia de las plantas medicinales

Estas han formado parte fundamental en la historia y cultura de las civilizaciones, especialmente los pueblos indígenas. El empleo y aplicación de las plantas medicinales para combatir las enfermedades se encuentra constituido por conocimientos que son transmitidos de forma verbal de generación en generación y que se propagó más allá de las fronteras por el proceso histórico de colonización. Estas curaciones realizadas con hierbas y plantas, variaban en cuanto a la preparación y forma de aplicación, así como del tipo de dolencia atendida y muchas veces eran acompañadas por un componente mítico religioso, por lo cual aquellos individuos que poseían estos conocimientos eran llamados médicos verdaderos, por conocer la medicina que sanaba. En la actualidad, el estudio científico de las plantas medicinales se ha convertido en motivo de investigación para varias ramas de la salud, considerando la herbolaria como una alternativa útil para resolver algunos problemas de salud. Determinando ventajas entre la cuales se puede mencionar: ⁽²⁷⁾

- Accesibilidad para el uso y recolección.
- Amplia variedad a nivel mundial.
- Relacionado con el medio cultural, mediante la concepción del mundo y de los individuos que existen en cada región.
- No requiere mucha inversión de tiempo y de dinero para la preparación.
- No es necesario poseer conocimientos o habilidades especiales para ser aplicadas.

- Crea independencia en las personas, debido a que las plantas son adquiridas a bajo costo y con recursos propios.
- Alta efectividad, comprobándose que han logrado resolver problemas de salud en las comunidades. ⁽²⁷⁾

5.3.3. Tipos de plantas medicinales

Las plantas medicinales pueden clasificarse según los principios activos en relación a las propiedades terapéuticas, las formas de preparación y características morfológicas que estas posean, entre las plantas medicinales más comunes se encuentran las siguientes: Acedera Silvestre (*Rumex acetosa*), Ajedrea de jardín (*satureja hortensis*), Albahaca (*ocimum bacilicum*), Alcaparra (*capparis spinsa*), Anís Dulce (*pimpinela anisum*), Artemisa (*artemisa vulgaris*), Berro de Jardín (*Lepidium sativum*), Berro de Agua (*nasturtium officinalis*), Borraja (*Borrago officinalis*), Mejorana (*Majorana hortensis*), Melisa (*Melissa officinalis*), Menta (*Mentha piperita*), Mostaza Blanca (*Sinapis alba*), Orégano (*Origanum vulgare*), Periflio (*Anthriscus cerefolium*), Poleo (*Mentha puleghium*), Comino (*Cuminum syminum*), Eneldo (*Enethum graveolens*), Estragón (*Artemisa dracunculus*), Genciana (*Gentiana lutea*), Hierba de los canónigos (*Valerianella locusta*), Hierba Buena (*Mentha piperita*), Hinojo de Florencia (*Foeniculum vulgare*), entre otras. ⁽²⁸⁾

5.3.4. Extracción de aceites esenciales

Se definen como extractos que poseen fragancias, volátiles, integrados por mezclas de líquidas halladas en cualquier parte de la planta. La extracción de aceites esenciales puede ser realizada por distintos procedimientos como lo son: ⁽²⁹⁾

- Enfleurage.** - en este procedimiento son utilizadas grasas naturales con puntos de reblandimiento de aproximadamente de 40 °C, por lo general es usada la manteca de porcino refinada, blanqueada, desodorizada. ⁽²⁹⁾

- b. Extracción por el uso de solventes.** - para iniciar el proceso la planta debe ser molida, picada, para que exista un mayor contacto entre el solvente y los trozos del material, es realizada a temperatura y presión ambiente. Entre los solventes más comúnmente utilizados se tiene: metanol, isopropano, hexano, tolueno, etanol, entre otros. ⁽²⁹⁾
- c. Extracción por el método del prensado.** - la planta se somete a presión, en prensa del tipo batch o de manera constante. ⁽²⁹⁾
- d. Extracción con fluidos supercríticos.** - se refiere al punto crítico cuando se relaciona las condiciones de presión y temperatura, en un vapor por medio de las cuales las sustancias no pueden ser licuadas por el aumento en la presión. ⁽²⁹⁾
- e. Hidrodestilación.** - para este procedimiento se coloca agua en el inferior del tanque extractor, colocando encima una rejilla para el soporte del producto extraído. ⁽²⁹⁾
- f. Extracción por arrastre con vapor.** - es un tipo de destilación en cual se utiliza la planta seca con el fin de obtener una mejor calidad de producto, además para mantener el principio aromático se utilizan calderas de acero inoxidable, cobre, alambique de hierro o vidrio. ⁽²⁹⁾

5.4. Hierba buena (*Mentha piperita*)

Las plantas del género *Mentha* pertenecen a la familia *Lamiaceae*, siendo ampliamente conocidas por la capacidad de producir un aceite esencial que se encuentra presente en las glándulas ubicadas bajo la epidermis de las hojas, sintetizando diversas esencias de acuerdo a cada especie, siendo la esencia de la *Mentha piperita* la más apreciada por producir aceites de mayor calidad. ⁽³⁰⁾

5.4.1. Etimología

Mentha es un nombre genérico que se deriva de la ninfa griega Mintha, que representa la enamorada de Zeus, a la cual la Diosa Perséfone, por celos, convirtió en planta. El sabor picante de la esencia de la planta es la que le otorga el nombre de origen latino piper, que significa pimienta.⁽³⁰⁾

5.4.2. Taxonomía

La clasificación botánica de esta planta se define de la siguiente manera⁽³⁰⁾:

- Reino: *Plantae*.
- Clado: *Angiosperme*.
- Clado: *Eudicotiledoni*.
- Clado: *Asteride*.
- Orden: *Lamiales*.
- Familia: *Lamiaceae*.
- Género: *Mentha*.
- Especies: *piperita*.⁽³⁰⁾

5.4.3. Descripción

La *Mentha piperita* se caracteriza por ser una planta herbácea perenne estolonífera de raíces rizomatosas que se desarrollan de manera intensa en el terreno, además, es un género de aspecto muy variable o polimorfo, de acuerdo a la especie.⁽³⁰⁾

- **Tallo:** De longitud que varía entre 30 cm y un metro, con innumerables ramas de sección cuadrangular y de coloración oscilante entre el verde y el violeta.⁽³⁰⁾
- **Hojas:** La mayor parte de las especies contienen glándulas ricas en aceites esenciales que le aportan el aroma que las caracteriza, son de forma simple, de

color verde que varía de intensidad, opuestas, lanceoladas y cubiertas por una pelusa ligera. ⁽³⁰⁾

- **Flores:** Estas poseen inflorescencia, integradas en la axila de las hojas y dispuestas en forma de corona sobre los nudos, semejantes a una espiga por la cercanía entre una y otra, de flores bilabiadas típicas de la familia a la que pertenecen. ⁽³⁰⁾

Además, toda la planta posee un aroma característico, agradable y fuerte de sabor canforáceo, el cual al inicio se percibe picante y posteriormente refrescante. ⁽³⁰⁾

5.4.4. Composición química

Las hojas contienen entre el 10% y 12% de elementos minerales como los flavonoides, especialmente los heterósidos derivados de la luteolina y apigenina, ácidos fenólicos, cafeico, clorogénico, ursólico, taninos y un principio amargo, hasta 3% de aceite esencial. ⁽³¹⁾

El aceite esencial de la *Mentha piperina* se observa como un líquido incoloro, con olor fuerte y sabor picante, que se encuentra en glándulas mínimas ubicadas en las superficies inferior y superior de las hojas, los tallos contienen aceite en menor proporción. El principal componente de la esencia es el mentol, que se halla en una proporción entre el 45% y el 70 %, parte de el en estado libre y parte combinado con ésteres, también se han identificado, mentona, acetato de metilo, mentofurano, alfa-pineno, felandreno, cadineno, ácido iso-valeriánico, iso-valerianato de mentilo, pulegona, timol, carvacrol, alcohol amílico, terpineno, alcohol iso-amílico, y cincol. ^(31,32)

Tabla 2. Componentes químicos (%) de los aceites esenciales destilados de *Mentha piperita*.

Compuesto	Índices de Retención	% en Aceite
α - Pineno	939	0,32
Sabinene	975	0,26
β - pineno	979	0,58
1,8 Cineole	1031	6,69
Cis - Sabineno hidrato	1070	0,50
Menthone	1152	2,45
Menthofuran	1164	11,18
Neomenthol	1165	2,79
Mentol	1171	53,28
Acetato de neomentilo	1273	0,65
Acetato de mentilo	1295	15,10
Acetato de isomentitilo	1305	0,61
β - Bourboneno	1388	0,37
(Z) -Carolileno	1408	2,06
E- β -farneseno	1456	0,30
Germacrene D	1485	2,01
Bicyclogermacrene	1500	0,22

Fuente: Saharkhiz et al. ⁽³²⁾

Autor: Karina Fernanda Flores Colcha

5.4.5. Propiedades

La infusión de hojas secas y la esencia de la *Mentha piperita* poseen propiedades antiespasmódicas, coleréticas, estomáquicas, carminativas, eupépticas, antifúngicas, antivirales. En uso externo, en forma de infusión, alcoholatura y jarabe, en los trastornos estomacales, espasmos digestivos y abdominales, así como contra insuficiencia biliar y el meteorismo. La esencia es empleada frecuentemente como aromatizante y saborizante, en farmacia, en alimentación y licorería, repostería y culinaria. En uso externo se aplica la esencia, en forma de disolución alcohólica o linimentos, en fricciones estimulantes, contra el reuma y las reumalgias, así como en inhalaciones

contra el resfriado y en laringología. La esencia generalmente es usada para perfumería y cosmética, en gargarismos, pasta dentífrica y elixires por la acción germicida y aromatizante. ⁽³³⁾

Otras propiedades del aceite de hierbabuena (*Mentha piperita*) es la de antibacteriano, antimicóticas, formación de antibióticos, radioprotector, antioedema, analgésico, y las actividades antioxidantes del aceite esencial y extractos metanólicos de partes de hierbas y cultivos de callos de *Mentha piperita*. Además, el aceite esencial de *Mentha piperita* ha demostrado que causa efectos inhibitorios contra el crecimiento de los hongos radiales. ⁽³²⁾

5.4.6. Uso en odontología

En la odontología la *Mentha piperita*, previene la formación de la placa bacteriana dental. En estudios realizados de manera in vitro, afectan algunos microorganismos como la *Candida albicans* y otras similares tales como *Escherichia coli*, *Micrococcus flavus* y *Staphylococcus aureus*, entre otros. De igual manera, posee un efecto antifúngico de mayor competencia en relación al bifonazol. ⁽³⁴⁾

5.4.7. Factores que limitan la producción de Hierba buena

La producción de la hierba buena se ve limitada por los siguientes factores: el clima, el suelo, el agua, las plagas y las enfermedades. ⁽³¹⁾

En el caso del clima, algunas especies se producen en ambientes fríos con temperaturas variables entre 10°C y 18°C, no obstante otras clases de hierba buena pueden darse en temperaturas entre 25°C y 35°C, con presencia de alta humedad o en áreas que se caracterizan por la sequedad del suelo. Respecto al suelo, aunque puede producirse en una gran diversidad de suelos, se obtiene mayor provecho en los de características ligeras del tipo areno-arcilloso, aluvión, francos y principalmente los calcáreos, ya que son fértiles, profundos y con buen drenaje. El agua es vital para la producción efectiva de la hierba buena, por lo tanto, es necesario que el cultivo tenga un buen sistema de

riego (requiere de presencia constante de agua), con una frecuencia semanal aproximadamente. Las principales plagas que afectan la producción de la hierba buena son: *Myzus persicae* provocando un pequeño enrollamiento en las hojas y es neutralizado de manera eficaz mediante pulverizaciones de Neem X. Por otra parte, está el *Epitrix sp*, representan gran peligro al iniciar la vegetación ocasionando perforaciones en las hojas. ⁽³¹⁾

