



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**ACTIVIDAD SINÉRGICA ANTIMICÓTICA DEL ACEITE ESENCIAL DE  
*Clinopodium pulchellum* (Kunth) Goavaert “PANIZARA” Y FLUCONAZOL  
FRENTE A *Candida albicans* ATCC 10231, *IN VITRO***

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO  
FARMACÉUTICO**

**AUTORES**

**BACH. COLLAZOS LEÓN JONE ALEX**

<https://orcid.org/0000-0002-0857-8005>

**BACH. ROQUE ANDRADE OLINDA MILY**

<https://orcid.org/0000-0003-0513-1854>

**ASESOR**

**Mg. BRAVO ARAUJO, GLORIA TULA**

<https://orcid.org/0000-0002-8133-3370>

**LIMA – PERÚ**

**2021**



## **DEDICATORIA**

### A mi madre y familia.

Esta tesis la dedico a mi madre que estuvo siempre a mi lado brindándome su mano amiga, dándome a cada instante una palabra de aliento para llegar a culminar mi profesión, también agradezco a mi familia quienes se han convertido en los pilares fundamentales para mi formación profesional, quienes con sus consejos y ayuda me dieron impulso para salir adelante.

**BACH. OLINDA MILY ROQUE ANDRADE**

### A mi familia.

Esta tesis la dedico a mis padres e hijos que están siempre a mi lado brindándome su mano amiga dándome a cada instante una palabra de aliento para llegar a culminar mi profesión.

**BACH. JONE ALEX COLLAZOS LEÓN**

## **AGRADECIMIENTO**

Agradecemos a DIOS, ser divino por darme la vida y guiar mis pasos día a día.

A la Mg. Sc. Bravo Araujo, Gloria Tula, por su paciencia, guía y orientación en los momentos difíciles de la realización de la tesis y brindarnos un poco de su conocimiento.

## Índice General

	<b>Páginas</b>
<b>Resumen</b>	viii
<b>Abstract</b>	ix
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>II. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	10
2.1 Enfoque y diseño de la investigación	10
2.2 Población, muestra y muestreo	10
2.3 Variables de investigación	11
2.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos	11
2.5 Proceso de recolección de datos	11
2.6 Métodos de análisis estadístico	14
<b>III. RESULTADOS</b>	15
<b>IV. DISCUSIÓN</b>	12
4.1 Discusión de resultados	
4.2 Conclusiones	
4.3 Recomendaciones	
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	14
<b>ANEXOS</b>	17

## Índice de Tablas

Tabla 1. Redimiendo del aceite esencial	15
Tabla 2. Ensayo de miscibilidad del aceite esencial	15
Tabla 3. Densidad relativa del aceite esencial	16
Tabla 4. Actividad anti <i>Candida albicans</i> del aceite esencial	17
<b>Tabla 5.</b> Estadística descriptiva de la actividad antifúngica del aceite esencial de las hojas de <i>Clinopodium pulchellum</i> (Kunth) Goavaert “panizara” frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.	<b>20</b>
<b>Tabla 6.</b> Prueba de Normalidad de los halos de inhibición del aceite esencial de las hojas de <i>Clinopodium pulchellum</i> (Kunth) Goavaert “panizara” frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 .	<b>21</b>
<b>Tabla 7.</b> Prueba de Homogeneidad de varianzas del aceite esencial de las hojas de <i>Clinopodium pulchellum</i> (Kunth) Goavaert “panizara”	<b>22</b>
<b>Tabla 8.</b> Prueba de ANOVA de los halos obtenidos frente a la cepa de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 .	<b>22</b>
<b>Tabla 9.</b> Comparaciones múltiples de los halos de inhibición de la cepa de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231, Prueba de HSD TUKEY.	<b>23</b>
<b>Tabla 10.</b> Prueba de subconjuntos de Tukey para <i>E. coli</i> ATCC 8739	<b>24</b>

## Índice de Figuras

Figura 1. Halos de inhibición promedio de los grupos experimentales frente a la cepa de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.	18
---	----

## Índice de Anexos

<b>Anexo A.</b> Operacionalización de la variable	40
<b>Anexo B.</b> Instrumento de recolección de datos	41
<b>Anexo C.</b> Clasificación taxonómica	42
<b>Anexo D.</b> Certificado de análisis del aceite esencial de panizara frente <i>A Candida albicans</i>	43
<b>Anexo E.</b> Evidencias fotográficas del trabajo de campo	44
<b>ANEXO F:</b> Matriz de consistencia	45



## RESUMEN

**Objetivo:** Determinar la actividad sinérgica antimicótica del aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Goavaert “panizara” y fluconazol frente a *Candida albicans* ATCC 10231, *in vitro*.

**Métodos:** La investigación es de tipo experimental. El aceite esencial se obtuvo mediante destilación por arrastre de vapor de agua, al cual se realizaron las pruebas de miscibilidad mediante el método de translucidez y determinación de densidad por picnometría. Para la evaluación de la actividad antifúngica se empleó el método de difusión en agar frente a la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231.

**Resultado:** El aceite esencial de las hojas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Goavaert “panizara” presenta miscibilidad en solventes orgánicos, tales como n-hexano, cloroformo, metanol y una densidad de  $0,963 \pm 0,006$  g/mL. Respecto a la actividad antifúngica se determinaron los halos de inhibición promedio de 12.843 mm, 12.985 mm, 16.368 mm, 10.59 mm y 17.03 mm para el aceite a concentraciones de 50%, 75, 100%, fluconazol al 0.2 mg/mL y la solución de aceite esencial 100% y fluconazol al 0.2mg/mL; respectivamente.

**Conclusiones:** El aceite esencial de las hojas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Goavaert “panizara” presenta actividad antifúngica frente a la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231, y una mayor actividad en asociación al fluconazol a la concentración de 0.2 mg/mL.

**Palabras claves:** *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Goavaert, aceite esencial, actividad antifúngica, *Candida albicans* ATCC 10231.

## ABSTRACT

**Objective:** To determine the antifungal synergistic activity of the essential oil of *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Goavaert "panizara" and fluconazole against *Candida albicans* ATCC 10231, *in vitro*.

**Methods:** The research is experimental. The essential oil was obtained by steam distillation, to which miscibility tests were carried out using the translucency method and density determination by pycnometry. For the evaluation of the antifungal activity, the agar diffusion method was used against the *Candida albicans* strain ATCC 10231.

**Result::** The essential oil from the leaves of *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Goavaert "panizara" shows miscibility in organic solvents, such as n-hexane, chloroform, methanol and a density of  $0.963 \pm 0.006$  g / mL. Regarding the antifungal activity, the average inhibition halos of 12,843 mm, 12,985 mm, 16,368 mm, 10.59 mm and 17.03 mm were determined for the oil at concentrations of 50%, 75, 100%, fluconazole at 0.2 mg / mL and the solution 100% essential oil and 0.2mg / mL fluconazole; respectively.

**Conclusions:** The essential oil from the leaves of *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Goavaert "panizara" shows antifungal activity against the strain of *Candida albicans* ATCC 10231, and a higher activity in association with fluconazole at a concentration of 0.2 mg / mL.

**Key words:** *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Goavaert, essential oil, antifungal activity, *Candida albicans* ATCC 10231.

## I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades fúngicas matan a más de 1,5 millones y afectan a más de mil millones de personas. Sin embargo, siguen siendo un tema descuidado por las autoridades de salud pública a pesar de que la mayoría de las muertes por enfermedades fúngicas son evitables. Esto afecta tanto a los pacientes de países desarrollados como en vías de desarrollo.<sup>1</sup>

La importancia de las infecciones por hongos tanto en humanos como en animales ha aumentado en las últimas décadas, las micosis oportunistas son responsables de una amplia gama de enfermedades, desde infecciones localizadas hasta enfermedades diseminadas fatales, como aspergilosis, mucormicosis, candidiasis, criptococosis.<sup>2</sup>

Se sabe que las infecciones generadas por especies del género *Candida*, específicamente por *Candida albicans* están en aumento con un 50% de incidencia de especies de *Candida*, estos organismos muestran potencial virulento característico, susceptibilidad antifúngica y epidemiológica.<sup>2</sup>

Actualmente se reporta la resistencia a *Candida albicans* a los agentes antifúngicos, en particular a compuestos de triazol. Las consecuencias clínicas de la resistencia a los antifúngicos pueden verse en los fracasos del tratamiento en los pacientes al no culminar el tratamiento y en los cambios continuos de las especies de *Candida* patogénicas. Las investigaciones señalan la aparición similar de cepas y especies de levadura resistentes a los antifúngicos causantes de otros tipos de infecciones, confundidas por candida, existiendo la necesidad de adicionar al tratamiento establecido con terapias alternativas, que puedan potenciar la acción del fármaco, presentando un efecto sinérgico<sup>3</sup>.

Nuestro país posee una variedad de recursos naturales producto de su diversidad de regiones geográficas, factores edáficos y otros factores que hacen propicio el desarrollo de diferentes plantas con múltiples propiedades medicinales una de ellas, la antifúngica. En la familia Lamiaceae encontramos al género *Clinopodium*, el cual se abordado en diferentes estudios de aceites esenciales y extractos por sus propiedades antimicrobianas, sin embargo, no se han realizado aún

investigaciones sobre el efecto conjunto relacionado al uso del aceite esencial de “panizara” y fluconazol frente a *Candida albicans* ATCC 10231, *in vitro*”.

La familia Lamiaceae, es una de las familias de hierbas más importantes, incorpora una amplia variedad de plantas con aplicaciones biológicas y médicas. Los miembros más conocidos de esta familia son una variedad de especias aromáticas como tomillo, menta, orégano, albahaca, salvia, ajedrea, romero, autocurativo, hisopo, toronjil y algunas otras de uso más limitado<sup>4</sup>. Esta familia abarca aproximadamente 21 géneros, destacando principalmente las hierbas y arbustos<sup>5</sup>, ubicándose al norte del Perú, especialmente en los Andes entre los 1500 a 4250 m de altitud<sup>6</sup>.

El género *Clinopodium* presenta 200 especies a nivel mundial, que se caracterizan por habitar en zonas de climas templados y tropicales de ambos hemisferios de la Tierra. En nuestro país se han reconocido 26 especies, de estas 20 son autóctonas, dentro de ellas, la panizara la encontramos en la región norte del país.<sup>5</sup>

Es una planta herbácea aromática de tallos finos, arbustivos y fuertemente ramificada. Presenta diminutas hojas, en forma de corazón y ápice puntiagudo, debido a su apariencia pubescente es aserrada con la parte superior verde y la parte inferior blanca, sus flores son pequeñas y achatadas, pentagonales, octogonales<sup>7</sup>.

Especie distribuida ampliamente en la zona norte del país, se localiza en laderas abiertas y rocosas, riberas, acequias, arroyos rocosos arcillosos, márgenes de caminos boscosos y arcillosos-pedregosos entre los 2800 a 3500 metros de altitud, en Cajamarca, Ancash y La Libertad<sup>4</sup>.

Al ser una planta aromática debido a que contiene esencias de características aceitosas, que se encuentran básicamente en hojas, es ideal para elaboración de perfumes y fitocosméticos, puesto que su esencia es muy profunda y duradera<sup>8</sup>.

En medicina tradicional la panizara es de gran utilidad para mitigar alteraciones digestivas como las flatulencias, indigestión y también un eficaz relajante.<sup>9</sup>

Los aceites esenciales son solubles en solventes orgánicos, como el alcohol, éter; pero insolubles en agua, suelen ser líquidos e incoloros a temperatura ambiente, con un olor característico y una densidad inferior a la unidad, con la excepción de algunos casos (canela, sazafrán y vetiver). Tienen un índice de refracción y una actividad óptica muy alta. Estos aceites volátiles contenidos en las hierbas son responsables de los diferentes aromas que emiten las plantas. Son ampliamente utilizados en la industria cosmética, perfumería y también aromaterapia <sup>10,11,12</sup>.

