



**UNIVERSIDAD NACIONAL
“PEDRO RUIZ GALLO”**



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE
MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA**

**“SUSCEPTIBILIDAD DE CEPAS DE *Candida albicans* A
DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO
ETANÓLICO DE LA CÁSCARA DE *Punica granatum*”**

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO DE LICENCIADO EN:

BIOLOGIA – MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA

PRESENTADO POR:

BR. MACO SERQUÉN, LOUISIANA DEL MILAGRO

LAMBAYEQUE – PERU

2017

**UNIVERSIDAD NACIONAL
“PEDRO RUIZ GALLO”**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE
MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA**

**“SUSCEPTIBILIDAD DE CEPAS DE *Candida albicans* A
DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO
ETANÓLICO DE LA CÁSCARA DE *Punica granatum*”**

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO DE LICENCIADO EN:

BIOLOGIA – MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA

PRESENTADO POR:

BR. MACO SERQUÉN, LOUISIANA DEL MILAGRO

LAMBAYEQUE – PERU

2017



**UNIVERSIDAD NACIONAL
"PEDRO RUIZ GALLO"**



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE
MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA**

**"SUSCEPTIBILIDAD DE CEPAS DE *Candida albicans* A
DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO
ETANÓLICO DE LA CÁSCARA DE *Punica granatum*"**

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN BIOLOGIA – MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA

APROBADO POR:

Mblga. Teresa Silva García

JURADO, Presidente

Dra. Gianina Llontop Barandiarán

JURADO, Secretario

Lic. Julio Cesar Silva Estela

JURADO, Vocal

Lic. Mario Moreno Mantilla

PATROCINADOR

LAMBAYEQUE – PERU

2017

DEDICATORIA

A DIOS

Por la vida, y los hermosos padres que me dio, por la dicha de poder compartir con ellos cada paso que doy; y por hacer de la microbiología mi mayor pasión.

A MIS PADRES SUSANA Y MARTÍN

Por ser el mejor ejemplo de entrega y dedicación, porque con su amor y ternura me encaminan hacia el éxito y porque día a día me brindan incondicional apoyo.

A MI HERMANO TADEO

Por ser amigo y compañero, mi respaldo en todo momento.

A MI ABUELITO ABSALÓN

Por sus grandes enseñanzas y consejos, por mostrarme de manera dulce que se puede llegar lejos.

LOUISIANA DEL MILAGRO

AGRADECIMIENTO

A DIOS

Por su infinito amor y bondad, porque está conmigo en todo momento, y por permitirme alcanzar mis sueños.

A MIS PADRES SUSANA Y MARTÍN

Por su amor y lucha constante, por todas sus enseñanzas y por hacer de mí una persona de bien.

A MI HERMANO TADEO

Por ser parte de mí día a día, y compartir conmigo tan buenos momentos.

A MI ABUELITO ABSALÓN

Por su dedicación y entrega, por compartir conmigo sus enseñanzas, su humildad y cariño.

LOUISIANA DEL MILAGRO

AGRADECIMIENTO

A MI ASESOR MARIO MORENO MANTILLA

Por cada una de sus enseñanzas, por contribuir de manera fundamental en el desarrollo del presente trabajo, por ser mi guía, amigo y maestro.

A MI PROFESOR JORGE FUPUY CHUNG

Por su amistad y motivación, por el apoyo en la realización del presente trabajo y por cada uno de sus consejos y enseñanzas.

A MIS PROFESORES GIANINA, JULIO Y TERESA

Porque además de ser mis maestros son mis amigos, por el aporte en el desarrollo de mi carrera profesional, y por la ayuda recibida siempre.

LOUISIANA DEL MILAGRO

INDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	2
III. MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.1 MATERIALES	11
3.1.1 Material biológico	11
3.2 MÉTODOS Y TÉCNICAS	11
3.2.2 Población y muestra en estudio	11
3.2.3 Obtención del extracto etanólico a partir de la cáscara de <i>Punica granatum</i> (González, V. 2005)	12
3.2.4 Concentraciones del extracto etanólico de <i>Punica granatum</i> (Granada)	15
3.2.5 Efecto inhibitorio del extracto etanólico de <i>Punica granatum</i> (Granada)	15
1. Identificación de las cepas de <i>Candida albicans</i>	15
2. Preparación y estandarización del inóculo fúngico	16
3. Evaluación de la susceptibilidad de <i>Candida albicans</i> frente al extracto etanólico de <i>Punica granatum</i>	16
3.2.6 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) del extracto etanólico de <i>Punica granatum</i> sobre <i>Candida albicans</i> . Método de macrodilución en tubo según Norma Técnica Peruana N° 30 del INS	18

3.2.7	Diseño de Contrastación	19
3.2.8	Análisis Estadístico De Los Datos	19
IV. RESULTADOS		
4.1	Susceptibilidad de cepas de <i>Candida albicans</i> a diferentes concentraciones del extracto etanólico de la cáscara de <i>Punica granatum</i>	22
4.2	Concentración Mínima Inhibitoria del extracto etanólico de la cáscara de <i>Punica granatum</i> (GRANADA) sobre cepas de <i>Candida albicans</i>	29
V.	DISCUSIÓN	33
VI.	CONCLUSIONES	36
VII.	RECOMENDACIONES	37
VIII.	RESUMEN	38
IX.	ANEXOS	40
X.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

INDICE DE TABLAS

Tabla 01. Diferentes concentraciones del extracto etanólico de <i>Punica granatum</i> (Granada)	15
Tabla 02. Promedio de los diámetros de los halos de inhibición de <i>Candida albicans</i> a diferentes concentraciones del extracto etanólico de <i>Punica granatum</i> (Granada)	23
Tabla 03. Análisis de varianza de la susceptibilidad de <i>Candida albicans</i> a las diferentes concentraciones del extracto etanólico de <i>Punica granatum</i> (GRANADA)	25
Tabla 04. Prueba de significancia de Tukey(0,05) de los promedios de los diámetros de los halos de inhibición de las cepas de <i>Candida albicans</i> frente al extracto etanólico de <i>Punica granatum</i>	26
Tabla 05. Prueba de significancia de Tukey(0,05) de los promedios de los diámetros de los halos de inhibición de <i>Candida albicans</i> en función a las diferentes concentraciones del extracto etanólico de <i>Punica granatum</i>	27
Tabla 06. Prueba de significancia de Tukey (0,05) interacción de las diferentes concentraciones del extracto etanólico de <i>Punica granatum</i> y cepas de <i>Candida albicans</i>	28
Tabla 07. Concentración Mínima Inhibitoria del extracto etanólico de la cáscara de <i>Punica granatum</i> sobre cepas de <i>Candida albicans</i>	30

INDICE DE FIGURAS

Fig. 01 Diagrama de obtención del extracto etanólico de <i>Punica granatum</i> (Granada)	13
Fig. 02 Obtención del extracto etanólico de <i>Punica granatum</i> (Granada).....	14
Fig. 03 Preparación y estandarización del inóculo fúngico; Agar Almidón Arroz para la prueba de clamidosporas.....	17
Fig.04 Diseño experimental para determinar la Susceptibilidad de cepas de <i>Candida albicans</i> a diferentes concentraciones del extracto etanólico de la cáscara de <i>Punica granatum</i>	20
Fig. 05 Identificación de <i>Candida albicans</i> . A. Observación microscópica del tubo germinativo de <i>Candida albicans</i> ; B. Cepas de <i>Candida albicans</i> en Chromogenic Candida Agar; C. Cepas de <i>Candida albicans</i> en Agar Sabouraud Glucosado	21
Fig. 06 Susceptibilidad de cepas de <i>Candida albicans</i> a diferentes concentraciones del extracto etanólico de la cáscara de <i>Punica granatum</i>	24
Fig. 07 Concentración Mínima Inhibitoria del extracto etanólico de la cáscara de <i>Punica granatum</i> sobre cepas de <i>Candida albicans</i> (C1 – C2)	31
Fig. 08 Concentración Mínima Inhibitoria del extracto etanólico de la cáscara de <i>Punica granatum</i> sobre cepas de <i>Candida albicans</i> (C3 – C4)	32

INDICE DE ANEXOS

Anexo 3.

Clasificación Taxonómica de <i>Punica granatum</i>	40
--	-----------

Anexo 2.

Pared celular de <i>Candida albicans</i>	41
--	-----------

Anexo 3.

Clasificación de los taninos	41
------------------------------------	-----------

Anexo 4.

Formación de clamidosporas de las cepas de <i>Candida albicans</i>	42
--	-----------

Anexo 5.

Tabla resumen del procedimiento para realizar la macrodilución en caldo según Norma Técnica Peruana N° 44 del INS	43
---	-----------

Anexo 6.

Prueba de susceptibilidad método de difusión en disco KIRBY BAUER	44
---	-----------

Anexo 7.

Gráfico de la prueba de significancia de Tukey (0,05) de los promedios de los diámetros de los halos de inhibición de las cepas de <i>Candida albicans</i> frente al extracto etanolico de <i>Punica granatum</i>	44
---	-----------

Anexo 8.

Gráfico de la prueba de significancia de Tukey (0,05) de los promedios de los diámetros de los halos de inhibición de <i>Candida albicans</i> en función a las diferentes concentraciones del extracto etanolico de <i>Punica granatum</i>	45
--	-----------

Anexo 9.

Comparaciones múltiples, prueba de Tukey	46
--	-----------

I. INTRODUCCIÓN

Anualmente 26 millones de personas padecen infección fúngica y más de 1,6 millones muere cada año (*Global Action Fund for Fungal Infections*), dentro de ese contexto se encuentra la candidiasis, una enfermedad causada por especies del genero *Candida*, siendo la especie más implicada *Candida albicans* ⁽⁸⁾. En dicho proceso el oportunismo de esta levadura se ve favorecido a su condición de comensal en piel y mucosas y, a factores predisponentes del individuo ⁽²¹⁾ por lo que su incidencia ha aumentado provocando un 25% de micosis superficiales y entre el 75 y 88% de infecciones fúngicas nosocomiales ⁽⁸⁾.

Sin embargo, la vulvovaginitis por *C. albicans* se encuentran entre las enfermedades que más afecta a las mujeres y al igual que la candiduria continúan siendo un problema de salud más común en las infecciones fúngicas sobre todo asociado a factores iatrogénicos de pacientes con tratamiento prolongado de antibióticos, corticosteroides, diabéticos y cateterismo. En el tracto urinario se forma microplacas blanquecinas que en pocas ocasiones, llega a los riñones, produciendo pielonefritis; esta entidad clínica se observa con más frecuencia en niños recién nacidos ^(6,9).

En los últimos años el uso de plantas medicinales se está incrementando, alrededor del mundo. Razón por la cual un 80% de personas que viven en países en vías de desarrollo emplea exclusivamente plantas medicinales tradicionales para necesidades primarias de salud (Organización Mundial de la Salud). Dentro de ellas está la granada (*Punica granatum*), una planta con múltiples propiedades terapéuticas que es empleada en diferentes países existiendo en la actualidad gran interés por el estudio de esta especie vegetal ^(30,36).

Diversos extractos a partir de su jugo, semillas, cáscara y fruto completo han sido empleados de la granada; de igual manera sus hojas, flores y raíces exhiben propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas, antihelmínticas, antibacteriales, antitumorales, antivirales y astringentes. Incluso han sido administrados para el control de diabetes mellitus, hiperlipidemia, hipertensión, arterosclerosis, problemas bucales, infertilidad femenina, disfunción eréctil, obesidad, Alzheimer, diarrea y úlceras ⁽³⁶⁾. Por tanto, hay necesidad de investigar la susceptibilidad de los extractos de la granada frente a *Candida albicans*.

En tal escenario los productos naturales constituyen una alternativa para combatir diversas enfermedades infecciosas y dado que en nuestro país existe una variedad de plantas medicinales, fue objetivo de la presente investigación determinar la "Susceptibilidad de cepas de *Candida albicans* a diferentes concentraciones del extracto etanólico de la cáscara de *Punica granatum*".

II. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

CÓRDOVA Y GARCÍA (2002) evaluaron el efecto inhibitorio in – vitro de una solución hidroalcoholica de *Allium sativum* “Ajo” sobre cepas de *Candida albicans*. Realizaron el experimento con seis cepas de *Candida albicans* sujetas a la presencia del extracto de *Allium sativum* “ajo” en Solución Hidroalcoholica a concentraciones de 30 mg/ml, 60 mg/ml y 90 mg/ml., con cinco repeticiones por cepa, obteniéndose 90 evaluaciones. Emplearon técnicas de obtención del extracto de ajo y ensayos microbiológicos, realizando modificaciones para este estudio.

Como resultado señalaron que la solución Hidroalcoholica de *Allium sativum* “Ajo” ejerce acción inhibitoria sobre cepas de *Candida albicans*, además la Concentración Mínima Inhibitoria de la solución hidroalcoholica de *Allium sativum* fue de 5.50 mg/ml.

CUBAS Y MEJÍA (2004) determinaron el efecto inhibitorio in vitro del extracto alcohólico de propóleo sobre el crecimiento de *Candida albicans*. Trabajaron con 5 cepas diferentes de *Candida albicans* (C-1, C-2, C-3, C-4, C5) aisladas de secreciones vaginales en el área de Programa de Control de Enfermedades de transmisión sexual y SIDA (PRO CETSS) del Hospital Regional Docente “Las Mercedes” – Chiclayo; enfrentadas a concentraciones de 24, 28, 32 y 36 mg/ml del extracto alcohólico de propóleo y sometidas a tiempos de exposición de 30, 60, 120 minutos; considerando 3 repeticiones por cepa, obteniendo un total de 180 evaluaciones.

El efecto inhibitorio y la Concentración Mínima Inhibitoria se determinaron según el método de diluciones en agar modificado, obteniendo como resultado que el extracto alcohólico de propóleo a concentraciones de 24, 28 ,32 y 36 mg/ml expuestos por 30, 60, 120 minutos tiene efecto inhibitorio in vitro sobre *Candida albicans*, dicho efecto es directamente proporcional a la concentración del producto y al tiempo de exposición. La CMI de dicho extracto a los 120 minutos fue de 36 mg/ml para las cepas C-2, C-4 y C-5. Para las cepas C-1 y C-3 la CMI resulto ser 40 mg/ml.

MANSOURIAN et al., (2004) estudiaron los efectos antimicóticos de los extractos herbales de *Syzygium aromaticum* y *Punica granatum*. Prepararon y cultivaron 21 cepas de *Candida albicans* oral en pacientes con estomatitis, los ensayos se realizaron en muestras de pacientes y cepas estándar 5027ATCC (PTCC10231). Además, usaron nistatina y metanol como control positivo y negativo, respectivamente. Tanto *Syzygium aromaticum* como *Punica granatum* mostraron una notable actividad antifúngica en el método del pozo. Debido a los crecientes problemas con enfermedades fúngicas, estos hallazgos sugieren que los extractos de plantas de *S. aromaticum* y *Punica granatum* mostraron buenos efectos antifúngicos ($P < 0,001$). *Syzygium aromaticum* (diámetro de la zona de inhibición: 29,62) mostrando mejores efectos antifúngicos que la nistatina (diámetro de la zona de inhibición: 28,48), a diferencia del extracto de *Punica granatum*, quien no mostro ser más efectivo que dicho antimicótico.