5.3.8. Extracción del aceite esencial de *Mentha piperita*

Para la extracción del aceite esencial de *Mentha piperita* es necesario considerar el tratamiento de las sustancias bruta con el disolvente indicado, con el fin de solo disolver el constituyente deseado sin disolver las otras sustancias. El método para la extracción del aceite esencial más utilizado es: Extracción por arrastre de vapor. La extracción por arrastre de vapor es un método higiénico que garantiza la calidad del producto, obteniendo un aceite sin ningún tipo de solvente y de bajo costo de producción. ⁽⁷⁾

En la extracción por arrastre de vapor, el material vegetal se destila con vapor generado fuera del tanque en un generador de vapor o caldera. Como en agua y destilación de vapor, el material vegetal se apoya sobre una rejilla perforada. Como ya se ha indicado, el vapor de agua en una muestra está a la atmósfera y por lo tanto la temperatura máxima es de 100°C. Además, no hay ninguna limitación en la generación de vapor cuando se utiliza una caldera externa como fuente de vapor. El uso de vapor de alta presión en modernas unidades de destilación de vapor permite más rápida y completa destilación de aceites esenciales. La destilación al vapor se prefiere cuando una gran cantidad de área está bajo cultivo y se debe instalar más de una unidad. Además, para la destilación de aceites y materiales resistentes como raíces y maderas como sándalo, madera de cedro y nagarmotha, la destilación de vapor es más eficiente. La destilación de vapor también reduce el tiempo requerido para la extracción de aceites. Una carga de citronela de Java, que tarda hasta 5 h en una muestra, se procesa dentro de 2 a 3 h en un vapor Destilación todavía. En este método de destilación, el vapor se genera por separado en una caldera de vapor y se hace pasar a través del tanque de destilación a través de una bobina de vapor. El material vegetal está apretado sobre la rejilla

perforada. El vapor, que contiene el vapor de aceite, se condensa en un condensador de tubo y se separa en el receptor de aceite. Los costos de combustible son generalmente más bajos en las modernas unidades de destilación de vapor debido a una mayor eficiencia térmica en la que operan la mayoría de las calderas. ⁽³⁵⁾

- **Evaporación Rotatoria**

La evaporación rotatoria es el proceso de reducir el volumen de un disolvente distribuyéndolo como una película fina a través del interior de un recipiente a temperatura elevada y presión reducida. Esto favorece la eliminación rápida del exceso de disolvente de muestras menos volátiles. La mayoría de los evaporadores rotativos tienen cuatro componentes principales: baño de calor, rotor, condensador y purgador de disolventes. Además, es necesario unir un aspirador o una bomba de vacío, así como un colector y un matraz de fondo redondo que contenga la muestra a concentrar. ⁽³⁶⁾

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Tipo de investigación

6.1.1. Experimental

El estudio es considerado experimental, debido que el Investigador manipula las condiciones de la investigación, para determinar la actividad antifúngica, de aceite esencial y extracto alcohólico del *Mentha piperita* (Hierba buena), mediante un estudio microbiológico sobre cepas de *Candida albicans* ATCC 10231.

6.1.2. Comparativo

Porque permite contrastar los resultados del experimento del efecto antifúngico del aceite esencial y del extracto alcohólico del *Mentha piperita* (Hierba buena), sobre cepas de *Candida albicans* ATCC 10231.

6.1.3. In vitro

La técnica para realizar el experimento se realiza en un ambiente controlado fuera de un organismo vivo.

6.2. Tipo de muestreo

Candida albicans cepa ATCC 10231

6.3. Población del Estudio

6.3.1. Universo

El efecto antifúngico “in vitro” de aceite esencial y extracto alcohólico de *Mentha piperita*, “Hierba buena”, se valoró a través de la reacción que mostraron las cepas de *Candida albicans*, hongos oportunistas pertenecientes a la flora bucal normal.

6.3.2. Unidades de Estudio

Se empleó aceite esencial y extracto alcohólico de *Mentha piperita*, “Hierba buena” a las concentraciones de 12.500, 10.500, 8.500, 6.500, 4.500, 2.500 ppm, comparación y se trabajó con cepas de *Candida albicans* ATCC 10231.

6.4. Criterios de Inclusión y Exclusión

6.4.1. Criterios de Inclusión

- Cepas puras de *Candida albicans* sin contacto con contaminantes ni fármacos.
- Aceite esencial de *Mentha piperita*, “Hierba Buena” a las concentraciones de 12.500, 10.500, 8.500, 6.500, 4.500, 2.500 ppm.
- Extracto alcohólico de *Mentha piperita*, “Hierba Buena” a las concentraciones de 5000, 10000, 20000, 30000, 40000 y 50000 ppm.

6.4.2. Criterios de Exclusión

- Cepas de hongos no pertenecientes a *Candida albicans* ATCC 10231.

- Otro derivado del aceite esencial y extracto alcohólico de *Mentha piperita*, “Hierba buena”, a concentraciones diferentes que las planteadas en la investigación.

6.5. Variables

VARIABLE INDEPENDIENTES: Actividad antifúngica “*in vitro*” del aceite esencial y extracto alcohólico de la *Mentha piperita* “Hierba buena”.

Tabla 3. Operacionalización de las variables independientes

Conceptualización	Categoría – Dimensión	Indicador	Técnica	Instrumento
Es la capacidad antifúngica que tiene el aceite y el extracto alcohólico extraído de la <i>Mentha piperita</i> “Hierba buena” de evitar el crecimiento del hongo	Actividad antifúngica “ <i>in vitro</i> ”	Medición de halos inhibitorios (mm)	Observación	Bitácora de laboratorio y ficha de recolección de información
	Aceite de la <i>Mentha piperita</i> “Hierba buena”	Nada Poco Medio Alto		
	Extracto alcohólico de la <i>Mentha piperita</i> “Hierba buena”	Diluciones	Experimentación	

Fuente: Karina Fernanda Flores Colcha

Autor: Karina Fernanda Flores Colcha

VARIABLE DEPENDIENTE: *Candida albicans*

Tabla 4. Operacionalización de la variable dependiente

Conceptualización	Categoría – Dimensión	Indicador	Técnica	Instrumento
Es un hongo de característica filamentosa y se reproduce de manera asexual, forma levadura en condiciones normales al huésped	Hongo Produce Candidiasis oral, bucofaríngea	Nivel de crecimiento del hongo SI NO	Experimentación Observación	Bitácora de laboratorio

Fuente: Karina Fernanda Flores Colcha

Autor: Karina Fernanda Flores Colcha

6.6. Recursos

6.6.1. Recursos Ambientales

Apoyo en la preparación del extracto alcohólico de *Mentha piperita*, “Hierba Buena”.

6.6.2. Recursos Humanos

- Microbiólogo
- Odontólogos

6.7. Materiales

6.7.1. Materiales y equipos para extraer el extracto alcohólico

- Hierba Buena
- Balanza
- Botellas ámbar

- Refrigerador
- Alcohol de 70°
- Papel filtro
- Vaso de precipitado

6.7.2. Materiales y equipos para la preparación de medios de cultivo

- Medios de cultivo enriquecidos Agar
- Agua destilada
- Probetas
- Matraz de Erlenmeyer
- Placas Petri
- Pipetas Pasteur
- Tubos a prueba
- Guantes
- Hisopo
- Rotavapor marca Buchi

6.7.3. Materiales para la activación del Hongo

- Placas Petri
- Agar Sabouraud
- Caldo de cultivo
- Asa
- *Candida albicans* (cepa ATCC 10231)

6.7.4. Materiales para antibiograma

- 6 cajas Petri
- 8 tubos de ensayo
- 2 Matraces

- Hisopos
- Puntas
- Pipetas
- Agar Sabouraud
- Caldo de cultivo Sabouraud brot

6.8. Procedimientos y Técnicas

6.8.1. Obtención del extracto alcohólico de *Mentha piperita* “Hierba Buena”

La planta en estudio, *Mentha piperita* “Hierba Buena”, se recolecto en la provincia Chimborazo, cantón Riobamba – Ecuador. Se trasladado a las instalaciones de del Laboratorio de Biología Molecular–Genética Investigación en la Universidad Nacional de Chimborazo.

Se retiraron las hojas de la hierba buena y fueron pesadas en una balanza la cantidad de 5 kg, secando a la sombra durante 3 semanas y pulverizando las hojas en un molino de mano, colocándola luego en un frasco de vidrio de color ámbar, agregando 1 L de alcohol de 96°, dejándole macerar por 15 días en un lugar oscuro, de acuerdo a la metodología aplicada por Quirós et al. ⁽³⁷⁾.

Fue filtrado 3 veces, primero con papel filtro Whatmann N ° 41, utilizando una bomba de vacío para agilizar el filtrado, obteniéndose extracto purificado libre de gérmenes, y se llevó a una máquina térmica de agua, a baño María se calentó 60 °C durante 3 horas hasta que el alcohol se evapore por completo, quedando solo el extracto alcohólico de *Mentha piperita* “Hierba buena”. Luego fue colocado en un frasco de vidrio, de color ámbar para la conservación.

Figura 1. Proceso de Filtrado



Fuente: Karina Fernanda Flores Colcha
Autor: Karina Fernanda Flores Colcha

Figura 2. Proceso de calentamiento en Baño de María



Fuente: Karina Fernanda Flores Colcha
Autor: Karina Fernanda Flores Colcha

6.8.2. Obtención de aceite esencial de *Mentha piperita* “Hierba Buena”

Empleando el método de arrastre por corriente de vapor, se utilizaron 10 kg de hierba buena sin deshidratar. La hoja se introduce en un recipiente de gran capacidad, según el peso de la materia prima a utilizar, haciéndole pasar vapor de agua proveniente de una caldera, calentado hasta el punto de evaporación de cada uno de los componentes del aceite esencial. Este aceite es arrastrado por el vapor de agua a través del refrigerante que, al enfriarse con el agua a temperatura ambiental, permite recolectarlo en una trampa de vidrio donde se deposita el aceite extraído, y se recolectara en un frasco ámbar.

Figura 3. Método de arrastre por corriente de vapor



Fuente: Karina Fernanda Flores Colcha
Autor: Karina Fernanda Flores Colcha

6.8.3. Cepa Bacteriana

La cepa de *Cándida albicans* ATCC 10231 fue adquirida en el laboratorio de la UNACH, que se encontraba en refrigeración en un tubo eppendorf, mediante un asa se inoculó las cajas Petri las cuales fueron incubadas a 37 °C por 24 horas, logrando de esta manera que el hongo crezca y se pueda formar colonias.

Figura 4. Muestra de *Candida albicans*



Fuente: Karina Fernanda Flores Colcha
Autor: Karina Fernanda Flores Colcha

6.8.4. Obtención de muestra de *Candida albicans* en un medio líquido

Para la preparación se colocó 10 ml suero fisiológico en un tubo de ensayo, con el asa se raspa la superficie del medio de cultivo de la *Candida albicans* y se colocó en otro tubo y se llevó a un vortex, para que sea una mezcla homogénea. En otro tubo de ensayo se colocó 10 ml de agua y se utilizó 5 μ l de leche de magnesia y se ubicó en el vórtex, y se comparó la turbidez entre los 2 tubos hasta que haya una igualdad, según la escala de Mc. Farland y fue llevado a la incubadora por 24 horas a 37 °C.