Químicamente son sustancias terpénicas (monoterpenos y sesquiterpenos) y derivados aromáticos fenilpropánicos. Pueden ser de tipo alcohol, cetona, fenol, éter, entre otros<sup>12</sup>.

La extracción de aceites esenciales de muestras vegetales que se obtiene por diferentes métodos entre ellos la destilación por arrastre con vapor de agua, extrusión, extracción con solventes orgánicos, por impregnación y con fluidos supercríticos<sup>13</sup>.

La destilación por arrastre con vapor, pasa por un acondicionamiento de la planta donde es secada y cortada para obtener trozos pequeños que serán colocados en una cámara inerte y sometidos a una corriente de vapor sobrecalentado, la esencia producida se recoge y separa de la fase acuosa. Esta tecnología es muy utilizada, especialmente para fragancias líquidas, especialmente fragancias para perfumes. Debido a su bajo costo de implementación, alto rendimiento de extracción y alta pureza del aceite esencial obtenido, se utiliza en la industria.<sup>13</sup>

Los aceites esenciales a través de numerosas investigaciones están demostrando que tienen actividad antioxidante y antifúngica, así, en un estudio sobre la actividad antioxidante *in vitro* de los aceites esenciales de *Origanum vulgare* L.(orégano), *Rosmarinus officinalis* L.(romero) y *Coriandrum sativum* L.(cilantro), en emulsiones de agua en aceites (Ag/Ac) y aceite de agua (Ac/Ag), sometidas al deterioro oxidativo por medio de la radiación ultravioleta, se demostró que en la emulsión de Ag/Ac, el aceite esencial de orégano presentó actividad antioxidante superior a la del cilantro y el romero, e incluso a la de la vitamina E y así mismo; el aceite esencial de orégano presentó una acción protectora más baja en la emulsión de Ac/Ag<sup>14</sup>.

En un estudio sobre la evaluación de la actividad antifúngica del aceite esencial de *Origanum vulgare L.* sobre *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* y *Candida albicans*; se demostró que presenta esta actividad, debido posiblemente a la presencia de compuestos químicos fenólicos como el timol y el carvacrol en su composición química<sup>15</sup>. Mientras que los aceites esenciales de canela y mostaza fueron efectivos para inhibir *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* O157: H7, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pectobacterium carotovorum* y *Salmonella entérica* subsp. *Entérica* individualmente, su acción sinérgica solo se encontró en *Escherichia coli* O157: H7 y *Pseudomonas putida*. La actividad antimicrobiana más alta se observó en aceite esencial de mostaza<sup>16</sup>.

Al realizar el estudio del aceite esencial, extractos e infusiones de eucalipto (*Eucalyptus globulus*), se reportó actividad antifúngica, a concentraciones entre el 54% y el 95% del componente activo 1,8-cineol<sup>17</sup>.

En su investigación De la Cruz<sup>18</sup>, identificó el efecto antimicótico, antioxidante y antimicrobiana de los aceites esenciales del matico, carpundia, y matico rojo.

Como señala Cano<sup>19</sup>, al realizar el análisis del aceite esencial de muña determinó actividad antimicótica *in vitro* frente a *Candida albicans* a concentraciones de 50% y 100%; asimismo, identificó actividad frente a *Microsporium canis*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton tonsurans*; a volúmenes de 5mL y 50 mL; los compuestos químicos que reportó en el aceite esencial fueron la Pulegona, mentona y limoneno.

Varios investigadores han propuesto el aumento de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales, cuando se utilizan en combinación. No sólo se han descrito interacciones sinérgicas sino también aditivas, no interactivas y antagónicas<sup>20</sup>.

Dentro de estas interacciones, se han sugerido combinaciones de aceites esenciales que tienen efectos sinérgicos y aditivos para aplicaciones alimentarias<sup>21</sup>. La acción sinérgica se evidencia cuando el control positivo y el aceite esencial en conjunto tienen un efecto inhibitor mayor; que la actividad individual del aceite esencial. En un trabajo que investigaba la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de tomillo y orégano y sus compuestos

principales (timol y carvacrol), se descubrió que la combinación de timol y carvacrol(monoterpenos aromáticos oxigenados) tienen efectos antibacterianos aditivos contra *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*, *Salmonella infantis*, y *Escherichia coli*. Además, se observó una acción antibacteriana aditiva con la combinación de aceite esencial de tomillo y orégano<sup>22</sup>. Si bien no se informó ningún antagonismo para las combinaciones de cardamomo, comino y eneldo, la mayor actividad antimicrobiana se observó en una combinación de cardamomo y eneldo<sup>22</sup>.

Los efectos antibacterianos de los aceites esenciales se producen de dos formas: por la restricción del crecimiento bacteriano (bacteriostático) o por la destrucción de las células bacterianas (bactericida)<sup>23</sup>.

Estas actividades antibacterianas se pueden determinar utilizando métodos de difusión en agar disco, micro y macro dilución en caldo y dilución en agar. La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales depende principalmente de la composición química y de las partes de las plantas. Por otro lado, las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas difieren en términos de su sensibilidad frente a los aceites esenciales. Estas diferencias se han explicado por varios mecanismos como las características de los componentes presentes en los aceites esenciales y la naturaleza resistente de las bacterias, destacando el grupo de gramnegativas las cuales poseen una doble capa de fosfolípidos conocida como doble membrana, sin embargo, la asociación de diversos componentes presente en algunos aceites esenciales, esto dependiente del tipo de especie vegetal y del quimiotipo dependiente de la zona de cultivo<sup>24</sup>. Mientras que la actividad antibacteriana de diferentes aceites esenciales vegetales está bien documentada contra bacterias Gram-positivas como: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*) y Gram-negativas como: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter* spp, persiste la tendencia de encontrar metabolitos secundarios de nuevas especies vegetales que presente una mayor actividad y seguridad<sup>25,26,27</sup>. Además de estas razones se debe evaluar las cepas clínicas y estándar pudiendo diferir en términos de su sensibilidad frente a los aceites esenciales <sup>28</sup>.

**Valverde P, (2017)**, desarrollo la investigación con el objetivo de “evaluar la efectividad antimicótica del aceite esencial de orégano de las provincias de Chimborazo y Santa Elena al 100% de concentración sobre *Candida albicans*”. En los resultados se determinó que los aceites esenciales de orégano de ambas mostraron diferencias significativas sobre las levaduras en comparación con nistatina. Se concluyó que el aceite esencial obtenido del orégano proveniente de la provincia de Chimborazo presentó mayor efectividad antimicótica frente a *Candida albicans* que el aceite de orégano de la localidad de Santa Elena <sup>29</sup>.

**Gamero y Martínez, (2019)**, desarrollaron la investigación cuyo objetivo fue “determinar el efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de las hojas secas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts (panizara) procedentes de Áncash”. Se analizaron extractos hidroalcohólicos de panizara a las concentraciones de 33%, 43% y 50%; los cuales fueron contrastados con cloranfenicol, ciprofloxacino y trimetoprima más sulfametoxazol. Se obtuvo la formación de halos de inhibición de las concentraciones de 33%, 43% y 50% siendo el diámetro de los halos de 22 mm, 24 mm, 28 mm respectivamente. Concluyeron que la concentración al 50% presentó mayor efecto antibacteriano que las otras concentraciones, sin embargo, el efecto antibacteriano fue menor en comparación con los medicamentos utilizados<sup>30</sup>.

**Tapia E, (2018)** realizó la investigación con el objetivo de “evaluar la composición química del aceite esencial de las hojas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts (panizara), actividad antioxidante *in vitro* y la actividad antifúngica *in vitro*, frente a *Candida albicans*”. El aceite esencial se obtuvo a partir de las hojas de panizara por arrastre de vapor de agua, reportándose un rendimiento de 0,58 %v/p. En los resultados se determinó que el aceite esencial presenta actividad antioxidante variable; por el método del DPPH no presentó actividad antioxidante significativa frente al patrón estándar Trolox. Por el contrario, por el método del radical ABTS•+, se obtuvo una actividad antioxidante significativa frente al estándar. La actividad antifúngica se evaluó empleando el método de difusión en agar mostrando actividad significativa frente a *Candida albicans* en concentraciones de 100%, 75% y 50% <sup>31</sup>.

Y como antecedentes internacionales:



**Blaszhekovikj D, et al. (2018)**, realizaron en Macedonia la investigación titulada “Actividad antifúngica del aceite esencial de la planta *Satureja hortensis* L.(salado) cultivado en la región de Pelagonija”. El objetivo fue investigar si el aceite esencial de la planta *Satureja hortensis* L. (salado), cultivado en la región de Pelagonija (Bitola, Macedonia), manifiesta cierta actividad antifúngica contra el hongo *Aspergillus niger* y actividad contra la levadura *Candida albicans*. El aceite esencial se obtuvo de las partes aéreas mediante el método de hidro-destilación y se usó el aparato Unger para obtener el aceite esencial de esta planta. Las actividades antifúngicas y anti-levadura del aceite se evaluaron mediante el método de difusión en disco a concentraciones de 10mg/mL, 50mg/mL, 100mg/mL, 150mg/mL, 200mg/mL y 600mg/mL . El aceite esencial de la planta *Satureja hortensis* L. mostró una actividad antimicrobiana diferente contra *Aspergillus niger* y *Candida albicans*, dependiendo de la concentración del aceite esencial usado, así como también del tipo de microorganismo <sup>32</sup>.

**Noriega F, et al. (2018)**, realizaron en Ecuador la investigación titulada “Composición química, actividad antioxidante y prueba antimicrobiana contra patógenos respiratorios del aceite esencial de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze”. El objetivo de este estudio fue dilucidar la composición química, y sus actividades antioxidantes y antimicrobianas del aceite esencial. La mayoría de los compuestos identificados fueron acetato de carvacrol (42,1%), carvacrol (20,6%), pulegona (6,3%) y timol (5,5%). Se concluye que la especie presenta actividad antibacteriana significativa a una concentración de 2,5% contra *Staphylococcus aureus* <sup>33</sup>.

**Potente G, et al. (2020)**, desarrollo la investigación titulada: Actividad *anti - cándida* de aceites esenciales de plantas Lamiaceae de la zona mediterránea y Oriente Medio. El estudio tuvo como objetivo revisar la actividad anti-*Candida* de los aceites esenciales recolectados de 100 especies de la familia Lamiaceae que crecen en el área del Mediterráneo y Oriente Medio. Se ofrece una descripción general de los aceites esenciales y los componentes más prometedores que inhiben *Candida* spp. crecimiento, con un enfoque particular para aquellos productos naturales capaces de reducir la expresión de factores de virulencia, como la transición levadura-hifa y la formación de biopelículas. Con base en el conocimiento actual sobre los miembros de la familia Lamiaceae, las

recomendaciones futuras para fortalecer el valor de estos aceites esenciales como agentes antimicrobianos incluyen la selección de patógenos, con una extensión hacia la nueva *Candida* emergente.spp. y detección toxicológica, ya que no se puede dar por sentado que los productos derivados de plantas carecen de propiedades potencialmente tóxicas y / o cancerígenas<sup>34</sup>.

El objetivo general del estudio será determinar la actividad sinérgica antimicótica del aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Goavaert “panizara” y fluconazol frente a *Candida albicans* ATCC 10231, *in vitro*.

La hipótesis general del estudio se describe como:

El aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Goavaert “panizara” y fluconazol, presenta actividad sinérgica antimicótica frente a *Candida albicans* ATCC 10231, *in vitro*.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 ENFOQUE Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

**Enfoque:** Cuantitativo, porque se tomaron las medidas de los halos de inhibición formados en el periodo de tiempo establecido para evaluar el efecto antimicótico.

