



UNIVERSIDAD CATÓLICA LOS ÁNGELES
CHIMBOTE

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE ODONTOLOGÍA

EFFECTO ANTIFÚNGICO, IN VITRO, ENTRE EL
EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE HOJAS Y TALLO
DE Piper aduncum (MATICO) SOBRE Candida albicans
ATCC 10231, TRUJILLO - 2018

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
CIRUJANO DENTISTA

AUTOR:

TAPIA CASTAÑEDA VANESSA LILIANA

ASESOR:

MGTR. VÁSQUEZ PLASENCIA CÉSAR ABRAHAM

TRUJILLO – PERÚ

2019

1. Título

EFFECTO ANTIFÚNGICO, IN VITRO, ENTRE EL EXTRACTO
HIDROALCOHÓLICO DE HOJAS Y TALLO DE Piper aduncum (MATICO)
SOBRE Candida albicans ATCC 10231, TRUJILLO - 2018

2. Equipo de trabajo

INVESTIGADOR PRINCIPAL

Tapia Castañeda Vanessa Liliana

ASESOR

Mgtr. Vásquez Plasencia César Abraham

3. Firma del jurado y asesor

Dr. AGUIRRE SIANCAS ELÍAS ERNESTO
PRESIDENTE

Mgtr. MORÓN CABRERA EDWAR RICHARD
MIEMBRO

Mgtr. PAIRAZAMÁN GARCÍA JUAN LUIS
MIEMBRO

Mgtr. VÁSQUEZ PLASENCIA CÉSAR ABRAHAM
ASESOR

4. Agradecimiento

A Dios, por las bendiciones y gracias recibidas. Agradezco a nuestro Padre Celestial, por darme la oportunidad de ponerme en esta nueva etapa de mi vida, cultivarme los conocimientos y fortaleza necesaria para llevar a cabo los planes que tiene para mí y ser parte tanto de la culminación de mis estudios profesionales como el comienzo de mi vida profesional.

A mis maestros, por su dedicación al brindarme sus horas de preparación, enseñanza y consejos; nutriendo mis conocimientos.

5. Dedicatoria

A mis padres Antonio y Gladys, que son los primeros seres en depositar su confianza y brindarme su apoyo incondicional.

A mi hija Antonella, por ser la fuente de mi inspiración, esfuerzo y deseos de superación. Y por su enorme comprensión de aceptar meses de distanciamiento, teniendo como recompensa la satisfacción personal.

6. Resumen

El presente estudio tiene como objetivo comparar, in vitro, el efecto antifúngico entre el extracto hidroalcohólico de hoja y tallo de *Piper aduncum* “matico” sobre *Cándida albicans*. La muestra estuvo conformada por 32 placas, inoculadas por cepas de *Cándida albicans* ATCC 10231 que fueron activadas para ser sembradas en agar TSA. Se recolectaron hojas y tallo de matico, y se prepararon dos concentraciones hidroalcohólicas de matico al 50% y 75% de cada uno. Posteriormente se colocaron discos empapados con los extractos de las diferentes concentraciones. Los resultados mostraron mediante el diámetro (mm) de los halos de inhibición del crecimiento, encontrándose que en el extracto de la hoja al 50% presenta un halo de inhibición de 14.94 mm y el extracto de la hoja al 75% presenta un halo de inhibición de 19.06 mm., mientras que en extracto de tallo al 50 % presenta un halo de inhibición de 0.00 mm y en el extracto del tallo al 75% presenta un halo de inhibición de 10.63 mm. Mediante este estudio se concluyó que el extracto hidroalcohólico en hoja, presenta mayor efecto antifúngico en comparación al tallo, en las concentraciones al 50% y 75%, así como que el extracto hidroalcohólico al 75% en hoja como en tallo, presenta mayor efectividad antifúngica, en comparación a la concentración al 50%.

Palabras clave: *Cándida albicans*, efecto antifúngico, *Piper aduncum*.

7. Abstract

The present study aims to compare, in vitro, the antifungal effect between the hydroalcoholic extract of the leaf and the stem of *Piper aduncum* "matico" on *Candida albicans*. The sample consisted of 32 plates, inoculated by strains of *Candida albicans* ATCC 10231 that were activated to be seeded on TSA agar. Leaves and stems of matter were collected, and two hydroalcoholic options of matter were prepared at 50% and 75% of each. Subsequently, Petri dishes were placed with the extracts of the different components. The results are obtained through the diameter (mm) of the halos of growth inhibition, are found in the extract of the leaf at 50% presents a halo of inhibition of 14.94 mm and the extract of the leaf at 75% presents a halo of inhibition of 19.06 mm., while in stem extract at 50% it has a halo of inhibition of 0.00 mm and in the stem extract at 75% it has a halo of inhibition of 10.63 mm. Through this study it was concluded that the hydroalcoholic extract in the leaf, presents the antifungal effect in the comparison with the stem, 50% and 75%, as well as the hydroalcoholic extract 75% in the leaf as in the stem, presents higher antifungal, compared to the 50% concentration.

Key words: *Candida albicans*, antifungal effect, *Piper aduncum*.

8. Contenido

1. Título de la tesis.....	ii
2. Equipo de trabajo.....	iii
3. Hoja de firma del jurado y asesor.....	iv
4. Hoja de agradecimiento.....	v
5. Hoja de dedicatoria.....	vi
6. Resumen.....	vii
7. Abstract.....	viii
8. Contenido	ix
9. Índice de tablas.....	x
10. Índice de gráficos.....	xii
I. Introducción	1
II. Revisión de literatura	4
III. Hipótesis	19
IV. Metodología	19
4.1. Diseño de la investigación.....	19
4.2. Población y muestra	19
4.3. Definición y operacionalización de variables e indicadores ...	22
4.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	23
4.5. Plan de análisis	28
4.6. Matriz de consistencia.....	29
4.7. Principios éticos	30
V. Resultados	31
5.1 Resultados	31
5.2. Análisis de Resultados	39
VI. Conclusiones	42
Recomendaciones.....	42
VII. Referencias Bibliográficas	43
Anexos.....	49

9. Índice de tablas

<i>Tabla 1. Resultado mediante el diámetros (mm) de los halos de inhibición del efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de hojas de Piper aduncum “matico” en las concentraciones de 50%, 75% y controles frente a Cándida albicans ATCC 10231</i>	31
<i>Tabla 2. Resumen Descriptivo para el Efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de hojas de Piper aduncum “matico” en las concentraciones de 50% y 75% y Controles frente a Cándida albicans ATCC 10231” mediante el Diámetro (mm) de los halos de inhibición del crecimiento</i>	32
<i>Tabla 3. Análisis de Varianza para el Efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de hojas de Piper aduncum “matico” en las concentraciones de 50% y 75% y Controles frente a Cándida albicans ATCC 10231” mediante el Diámetro (mm) de los halos de inhibición del crecimiento</i>	33
<i>Tabla 4. Prueba de Duncan para el Efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de hojas de Piper aduncum “matico” en las concentraciones de 50% y 75% y Controles frente a Cándida albicans ATCC 10231” mediante el Diámetro (mm) de los halos de inhibición del crecimiento</i>	34

Tabla 5. Resultado mediante el diámetros (mm) de los halos de inhibición del efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de tallo de Piper aduncum “matico” en las concentraciones de 50%, 75% y controles frente a Cándida albicans ATCC 10231.....35

Tabla 6. Resumen Descriptivo para el Efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de hojas de Piper aduncum “matico” en las concentraciones de 50% y 75% y Controles frente a Cándida albicans ATCC 10231” mediante el Diámetro (mm) de los halos de inhibición del crecimiento.....36

Tabla 7. Análisis de Varianza para el Efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de tallo de Piper aduncum “matico” en las concentraciones de 50% y 75% y Controles frente a Cándida albicans ATCC 10231” mediante el Diámetro (mm) de los halos de inhibición del crecimiento.....37

Tabla 8. Prueba de Duncan para el Efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de tallo de Piper aduncum “matico” en las concentraciones de 50% y 75% y Controles frente a Cándida albicans ATCC 10231” mediante el Diámetro (mm) de los halos de inhibición del crecimiento.....38

10. Índice de gráficos

Gráfico 1. *Medias de los halos de inhibición de los grupos controles y de las concentraciones al 50% y 75% de la hoja de Piper aduncum, frente a Cándida albicans.....55*

Gráfico 2. *Medias de los halos de inhibición de los grupos controles y de las concentraciones al 50% y 75% del tallo de Piper aduncum, frente a Cándida albicans.....56*

I. Introducción

La cavidad oral humana es un complejo ambiente ecológico donde los microorganismos, entre bacterias y hongos ¹ están bañados en un medio líquido como la saliva y tienen acceso a adherirse a superficies de tejido blando y duro.² En la actualidad la candidiasis oral es considerada una de las enfermedades más prevalentes,³ encontrándose en la ubicación cuatro de los nosocomios a nivel mundial, debido a que es considerada una infección causada por un hongo oportunista llamado *Cándida albicans* la cual no distingue ni edad, sexo o raza.^{3,4}

La Candidiasis Oral es una infección causada por las especies comensales de un hongo saprofítico del género *Cándida*.³ Mientras que más del 50% los individuos aparentemente saludables hospedan a las cepas de *Cándida* como componente normal de la microflora oral,⁵ sólo un grupo selecto desarrolla evidencia clínica de su patogenicidad.⁶ La cepa predominante y con mayor potencial de patogenicidad en el desarrollo de las infecciones orales es la *Cándida albicans*, y se encuentra aislada en el 80% de las lesiones por *Cándida*.^{6,7}

En los últimos años hay un incremento en la incidencia de enfermedades infecciosas, destacando las fúngicas.^{4,6} debido al aumento considerable de pacientes inmunocomprometidos,⁸ con quimioterapia, con nutrición parenteral, sometidos a cirugía de trasplante y el uso de agentes antimicrobianos de amplio espectro,^{8,9} agregados a la presencia de sida,⁸ lo que da lugar a verdaderas “placas Petri vivientes” individuales, quienes son altamente susceptibles a las infecciones oportunistas.⁹ Las infecciones fúngicas sistémicas y dérmicas son causas de alta morbi-mortalidad en este tipo de pacientes,⁸ siendo las dermatomicosis problemas serios para niños de las

naciones del tercer mundo como consecuencia del deficiente cuidado sanitario.^{10,11} La medicina tradicional viene desde tiempos antiguos en el cual de manera empírica se utilizaban para calmar diversos tipos de enfermedades e infecciones.¹ El Perú es uno de los países con mayor diversidad de flora que poseen diversas propiedades,^{1,2} motivo por el cual ha captado la investigación de diversos científicos para el reconocimiento de los principios activos que dan como reflejo su actividad terapéutica.^{1,2,12}

Dentro de la gran diversidad de plantas se encuentra la especie de *Piper aduncum* “Matico”, el cual viene siendo muy utilizado para aliviar y curar diversos tipos de enfermedades tanto las hojas como el tallo encontrándose compuestos como taninos, flavonoides, glucósidos, alcaloides que son los que le dan su actividad antibacteriana y antifúngica.¹²

Existen reportes en la literatura de que numerosas investigaciones están encaminadas a la búsqueda de nuevos compuestos con actividades biológicas a partir de fuentes naturales, mientras otras están destinadas a verificar las propiedades que se les atribuyen.¹² Motivo por lo cual el presente estudio tuvo como propósito principal determinar el efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de las hojas en comparación con el tallo de *Piper aduncum* “matico” sobre *Cándida albicans* ATCC 10231. Los efectos secundarios ante la administración de los antifúngicos aumentan significativamente la resistencia microbiana ante el fármaco y compromete la calidad de vida del paciente, razón por la cual se han dirigido investigaciones en la búsqueda y utilización de sustancias puras o extractos de plantas naturales para el tratamiento de enfermedades.