Figura 5. Se retiró la superficie *Candida albicans* para colocarlo en un tubo esterilizado



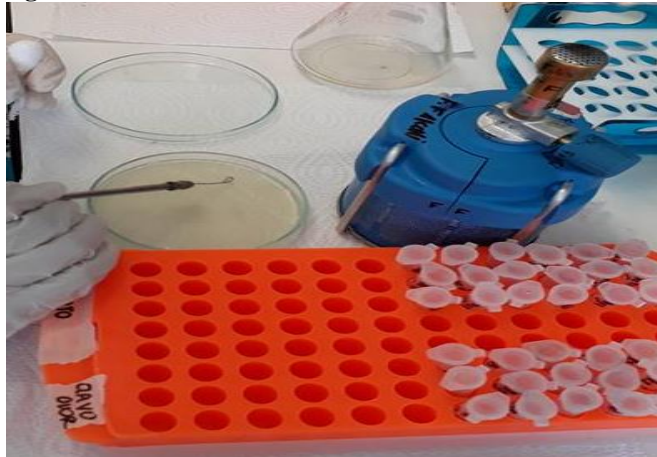
Fuente: Karina Fernanda Flores Colcha
Autor: Karina Fernanda Flores Colcha

Figura 6. Vortex para que sea una mezcla homogénea



Fuente: Karina Fernanda Flores Colcha
Autor: Karina Fernanda Flores Colcha

Figura 7. Inoculación de la *Candida albicans* en la Placa Petri



Fuente: Karina Fernanda Flores Colcha
Autor: Karina Fernanda Flores Colcha

Figura 8. Incubadora 37 °C por 24 horas

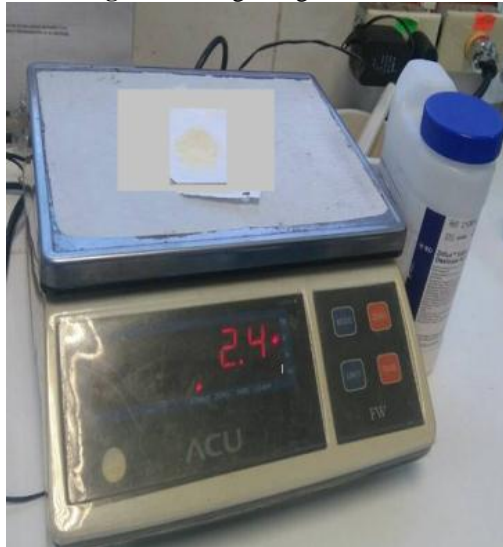


Fuente: Karina Fernanda Flores Colcha
Autor: Karina Fernanda Flores Colcha

6.8.5. Preparación medios de cultivo

El medio de cultivo agar Dextrosa Sabouraud fue preparado según las instrucciones del fabricante en este caso fue 2,7 gramos para 500 ml de agua, la preparación se realizó en un Matraz Erlenmeyer que fue llevada a la estufa hasta obtener una mezcla homogénea que posteriormente fue llevado al proceso de esterilización. Luego de este proceso el preparado fue distribuido de manera equilibrada en las “18” placas Petri, a razón de un espesor de 4 mm por placa aproximadamente.

Figura 9. 2,4 g de agar Saboraud



Fuente: Karina Fernanda Flores Colcha
Autor: Karina Fernanda Flores Colcha

Figura 10. 500 ml Agua + 2,4 agar



Fuente: Karina Fernanda Flores Colcha
Autor: Karina Fernanda Flores Colcha

Figura 11. Hervir para una mezcla homogénea



Fuente: Karina Fernanda Flores Colcha
Autor: Karina Fernanda Flores Colcha

Figura 12. Llevar al esterilizador



Fuente: Karina Fernanda Flores Colcha
Autor: Karina Fernanda Flores Colcha

Figura 13. Preparación medios de cultivo



Fuente: Karina Fernanda Flores Colcha
Autor: Karina Fernanda Flores Colcha

6.8.6. Siembra

La siembra fue realizada a través de la técnica de barrido con la ayuda de un hisopo. En forma horizontal rotando la caja Petri en 3 direcciones. Para así obtener una siembra uniforme.

Figura 14. Proceso de Siembra



Fuente: Karina Fernanda Flores Colcha
Autor: Karina Fernanda Flores Colcha

- **Técnica de susceptibilidad en el caldo de difusión**

Tabla 5. Concentraciones del aceite esencial de *Mentha piperita* (hierba buena) en DMSO y caldo Saboroud both

N° Tratamiento	Volumen µl + Solvente DMSO	MIX (DMSO + Ac)
T 1	300 µl Ac + 300 µl DMSO	600 ppm mix (DMSO + Ac)
T 2	250 µl Ac + 250 µl DMSO	500 ppm mix (DMSO + Ac)
T 3	200 µl Ac + 200 µl DMSO	400 ppm mix (DMSO + Ac)
T 4	150 µl Ac + 150 µl DMSO	300 ppm mix (DMSO + Ac)
T 5	100 µl Ac + 100 µl DMSO	200 ppm mix (DMSO + Ac)
T 6	75 µl Ac + 75 µl DMSO	150 ppm mix (DMSO + Ac)

Fuente: Karina Fernanda Flores Colcha
Autor: Ing. Félix Falconí

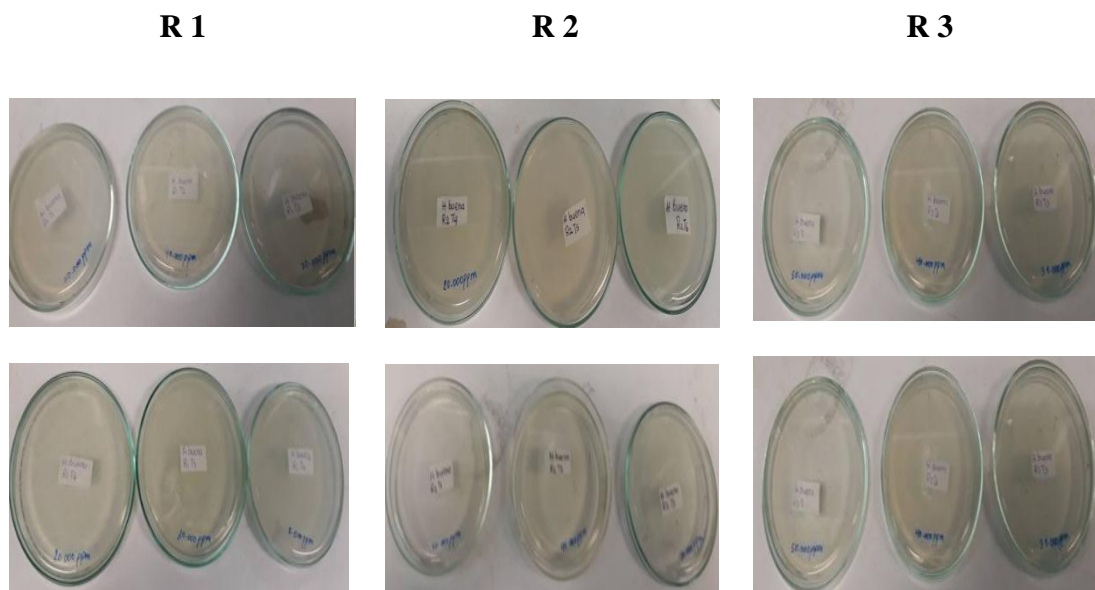
Tabla 6. Preparación del MIX + Caldo saboraund + *Cándida albicans*

Tratamiento	Mix + Cs+ Ca	Ppm
T 1	100mix+900 cs+10 C.a ppm	5.000 ppm
T 2	80mix + 920 cs +10 C.a ppm	10.000 ppm
T 3	60mix + 940 cs+10 C.a ppm	20.000 ppm
T 4	40mix + 960 cs+10 C.a ppm	30.000 ppm
T 5	20mix + 980 cs+10 C.a ppm	40.000 ppm
T 6	10mix + 990 cs+10 C.a ppm	50.000 ppm

Fuente: Karina Fernanda Flores Colcha
Autor: Ing. Félix Falconí

Se procede a poner con una pipeta 100 µl del mix + C. Saboraand + *C. Albicans* en las cajas Petri y se coloca en la incubadora por 24 hrs a 37 °C.

Figura 15. Resultados de la Placas Petri en la Incubadora



Fuente: Karina Fernanda Flores Colcha

Autor: Karina Fernanda Flores Colcha

6.8.7. Difusión de Discos

Se realizó una dilución del aceite esencial de hierba buena con DMSO (Dimetilsulfoxido) en los discos y colocando en las 6 cajas Petri de agar saboraund, previamente inoculadas con *Candida albicans* 10 ml.

- **Preparación del fluconazol para el control positivo.**

1. Pesar 100 mg de fluconazol = 0,1000 g.
2. Añadir 900 µl alcohol.
3. Poner en el vortex para que haya una mezcla homogénea.
4. Colocar 25 µl de la solución de fluconazol con alcohol.
5. Dejar secar al ambiente.

Figura 16. Preparación del fluconazol para el control positivo y negativo



Fuente: Karina Fernanda Flores Colcha
Autor: Karina Fernanda Flores Colcha

- **Preparación medios de cultivo**

El medio de cultivo agar Sabouraud Dextrosa con chloramphenicol fue preparado según las instrucciones del fabricante en este caso fue 22 gramos de agar para 300 ml de agua, la preparación se realizó en un Matraz Erlenmeyer que fue llevado a la estufa hasta obtener una mezcla homogénea, que posteriormente se llevó al proceso de esterilización. Luego de este proceso el preparado fue distribuido de manera equilibrada en las 6 placas Petri y 2 adicional para el control positivo y negativo, a razón de un espesor de 4 mm por placa aproximadamente en cada caja Petri.

Colocando en el esterilizador los tubos eppendorf, agua destilada, discos de papel filtro, puntas, asa, tubos de ensayo, hisopos.

Con la ayuda de la micropipeta se extrajeron “10 μ l” de la *Cándida albicans* cuyo contenido se depositó en las respectivas placas con agar gelificado, 3 cajas para los discos embebidos del extracto alcohólico y el aceite de “Hierba buena” y en la caja de control positivo.