**Experimental:** Porque se manipulo la variable independiente (aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunt) Goavaert “panizara” a concentraciones de 100, 75 , 50 % y asociación con fluconazol) para determinar su efecto sobre la variable dependiente (actividad sinérgica antimicótica frente a *Candida albicans* ATCC 10231)

**Explicativo:** Porque explica el porqué de los hechos mediante una relación causa-efecto. Para el caso de nuestro estudio, busca relacionar las diferentes concentraciones del aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunt) Goavaert “panizara” y su asociación con fluconazol con la finalidad de evaluar la actividad antimicótica frente a *Candida albicans* ATCC 10231 y el posible sinergismo entre el aceite esencial y fluconazol.

**Prospectivo:** Porque la ejecución y recolección de datos se dieron en el presente para evaluarlos en el futuro.

**Transversal:** Porque la recolección de los datos se dio por única vez en un momento determinado.

### 2.2 POBLACIÓN, MUESTRA Y MUESTREO

La población estuvo conformada por las hojas *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Goavaert “panizara”, las hojas fueron colectadas en la provincia de Pallasca ubicada a 3100 metros de altitud en Ancash, dichas hojas fueron internadas en el Museo de Historia Natural de la UNMSM donde se realizó la clasificación taxonómica.

La muestra estuvo constituida por 1500 gramos de hojas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Goavaert “panizara”.

La muestra microbiológica fue la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231.

## 2.3 VARIABLES DE INVESTIGACIÓN

**Variable independiente:** Aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Goavaert “panizara”

Definición conceptual: Mezclas complejas de compuestos producidos por plantas y aislado mediante destilación por arrastre a vapor de agua.

Definición operacional: Concentración del aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Goavaert “panizara”

**Variable dependiente:** Actividad antimicótica *in vitro* frente a cepas de *Candida albicans* ATCC 10231

Definición conceptual: Capacidad de una sustancia para inhibición el crecimiento micótico

Definición operacional: Sensibilidad micótica frente al aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Goavaert “panizara” obtenidas por medición del diámetro de los halos de inhibición.

## 2.4 TÉCNICAS E INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Se usaron fichas de registro ficha de registro de datos para evaluar la miscibilidad del aceite esencial y a la actividad antimicótica.

## 2.5. PROCESO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

El procedimiento para la recolección de datos está basado en el tipo de observación no participativa, realizando el seguimiento a los siguientes procesos:

### 2.5.1 Recolección del material vegetal

Se recolectaron las hojas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara” en la provincia de Pallasca, capital Cabana, región Ancash ubicada a 3100 metros de altitud.

Se seleccionaron las hojas se lavarán a temperatura ambiente promedio 20 °C, a penas lleguen a Lima, con abundante agua, para la posterior obtención del aceite esencial.

### 2.5.2 Obtención del aceite esencial

Se procesó 1,5 kg de hojas frescas mediante destilación por arrastre de vapor de agua en el equipo de destilación. Teniendo en cuenta la insolubilidad del destilado y la diferencia de densidad entre el agua y los aceites esenciales, se usó un embudo de decantación para separar el aceite, posteriormente se usó sulfato de sodio anhidro de grado reactivo para eliminar las impurezas del agua en el aceite esencial y posteriormente se conservó en un frasco ámbar. a 4 ° C <sup>31</sup>.

### 2.5.3 Ensayo de miscibilidad

Para la prueba de miscibilidad se utilizó una variedad de solventes como agua, metanol, etanol absoluto, n-butanol, dimetilsulfóxido (DMSO), éter etílico, cloroformo. Los resultados fueron interpretados como: - (inmiscible); + (miscible)<sup>35</sup>

### 2.5.4 Ensayo de densidad relativa

Se evaluó según la fórmula: .

$$D = \frac{(P.MP - P)}{(P. agua - P)}$$

Donde:

D: Densidad relativa.

P. MP : Peso del picnómetro con muestra (g).

P. agua: Peso del picnómetro con agua destilada (g).

P : Peso del picnómetro vacío (g).

### 2.5.5 Rendimiento del aceite esencial (RAE) <sup>35</sup>

Para la determinación del rendimiento se realizó con el volumen de destilado del aceite esencial obtenido en la probeta florentino. Por el método gravimétrico-volumétrico se determinó el porcentaje de Rendimiento de Aceite Esencial (%RAE) con la siguiente expresión :

$$\%RAE = \text{Vol. AE(mL)} / P_{\text{muestra}} \text{ (g)} \times 100$$

Donde:

Vol. AE: Volumen del aceite esencial obtenido en mililitros.

P<sub>muestra</sub>: Peso de la muestra a destilar en gramos.

### 2.5.5 Prueba antimicótica (*Candida albicans*) por el método de difusión en agar

Esta prueba se basa en la inhibición del crecimiento fúngico, mediante la difusión de las sustancias activas en un medio sólido y se evidencia por la formación de halos claros alrededor de las colonias.

Para la preparación de la suspensión del inóculo, se utilizó el microorganismo *Candida albicans* en agar dextrosa Sabouraud por 48 h. Luego se suspendió el microorganismo en solución salina 0,85% estéril y se ajustó la turbidez al equivalente al tubo 0,5 de la escala de McFarland.

El medio de agar de Glucosa Sabouraud fue reconstituido a 45 ° C. Se inoculó 1 mL de suspensión ( $1 \times 10^6$  ufc / mL) en 100 mL de medio, posteriormente se procedió a homogeneizar y distribuir su contenido en placas petri de vidrio estériles de diámetro de 90 mm. Luego se procedió con el rotulado, indicando el nombre del microorganismo. Finalmente, se realizaron agujeros con un punzón de acero con un diámetro exterior de 11 mm, haciendo 4 agujeros equidistantes en cada placa. Se agregó 100 µL de aceite esencial a las concentraciones de 100, 75 y 50 %, solución de aceite y estándar en los pocillos, se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos y luego fue incubado a 37 ° C durante 24 horas.

Se observó zonas claras correspondiente a la inhibición del crecimiento y se midió los diámetro de los halos. Se consideró una actividad antifúngica significativa cuando presenta un halo de inhibición mayor a 18mm según Rojas<sup>36</sup>, mientras que Duraffourd y Lapraz plantean una interpretación de actividad (-) Nula con diámetro (< 8 mm); actividad (+) Sensible bajo con diámetro (8 - 14 mm); actividad media

(muy sensible) con un diámetro (14 - 20 mm) y sumamente sensible: con diámetro (> 20 mm)<sup>37</sup>.

Se utilizó como:

Control positivo: fluconazol 0,2 mg/mL

Control negativo: Dimetilsulfoxido(DMSO)

Concentración 1: 100% de aceite

Concentración 2: 75% p/p aceite

Concentración 3: 50% p/p aceite

Concentración 4: 100% p/p aceite + 0,2 mg/mL

## **2.6. MÉTODOS DE ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

Luego de la obtención de resultados de los análisis mencionados, se realizaron las evaluaciones mediante estadística descriptiva utilizando el paquete informático Microsoft Excel versión 2019. Asimismo, los valores de los halos de inhibición medidos a las 24 horas de incubación, se analizarán en el programa estadístico SPSS versión 23 en su versión reciente, en las cuales se realizará la prueba de ANOVA y la prueba de Tukey para elegir el mejor tratamiento, en caso de existir diferencia significativa.

### III. RESULTADOS

#### 3.1 Rendimiento del aceite esencial

Tabla1. Rendimiento del aceite esencial de las hojas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Goavaert “panizara”

Muestra	Cantidad de muestra fresca (Kg)	Cantidad de aceite esencial(mL)	Rendimiento (%) v/p
hojas de <i>Clinopodium pulchellum</i> (Kunth) Goavaert “panizara”	1.5	7.8	0,52

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 1, se muestra la obtención de 7.8 mL de aceite esencial a partir de 1.5 Kg de hojas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Goavaert “panizara” con un rendimiento del 0,52% v/p mediante destilación por arrastre a vapor de agua.

#### 3.2 Ensayo de miscibilidad

Tabla 2. Ensayo de miscibilidad del aceite esencial de las hojas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Goavaert “panizara”

SOLVENTES	RESULTADOS
N-hexano	+
Cloroformo	+
Etanol 96%	-
Metanol	+



Ácido acético	-
Agua destilada	-

Fuente: Elaboración propia

Donde: (-) inmisible (+) miscible

En la tabla 2, se muestran los resultados de la prueba de miscibilidad del aceite esencial de las hojas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Goavaert “panizara”, mostrando miscibilidad en los solventes n-hexano, cloroformo y metanol.

### 3.3 Densidad relativa

**Tabla 3. Densidad relativa del aceite esencial de las hojas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Goavaert “panizara”**

Densidad relativa (g/mL)	Promedio $\pm$ Desviación estándar.
0,97	0,963 $\pm$ 0,006*
0.96	
0,96	

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 3, se puede apreciar la densidad relativa del aceite esencial de 0,963  $\pm$  0,006 g/mL.

### 3.4 Actividad antifúngica frente a *Candida albicans* ATCC 10231

Para la determinación de la actividad antifúngica del aceite esencial de las hojas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Goavaert “panizara” frente a *Candida albicans* ATCC 10231, se utilizaron concentraciones del aceite esencial al 50%, 75%, 100%, adicionalmente se utilizó una solución de aceite esencial al 100% con fluconazol para evaluar el sinergismo. El control positivo fue fluconazol 0.2 mg/mL y el control negativo fue Dimetilsulfoxido.

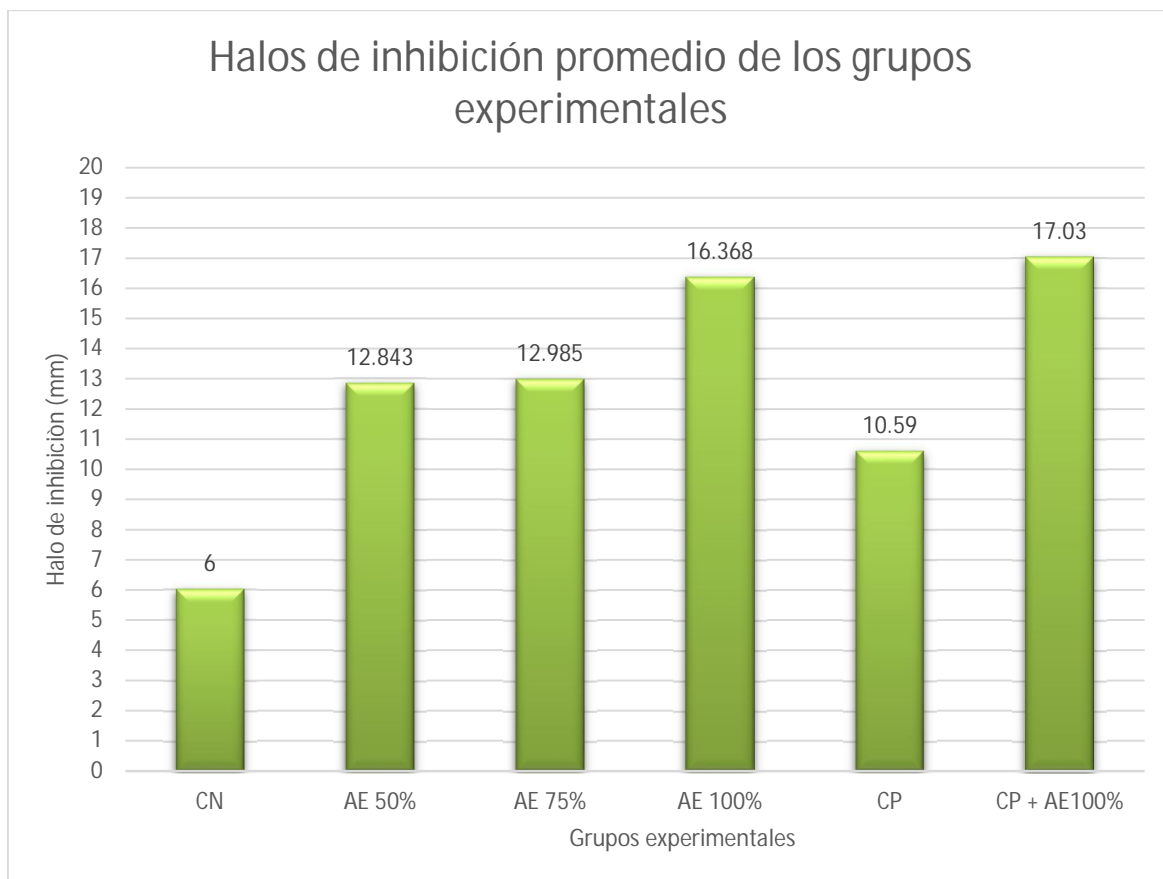
**Tabla 4. Actividad anti*Candida albicans* del aceite esencial de las hojas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Goavaert “panizara”**