Teniendo en consideración que contamos con recursos humanos y material disponible para elaborar el extracto de *Piper aduncum* “matico” resulta fundamental

que alternativas como estas que resulten benéficas, de bajo costo y de fácil acceso para la sociedad y puedan incluirse en productos que puedan disminuir y controlar este microorganismo y evitar molestias a la población susceptible. Por lo tanto el objetivo general de la presente investigación es comparar, *in vitro*, el efecto antifúngico, entre el extracto hidroalcohólico de hojas y tallo de *Piper aduncum* “matico” sobre cepas de *Cándida albicans* ATCC 10231.

La muestra estuvo conformada por 20 placas, inoculadas por cepas de *Cándida albicans* ATCC 10231 que fueron activadas para ser sembradas en agar TSA. Se recolectaron hojas y tallo de matico, y se prepararon dos concentraciones hidroalcohólicas de matico al 50% y 75% de cada uno. Posteriormente se colocaron discos empapados con los extractos de las diferentes concentraciones. Los resultados mostraron mediante el diámetro (mm) de los halos de inhibición del crecimiento, encontrándose que en el extracto de la hoja al 50% presenta un halo de inhibición de 14.94 mm y el extracto de la hoja al 75% presenta un halo de inhibición de 19.06 mm., mientras que en el extracto de tallo al 50 % presenta un halo de inhibición de 0.00 mm y en el extracto del tallo al 75% presenta un halo de inhibición de 10.63 mm. Se concluyó que el extracto hidroalcohólico en hoja, presenta mayor efecto antifúngico en comparación al tallo, en las concentraciones al 50% y 75%, así como que el extracto hidroalcohólico al 75% en hoja como en tallo, presenta mayor efectividad antifúngica, en comparación a la concentración al 50%.

II. Revisión de la literatura

2.1. Antecedentes:

Tipula M¹³ (Trujillo, 2016). **Efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de hojas de Piper angustifolium “Matico” sobre cepas de Cándida albicans comparada con la nistatina, estudio in vitro.** El objetivo del estudio fue evaluar el efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de hojas del *Piper angustifolium* “matico” sobre cepas de Cándida albicans en comparación con la Nistatina fue un estudio in vitro en el cual se utilizó 32 placas Petri de las cuales 8 placas fueron empleadas la nistatina y 24 para las 3 dosis de Piper angustifolium. Se encontró como resultados que la nistatina en un total de 24 horas mostró en promedio un halo de inhibición de 22.6 + 1.1 mm. En cuanto al extracto hidroalcohólico de hojas *Piper angustifolium* en un porcentaje de 12 % dentro de las 24 horas obtuvo un halo de inhibición en promedio de 25.8 + 1.4 mm y 11.9 + 0.8 mm (resistente) a las 48 horas. Al 10% el halo inhibitorio fue 16.8 + 1.3 mm a las 24 horas, y 8.6 + 1.4 mm a las 48 horas. Concluyendo que tanto la nistatina de 300 microgramos como el extracto al 12% de hojas del Piper angustifolium tienen efecto antifúngico en las primeras 24 horas, mientras que la dosis al 10% tiene un efecto intermedio, para las demás concentraciones la cepa se mostró resistente.

Valle B² (Otuzco, 2016) **Cuantificación de flavonoides totales en los extractos hidroalcohólicos de las hojas de Piper aduncum “matico” procedentes del**

distrito de Chota, departamento de Cajamarca y del jardín botánico “Rosa Elena de los Ríos Martínez” de la Universidad Nacional de Trujillo. El propósito de la presente investigación fue la cuantificación de flavonoides totales expresados como quercetina en los extractos hidroalcohólicos de las hojas de *Piper aduncum* “matico”. La identificación preliminar de flavonoides se realizó mediante la reacción de Shinoda y la reacción con Ácido sulfúrico q.p; en la reacción de Shinoda se obtuvo una coloración rojiza y en la reacción con Ácido sulfúrico q.p. se obtuvo una coloración amarilla intensa; ambas coloraciones indican la presencia de flavonas y flavonoles en los extractos hidroalcohólicos preparados. Posteriormente se realizó la cuantificación de flavonoides utilizando la técnica espectrofotométrica, obteniéndose que la cantidad de flavonoides totales expresados como quercetina en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Piper aduncum* “matico” fue 0,0201 mg/mL en comparación con 0,0097 mg/mL, cantidad de flavonoides totales expresados como quercetina obtenida en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Piper aduncum* “matico”, por lo tanto se concluye que las hojas de matico tienen un alto porcentaje de flavonoides lo cual demuestra su alto potencial antimicrobiano y antifúngico.

Vega L ¹⁴ (Trujillo, 2014) **Cuantificación espectrofotométrica de taninos en hojas de *Piper aduncum* procedentes de la provincia de Otuzco, departamento La Libertad.** El propósito de la presente investigación fue la cuantificación de taninos en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Piper aduncum* “matico”. Las muestras de las hojas fueron recolectadas en la Provincia de Otuzco, departamento de La Libertad, en el mes de Marzo-2013. El extracto se preparó usando como

solvente etanol al 50% v/v. La cuantificación de taninos en el extracto hidroalcohólico se realizó mediante el método espectrofotométrico para lo cual se preparó una curva de calibración usando como estándar ácido tánico, obteniéndose la siguiente ecuación $y = 47.6x + 0.0024$, la absorbancia de las muestras del extracto fueron leídas a una longitud de onda de 700 nm, obteniéndose como promedio 27,7814 % de taninos expresados como ácido tánico. Se concluye que las hojas de matico tienen altos índices de taninos, convirtiendo a esta planta como gran potencial antimicrobiano y antifúngico.

Soto M¹⁵ (Amazonas, 2015) **Estudio fotoquímico y cuantificación de flavonoides totales de las hojas de *Piper peltatum* L. y *Piper aduncum* L. procedentes de la región de Amazonas.** El objetivo del estudio fue realizar un análisis fitoquímico y determinar la concentración de flavonoides totales a partir de las hojas de *Piper peltatum* L. y *Piper aduncum* L. obtenidas de la zona de Amazonas. Con respecto al tamizaje fitoquímico se desarrolló mediante el empleo de reactivos de coloración y precipitación y en el caso de los flavonoides totales se cuantificaron mediante el método Kostennikova. Se encontró como resultados la presencia de una alta concentración y diversidad de metabolitos en ambas especies, entre ellos flavonoides, taninos, alcaloides etc. la presencia de saponinas en la especie de *Piper aduncum* L. El contenido de flavonoides totales en las especies de *Piper peltatum* L. y *Piper aduncum* L. fue de $1,8 \pm 0,16$ y $2,51 \pm 0,15$ g equivalentes a quercetina por cada 100 g de hoja seca, respectivamente; Se consideró al *Piper aduncum* L. como la especie de mayor concentración de flavonoides expresados como quercetina con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Valle B, Yanac A ² (Otuzco, 2014) **Efecto del extracto hidroalcohólico de las hojas de Piper aduncum “Matico” sobre el crecimiento de *Cándida albicans* in vitro, procedentes del distrito de Otuzco-La Libertad.** El objetivo del estudio fue determinar el efecto del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Piper aduncum* “Matico” frente a *Cándida albicans*, éste se desarrolló in vitro en comparación con el Fluconazol. Se utilizó discos que se impregnaron con diferentes concentraciones del extracto los cuales se colocaron en placas Petri conteniendo cultivos de *Cándida albicans* y se incubaron a 37° centígrados durante 24 horas. Encontrando como resultado 7 mm en promedio para 13,6 mg/dl, 8,4mm para 27,2 mg/dl y 10,2 mm para 40,8 mg/dl y 13,8mm para 54,4 mg/dl respectivamente. Concluyendo que el extracto de hojas de *Piper aduncum* tiene poder antifúngico frente a *Cándida albicans* y que es proporcional a la cantidad de concentración.

Braga FG et al ¹⁷ (Brasil, 2007) **Actividad antifúngica de plantas utilizadas en medicina tradicional en Brasil.** Se realizó 24 extractos de metanol de 20 plantas, todos ellos utilizados en la medicina tradicional brasileña para el tratamiento de varios desórdenes infecciosos e inflamatorios, se evaluaron contra bacterias y hongos entre ellas *Cándida albicans*. Entre los 20 extractos metanólicos probados, en cuanto a la actividad antifúngica, *Schinus terebintifolius*, *O. gratissimum*, *Cajanus cajan* y *Piper aduncum* fueron los extractos más activos contra *C. albicans*. (MIC de 1.25 mg / ml). Se concluye que el extracto metanólico de *Piper aduncum* tiene un potencial efecto antifúngico.

Vásquez S ¹⁸ (Lima, 2003) **Efecto fungicida del aceite esencial de Piper angustifolium en el tratamiento de candidiasis bucal subprotésica.** El propósito del presente estudio fue utilizar el aceite esencial de Piper angustifolium para poder comprobar el efecto fungicida sobre la cepa de *Cándida albicans* en prótesis dentales. Se estableció la observación mediante el número de colonias que se formaron antes y después de 5 días y 15 días de tratamiento. Al comienzo de la evaluación se encontró un promedio de 29 colonias totales aisladas en el paladar y 318 colonias totales a partir de la evaluación de la prótesis. A los 5 días posteriores a la aplicación del aceite esencial se encontró únicamente 14 colonias de *Cándida* a nivel del paladar y 54 colonias a nivel de la prótesis y con una reducción de colonias más notorias a los 15 días. Concluyendo finalmente que la utilización de 15 días del aceite esencial constituye un tratamiento para la candidiasis subprotésica.

2.2.Marco teórico

2.2.1. Cándida albicans

Cándida albicans es una levadura que habita de manera normal en la cavidad oral junto con otras bacterias saprófitas.¹⁹ Las enfermedades causadas por hongo han incrementado su frecuencia y de esa manera su importancia clínica. La candidiasis es una de las afecciones micóticas más común en la cavidad oral,²⁰ y su gravedad dependerá de muchos factores principalmente la falta de higiene oral tras el uso de prótesis dentales,^{21,22} teniendo como principales factores etiológico a la *Cándida albicans*.²³

Esta levadura tiene diversas moléculas que generan adherencia a los tejidos del huésped; para que esta levadura se convierta en patógeno tiene que considerarse factores sistémicos como locales mencionados anteriormente.²⁴ Esta enfermedad se puede manifestar en diversas formas que generalmente se diagnostican en una inspección bucal, teniendo con signos clínicos principalmente al eritema y a los depósitos blanquecinos en los tejidos blandos y en algunos casos está asociado a cuadros de disguesia, ardor o quemazón de variada intensidad.^{25,26}

2.2.1.2 Infección por Cándida albicans

- Adhesión y colonización: La *Cándida albicans* muestran niveles de adhesión importante a los epitelios teniendo ventaja competitiva con otras especies cuando coloniza y causa una infección.²⁷

- Penetración y producción de enzimas hidrolíticas: Se da cuando se genera hifas largas lo que facilita la penetración mediante los espacios intracelulares. Considerando sus factores de virulencia la producción de toxinas asesinas, hidrolasas extracelulares, entre otros, están controladas mediante diversos genes lo cuales se presenta mediante un número determinado de los siguientes genes: gen de la hexosamida (HEDA), genes de proteinasa, aspárticas (SAP 1, SAP2, SAP3, SAP4), gen para producir tubos germinales y favorecer la adhesión (INT1).^{27,28}
- Respuesta inflamatoria aguda: Se da a través de la elevación de neutrófilos y presencia de IgG, IgA, IgM, factores del complemento, linfocitos T y macrófagos. Considerándose a la *Cándida albicans* una de las levaduras más patógenas y con mayor reacción inflamatoria.²⁹

