



UNIVERSIDAD NACIONAL

“PEDRO RUIZ GALLO”

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE
MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA**

**“EFECTO INHIBITORIO *IN VITRO* DEL EXTRACTO ACUOSO DE
ALLIUM SATIVUM L. (AJO) FRENTE A CEPAS DE *CANDIDA*
ALBICANS RESISTENTE A LA NISTATINA OBTENIDAS DEL
HOSPITAL REGIONAL DOCENTE LAS MERCEDES. LAMBAYEQUE.
MARZO – SETIEMBRE 2017.”**

TESIS

**PARA OPTAR EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA – MICROBIOLOGÍA Y
PARASITOLOGÍA**

PRESENTADO POR:

**Bach. MESTANZA CARRASCO, KATHERINE ELIZABETH
Bach. VÁSQUEZ PACHAMANGO, ERICKSON JOAU MARCO**

PATROCINADOR:

Dra. GIANINA LLONTOP BARANDARIAN

**LAMBAYEQUE – PERÚ
2018**



UNIVERSIDAD NACIONAL “PEDRO RUIZ GALLO”



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

“EFECTO INHIBITORIO *IN VITRO* DEL EXTRACTO ACUOSO DE *ALLIUM SATIVUM* L. (AJO) FRENTE A CEPAS DE *CANDIDA ALBICANS* RESISTENTE A LA NISTATINA OBTENIDAS DEL HOSPITAL REGIONAL DOCENTE LAS MERCEDES. LAMBAYEQUE. MARZO – SETIEMBRE 2017.”

TESIS

**PARA OPTAR EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA – MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA**

APROBADO POR:

Dr. Eduardo Tejada Sánchez

JURADO, Presidente

Mblga. Teresa Silva García

JURADO, Secretario

Lic. Julio Cesar Silva Estela

JURADO, Vocal

Dra. Gianina Llontop Barandarian

PATROCINADOR

**LAMBAYEQUE – PERÚ
2018**

DEDICATORIA

A DIOS

Por la vida, y los hermosos padres que me dió, por hacer de la microbiología mi mayor pasión. Clama a mí y yo te responderé, y te enseñaré cosas grandes y ocultas que tú no conoces.

A MIS PADRES MARIA Y VALOY

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 MIS HERMANOS MARICIELO Y ELIAS

Por ser amigos y compañeros, mi respaldo en todo momento.

A MI ABUELITA PETRONILA

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

ERICKSON JOAU MARCO

A DIOS

Por la vida, y los hermosos padres que me dió, por hacer de la microbiología mi mayor pasión. Clama a mí y yo te responderé, y te enseñaré cosas grandes y ocultas que tú no conoces.

A MIS PADRES ROSALIA Y NORVIL

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 LEONARDO

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

A BILLY Y ROMINA

Por ser el motivo de mi superación día a día.

KATHERINE ELIZABETH

AGRADECIMIENTO

A Dios

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

A MIS PADRES MARIA Y VALOY

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

A MIS HERMANOS MARICIELO Y ELIAS

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

A MI ABUELITA PETRONILA

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

ERICKSON JOAU MARCO

A MI ASESORA
GIANINA LLONTOP BARANDARIAN

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

A MI PROFESOR
MANUEL FARCIO VILLAREAL

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
EDUARDO, 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.

ERICKSON JOAU MARCO

A Dios

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

A MIS PADRES ROSALIA Y NORVIL

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

A MI HERMANOS LEONARDO

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

A BILLY Y ROMINA

Por ser el motivo de mi superación día a día.

KATHERINE ELIZABETH

A MI ASESORA
GIANINA LLONTOP BARANDARIAN

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

A MI PROFESOR
MANUEL FARCIO
VILLAREAL

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
EDUARDO, 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.