SABARBURU (2004) en su trabajo “Microbiología de las investigaciones vaginales en mujeres de edad fértil, prevalencia y aspectos epidemiológicos en el programa de control de ETS y SIDA (PROCETSS) Centro de Salud José Olaya. Chiclayo. Diciembre 2002 – junio 2003”, evaluó 105 pacientes que presentan flujo vaginal y/o síntomas. Encontró una prevalencia de 87,62% siendo *Candida albicans* el agente etiológico de mayor frecuencia (43,48 %), seguido por *Gardnerella vaginalis* (28,26 %); *Trichomonas vaginalis* (5,43%); Enterobacterias (7,61) e infecciones mixtas (10,87 %). Evaluó 11 mujeres embarazadas y encontró a todas positivas a la infección de vulvovaginal (10,48%).

ESPINOZA Y VIDAURRE (2004) realizaron un estudio en el que determinaron la prevalencia de *Trichomonas vaginalis*, *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis* en gestantes de los Centros de Salud Paul Harris, Atusparias, Túpac Amaru y Cerropon Chiclayo 2004. En el centro de salud de Atusparias se encontró una prevalencia de 87,5 %, en el Centro de Salud de Túpac Amaru 81,9 %, en el Centro de Salud de Paul Harris 80,6 % y en el Centro de Salud Cerropon 72,2 %. El tipo de infección única obtuvo un mayor porcentaje con 77,6 %, predominando *Gardnerella vaginalis* con 46,6; seguido de *Candida albicans* con 28,4 % y *Trichomonas vaginalis* con 19,8 %, la infección causada por la asociación de los tres microorganismos alcanzó una prevalencia de 0,4 %. Además se encontró mayor prevalencia de infeccionen el grupo de 25 – 30 años con 89,1 %; así como en las gestantes que se encontraron cursando las 28-40 semanas de gestación con 84,6 %, número de partos 0 – 1 con 81,6%.

AGUILERA et al., (2005) evaluaron el efecto inhibitorio del ácido elálgico obtenido de cáscara de *Punica granatum* (AEP) y *Larrea tridentata* (AEL), así como también la concentración mínima inhibitoria del ácido elálgico comercial. Trabajaron con concentraciones de ácido elálgico comercial de 0, 25, 50, 100, 150 y 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, además en AEP y AEL, y cepas patógenas de *Staphylococcus aureus* (Sa), *Enterobacter aerogenes* (Ea), *Staphylococcus epidermis* (Se), *Samonella thiphi* (St) y *Vibrio cholerae* (Vc), con tiempos de evaluación de 4, 8, 12 y 24 horas.

Los resultados obtenidos muestran un efecto inhibición para Sa y Ea, a concentraciones mayores a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, AEP y AEL, para Se, no se observó ningún efecto inhibitorio, en el caso de St, a concentraciones por arriba de 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$, AEP y AE si se aprecia el efecto inhibitorio y finalmente para Vc, se observó efecto inhibitorio con AEP y AEL.

FIGUEROA et al., (2005) en Cuba realizaron un estudio, con el extracto de *Punica granatum* a partir de frutos maduros, con la finalidad de demostrar su efecto en el tratamiento de las enfermedades respiratorias. Trabajaron con ratones hembras de la línea Balb/C de 4 semanas de edad, los cuales fueron organizados en cuatro grupos de 20 animales cada uno. Los grupos I, II y III recibieron una dosis única de 25 μL de 10 DIE50 de virus por cada fosa nasal, el grupo IV funcionó como control negativo de virus, pues solo recibió la máxima dosis de BLBu (175 mg/kg de peso).

La dosificación de este extracto para el tratamiento diario de los diferentes grupos comenzó 24 h posteriores a la infección, con la administración de 50 μL de una dosis diaria de 50 y 175 mg/kg de peso de BLBu, durante 5 días, por las vías intranasal u oral, según el grupo de tratamiento. Los animales fueron sacrificados el séptimo día y con los homogenados pulmonares se calculó el título hemaglutinante y la dosis infectiva viral media. El peso inicial y final de cada animal / grupo fue medido en este estudio. Los resultados indicaron que todos los ratones infectados y luego tratados con BLBu no mostraron pérdida de peso corporal. Los animales infectados y tratados con 175 mg/kg de peso de BLBu por la vía intranasal, experimentaron la mayor reducción del título hemaglutinante viral (< 2). La dosis de 175 mg/kg de peso de BLBu que fue suministrada tanto por vía intranasal como oral, disminuyó en más de 2 \log_{10} el título infectivo del virus.

HUAMANI Y RUIZ (2005) investigaron la actividad antifúngica in vitro de doce extractos etanolicos correspondientes a diez plantas medicinales peruanas; entre las que destacan *Annona cherimolia* Mill. (Hojas), *Annona muricata* L. (corteza y hojas), *Bidens pilosa* L. (partes aéreas), *Hypericum laricifolium* L. (partes aéreas), *Juglans neotropica* Diels (corteza).

Evaluaron la actividad antifúngica mediante los métodos de difusión en agar y dilución en agar para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI). Utilizaron las levaduras *Candida albicans* ATCC 10231 y *Candida albicans* cepa clínica, así como, el hongo filamentoso *Aspergillus niger* ATCC 16404, como microorganismos de prueba; se investigaron 12 extractos, de ellos seis presentaron actividad antifúngica consistente con un diámetro de halos de inhibición 18mm (Prueba de Difusión en agar) frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Ningún extracto mostró actividad consistente frente a la cepa clínica de *Candida albicans* y *Aspergillus niger* ATCC 16404. La CMI de los extractos que presentaron actividad consistente frente a *Candida albicans* ATCC 10231, fue de 250 µg/mL para *Hypericum laricifolium* L., *Juglans neotropica* Diels, *Psidium guajava* L. y *Schinus molle* L. (un extracto de corteza y uno de hojas) y de 500µg/mL para *Piper* spp. No se determinó la CMI de los extractos (*Juglans neotropica* Diels y *Psidium guajava* L.) que presentaron halos frente al *Aspergillus niger* ATCC 16404 por considerarlos sin actividad significativa (<18mm.).

SANCHEZ et al ., (2005) exponen los resultados obtenidos al valorar, la capacidad del extracto de granada, de disminuir el daño inducido por el peróxido de hidrógeno en células de ovario de Hamster chino cultivadas *in vitro*.

Realizaron experimentos de carácter citogenético como el intercambio de cromátidas hermanas y citofluorimétrico: la fluorimetría de la diclofluoreceína oxidada. En condiciones experimentales de esta investigación, el extracto de frutos enteros de granada fue capaz de secuestrar especies reactivas del oxígeno producidas por el peróxido de hidrógeno, mecanismo mediante el cual ejerce su acción protectora del ADN frente a las lesiones causadas por este agente.

SEERAM Y HEBER (2005) patentaron un método para la obtención de elagitaninos de cáscara de *Punica granatum*, a partir de cáscaras secas de granada, trituradas y suspendidas en metanol. Usaron una columna adsorbente polimérica rápida para purificar los taninos de granada a partir de los extractos acuoso y alcohólico. Los taninos son adsorbidos a las columnas y seguidos de limpieza, evacuación por gravedad y aspiración de líquido de la columna, extrajeron los taninos adsorbidos del sólido adsorbente y eliminaron el disolvente a vacío para dar un polvo de taninos totales altamente concentrados que comprende un alto porcentaje (80%) de anómeros de punicalagina, así como un porcentaje significativo de ácido elágico.

Pueden realizarse etapas de cromatografía adicionales para proporcionar composiciones altamente purificadas de ácido galálgico o punicalagina. Compuestos con actividad biológica, antioxidante, antimicrobiana, antimutagénica, para uso en estudios biológicos in vitro e in vivo

BUSTAMANTE (2006) evaluó el efecto inhibitorio de los extractos etanolicos de *Piper aduncum* (matico) y *Alloysia triphylla* (cedrón) frente a *Candida albicans*, utilizo 5 cepas de *Candida albicans* (C-1 UNPRG, C-2 UNPRG, C-3 UNPRG, C-4 INS, C-INS), a una concentración de 3×10^6 UFC/ mL y 4 concentraciones del extracto etanolic (0,05; 0,07; 0,09; 0,10 MG/mL). El efecto inhibitorio y la Concentración Mínima Inhibitoria se determinaron según el método del cilindro placa.

Como resultado obtuvo que el efecto inhibitorio del extracto etanolic de *Piper aduncum* y *Aloysa Triphylla* frente a *Candida albicans* fue directamente proporcional a las concentraciones. La Concentración Mínima Inhibitoria del extracto etanolic de *Piper aduncum*, según la prueba estadística de correlación y regresión es de 0,0464 mg/mL y para *Aloysa triphylla* es de 0,0585 mg/mL.

CORREIA et al., (2006) en Brasil realizaron un estudio sobre el efecto antimicrobiano de *Punica granatum Linn* (granada) gel fitoterapéutico y miconazol (Daktaringel oral) contra tres cepas de *Streptococos (mutans ATCC 25175, sanguis ATCC 10577 y mitis ATCC 9811)*, *S. mutans* y *Candida albicans* aisladas clínicamente ya sea solos o en asociación.

El efecto de las concentraciones mínimas inhibitorias de los geles sobre la adhesión de estos microorganismos a vidrio se evaluó en presencia de 5% de sacarosa, usando cada vez mayor y se duplicó la concentración de la solución diluida de los geles que van desde 1: 1 a 1: 1.024.

Las concentraciones mínimas inhibitorias de adherencia de *Punica granatum L.* gel contra los organismos de ensayo fueron: 1:16 Porque *S. mutans (ATCC)*, *S. mutans (CI)* y *Sanguis S.*; 1: 128 de *S. mitis* y 1:64 para *C. albicans*. Las concentraciones mínimas inhibitorias de adherencia de miconazol contra los mismos organismos fueron: 1: 512, 1:64, 1: 4, 1: 128 y 1:16, respectivamente. En experimentos con tres y cuatro microorganismos asociados, el gel *Punica granatum L.* tenía una mayor eficiencia en la inhibición de la adherencia microbiana que el miconazol. Los resultados de este estudio sugieren que este agente fitoterapéuticos podría ser utilizado en el control de la adhesión de diferentes microorganismos en la cavidad oral.

SHAOKAT et al., (2007) trabajaron con 35 muestras recolectadas de pacientes de 1 a 30 años de edad, con piel infectada, juncos, furúnculos, aftas orales, picazón anal y vaginal. Obteniendo, el aislamiento de *Candida albicans* en un 57,3% y *Candida tropicalis* en un 22,5% *Aspergillus fumigatus* 11,5% y *Aspergillus niger* 8,7%. Prepararon extractos alcohólicos y acuosos de las cáscaras de *Punica granatum* (granada) así como el polvo seco. La actividad antifúngica de los extractos se evaluó por medio del ensayo de difusión de pocillo de agar. El extracto mostró una potente actividad contra la levadura. Las concentraciones inhibitorias mínimas fueron de 128-1024 µg / ml frente a *Candida albicans* y *Candida tropicalis*. Su diferencia fue pequeña entre las actividades de extracto alcohólico y extracto acuoso. Estos resultados sugieren que el extracto de granada que contiene el ácido galotánico como agente antifúngico prometedor.

CASTILLO (2010) realizó la extracción y cuantificación del aceite esencial de cáscara de granada y además determinó el efecto antifúngico sobre *Penicillium sp* in vitro; para ello se implementaron tres métodos diferentes de extracción de aceite, Soxleth (M1), sólido-líquido (M2) y arrastre de vapor (M3); se hicieron extracciones por triplicado para cada método, se obtuvo un ANOVA, donde se mostraron mejores resultados por el método de arrastre de vapor, con un rendimiento de 8.7 %.

Posteriormente se realizó la esterificación del aceite, donde se obtuvieron los ésteres metílicos de los ácidos grasos, analizados por cromatografía de gases. Fueron identificados ácido butírico (C4:0); ácido linolelaídico (C18:2n6-t); linoleico (C18:2n6-c) (ω -6); araquídico (C20:0) y docosahexaenoico (DHA) (C22:6n-3) (ω -6), de acuerdo al estándar de los ésteres metílicos de los ácidos grasos (Supelco™ 37 Component FAME Mix), algunos de ellos se encontraron hasta en un 0.9 % en peso de la muestra, siendo estos de gran importancia para la industria alimentaria. Se evaluó el efecto antifúngico sobre *Penicillium sp*, aplicando diferentes concentraciones del aceite esencial de cáscara de granada 100, 300, 500, 1500 μ l y control (0), obteniendo como resultado un efecto negativo, ya que el microorganismo fue capaz de crecer incluso con un área mayor que el control.

GUERRA Y GODOY (2010) evaluaron la actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos y diclorometánicos de ocho especies de plantas medicinales utilizadas para el tratamiento de infecciones vaginales contra *Gardnerella vaginalis* y cinco especies de *Candida* para poder ser utilizados como una alternativa al tratamiento farmacológico. A los extractos que presentaron actividad ($p < 0.10$) contra alguna de las especies de *Candida* se les determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM).

El crecimiento de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilopsis* y *Candida krusei* fue inhibido por el extracto metanólico de *Punica granatum* a una concentración de 0.5 mg/mL. *Candida tropicalis* mostró inhibición a una concentración de 1 mg/mL. Sin embargo *Gardnerella vaginalis* no fue inhibida por los extractos metanólicos y diclorometánicos ensayados.

PAI et al., (2010) evaluaron la eficacia antifúngica in vitro de *Punica granatum*, *Acacia nilotica*, *Cyminum cyminum* y *Foeniculum vulgare* en *Candida albicans*. Utilizando el método de difusión de disco, y extractos acuosos así como de aceites esenciales.

Obtuvieron como resultado que *Punica granatum* (granada) mostró la mayor actividad antifúngica frente a *Candida albicans*, seguido de *Acacia nilotica*, *Cyminum cyminum* y *Foeniculum vulgare*, quien presentaron menor actividad antifúngica al final de las 48 h. La diferencia entre los extractos de plantas fue significativa.

SARAVIA Y GUILLINTIA (2012) determinaron la actividad antifúngica del extracto de etanol *Schinus molle* y Fluconazol sobre *Candida albicans*, se utilizó las hojas de la planta para preparar el extracto etanólico. Se experimentó con 30 muestras de extracto etanolico de *Schinus molle* y 30 muestras de Fluconazol, se aplicó en el disco el extracto etanolico de *Schinus molle* y otro disco se utilizó para el Fluconazol y se colocaron en el agar dextrosa sabouraud.

El extracto de *Schinus molle* mostró actividad antifúngica con 25µg/ml, con un halo de inhibición ≥ 20 mm, y el Fluconazol con 25 µg/ml con un halo de inhibición de ≥ 31 mm. ($p=0.0001$) mostrando así actividad antifúngica frente a cepas clínicas de *Candida albicans* ATCC 10231. (Kiru 2012, 9(1): 39-41).