Figura 17. Medio de cultivo agar Sabouraud chloramphenicol + AGUA



Fuente: Karina Fernanda Flores Colcha
Autor: Karina Fernanda Flores Colcha

Figura 18. Medio de cultivo y cajas en el esterilizador



Fuente: Karina Fernanda Flores Colcha
Autor: Karina Fernanda Flores Colcha

Figura 19. Placas con agar Saboraud



Fuente: Karina Fernanda Flores Colcha
Autor: Karina Fernanda Flores Colcha

6.8.8. Aceite de Hierba Buena

Tabla 7. Cálculos de la preparación de los discos con aceite de Hierba Buena

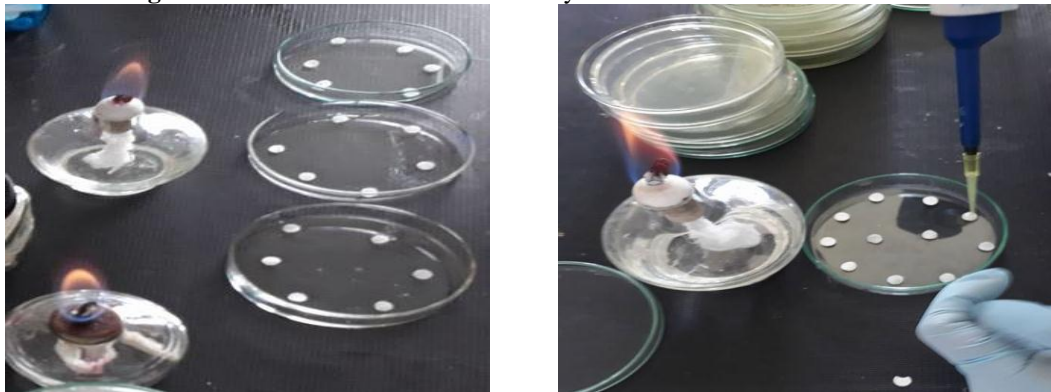
Formula	Operación	Resultados
$C1 \times V1$ $= C2 \times V2$	$\frac{12.500 \text{ ppm} \times 100 \mu\text{l}}{12.500 \mu\text{l}} = 100 \mu\text{l}$	R= 0 μl DMSO y 100 μl de aceite Hb
$C1 \times V1$ $= C2 \times V2$	$\frac{10.500 \text{ ppm} \times 100 \mu\text{l}}{12.500 \mu\text{l}} = 84 \mu\text{l}$	R= 16 μl DMSO y 84 μl de aceite Hb
$C1 \times V1$ $= C2 \times V2$	$\frac{8.500 \text{ ppm} \times 100 \mu\text{l}}{12.500 \mu\text{l}} = 68 \mu\text{l}$	R= 32 μl DMSO y 68 μl de aceite Hb
$C1 \times V1$ $= C2 \times V2$	$\frac{6.500 \text{ ppm} \times 100 \mu\text{l}}{12.500 \mu\text{l}} = 52 \mu\text{l}$	R= 48 μl DMSO y 52 μl de aceite Hb
$C1 \times V1$ $= C2 \times V2$	$\frac{4.500 \text{ ppm} \times 100 \mu\text{l}}{12.500 \mu\text{l}} = 36 \mu\text{l}$	R= 74 μl DMSO y 36 μl de aceite Hb
$C1 \times V1$ $= C2 \times V2$	$\frac{2.500 \text{ ppm} \times 100 \mu\text{l}}{12.500 \mu\text{l}} = 20 \mu\text{l}$	R= 80 μl DMSO y 20 μl de aceite Hb

Fuente: Karina Fernanda Flores Colcha
Autor: Ing. Felix Falconí

- **Método para la aplicación de los discos a las placas inoculadas**

Con la ayuda de pinzas estériles se procedió a colocar en cada placa los respectivos discos (6 discos por placa) embebidos cada uno con 25 μ l del aceite hierba buena en concentraciones de (12500, 10500, 8500, 6500, 4500, 2500 ppm).

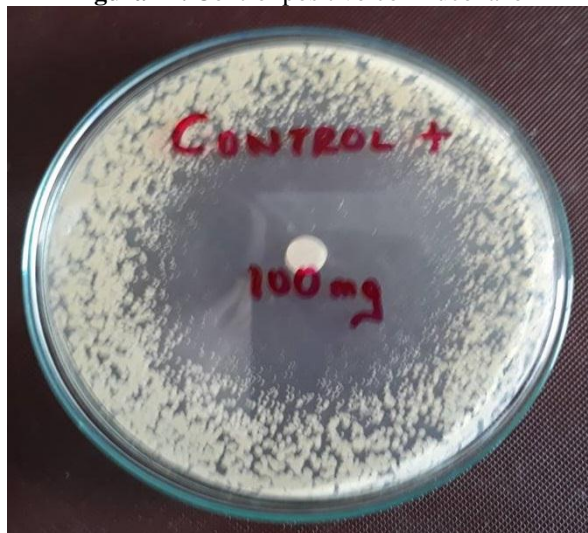
Figura 20. Discos embebidos con aceite y extracto alcohólico Hierba buena



Fuente: Karina Fernanda Flores Colcha
Autor: Karina Fernanda Flores Colcha

Para el control positivo se colocará un disco blank impregnado con un antimicótico fluconazol 100mg el cual servirá para la experimentación.

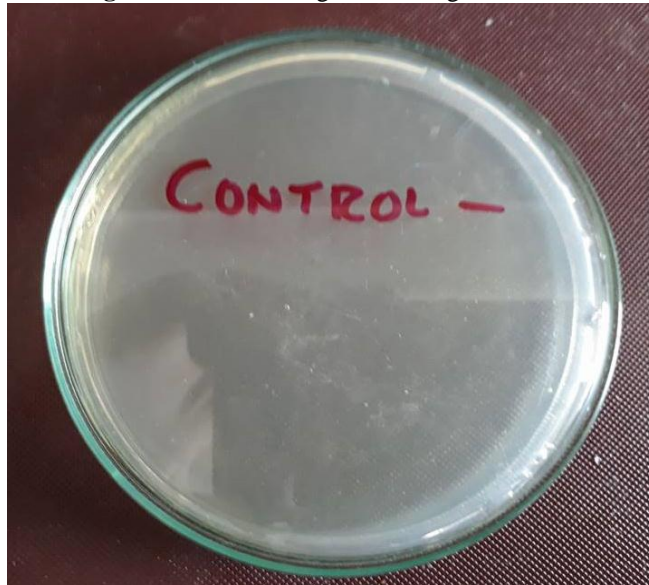
Figura 21. Control positivo con fluconazol



Fuente: Karina Fernanda Flores Colcha
Autor: Karina Fernanda Flores Colcha

Para el control negativo solo se colocará agar.

Figura 22. Control negativo con agua destilada



Fuente: Karina Fernanda Flores Colcha
Autor: Karina Fernanda Flores Colcha

Una vez terminado la colocación de los discos en las cajas Petri se procedió a poner en la incubadora en el lapso de 48 hrs a una temperatura 37 °C para su posterior lectura.

Figura 23. Resultados difusión de los discos del aceite de Hierba Buena



Fuente: Karina Fernanda Flores Colcha
Autor: Karina Fernanda Flores Colcha

6.8.9. Extracto alcohólico de Hierba Buena

Tabla 8. Extracto alcohólico de Hierba Buena

Tratamiento	Ea+ Alcohol	Ppm
T 1(ppm)	50 ul Ea +950ul alcohol	50.000 ppm
T 2(ppm)	40 ul Ea + 960ul alcohol	40.000 ppm
T 3(ppm)	30ul Ea + 970 cs alcohol	30.000 ppm
T 4(ppm)	20ul Ea + 980 cs alcohol	20.000 ppm
T 5(ppm)	10ul Ea + 990 cs alcohol	10.000 ppm
T 6(ppm)	5 ul Ea + 995 cs alcohol	5.000 ppm

Fuente: Karina Fernanda Flores Colcha

Autor: Ing Felix Falconí

El extracto alcohólico de hierba buena se puso en las proporciones de 50.000 ppm, 40.000, 30.000 ppm, 20.000 ppm, 10.000 ppm, 5.000 ppm, las cuales fueron ubicadas en los discos blank, y se colocó en las cajas Petri previamente inoculadas con 0,10 ul de *Candida albicans*.

Figura 24. Resultados del extracto alcohólico de Hierba Buena



Fuente: Karina Fernanda Flores Colcha

Autor: Karina Fernanda Flores Colcha

Figura 25. Control positivo y negativo del extracto alcohólico de Hierba buena.



Fuente: Karina Fernanda Flores Colcha
Autor: Karina Fernanda Flores Colcha

7. RESULTADOS

7.1. Susceptibilidad en el caldo de difusión con el aceite esencial de *Mentha piperita* y *Candida albicans*.

Tabla 9. Nivel de crecimiento

Concentración (ppm)	Nivel Crecimiento R1	
	Ninguno	Crecimiento Alto
5000,00	-	+
10000,00	-	+
20000,00	+	-
30000,00	+	-
40000,00	+	-
50000,00	+	-

Fuente: Datos procesados en SPSS

Autor: Karina Fernanda Flores Colcha

Descripción: La concentración de 5000 y 10000 ppm del aceite esencial de *Mentha piperita* mostraron un nivel de crecimiento alto del microorganismo *Candida albicans*. En cambio desde 20000 hasta 50000 ppm del aceite esencial de *Mentha piperita* no exhibió ningún crecimiento de la *Candida albicans*, en la primera repetición durante el procedimiento de la susceptibilidad en el caldo de difusión.

Análisis e interpretación: Al comparar el nivel de crecimiento de la *Candida albicans* en el caldo compuesto por el aceite esencial de *Mentha piperita*, se evidencia que a menor concentración del aceite existe crecimiento del microorganismo.

7.2. Resultados del halo de inhibición del aceite esencial de *Mentha piperita* sobre la *Candida albicans*

Tabla 10. Nivel Halo R1 del aceite esencial de *Mentha piperita* sobre la *Candida albicans*

Concentración (ppm)	Nivel Halo R1	
	Ninguno	Crecimiento Alto
2500	+	-
4500	+	-
6500	-	+
8500	-	+
10500	-	+
12500	-	+

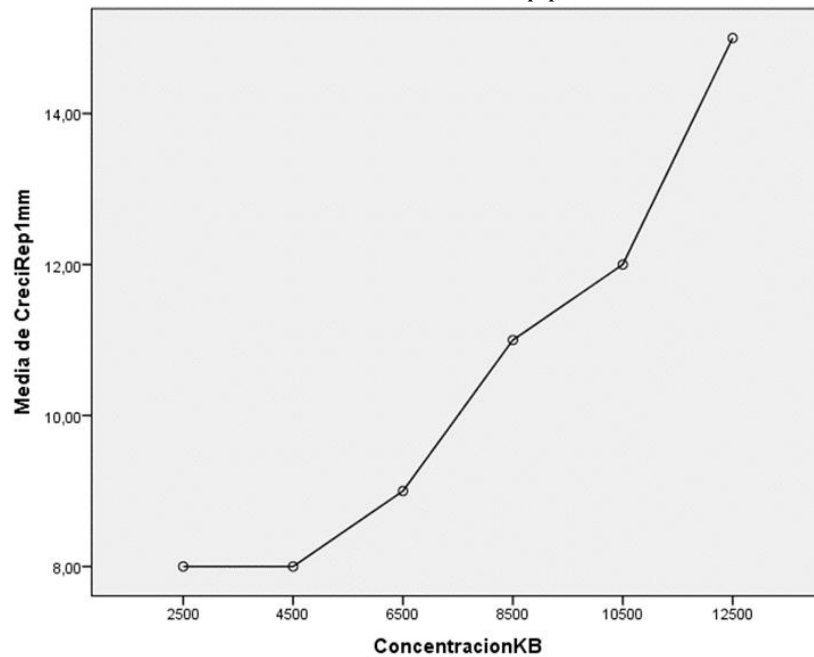
Fuente: Datos procesados en SPSS

Autor: Karina Fernanda Flores Colcha

Descripción: En la primera repetición se demuestra que desde la concentración de 2500 y 4500 ppm del aceite esencial de *Mentha piperita* no se evidenció ninguna acción antifúngica del producto natural sobre el microorganismo *Candida albicans*. Mientras que desde 6500 hasta 12500 ppm del aceite esencial de *Mentha piperita* exhibió un crecimiento alto del halo.