KATHERINE ELIZABETH

RESUMEN

OBJETIVO: Determinar el efecto inhibitorio *In Vitro* del extracto acuoso *Allium sativum* L (Ajo) frente a cepas de *Candida albicans* resistente a la nistatina obtenidas del Hospital Regional Docente las Mercedes. Lambayeque. Marzo - Setiembre 2017. Se analizaron 4 cepas de *Candida albicans* de muestra vaginal resistentes a la nistatina, Se realizó 3 repeticiones por cepa para evaluar resultados confiables y confirmativos. 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/CNSP, formación de clamidosporas, crecimiento en caldo de Urea Stuart y aislamiento e identificación en Chromogenic Candida Agar (CCA) y Agar Arroz. La prueba de susceptibilidad de las cepas de *Candida albicans* resistente a la nistatina frente al extracto acuoso de ajo. Se realizó mediante el método de Disco de difusión (INS/CNSP), y para la evaluación de la CMI se trabajó con el método de macrodilución en tubo según Norma Técnica Peruana N° 30 del INS. **RESULTADOS:** Como resultado se obtuvo que todas las cepas de *Candida albicans* resistente a la nistatina en estudio fueron susceptibles al extracto acuoso de *Allium sativum* L (ajo). Notándose mayor susceptibilidad de las cepas a medida de que la concentración del extracto aumentaba. La Concentración Mínima Inhibitoria del extracto acuoso de ajo sobre cepas de *Candida albicans* resistente a la nistatina se determinó utilizando la concentración más baja (25 uL/mL) que causó susceptibilidad de todas las cepas en estudio. **CONCLUSIÓN:** Al realizar el estudio sobre el efecto inhibitorio del extracto acuoso de *Allium sativum* L. frente a cepas de *Candida albicans* resistentes a la nistatina obtenidas del Hospital Regional Docente Las Mercedes se concluye que, Las cepas en estudio (C1:3729 - C2:3709 - C3:3414 - C4:3690) son susceptibles al extracto acuoso de *Allium sativum* L, lo cual fue evidenciado por la presencia de halos de inhibición y CMI. Lo cual de esta manera de concluye que los metabolitos del extracto acuoso de ajo tienen un alto mecanismo de acción antifungico.

Palabras Clave: Efecto inhibitorio, candidosis, resistencia a la nistatina.

ABSTRACT

OBJETIVE: To determine the inhibitory effect In Vitro of the aqueous extract *Allium sativum* L (Garlic) against strains of *Candida albicans* resistant to nystatin obtained from the Teaching Regional Hospital Mercedes. Lambayeque. March - September 2017. Four strains of *Candida albicans* of vaginal sample resistant to nystatin were analyzed. Three replications were performed per strain to evaluate reliable and confirmatory results. The strains of *Candida albicans* were identified by means of the germinative tube test as established in the Peruvian Technical Standard No. 44 of the INS / CNSP, chlamydospore formation, growth in Urea Stuart broth and isolation and identification in Chromogenic *Candida* Agar (CCA) and Rice Agar. The susceptibility test of the strains of *Candida albicans* resistant to nystatin against the aqueous extract of garlic. It was carried out using the diffusion disc method (INS / CNSP), and for the evaluation of the CMI, the method of macrodilution in tube was carried out according to Peruvian Technical Standard No. 30 of the INS. **RESULTS:** As a result it was obtained that all the strains of *Candida albicans* resistant to the nystatin in study were susceptible to the aqueous extract of *Allium sativum* L (garlic). Noticing greater susceptibility of the strains as the concentration of the extract increased. The Minimum Inhibitory Concentration of the aqueous extract of garlic on strains of *Candida albicans* resistant to nystatin was determined using the lowest concentration (25 uL / mL) that caused susceptibility of all the strains under study. **CONCLUSION:** When conducting the study on the effect inhibition of the aqueous extract of *Allium sativum* L. against strains of *Candida albicans* resistant to nystatin obtained from the Teaching Regional Hospital Las Mercedes concludes that, The strains under study (C1: 3729 - C2: 3709 - C3: 3414 - C4: 3690) are susceptible to the aqueous extract of *Allium sativum* L, which was evidenced by the presence of inhibition halos and CMI. Which in this way concludes that the metabolites of the aqueous extract of garlic have a high mechanism of antifungal action.