SHAFIGHI et al., (2012) realizaron un estudio para investigar el efecto antimicótico del éter de petróleo, acetato de etilo y n-butanol de las fracciones aisladas de pericarpio de granada y flor contra *Candida albicans* (ATCC 3153). La zona de inhibición máxima de *Candida albicans* se obtuvo por fracción de n-butanol de la cáscara, 35 Mm. Las fracciones de éter de petróleo no tenían ninguna actividad antifúngica. *Candida albicans* ATCC 3153 sólo fue sensible a la fracción de n-butanol de flores, además de ser resistente a fracciones de cáscara y flor de petróleo de petróleo. Las fracciones no tenían actividad antifúngica en 10 µl, y había una relación directa entre la concentración y la zona de inhibición. Los compuestos extraídos de piel y flor fueron eficaces.

AGUILAR, L (2013) compararon el efecto inhibitorio in vitro del extracto etanólico con el aceite esencial de *Cymbopogon citratus* sobre una cepa de *Candida albicans*; ensayaron 13 repeticiones por cada concentración al 5% (44mg/mL), 25% (222mg/mL), 50% (443mg/mL), 75% (665mg/mL) y 100% (886mg/mL) de aceite esencial y 5% (50mg/mL), 25% (250mg/mL), 50% (500mg/mL), 75% (750mg/mL) y 100% (1000mg/mL) de extracto etanólico. En la prueba de difusión de discos, con las cinco concentraciones del aceite esencial y el extracto etanolico al 100% se obtuvo un efecto máximo (40mm); mientras que las otras concentraciones del extracto etanólico presentaron menor inhibición, pero con incremento conforme al aumento de la concentración. Con respecto a la CIM, se encontró disminución de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) conforme aumentó la concentración. En el aceite esencial, a partir del 50% no se contabilizó UFC; mientras que el extracto etanolico inhibió a *Candida albicans* a la concentración de 100%.

ANIBAL et al., (2013) prepararon extractos etanólicos a partir de los arilos y las semillas, el pericarpio, las cáscaras y del fruto entero de *Punica granatum*, probando su actividad antifúngica contra *Candida spp.* Los extractos etanólicos se analizaron mediante Espectrometría de Masas y produjeron muchos compuestos tales como punicalagina y galadydilacton. Los extractos del pericarpio y la cáscara mostraron actividad contra *Candida spp.*, Con CIMs de 125 µg / mL. El efecto del pericarpio y de los extractos de cáscara sobre la morfología y estructura de *C. albicans* y *C. krusei* se examinó mediante microscopía electrónica de barrido y transmisión. Los datos obtenidos revelaron actividad antimicrobiana potencial contra células de levaduras del género *Candida*, y los compuestos bioactivos podrían ser responsables de cambios en la morfología celular y estructura.

Bernal et al., (2014) evaluaron el efecto de la concentración del extracto hidroalcoholico de la cáscara del fruto de *Punica granatum*, sobre la viabilidad de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus ATCC 25923* y *Pseudomonas aeruginosa*. Trabajaron con cinco concentraciones del extracto (500, 250, 125, 62.50, y 32.25 mg/ mL), y gentamicina como control positivo.

El efecto se determinó siguiendo lo propuesto por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS): sembrando un inóculo estandarizado con el patrón de turbiedad 0,5 del Nefelómetro de Mac Farland en placas con Agar Mueller Hinton por la técnica placa vertida y a su vez se realizó la Concentración Mínima Bactericida a partir de las concentraciones de: 62.5, 31.25, 15.63, 7.81, 3.91, 1.95 y 0.98 mg/mL, respectivamente, para *S. aureus*, *S. aureus ATCC 25923* y *P. aeruginosa*.

Concluyeron, que a medida que aumenta la concentración del extracto hidroalcohólico aumenta porcentaje de inhibición relativo o índice de actividad antibacteriana en el rango de 31,25 a 500 mg/mL. También se demostraron que la Concentración Mínima Bactericida (CMB) para *S. aureus* y *S. aureus ATCC 25923* es a partir de la concentración 7,88 mg/mL, mientras que para *P. aeruginosa* es a partir de 31.25 mg/mL del extracto hidroalcohólico de cáscaras de frutos de *P. granatum*.

III. MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo de investigación se realizó en los laboratorios de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional “Pedro Ruíz Gallo” (Lambayeque).

3.1. MATERIALES

3.1.1. Material biológico

Se utilizó como materia prima, la cáscara de *Punica granatum* “GRANADA”, el fruto de granada fue obtenido en el Mercado Modelo de la ciudad de Chiclayo en el departamento de Lambayeque, durante los meses de Diciembre 2015 – Octubre de 2016

Se trabajó con cultivos puros de *Candida albicans* obtenidos a partir de secreciones vaginales, aislados e identificados en el Laboratorio de Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional “Pedro Ruiz Gallo” en Lambayeque.

3.2. MÉTODOS Y TÉCNICAS

3.2.1. Población y muestra en estudio

La población estuvo constituida por cepas de *Candida albicans*, procedentes de muestras vaginales, identificadas en el Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional “Pedro Ruiz Gallo en Lambayeque”.

El tamaño de la muestra en estudio es 20, representado por 4 cepas de *Candida albicans*, enfrentadas a 5 concentraciones (50 mg/mL, 100 mg/mL, 150 mg/mL, 200 mg/mL, 250 mg/mL) del extracto etanólico de la cáscara de *Punica granatum*, considerándose tres repeticiones, se tuvo un total de 60 unidades experimentales.

3.2.9 Obtención del extracto etanólico a partir de la cáscara de *Punica granatum* (González, V. 2005).

- La experimentación se realizó en el laboratorio de Microbiología Humana, de las instalaciones de la Universidad Nacional “Pedro Ruiz Gallo” Lambayeque.
- Los frutos de la granada en condiciones normales se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2 %, luego se enjuagaron con agua destilada para eliminar el cloro residual, posteriormente fueron escurridos y secados con toallas absorbentes.
- Las cáscaras de granada fueron deshidratadas en la estufa (THELCO PRECISION), a temperatura de 60 °C, por 72 horas. El material seco, fue sometido a trituración con ayuda de un mortero previamente esterilizado.
- La muestra molida (250 gr.) se colocó en un recipiente de vidrio 1000 ml aproximadamente. Al cual se agregó en cantidad doble de etanol (500 ml) al 96 %, en proporción 1:2 y se dejó macerar por 7 días en un lugar donde no tuvo contacto con la luz solar. Transcurrido ese tiempo se filtró con papel de filtro Whatman Nº 1 y se colocó en crisoles para permitir su evaporación y la obtención del extracto de la cáscara de granada.



Fig. 1 Diagrama de obtención del extracto etanólico de *Punica granatum* (Granada).



A. Fruto de *Punica granatum* (Granada).



B. Peso de la cáscara de *Punica granatum* (Granada).



C. Maceración Etanólica de la cáscara de *Punica granatum* (Granada).



D. Filtración del Extracto etanólico.



E. Extracto seco.

Fig. 2 Obtención del extracto etanólico de *Punica granatum* (Granada).

3.2.10 Concentraciones del extracto etanólico de *Punica granatum* (Granada).

La solución madre se preparó a partir de 1 gramo del extracto etanólico de *Punica granatum* diluido en 4 mL de Alcohol al 40 %, obteniéndose una concentración de 250mg/mL y a partir de ella se realizó diluciones sucesivas hasta obtener concentraciones de 200mg/mL, 150 mg/mL, 100 mg/mL y 50 mg/mL (Tabla 01). Tomando un volumen de la solución stock y completando con alcohol al 40%.

Tabla 01. Diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Punica granatum* (Granada).

Extracto etanólico (mg)	Alcohol 40 %(mL)	Concentración (mg/mL)
1000 mg	4 mL	250 mg/mL
600 mg	3 mL	200 mg/mL
300 mg	2 mL	150 mg/mL
100 mg	1 mL	100 mg/mL
25 mg	0.5 mL	50 mg/mL

3.2.11 Efecto inhibitorio del extracto etanólico de la cáscara de *Punica granatum*

1. Identificación de las cepas de *Candida albicans*.

- La caracterización macroscópica y microscópica de *Candida albicans*, se realizó en Agar Sabouraud, identificándose colonias con aspecto característico (Colonias pequeñas 2,00 mm – 3,00 mm de diámetro y completamente blancas).
- El procedimiento e identificación de la prueba del tubo germinativo se realizó según lo establecido en la Norma Técnica Peruana N° 44 del INS ⁽¹⁷⁾.
- Otros estudios complementarios fueron, la observación de Clamidosporas, así como la identificación en Chromogenic Candida Agar (CCA).

2. Preparación y estandarización del inóculo fúngico

- Del cultivo se seleccionaron cuatro colonias aisladas y con ayuda de un asa de siembra se transfirieron a 5 mL de Solución Salina Fisiológica Estéril contenida en un tubo de ensayo. Se ajustó la turbidez del inóculo hasta obtener por comparación visual el estándar equivalente de 1.5×10^8 UFC / mL correspondiente al tubo 0.5 de la escala de Mc. Farland.
- Luego se realizó una dilución de 1/200, la cual se mantuvo hasta el momento de la siembra en placa.

3. Evaluación de la susceptibilidad de *Candida albicans* frente al extracto etanólico de *Punica granatum*, según el método de difusión de disco (Kirby Bauer).

- Previamente a la evaluación se contó con discos de 5 mm de diámetro de papel Whatman Nº 01 estériles y embebidos con cada una de las concentraciones del extracto etanólico de *Punica granatum* "GRANADA" 50 mg/mL, 100mg/mL, 150mg/mL, 200mg/mL, 250mg/mL.
- Del inóculo estandarizado y con ayuda de un hisopo previamente embebido se retiró presionando ligeramente sobre la pared del tubo; luego fue sembrado en agar sabouraud en tres direcciones a fin de asegurar la distribución uniforme del inóculo y se dejó durante 15 minutos temperatura ambiente para que el exceso de humedad sea absorbido.
- Transcurrido el tiempo y con la ayuda de una pinza estéril se colocaron los discos suavemente sobre la superficie del agar, los mismos que fueron distribuidos uniformemente a una distancia de 25 mm uno del otro.
- Concluida este proceso las placas fueron incubadas en posición invertida a 37°C por 24 horas.
- Después del periodo de incubación se procedió a la evaluación midiéndose los diámetros de las zonas de inhibición completa, con una regla milimetrada.



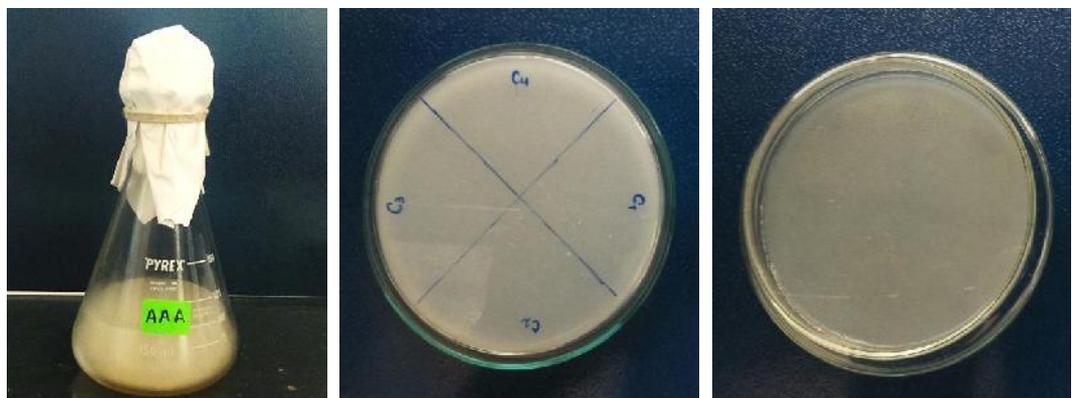
C1, C2, C3, C4 de *Candida albicans* en Agar Sabouraud glucosado.



Cultivo en placa de *Candida albicans* en Agar Sabouraud



Estandarización del inóculo fúngico al tubo 0.5 de la escala de Mc. Farland. Equivalente a 1.5×10^8 UFC / mL.



Agar Almidón Arroz para la realización de la prueba de clamidosporas.

Fig. 3 Preparación y estandarización del inóculo fúngico; Agar Almidón Arroz para la prueba de clamidosporas.

3.2.12 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) del extracto etanólico de la cáscara de *Punica granatum* sobre *Candida albicans*. Método de macrodilución en tubo según Norma Técnica Peruana N° 30 del INS.

- La Concentración Mínima Inhibitoria para las cepas de *Candida albicans* se realizó siguiendo las recomendaciones del método de macrodilución en tubo según Norma Técnica Peruana N° 30 del INS ⁽²⁴⁾.
- Las cepas se sembraron en Agar Sabouraud y se incubaron a 35 °C durante 24 horas, transcurrido ese tiempo se seleccionaron de 3 - 5 colonias y fueron traspasados a 5 mL de solución salina hasta obtener una densidad poblacional de 1.5×10^8 levaduras/mL correspondiente a la turbidez del tubo número 0.5 del nefelómetro de Mc Farland. Procediéndose luego a diluir en caldo hasta lograr una dilución 1/100 (inóculo de trabajo = 1×10^6 UFC/mL).

Procedimiento

- Se colocó 0,5 mL de Caldo Sabouraud desde el tubo N° 2 al N° 12.
- Se colocó 0,5 mL de solución del extracto etanolico de *Punica granatum* en el tubo N°1 y N°2. Luego se transfirió 0,5 mL del tubo N°2 al tubo N°3 y así sucesivamente hasta el tubo N°10.
- De la última dilución correspondiente al tubo N°10, se descartó 0,5 mL.
- El tubo N°11 fue el control del inóculo y el N°12 el control de esterilidad.
- Se incubó a 35°C, en un tiempo de 16 – 20 horas.
- El punto final se definió a simple vista, por la falta de turbidez del caldo, para ello se comparó cada tubo con el tubo de control de crecimiento.

3.2.13 Diseño de Contrastación:

- El Diseño de Investigación utilizado fue el de estímulo creciente, descrito por GOODE y HATT (1976). Siendo los grupos experimentales las cepas de *Candida albicans*, al cual se le aplicó el estímulo creciente que consistió en las diferentes concentraciones del extracto etanólico de la cáscara de *Punica granatum*.
- Según este diseño la variable independiente estuvo constituida por las concentraciones del extracto etanólico (50 mg/mL, 100 mg/mL, 150 mg/mL, 200 mg/mL, 250 mg/mL) y la variable dependiente, por el diámetro de los halos de inhibición, en milímetros, de las cepas del microorganismo (*Candida albicans*).

3.2.14 Análisis Estadístico De Los Datos

- El análisis estadístico de los datos, obtenidos en la experimentación correspondiente, se realizó por medio de Análisis de Varianza (ANAVA), con arreglo factorial (5x4x3); donde cinco es el número de concentraciones del extracto etanólico de la cáscara de *Punica granatum* (50 mg/mL, 100 mg/mL, 150 mg/mL, 200 mg/mL, 250 mg/mL), cuatro es el número de cepas de cultivo puro de *Candida albicans* y tres es el número de repeticiones; lo que nos da un total de 60 unidades experimentales; en donde se observó el grado de susceptibilidad de *Candida albicans* cuando fue expuesta a las diferentes concentraciones del extracto etanólico de la cáscara de *Punica granatum*, este análisis se complementó con la Prueba discriminadora de Tukey a 0,05 nivel de significación (STELL y TORRIE, 1983) con la finalidad de determinar las diferencias entre cada uno de los factores.
- El procesamiento estadístico se realizó con ayuda del software estadístico: SPSS Statistics v19 y Excel 2013.