Análisis e interpretación: Con los resultados se evidencia que a mayores concentraciones, mayor es el crecimiento del halo de inhibición, por lo tanto se deduce una mayor efecto antifúngico al aumentar las concentraciones desde 6500 hasta 12500 ppm de aceite esencial de *Mentha piperita*.

Gráfico 1. Nivel Halo R1 del aceite esencial de *Mentha piperita* sobre la *Candida albicans*



Fuente: Datos procesados en SPSS

Autor: Karina Fernanda Flores Colcha

Descripción: En el gráfico 1 se demuestra que a las concentraciones de 2500 y 4500 ppm del aceite esencial de *Mentha piperita*, el halo de inhibición fue de 8 mm, a las 6500 ppm aumenta hasta el halo a 9 mm, a la proporción de 8500 ppm el halo es de 11 mm, a 10500 ppm del producto natural el halo de inhibición es de 12 mm, por último a la concentración de 12500 ppm el halo fue de 15 mm.

Análisis e interpretación: Se evidencia que a las concentraciones de 2500 y 4500 ppm de aceite esencial de *Mentha piperita* muestra un efecto antifúngico sobre la *Candida albicans* constante (8 mm). Luego a mayores concentraciones, mayor es el crecimiento del halo de inhibición, por tal razón mayor acción antifúngico sobre la Cepa de *Candida albicans* ATCC 10231 al aumentar las concentraciones desde 6500 hasta 12500 ppm de aceite esencial de *Mentha piperita*.

Tabla 11. Nivel Halo R2 del aceite esencial de *Mentha piperita* sobre la *Candida albicans*

Concentración (ppm)	Nivel Halo R2	
	Ninguno	Crecimiento Alto
2500	-	+
4500	+	-
6500	-	+
8500	-	+
10500	-	+
12500	-	+

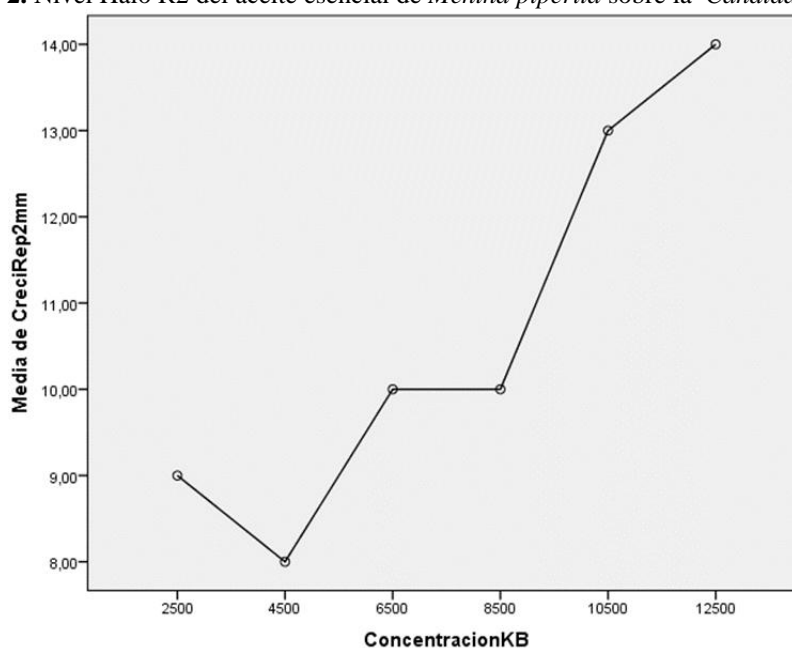
Fuente: Datos procesados en SPSS

Autor: Karina Fernanda Flores Colcha

Descripción: En la segunda repetición se evidencia que en la concentración de 2500 ppm del aceite esencial de *Mentha piperita* se mostró crecimiento del halo de inhibición, en cambio en 4500 ppm no presentó ninguna acción antifúngica del producto natural sobre el microorganismo *Candida albicans*. Mientras que desde 6500 hasta 12500 ppm del aceite esencial de *Mentha piperita* exhibió un alto crecimiento del halo.

Análisis e interpretación: De acuerdo a los resultados se evidencia que a mayores concentraciones, aumenta el crecimiento del halo de inhibición, es por esto que se establece que un mayor efecto antifúngico al incrementa las concentraciones desde 6500 hasta 12500 ppm de aceite esencial de *Mentha piperita*.

Gráfico 2. Nivel Halo R2 del aceite esencial de *Mentha piperita* sobre la *Candida albicans*



Fuente: Datos procesados en SPSS

Autor: Karina Fernanda Flores Colcha

Descripción: En el gráfico se muestra que en la concentración de 2500 ppm del aceite esencial de *Mentha piperita* presentó un halo de inhibición sobre el microorganismo *Candida albicans* de 9 mm, a 4500 ppm exhibió una disminución a 8 mm, luego fue aumentando el halo de inhibición a 6500 ppm a 10 mm y se mantuvo constante el halo hasta la concentración de 8500 ppm. A 10500 ppm del producto natural sobre el microorganismo *Candida albicans* se evidenció un aumento del halo hasta 13 mm y a 12500 ppm el halo fue de 14 mm.

Análisis e interpretación: Al comparar los halos de inhibición de las diferentes concentraciones del aceite esencial de *Mentha piperita*, se demuestra que a mayores concentraciones de 6500 ppm, existe un aumento del efecto antifúngico del producto natural sobre la *Candida albicans*, mejorando la acción antifúngica del aceite esencial de *Mentha piperita*.

Tabla 12. Nivel Halo R3 del aceite esencial de *Mentha piperita* en la *Candida albicans*

Concentración (ppm)	Nivel Halo R3	
	Ninguno	Crecimiento Alto
2500	+	-
4500	-	+
6500	-	+
8500	-	+
10500	-	+
12500	-	+

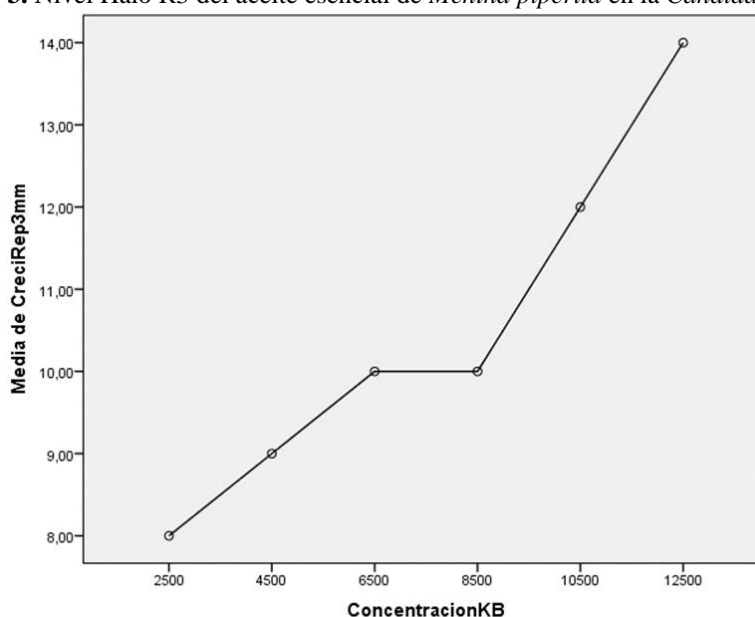
Fuente: Datos procesados en SPSS

Autor: Karina Fernanda Flores Colcha

Descripción: En la tercera repetición se observa que en la concentración de 2500 ppm del aceite esencial de *Mentha piperita* no fue posible identificar crecimiento del halo de inhibición, en cambio desde la proporción de 4500 hasta 12500 ppm exhibió un alto crecimiento del halo sobre la cepa de *Candida albicans*

Análisis e interpretación: De acuerdo a los resultados se evidencia que a mayores concentraciones, aumenta el crecimiento del halo de inhibición, es por esto que se establece que un mayor efecto antifúngico al incrementa las concentraciones desde 4500 hasta 12500 ppm de aceite esencial de *Mentha piperita*.

Gráfico 3. Nivel Halo R3 del aceite esencial de *Mentha piperita* en la *Candida albicans*



Fuente: Datos procesados en SPSS

Autor: Karina Fernanda Flores Colcha

Descripción: En el gráfico 3 se observa que en la concentración de 2500 ppm del aceite esencial de *Mentha piperita* presentó un halo de inhibición sobre la *Candida albicans* de 8 mm, a 4500 ppm exhibió un aumento a 9 mm, luego fue aumentando el halo de inhibición a 6500 ppm a 10 mm y se mantuvo constante el halo hasta la concentración de 8500 ppm. A 10500 ppm del producto natural sobre el microorganismo *Candida albicans* se evidenció un aumento del halo hasta 12 mm y a 12500 ppm el halo fue de 14 mm.

Análisis e interpretación: Al contrastar los halos de inhibición de las diferentes concentraciones del aceite esencial de *Mentha piperita*, se evidencia que a mayores concentraciones, presentó un aumento del efecto antifúngico del producto natural sobre la *Candida albicans*.

Tabla 13. Medias y desviación del halo de inhibición del aceite esencial de *Mentha piperita* en la *Candida albicans*

Concentración KB (ppm)	Repet1 (mm)	Repet2 (mm)	Repet3 (mm)	Media (mm)	Desv. Estand
2500	8	9	8	8,33	0,58
4500	8	8	9	8,33	0,58
6500	9	10	10	9,67	0,58
8500	11	10	10	10,33	0,58
10500	12	13	12	12,33	0,58
12500	15	14	14	14,33	0,58

Fuente: Datos procesados en SPSS

Autor: Karina Fernanda Flores Colcha

Descripción: Con las repeticiones se determinó una media y desviación estándar para cada una de las concentraciones del aceite esencial de *Mentha piperita*, donde la media del halo de inhibición a 2500 y 4500 ppm del producto natural sobre la *Candida albicans* fue de $8,33 \pm 0,58$ mm, luego aumentó a $9,67 \pm 0,58$ mm a la concentración de 6500 ppm. A 8500 ppm reportó una media del halo de $10,33 \pm 0,58$ mm, a 10500 ppm fue de $12,33 \pm 0,58$ mm y a 12500 ppm se identificó una media del halo de inhibición de $14,33 \pm 0,58$ mm.

Análisis e interpretación: Comparando las medias del halo de inhibición de las diferentes concentraciones del aceite esencial de *Mentha piperita* sobre la *Candida albicans*, se evidencia que se mantiene constante el efecto antifúngico en las primeras

concentraciones (2500 y 4500 ppm), luego aumento la acción antifúngica del producto natural sobre la *Candida albicans*, presentando una mejor eficiencia del aceite esencial de *Mentha piperita*.

Tabla 14. Actividad de los aceites esenciales según Duraffourd

Actividad de los aceites esenciales:
Nula (-) si fue inferior o es igual a 8 mm
Sensibilidad límite (Sensible = +) de 9 a 14 mm
Sensibilidad media (muy sensible = ++) de 15 a 19 mm
Sumamente sensible (S.S. = +++) si fue igual o superior a 20 mm

Elaboración: Duraffourd y Lapraz 1983

Tabla 15. Comportamiento del halo de inhibición del aceite esencial de *Mentha piperita* en la *Candida albicans* según la escala de Duraffourd

Concentración (ppm)	Repet1	Repet2	Repet3	Media
2500	-	+	-	-
4500	-	-	+	-
6500	+	+	+	+
8500	+	+	+	+
10500	-	+	+	+
12500	++	+	+	+

Fuente: Datos procesados en SPSS

Autor: Karina Fernanda Flores Colcha

Descripción: Con las repeticiones, las medias y desviación estándar del halo de inhibición de cada una de las concentraciones del aceite esencial de *Mentha piperita*, se utilizó la escala de aceites esenciales según Duraffourd y se identificó que a la concentración de 2500 y 4500 ppm la actividad del aceite esencial es nula (-). Mientras que a partir de 6500 hasta 12500 ppm presenta una sensibilidad límite (+) de la acción del producto natural sobre la *Candida albicans*.