2.2.1.3 Candidiasis oral

En la cavidad oral del ser humano pueden influir diversos factores locales contribuyen a la aparición de candidiasis como por ejemplo los cambios epiteliales exógenos y endógenos, factores salivales: cantidad y tipo de saliva; dieta y cambios cualitativos en relación al pH, a la concentración de glucosa y a la temperatura.²⁹ También pueden existir factores sistémicos y externos que favorezcan la candidiasis: la infancia y la vejez, estados hormonales alterados; estados nutricionales alterados; terapia con inmunosupresores; terapia con medicamentos; prótesis mal ajustadas,

trauma de tejidos blandos, mala higiene, tabaco y alcohol.³⁰

La candidiasis oral, es una enfermedad causada principalmente por una levadura llamado *Cándida albicans*, al ser proliferado en los tejidos blandos de la cavidad bucal, desarrolla una serie de características propias de la enfermedad; actualmente se han ido realizando una serie de investigaciones para descubrir nuevos tratamientos en base a principios activos naturales, como la especie *Piper aduncum*, que viene siendo utilizada desde la época pre-inca, ya sea por sus diversas propiedades antiinflamatoria y antifúngica, se han identificado una gran variedad de compuestos como amidas, alcaloides, dihidrochalconas, pironas, fenilpropanoides, flavonoides, etc; que se encuentran en diversas partes de la planta.³¹

2.2.1.3.1 Taxonomía

Es una levadura caracterizada por tener una división deuteromycota. Su clase es perteneciente a los Blastomycetes, de la familia de Cryptococcaceae. Su género es *Cándida* y las especies que es *Cándida albicans* considerándose como la más frecuente y virulenta.⁷

2.2.1.3.2 Etiología

Cándida albicans es la especie más frecuente relacionada con infecciones fúngicas orales en adultos y niños y es la especie más virulenta del género.⁷ Los hongos o levaduras se consideran huéspedes normales que habitan en la cavidad oral en una persona, no obstante cuando el sistema inmune está comprometido, o los hábitos que

tenga el paciente pueden tener repercusiones, *Candida albicans* se convierte en un patógeno oportunista.¹⁹

Las enfermedades autoinmunes que pueden provocar la acción de dichos microorganismos son la diabetes, sida, neoplasias, tabaquismo, drogadicción, embarazo, vejez.¹⁹

2.2.1.3.3 Clasificación

La candidiasis oral se clasifica por grados según la severidad y el desarrollo de esta enfermedad tal como grado 1 en donde en la zona del paladar hay una aparición de puntos rojos acompañado de una inflamación localizada. El grado dos el paladar ya se encuentra hiperémica con una textura lisa y atrofia de la zona. En el grado tres es el estadio más avanzado porque se forma tejido granular, la zona del paladar está mucho más hiperémica del grado dos con un aspecto granular.⁵

- Candidiasis pseudomembranosa

Es un tipo de candidiasis superficial que afecta a la mucosa ya sea labial o bucal ya sea paladar blando, paladar duro e incluso la lengua. La histología que presenta en este tipo de candidiasis es que están compuestas por células epiteliales descamativas y necróticas,¹ y numerosos micelios de *C. albicans*.⁷ Las características clínicas se presentan como una capa de color blanco y

crema, removiéndose sencillamente con una gasa, sin embargo, al ser removidos presenta un fondo con sangre.⁵⁻⁷

- Candidiasis eritematosa

También se considera un tipo de candidiasis superficial, mayormente se localiza en la lengua, en la zona dorsal así mismo como en el paladar. Se presenta como una zona eritematosa generalizada por tejido que está atrófico.¹ En el paciente produce una sensación de quemazón,¹ mientras que cuando se localiza en la lengua tiene una textura lisa y eritematosa, ello se da porque se genera una hipotrofia de papilas filiformes.¹ Dicha condición se asocia con la administración de antibióticos de amplio espectro.⁷

- Candidiasis hiperplásica

Este tipo de lesión es poco frecuente, no presenta síntomas, y se caracteriza por una queilitis angular en las comisuras labiales, teniendo un efecto negativo en las comisuras labiales. Esto puede provocar la disminución de la dimensión vertical.⁵

2.2.1.3.4 Características Clínicas

Se identifica como unas lesiones blanquecinas en la lengua y en el paladar que al raspado se desprenden fácilmente.³¹

2.2.2 Piper aduncum (Matico)

Las plantas medicinales tienen una contribución importante en el sistema de salud de comunidades locales, ya que son usadas de manera frecuente por la mayoría de las poblaciones rurales.³¹

La búsqueda de nuevas alternativas para la medicina convencional ha logrado convertirse en algo extremadamente importantes, y las plantas son una fuente muy rica que proporciona una variedad de sustancias nuevas y selectivas con una elevada capacidad terapéutica. En la actualidad existen aproximadamente 250,000 especies de plantas en todo el mundo,¹⁸ de entre las cuales solo una pequeña fracción ha sido estudiada hasta ahora.^{31,32} Aún en la actualidad muchas plantas son utilizadas en medicina y constituyen laboratorios naturales donde se biosintetiza una gran cantidad de sustancias químicas, considerándolas como la fuente de compuestos químicos más importante que existe.

Un gran porcentaje de los principios activos está comprendido dentro de los llamados productos naturales o metabolitos secundarios, que son compuestos químicos de estructuras relativamente complejas y de distribución restringida.³³

Entre estos metabolitos son comunes aquellos con funciones defensivas contra insectos, bacterias y hongos, como son los alcaloides, aminoácidos no proteicos, esteroides, fenoles, flavonoides, cumarinas, quinonas, taninos y terpenoides.³²

2.2.2.1 Taxonomía

Esta planta pertenece a la división Tracheophyta por ser de tipo vascular y de distribución tropical, el género Piper debe su nombre a la palabra griega peperí,³³ que significa pimienta, por lo cual en países fuera de Latinoamérica *P. aduncum* se conoce como pimienta con picos.^{34,35}

Es un arbusto de hasta 7 m de altura y 10 cm o más de diámetro en el tallo, con raíces de limo cortas y madera quebradiza de dureza media; follaje y ramas aromáticas. Pueden crecer como plantas individuales o en matorrales. Las ramas principales son firmes y nódulos inflamados y pupúreos.³⁶

Presenta hojas alternas, dísticas, elípticas, de 12-22 cm de largo, poco pecioladas con nervios hundidos, suavemente peluda debajo. Inflorescencia en forma de espiga curvada opuesta a la hoja en un pedúnculo de 12 a 17 cm, de color blanco a amarillo pálido, que se vuelve verde con la madurez. Flores abarrotadas en las filas transversales regulares.³⁶ Peritecio ausente; por lo general 4 estambres.

Produce como frutos una baya de 1 semilla, comprimida en espigas de

color grisáceo. Semillas de color marrón a negro, 0.7 -1.25 mm de largo comprimidas, con una superficie reticulada.^{36,37}

2.2.2.2. Componentes fitoquímicos

Es una planta conocida comúnmente como: matico; cordoncillo, moho-moho, hierba de soldado. Sus hojas y ramas contienen aceites esenciales, ácido artánico, resinas, sustancias amargas, taninos, alcaloides, saponinas, flavonoides triterpenoides.³⁷

Se ha podido aislar diversos compuestos como: esteroides, alcaloides, amidas, propenilfenoles, terpenos, neolignanos, lignanos, kawapironas, chalconas, piperolidos, hidrochalconas, flavonones, flavonas y entre otros.^{38,39} En *P. tuberculatum*, *P. hispidum* y *P. arboreum*, se logró aislar las amidas, *piplartina*, *piperamina*, *piperina*, *arboreumina*, *5,6-hidropiperlonguminina*, *fagaramida* y en *P. crassinervium*,⁴⁰ también se hallaron varias hidroquinonas preniladas y flavononas, todas con actividad antidermatofítica, también se obtuvo del extracto crudo de la hoja de la *Piper* sp, a las neolignanas eupomatenoides-3 y eupomatenoides-5 que mostraron gran actividad sobre *M. canis*, *T. rubrum*, *M. gypseum* y *T. mentagrophytes*.^{38,39} Estudios químicos en especies de la familia Piperaceae revelan la existencia de productos naturales fisiológicamente activos como amidas, alcaloides, dihidrochalconas, pironas, fenilpropanoides, flavonoides,

neolignanos y lignanos. También amidas piperidina, dihidroxipiridona, piperidina y isobutílicas, fueron aisladas.^{33,40}

Estudios previos detallan efectos antiprotozoarios, antihelmínticos, antioxidantes e insecticidas además de antimicrobianos debido a la presencia de monoterpenos y sesquiterpenos, en concreto piperitona, alcanfor y viridiflorol fueron los principales componentes.⁴¹

5.2.3.3. Localización

La familia Piperaceae se distribuye en regiones tropicales y subtropicales en el norte y hemisferios del sur y comprende alrededor de 3600 especies. El género *Piper* constituye el más representado, con alrededor de 2000 especies.¹

Piper aduncum se encuentra de manera silvestre en varios sitios del país, abarca tanto especies herbáceas y leñosas de áreas tropicales. Este género ocupa un promedio de 700 especies.⁴²

En el Perú en el departamento de Amazonas podemos encontrar a la gran mayoría de variedades del género *Piper* encontrándose 210 especies, 2 subespecies, y 33 variedades que crecen entre 1500 msnm a 2 000 msnm, en bosques con neblina. Los taninos contribuyen a su actividad cicatrizante; los flavonoides tienen propiedades antioxidantes y protectoras

de la membrana celular.⁴²

La Familia piperáceas últimamente está siendo estudiada por las propiedades aromáticas, antimicóticas y antibacterianas de sus aceites. Plantas del género Piper, son ampliamente utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de vaginitis, desórdenes intestinales, y como antimicrobiano y citotóxico. La evaluación in vitro de extractos de estas plantas, muestran propiedades antifúngica y antibacteriana. Los aceites esenciales de Piper spp inhiben el crecimiento de un amplio grupo de microorganismos que causan infecciones importantes en humanos como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa*, *E.coli*, y los hongos *Trichophyton mentagrophytes*, *C. albicans*, *A. flavus* y *A. fumigatus* .^{43,44}

Se escogieron las concentraciones de extracto hidroalcohólico de *Piper aduncum* al 50% y 75% por los excelentes resultados de actividad antifúngica en hojas de *Piper aduncum* a mayor concentración y por no existir evidencias suficientes donde se determine que el extracto hidroalcohólico de tallo de *Piper aduncum* tenga niveles altos de actividad antifúngica entre sus componentes; por ello se busca de medianas a altas concentraciones.

III. Hipótesis

El extracto hidroalcohólico de hoja de *Piper aduncum* (matico) presenta mayor efecto antifúngico que el extracto hidroalcohólico de tallo, frente a *Cándida albicans*. ATCC 10231.

IV. Metodología

4.1 Diseño de la investigación:

- Analítico: Hay asociación entre las variables y en el presente estudio se comprueba la hipótesis.³⁷
- Prospectivo: El estudio se aplica hasta determinar o no la aparición del efecto³⁷. En el presente estudio se comprobó el efecto antifúngico.
- Experimental: La presente investigación ha planteado una hipótesis³⁷. En el presente estudio el investigador manipula el factor de estudio.
- Transversal: cuando la variable se mide una vez sola.³⁷ En este estudio los halos de inhibición se midieron después de la aplicación del extracto.