Keywords: Inhibitory effect, candidosis, nystatin resistance

INDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	3
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
3.1 MATERIALES.....	10
3.1.1 Material biológico.....	10
3.2 MÉTODOS Y TÉCNICAS.....	10
3.2.1 Población y muestra en estudio.....	10
3.2.2 Obtención del extracto acuoso a partir del bulbo de <i>Allium sativum</i> L. (AJO) (Cobeñas y Ramos ,1998).....	11
3.2.3 Concentraciones del extracto acuoso de <i>Allium sativum</i> L (ajo)	14
3.2.4 Efecto inhibitorio del extracto acuoso de <i>Allium sativum</i> L (AJO)	14
1. Identificación de las cepas de <i>Candida albicans</i>	14
2. Preparación y estandarización del inóculo fúngico.....	14
3. Evaluación del efecto inhibitorio de <i>Candida albicans</i> resistente a la nistatina frente al extracto acuoso de <i>Allium sativum</i> L(AJO)...	15
3.2.5 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) del extracto acuoso de <i>Allium sativum</i> L. sobre <i>Candida albicans</i> resistente a la nistatina .Método de macrodilución en tubo según Norma Técnica Peruana N° 30 del INS.....	17
3.2.6 Diseño de Contrastación.....	18
3.2.7 Análisis Estadístico De Los Datos.....	18

IV. RESULTADOS

4.1 Efecto inhibitorio de cepas de <i>Candida albicans</i> resistente a la nistatina a diferentes concentraciones del extracto acuoso del bulbo de <i>Allium sativum</i> L. (AJO)	20
--	-----------

4.2 Concentración Mínima Inhibitoria del extracto acuoso del bulbo de <i>Allium sativum</i> L (AJO) sobre cepas de <i>Candida albicans</i> resistente a la nistatina.....	35
--	-----------

V. DISCUSIÓN	39
---------------------------	-----------

VI. CONCLUSIONES	42
-------------------------------	-----------

VII. RECOMENDACIONES	43
-----------------------------------	-----------

VIII. RESUMEN	44
----------------------------	-----------

IX. ANEXOS	46
-------------------------	-----------

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
--	-----------

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Diferentes concentraciones del extracto acuoso de <i>Allium sativum</i> L (Ajo).....	14
Tabla 2.	Promedio de los diámetros de los halos de inhibición de <i>Candida albicans</i> resistente a la nistatina a diferentes concentraciones del extracto acuoso de <i>Allium sativum</i> L. (Ajo).....	21
Tabla 3.	Análisis de varianza del efecto inhibitorio de <i>Candida albicans</i> resistente a la nistatina a las diferentes concentraciones del extracto acuoso de <i>Allium sativum</i> L. (Ajo).....	28
Tabla 4.	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> resistente a la nistatina frente al extracto acuoso de <i>Allium sativum</i> L (Ajo).....	29
Tabla 5.	Prueba de significancia de Tukey(0,05) de los promedios de los diámetros de los halos de inhibición de <i>Candida albicans</i> resistente a la nistatina en función a las diferentes concentraciones del extracto acuoso de <i>Allium sativum</i> L (Ajo).....	31
Tabla 6.	Prueba de significancia de Tukey (0,05) interacción de las diferentes concentraciones del extracto acuoso de <i>Allium sativum</i> L. y cepas de <i>Candida albicans</i> resistente a la nistatina.....	33
Tabla 7.	Concentración Mínima Inhibitoria del extracto acuoso del bulbo de <i>Allium sativum</i> L. sobre cepas de <i>Candida albicans</i> resistente a la nistatina.....	36

INDICE DE FIGURAS

Fig.1	Diagrama de obtención del extracto acuoso de <i>Allium sativum</i> L (Ajo).....	12
Fig. 2	Obtención del extracto acuoso de <i>Allium sativum</i> L. (Ajo).....	13
Fig. 3	Preparación y estandarización del inóculo fúngico; Agar Almidón Arroz para la prueba de clamidosporas.....	16
Fig.4	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; D. Cepas de <i>Candida albicans</i> en caldo de Urea de Stuart.	19
Fig. 5	Cepas de <i>Candida albicans</i> resistentes a la nistatina (C1:3729 – C2:3709 – C3:3414 – C4:3690) enfrentadas individualmente a las concentraciones Cc 25uL/mL - Cc 50uL/mL - Cc 75uL/mL - Cc 100uL/mL - Cc 150uL/mL del extracto acuoso de <i>Allium sativum</i> L.....	22
Fig. 6	Efecto inhibitorio de cepas de <i>Candida albicans</i> resistente a la nistatina a diferentes concentraciones del extracto acuoso del bulbo de <i>Allium sativum</i> L (Ajo).....	26
Fig. 7	Concentración Mínima Inhibitoria del extracto acuoso del bulbo de <i>Allium sativum</i> L. sobre cepas de <i>Candida albicans</i> resistente a la nistatina (C1:3729 – C2:3709 – C3:3414 – C4:3690).....	38