Diámetro del halo de inhibición (mm) de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231						
Numero de muestra	Control negativo (Dimetilsulfoxido)	Aceite esencial al 50 %	Aceite esencial al 75%	Aceite esencial al 100 %	Control positivo Fluconazol al 0.2mg/mL	Aceite esencial al 100% y fluconazol al 0.2 mg/mL
1	6	12.96	13.01	16.44	10.38	16.91
2	6	12.83	12.97	16.21	11.01	17.05
3	6	12.81	13.07	16.47	10.45	17.03
4	6	12.77	12.89	16.35	10.52	17.13
<b>Promedio</b>	6.000	12.843	12.985	16.368	10.59	17.030
<b>Desviación estándar</b>	0.000	0.082	0.075	0.117	0.286	0.091

Fuente: Elaboración propia

**Escala interpretativa Duraffourd y Lapraz (1983)**

- (-) Nula: Diámetro (< 8 mm)
- (+) Sensible bajo: Diámetro (8 - 14 mm)
- (++) Medio (muy sensible): Diámetro (14 - 20 mm)
- (+++) Sumamente sensible: Diámetro (> 20 mm)



Fuente: Elaboración propia

**Figura N°1.** Halos de inhibición promedio de los grupos experimentales frente a la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231.

Leyenda:

CN: Control negativo (Dimetilsulfoxido)

AE 50%: Aceite esencial al 50 %

AE 75%: Aceite esencial al 75 %

AE 100%: Aceite esencial al 100 %

CP = Control positivo Fluconazol al 0.2mg/mL

CP + AE 100%= Fluconazol al 0.2mg/mL + aceite esencial al 100%.

En la tabla 4, se observan los valores promedios y la desviación estándar de las lecturas por cuadruplicado del control negativo (dimetilsulfoxido), aceite esencial al

50%, aceite esencial al 75%, aceite esencial al 100%, control positivo (fluconazol al 0.2mg/mL) y la solución de aceite esencial al 100% con fluconazol al 0.2 mg/mL.

Según la escala interpretativa de Duraffourd y Lapraz, el grupo que contenía dimetilsufóxido (control negativo) presenta una actividad nula, los grupos que contenían el aceite esencial al 50, 75% y control positivo presentan halos de inhibición de 12.843, 12.985 y 10.49, respectivamente, presentando una actividad sensible-baja. La concentración del aceite esencia al 100% y fluconazol con aceite esencial 100%, presentan halos de 16.368 y 17.030, respectivamente, teniendo actividades muy sensibles.

### **3.5 Contraste de hipótesis**

#### **3.5.1 Contrastación de hipótesis general**

**H0:** El aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Goavaert “panizara” y fluconazol, no presenta actividad sinérgica antimicótica frente a *Candida albicans* ATCC 10231, *in vitro*.

**H1:** El aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Goavaert “panizara” y fluconazol, presenta actividad sinérgica antimicótica frente a *Candida albicans* ATCC 10231, *in vitro*.

Se realizaron los análisis estadísticos de los halos de inhibición producidos al evaluar la actividad antibacteriana del aceite esencial de las hojas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Goavaert “panizara”., los resultados se muestran en la Tabla 5, donde se considera la determinación de la media aritmética, desviación estándar, error estándar, límites de confianza y valores mínimo y máximo para los grupos experimentales frente a *Candida albicans* ATCC 10231, se observa que todos los resultados obtenidos se encuentran dentro de los límites de confianza. Se evalúa la media de los diámetros de los halos de inhibición obtenidos frente la escala de sensibilidad de Duraffourd y Lapraz.

**Tabla 5.** Estadística descriptiva de la actividad antifúngica del aceite esencial de las hojas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Goavaert “panizara” frente a *Candida albicans* ATCC 10231.

**Descriptivos**

Halo de inhibición

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
0	4	6.000000	.0000000	.0000000	6.000000	6.000000	6.0000	6.0000
AE 50 %	4	12.842500	.0822091	.0411045	12.711687	12.973313	12.7700	12.9600
AE 75 %	4	12.985000	.0754983	.0377492	12.864865	13.105135	12.8900	13.0700
AE 100 %	4	16.367500	.1167262	.0583631	16.181763	16.553237	16.2100	16.4700
Fluconazol 0.2 mg/mL	4	10.590000	.2857738	.1428869	10.135270	11.044730	10.3800	11.0100
AE 100% y Fluconazol 0.2 mg/mL	4	17.030000	.0909212	.0454606	16.885324	17.174676	16.9100	17.1300
Total	24	12.635833	3.7695668	.7694596	11.044085	14.227582	6.0000	17.1300

Fuente: Elaboración propia

Como se puede apreciar los grupos experimentales de 50%, 75% y control positivo obtuvieron una sensibilidad baja, considerando la escala de Duraffourd con una media de  $12.84 \pm 0.082$  mm,  $12.99 \pm 0.075$  mm y  $10.59 \pm 0.286$  mm respectivamente y al 100% y 100% más fluconazol al 0.2 mg/ml muy sensible con una media de  $16.37 \pm 0.112$  mm y  $17.03 \pm 0.091$  mm. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula (H0) y se acepta la hipótesis alterna (H1).

Conclusión: El aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Goavaert “panizara” y fluconazol, presenta actividad sinérgica antimicótica frente a *Candida albicans* ATCC 10231.

**- Hipótesis específica 1:**

**H0:** El aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Goavaert “panizara” al 100%, no presenta actividad antimicótica frente a la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231, *in vitro*.

**H1:** El aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Goavaert “panizara” al 100%, presenta actividad antimicótica frente a la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231, *in vitro*.

Como se puede apreciar el grupo experimental que contenía el aceite esencial al 100%, evidenció una actividad muy sensible según la escala de Duraffourd, con una media de  $16.36 \pm 0.116$  mm, mostrando una diferencia entre los valores de promedios del control negativo y control positivo equivalentes a  $6 \pm 0$  mm y  $10.56 \pm 0.285$  mm, respectivamente. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula (H0) y se acepta la hipótesis alterna (H1).

Conclusión: El aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Goavaert “panizara” al 100%, presenta actividad antimicótica frente a *Candida albicans* ATCC 10231.

**- Hipótesis específica 2:**

**H0:** El aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Goavaert “panizara” al 75%, no presenta actividad antimicótica frente a la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231, *in vitro*.

**H1:** El aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Goavaert “panizara” al 75%, presenta actividad antimicótica frente a la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231, *in vitro*.

Como se puede apreciar el grupo experimental que contenía el aceite esencial al 75%, evidenció una sensibilidad baja según la escala de Duraffourd, con una media de  $12.98 \pm 0.075$  mm, mostrando una diferencia entre los valores de promedios del control negativo y control positivo equivalentes a  $6 \pm 0$  mm y  $10.56 \pm 0.285$  mm, respectivamente. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula (H0) y se acepta la hipótesis alterna (H1).

Conclusión: El aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Goavaert “panizara” al 75%, presenta actividad antimicótica frente a *Candida albicans* ATCC 10231.

**- Hipótesis específica 3:**

**H0:** El aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Goavaert “panizara” al 50%, no presenta actividad antimicótica frente a la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231, *in vitro*.

**H1:** El aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Goavaert “panizara” al 50%, presenta actividad antimicótica frente a la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231, *in vitro*.

Como se puede apreciar el grupo experimental que contenía el aceite esencial al 50%, evidenció una sensibilidad baja según la escala de Duraffourd, con una media de  $12.84 \pm 0.082$  mm, mostrando una diferencia entre los valores de promedios del control negativo y control positivo equivalentes a  $6 \pm 0$  mm y  $10.56 \pm 0.285$  mm, respectivamente. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula (H0) y se acepta la hipótesis alterna (H1).

Conclusión: El aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Goavaert “panizara” al 75%, presenta actividad antimicótica frente a *Candida albicans* ATCC 10231.

**- Hipótesis específica 4:**

**H0:** La disolución del aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Goavaert “panizara” y fluconazol, no presenta actividad sinérgica antimicótica frente a la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231, *in vitro*.

**H1:** La disolución del aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Goavaert “panizara” y fluconazol, presenta actividad sinérgica antimicótica frente a la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231, *in vitro*.

Como se puede apreciar en la tabla 5, el grupo experimental que contenía el aceite esencial al 100% con fluconazol 0.2mg/mL presenta una actividad muy sensible según la escala de Duraffourd con una media de  $17.03 \pm 0.09$  mm, siendo superior a los demás tratamientos.

Para determinar si existe diferencia significativa entre los tratamientos realizaremos las pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas para determinar la prueba estadística a utilizar.

La prueba de normalidad nos indica que los halos de inhibición obtenidos presentan una distribución normal, en este caso se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk, debido a que la muestra es menor a 30 unidades, en la Tabla 6, se muestra que el p-valor(sig) donde resulta ser mayor a 0.05 para todos los grupos de estudio, por lo

tanto, los resultados presentan distribución normal. La prueba de homogeneidad de varianzas nos ayuda a determinar si las varianzas de cada tratamiento aplicado son iguales o diferentes estadísticamente para ello se emplea el estadístico de Levene, en la Tabla 7 observamos que p-valor (sig) es mayor a 0.05, por lo tanto, se concluye que las varianzas de los tratamientos aplicados son homogéneas, por consiguiente; al cumplir con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza aplicaremos pruebas paramétricas, en este caso la prueba de ANOVA.

**Tabla 6.** Prueba de Normalidad de los halos de inhibición del aceite esencial de las hojas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Goavaert “panizara” frente a *Candida albicans* ATCC 10231 .

		Pruebas de normalidad <sup>a</sup>					
		Kolmogorov-Smirnov <sup>b</sup>			Shapiro-Wilk		
Concentraciones		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Halo de inhibición	AE 50 %	,310	4	.	,884	4	,358
	AE 75 %	,171	4	.	,994	4	,976
	AE 100 %	,233	4	.	,918	4	,523
	Fluconazol 0.2 mg/mL	,347	4	.	,807	4	,115
	AE 100% y Fluconazol 0.2 mg/mL	,250	4	.	,963	4	,797

a. Halo de inhibición es constante cuando Concentraciones = 0. Se ha omitido.

b. Corrección de significación de Lilliefors

Fuente: Elaboración propia

**Tabla 7.** Prueba de Homogeneidad de varianzas del aceite esencial de las hojas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Goavaert “panizara”

**Prueba de homogeneidad de varianzas**

Halo de inhibición

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
3,549	5	18	,021

Fuente: Elaboración propia



**Tabla 8.** Prueba de ANOVA de los halos obtenidos frente a la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231 .

**ANOVA**

Halo de inhibición

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	326,474	5	65,295	3376,827	,000
Dentro de grupos	,348	18	,019		
Total	326,822	23			

Fuente: Elaboración propia

La prueba ANOVA nos permite verificar la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos aplicados a la media de cada uno de ellos. Al observar el resultado  $p < 0.05$  (sig), en la Tabla 8, para la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231, se afirma que existe diferencias significativas entre los tratamientos aplicados, para saber cuál de los tratamientos son diferentes, se debe aplicar la prueba de Tukey.