4.2 Población y muestra

a. Población

Cepas de *Cándida albicans* ATCC 10231.

b. Criterios de inclusión

Placas Petri sembradas con cepas de *Cándida albicans* ATCC 10231 identificado mediante las siguientes pruebas: coloración gram, formación de tubo germinal, formación de clamidosporas, y fermentación de carbohidratos.

c. Criterios de exclusión

Placas Petri con halos de inhibición no muy claros o con signos de contaminación.

d. Muestra

100 uL de una suspensión obtenida a partir de la cepa de *Cándida albicans* ATCC 10231, esta suspensión es equivalente a tubo N° 0.5 ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) del nefelómetro de MacFarland.

La muestra estuvo conformada por 16 discos por grupo, empleando la fórmula para comparar promedios, dada por:

$$n = \frac{2 * (Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 * S^2}{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)^2}$$

n Número placas petri por grupo

$Z_{\alpha/2}=1.96$ Valor normal al 5 % de error tipo I

$Z_{\beta}=0.842$ Valor normal al 20% de error tipo II

\bar{X}_1 Efecto antigúngico medio del extracto etanólico de hojas de *Piper aduncum*.

\bar{X}_2 Efecto antigúngico medio del extracto etanólico de tallo de *Piper aduncum*.

S Desviación estándar del efecto antifúngico del extracto etanólico de hojas y tallo de *Piper aduncum*.

Se asume: $S = (\bar{X}_1 - \bar{X}_2)$

Reemplazando se tiene:

$$n = 2 * (1.96 + 0.842)^2 * 1^2$$

$$n = 16 \text{ discos}$$

En total se requirió 16 discos para el extracto de hojas al 50% y al 75%, y 16 discos para el extracto del tallo al 50% y 75%.

En cada placa Petri, se colocó 4 discos de cada grupo experimental. En total:

- 4 placas Petri para el extracto de hoja al 50 %
- 4 placas Petri para el extracto de hoja al 75 %
- 4 placas Petri para el extracto de tallo al 50 %
- 4 placas Petri para el extracto de tallo al 75 %
- 4 placas Petri para el control positivo (fluconazol).
- 4 placas Petri para el control negativo (etanol).

En total se utilizó 24 placas Petri para los grupos experimental.

4.3 Definición y operacionalización de variables

Variables	Definición conceptual	Definición operacional	Dimensiones	Indicador	Valores finales	Tipo de variable	Escala de Medición
<p>Extracto hidroalcohólico de Piper aduncum “matico”.</p> <p>(Variable independiente)</p>	<p>Sustancia que, en forma concentrada, se extrae de otra y la cual conserva sus propiedades</p>	<p>Sustancia que se obtendrá a partir de los protocolos establecidos a base de las hojas y el tallo de Piper aduncum “matico” maceradas en una sustancia hidroalcohólica, la cual será utilizada para comprobar y comparar su efectividad antifúngica frente a cepas de <i>Candida albicans</i> ATCC10231</p>	<p>Extracto de hojas.</p> <p>Extracto de tallo.</p>	<p>Concentraciones</p>	<p>50 %</p> <p>75 %</p>	<p>Cualitativo</p>	<p>Ordinal</p>
<p>Efecto antifúngico</p> <p>(Variable dependiente)</p>	<p>Efectividad inhibitoria del crecimiento de levadura</p>	<p>Acción antifúngica que se determinará a partir del extracto hidroalcohólico, hojas y el tallo lo cual se determinará mediante los halos de inhibición frente a las cepas de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231</p>		<p>Halo de inhibición</p>	<p>mm</p>	<p>Cuantitativo</p>	<p>De razón</p>

4.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos:

4.4.1 Técnica: Observación microbiológica

4.4.2 Instrumento: Para medir los halos de inhibición se utilizó un calibrador Vernier digital marca Mitutoyo, Modelo 500-196-20, por estar calibrado y validado con el ISO de calidad 17025. (Anexo 1)

4.4.3 Recolección e identificación taxonómica de la especie vegetal

Se presentó un ejemplar completo de la especie vegetal se llevó al Herbarium Truxillense para su identificación taxonómica. (Anexo 2)

Se recolectó 1 kg de las hojas y 1 kg de tallos de *Piper aduncum* (matico) del Jardín Botánico de la Universidad Nacional de Trujillo (Anexo 3), del distrito de Trujillo, provincia de Trujillo, región La Libertad, ubicado a 34 m.s.n.m.

4.4.4. Preparación de la muestra vegetal^{44,45}

Selección:

Una vez recolectadas las hojas y tallos de *Piper aduncum*, estas fueron transportadas al laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo, donde se seleccionaron las hojas y tallos en buenas condiciones, sin ataques de hongos, ni decoloradas o marchitadas.

Lavado y desinfección:

Se lavó cada una de las hojas y los tallos con agua destilada y luego se desinfectó con hipoclorito de sodio al 0.5%.⁴⁵

Secado:

Las hojas y tallos fueron colocados en papeles Kraft, y se llevó a secar a una estufa de circulación de aire por convección forzada (40 °C) por 48 horas.

Pulverización:

Las hojas y tallos una vez secadas se pulverizaron con ayuda de un mortero.⁴⁵

Tamizaje:

Luego las hojas y tallos pulverizadas, fueron tamizadas a través del tamiz de malla N° 20.

Almacenamiento:

El polvo de las hojas y tallos de *Piper aduncum* se guardaron en sus respectivos frascos de vidrio de color ámbar de boca ancha.

4.4.5 Preparación de los extractos hidroalcohólico de las hojas y tallos de *Piper aduncum*, (matico)⁴⁵

Se pesaron por separado 100 g de polvo de hojas y 100 g de polvo de tallos de *Piper aduncum* y luego se colocaron en sus respectivos recipientes de vidrio de boca ancha color ámbar. Se le añadió etanol de 70° G.L. cantidad suficiente hasta cubrir la muestra por sobre 2 cm de altura. Se mezcló bien, teniendo en cuenta que la mezcla debe ocupar como máximo las $\frac{3}{4}$ partes del

recipiente. Se taparon los recipientes y se maceraron por 7 días, agitándose 15 minutos, dos veces al día.

Transcurrido el tiempo de maceración, se filtró los macerados usando una bomba de vacío, con papel de filtro Whatman N° 1. Al líquido filtrado se le denominó extracto hidroalcohólico.

A continuación, cada extracto hidroalcohólico se concentró en un rota vapor hasta obtener una masa siruposa. Esta se llevó a secar a la estufa a 40 °C. Al producto resultante se le denominó extracto seco. De estos, se preparó las concentraciones de 50% y 75% disueltas en etanol de 70 ° G.L. tanto de hoja como de tallo. Finalmente, los extractos etanólico de hojas y tallos fueron guardados en frascos de vidrio de color ámbar y en refrigeración (4-8°C) hasta su utilización^{34,35}

4.4.6 Evaluación del efecto del extracto hidroalcohólico de hojas y tallos de *Piper aduncum*, (matico) sobre *Cándida albicans* ATCC 10231.

a. Reactivación de la cepa de *Cándida albicans* ATCC 10231.

Para este estudio se utilizó cultivo liofilizado de la cepa de *Cándida albicans* 10231.

La reactivación se realizó sembrando el cultivo liofilizado en tubo con 5 mL de Caldo Sabouraud, luego se incubó a 37°C por 24 horas.

Para evaluar su pureza se sembró por estría en Agar Sabouraud e incubó a 37°C por 24 horas. Posteriormente se realizó coloración gram.

b. Identificación de *C. albicans*.

Después de reactivar la levadura, esta fue identificada mediante las siguientes pruebas Coloración Gram, formación de tubo germinal, formación de clamidosporas, y fermentación de carbohidratos.⁵

La cepa se mantuvo en caldo BHI y en Agar Sabouraud, hasta su posterior utilización⁴⁶

c. Preparación de las concentraciones del extracto hidroalcohólico de hoja y tallo de *P.aduncum*

A Partir del extracto etanólico hoja y tallo obtenido se procedió a preparar la concentración que fueron empleados en la investigación, como sigue:

- Extracto hidroalcohólico de hoja 50% y 75%
- Extracto hidroalcohólico de tallo 50% y 75%

d. Método de difusión en agar.

La evaluación del efecto de los extractos hidroalcohólico de hoja y tallo de *P.aduncum* se realizó mediante el método Kirby Bauer, de difusión en agar⁴⁷.

Para lo cual se procedió de la siguiente manera:

e. Estandarización del inóculo de *C. albicans* ATCC 10231.

Las cepa de *C. albicans* ATCC 10231 mantenidos en Caldo BHI y Agar

Sabouraud se sembraron en Agar Sabouraud, e incubó a 37°C durante 24 horas, con el fin de obtener colonias jóvenes.

Luego, de 24 horas cada colonia de *C. albicans* ATCC 10231 se colocó en solución salina fisiológica estéril y se hizo suspensiones con una turbidez semejante al tubo número 0.5 del Nefelómetro de Mac Farland (1.5×10^8 bact./mL).⁴⁵

f. Inoculación

Dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de la turbidez del inóculo (1.5×10^8 bact/ml), se tomó una alícuota de 100µl y se colocaron en cada una de las placas con Agar Müeller Hinton suplementado con 2 % de glucosa (AMHG), con un hisopo estéril sumergido en la suspensión se distribuyó la suspensión de la levadura en tres direcciones para asegurar una distribución uniforme del inóculo en la placa. Se dejó secar la placa a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos para que cualquier exceso de humedad superficial sea absorbido.⁴⁷

g. Preparación de los discos con el extracto hidroalcohólico de hoja y tallo de *P.aduncum*

Se preparó discos de papel filtro whatman número 3 estériles, los cuales fueron embebidos con 30 ul de cada una de las concentraciones de 50% y 75% de extracto hidroalcohólico de hoja y tallo respectivamente. Luego, con una pinza estéril, fueron colocados los discos sobre las placas de Müeller Hinton (AMHG) inoculadas con *C. albicans* ATCC 10231.⁴⁶

h. Incubación:

Se incubó las placas en posición invertida dentro de los 15 minutos posteriores a la aplicación de las sustancias a evaluar, a 37°C durante 24 horas.⁴⁶

i. Lectura de los resultados

Después del tiempo de incubación 24 horas se examinó cada placa y se midió los diámetros de los halos de inhibición (mm) del crecimiento alrededor de cada disco.⁴⁵ para lo cual se utilizó regla vernier Mitutoyo, abarcando el diámetro del halo.

Se inocularon 16 discos, por cada grupo experimental, usando 4 discos en cada placa Petri.

Se empleó como control positivo al Fluconazol y como control negativo etanol.

4.5. Plan de análisis

Los datos experimentales fueron ingresados en bases de datos en IBM SPSS Statistics versión 23 trabajándose con la prueba estadística ANOVA. Luego se realizó una prueba de comparación múltiple utilizando la prueba de Duncan. Ambas pruebas con un nivel de significancia al 5%. Los datos fueron organizados y presentados en Tablas y Gráficos estadísticos para su análisis e interpretación.