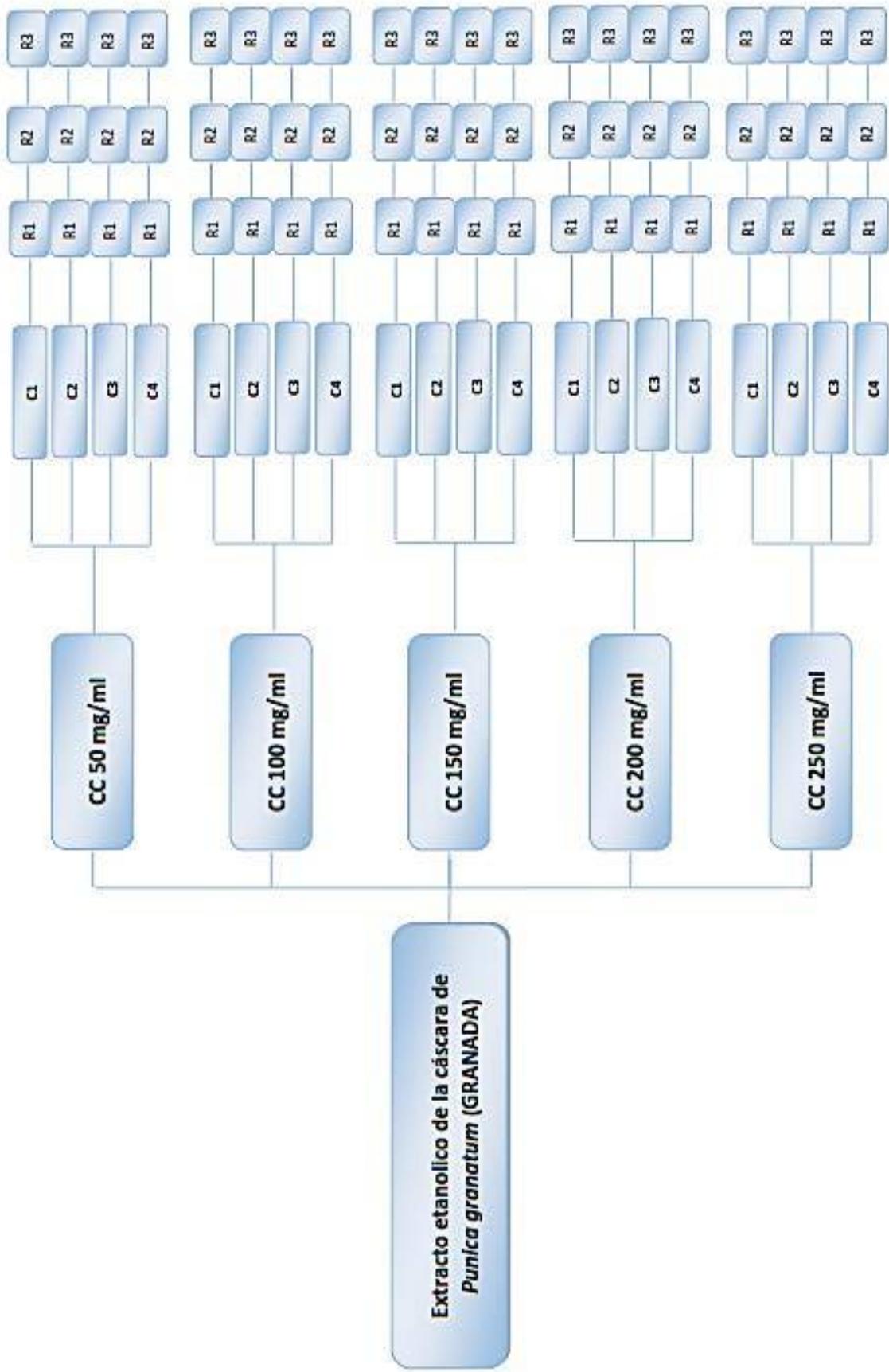


Fig. 4 Diseño experimental para determinar la Susceptibilidad de cepas de *Candida albicans* a diferentes concentraciones del extracto etanolico de la cáscara de *Punica granatum*.

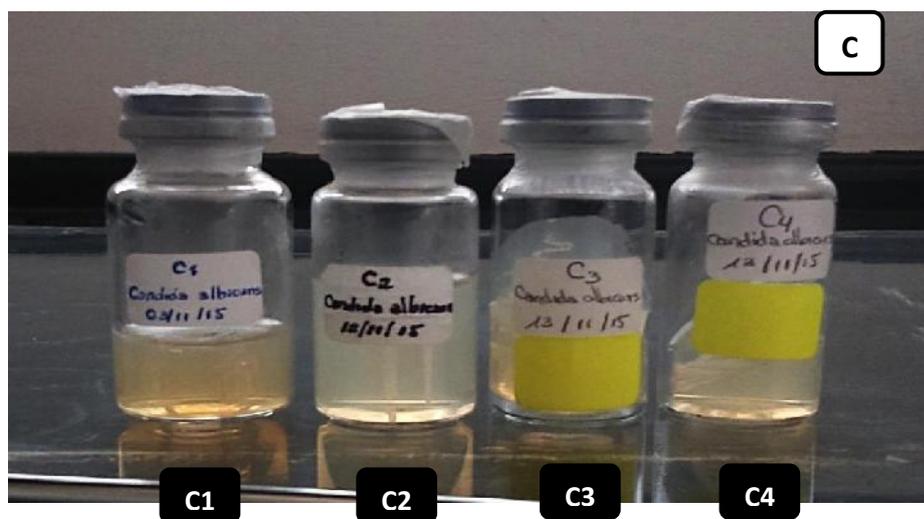
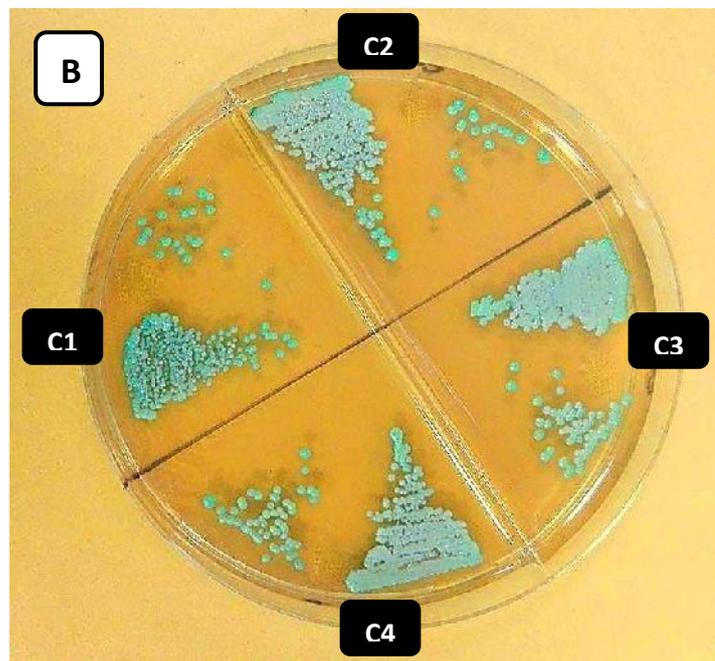


Fig. 5 Identificación de *Candida albicans*. A. Observación microscópica del tubo germinativo de *Candida albicans*; B. Cepas de *Candida albicans* en Chromogenic Candida Agar; C. Cepas de *Candida albicans* en Agar Sabouraud Glucosado.

IV. RESULTADOS

El objetivo del presente trabajo de investigación fue determinar la Susceptibilidad de cepas de *Candida albicans* a diferentes concentraciones del extracto etanólico de la cáscara de *Punica granatum*, lo cual se evidenció por la presencia de halos de inhibición medidos en milímetros, los resultados se muestran a continuación en tablas y gráficos con su interpretación correspondiente.

4.1 Susceptibilidad de cepas de *Candida albicans* a diferentes concentraciones del extracto etanólico de la cáscara de *Punica granatum*.

Los valores obtenidos demostraron que todas cepas de *Candida albicans* en estudio fueron susceptibles al extracto etanólico de la cáscara de *Punica granatum*, encontrándose algunas diferencias en el comportamiento de las cepas, debido a que fueron enfrentadas a diferentes concentraciones del extracto.

Se obtuvieron los promedios del diámetro en mm. de los halos de inhibición para todas las cepas de *Candida albicans*, de tal manera que para la C1 de *Candida albicans*, se observó que la menor concentración (50 mg/mL) alcanzó un promedio de 15 mm. de inhibición y la concentración mayor (250 mg/mL) alcanzó un promedio de 28 mm. de inhibición.

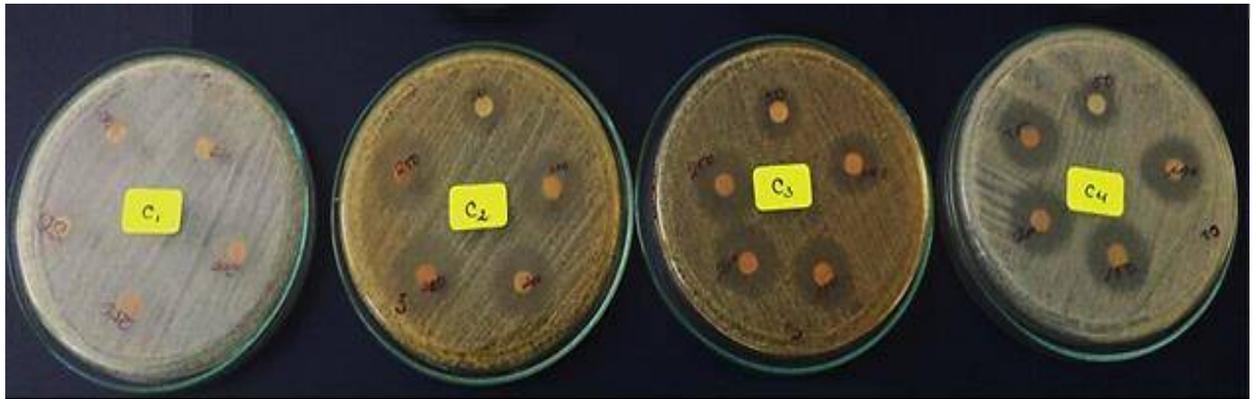
La C2 de *Candida albicans*, la menor concentración (50 mg/mL) obtuvo promedio de inhibición de 12,6 mm., y la concentración mayor (250 mg/mL) obtuvo promedio de inhibición de 25,6 mm.

La C3 de *Candida albicans*, la menor concentración (50 mg/mL) obtuvo promedio de inhibición de 13 mm., y la concentración mayor (250 mg/mL) obtuvo promedio de inhibición de 26,6 mm.

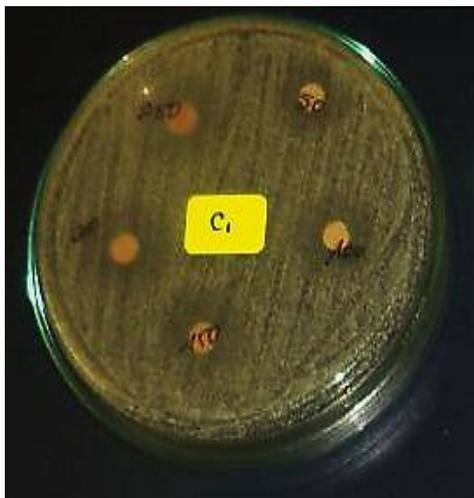
La C4 de *Candida albicans*, la menor concentración (50 mg/mL) obtuvo promedio de inhibición de 12,6 mm., y la concentración mayor (250 mg/mL) un promedio de inhibición de 28,3 mm.

Tabla 02. Promedio de los diámetros de los halos de inhibición de *Candida albicans* a diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Punica granatum* (Granada).

Cepas Candida	Concentración	Media	Total
C -1	K-50	15,0000	23,1333
	K-100	22,0000	
	K-150	25,0000	
	K-200	25,6667	
	K-250	28,0000	
C -2	K-50	12,6667	20,9333
	K-100	17,0000	
	K-150	24,3333	
	K-200	25,0000	
	K-250	25,6667	
C-3	K-50	13,0000	21,6000
	K-100	19,3333	
	K-150	24,0000	
	K-200	25,0000	
	K-250	26,6667	
C-4	K-50	12,6667	21,0000
	K-100	15,3333	
	K-150	22,3333	
	K-200	26,3333	
	K-250	28,3333	



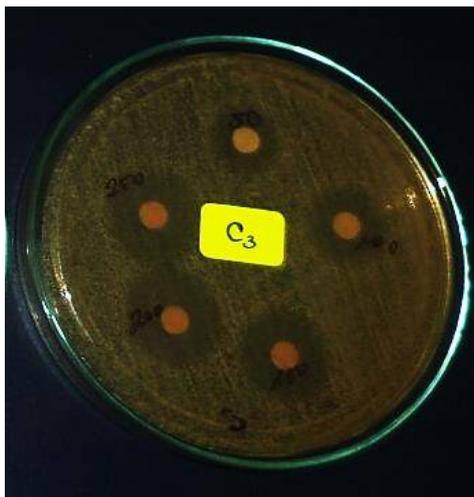
Cepas de *Candida albicans* (C1 - C2 - C3 - C4) enfrentadas a las concentraciones Cc. 50 mg/mL – Cc. 100 mg/mL Cc. 150 mg/mL – Cc. 200 mg/mL – Cc. 250 mg/mL del extracto etanólico de *Punica granatum*.



C1. Cc 50 mg/mL - Cc 100 mg/mL - Cc 150 mg/mL Cc 200 mg/mL - Cc 250 mg/mL



C2. Cc 50 mg/mL - Cc 100 mg/mL - Cc 150 mg/mL Cc 200 mg/mL - Cc 250 mg/mL



C3. Cc 50 mg/mL - Cc 100 mg/mL - Cc 150 mg/mL Cc 200 mg/mL - Cc 250 mg/mL



C4. Cc 50 mg/mL - Cc 100 mg/mL - Cc 150 mg/mL Cc 200 mg/mL - Cc 250 mg/mL

Fig. 6 Susceptibilidad de cepas de *Candida albicans* a diferentes concentraciones del extracto etanólico de la cáscara de *Punica granatum*.

Al realizar el Análisis de varianza de la susceptibilidad de *Candida albicans* a diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Punica Granatum*, se concluye que las variables concentración y cepa, así como la interacción concentración – cepa, presentan diferencias estadísticas significativas (Tabla 3).

De tal manera que los resultados permiten observar que las variables cepa y concentración, influyeron significativamente en la efectividad del extracto etanólico de la cáscara de *Punica Granatum* sobre la susceptibilidad *Candida albicans*.