**Tabla 9.** Comparaciones múltiples de los halos de inhibición de la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231, Prueba de HSD TUKEY.

**Comparaciones múltiples**

Variable dependiente: Halo de inhibición

HSD Tukey

(I) Concentraciones	(J) Concentraciones	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
0	AE 50 %	-6.8425000*	.0983263	,000	-7.154984	-6.530016
	AE 75 %	-6.9850000*	.0983263	,000	-7.297484	-6.672516
	AE 100 %	-	.0983263	,000	-10.679984	-10.055016
	Fluconazol 0.2 mg/mL	10.3675000*	.0983263	,000	-4.902484	-4.277516
	AE 100% y Fluconazol	-	.0983263	,000	-11.342484	-10.717516
	0.2 mg/mL	11.0300000*				
AE 50 %	0	6.8425000*	.0983263	,000	6.530016	7.154984
	AE 75 %	-.1425000	.0983263	,698	-.454984	.169984

	AE 100 %	-3.525000*	.0983263	,000	-3.837484	-3.212516
	Fluconazol 0.2 mg/mL	2.252500*	.0983263	,000	1.940016	2.564984
	AE 100% y Fluconazol 0.2 mg/mL	-4.187500*	.0983263	,000	-4.499984	-3.875016
AE 75 %	0	6.985000*	.0983263	,000	6.672516	7.297484
	AE 50 %	.1425000	.0983263	,698	-.169984	.454984
	AE 100 %	-3.382500*	.0983263	,000	-3.694984	-3.070016
	Fluconazol 0.2 mg/mL	2.395000*	.0983263	,000	2.082516	2.707484
	AE 100% y Fluconazol 0.2 mg/mL	-4.045000*	.0983263	,000	-4.357484	-3.732516
AE 100 %	0	10.367500*	.0983263	,000	10.055016	10.679984
	AE 50 %	3.525000*	.0983263	,000	3.212516	3.837484
	AE 75 %	3.382500*	.0983263	,000	3.070016	3.694984
	Fluconazol 0.2 mg/mL	5.777500*	.0983263	,000	5.465016	6.089984
	AE 100% y Fluconazol 0.2 mg/mL	-.662500*	.0983263	,000	-.974984	-.350016
Fluconazol 0.2 mg/mL	0	4.590000*	.0983263	,000	4.277516	4.902484
	AE 50 %	-2.252500*	.0983263	,000	-2.564984	-1.940016
	AE 75 %	-2.395000*	.0983263	,000	-2.707484	-2.082516
	AE 100 %	-5.777500*	.0983263	,000	-6.089984	-5.465016
	AE 100% y Fluconazol 0.2 mg/mL	-6.440000*	.0983263	,000	-6.752484	-6.127516
AE 100% y Fluconazol 0.2 mg/mL	0	11.030000*	.0983263	,000	10.717516	11.342484
	AE 50 %	4.187500*	.0983263	,000	3.875016	4.499984
	AE 75 %	4.045000*	.0983263	,000	3.732516	4.357484
	AE 100 %	.662500*	.0983263	,000	.350016	.974984
	Fluconazol 0.2 mg/mL	6.440000*	.0983263	,000	6.127516	6.752484

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 9, se demuestra que los grupos experimentales presentan diferencias significativas dado que; el valor de Sig es menor 0.05, excepto para la concentración del aceite esencial al 50 y 75%, que estadísticamente presentan la misma actividad, en comparación a los demás grupos.

**Tabla 10.** Prueba de subconjuntos de Tukey para *Candida albicans* ATCC 10231

Halo de inhibición

HSD Tukey<sup>a</sup>

Concentraciones	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
0	4	6.000000				
Fluconazol 0.2 mg/mL	4		10.590000			
AE 50 %	4			12.842500		
AE 75 %	4			12.985000		
AE 100 %	4				16.367500	
AE 100% y Fluconazol 0.2 mg/mL	4					17.030000
Sig.		1,000	1,000	,698	1,000	1,000

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

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 4,000.

Fuente: Elaboración propia

En las tablas 10, podemos observar que las medias de los tratamientos aplicados son distintas, excepto para los grupos que contenían aceite esencial al 50 y 75%, excluyendo estos grupos se observa que a mayor concentración del aceite hay una mayor inhibición, representado en el diámetro de los halos. El aceite esencial de las hojas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Goavaert “panizara” al 100% y fluconazol 0.2 mg/dl presenta actividad frente a la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231, dando como resultados halos de 16,367 mm (muy sensible) y este es superior a los demás tratamientos. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula (H0) y se acepta la hipótesis alterna (H1).

Conclusión: La disolución del aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Goavaert “panizara” y fluconazol, presenta actividad sinérgica antimicótica frente a la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231, *in vitro*.

## IV. DISCUSIÓN

### 4.1 Discusión de resultados

En nuestra investigación obtuvimos 7.8 mL de aceite esencial a partir de un kilo y medio de hojas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Goavaert “panizara”, evidenciando un rendimiento del 0.52 % v/p, este valor es similar al reportado por Tapia<sup>31-43</sup>, quien refiere en sus dos investigaciones un rendimiento de 0.58% v/p para el aceite esencial de las hojas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Goavaert “panizara”, esta similitud se debe principalmente a que la especie vegetal se recolectó del mismo departamento, además se utilizó el método de destilación por arrastre a vapor de agua. Otras especies del género *Clinopodium* como *Clinopodium bolivianum* Benth. Kuntze presentan rendimiento de 0.08% obtenidos mediante hidrodestilación<sup>38</sup>, esto debido al tipo de tratamiento el cual fue sometido el material vegetal, puesto que el material vegetal fue secado en una estufa a 40°C por 7 días produciendo la eliminación de diversos compuestos volátiles y semivolátiles, la diferencia que se observa se representa en el rendimiento. En otra investigación, refieren que *Clinopodium brevicalyx*<sup>39</sup> presenta un rendimiento de 1,98 % p/v mayor al de nuestra investigación, esto debido a las condiciones al momento de realizar la colecta, el estado de las plantas y los factores externos relacionados como el tipo de suelo, altitud, exposición a la radiación, entre otros; que culminan en la expresión de metabolitos secundarios<sup>52</sup>.

En las determinaciones de las características fisicoquímicas preliminares del aceite esencial de las hojas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Goavaert “panizara” se evidenció la miscibilidad del aceite esencial en solventes orgánicos como el n-hexano, cloroformo, metanol y una densidad de  $0.963 \pm 0,006$  g/mL. Reportes demuestran que el aceite esencial de panizara es miscible en solventes orgánicos incluidos el dimetilsulfoxido, datos que coinciden con los nuestros<sup>43</sup>. Referente a la densidad, se encontraron resultados similares descritos por Cueva<sup>40</sup>, quien reporta un valor de 0.975 g/mL para la densidad el aceite de panizara, además; un trabajo de investigación evaluó las densidades de 12 muestras de aceite esencial de *Clinopodium*, presentandó un valor máximo y mínimo de 0.9551 y 0.9321 g/mL, respectivamente<sup>41</sup>. Las mediciones de densidad se realizan a temperaturas y presiones precisas, la variación de estos factores puede afectar las mediciones.

Los aceites esenciales particulares tienen rangos conocidos de densidad específica en los que el aceite se considera puro y sin adulterar<sup>57</sup>. La densidad de un aceite esencial varía en función de la metodología de obtención, lugar de procedencia de la especie vegetal, tipo de suelo etc, por ello las mediciones de densidad proporcionan información sobre la calidad de los aceites esenciales a determinadas condiciones para un lote de producción<sup>57-58</sup>.

La acción antifúngica del aceite esencial, se explica por el carácter lipofílico de sus constituyentes y el carácter anfipático de la membrana celular, el rango general de la actividad de los componentes del aceite esencial en orden decreciente destaca a los fenoles, aldehídos, cetonas, alcoholes, éteres e hidrocarburos. La mayor actividad se reporta para los fenoles (timol, carvacrol y eugenol), lo que se explica por la naturaleza ácida del grupo hidroxilo, que forma un enlace de hidrógeno con un centro enzimático activo. Por tanto, los aceites esenciales que contienen fenoles como compuestos principales, expresan la mayor actividad contra los microorganismos<sup>42</sup>.

En nuestro trabajo de investigación donde se evaluó la actividad antifúngica del aceite esencial de las hojas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Goavaert "panizara" frente a la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231, se evidenció un halo de inhibición de 12.843 mm, 12.985 mm y 16.368 mm para las concentraciones del aceite esencial al 50%, 75, 100%, respectivamente. El control positivo de fluconazol al 0.2 mg/mL evidenció un halo de 10.59 mm y la solución de aceite esencial 100% con fluconazol al 0.2mg/mL presentó un halo de 17.03 mm. La acción antifúngica de los aceites esenciales está relacionada con la presencia de monoterpenos, sesquiterpenos y compuestos oxigenados, como alcoholes, fenoles y aldehídos. Según estudios anteriores, estos compuestos son responsables de inhibir el crecimiento de micelios de varios hongos<sup>44</sup>. Según Tapia<sup>43</sup>, refiere que los terpenos responsables de esta actividad antifúngica, son el linalool, terpinen-4-ol, endoborneol, citronelal, eucaliptol, gamma-terpineno, D-limoneno, que son moléculas mayoritarias y minoritarias en el aceite esencial determinada mediante Cromatografía de Gases Acoplado a un Espectrómetro de Masas (CG-MS), presuntamente los compuestos mayoritarios y minoritarios del aceite esencial actúan en sinergismo potenciando la actividad individual de cada componente, en una investigación que utilizó como control positivo a la nistatina mostró un halo de

inhibición de 38 mm para el mencionado control positivo y el aceite de las hojas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Goavaert “panizara” al 100% presentó un halo de inhibición de 25 mm para la misma cepa fúngica<sup>43</sup>.

En nuestra investigación se evidencia el efecto sinérgico entre el fluconazol de 0.2mg/mL con el aceite esencial de las hojas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Goavaert “panizara” al 100%, varios estudios han investigado la sinergia de aceites esenciales con otros aceites esenciales y compuestos sintéticos, por ejemplo; la sinergia antimicrobiana *in vitro* del aceite esencial de *Matricaria chamomilla* con ciprofloxacino frente a *Escherichia coli*; el efecto sinérgico antifúngico *in vitro* del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* y clotrimazol sobre *Trichophyton rubrum*; efecto sinérgico antifúngico de la combinación de fluconazol y aceite esencial de *Syzygium aromaticum* sobre *Candida albicans*, entre otras<sup>45-47</sup>.

La literatura describe que la combinación de dos agentes antimicrobianos produce un efecto antagonista o sinérgico, dependiendo de los mecanismos ejercidos por cada agente individual contra el organismo de prueba<sup>48</sup>. Es importante caracterizar los mecanismos subyacentes de las interacciones farmacológicas que aún se desconocen en gran medida. Los modos de acción y la farmacodinamia de la acción sinérgica de los fármacos por sí solos no pueden explicar las interacciones farmacológicas de forma obvia, por ello las interacciones farmacológicas pueden ser causadas por efectos de absorción relativamente simples, por ejemplo, se produce sinergismo si un fármaco aumenta la permeabilidad de la envoltura celular a otro fármaco<sup>53</sup>. De hecho, tal efecto de absorción probablemente cause el sinergismo entre los antibióticos aminoglucósidos y otras sustancias<sup>54</sup>. Las interacciones sinérgicas también pueden ser causadas por interacciones físicas directas entre los compuestos; este mecanismo actúa para los antibióticos que se unen al ribosoma en diferentes sitios y estabilizan recíprocamente su unión, debido a la complejidad para describir los mecanismos deducimos empíricamente la actividad sinérgica de sustancias combinadas<sup>55-56</sup>.