4.6 Matriz de consistencia

ENUNCIADO DEL PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	METODOLOGÍA	POBLACION Y MUESTRA
<p>¿Cuál de los extractos hidroalcohólicos de hoja y tallo de <i>Piper aduncum</i> “matico”, presenta mayor efecto antifúngico sobre <i>Cándida albicans</i> ATCC 10231?</p>	<p>Objetivo general: Comparar, in vitro, el efecto antifúngico entre el extracto hidroalcohólico de hoja y tallo de <i>Piper aduncum</i> “matico” sobre <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.</p> <p>Objetivos específicos: Comparar, in vitro el efecto antifúngico, del extracto hidroalcohólico de hoja de <i>Piper aduncum</i> “matico”, al 50% y 75% sobre <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.</p> <p>Comparar, in vitro el efecto antifúngico, del extracto hidroalcohólico de tallo de <i>Piper aduncum</i> “matico”, al 50% y 75% sobre <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.</p>	<p>El extracto hidroalcohólico de hoja de <i>Piper aduncum</i> (matico) presentan mayor efecto antifúngico frente a <i>Cándida albicans</i>.ATCC 10231.</p>	<p>Tipo de investigación</p> <p>Tipo cuantitativo</p> <p>Nivel de investigación</p> <p>Nivel explicativo.</p> <p>Diseño de la investigación</p> <p>Analítico, Prospectivo, Experimental, Transversal.</p>	<p>Población</p> <p>-Cepa de <i>Cándida albicans</i> ATCC 10231.</p> <p>Muestra</p> <p>-Será 100 uL de una suspensión obtenida a partir de la cepa de <i>Cándida albicans</i> ATCC 10231.</p>

4.6 Principios éticos:

Este estudio de investigación se fundamentó en el código de ética de la Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote, además al finalizar el estudio las placas Petri fueron expuestas a 121° C y 1 Bar de presión en autoclave. A fin de desechar el material biológico contaminado.

V. Resultados

5.1 Resultados

Tabla 1. Resultado mediante el diámetros (mm) de los halos de inhibición el efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de hojas de Piper aduncum “matico” en las concentraciones de 50%, 75% y controles frente a Cándida albicans ATCC 10231.

Concentración Repeticiones	50%	75%	fluconazol	etanol
1.	15	20	20	08
2.	15	20	21	10
3.	16	18	20	10
4.	16	18	20	09
5.	15	20	22	08
6.	15	20	21	10
7.	14	17	22	08
8.	15	18	21	08
9.	14	20	23	08
10.	14	20	22	10
11.	15	20	20	10
12.	15	18	22	09
13.	15	20	21	09
14.	15	20	23	08
15.	15	18	21	09
16.	15	18	20	10

Tabla 2: Resumen Descriptivo para el Efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de hojas de Piper aduncum “matico” en las concentraciones de 50% y 75% y Controles frente a Cándida albicans ATCC 10231, mediante el Diámetro (mm) de los halos de inhibición del crecimiento.

Tratamientos	Ni	Promedio	Desv. Est.
C -	16	9.00	0.894
C +	16	21.19	1.047
50% Piper aduncum “matico”	16	14.94	0.574
75% Piper aduncum “matico”	16	19.06	1.124

Se observa los promedios de los diferentes tratamientos, así el extracto hidroalcohólico de hojas de Piper aduncum (matico), al 75 % tiene un promedio de halo de inhibición de 19.06 mm de diámetro y con una desviación estándar de 1.124, ligeramente menor que el control positivo (fluconazol) que presenta un halo de inhibición de 21.19 mm de diámetro y con una desviación estándar de 1.047, siendo mayor que el extracto hidroalcohólico al 50 % que presenta un halo de inhibición de 14.94 mm de diámetro con una desviación estándar de 0.574, se observa que el control negativo (etanol) presenta un promedio de halo de inhibición de 9.00 mm de diámetro siendo el de menor diámetro de todo el grupo, con una desviación estándar de 0.894.

Se realiza la Prueba de Normalidad para cada grupo de Tratamientos de hojas de Piper aduncum “matico”. (Anexo 4)

Tabla 3: Análisis de Varianza para el Efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de hojas de Piper aduncum “matico” en las concentraciones de 50% y 75% y Controles frente a Cándida albicans ATCC 10231, mediante el Diámetro (mm) de los halos de inhibición del crecimiento.

F.V	SC	GI	CM	F	P
Entre grupos	1382.55	3	460.85	528.57	0.0000
Dentro de grupos	52.31	60	0.87		
Total	1434.86	63			

Se observa una diferencia altamente significativa entre los promedios de los efectos antifúngicos frente a cepas de Cándida albicans.

Tabla 4. Prueba de Duncan para el Efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de hojas de Piper aduncum “matico” en las concentraciones de 50% y 75% y Controles frente a Cándida albicans ATCC 10231, mediante el Diámetro (mm) de los halos de inhibición del crecimiento.

Tratamientos	ni	Grupo para alfa = 0.05			
		G1	G2	G3	G4
C -	16	9.0			
C +	16				21.2
50% Piper aduncum “matico”	16		14.9		
75% Piper aduncum “matico”	16			19.1	

Según la prueba de Duncan, todos los tratamientos difieren entre sí.

Tabla 5. Resultado mediante el diámetros (mm) de los halos de inhibición del efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de tallo de Piper aduncum “matico” en las concentraciones de 50%, 75% y controles frente a Cándida albicans ATCC 10231.

Concentración	50%	75%	fluconazol	Etanol
Repeticiones				
1.	0	10	20	08
2.	0	10	21	10
3.	0	12	20	10
4.	0	10	20	09
5.	0	10	22	08
6.	0	10	21	08
7.	0	12	19	09
8.	0	10	20	08
9.	0	12	20	10
10.	0	12	19	09
11.	0	12	21	08
12.	0	10	22	09
13.	0	12	21	09
14.	0	09	21	10
15.	0	09	19	09
16.	0	10	20	10

Tabla 6. Resumen Descriptivo para el Efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de tallo de Piper aduncum “matico” en las concentraciones de 50% y 75% y Controles frente a Cándida albicans ATCC 10231, mediante el Diámetro (mm) de los halos de inhibición del crecimiento.

Tratamientos	Ni	Promedio	Desv. Est.
C -	16	9.00	0.816
C +	16	20.38	0.957
50% Piper aduncum “matico”	16	0.00	0.000
75% Piper aduncum “matico”	16	10.63	1.147

Se observa los promedios de los diferentes tratamientos, así el extracto hidroalcohólico de tallo de Piper aduncum (matico), al 75 % tiene un promedio de halo de inhibición de 10.63 mm de diámetro y con una desviación estándar de 1.147, menor que el control positivo (fluconazol) que presenta un halo de inhibición de 20.38 mm de diámetro y con una desviación estándar de 0.957, altamente mayor que el control negativo (etanol) que presenta un halo de inhibición de 9.00 mm de diámetro, con una desviación estándar de 0.816, siendo mayor que el extracto hidroalcohólico de tallo al 50 % que presenta un halo de inhibición de 0.00 mm de diámetro con una desviación estándar de 0,00, estando por debajo de todo el grupo de los tratamientos.

Se realiza la Prueba de Normalidad para cada grupo de Tratamientos de tallo de Piper aduncum “matico”. (Anexo 5)

Tabla 7. Análisis de Varianza para el Efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de tallo de Piper aduncum “matico” en las concentraciones de 50% y 75% y Controles frente a Cándida albicans ATCC 10231, mediante el Diámetro (mm) de los halos de inhibición del crecimiento.

F.V	SC	GI	CM	F	P
Entre grupos	3344.50	3	1114.83	1537.70	0.0000
Dentro de grupos	43.50	60	0.73		
Total	3388.00	63			

Se observa una diferencia altamente significativa entre los promedios de los diferentes de los diferentes tratamientos antifúngicos, frente a cepas de Cándida albicans.

Tabla 8. Prueba de Duncan para el Efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de tallo de Piper aduncum “matico” en las concentraciones de 50% y 75% y Controles frente a Cándida albicans ATCC 10231, mediante el Diámetro (mm) de los halos de inhibición del crecimiento.

Tratamientos	Ni	Grupo para alfa = 0.05			
		G1	G2	G3	G4
C -	16		9.0		
C +	16				20.4
50% Piper aduncum “matico”	16	0.0			
75% Piper aduncum “matico”	16			10.6	

Según la prueba de Duncan se observa que los tratamientos antifúngicos difieren entre sí.

5.2 Análisis de resultados

Los resultados de esta investigación demostraron que el extracto hidroalcohólico procedente de las hojas de *Piper aduncum* presenta un mayor efecto antifúngico en comparación con el extracto hidroalcohólico de tallo. Esto se ve representado por un halo de inhibición de 14.94 mm para la concentración al 50% y 19.06 mm para una concentración al 75%. Resultados que coinciden con el estudio de Valle B ² encontrándose que el extracto de la hoja al 54.4% presentó un halo de inhibición de 13,8 mm siendo su mayor concentración, ya que trabajaron con concentraciones similares del 13,6 %, 27% y 40,8% respectivamente esto podría estar relacionado a los principios activos presentes en la extracción. De acuerdo con investigaciones mencionadas, la aplicación del aceite esencial obtenido a partir de hojas de *Piper aduncum* además de actuar como antibacteriano frente a ciertas especies presentó una marcada actividad antifúngica contra patógenos clínicos debido a la presencia de tres compuestos mayoritarios en la extracción, piperitona,⁴⁴ alcanfor y viridiflorol,⁴⁵ los autores no descartan la posibilidad de que estos compuestos se mantengan presentes en otro tipo de extracciones, como en el caso de extractos hidroalcohólicos,^{1,46} de esta manera la presencia de estos tres terpenos actuarían en conjunto al unirse a proteínas de la membrana celular alterando la permeabilidad de esta,⁴⁴ lo que ocasiona la liberación de fluidos vitales para la levadura mientras que en simultaneo terpenos del exterior ingresan para continuar actuando frente a los sistemas metabólicos.^{2,46}

Estudios recientes ⁴⁶ se enfocan en la resistencia antifúngica y virulencia de *Cándida*, en concreto en una ATPasa caracterizada como V-ATPasa ⁴⁷⁻⁴⁹ la cual se

encarga de la translocación de protones y consecuentemente mantener un pH ácido,⁴⁷ cuando los terpenos ingresan luego de romper la membrana celular crean un desbalance osmótico además de atacar membranas vacuolares internas que son puntos de acción en el recorrido de la V-ATPasa,^{48,49} de esta manera el principal factor generador de virulencia se ve afectado facilitando la susceptibilidad de *Cándida*³ frente al extracto de *Piper aduncum*. Sin embargo, los resultados del estudio de Tipula¹³ difieren de los resultados anteriores, demostrando que el 10% del extracto hidroetanólico de hojas de matico presenta un 16,8 mm de halo de inhibición, en este caso el mayor efecto antifúngico se explica por la combinación del extracto con quercentina comercial, un flavonoide producido de manera natural por *Piper aduncum*, con capacidad antifúngica la cual sumada a la quercentina natural arrastrada en el extracto actuarían potenciando y amplificando el efecto,⁴⁴ lo cual explica que de manera complementaria modificaciones en el pH modelan un ambiente hostil para el desarrollo de esta levadura, esto se lograría a ciertos flavonoides presentes en *Piper aduncum* en concreto la quercentina,⁴⁷ la cual con un pH alcalino altera el medio en donde *Cándida* habita controlando así el desarrollo de las levaduras que aun permanezcan viables y al tener alteraciones a nivel de membrana este flavonoide puede ingresar actuando en sinergia con los terpenos para alterar las funciones metabólicas, potenciado así el efecto antifúngico en conjunto con los principios activos que son arrastrados en el extracto hidroalcohólico⁴.

Sin embargo, a diferencia del extracto hidroalcohólico de las hojas, también se hizo un análisis del efecto antifúngico del tallo de *Piper aduncum* a las concentraciones de 50% y 75% frente a *Cándida albicans*, encontrándose que a la concentración del 50% no presenta efecto inhibitorio ni actividad antifúngica, mientras que al 75%

presenta un 10,63 mm de halo de inhibición. Se ha comprobado mediante estudios ^{31,32} que el tallo de *Piper aduncum* presenta menos actividad fitoquímica ³² en donde la principal diferencia en la mayor acción del extracto de hojas frente a tallo radica en la capacidad de este último para transportar savia, sales minerales y agua, dejando un menor espacio y capacidad para concentrar los agentes antimicrobianos en comparación con las hojas, que al no cumplir funciones de captación y transporte de nutrientes como el tallo quedan libres para realizar un mayor metabolismo y producir los agentes antimicrobianos⁵.