Análisis e interpretación: Considerando las medias del halo de inhibición de las diferentes concentraciones del aceite esencial de *Mentha piperita* sobre la *Candida albicans* y la escala de aceites esenciales según Duraffourd, se demostró que a mayor concentración existe un efecto antifúngico de sensibilidad límite del aceite esencial de *Mentha piperita*, ante la presencia de la cepa de *Candida albicans*.

Tabla 16. Tabla comparativa entre el control positivo, negativo y los diferentes tratamiento

Descripción	Control negativo (H ₂ O + DMSO)	Control positivo (Fluconazol 150 mg)	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Halo de inhibición (mm)	0	60	8,33	8,33	9,67	10,33	12,33	14,53
Actividad según Duraffourd	-	+++	-	-	+	+	+	+

Fuente: Datos procesados en SPSS
Autor: Karina Fernanda Flores Colcha

Descripción: Mediante la técnica Kirby Bauer (difusión del disco) se determinó que el control negativo (H₂O + DMSO) presentó un halo de inhibición de 0 mm y una actividad según Duraffourd nula, mientras el control positivo (Fluconazol 150 mg) el diámetro de inhibición fue de 60 mm y una actividad sumamente sensible (+++). En cuanto a los tratamientos T1 (2500 ppm) y T2 (4500 ppm) exhibieron una media del halo de inhibición de 8,33, considerado un crecimiento nulo según Duraffourd, T3 (6500 ppm) la media del halo fue de 9,67 mm, T4 (8500 ppm) fue de 10,33 mm, T5 (10500 ppm) fue de 12,33 mm y el T6 presentó un diámetro del halo fue de 14,53 mm, los tratamientos desde T3 hasta T6 presenta una sensibilidad límite (+) de la acción del producto natural sobre la *Candida albicans*.

Interpretación: Con los resultados de la media de halo de inhibición de los seis tratamientos y se compara con el diámetro del halo del control positivo y negativo, se evidencia que a partir del T3 presentó mayor actividad antifúngica fue de sensibilidad límite (+) en contraste con el control negativo que fue nula el crecimiento del halo de inhibición, sin embargo al comparar con el control positivo ninguno de los tratamientos demostró una actividad sumamente sensible (+++), como fue determinado con el fluconazol 150 mg.

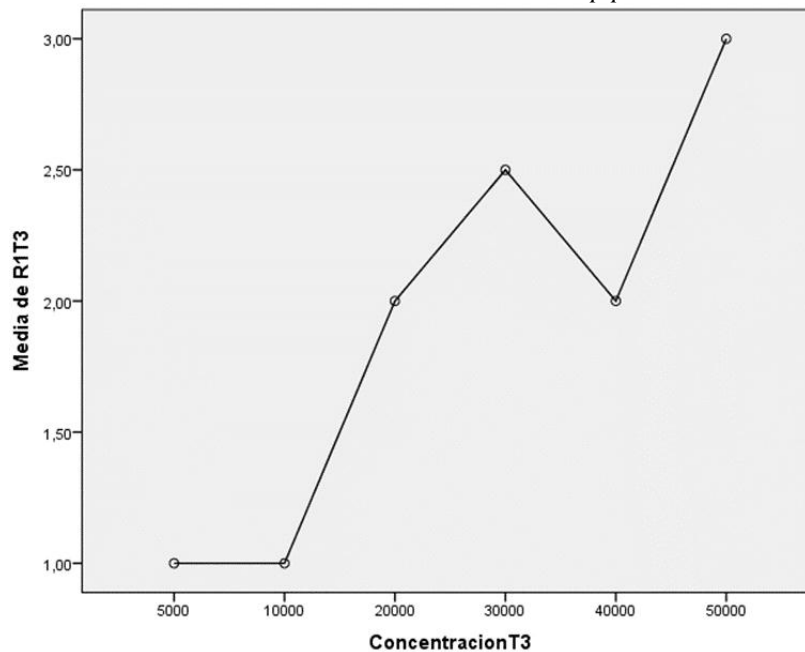
7.3. Resultados del halo de inhibición del extracto alcohólico de *Mentha piperita* sobre la *Candida albicans*

Tabla 17. Halo de inhibición R1 del extracto alcohólico de *Mentha piperita* sobre la *Candida albicans*

Concentración (ppm)	Halo de inhibición R1 (mm)			
	1	2	2,5	3
5000	+	-	-	-
10000	+	-	-	-
20000	-	+	-	-
30000	-	-	+	-
40000	-	+	-	-
50000	-	-	-	+

Fuente: Datos procesados en SPSS
Autor: Karina Fernanda Flores Colcha

Gráfico 4. Halo de inhibición R1 del extracto alcohólico de *Mentha piperita* sobre la *Candida albicans*



Fuente: Datos procesados en SPSS
Autor: Karina Fernanda Flores Colcha

Descripción: Con los resultados de la primera repetición, se identifican los halos de inhibición del extracto alcohólico de la *Mentha piperita* sobre la *Candida albicans*, evidenciando para una concentración de 5000 y 10000 ppm una longitud del diámetro del halo constante de 1 mm, luego aumenta a la proporción de 20000 ppm con 2 mm, a 30000 ppm mide 2,5 mm, posteriormente disminuye el halo a 2 mm y vuelve a

aumentar el diámetro del halo a 3 mm a 50000 ppm del extracto alcohólico de la *Mentha piperita*.

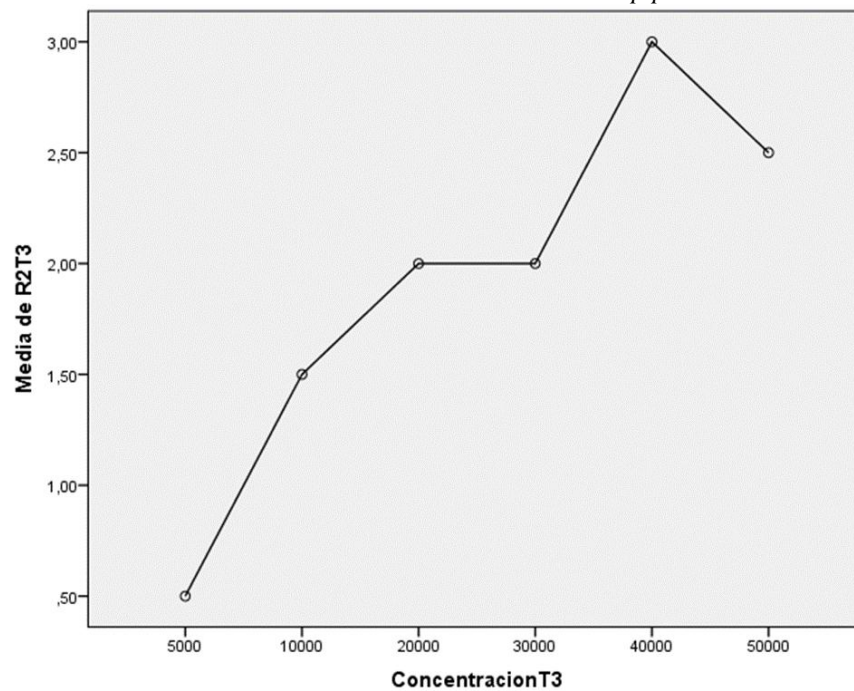
Análisis e interpretación: Evaluando el comportamiento del halo de inhibición del extracto alcohólico de la *Mentha piperita* sobre la *Candida albicans* se demuestra una tendencia irregular, donde los valores del diámetro del halo no superan los 3 mm, considerando una baja acción antifúngica en contraste con el aceite de la *Mentha piperita*.

Tabla 18. Halo de inhibición R2 del extracto alcohólico de *Mentha piperita* en la *Candida albicans*

Concentración (ppm)	Halo de inhibición R2 (mm)				
	,50	1,50	2,00	2,50	3,00
5000	+	-	-	-	-
10000	-	+	-	-	-
20000	-	-	+	-	-
30000	-	-	+	-	-
40000	-	-	-	-	+
50000	-	-	-	+	-

Fuente: Datos procesados en SPSS
Autor: Karina Fernanda Flores Colcha

Gráfico 5. Halo de inhibición R2 del extracto alcohólico de *Mentha piperita* en la *Candida albicans*



Fuente: Datos procesados en SPSS
Autor: Karina Fernanda Flores Colcha

Descripción: En cuanto a lo reportado en la segunda repetición, se evidencia que el diámetro del halo de inhibición de la concentración de 5000 ppm extracto alcohólico de la *Mentha piperita* sobre la *Candida albicans* fue de 0,5 mm, a 10000 ppm la longitud del halo fue de 1,50 mm, a 20000 y 30000 ppm el diámetro del halo se mantuvo constante a 2 mm, aumentando el halo a 3 mm en la concentración de 40000 ppm y luego disminuyó el halo hasta 2,50 mm a 50000 ppm del extracto alcohólico de la *Mentha piperita*.

Análisis e interpretación: Comparando los diámetros de los halos de inhibición del extracto alcohólico de la *Mentha piperita* sobre la *Candida albicans* se evidencia una tendencia de aumento del efecto antifúngico al elevar las concentraciones del producto natural hasta 40000 ppm, luego el comportamiento del halo disminuye a la 50000 ppm.

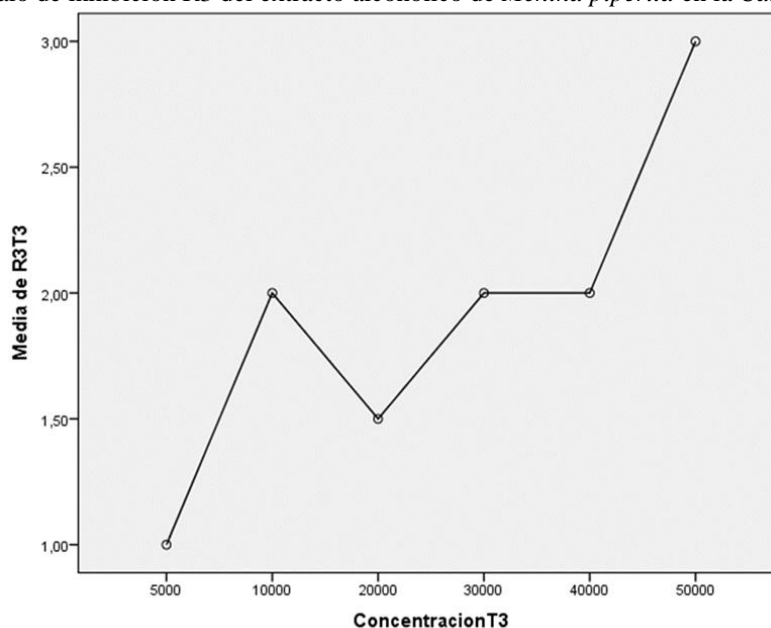
Tabla 19. Halo de inhibición R3 del extracto alcohólico de *Mentha piperita* en la *Candida albicans*

Concentración (ppm)	Halo de inhibición R3 (mm)			
	1,00	1,50	2,00	3,00
5000	+	-	-	-
10000	-	-	+	-
20000	-	+	-	-
30000	-	-	+	-
40000	-	-	+	-
50000	-	-	-	+

Fuente: Datos procesados en SPSS

Autor: Karina Fernanda Flores Colcha

Gráfico 6. Halo de inhibición R3 del extracto alcohólico de *Mentha piperita* en la *Candida albicans*



Fuente: Datos procesados en SPSS
Autor: Karina Fernanda Flores Colcha

Descripción: En la tercera repetición se demuestra que el diámetro del halo de inhibición de la concentración de 5000 ppm es de 1 mm, a 10000 ppm aumenta la longitud del halo hasta 2 mm, luego disminuye a 1,5 mm a la concentración de 20000 ppm del extracto alcohólico de la *Mentha piperita*. Mientras que a 30000 y 40000 ppm se mantiene constante la longitud del halo a 2 mm y a 50000 ppm alcanza el diámetro de 3 mm.