En nuestra investigación la solución que contenía al aceite esencial 100% con fluconazol al 0.2mg/mL presentó un halo de inhibición 17.03 mm, corroborando su efecto sinérgico debido a que el valor de halo de inhibición supera a las concentraciones individuales del aceite y control positivo. La posibilidad de que uno

o más componentes presentes en el aceite esencial interactúen sinérgicamente y estos a su vez con el antifúngico de referencia (medicamento), toma relevancia como un factor potencial para el uso de compuestos naturales en asociación con medicamentos, sin embargo, es importante conocer el mecanismo de acción individual del aceite esencial y en conjunto con el medicamento, a fin de evitar efectos adversos o la toxicidad de esta asociación<sup>49-51</sup>.

## **4.2 Conclusiones**

El aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Goavaert “panizara” a la concentración de 100%, presentó actividad antifúngica frente a la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231.

El aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Goavaert “panizara” a la concentración de 75%, presentó actividad antifúngica frente a la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231.

El aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Goavaert “panizara” a la concentración de 50%, presentó actividad antifúngica frente a la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231.

La disolución del aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Goavaert “panizara” y fluconazol al 0.2 mg/mL, presentó actividad antifúngica frente a la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231.

### 4.3 Recomendaciones

Debido a la buena actividad antifúngica mediante un método *invitro* se recomienda realizar ensayos pre-clínicos y clínicos, con la finalidad de evaluar la eficacia de la actividad antifúngica del aceite esencial de las hojas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Goavaert “panizara” frente a cepas clínicas de *Candida albicans*.

Realizar la identificación de los componentes químicos presente en el aceite esencial de las hojas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Goavaert “panizara” mediante Cromatografía de Gases Acoplado a un Espectrómetro de Masas.

Evaluar la actividad antifúngica sinérgica del aceite esencial de las hojas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Goavaert “panizara” con otros medicamentos de referencia.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bongomin F, Gago S, Oladele R, Denning D. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision. *Journal of Fungi*. 2017;3(4):57. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5753159/>
2. Seyedmousavi S, Bosco S, de Hoog S, Ebel F, Elad D, Gomes R et al. Fungal infections in animals: a patchwork of different situations. *Medical Mycology*.



2018;56(1):S165-S187.

Disponible:

[https://academic.oup.com/mmy/article/56/suppl\\_1/S165/4925968](https://academic.oup.com/mmy/article/56/suppl_1/S165/4925968).

3. Zurita S. Situación de la resistencia antifúngica de especies del género *Candida* en Perú. *Rev Pery. Med, exp, salud pública*. 2018;35(1):10-18.
4. Bekut M, Brkić S, Kladar N, Dragović G, Gavarić N, Božin B. Potential of selected Lamiaceae plants in anti(retro)viral therapy. *Pharmacological Research*. 2018;133(1):301-314. Disponible: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1043661817310253?via%3Dihub>
5. Rodríguez M. Lamiaceae endémicas del Perú. *Revista peruana de Biología*. 2006;13(2): 371-79.
6. Sagástegui A, Rodríguez E. Una nueva especie de *Salvia* (Lamiaceae) del Norte del Perú. *Revista peruana de Biología*: 2012;13(2) : 139-42.
7. Instituto Cuencas. Conocimientos tradicionales de plantas medicinales en Cajamarca. Perú. [en línea] [citado: 2020 diciembre 10]. Disponible en: <https://repositoriodigital.minam.gob.pe/handle/123456789/182>
8. Rodriguez A, Alcaraz M. PROCEDIMIENTOS PARA LA EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES EN PLANTAS AROMÁTICAS. Disponible en: <http://dspace.cibnor.mx:8080/handle/123456789/1402>
9. Gil Lucio. Plantas medicinales en Cajamarca. Perú. Herbario Isidoro Sánchez Vega. Disponible en: [https://fieldguides.fieldmuseum.org/sites/default/files/rapid-color-guides-pdfs/928\\_peru\\_plantas\\_medicinales\\_de\\_cajamarca.pdf](https://fieldguides.fieldmuseum.org/sites/default/files/rapid-color-guides-pdfs/928_peru_plantas_medicinales_de_cajamarca.pdf)
10. Saad L.M.M.G., Abdelgaleil S.A.M. Allelopathic Potential of Essential Oils Isolated from Aromatic Plants on *Silybum marianum*. *Glob. Adv. Res. J. Agric. Sci*. 2014;3:289–297.

11. Dhifi W, Bellili S, Jazi S, Bahloul N, Mnif W. Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. *Medicines*. 2016;3(4):25.
12. De Oliveira CM, das Graças Cardoso M, Ionta M, Gomes Soares M, de Andrade Santiago J, Ferreira Da Silva GA, Teixeira ML, de Carvalho Selvati Rezende DA, Vieira de Souza R, Isac Soares L., et al. Chemical Characterization and in vitro Antitumor Activity of the Essential Oils from the Leaves and Flowers of *Callistemon viminalis*. *Am. J. Plant Sci*. 2015;6:2664–2671. Disponible en : [10.4236/ajps.2015.616268](http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2015.616268).
13. Martínez A. Aceites esenciales. Universidad de Antioquía. Facultad de Química Farmacéutica. Medellín. Colombia, 2003. Disponible en: [http://www.med-informatica.com/OBSERVAMED/Descripciones/AceitesEsencialesUdeA\\_esencias2001b.pdf](http://www.med-informatica.com/OBSERVAMED/Descripciones/AceitesEsencialesUdeA_esencias2001b.pdf)
14. Tafur GG, Martínez JR, Stashenko EE. Evaluación de la actividad antioxidante de aceites esenciales en emulsiones degradadas por radiación ultravioleta. *Revista Colombiana de Química*. 2005;34(1): 43-55.
15. Rojas, Bezada y col. Effect of essential oil *Origanum vulgare* L. (oregano) on external otitis by *Malassezia* spp. in dogs (*Canis lupus familiaris*). *Ciencia e Investigacion*. 2015; 18(1): 43-46.
16. Clemente L, Aznar M, Silva F, Nerín C. Propiedades antimicrobianas y modo de acción de los aceites esenciales de mostaza y canela y su combinación contra bacterias transmitidas por los alimentos. *Innov. Ciencia de los alimentos. Emerg. Technol*. 2016 ; 36 (1): 26–33.
17. World Health Organization. *Folium Eucalypti*. WHO monographs on selected medicinal plants. WHO Graphies. Ginebra; 2002. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42052/9241545372.pdf;jsessionid=003F68DEB3F217928EC1425631D7E684?sequence=2>

18. De la Cruz JP. Actividad antimicrobiana, antioxidante y determinación de la composición química mediante Cromatografía de Gases/ Espectrometría de Masas (CG/EM) de los aceites esenciales de 3 especies de piper nativas del Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima. 2012. Disponible en : [http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/15589/DelaCruz\\_vj%20-%20Resumen.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/15589/DelaCruz_vj%20-%20Resumen.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
19. Cano C. Actividad antimicrobiana in vitro y elucidación estructural del aceite esencial de las hojas de *Mintostachys mollis* (muña). Tesis para optar al Grado de Magister. Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM. Lima. 2007 Disponible en : <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/2573>
20. Mutlu-Ingok A, Tasir S, Seven A, Akgun N, Karbancioglu-Guler F. Evaluación de la eficacia antibacteriana simple y combinada de aceites esenciales para el control de *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y cultivos mixtos. Sabor Fragr. J. 2019; 34(1) : 280–287.
21. Clemente I, Aznar M, Silva F, Nerín, C. Propiedades antimicrobianas y modo de acción de los aceites esenciales de mostaza y canela y su combinación contra bacterias transmitidas por los alimentos. Innov. Ciencia de los alimentos. Emerg. Technol. 2016; 36 (1): 26–33.
22. Gavaric N, Mozina SS, Kladar N, Bozin B. Perfil químico, actividad antioxidante y antibacteriana de los aceites esenciales de tomillo y orégano, timol y carvacrol y su posible sinergismo. J. Essent. Oils de aceite. Plantas 2015; 18(1) : 1013–1021.
23. Tariq S, Wani S, Rasool W, Shafi K, Bhat MA, Prabhakar A, Shalla AH. Una revisión integral del potencial antibacteriano, antifúngico y antiviral de los aceites esenciales y sus componentes químicos contra patógenos microbianos resistentes a los medicamentos. Microb. Pathog. 2019 ;134 (1):103-108.

24. Bhavaniramy S, Vishnupriya S, Al-Aboody MS, Vijayakumar R, Baskaran D.. Papel de los aceites esenciales en la seguridad alimentaria: Aplicaciones antimicrobianas y antioxidantes. *Grain Oil Sci. Technol.* 2019 ; 2(1) : 49–55.
25. Tu XF, Hu F, Thakur K, Li XL, Zhang YS, Wei ZJ. Comparación de los efectos antibacterianos y la toxicidad del fumigante de los aceites esenciales extraídos de diferentes plantas. *Ind. Cultivos Prod.* 2018 ; 124(1) :192–200.
26. Abou Baker DH, Al-Moghazy M, ElSayed AA. La citotoxicidad in vitro, potencial antioxidante y antibacteriano del aceite esencial de *Satureja hortensis* L. cultivado en Egipto. *Bioorg. Chem. Apl.* 2020; 95(1): 103-110.
27. El Hamdaoui A, Msanda F, Boubaker Leach D, Bombarda I, Vanloot P, El Aouad N. Composición de aceite esencial, actividades antioxidantes y antibacterianas de *Lavandula mairei* Humbert silvestre y cultivada . *Biochem. Syst. Ecol.* 2018; 76(1):1–7.
28. Nirmal NP, Mereddy R, Sultanbawa Y. Formulación, caracterización y actividad antibacteriana del aceite esencial de mirto limón y mirto anís en nanoemulsión acuosa. *Food Chem.* 2018; 254(1):1–7
29. Cueva E. Actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial de las hojas *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts "panizara". Tesis para optar al título de químico farmacéutico. Universidad San Pedro. 2017.  
[http://repositorio.usanpedro.edu.pe/bitstream/handle/USANPEDRO/765/Tesis\\_54495.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.usanpedro.edu.pe/bitstream/handle/USANPEDRO/765/Tesis_54495.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
30. Gamero y martinez, Efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts "panizara" en cepas de *Salmonella enterica typhimurium* in vitro. Tesis para optar al título de químico farmacéutico. Universidad Inca Garcilaso de la Vega. Lima. 2019.  
Disponible en : <http://repositorio.uigv.edu.pe/handle/20.500.11818/4537>

31. Tapia E. Composición química, actividad antioxidante y antiCandida albicans del aceite esencial de Clinopodium pulchellum (Kunth) Govaerts “panizara”. Tesis para optar al grado de doctor. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima.2018. Disponible en : <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/7557>
32. Blaszhekoviki D, y col. Antifungal and anti-yeast activity of satureja hortensis L. (lamiaceae) essential oil from pelagonian region. Journal of Hygienic Enginee and Desing. 2018. Disponible: <http://eprints.uklo.edu.mk/4760/>
33. Noriega F, Tatiana d, Edison A, Pablo G, Andrea F. Clinopodium nubigenum (Kunth) Kuntze essential oil: Chemical composition, antioxidant activity, and antimicrobial test against respiratory pathogens. Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy. 2018;10(9):149-157.
34. Potente G, Bonvicini F, Gentilomi G, Antognoni F. Anti-Candida Activity of Essential Oils from Lamiaceae Plants from the Mediterranean Area and the Middle East. Antibiotics. 2020;9(7):395.
35. Ponce Juan. Composición química, actividad antioxidante y antimicrobiana del aceite esencial de Peperomia galioides Kunth y actividad fotoprotectora in vitro en una emulsión dermocosmética. Tesis para optar al Grado de Magister Ciencias Farmacéuticas con mención en Ciencia y Tecnología Cosmética Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, 2019.
36. Rojas R, Bustamante B, Bauer J, Fernández I, Albán J, Lock O. (2003). Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. J Ethnopharmacol; 88(2-3): 199-204
37. Duraffourd C, Lapraz J, d' Hervicourt L. Cuadernos de fitoterapia clínica. Primera ed. Duraffourd C, editor. Barcelona: MASSON S.A.; 1987.
38. Arias J, Martinez J. Estudio de los componentes del aceite esencial y extracto de Clinopodium bolivianum (Inca Muña) obtenidos por hidrodestilación y

extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico. En: V Congreso Latinoamericano de Cromatografía y Técnicas Afines. Cartagena; 2014..