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Clasificación Taxonómica de <i>Allium sativum</i> L.....	46
Anexo 2. Pared celular de <i>Candida albicans</i>	47
Anexo 3. Clasificación de Alicina, Dialil, Vinilodetiinas.....	47
Anexo 4. Formación de clamidosporas de las cepas de <i>Candida albicans</i>	48
Anexo 5. Tabla referencial del procedimiento para realizar la macrodilución en caldo según Norma Técnica Peruana N° 44 del INS	49
Anexo 6. Prueba de efecto inhibitorio método de difusión en disco KIRBY BAUER.....	50
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> resistente a la nistatina frente al extracto acuoso de <i>Allium sativum</i> L.....	51
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> resistente a la nistatina en función a las diferentes concentraciones del extracto acuoso de <i>Allium sativum</i> L.....	51
Anexo 9. Comparaciones múltiples en Percentil de Dosis.....	52

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 candidosis, una enfermedad causada por especies del género *Candida*, siendo la especie más implicada *Candida albicans*. 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 por lo que su incidencia ha aumentado provocando un 25% en micosis superficiales y entre el 75 y 88% en infecciones fúngicas nosocomiales.

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.

Pero hoy en día *C. albicans* está expresando mayor resistencia al tratamiento demostrando de esta manera mayor patogenicidad ; anteriormente el tratamiento con el antimicótico nistatina era el más común , pero actualmente debido a su falta de susceptibilidad y generar resistencia es causa de preocupación y de buscar nuevas alternativas antifúngicas , esta resistencia puede verse en cepas salvajes de *Candida sp* (resistencia primaria) o puede haber sido inducida por tratamientos previos (resistencia secundaria). En los hospitales de salud pública se administra nistatina a pacientes con problemas de candidosis vaginal, bucofaríngea y gastrointestinal lo cual no está demostrando resultados positivos, de esta manera volviéndose las infecciones más agudas. Los estudios de sensibilidad *In Vitro* con agentes antifúngicos no se realizan de forma habitual en los laboratorios clínicos, sin embargo, cada vez resulta más evidente que es necesario contar con técnicas que permitan orientar el tratamiento adecuado de las micosis, así se tiene en cuenta la creciente frecuencia de cepas resistentes.

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 el ajo (*Allium sativum* L.), 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. Diversos extractos a partir de su jugo, semillas y fruto completo han sido empleados del ajo; de igual manera sus hojas, flores y raíces exhiben propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas, antihelmínticas, antibacteriales, antitumorales, antivirales y astringentes. Por tanto, hay necesidad de investigar la susceptibilidad de los extractos del ajo 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 el “Efecto inhibitorio *In Vitro* del extracto acuoso de *Allium sativum* L (ajo) Frente a Cepas de *Candida albicans* resistente a la nistatina”

II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

FERNANDEZ Y ECHEMENDIA (2001) Determinaron en Cuba la concentración mínima inhibitoria (CMI) de nistatina, uno de los antifúngicos más empleados en esta micosis, frente a 68 cepas de *Candida sp* aisladas de exudados vaginales. *Candida albicans* representó 75 % del total de cepas, mientras que *C. parapsilosis*, *C. krusei* y *C. glabrata* se encontraron con mucha menor frecuencia. Los factores predisponentes que más se presentaron fueron el embarazo y el tratamiento con antibacterianos, mientras que la leucorrea y el prurito caracterizaron los síntomas en la mayoría de los casos. Generando resistencia. Entre las micosis, probablemente la candidosis sea la de más amplia distribución y es considerada también la principal micosis oportunista. Una de sus formas clínicas más comunes es la vaginitis por *Candida albicans* o candidosis vaginal, que constituye una causa común de morbilidad en las mujeres.