HIPOTESIS

Cepas:

$H_0 = \text{Cepa 1} = \text{Cepa 2} = \text{Cepa 3} = \text{Cepa 4}$

Concentración:

$H_0 = \text{K 50} = \text{K 100} = \text{K 150} = \text{K 200} = \text{K 250}$

Interacciones:

$H_0 =$ No existen efecto de interacciones entre las cepas de *Candida albicans* y las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Punica granatum*.

Tabla 03. Análisis de varianza de la susceptibilidad de *Candida albicans* a las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Punica granatum*.

Origen	SC	GL	CM	F	Sig.	Decisión
Cepa (C)	47,067	3	15,689	4,488	,007	Rechazar H_0
Concentración (K)	1554,500	4	388,625	111,178	,000	Rechazar H_0
Intersección	28166,667	1	28166,667	8057,950	,000	Rechazar H_0
Error	181,767	52	3,496			
Total	29950,000	60				
Total corregida	1783,333	59				

a. R cuadrado = 0.898 (R cuadrado corregida = 0.884)

S.C = Suma de Cuadrados

G.L = Grados de libertad

C.M = Cuadrado Medio

Al realizar la prueba de significancia de Tukey (0,05) a los promedios de los diámetros de los halos de inhibición de las cepas de *Candida albicans* frente al extracto etanólico de *Punica granatum*, para el factor cepas (C₁, C₂, C₃, C₄) se demostró estadísticamente que la cepa C₂, la cepa C₃ y la cepa C₄ presentaron comportamiento similar, de la misma manera que las cepa C₁ y C₃; sin embargo se evidenció que existe diferencia entre las cepas C₁ y C₂, del mismo modo que las cepas C₁ y C₄.

Se determinó el grado de susceptibilidad de cada cepa de *Candida albicans*, frente al extracto de *Punica granatum*, sin tener en consideración las diferentes concentraciones.

Tabla 05. Prueba de significancia de Tukey (0,05) de los promedios de los diámetros de los halos de inhibición de las cepas de *Candida albicans* frente al extracto etanólico de *Punica granatum*.

Cepas Candida	Promedio	Significancia
C-2	20.9333	a
C-4	21.0000	a
C-3	21.6000	a b
C-1	23.1333	b

 **Letras diferentes** = Diferencia significativa

 **Letras iguales** = No existe diferencia significativa

Por medio de la prueba de Tukey (0,05) se demostró estadísticamente la susceptibilidad de *Candida albicans* al ser expuesta a las diferentes concentraciones (Cc. 50 mg/mL, Cc. 100 mg/mL, Cc. 150 mg/mL, Cc. 200 mg/mL, Cc. 250 mg/mL) del extracto etanólico de *Punica granatum*. Se determinó que existen diferencias significativas entre las diferentes concentraciones (Tabla N° 6).

De esta manera se pudo afirmar que a medida que aumenta la concentración del extracto etanólico, existe también mayor susceptibilidad de las cepas de *Candida albicans*.

Tabla 05. Prueba de significancia de Tukey (0,05) de los promedios de los diámetros de los halos de inhibición de *Candida albicans* en función a las diferentes concentraciones del extracto etanólico de la cáscara *Punica granatum*.

Concentración	Promedio	Significancia
K-50	13.3333	a
K-100	18.4167	b
K-150	24.0833	c
K-200	25.3333	c d
K-250	27.1667	d

✚ Letras diferentes = Diferencia significativa

✚ Letras iguales = No existe diferencia significativa

Por medio de la prueba de Tukey (0,05) para el factor Interacción Cepas - Concentración, se demostró estadísticamente que los promedios de los diámetros de los halos de inhibición van a diferir significativamente cuando las concentraciones del extracto etanólico de *Punica granatum* van en aumento, teniendo en cuenta además del distinto comportamiento que presenta cada una de las cepas de *Candida albicans*, lo cual demuestra que la susceptibilidad de *Candida albicans* a diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Punica granatum*, se va a ver influenciada tanto por las concentraciones del extracto (Cc 50 mg/mL, Cc 100 mg/mL, Cc 150 mg/mL, Cc 200 mg/mL, Cc 250 mg/mL), como por diferencias existentes entre las cepas de *Candida albicans* (C1, C2, C3, C4), notándose mayor diferencia a partir de la C1 – K100, observando a partir de allí mayor susceptibilidad de las cepas, confirmando que a mayor concentración existe mayor inhibición.

Tabla 06. Prueba de significancia de Tukey (0,05) interacción de las diferentes concentraciones del extracto etanólico de la cáscara de *Punica granatum* y cepas de *Candida albicans*.

Cepa - Concentración	Promedio	Significancia
C-2 x K-50	12.6667	a
C-4 x K-50	12.6667	a
C-3 x K-50	13.0000	a
C-1 x K-50	15.0000	a b
C-4 x K-100	15.3333	a b
C-2 x K-100	17.0000	b
C-3 x K-100	19.3333	b c
C-1 x K-100	22.0000	c d
C-4 x K-150	22.3333	c d
C-3 x K-150	24.0000	d
C-2 x K-200	24.3333	d
C-1 x K-150	25.0000	d
C-2 x K-150	25.0000	d
C-3 x K-200	25.0000	d
C-1 x K-200	25.6667	d
C-2 x K-250	25.6667	d
C-4 x K-200	26.3333	d
C-3 x K-250	26.6667	d
C-1 x K-250	28.0000	d
C-4 x K-250	28.3333	d

4.2 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del extracto etanólico de la cáscara de *Punica granatum* (GRANADA) sobre cepas de *Candida albicans*.

Para determinar la Concentración mínima inhibitoria del extracto de la cáscara de *Punica granatum* (GRANADA) sobre cepas de *Candida albicans*, se trabajó el método de macrodilución en tubo, aplicado según Norma Técnica Peruana N° 30 del INS ⁽²⁴⁾.

Para la realización del experimento, se utilizaron las cuatro cepas de *Candida albicans* (C1, C2, C3, C4) y la concentración de 50 mg/mL del extracto etanólico de la cáscara de *Punica granatum*, se trabajó con dicha concentración debido a que fue la menor concentración que ejerció susceptibilidad sobre todas las cepas de *Candida albicans* en estudio.

Para la evaluación de la Concentración Mínima Inhibitoria, se tuvo en cuenta si hubo crecimiento o no de *Candida albicans* en los tubos en que se realizaron las diluciones del extracto etanólico de la cáscara de *Punica granatum* (Cc 50 mg/mL).

Se pudo observar la susceptibilidad de cada una de la cepas, y se obtuvo como resultado que para la C₁ y C₃ de *Candida albicans* la concentración mínima que no permite su desarrollo visible es 1.56 mg/mL, sin embargo para la C₂ de *Candida albicans* la concentración mínima que impide su desarrollo es 6.25 mg/mL, a diferencia de la C₄ cuya Concentración Mínima Inhibitoria es 3.125 mg/mL, lo cual se observa en la Tabla N° 06.

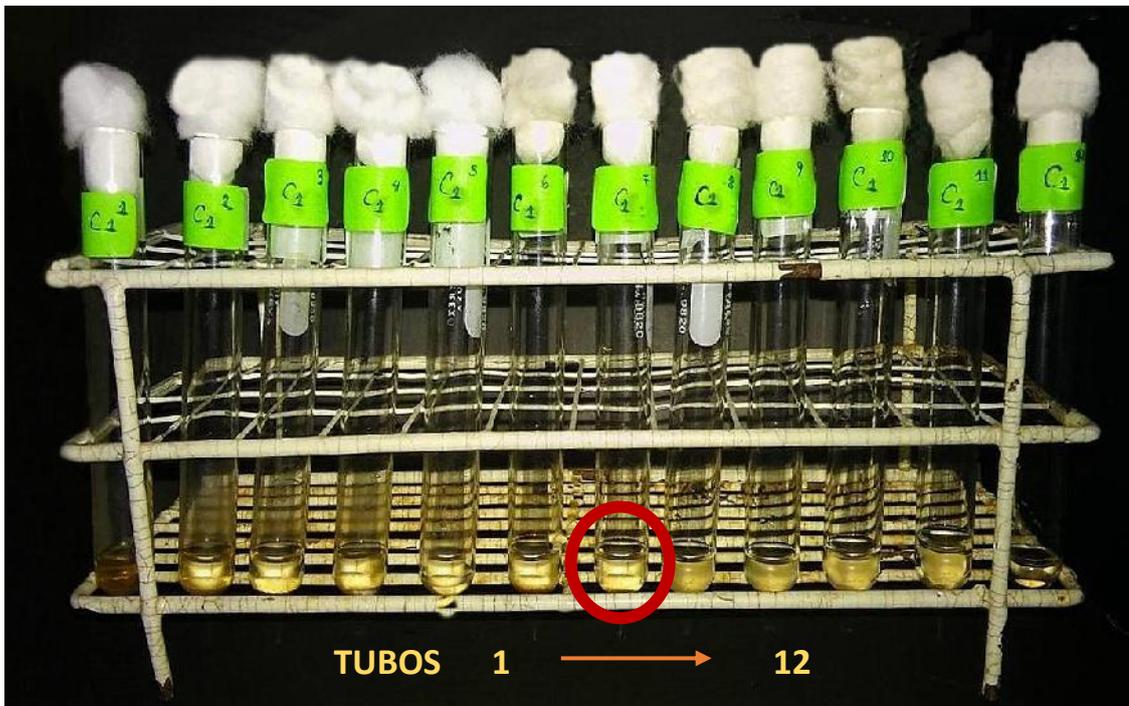
Tabla 07. Concentración Mínima Inhibitoria del extracto etanólico de la cáscara de *Punica granatum* sobre cepas de *Candida albicans*.

Cepas de <i>Candida albicans</i> - Concentración 50 mg/ml				
	C1	C2	C3	C4
Control positivo*	-	-	-	-
50 mg/mL.	-	-	-	-
25 mg/mL.	-	-	-	-
12.5 mg/mL.	-	-	-	-
6.25 mg/mL.	-	-	-	-
3.125 mg/mL.	-	+	-	-
1.56 mg/mL.	-	+	-	+
0.78 mg/mL.	+	+	+	+
0.39 mg/mL.	+	+	+	+
0.19 mg/mL.	+	+	+	+
Control negativo**	+	+	+	+
Control del Extracto***	-	-	-	-

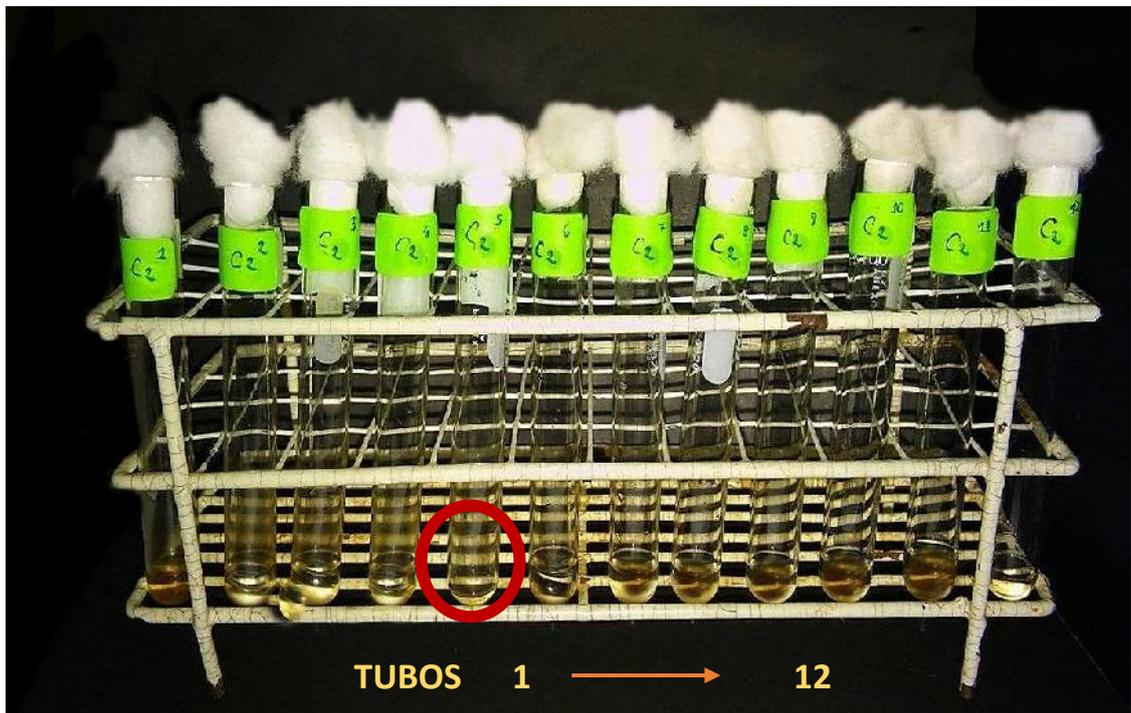
(*) Extracto + inóculo (**) Caldo sabouraud + inóculo (***) Caldo sabouraud + Extracto