39. Merma Ccana C, Tomaylla Cruz C, Del Carpio Jiménez C. Actividad anti-Trichophyton rubrum del aceite esencial de Clinopodium brevicalyx y elaboración de una emulsión tópica. Revista de Investigaciones Altoandinas - Journal of High Andean Research. 2020;22(2):182-190.
40. Cueva Julca. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DEL ACEITE ESENCIAL DE LAS HOJAS CLINOPODIUM PULCHELLUM (KUNTH) GOVAERTS "PANIZARA". Tesis para optar al título profesional de Químico Farmacéutico. Universidad San Pedro, Chimbote, 2017.
41. Malaga V. Análisis de la difusión del aceite esencial de muña en vapor de agua. Ciencia y Desarrollo. 17(1):47-55;2014.
42. Böhme, K., Barros-Velázquez, J., Calo-Mata, P. & Aubourg, S. P. 2014. Antibacterial, antiviral and antifungal activity of essential oils: mechanisms and applications. In: Antimicrobial Compounds. Springer Berlin Heidelberg, pp. 51–81.
43. Tapia E y col. Evaluación de la actividad anti-Candida albicans del aceite esencial de Clinopodium pulchellum (Kunth) Govaertz "panizara". Revista Agora. 2019;06(2):1-5.
44. Fadli M, Saad A, Sayadi S, Chevalier J, Mezrioui N, Pagès J et al. Antibacterial activity of Thymus maroccanus and Thymus broussonetii essential oils against nosocomial infection – bacteria and their synergistic potential with antibiotics. Phytomedicine. 2012;19(5):464-471.
45. Cueva Julca. Sinergia antimicrobiana in vitro del aceite esencial de *Matricaria chamomilla* con ciprofloxacino sobre *Escherichia coli* ATCC 25922". Tesis para optar al título profesional de Médico Cirujano. Universidad Cesar Vallejo, Trujillo, 2019.

46. Ravello Alayo. Efecto sinérgico antifúngico in vitro del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* y clotrimazol sobre *Trichophyton rubrum*. Tesis para optar al título profesional de Médico Cirujano. Universidad Cesar Vallejo, Trujillo, 2019.
47. Luyo Hermosa. Efecto sinérgico antifúngico de la combinación de fluconazol y aceite esencial de *Syzygium aromaticum* sobre *Candida albicans*, in vitro. Tesis para optar al título profesional de Médico Cirujano. Universidad Cesar Vallejo, Trujillo, 2019. Disponible :  
<https://repositorio.ucv.edu.pe/handle/20.500.12692/42487>
48. Xu X, Xu L, Yuan G, Wang Y, Qu Y, Zhou M. Synergistic combination of two antimicrobial agents closing each other's mutant selection windows to prevent antimicrobial resistance. Scientific Reports. 2018;8(1):1-10. Disponible:  
<https://www.nature.com/articles/s41598-018-25714-z>
49. Malcolm B, Tallian K. Essential oil of lavender in anxiety disorders: Ready for prime time?. Mental Health Clinician. 2017;7(4):147-155. Disponible.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6007527/>
50. Vostinaru O, Codruta Heghes S, Filip L. Safety Profile of Essential Oils. Essential Oils - Bioactive Compounds, New Perspectives and Applications. 2020. Disponible: <https://www.intechopen.com/books/essential-oils-bioactive-compounds-new-perspectives-and-applications/safety-profile-of-essential-oils>
51. Yap P, Yiap B, Ping H, Lim S. Essential Oils, A New Horizon in Combating Bacterial Antibiotic Resistance. The Open Microbiology Journal. 2014;8(1):6-14. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3950955/>
52. Yuan Y, Huang M, Pang Y, Yu F, Chen C, Liu L et al. Variations in Essential Oil Yield, Composition, and Antioxidant Activity of Different Plant Organs from *Blumea balsamifera* (L.) DC. at Different Growth Times. Molecules. 2016;21(8):10-24.
53. Ankomah P, Johnson P, Levin B. The Pharmacokinetics and Evolutionary Dynamics of Multi-drug Therapy: Experiments with *S. aureus* and *E. coli* and

Computer Simulations. PLoS Pathogens. 2013;9(4):1-14. Disponible en: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1003300>

54. Ocampo P, Lázár V, Papp B, Arnoldini M, Abel zur Wiesch P, Busa-Fekete R et al. Antagonism between Bacteriostatic and Bactericidal Antibiotics Is Prevalent. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2014;58(8):4573-4582.
55. Liu LG y col. Estudio comparativo de las concentraciones de prevención de mutantes de vancomicina sola y en combinación con levofloxacino, rifampicina y fosfomicina frente a *Staphylococcus epidermidis* resistente a meticilina . *J. Antibióticos*. 2013; 66 : 709–712. Disponible: 10.1038 / ja.2013.87.
56. Deresinski S. Vancomicina en combinación con otros antibióticos para el tratamiento de infecciones graves por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina . *Clin. Infectar. Dis.* 2009; 49 : 1072–1079. Disponible: 10.1086/05572.
57. Mansoori I. The Effect of Plant Density and Harvesting Time on Growth and Essential Oil of Peppermint (*Mentha Piperita* L.). *Journal of Medical and Bioengineering*. 2014;3(2):113-116.
58. Souza M, Santos L, Brito D, Rocha J, Castro R, Fernandes M et al. Influence of light intensity on glandular trichome density, gene expression and essential oil of menthol mint (*Mentha arvensis*L.). *Journal of Essential Oil Research*. 2015;28(2):138-145.



## **ANEXOS**

## ANEXO A. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

Variable		Tipo	Definición conceptual	Definición operacional	Dimensiones	Indicador	Unidad de medida
Independiente	Aceite esencial de <i>Clinopodium pulchellum</i> (Kunth) Goavaert "panizara"	Cuantitativa	Mezclas complejas de compuestos producidos por plantas y aislado mediante destilación por arrastre a vapor de agua.	Concentración del aceite esencial de <i>Clinopodium pulchellum</i> (Kunth) Goavaert "panizara"	Concentración	100%, 75%, 50% y 100% +0.2 mg/mL de fluconazol	ug /mL y mg/mL
Dependiente	Actividad sinérgica antimicótica <i>in vitro</i> frente a cepas de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Cuantitativa	Capacidad de una sustancia para inhibición el crecimiento micótico	Sensibilidad micótica frente al aceite esencial de <i>Clinopodium pulchellum</i> (Kunth) Goavaert "panizara" obtenidas por medición del diámetro de los halos de inhibición	Microbiológica	Medición de los halos de inhibición	milímetros (mm)

**ANEXO B. INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS**

**DE LA ACTIVIDAD ANTICANDIDA ALBICANS**

CEPAS	Cepa de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231							
	Halos de inhibición (mm)							
	N=4			X	N=4			X
Concentración del aceite esencial (%)	1	...	4		1	...	4	
100								
75								
50								
100 +0.2 mg/mL de fluconazol								
Dimetilsulfoxido (Control negativo)								
Fluconazol 0.2 mg/mL								

n: número de ensayos microbiológicos X: promedio

**LEYENDA:** Escala interpretativa Duraffourd y Lapraz (1983)

- (-) Nula: Diámetro (< 8 mm)
- (+) Sensible bajo: Diámetro (8 - 14 mm)
- (++) Medio (muy sensible): Diámetro (14 - 20 mm)
- (+++) Sumamente sensible: Diámetro (> 20 mm)

## ANEXO C. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

JOSÉ R. CAMPOS DE LA CRUZ  
CONSULTOR BOTÁNICO  
C.B.P. N° 3796  
Tel: 17512863 RPM 963689079  
E-mail: joramde@gmail.com



### CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA

JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA CRUZ. BIÓLOGO COLEGIADO- N° 3796 - INSCRITO CON EL N° 36 EN EL REGISTRO DE PROFESIONALES QUE REALIZAN CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE ESPECÍMENES Y PRODUCTOS DE FLORA - RESOLUCIÓN DIRECTORAL N° 0311-2013- MINAGRI-DGFFS-DGEFFS.

#### CERTIFICA:

Que, JONE ALEX COLLAZOS LEÓN, estudiante de la Escuela de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Alas Peruanas, con fines de investigación, ha solicitado la identificación y certificación botánica de la planta conocida con el nombre vulgar de "panizara", la muestra ha sido estudiada y determinada como *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts, y según el Sistema Integrado de Clasificación de las Angiospermas de Arthur Cronquist. (1981), ocupa las siguientes categorías taxonómicas.

REINO	: Plantae
DIVISIÓN	: Magnoliophyta
CLASE	: Magnoliopsida
SUBCLASE	: Asteridae
ORDEN	: Lamiales
FAMILIA	: Lamiaceae
GENERO	: <i>Clinopodium</i>
ESPECIE	: <i>Clinopodium pulchellum</i> (Kunth) Govaerts

Sinónimo: *Satureja pulchella* (Kunth) Briq.

Nombre vulgar: "panizara"

Se expide la presente certificación para los fines que se estime conveniente.

Lima, 07 de noviembre del 2018

  
José R. Campos De La Cruz  
BIOLOGO  
C.B.P. 3796

Jr. Sánchez Silva # 156-2do piso – Urb. Santa Luzmila - Lima 07 /e-mail: joricampos@yahoo.es

## ANEXO D. CERTIFICADO DE ANÁLISIS DEL ACEITE ESENCIAL DE PANIZARA FRENTE A *Candida albicans*



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA  
CENPROFARMA  
CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA



### PROTOCOLO DE ANÁLISIS N.º00146-CPF-2020

ORDEN DE ANÁLISIS : 005746/2020  
SOLICITADO POR : Jone Alex Collazos León  
MUESTRA : ACEITE ESENCIAL DE *Clinopodium pulchellum* (kunth) Goavaert "panizara"  
NÚMERO DE LOTE : -----  
CANTIDAD : 01 frasco x 2 ml. aprox.  
FECHA DE RECEPCIÓN : 28 de Octubre del 2020  
FECHA DE FABRICACIÓN : -----  
FECHA DE VENCIMIENTO : -----

MICROORGANISMOS	DIAMETRO DE INHIBICIÓN EN MILÍMETROS					
	Control	Blanco	100%	75%	50%	Aceite al 100% + fluconazol
<i>Candida albicans</i>	10.38	6	16.44	13.01	12.96	16.91
	11.01	6	16.21	12.97	12.83	17.05
	10.45	6	16.47	13.07	12.81	17.03
	10.52	6	16.35	12.89	12.77	17.13

\*El tamaño de los pocillos es de 6mm, por lo tanto cuando se reporta esta medida indica que no hay formación de halo de inhibición.