La nistatina es uno de los principales agentes antifúngicos utilizados en el tratamiento tópico de la candidiasis vaginal y es quizás, el más utilizado en Cuba; sin embargo, con frecuencia se presentan casos de mujeres que padecen vaginitis crónica por *Candida*, las cuales responden solo parcialmente al tratamiento antifúngico tópico y pueden tener ataques recurrentes severos. Muchas veces las razones de esta recurrencia no llegan a precisarse, lo que hace sugerir un fallo terapéutico no inherente al hongo o la aparición de cepas con sensibilidades disminuidas o resistentes a la droga.

CÓRDOVA Y GARCÍA (2002) evaluaron el efecto inhibitorio in – vitro de una solución hidroalcohólica 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 Hidroalcohólica 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 Hidroalcohólica de *Allium sativum* “Ajo” ejerce acción inhibitoria sobre cepas de *Candida albicans*, además la Concentración Mínima Inhibitoria de la solución hidroalcohólica 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 (PROCETSS) 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 resultó ser 40 mg/ml.

ESPINOZA Y VIDAURRE (2004) Realizaron un estudio en el que determinaron la prevalencia de *Trichomonas vaginalis*, *Candida albicans*, *Gardenerella vaginalis* en gestantes de los centros de Salud Paul Harris, Atusparias, Tupac Amaru y Cerropon Chiclayo 2004. En el centro de salud de Atusparias se encontró una prevalencia de 87.5%, en el centro de Salud Tupac 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 infecciones única obtuvo un mayor porcentaje con 77.6% predominando *Gardenerella 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 infección en el grupo de 25-30 años con 89.1%; así como en las gestantes que se encontraron cursando las 28-4 semanas de gestación con 84.6%, número de partos 0-1 con 81.6%

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 presentaron flujo vaginal y/o síntomas. Encontró una prevalencia de 87,62% siendo *Candida albicans* el agente etiológico con 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 vulvovaginal (10,48%).

HUAMANI Y RUIZ (2005) Investigaron la actividad antifúngica *In Vitro* de doce extractos etanolicos correspondientes a diez plantas medicinales peruanas; *Annona cherimolia mill.* (hojas) , *Annona muricata L.* (corteza y hojas) , *Bidens pilosa L.* (partes aéreas) , *Hypericum laricifolium L.* (partes aéreas), *Juglans neotropica Diels* (corteza) , *Piper spp.*(hojas) , *Plantago major L.*(hojas) , *Psidium guajava L.*(hojas) , *Schinus molle L.*(corteza y hojas) y *Spartium junceum L.* (planta entera). Recolectaron a las especies en el departamento de Amazonas, excepto *Schinus molle L.* (Apurimac) y *Annona muricata L.* (Lima). 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 *Aspegillus niger* ATCC1 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 mostro 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 ug/ml para *Hypericum laricifolium L.*, *Juglans neotropica Diels*, *Psidium guajava L.* y *Schinus molle L.* (un extracto de corteza y una de hojas) y de 500 ug/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), los antifungicos Nistatina y Fluconazol fueron incluidos en el estudio como controles positivos.

BUSTAMANTE (2006) Evaluaron el efecto inhibitorio de los extractos etanolicos de *Piper aduncum* (matico) y *Alloysia triphylla* (cedron) frente a *Candida albicans* , utilizo 5 cepas de *Candida albicans* (c-1UNPRG , c-2 UNPRG , c-3 UNPRG ,c-4 INS , C-5 INS) , a una concentración de 3x10⁶ 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 y cálculo de la CMI.

Como resultado obtuvo que el efecto inhibitorio del extracto etanolico de *Piper aduncum* y *Aloysa triphylla* frente a *Cándida albicans* fue directamente proporcional a las concentraciones. La concentración Mínima Inhibitoria del extracto etanolico 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.