Por lo tanto, mediante este estudio se pudo identificar que lo ideal para lograr un efecto antifúngico es la utilización del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Piper aduncum* tanto a las concentraciones de 50% y 75%, sin embargo, lo recomendable sería a la concentración del 75% para lograr mejores resultados. No obstante, los resultados respecto a la comparación del control positivo y negativo, el extracto hidroalcohólico de hojas de *Piper aduncum* (matico) al 75 % tiene un promedio de halo de inhibición de 19.06 mm de diámetro, ligeramente menor que el control positivo (fluconazol) que presenta un halo de inhibición de 21.19 mm de diámetro, siendo mayor que el extracto hidroalcohólico al 50 % y que el control negativo (etanol). El fluconazol es el antifúngico por elección para el tratamiento de *Cándida albicans* por su amplio espectro,^{4,9} sin embargo, los estudios demuestran que genera resistencia ante las cepas de *cándida*,^{1-7,16,19,27,35} lo que a la larga, el tratamiento será considerado por altas concentraciones del fármaco, es por ello que se busca productos naturales que cumplan con las mismas funciones y no generen esta resistencia bacteriana ^{32,34} y proporcionando mayores beneficios como lo ha demostrado ser el *piper aduncum* frente a *cándida albicans*.¹⁻¹⁰ Las diferencias entre el control positivo y la

concentración de 75% del extracto hidroetanólico de las hojas de matico no son significativamente estadísticas, por lo tanto se puede considerar que la concentración de 75% es la ideal.

Al trabajar con productos naturales como las plantas existen muchos factores que considerar como: lugar de muestreo, estación del año, hora del muestreo, tipo de extracción, solvente de extracción y la metodología para evaluar la actividad antifúngica; lo que puede influir en la comparación de los resultados con otras investigaciones; además no se abordó en profundidad el estudio fitoquímico de las plantas de estudio porque este se limitó a los objetivos planteados.

VI. Conclusiones

El extracto hidroalcohólico en hoja, presenta mayor efecto antifúngico en comparación al tallo, en las concentraciones al 50% y 75%.

El control positivo (Fluconazol), presentó mejor mayor efecto antifúngico, tanto en hoja como en tallo.

El control negativo (etanol), presentó menor efecto antifúngico, tanto en hoja como en tallo.

Recomendaciones:

- Se recomienda realizar estudios de nivel aplicativo donde se pueda valorar el efecto de colutorios, geles, barnices a base de la hoja y tallo de Piper aduncum (matico).
- Se recomienda realizar estudios comparativos entre extractos que usen solventes diferentes al etanol.

VII. Referencias Bibliográficas

1. Ruiz J. Actividad antifúngica in vitro y concentración mínima inhibitoria mediante microdilución de ocho plantas medicinales. [Tesis para optar el título de cirujano dentista]. Lima: Universidad Mayor de San Marcos;2013. Disponible en: http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/2590/Ruiz_qj.pdf?jsessionid=1F6BF2B371296F3F4F190AB4B49548DB?sequence=1
2. Valle B, Yanac A. Efecto del extracto hidroalcohólico de las hojas de Piper ‘p0aduncum “Matico” sobre el crecimiento de Candida albicans in vitro, procedentes del distrito de Otuzco-La Libertad. [Tesis para optar el título de cirujano dentista]. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo.2014. Disponible en:<http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/888/browse?value=Piper+aduncum &type=subject>
3. Farah C, Lynch N, McCullough M. Oral fungal infections: an update for the general practitioner. Aust Dent J 2010; 55 Supl 1:48–54. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20553244>
4. Giannini P, Shetty K. Diagnosis and management of oral candidiasis. Otolaryngol Clin N Am 2011; 44:231–40. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21093632>
5. Salazar M, Sacsquispe S. J. Presencia de hifas de Candida en adultos con mucosa oral clínicamente saludable. Rev Estomatol Herediana 2005; 15(1):54–59. Disponible en: D:\semi-hardisck\MedIntContenido04_04_5.pdf
6. Noonan V, Kabani S. Diagnosis and management of suspicious lesions of the oral cavity. Otolaryngol Clin N Am 2005; 38:21–35. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15649496>
7. Infecciones orales. En: Sapp J, Eversole L, Wysocki, G. Patología oral y maxilofacial contemporánea. 2 ed. Amsterdam: Elsevier España; 2005. p. 240–46. Disponible en:<https://books.google.com.ec/books?id=quNVwwFOmfgC&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false>
8. Delgado W, Aguirre J. Las micosis orales en la era del sida. Rev Iberoam Micol 1997; 14:14-22. Disponible en: <file:///D:/semi-hardisck/014022.pdf>
9. Soysa N, Samaranayake L, Ellepola ANB. Antimicrobials as a contributory factor in oral candidosis – a brief overview. Oral Dis 2008; 14, 138–43. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18302673>

10. Navarro-Garcia V, Gonzalez A, Fuentes M, Aviles M, Rios M, Zepeda G, Rojas M. Antifungal activities of nine traditional Mexican medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 2003; 87(1):85-8. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12787958>

11. Lopez S, Castelli M, Zacchino S, Dominguez J, Lobo G, Charris-Charris J, et al. In vitro antifungal evaluation and structure-activity relationships of a new series of chalcone derivatives and synthetic analogues, with inhibitory properties against polymers of the fungal cell wall. *Bioorg Med Chem* 2001; 9(8): 1999-2013. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11504637>

12. Avellaneda, S., Rojas, N., Cuellar, R. y Fonseca, R. Actividad antibacteriana de *Diphyssa minutifolia* Rose. *Rev Cubana Plant Med.*, 2005. 10 (2), 1-10. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962005000200004

13. Tipula M. Efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de hojas de *Piper angustifolium* “Matico” sobre cepas de *Cándida albicans* comparada con la nistatina, estudio in vitro. [Tesis para optar el título de médico cirujano]. Trujillo: Universidad César Vallejo. 2016. Disponible en: repositorio.ucv.edu.pe/bitstream/handle/UCV/596/tipula_dm.pdf?sequence=1

14. Vega L, Salazar L. Cuantificación espectrofotométrica de taninos en hojas de *piper aduncum* procedentes de la provincia de Otuzco, departamento La Libertad. [Tesis para optar el título de químico farmacéutico]. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo. 2014. Disponible en: <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/3765>

15. Soto M. Estudio fotoquímico y cuantificación de flavonoides totales de las hojas de *Piper peltatum* L. y *Piper aduncum* L. procedentes de la región de Amazonas. In *Crescendo*. Institucional. 2015; 6(1): 105-116. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/279516871_Estudio_fitoquimico_y_cuantificacion_de_flavonoides_totales_de_las_hojas_de_Piper_peltatum_L_y_Piper_aduncum_L_procedentes_de_la_region_Amazonas

16. Braga F, Bouzada R, 2007. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *J Ethnopharmacol*. 111: 396-402.

17. Vásquez S. Efecto fungicida del aceite esencial de *Piper angustifolium* en el tratamiento de candidiasis bucal subprotésica. Tesis de licenciatura en odontología. Lima Universidad de san Martín de Porres; 2003.

18. Regezi J, Sciucca J. Patología bucal. 1 ed. México Interamericana- McGraw-Hill; 1991. 114-5. Disponible en: <https://4tousac.files.wordpress.com/2012/01/regezzi-patologia-bucal-clinicopatolc3b3gicasevolucionodontologica1.pdf>
19. Negroni M. Microbiología estomatológica: Fundamentos y guía práctica. 2° ed. Buenos Aires: Medica panamericana.2009. Disponible en: <https://www.medicapanamericana.com/Libros/Libro/6103/Microbiologia-Estomatologica.html>
20. Scully C. Lakshman P. Candida and oral candidosis: A review. Critical Reviews in Oral Biology and Medicine. 2004; 5(2):125-157. Disponible en: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/10454411940050020101>
21. Rodríguez J. Miranda J. Candidiasis de la mucosa bucal. Revisión bibliográfica. Rev Cubana Estomatol. 2002; 39 (2): 1-9. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S00347507200200020007
22. Davicino R., M.. Mattar, Y. Casali, S. Correa, E. Pettenati & B. Micalizzi. 2007. Actividad antifúngica de extractos de plantas usadas en medicina popular en Argentina. Rev. peru. biol. 14(2): 247-251. Disponible en: <https://www.redalyc.org/html/1950/195014939014/>
23. Dabur R., H. Singh, A. Chhillar, M. Ali & G.L. Sharma. 2004. Antifungal potential of Indian medicinal plants. Fitoterapia 75(3-4): 389-391. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15159003>
24. Fenner R., M. Sortino, S. Rates, R. Dall'Agnol, A. Ferraz, et al. 2005. Antifungal activity of some Brazilian Hypericum species. Phytomedicine 12(3):236240. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/262448602_Actividad_antifungica_in_vitro_de_extractos_crudos_de_Piper_tuberculatum
25. Zhang J., Y. Cao, Z. Xu, H. Sun, M. An, L. Yan, H.S. Chen, R.. Gao, Y. Wang, X. Jia & Y. Jiang. 2005. In vitro and in vivo antifungal activities of the eight steroid saponins from Tribulus terrestris L. with potent activity against fluconazole-resistant fungal pathogens. Biol. Pharm. Bull. 28(12): 2211- 2215. Disponible en: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Zhang+J.D.%2C+Y.B.+Cao%2C+Z.+Xu%2C+H.H.+Sun%2C+M.M.+An%2C+L.+Yan%2C+H.S.+Chen%2C+R.H.+Gao%2C+Y.+Wang%2C+X.M.+Jia+%26+Y.Y.+Jiang.+2005.+In+vitro+and+in+vivo+antifungal+activities++Biol.+Pharm.+Bull.+28\(12\)%3A+2211-2215.](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Zhang+J.D.%2C+Y.B.+Cao%2C+Z.+Xu%2C+H.H.+Sun%2C+M.M.+An%2C+L.+Yan%2C+H.S.+Chen%2C+R.H.+Gao%2C+Y.+Wang%2C+X.M.+Jia+%26+Y.Y.+Jiang.+2005.+In+vitro+and+in+vivo+antifungal+activities++Biol.+Pharm.+Bull.+28(12)%3A+2211-2215.)