Análisis e interpretación: Contrastando la longitud de los halos de inhibición del extracto alcohólico de la *Mentha piperita* sobre la *Candida albicans* se observa una tendencia no definida, reportando el mayor valor del efecto antifúngico del producto natural a 50000 ppm.

Tabla 20. Media y desviación estándar del halo de inhibición del extracto alcohólico de *Mentha piperita* en la *Candida albicans*

Concentración (ppm)	R1 (mm)	R2 (mm)	R3 (mm)	Media (mm)	Desv. Estand
5000	1	0,5	1	0,83	0,29
10000	1	1,5	2	1,50	0,50
20000	2	2	1,5	1,83	0,29
30000	2,5	2	2	2,17	0,29
40000	2	3	2	2,33	0,58
50000	3	2,5	3	2,83	0,29

Fuente: Datos procesados en SPSS
Autor: Karina Fernanda Flores Colcha

Descripción: Para una concentración de 5000 ppm del extracto alcohólico de la *Mentha piperita* sobre la *Candida albicans*, se presentó una media del diámetro del halo de inhibición de $0,83 \pm 0,29$ mm, a 10000 ppm el promedio fue de $1,50 \pm 0,50$ mm, en cuanto a 20000 ppm la media reportada fue de $1,83 \pm 0,29$ mm, a 30000 ppm fue de $2,17 \pm 0,29$ mm, en el caso de 40000 ppm la media de la longitud del halo fue de $2,33 \pm 0,58$ mm y a 50000 ppm de $2,83 \pm 0,29$ mm.

Análisis e interpretación: Al comparar la longitud del diámetro del halo de inhibición de las diferentes concentraciones utilizadas en el estudio se evidencia que a mayor concentración de extracto alcohólico de la *Mentha piperita* sobre la *Candida albicans* mejor es el efecto antifúngico. No obstante, al contrastar con el comportamiento del aceite de la *Mentha piperita* se identifica que la acción antifúngica del extracto alcohólico sobre la *Candida albicans* es menor que del aceite esencial de la hierba buena.

Tabla 21. Comparación de las medias del halo de inhibición de los tratamientos con el control positivo y negativo

Descripción	Control negativo (H ₂ O + DMSO)	Control positivo (Fluconazol 150 mg)	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Halo de inhibición (mm)	0	60	0,83	1,50	1,83	2,17	2,33	2,83

Fuente: Datos procesados en SPSS
Autor: Karina Fernanda Flores Colcha

Descripción: El control negativo tuvo un halo de inhibición de 0 mm, en cambio con el control positivo el halo de inhibición fue de 60 mm, los tratamientos presentaron un diámetro del halo que no superó los 3 mm.

Interpretación: Al comparar el efecto antifúngico que produjo el control negativo con los tratamientos se evidencia que si existió crecimiento del halo de inhibición, sin embargo al contratarlos con el fluconazol 150 mg, los tratamientos no superaron la actividad antifúngica del control positivo.

Resultados estadísticos del programa Anova

El estudio requiere comparar la actividad anti fúngica “In vitro”, de aceite esencial y extracto alcohólico del *Mentha piperita* (Hierba buena), mediante un estudio microbiológico sobre cepas de *Candida albicans* ATCC 10231.

En base al objetivo planteado en la investigación se analizará si los valores de crecimiento del halo de inhibición tanto del aceite esencial como del extracto alcohólico es significativo respecto a la actividad antifúngica. mediante la escala de crecimiento.

Variable 1 (Cuantitativa) Dependiente: Valores de Crecimiento del Halo de Inhibición (CrecRepmm)

Variable 2 (Cualitativa) Factor: Escala de Crecimiento

Consideraciones:

- **Significación:** si es menor de 0,05 es que las dos variables están relacionadas y por tanto que hay diferencias significativas entre los grupos

- **Valor de F:** cuanto más alto sea F, más están relacionadas las variables, lo que significa que las medias de la variable dependiente difieren o varían mucho entre los grupos de la variable independiente.

Hipótesis 1.

H0: No existe una relación entre los valores del halo de inhibición del aceite esencial del *Mentha piperita* (Hierba buena) y la escala de crecimiento.

Hi: Existe una relación entre los valores del halo de inhibición del aceite esencial del *Mentha piperita* (Hierba buena) y la escala de crecimiento.

Criterio de Decisión:

Si $p < 0,05$ existe una relación entre los valores del halo de inhibición y la escala de crecimiento; por lo que se rechaza H0.

8. DISCUSIÓN

La presente investigación se fundamentó en determinar y comparar la actividad antifúngica “In vitro”, de aceite esencial y extracto alcohólico del *Mentha piperita* (Hierba buena), mediante un estudio microbiológico sobre cepas de *Candida albicans* ATCC 10231, evidenciando que el efecto antifúngico del aceite esencial del *Mentha piperita* fue mayor que del extracto alcohólico, donde las concentraciones del aceite natural desde 6500 hasta 12500 ppm fueron aumentando la media del diámetro del halo de inhibición, manteniendo en una Sensibilidad límite según la escala de Duraffourd. No obstante, las longitudes del halo de inhibición de las diferentes concentraciones de los extractos alcohólicos no superaron el valor de 3 mm.

Tyagi & Malik ⁽³⁸⁾, realizaron un estudio sobre las actividades antimicóticas en fase líquida y en fase de vapor de aceites esenciales (*Cymbopogon citratus*, *Mentha piperita* y *Eucalyptus globulus*) seleccionados contra *Candida albicans*. Utilizaron el método de dilución de caldo y dilución de placa de agar, para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima fungicida (MFC). Evidenciando que los aceites esenciales mostraron una inhibición del crecimiento dependiente de la concentración, el segundo aceite que presentó mejor efecto antifúngico sobre el crecimiento de *Candida albicans* fue el de *Mentha piperita*, a las concentraciones de 20 µL el diámetro del halo de inhibición fue de 18 mm, a 40 µL el halo fue de 32 mm hasta los 60 µL que exhibió la mayor zona de inhibición con 54 mm. La eficacia antimicrobiana relativa de los vapores de aceites esenciales (medida como zona de inhibición) también mostró la misma tendencia que en el ensayo en fase líquida (es decir, aceite esencial de *Cymbopogon citratus* < aceite esencial de *Mentha piperita* < *Eucalyptus globulus*), al igual que la CMI IM siguió la siguiente tendencia: *Cymbopogon citratus* (100 mg /L) < *Mentha piperita* (200 mg/L) *Eucalyptus globulus* < (500 m/L). También aduce que la actividad antifúngica registrada por el aceite esencial de la *Mentha piperita* se debe a la composición química, en el caso de la *Mentha piperita* es el mentol (35-55% del contenido), en menor proporción estereoisómeros (neomentol, isomentol), mentona y ésteres del mentol, estos compuestos conducen a

alteraciones superficiales y deformidades importantes también reducen la capacidad de los hongos para adherirse y, en consecuencia, reducen su virulencia e infecciosidad. Por tanto, en el presente estudio la concentración de *Mentha piperita* que exhibió el mayor crecimiento del halo inhibitorio fue a 12500 ppm con la media del diámetro de $14,33 \pm 0,58$ mm y a medida que se aumentaba las ppm del aceite esencial mayor es el efecto antifúngico con respecto a la *Candida albicans*.

Sobre esto Duarte et al. ⁽³⁹⁾, investigaron sobre los aceites esenciales y los extractos etanólicos de las hojas y/o raíces de 35 plantas medicinales de uso común en Brasil que seleccionaron para determinar la actividad antifúngica de la *Candida albicans*, para lo cual usaron la prueba de concentración inhibitoria mínima (MIC). Demostrando que el extracto etanólico (alcohólico) de la *Mentha piperita* no mostró efecto inhibitorio, es decir el extracto de etanol no fue efectivo en ninguna de las concentraciones probadas (MIC mayor a 2,0 mg/mL como la concentración más alta y sin efecto inhibitorio). En cambio, los aceites esenciales de 13 plantas mostraron acción antifúngica sobre la *Candida albicans*, incluyendo *Aloysia triphylla*, *Anthemis nobilis*, *Cymbopogon martini*, *Cymbopogon winterianus*, *Cyperus articulatus*, *Cyperus rotundus*, *Lippia alba*, *Mentha arvensis*, *Mikania glomerata*, *Mentha piperita*, *Mentha spicata*, *Stachys byzantina*, y *Solidago chilensis*. Además, identificaron mediante los análisis químicos la presencia de compuestos con actividad antimicrobiana conocida, incluidos 1,8-cineol, geranio, germacreno-d, limoneno, linalool y mentol. Este comportamiento fue similar a lo estudiado en la presente investigación, la actividad antifúngica del extracto alcohólico fue relativamente baja en todas las concentraciones (a la mayor concentración que fue de 50000 ppm la media de la longitud del halo no superó los 3 mm ($2,83 \pm 0,29$ mm)). En cambio, con el aceite esencial desde la concentración de 6500 hasta 12500 ppm presentaron un crecimiento del halo de inhibición dentro de la Sensibilidad límite según la escala de Duraffourd. Esto demuestra que el proceso de extracción alcohólica no es la mejor técnica para extracción del producto natural derivado de la *Mentha piperita*.

Además, Peredo-Luna et al. ⁽⁴⁰⁾, mencionan que en el proceso de extracción alcohólico se pierde algunas propiedades que se mantiene durante la extracción del aceite esencial (método de arrastre por corriente de vapor), específicamente se conserva la composición de la resina, pigmentos y ceras.

Marivi ⁽³⁴⁾, realizaron un estudio donde determinaron el efecto antibacteriano y antifúngico in vitro del aceite esencial de: *Menta piperita* a las concentraciones del 50% y 100%, *Origanum vulgare* y *Cymbopogon citratus*, utilizando el método de difusión en agar con disco sobre tres microorganismos, entre el que incluía la *Cándida albicans* ATCC 90028. Reportando un halo de inhibición de $39,46 \pm 0,42$ mm a la concentración del 100% y al 50% el diámetro del halo fue de $12,82 \pm 0,66$ mm. Expresan que la efectividad antifúngica y antibacteriana depende de la composición de estos diferentes aceites esenciales, tales como los grupos alcoholes (linalol), fenólicos (timol y carvacrol) y cetonas (mentona). Estos resultados concuerdan con la presente investigación, donde a mayor concentración (12500 ppm) mejor efecto antifúngico tiene el aceite esencial de la *Menta piperita*.