\*Concentración del inóculo:  $1 \times 10^8$  UFC/mL

\*Control positivo: fluconazol 0.2mg/mL

\*Control negativo: DMSO (dimetil sulfóxido)

Lima, 11 de Noviembre de 2020

Q.F. Gustavo Guerra Brizuela  
Director del Centro de Control Analítico



**"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"**

Jr. Puno N° 1002 Jardín Botánico Lima 1 - Perú  
☎ (511) 619-7000 anexo 4824 ✉ Ap. Postal 4559 - Lima 1  
E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>

ISO 9001

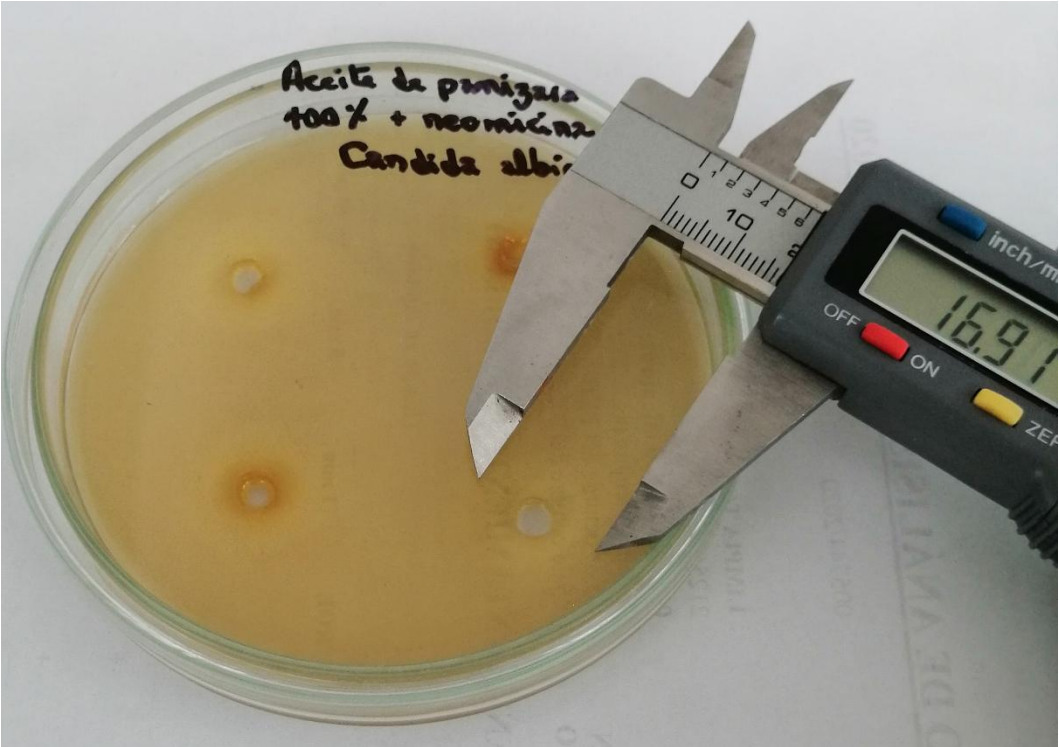
**BUREAU VERITAS**  
Certification



N° BR233265



**ANEXO E. EVIDENCIAS FOTOGRÁFICAS DEL TRABAJO DE CAMPO**



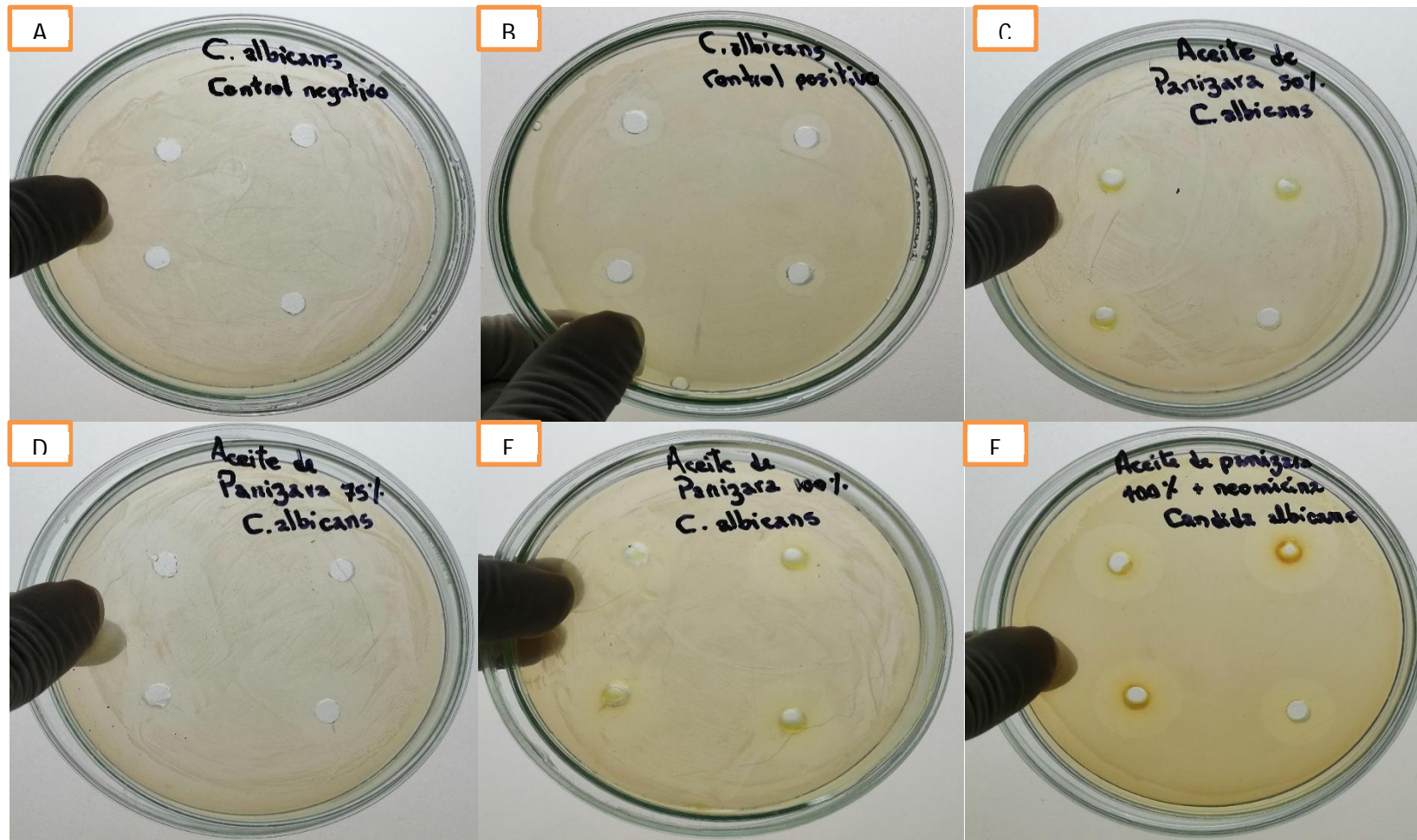
**ANEXO F: MATRIZ DE CONSISTENCIA**

**Título: ACTIVIDAD SINÉRGICA ANTIMICÓTICA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Goavaert “PANIZARA” Y FLUCONAZOL FRENTE A *Candida albicans* ATCC 10231, IN VITRO**

PROBLEMA	OBJETIVO	HIPÓTESIS	VARIABLES	METODOLOGÍA
<p><b>Problema Principal</b> ¿Presentará actividad sinérgica antimicótica del aceite esencial de <i>Clinopodium pulchellum</i> (Kunth) Goavaert “panizara” y fluconazol frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231, <i>in vitro</i>?</p> <p><b>Problemas secundarios</b></p> <p>a) ¿Presentará actividad antimicótica el aceite esencial de <i>Clinopodium pulchellum</i> (Kunth) Goavaert “panizara” al 100% frente a la cepa de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231, <i>in vitro</i>?</p> <p>b) ¿Presentará actividad antimicótica el aceite esencial de</p>	<p><b>Objetivo general</b> Determinar la actividad sinérgica antimicótica del aceite esencial de <i>Clinopodium pulchellum</i> (Kunth) Goavaert “panizara” y fluconazol frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231, <i>in vitro</i>.</p> <p><b>Objetivos Específicos</b></p> <p>a) Determinar la actividad antimicótica del aceite esencial de <i>Clinopodium pulchellum</i> (Kunth) Goavaert “panizara” al 100% frente a la cepa de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231, <i>in vitro</i>.</p> <p>b) Determinar la actividad antimicótica del aceite esencial de <i>Clinopodium pulchellum</i> (Kunth)</p>	<p><b>Hipótesis Principal</b> El aceite esencial de <i>Clinopodium pulchellum</i> (Kunth) Goavaert “panizara” y fluconazol, tienen actividad sinérgica antimicótica frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231, <i>in vitro</i>.</p> <p><b>Hipótesis específicas</b></p> <p>a) El aceite esencial de <i>Clinopodium pulchellum</i> (Kunth) Goavaert “panizara” al 100%, presenta actividad antimicótica frente a la cepa de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231, <i>in vitro</i>.</p> <p>b) El aceite esencial de <i>Clinopodium pulchellum</i> (Kunth)</p>	<p><b>Variable Independiente</b> Aceite esencial de <i>Clinopodium pulchellum</i> (Kunth) Goavaert “panizara”</p> <p><b>Indicadores</b> -Concentración</p> <p><b>Variable dependiente</b> Actividad antimicótica <i>in vitro</i> frente a cepas de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231</p>	<p><b>Tipo de investigación</b> Analítico, experimental longitudinal y prospectivo.</p> <p><b>Diseño</b> Experimental</p> <p><b>Población</b> Planta de <i>Clinopodium pulchellum</i> (Kunth) Goavaert “panizara”</p>

<p><i>Clinopodium pulchellum</i> (Kunth) Goavaert “panizara” al 75% frente a la cepa de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231, <i>in vitro</i>?</p> <p>c) ¿Presentará actividad antimicótica el aceite esencial de <i>Clinopodium pulchellum</i> (Kunth) Goavaert “panizara” al 50% frente a la cepa de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231, <i>in vitro</i>?</p> <p>d) ¿Presentará actividad sinérgica antimicótica la disolución del aceite esencial de <i>Clinopodium pulchellum</i> (Kunth) Goavaert “panizara” y fluconazol frente a la cepa de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231, <i>in vitro</i>?</p>	<p>Goavaert “panizara” al 75% frente a la cepa de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231, <i>in vitro</i>.</p> <p>c) Determinar la actividad antimicótica del aceite esencial de <i>Clinopodium pulchellum</i> (Kunth) Goavaert “panizara” al 50% frente a la cepa de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231, <i>in vitro</i>.</p> <p>d) Determinar la actividad antimicótica de la <i>disolución</i> del aceite esencial de <i>Clinopodium pulchellum</i> (Kunth) Goavaert “panizara” y fluconazol frente a la cepa de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231, <i>in vitro</i>.</p>	<p>Goavaert “panizara” al 75%, presenta actividad antimicótica frente a la cepa de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231, <i>in vitro</i>.</p> <p>c) El aceite esencial de <i>Clinopodium pulchellum</i> (Kunth) Goavaert “panizara” al 50%, presenta actividad antimicótica frente a la cepa de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231, <i>in vitro</i>.</p> <p>d) La disolución del aceite esencial de <i>Clinopodium pulchellum</i> (Kunth) Goavaert “panizara” y fluconazol, presenta actividad sinérgica antimicótica frente a la cepa de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231, <i>in vitro</i>.</p>	<p><b>Indicadores</b></p> <p>Concentración mínima inhibitoria</p>	<p><b>Muestra</b></p> <p>1500 gramos de hojas <i>Clinopodium pulchellum</i> (Kunth) Goavaert “panizara”</p>
---	--	--	---	---





**Figura .** Halos de inhibición producido por el aceite esencial de las hojas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Goavaert “panizara”  
 A.Control negativo: dimetilsulfoxido, B: control positivo: fluconazol 0.2mg/mL, C: aceite esencial al 50%, D: aceite esencial al 75%,  
 E: aceite esencial al 100%, F: aceite esencial al 100 + fluconazol al 0.2 mg/mL.