26. Ucar A, Rojas M, Lelis B. Acción de agentes químicos en la eliminación de *Candida albicans* sobre prótesis dentales. 2005; 45(2): 7-10. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-63652007000200007
27. D. Jesus, J. Oliveira, F. Oliveira, K. Higa, J. Junqueira, A. Jorge, G. Back-Brito, L. Oliveira D. Persea americana Glycolic Extract: In Vitro Study of Antimicrobial Activity against *Candida albicans* Biofilm and Cytotoxicity Evaluation. The Scientific world Journal .2015; 10(11):1-5. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26605376>
28. Jesus D, Oliveira R, Améndola I, Jorge A, Back G, Oliveira L. Antifungal effect in vitro of vegetal extracts against *Candida albicans* planktonic cells and biofilm. 2011; 71 (4): 1-5. <https://sbmicrobiologia.org.br/cd28cbm/resumos/R1189-2.PDF>
29. Vidotto V, Mantoan B, Pugliese A, Ponton J, Quindos G. (2003) Adherence of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to bucal and vaginal cells. Rev Iberoam Micol; 20(2):52-4. Disponible en: <file:///D:/semi-hardisck/052054.pdf>
30. Vidotto V, Ponton J, Aoki S, Quindos G. (2004) Differences in extracellular enzymatic activity between *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* isolates. Rev Iberoam Micol; 21(2):70-4. Disponible en: [file:///C:/Users/USER/Downloads/988-1-3824-1-10-20160327%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/USER/Downloads/988-1-3824-1-10-20160327%20(1).pdf)
31. Vitela MM, Kamei K, Sano A, Tanaka R, Uno J. (2002) Pathogenicity and virulence of *Candida dubliniensis*: comparison with *Candida albicans*. Med Mycol; 40(3):249. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12146754>
32. Tirillini B, Velasquez E, Pellegrino R. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Piper angustifolium*. Planta Med. 2006; 62(4):372-373. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8792674>
33. Cheikhoussef A, Shapi M, Matengu K, Mu Ashekele H. Estudio etnobotánico del conocimiento indígena sobre el uso de plantas medicinales por los curanderos tradicionales en Región de Oshikoto, Namibia. Revista de Etnobiología y Ethnomedicine 2011; (7): 1-10.
34. Danelutte A, Lago J, Young M, Kato M. Antifungal flavonones and prenylated hydroquinones from *Piper crassinervum* Kunth. Phytochemistry. 2003. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12943774>

35. Ruiz R. Actividad antifúngica In Vitro y Concentración Mínima Inhibitoria mediante microdilución de ocho plantas medicinales (TESIS Para optar el Grado Académico de Magíster en Microbiología) Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima 2008. Disponible en: http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/2590/Ruiz_qj.pdf;jsessionid=1F6BF2B371296F3F4F190AB4B49548DB?sequence=1
36. Guerrini A, Sacchetti G, Rossi D, Paganetto G, Muzzoli M, Andreotti E, et al. Bioactivities of *Piper aduncum* L. and *Piper obliquum* Ruiz & Pavon (Piperaceae) essential oils from Eastern Ecuador. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2009; 27(1):39–48. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21783920>
37. Hernandez S, Fernandez C, Baptista L. Metodología de la Investigación. 5ta Edición. México: McGraw Hill, 2010. Disponible en: <https://www.google.com/search?q=34.+Hernandez+SR%2C+Fernandez+CC%2C+Baptista+LC.+Metodolog%C3%ADa+de+la+Investigaci%C3%B3n.+5ta+Edici%C3%B3n.+M%C3%A9xico%3A+McGraw+Hill%2C+2010.&aq=34.+Hernandez+SR%2C+Fernandez+CC%2C+Baptista+LC.+Metodolog%C3%ADa+de+la+Investigaci%C3%B3n.+5ta+Edici%C3%B3n.+M%C3%A9xico%3A+McGraw+Hill%2C+2010.&aqs=chrome..69i57j4&sourceid=chrome&ie=UTF-8>
38. Soto-Vásquez, M. Estudio fitoquímico y cuantificación de flavonoides totales de las hojas de *Piper peltatum* L. y *Piper aduncum* L. procedentes de la región Amazonas. Disponible en: <http://revistas.uladech.edu.pe/index.php/increscendo/article/view/824>
39. Cantón L.E; Martín M.; Espinel-Ingroff .A. Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos. 2007. Revista Iberoamericana de Micología - ISBN: 978-84-611-8776-8. Disponible en: <file:///D:/semi-hardisk/Capitulo15.pdf>
40. Clinical Laboratory Standard Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty third Information Supplement. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute); M100-S23. 2013. Vol 33 (1). Disponible en: <file:///C:/Users/USER/Downloads/CLSI2013.pdf>
41. Cruz-Carrillo, A., Rodríguez N.,N., Rodríguez, C.E. EVALUACIÓN IN VITRO DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DE LOS EXTRACTOS DE *Bidens pilosa*, *Lantana camara*, *Schinus molle* Y *Silybum marianu* Rev. U.D.CA Act. & Div. Cient. 2010 . 13 (2): 117-124. Disponible en: <file:///D:/semi-hardisk/v13n2a14.pdf>

42. Monzote L, Scull R, Cos P, Setzer WN. Essential Oil from *Piper aduncum*: Chemical Analysis, Antimicrobial Assessment, and Literature Review. *Medicines (Basel)*. 2017;4(3):49. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28930264>
43. Soto, F. caracterización química, fitoquímica y antibacteriana in vitro de las hojas del *Anacardium occidentale* L. (Marañón). [Tesis para optar el grado de máster] Química-Biológica. Granma: Universidad de Granma. (2011). Disponible en: <http://revistas.uladech.edu.pe/index.php/increscendo/article/view/824>
44. Lock, O. (1994). Investigación fitoquímica; Métodos en el estudio de productos naturales. 2.^a ed. Lima: Fondo Editorial Pontificia Universidad Católica del Perú 2004. Disponible en: http://departamento.pucp.edu.pe/ciencias/pub_dpto/investigacion-fitoquimica-metodos-en-el-estudio-de-productos-naturales/
45. Lepš Jan, Novotný Vojtěch, Čížek Lukáš, Molem Kenneth, Isua Brus et al. Successful invasion of the neotropical species *Piper aduncum* in rain forests in Papua New Guinea. *Applied Vegetation Science*. 2002;5: 255-262. Disponible en: <https://besjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-2656.2002.00608.x>
46. Perić M, Rajković K, Milić Lemić A, Živković R3, Arsić Arsenijević V. Development and validation of mathematical models for testing antifungal activity of different essential oils against *Candida* species. *Arch Oral Biol*. 2019; 98:258-264. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30530237>
47. Miyazaki T, Shimamura S, Nishikawa H, Nakayama H, Takazono T et al. Vacuolar proton-translocating ATPase is required for antifungal resistance and virulence of *Candida glabrata*. *PLoS One*. 2019;14(1):e0210883. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0210883>
48. Jurasekova Z, Domingo C, Garcia-Ramos JV, Sanchez-Cortes S. Effect of pH on the chemical modification of quercetin and structurally related flavonoids characterized by optical (UV-visible and Raman) spectroscopy. *Phys Chem Chem Phys*. 2014;16(25):12802-11. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24836778>
49. Bernuci K, Iwanaga C, Fernandez-Andrade C, Lorenzetti FB, Torres-Santos EC et al. Evaluation of Chemical Composition and Antileishmanial and Antituberculosis Activities of Essential Oils of Piper Species. *Molecules*. 2016;21(12). pii: E1698. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5751174/>

ANEXOS

Anexo 1

*Vernier digital marca Mitutoyo, Modelo 500-196-20 ABSOLUTE Digimatic Caliper
0-150mm / 0-6", por estar calibrado y validado con ISO de calidad 17025*



Anexo 2

Constancia Taxonómica de *Piper aduncum*, por la
Universidad Nacional de Trujillo.



Herbarium Truxillense (HUT)

Universidad Nacional de Trujillo
Facultad de Ciencias Biológicas
Jr. San Martín 392, Trujillo - Perú



Constancia N° 98 – 2017- HUT

EL DIRECTOR DEL HERBARIUM TRUXILLENSE (HUT) DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO.

Da Constancia de la determinación taxonómica de un (01) espécimen vegetal:

- Clase: Equisetopsida
- Subclase: Magnoliidae.
- Super Orden: Magnolianae
- Orden: Piperales
- Familia: Piperaceae
- Género: ***Piper***
- Especie: ***P. aduncum* L.**
- Nombre común: "matico"

Muestra alcanzada a este despacho por VANESSA LILIANA TAPIA CASTAÑEDA, identificado con DNI: 43288378, con domicilio legal en Calle Sucre N° 727- Chicago-Trujillo. Estudiante de la Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela Profesional de Odontología de la Universidad Católica los Angeles de Chimbote- Sede Trujillo, cuya determinación taxonómica servirá para la realización del Proyecto de Tesis: "Efecto antifúngico, *in vitro*, entre el extracto hidroalcohólico de hojas y tallo de *Piper aduncum* "matico" sobre *Candida albicans* ATCC 10231, Trujillo-2018".

Se expide la presente Constancia a solicitud de la parte interesada para los fines que hubiera lugar.

Trujillo, 08 de noviembre del 2017




D. JOSE MOSTACERO LEON
Director del Herbario HUT

E- mail: herbariumtruxillensehut@yahoo.com

Anexo 3

*Constancia de Piper aduncum cultivada de manera natural en el Campus de la
Universidad Nacional de Trujillo.*

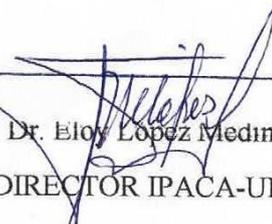
**EL DIRECTOR DEL INSTITUTO DE LA PAPA Y CULTIVOS
ANDINOS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO**

Hace constar que:

Las plantas de *Piper aduncum* (L.) “Matico”, que crecen dentro del área de investigación del Instituto, sito en el Campus de la Ciudad Universitaria, Universidad Nacional de Trujillo, son cultivadas de manera natural sin el uso de fertilizantes químicos, ni plaguicidas, catalogándose como un cultivo orgánico.

Trujillo, 10 de noviembre del 2017.




Dr. Eloy López Medina
DIRECTOR IPACA-UNT.

Anexo 4

*Pruebas de normalidad para el grupo control de hoja de
Piper aduncum “matico”*

Prueba de Normalidad para cada Grupo de Tratamientos de hojas de Piper aduncum “matico”.

Tratamientos	Shapiro- Wilk P
C -	0.053
C +	0.067
50% Piper aduncum “matico”	0.082
75% Piper aduncum “matico”	0.059

Interpretación: Se evidencia el incumplimiento del supuesto de normalidad.

Anexo 5

*Pruebas de normalidad para el grupo control de tallo
de Piper aduncum “matico”*

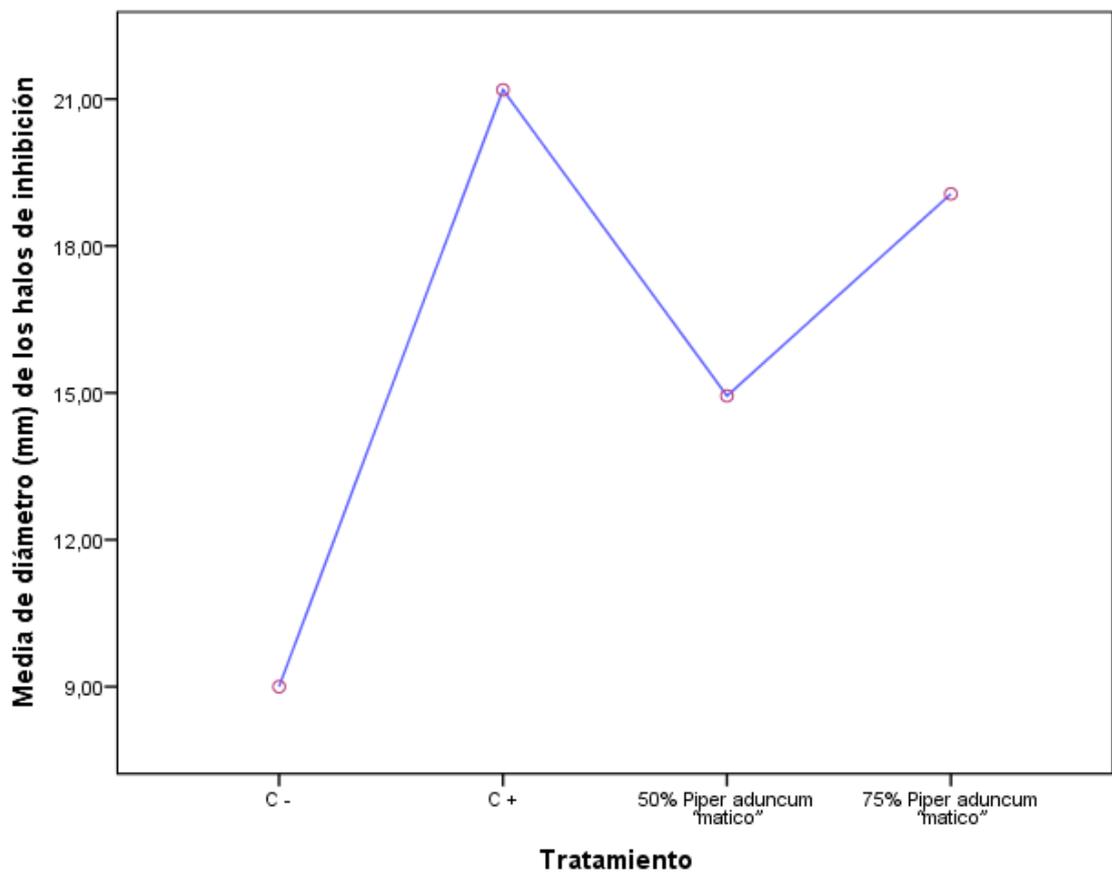
Prueba de Normalidad para cada Grupo de Tratamientos de tallo de Piper aduncum “matico”.