Saharkhiz et al. ⁽³²⁾, investigaron sobre la composición química, antimicóticos y antibiograma del aceite esencial de *Mentha piperita* y la inhibición de la formación de biopelículas producida por la *Candida albicans* y *Candida dubliniensis*. Las concentraciones inhibitorias mínimas del aceite esencial de *Mentha piperita* contra las especies estándar y clínicas de los hongos se determinaron mediante el método de microdilución en caldo según lo recomendado por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). El aceite de *Mentha piperita* exhibió fuertes actividades antifúngicas contra los hongos examinados en concentraciones que van desde 0,12 a 8,0 μ L/ mL. Además, inhibió la formación de biopelícula de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* a concentraciones de hasta 2 μ L/mL. Teniendo en cuenta la amplia gama de actividades antifúngicas del aceite extracto de *Mentha piperita* examinado, podría utilizarse potencialmente en el tratamiento de infecciones fúngicas o en la extensión de la vida útil de los productos alimenticios.

9. CONCLUSIONES

- La media del halo de inhibición sobre cepas de *Candida albicans* a las concentraciones de 2500 y 4500 permanecieron constantes ($8,33 \pm 0,58$ mm) y a partir de 6500 hasta 12500 ppm aumentó la acción antifúngica ($9,67 \pm 0,58$ mm hasta $14,33 \pm 0,58$ mm) y de acuerdo a la escala de aceites esenciales según Duraffourd, se determinó que la concentración de 2500 y 4500 ppm de aceite esencial de *Mentha piperita*, la actividad del aceite esencial es nula (-). En cambio, a partir de 6500 hasta 12500 ppm presenta una sensibilidad límite (+) de la acción del producto natural sobre la *Candida albicans*.
- Se determinó que el efecto extracto alcohólico de la *Mentha piperita* “Hierba buena” a las diferentes concentraciones (50.000, 40.000, 30.000, 20.000, 10.000, 5.000 ppm), sobre cepas de *Candida albicans*, presento una actividad nula.
- Al comparar la actividad antifúngica derivada del extracto alcohólico y el aceite esencial de la *Mentha piperita*, sobre cepas de *Candida albicans*, se demostró que el efecto antifúngico del aceite de la *Mentha piperita* es mejor a partir de las concentraciones de 12.500 a 6.500 ppm a diferencia del extracto alcohólico que no presento una significancia en halos de inhibición reportado

10. RECOMENDACIONES

- Se recomienda utilizar el proceso de extracción del aceite esencial de la *Mentha piperita* (método de arrastre por corriente de vapor), así como analizar los componentes empleados para el proceso de extracción del extracto alcohólico en otras investigaciones realizadas.
- Realizar otros estudios aumentando las concentraciones del extracto del aceite esencial y diferentes partes de la *Mentha piperita*, para identificar el efecto antibacteriano y antifúngico del mismo.
- Se recomienda mezclar el extracto del aceite esencial de *Mentha piperita* a la concentración de 12500 ppm con otros productos para verificar la acción antifúngica y antibacteriana.
- Sería de mucha utilidad para las comparaciones de los diferentes métodos de extracción de productos naturales y concentraciones el usar el procedimiento de la concentración mínima inhibidora, conjuntamente con el halo de inhibición.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Rajkowska K, Otlewska A, Kunicka-Styczyńska A, Krajewska A. Candida albicans Impairments Induced by Peppermint and Clove Oils at Sub-Inhibitory Concentrations. *Int J Mol Sci*. 2017 may; 18(6): p. 2-11.
2. Palombo E. Traditional Medicinal Plant Extracts and Natural Products with Activity against Oral Bacteria: Potential Application in the Prevention and Treatment of Oral Diseases. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2011 jan; 1(1): p. 1-15.
3. Concia E, Azzini A, Conti M. Las Infecciones Invasivas por Candida se Asocian con una Elevada Mortalidad. *Drugs*. 2009; 69(1): p. 5-14.
4. Cornisteina W, Mora A, Orellana N, Capparelli F, Castillo M. Candida: epidemiología y factores de riesgo para especies no albicans. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2013; 31(6): p. 380-384.
5. Copprende Ecuador. Candida albicans. Copprende Ecuador. 2013 julio;(10): p. 1-4.
6. Oficina Comercial del Ecuador en Nueva York-EEUU. Perfil de aceites esenciales en Estados Unidos. [Online].; 2011 [cited 2017 Julio 05. Available from: http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2015/02/PROECU_PPM2011_ACEITES-ESENCIALES_ESTADOS-UNIDOS.pdf.
7. Del Valle H, Zambrano J. Extracción de aceites esenciales de plantas autóctonas menta (*Mentha piperita* L.) Palo Santo (*Bursera Graveolens*), Hierba Luisa (*Cimbopongón Citratus*) de la provincia de Manabí, con potenciales de industrialización. Tesis de Grado. Portoviejo: Universidad Técnica de Manabí, Facultad de Ciencias Matemáticas Físicas y Químicas; 2015.
8. Al-Judaibi A, Al-Yousef F. Antifungal effect of ethanol plant extract on candida SP. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*. 2014 marzo; 9(3): p. 277-283.
9. Herman A, Mlynarczyk. Essential oils and plant extracts with activity against oral microorganisms: Prevention and treatment of oral diseases. *Israel Journal of Plant*

- Sciences. 2014 may; 13(29): p. 1-8.
10. Tampieri M, Galuppi R, Carelle M, Falcioni L, Cioni P, Morelli I. The inhibition of *Candida albicans* by selected essential oils and their major components. *Mycopathologia*. 2005 april; 159(3): p. 339-345.
 11. Samber N, Varma A, Manzoor N. Evaluation of *Mentha piperita* Essential Oil and its Major Constituents for Antifungal Activity in *Candida* spp. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*. 2014 february; 3(2): p. 9404-9411.
 12. Zapata J, Fernández G. Micropropagación de plantas de *Mentha piperita* y evaluación de sus constituyentes volátiles. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 2009; 2(1): p. 16-22.
 13. Moghtader M. In vitro antifungal effects of the essential oil of *Mentha piperita* L. and its comparison with synthetic menthol on *Aspergillus niger*. *African Journal of Plant Science*. 2013 November; 7(11): p. 521-527.
 14. Arenas R. *Micología Médica Ilustrada*. 5th ed. México: McGraw Hill; 2014.
 15. Bohórquez L, Cardona N. Diagnóstico diferencial de las micosis superficiales con enfermedades dermatológicas. *CES Medicina*. 2010 enero-junio; 24(1): p. 37-52.
 16. Sánchez L, Galarza C, Matos R. Infecciones micóticas subcutáneas. *Dermatología Peruana*. 2009 noviembre; 19(4): p. 362-387.
 17. Magaña M, Magaña M. *Dermatología*. 2nd ed. México: Editorial Médica Panamericana; 2012.
 18. Estrada G, Márquez M, Díaz J, Sánchez O. Candidiasis bucal en pacientes con tratamiento antineoplásico. *MEDISAN*. 2015 septiembre; 19(9): p. 1080-1087.
 19. Otero E, Peñamaría M, Rodríguez M, Martín B, Blanco A. Candidiasis oral en el paciente mayor. *Avances en Odontostomatología*. 2015 mayo-junio; 31(3): p. 135-148.
 20. Aguirre J. Candidiasis Orales. *Rev Iberoam Micol*. 2002 enero; 19(1): p. 17-21.
 21. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. *Candida albicans*. [Online].; 2012 [cited 2017 noviembre 29. Available from: <http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas%20de%20agentes%20b>

iologicos/Fichas/Hongos/Candida%20albicans.pdf.

22. Vieira C. Candidiasis bucal. *Propdental*. 2013 Enero;(15): p. 1-31.
23. Rodríguez J, Miranda J, Morejón H, Santana J. Candidiasis de la mucosa bucal. Revisión bibliográfica. *Revista Cubana de Estomatología*. 2002; 39(2): p. 1-16.
24. Laforet L. Estudio de Pga 26, una proteína implicada en la arquitectura de la pared celular de *Candida albicans*. Tesis Doctoral. Valencia: Universitat de Valencia, Facultad de Farmacia; 2009.
25. García C, Carratalá J. Patogenia de la infección fúngica invasora. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2012 marzo; 30(3).
26. Escalona L, Tase A, Estrada A, Almaguer M. Uso tradicional de plantas medicinales por el adulto mayor en la comunidad serrana de Corralillo Arriba. Guisa, Granma. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 2015 octubre-diciembre; 20(4): p. 429-439.
27. Cosme I. El Uso de las Plantas Medicinales. *Revista Intercultural*. 2008 enero; 1(1): p. 23-26.
28. Fretes F. Plantas Medicinales y Aromáticas una alternativa comercial de producción comercial. [Online].; 2010 [cited 2017 julio 11. Available from: https://www.usaid.gov/sites/default/files/documents/1862/plantas_medicinales.pdf.
29. Paredes D, Quinatoa F. Desarrollo de un sistema de extracción de aceites esenciales. Tesis de Grado. Riobamaba: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Escuela de Ingeniería Mecánica; 2010.
30. Elicrisio. Las Plantas Aromáticas. *Revista sobre el entorno y la naturaleza*. 2010; 1(1): p. 1-8.
31. Torres P. Respuesta a la Hierba Buena (*Mentha piperita* L.) a dos distnacias de siembra y a la aplicación edafica de dos abonos orgánicos mas compuestos minerales a tres dosis. Tumbaco, Pichincha. Tesis de Grado. Quito: Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Agrícolas; 2013.
32. Saharkhiz M, Motamedi M, Zomorodian K, Pakshir K, Miri R, Hemyari K. Chemical Composition, Antifungal and Antibiofilm Activities of the Essential Oil of *Mentha Piperita* L. *ISRN Pharmaceutics*. 2012 November; 1(1): p. 1-6.

33. Olguin S. Propiedades medicinales de la Hierbabuena. PPC Plantas para curar. 2016 agosto;(13): p. 1-4.
34. Mariví G. Efecto antibacteriano y antifúngico del aceite esencial de: menta piperita, origanum vulgare y cymbopogon citratus sobre streptococcus mutans ATCC 25175, Lactobacillus acidophilus ATCC 10746 y Cándida albicans ATCC 90028. Tesis de Grado. Lima: Universidad Privada Nobert Wiener, Facultad de Ciencias de la Salud; 2012.
35. INTERNATIONAL CENTRE FOR SCIENCE AND HIGH TECHNOLOGY. Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. [Online].; 2008 [cited 2017 julio 11. Available from: https://www.morningmystbotanics.com/wp-content/uploads/Extraction_technologies_for_medicinal_and_aromatic_plants.pdf.
36. Chemistry. Rotary Evaporation. [Online].; 2014 [cited 2017 julio 11. Available from: https://chem.libretexts.org/Core/Analytical_Chemistry/Lab_Techniques/Rotary_Evaporation.
37. Quirós A, Albertin A, Blázquez M. Elabore sus propios abonos, insecticidas y repelentes orgánicos San Pedro de Montes de Oca: Avina; 2004.
38. Tyagi A, Malik A. Liquid and vapour-phase antifungal activities of selected essential oils against Candida albicans: microscopic observations and chemical characterization of Cymbopogon citratus. BMC Complementary and Alternative Medicine. 2010 noviembre; 10(65): p. 1-11.
39. Duarte M, Figueira G, Sartoratto A, Rehder V, Delarmelina C. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology. 2005 febrero; 97(2): p. 305-311.
40. Peredo H, Palou E, López A. Aceites esenciales: métodos de extracción. Temas Selectos de ingeniería de Alimentos. 2009; 3(1): p. 24-32.