(+) Crecimiento

(-) No hay crecimiento

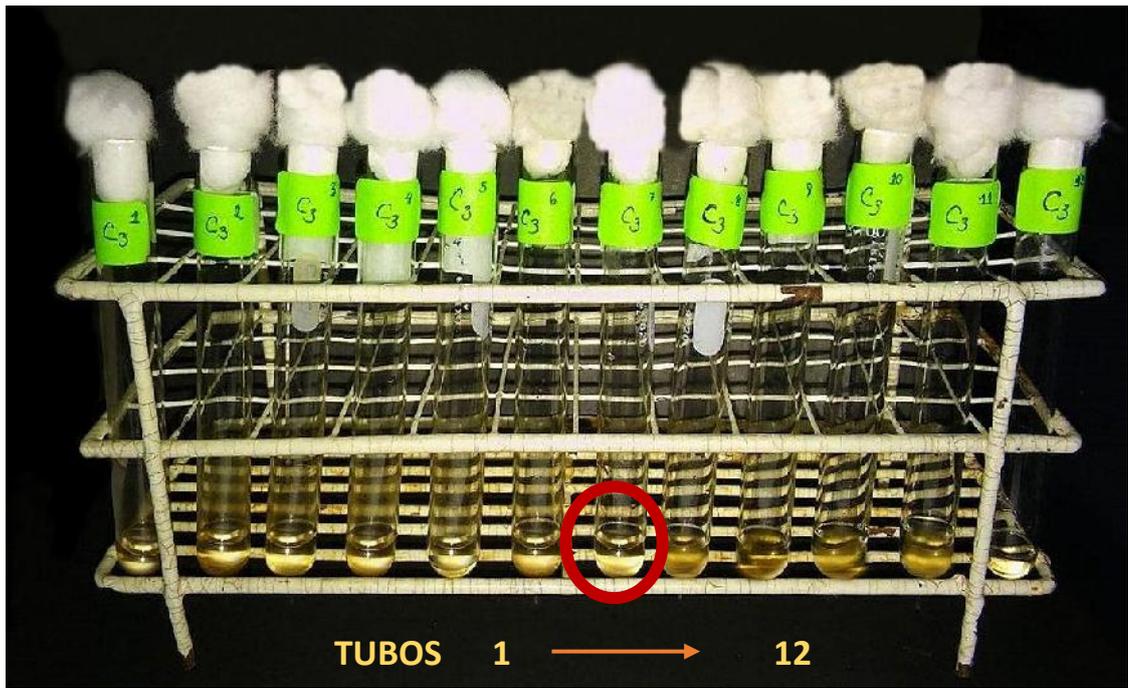


C₁ de *Candida albicans* – Cc. 50 mg/mL. CMI – 1.56 mg/mL

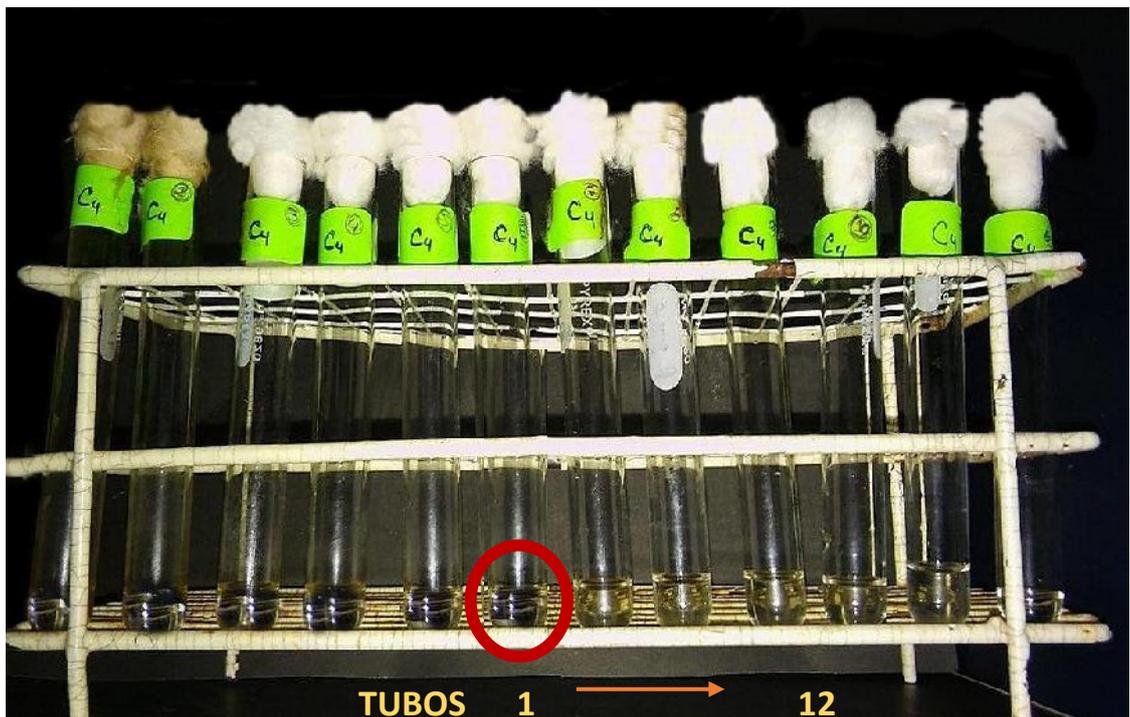


C₂ de *Candida albicans* – Cc. 50 mg/mL. CMI – 6.25 mg/mL

Fig. 7 Concentración Mínima Inhibitoria del extracto etanólico de la cáscara de *Punica granatum* sobre cepas de *Candida albicans* (C1 – C2).



C₃ de *Candida albicans* – Cc. 50 mg/mL. CMI – 1. 56 mg/mL



C₄ de *Candida albicans* – Cc. 50 mg/mL. CMI – 3. 125 mg/mL

Fig. 8 Concentración Mínima Inhibitoria del extracto etanólico de la cáscara de *Punica granatum* sobre cepas de *Candida albicans* (C3 – C4).

V. DISCUSIÓN

En el presente trabajo de investigación se determina la susceptibilidad de cepas de *Candida albicans* a diferentes concentraciones del extracto etanólico de la cáscara de *Punica granatum*, el cual busca contribuir con el desarrollo de nuevas alternativas en la terapia antimicótica.

Los resultados obtenidos nos indican que el extracto etanólico de la cáscara de *Punica granatum* ejerce actividad antifúngica sobre *Candida albicans* ^(3, 4, 19, 23, 27, 33, 34). Los estudios revelan que esto puede ser debido a la acción de los compuestos bioactivos de la cáscara ⁽⁴⁾, ya que esta contiene alcaloides y aproximadamente 20% de taninos totales altamente concentrados^(4, 27) incluyendo un alto porcentaje (80%) de anómeros de punicalagina ⁽³²⁾, granatinas A y B, gallagyldilacton, casuarinina, pedunculagina ^(4, 5, 27, 34) y es fuente importante de elagitaninos ^(5, 32), que pueden ser degradados por ácidos y bases fuertes o mediante el uso de enzimas para formar un porcentaje significativo de ácido eláxico ^(12, 32).

Un análisis realizado a la cáscara de granada muestra más de 30 compuestos detectados, los cuales incluyen: punicacortein A, punicacortein B, punicacortein A, punicacortein B, corilagina. Los compuestos superiores al 40% fueron: glucosa, ácido cítrico, ácido cafeico, ácido punicina, pedunculagina, tellimagrandina; y punicalagina presentó el 100% de detección ⁽⁴⁾, el mismo estudio reveló el efecto de los extractos de cáscara de granada sobre la morfología y estructura de *C. albicans* y *C. krusei*, el cual se examinó mediante microscopía electrónica de barrido y transmisión, con la visualización de una membrana irregular e hifas, formación de vacuolas y engrosamiento de la pared celular.

Existen diferentes investigaciones, sobre el uso y efectividad de *Punica granatum*, el presente estudio fue realizado a partir del extracto etanólico de la cáscara de granada, a concentraciones de 50 mg/mL - 250 mg/mL sobre cepas de *Candida albicans*, obteniendo resultados de 12,66 mm hasta 28.3 mm de halos de inhibición;

con una CMI de 1.56 mg/mL. Un ensayo similar con extracto metanólico del pericarpo de granada determinó que existe efecto inhibitorio contra las especies del género *Candida*, obteniendo la CMI a concentraciones de 0.5 y 1 mg/mL; *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilopsis* fueron inhibidas a la dosis de 0.5 mg/mL y *Candida tropicalis* a 1 mg/mL ⁽¹⁹⁾; cabe señalar que el tipo de extracto y la concentración de metabolitos responsables de la inhibición, que se encuentran en las distintas partes de la planta puedan marcar las diferencias entre las experimentaciones.

La actividad antifúngica de los extractos etanólicos de arilos y semillas, pericarpio, y jugo de granada; demostraron que el pericarpo de dicha fruta presentó una CIM de 31,5 µg / mL a *C. parapsilosis*, 62,5 µg / mL a *C. utilis*, *C. lusitaniae*, *C. glabrata*, y 125 o 250 µg / mL para las otras especies de *Candida*, mostrando una mayor actividad que los demás extractos y la resistencia de todas las cepas a los arilos y al extracto de semilla ⁽⁴⁾. Mediante el método de decocción acuosa de la cáscara de granada en polvo, se logró determinar que *Punica granatum* inhibe a *Candida albicans* con una zona media de inhibición de 22 mm ⁽²⁷⁾; por medio de un experimento con extracto acuoso y etanólico de la cáscara de granada en polvo, con concentraciones de 80% a 25%, se obtuvieron zonas de inhibición de 19,5 mm a 22 mm sobre *Candida albicans* y de 21 mm - 23,5 mm sobre *Candida tropicalis*, indicando la excelente actividad etanólica a diferentes concentraciones; el extracto acuoso también mostró buena actividad antifúngica. Las concentraciones inhibitorias mínimas fueron de 128µg/ mL - 1024µg / mL frente a *Candida albicans* y *Candida tropicalis*, la diferencia entre las actividades de extracto alcohólico y extracto acuoso fue mínima ⁽³⁴⁾.

Dependiendo del tipo de extracto y la parte de la planta utilizada, se deduce que los extractos de *Punica granatum* son eficaces contra *Candida albicans*, y que la susceptibilidad de la levadura es directamente proporcional a la concentración del extracto; notándose mayor efectividad con los extractos etanólicos del pericarpio (cáscara y corteza) de granada, asumiendo de esta manera que los principios activos están presentes en gran proporción en esta parte de la planta, así como lo señala la literatura.

Demás estudios revelan que el extracto acuoso de *Punica granatum* posee efectos antifúngicos similares al miconazol ⁽³⁵⁾, importante en el tratamiento antifúngico; un estudio comparativo demostró que *P. granatum* a concentración de 100 mg / mL, tiene actividad definida contra *Candida*, sin embargo el efecto de inhibición es menor que el de la nistatina (100 mg/mL); un aumento en la dosis de medicación podría alcanzar una actividad similar a la del medicamento ⁽²³⁾.

En referencia a los promedios de los halos de inhibición obtenidos según el ANAVA existen diferencias entre las cepas evaluadas, sin embargo la prueba discriminativa de Tukey (0.5), indica que esta diferencia no es significativa; en relación a las diferentes concentraciones del extracto, se pudo observar que si existen diferencias significativas, notándose que a medida que aumenta la concentración existe mayor susceptibilidad, demostrándose que la susceptibilidad de *Candida albicans* es directamente proporcional a la concentración del extracto de *Punica granatum*.

La CMI obtenida en este estudio fue de 1.56 mg/mL, coincidiendo con los reportes de otras investigaciones que obtuvieron CMI de 0.125 ug / mL ⁽⁴⁾, 0.128 mg/ mL - 1.024 mg / mL ⁽³⁴⁾, 0.5 – 1 mg/mL ⁽¹⁹⁾; estos experimentos fueron realizados con extracto etanólico de la cáscara de *Punica granatum*. Los resultados sugieren al extracto de granada como agente antifúngico prometedor ⁽³⁴⁾.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, demuestran la susceptibilidad de *Candida albicans*, procedente de infecciones vaginales, frente al extracto etanólico de la cáscara de *Punica granatum*, contribuyendo en la investigación de nuevas alternativas para la terapia antimicótica.

VI. CONCLUSIONES

Al realizar el estudio sobre la Susceptibilidad de cepas de *Candida albicans* a diferentes concentraciones del extracto etanólico de la cáscara de *Punica granatum* se concluye que:

- Las cepas en estudio (C1, C2, C3, C4) de *Candida albicans* son susceptibles al extracto etanólico de la cáscara de *Punica granatum*, a concentraciones de 50 mg/mL, 100 mg/mL, 150 mg/mL, 200 mg/mL y 250 mg/mL, lo cual fue evidenciado por la presencia de halos de inhibición, notándose que la cepa más resistente fue la C₂ con un halo de inhibición de 20.93 mm y la cepa más susceptible es la C₁ con un halo de inhibición de 23.13 mm.
- Con respecto a la CMI del extracto de la cáscara de *Punica granatum* sobre cepas de *Candida albicans*, se concluyó que la cepa más resistente C₂ es inhibida a una concentración mínima de 6.25 mg/mL; mientras que la cepa más sensible C₁ se inhibió a una concentración mínima de 1.56 mg/mL.

VII. RECOMENDACIONES

- Continuar con el trabajo de investigación, enfatizando en el estudio de los principios activos que posee *Punica granatum*, evaluando así las múltiples propiedades que ofrece esta planta, además de realizar ensayos con otros microorganismos.
- Realizar otros tipos de extracciones con la finalidad de optimizar la obtención de principios activos.
- Realizar ensayos en animales de experimentación, con la finalidad, de evaluar si existe efecto citotóxico por parte de la planta en estudio.
- Continuar con trabajos de investigación que nos permitan descubrir nuevos tratamientos con la finalidad de validar el uso de plantas medicinales.

VIII. RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo determinar la susceptibilidad de las cepas de *Candida albicans* frente al extracto etanólico de la cáscara de *Punica granatum*.

Se trabajó con 4 cepas de *Candida albicans* (C1, C2, C3, C4) y 5 concentraciones distintas del extracto etanolico de la cascara de *Punica granatum* (50 mg/mL, 100 mg/mL, 150 mg/mL, 200 mg/mL, 250 mg/mL), considerando tres repeticiones por cada cepa, se realizaron un total de 60 evaluaciones.

Las cepas de *Candida albicans* se identificaron por medio de la prueba del tubo germinativo según lo establecido en la Norma Técnica Peruana N° 44 del INS ⁽¹⁷⁾, formación de clamidosporas y aislamiento e identificación en Chromogenic *Candida* Agar (CCA). Además de la obtención del extracto etanólico de la cáscara de *Punica granatum* ⁽¹⁶⁾.

La prueba de susceptibilidad de las cepas de *Candida albicans* frente al extracto etanólico de *Punica granatum* se realizó mediante el método de Disco de difusión (Kirby - Bauer), y para la evaluación de la CMI se trabajó con el método de macrodilución en tubo según Norma Técnica Peruana N° 30 del INS ⁽²⁴⁾.

El Diseño de Investigación utilizado fue el de estímulo creciente, descrito por **GOODE y HATT (1976)**. Y para el análisis estadístico de los datos, obtenidos en la experimentación correspondiente se realizó un Análisis de Varianza (ANAVA), con arreglo factorial (5x4x3); donde cinco es el número de concentraciones del extracto etanólico de la cáscara de *Punica granatum* (50 mg/ml, 100 mg/ml, 150 mg/ml, 200 mg/ml, 250 mg/ml), cuatro es el número de cepas de cultivo puro de *Candida albicans* y tres es el número de repeticiones; con un nivel de confianza del 95 %, el cual se complementó con la Prueba discriminatoria de Tukey a 0,05 nivel de significación (STELL y TORRIE, 1983).

Como resultado se obtuvo que todas cepas de *Candida albicans* en estudio fueron susceptibles al extracto etanólico de la cáscara de *Punica granatum*. Notándose mayor susceptibilidad de las cepas a medida de que la concentración del extracto aumentaba, demostrándose que la susceptibilidad de *Candida albicans* es directamente proporcional a la concentración del extracto de *Punica granatum*.

La Concentración Mínima Inhibitoria del extracto de la cáscara de *Punica granatum* sobre cepas de *Candida albicans*, se determinó utilizando la concentración más baja (50 mg/mL) que causó susceptibilidad de todas las cepas en estudio (C1, C2, C3, C4), los valores obtenidos fueron para las C₁ y C₃ de *Candida albicans*, CMI 1.56 mg/mL.; para la C₄ de *Candida albicans* CMI 3.125 mg/ mL. y para la C₂ , CMI fue de 6.25 mg/mL.

IX. ANEXOS

Anexo 01. Clasificación Taxonómica de *Punica granatum*.