Tratamientos	Shapiro- Wilk P
C -	0.065
C +	0.051
50% Piper aduncum “matico”	0.072
75% Piper aduncum “matico”	0.083

Interpretación: Se evidencia el incumplimiento del supuesto de normalidad.

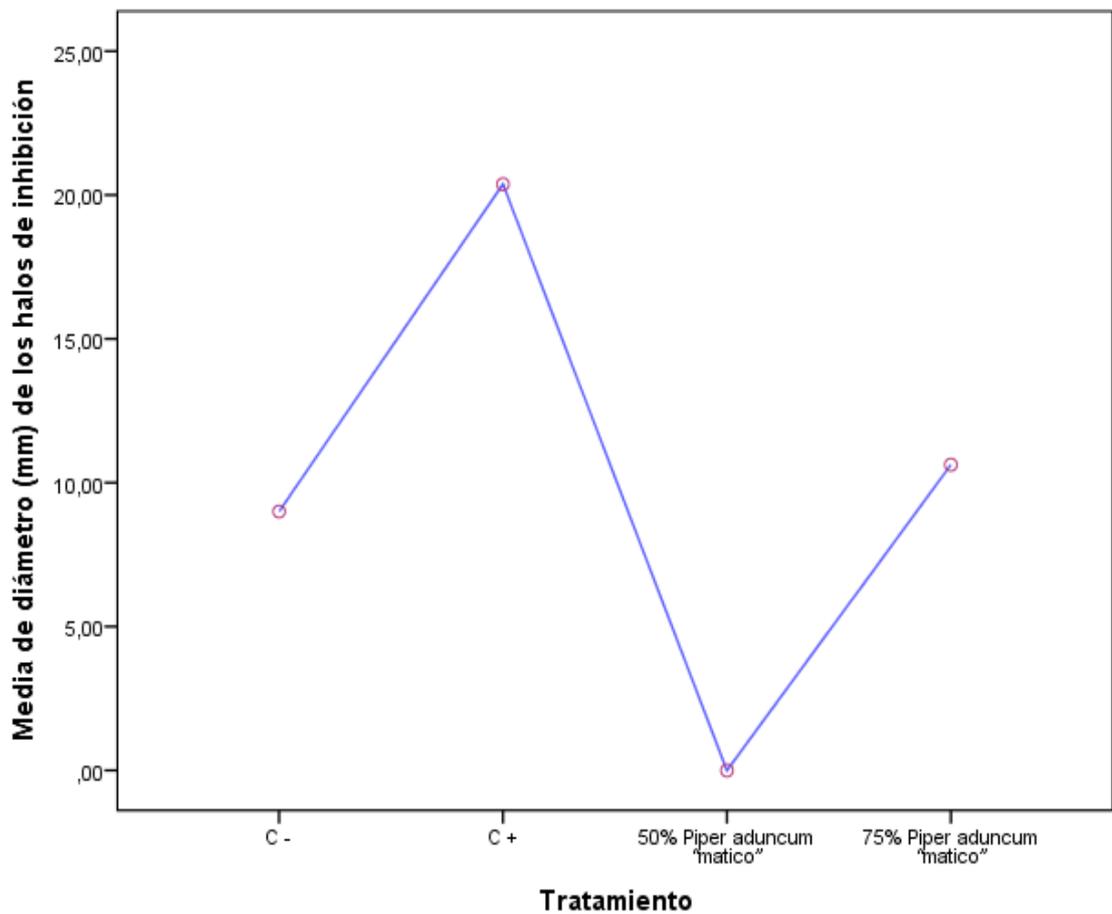
Anexo 6

Gráfico 1: Medias de los halos de inhibición de los grupos controles y de las concentraciones al 50% y 75% de la hoja de *Piper aduncum*, frente a *Cándida albicans*



Anexo 7

Gráfico 2: Medias de los halos de inhibición de los grupos controles y de las concentraciones al 50% y 75% del tallo de *Piper aduncum*, frente a *Cándida albicans*



Anexo 8

Constancia de colaboración de Marilú Roxana Soto Vásquez, Dra en Farmacia y Bioquímica, en la ejecución del proyecto de investigación.

CONSTANCIA DE COLABORACIÓN

Yo, MARILÚ ROXANA SOTO VÁSQUEZ, docente de la Cátedra de Farmacognosia del Departamento Académico de Farmacotecnia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo, con código UNT 5727.

Mediante la presente dejo constancia de haber colaborado en la preparación de la muestra vegetal y de las concentraciones de los extractos hidroalcohólicos de *Piper aduncum*, en el laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo, a la alumna TAPIA CASTAÑEDA VANESSA LILIANA, identificada con DNI 43288378, con domicilio legal en la calle Sucre # 727- Chicago, estudiante de la Facultad de Ciencias de Salud, Escuela Profesional de Odontología de la Universidad Católica los Ángeles de Chimbote .

Asimismo, las concentraciones de ensayo preparadas, serán utilizadas para la ejecución de la tesis titulada "EFECTO ANTIFÚNGICO, *in vitro*, ENTRE EL EXTRACTO HIDROALCÓHOLICO DE HOJAS Y TALLO DE *Piper aduncum* (MATICO) SOBRE *Candida Albicans*. ATCC 10231"

Se expide esta constancia, a solicitud de la interesada, para los fines que estime pertinentes.




Dra. Marilú Roxana Soto Vásquez
Docente de la Facultad de Farmacia y Bioquímica
Cátedra de Farmacognosia
Universidad Nacional de Trujillo

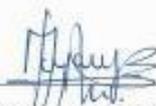
Anexo 9

*Constancia de colaboración de Manuela Natividad Luján Velásquez,
bióloga- Microbióloga, en la ejecución del proyecto.*

CONSTANCIA

Yo, Manuela Natividad Luján Velásquez, Biólogo – Microbiólogo, docente de la Escuela de Microbiología y Parasitología, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo, con registro del CBP N° 2132.

Mediante la presente dejo constancia de haber colaborado con la alumna TAPIA CASTAÑEDA VANESSA LILIANA, estudiante de la Facultad de Odontología de la Universidad Los Ángeles de Chimbote, identificado con DNI 43288378 y con domicilio en Calle Sucre # 727 – Chicago. en la ejecución de la parte microbiológica planteada en el proyecto de investigación titulado “EFECTO ANTIFÚNGICO, *in vitro*, ENTRE EL EXTRACTO HIDROALCÓHOLICO DE HOJAS Y TALLO DE *Piper aduncum* (Matico) SOBRE *Candida Albicans*. ATCC 10231, Trujillo – 2018”.



Manuela Natividad Luján Velásquez

Docente de la Escuela de Microbiología y Parasitología
Universidad Nacional de Trujillo

Dra. Manuela Natividad Luján Velásquez
CATEDRA DE INMUNOLOGÍA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO

Anexo 10

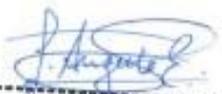
*Constancia de colaboración de Luis Alfredo Angulo Elorreaga,
Ingeniero Estadístico, en la ejecución del proyecto de investigación.*

CONSTANCIA

Yo, Luis Alfredo Angulo Elorreaga, con DNI 47383050, Ingeniero Estadístico de la Universidad Nacional de Trujillo, con COESPE N° 1159.

Mediante el presente dejo constancia de haber colaborado con la alumna TAPIA CASTAÑEDA VANESSA LILIANA, con DNI 43288378, con domicilio legal en la calle Sucre # 727, Barrio Chicago – Trujillo, estudiante de la facultad de Ciencias de la Salud, Escuela Profesional de Odontología de la Universidad Los Ángeles de Chimbote.

Se consta que se colaboró con el análisis estadístico de la tesis titulada “Efecto antifúngico, *in vitro*, entre el Extracto Hidroalcohólico de Hojas y Tallo de *piper aduncum* (matico) sobre *candida albicans*. ATCC 10231, Trujillo 2018”


Luis Alfredo Angulo Elorreaga
INGENIERO ESTADISTICO
COESPE N° 1159

FIRMA
Luis Alfredo Angulo Elorreaga
COESPE N° 1159

Anexo 11

Procedimiento

1. Recolección e identificación taxonómica de la especie vegetal



2. Preparación de la muestra vegetal



3. *Preparación de los extractos hidroalcohólico de las hojas y tallos de Piper aduncum, (matico).*



4. *Evaluación del efecto del extracto hidroalcohólico de hojas y tallos de Piper aduncum, (matico) sobre Candida albicans ATCC 10231.*

a. *Reactivación de la cepa*



b. *Método de difusión en agar.*



c. *Estandarización del inóculo de C. albicans*



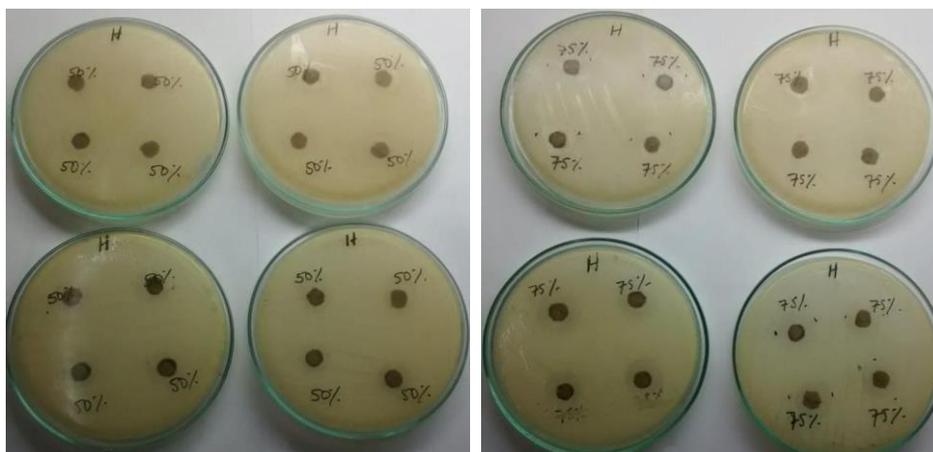
d. *Preparación de los discos con el extracto hidroalcohólico de hoja y tallo de P.aduncum.*





e. Resultados

Halos de inhibición presentes en los discos de extractos hidroalcohólico de hoja al 50% y 75%



Halos de inhibición presentes en los discos de extractos hidroalcohólico de tallo al 50% y 75%.