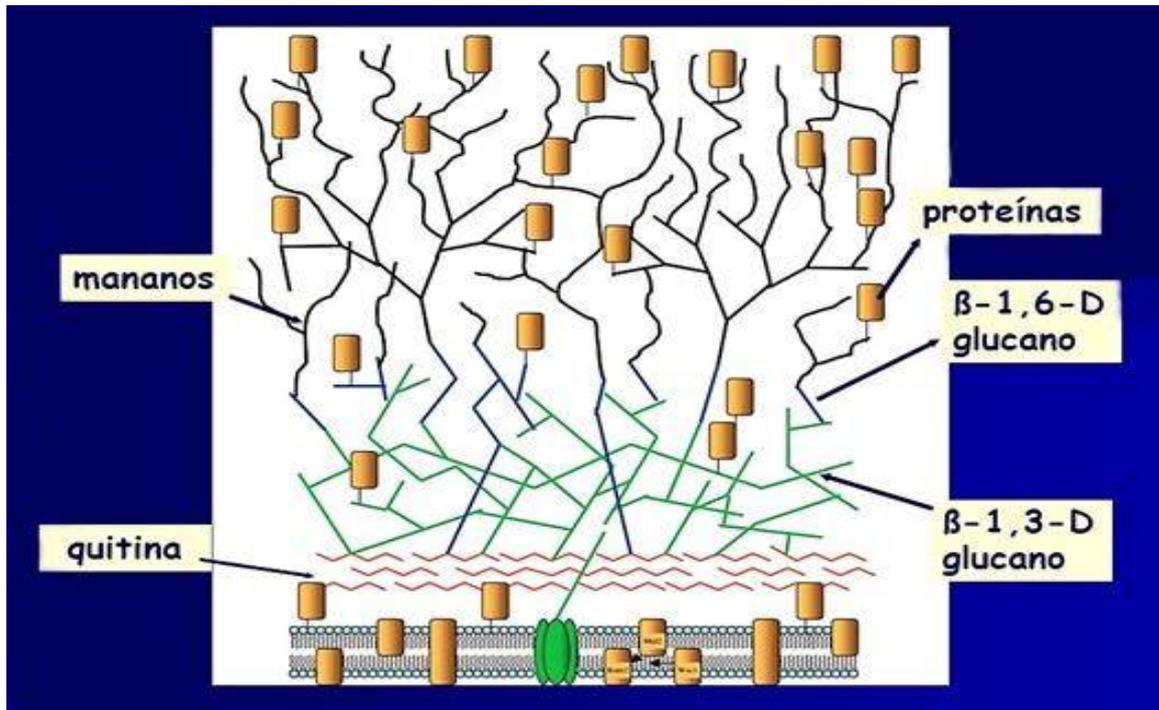


CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

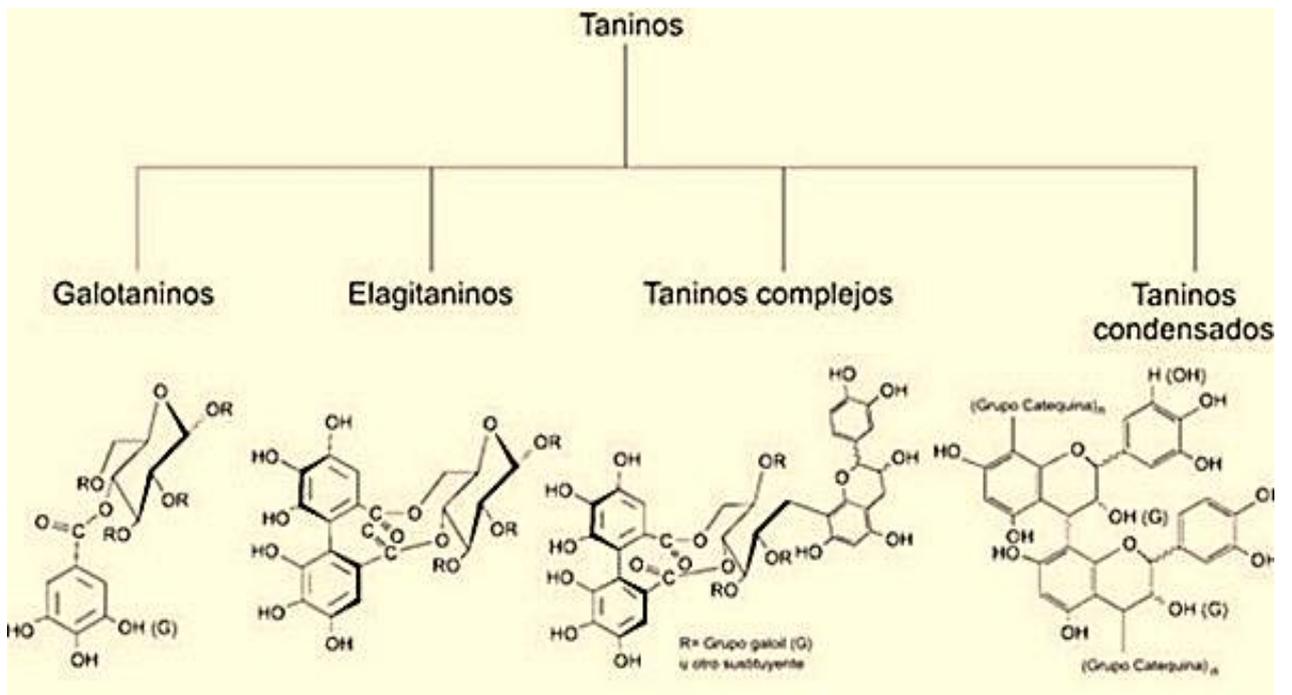
Reino	:	Plantae
División	:	Magnoliophyta
Clase	:	Magnoliopsida
Orden	:	Myrtales
Familia	:	Lythraceae
Subfamilia	:	Punicoideae
Género	:	<i>Punica</i>
Especie	:	<i>Punica granatum</i>

Llatas S., "Botánica Fanerogámica". Lambayeque – Perú, 2008

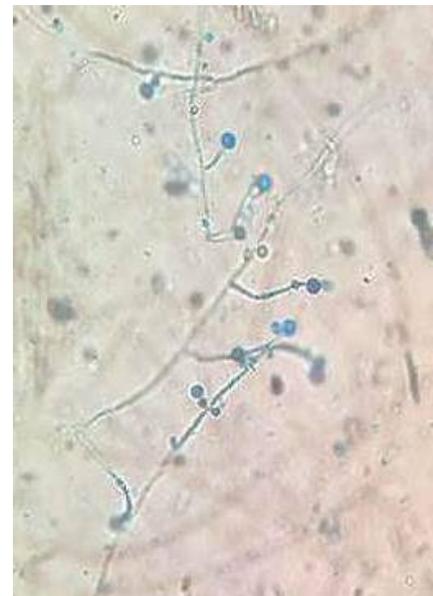
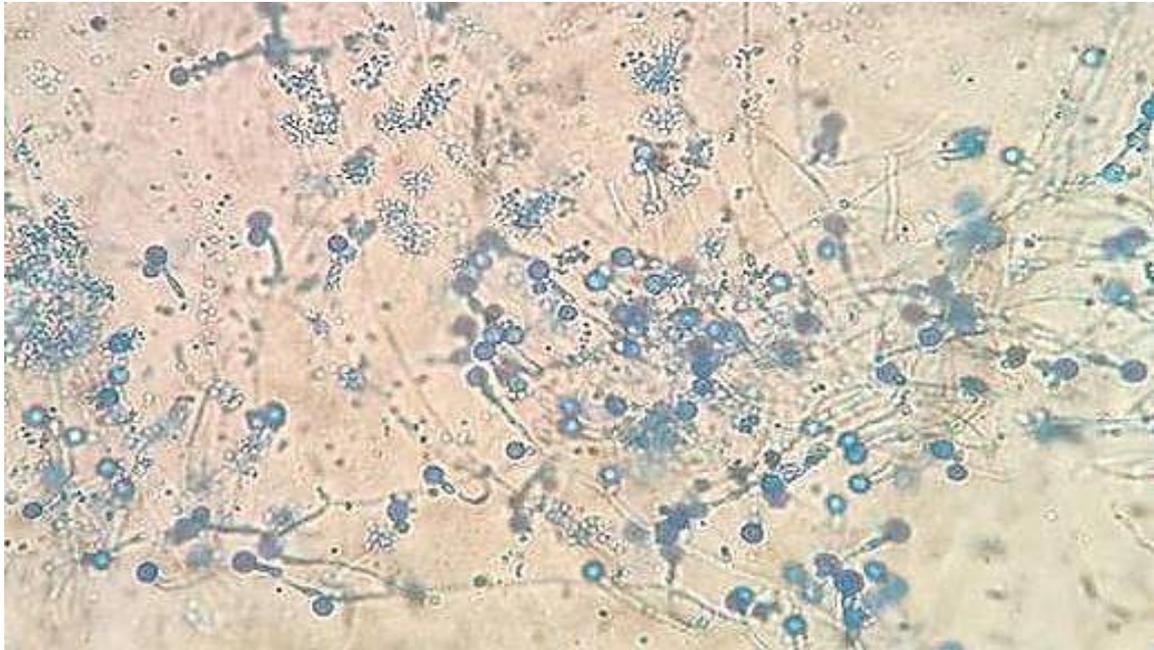
Anexo 02. Pared celular de *Candida albicans*.



Anexo 03. Clasificación de los taninos



Anexo 04. Formación de clamidosporas de las cepas de *Candida albicans*.



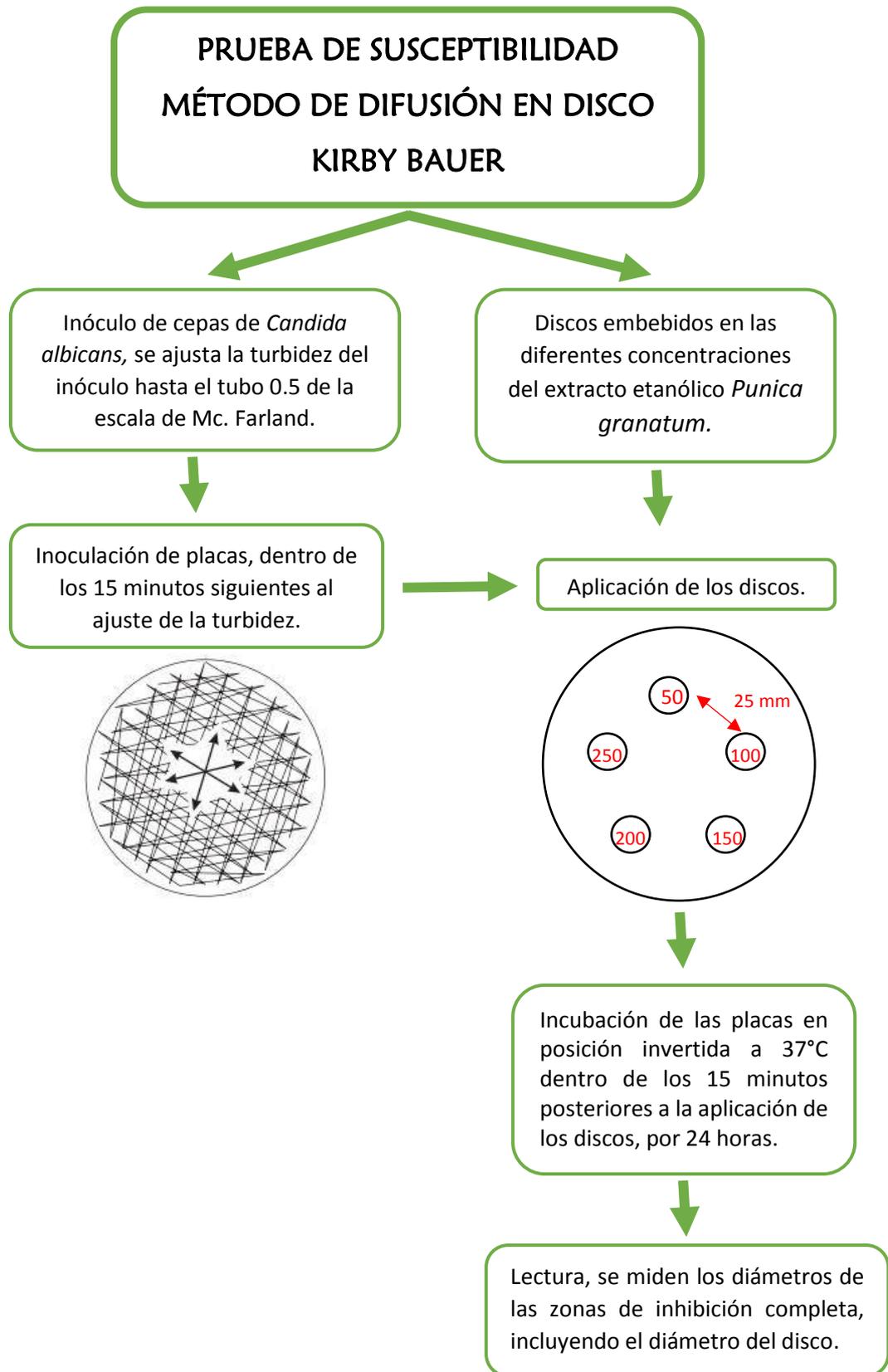
Anexo 05. Tabla resumen del procedimiento para realizar la macrodilución en Caldo

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	C.I	C.E
CALDO SABOURAUD mL	-	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Solución del extracto etanólico <i>Punica granatum</i>	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	-	-
Inóculo <i>Candida albicans</i>	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	-
Volumen final	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.5

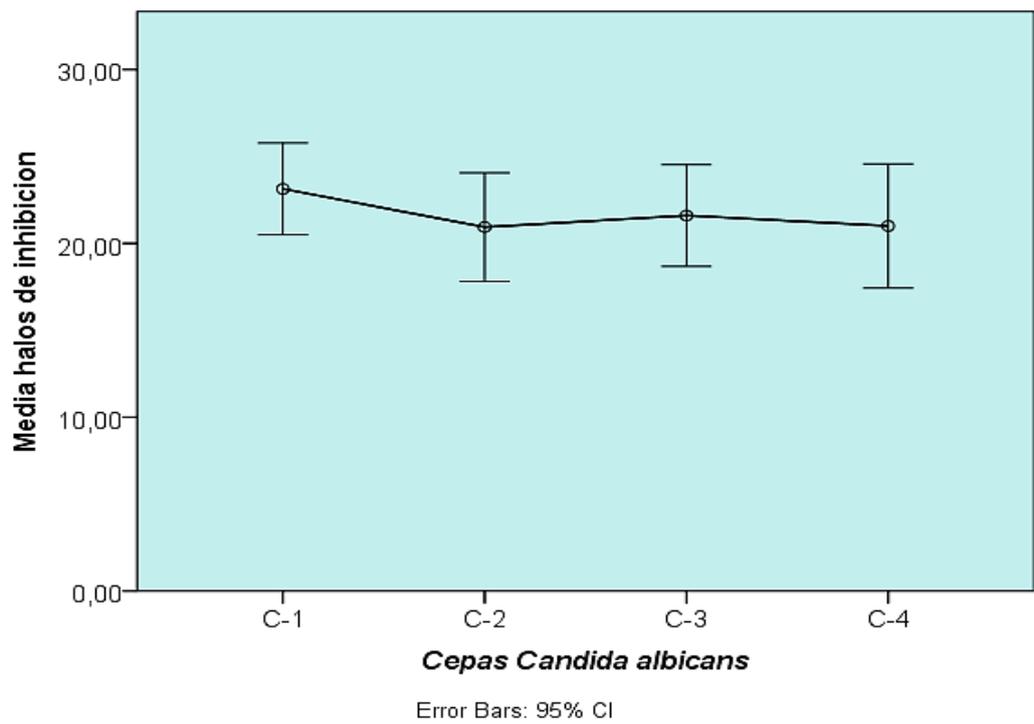
C.I = Control de inóculo

C.E = Control de esterilidad

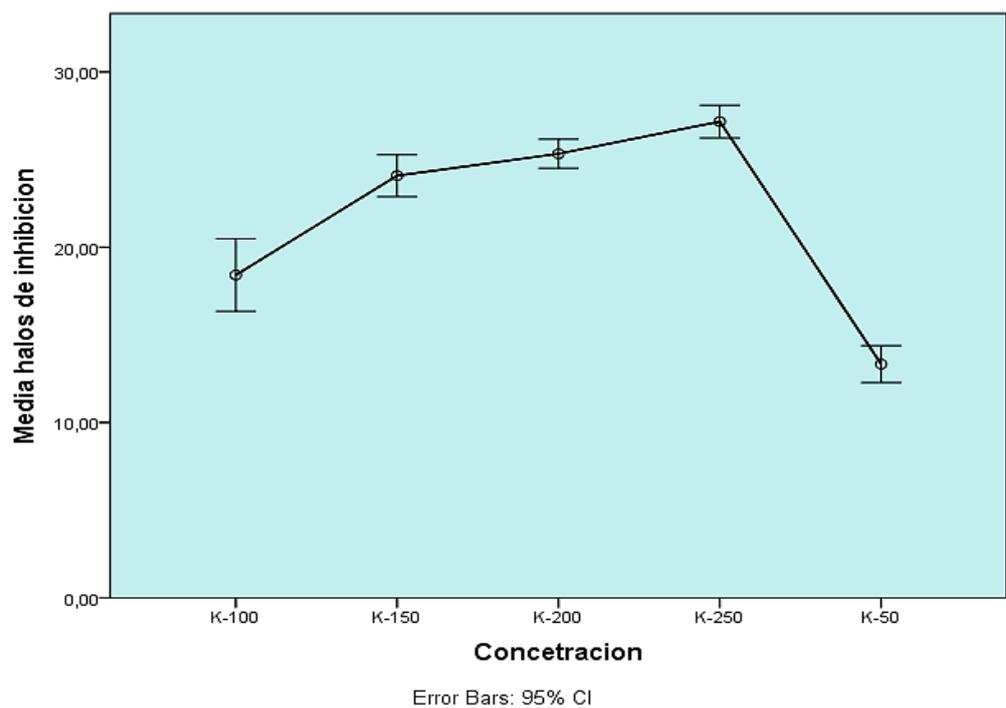
Anexo 06. Prueba de susceptibilidad método de difusión en disco KIRBY BAUER



Anexo 07. Gráfico de la prueba de significancia de Tukey (0,05) de los promedios de los diámetros de los halos de inhibición de las cepas de *Candida albicans* frente al extracto etanólico de *Punica granatum*.



Anexo 8. Gráfico de la prueba de significancia de Tukey (0,05) de los promedios de los diámetros de los halos de inhibición de *Candida albicans* en función a las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Punica granatum*.



ANEXO 09. Comparaciones múltiples, prueba de Tukey.

Variable dependiente: Halos de inhibición

(I)concentracion	(J)concentracion	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
					Límite inferior	Límite superior
K-100	K-150	-5,6667*	,76327	,000	-7,8235	-3,5098
	K-200	-6,9167*	,76327	,000	-9,0735	-4,7598
	K-250	-8,7500*	,76327	,000	-10,9068	-6,5932
	K-50	5,0833*	,76327	,000	2,9265	7,2402
K-150	K-100	5,6667*	,76327	,000	3,5098	7,8235
	K-200	-1,2500	,76327	,481	-3,4068	,9068
	K-250	-3,0833*	,76327	,002	-5,2402	-,9265
	K-50	10,7500*	,76327	,000	8,5932	12,9068
K-200	K-100	6,9167*	,76327	,000	4,7598	9,0735
	K-150	1,2500	,76327	,481	-,9068	3,4068
	K-250	-1,8333	,76327	,131	-3,9902	,3235
	K-50	12,0000*	,76327	,000	9,8432	14,1568
K-250	K-100	8,7500*	,76327	,000	6,5932	10,9068
	K-150	3,0833*	,76327	,002	,9265	5,2402
	K-200	1,8333	,76327	,131	-,3235	3,9902
	K-50	13,8333*	,76327	,000	11,6765	15,9902
K-50	K-100	-5,0833*	,76327	,000	-7,2402	-2,9265
	K-150	-10,7500*	,76327	,000	-12,9068	-8,5932
	K-200	-12,0000*	,76327	,000	-14,1568	-9,8432
	K-250	-13,8333*	,76327	,000	-15,9902	-11,6765

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = 3.496.

*. La diferencia de medias es significativa al nivel .05.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Aguilar, C; Sepúlveda, L; Ascacio J; Buenrostro J; De la Cruz R; Rodríguez, R; Contreras, J; Aguilera, A (2012).** “Aspectos fundamentales de los elagitaninos de granada (*Punica granatum L.*)”. Departamento de Química - UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE COAHUILA. Saltillo, Coahuila, México.
2. **Aguilar, Lucero (2013).** “Comparación del efecto inhibitorio in vitro del extracto etanólico con el aceite esencial de *Cymbop* “hierba luisa” sobre una cepa de *Candida albicans*”. Tesis para optar el grado de bachiller en Medicina. UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO. Trujillo – Perú.
3. **Aguilera, A; Garcia, C; Belmares, R; Aguilar, C (2005)** “Efecto inhibitorio del ácido elágico obtenido de cascara (*Punica granatum*) y gobernadora (*Larrea tridentata*) sobre diferentes microorganismos patógenos”. Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila. Saltillo, Coahuila, México.
4. **Anibal, P; Peixoto, I; Foglio, M; Höfling, J (2013)** “Antifungal activity of the ethanolic extracts of *Punica granatum L.* and evaluation of the morphological and structural modifications of its compounds upon the cells of *Candida spp*”. Braz J Microbiol. Dec 17; 44(3):839-48. Brasil.
5. **Arbayza, J; Ruiz, S; Venegas, E; Ruidias, D; Cosavalente, K (2014).** Capacidad antioxidante del zumo y de los extractos hidroalcohólico y acuoso obtenidos de *Punica granatum* y su relación con el contenido de polifenoles. Departamento de Farmacotecnia. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO. Trujillo – Perú.

6. **Arenas R.** Micología Médica ilustrada. 4ª ed. México; 2011.

7. **Bernal, R; Rodríguez, I; Salaz, M (2014).** “Efecto del extracto hidroalcohólico de *Punica granatum* sobre la viabilidad de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* in - vitro”. Escuela AP de Microbiología y Parasitología. UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO (UNT). Trujillo – Perú.

8. **Biasoli Marisa.** Candidiasis. Centro de Referencia de Micología. FBIOyF. UNR. 2013. Argentina.

9. **Bonifaz A.** Micología Médica Básica. 4ª ed. México; 2012.

10. **Bustamante, O (2006).** “Efecto inhibitorio in vitro de los extractos etanolicos de (matico) *Piper aduncum* y (cedrón) *Alloysia triphylla* sobre *Candida albicans*”. Tesis para optar el título de Licenciado en Biología, Microbiología – Parasitología. UNIVERSIDAD NACIONAL “PEDRO RUIZ GALLO”, Lambayeque – Perú.

11. **Castillo, T (2010)** “Extracción y Cuantificación de Aceite Esencial de Cáscara de Granada (*Punica granatum L.*) Y Determinar su Efecto Antifúngico Sobre *Penicillium sp*”. Tesis para obtener el título profesional de INGENIERA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

12. **Clifford, M.N; Scalbert ,A. 2000.** Review: Ellagitannins-nature, occurrence and dietary burden. J. of the Sci. of Food and Agric. 80:1118-1125.

13. **Córdova, V & García, L (2002).** “Efecto inhibitorio de una solución hidroalcoholica de *Allium sativum* (Ajo) sobre cepas de *Candida albicans*”. Tesis para optar el título de Licenciado en Biología, Microbiología – Parasitología. UNIVERSIDAD NACIONAL “PEDRO RUIZ GALLO”, LAMBAYEQUE – PERU.

14. **Cubas, J & Mejía, E (2004).** “Efecto inhibitorio In- Vitro del extracto etanólico de propóleo sobre *Candida albicans*”. Tesis para optar el título de Licenciado en Biología, Microbiología – Parasitología. UNIVERSIDAD NACIONAL “PEDRO RUIZ GALLO”, Lambayeque – Perú.
15. **De Souza, C; Correia, F; Correia, C; Vieira, M; Sheila, J; Pereira, M (2006)** “Concentración mínima inhibitoria de adhesión de *Punica granatum Linn* (granada) gel contra *S. mutans*, *S. mitis* y *C. albicans*”. Departamento de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.
16. **Espinoza & Vidaurre (2004).** “Prevalencia de *Trichomonas vaginalis*, *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis* en gestantes de los Centros de Salud Paul Harris, Atusparias, Túpac Amaru y Cerropon Chiclayo”. Tesis para optar el título de Licenciado en Biología, Microbiología – Parasitología. UNIVERSIDAD NACIONAL “PEDRO RUIZ GALLO”, Lambayeque - Perú.
17. **Figuerola, J; Peña, B; Oropesa S (2005)** “Actividad antiviral del extracto de *Punica granatum L.* (BLBu) en el modelo experimental de gripe en ratones de la línea Balb/C”. Laboratorio Nacional de Influenza, Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” Dpto. de Investigaciones Biomédicas, Centro de Química Farmacéutica. La Habana – Cuba.
18. **Gonzales, V (2004)** Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas del Amazonas. Línea de Profundización: Tecnología en Alimentos. Universidad Nacional de Colombia sede Manizales departamento de Ingeniería Química.
19. **Guerra, M; Godoy, A (2010).** “Inhibición de microorganismos causantes de vaginitis y vaginosis por frutas y raíces de uso etnomédico en Guatemala” Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología de la Facultad de Farmacia de la UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA.

20. **Guevara, M; Urcia, F; Casquero, J.** Manual de procedimientos y técnicas de laboratorio para la identificación de los principales hongos oportunistas causantes de micosis humanas. Lima: Instituto Nacional de Salud; 2007. Serie de Normas Técnicas N.º 44.
21. **Giusiano Gustavo.** Micosis oportunistas. Cátedra de Microbiología, parasitología e inmunología. 2011. Argentina.
22. **Huamani, M & Ruiz, J (2005).** “Determinación de la actividad antifúngica contra *Candida Albicans* y *Aspergillus Niger* de 10 plantas medicinales de 3 departamentos del Perú”. TESIS para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico. UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, Lima – Perú.
23. **Mansourian, A; Boojarpour, N; Ashnagar, S; Momen Beitollahi, J; Shamshiri, A (2004)** The comparative study of antifungal activity of *Syzygium aromaticum*, *Punica granatum* and nystatin on *Candida albicans*; an in vitro study. Escuela de Odontología, Teherán Universidad de Ciencias Médicas, Teherán, Irán
24. **Montes, P; Fabela H; Betanzos, G (2012).** “Actividad antimicrobiana de jugo fresco de granada y bebidas comerciales sobre cepas clínicas de *Staphylococcus epidermidis* aisladas de infecciones oculares.” Área Académica de Nutrición, Instituto de Ciencias de la Salud, UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE HIDALGO. Pachuca- México.
25. **Naz, S., Siddiqi, R., Ahmad, S., Rasool, S. A. y Sayeed, S. A. (2007).** Antibacterial activity directed isolation of compounds from *Punica granatum*. Journal of food science, 72, 341-345.
26. **Opara, L. U., Al-Ani, M. R. y Al-Shuaibi, Y. S. (2010).** Physico-chemical vitamin C content and antimicrobial properties of pomegranate fruit (*Punica granatum* L.). Food and Bioprocess Technology, 2, 315-321.

27. **Pai, M; Prashant, G; Murlikrishna, K; Shivakumar, K; Chandu, G (2010)** Antifungal efficacy of *Punica granatum*, *Acacia nilotica*, *Cuminum cyminum* and *Foeniculum vulgare* on *Candida albicans*: an in vitro study. Indian J Dent Res 2010; 21: 334-6
28. **Sabarburu, G (2004)**. "Microbiología de las investigaciones vaginales en mujeres de edad fértil, prevalencia y aspectos epidemiológicos en el programa de control de ETS y SIDA (PRO CETSS) Centro de Salud José Olaya. Chiclayo. Diciembre 2002 – Junio 2003". Tesis para optar el título de Licenciado en Biología, Microbiología – Parasitología. UNIVERSIDAD NACIONAL "PEDRO RUIZ GALLO", Lambayeque – Perú.
29. **Sacsquispe, R; Velásquez, J**. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de Disco Difusión. Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, 2002. Serie de Normas Técnicas N° 30.
30. **Sánchez, A; Cozzi, R; Cundari, E; Fiore, M; Ricordy, R; Gensabella, G; Degrassi, F; De Salvia, R (2005)**. Extracto de frutos enteros de *Punica granatum* L. como agente protector del daño inducido por el peróxido de hidrógeno. Facultad de Biología, Universidad de La Habana. Rev. Cubana Plant Med., (10) (2).
31. **Saravia, N & Guillintia, G (2012)**. Actividad antifúngica del extracto de etanol *Schinus molle* y el Fluconazol sobre *Candida albicans*. Facultad de Odontología - Universidad de San Martín de Porres, Lima - Perú.
32. **Seeram, N and Heber, D (2005)** International patent of Purification of ellagitannins. University of California. Number Publication: Wo2005097106.
33. **Shafighi, M; Amjad, L; Madani, M (2012)** Effect of Fungal Growth Inhibition from Pomegranate Flower and Peel Extracts. Departamentos de Microbiología, Rama Falavarjan, Universidad Islámica Azad, Isfahán, Irán.

34. **Shaokat, S; Hameed, H; Mohammad, H (2007)** Anti-fungal Activity of Punica Granatum L.peels Powder and Extracts from Pathogenic Samples. Iraqi J.Pharm.Sci., Vol.16 (2).

35. **Vasconcelos, L; Sampaio, M. Sampaio, FC; Higinio, JS (2003)** Use of Punica granatum Linn as an antifungal agent against candidosis associated with denture stomatitis.

36. **Ventura, J; Alarcón, F; Ramos, R; Aguilar C (2006)** Punica granatum L. (Granada): Aspectos terapéuticos, fitoquímicos y toxicológicos. Lab. Farmacología, Dpto. Ciencias de la Salud. Universidad Autónoma de Coahuila Mexico.

37. **Yáñez, G; Velasteguí, J (2014).** “Investigación de la actividad antimicrobiana y fitoquímica de extractos de plantas medicinales frente a los microorganismos patógenos *Escherichia coli* y *Candida albicans*”. Carrera de Ingeniería Bioquímica, Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO. Ambato – Ecuador.