GARCIA Y HERRERA (2007) Realizaron un trabajo donde evaluaron el efecto inhibitorio *In Vitro* *Allium sativum*, *Allium fistulosum* y *Allium cepa* sobre cinco cepas bacterianas patógenas: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Salmonella spp.* El extracto de *Allium cepa* mostro mayor poder inhibitorio sobre *E.coli*, *Salmonella spp.* Y *Bacillus cereus*; *Allium Fistulosum* mostro un bajo efecto antibacteriano excepto cuando se enfrentó a *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* con los cuales mostro el mayor efecto inhibitorio. Los extractos de *Allium cepa* y *Allium fistulosum* mostraron un mayor poder antimicrobiano con respecto a *Allium sativum*.

MAMANI Y MERCADO (2009) Realizaron un trabajo de investigación del efecto *In Vitro* de *Allium sativum* liofilizado sobre *Candida albicans*; se utilizaron 15 muestras aislados de pacientes del hospital “Carlos Monge Medrano” Juliaca; se utilizó ajo liofilizado (alicina 9 mg) ; posteriormente se realizaron diluciones para encontrar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima Letal (CML ,por medio de la escala de Mc Farland)

Se encontró que la CMI produjo un halo de inhibición promedio de 7.3mm siendo la concentración del ajo 25mg/ml; CML produjo un halo de inhibición promedio de 11.6mm y una concentración de 50mg/ml de solución de ajo, además se demostró la concentración óptima (CO) 200mg/ml y un halo promedio de 31.3mm. Concluyendo así que el ajo liofilizado posee una actividad anti fúngica *In Vitro* frente a *Cándida albicans*.

LORA et al., (2010) Realizaron un trabajo orientado al efecto antimicótico *In Vitro* de *Allium sativum* sobre dermatofitos y *Candida albicans*. Para ello se utilizaron treinta cultivos puros de los cuales correspondieron: 7 a *Trichophyton mentagrophytes*, 4 a *Trichophyton rubrum*, 4 a *Microsporum canis* y 15 a *Candida albicans*; se utilizaron 100g de *Allium sativum*.

Las pruebas de sensibilidad se realizaron usando el método de difusión en agar (MDA) y el método de dilución en agar. Para el caso de los dermatofitos por el MDA se logró una inhibición de 300-400 ug/ml de ajo liofilizado; una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 500 ug/ml y un efecto fungicida de 1000 ug/ml. En el caso de *Candida albicans*, por el MDA se obtuvo mayor diámetro de inhibición entre 4000 y 5000 ug/ml una CMI de 250 ug/ml y un efecto fungicida de 5000 ug/ml. Con estos resultados se corrobora las propiedades medicinales que se le atribuyen al ajo y se podrían utilizar en estudios In Vivo.

DIAZ et al., (2011) Realizaron que el tratamiento sintomático de la candidosis vulvo vaginal aumenta la posibilidad de crear resistencia en las agentes causales; en sus resultados se reportó resistencia a nistatina y fluconazol por especie *Candida krusei*, *Candida albicans*; pero en las demás cepas fueron sensibles a los tratamientos incluso a fluconazol.

Tomaron 15 cepas de *C.albicans* de las cuales 5 generaron resistencia a nistatina 7mm y fluconazol con halos de 10 mm y el resto de cepas mostraron susceptibilidad ambos antimicóticos, sin embargo de las 10 cepas de *C.krusei* 6 mostraron resistencia al nistatina el resto de cepas fueron sensibles al fluconazol dicho antimicótico terapéutico.

GULL et al., (2012) Realizaron un estudio sobre el efecto inhibidor de *Allium sativum* y *Zingiber officinale* contra bacterias patógenas resistentes a drogas clínicamente importantes. Utilizaron tres tipos de extractos de ajo y jengibre incluyendo; extracto acuoso, metanol extracto y etanol extracto, contra *Pseudomona aeruginosa*, *S.aureus*, *B.subtilis*, *K.pneumoniae*, *Salmonella sonnei*, *Staphylococcus epidermidis*, *E.coli* y *Salmonella thypi*. La actividad bacteriana se determinó por método de difusión en disco, obteniendo como resultado en todas las cepas bacterianas probadas susceptibilidad del extracto acuoso del ajo y pobre susceptibilidad al extracto acuoso de jengibre. La CMI de las diferentes especies bacterianas vario de 0.005 mg/ml a 1.0 mg/ml. Concluyeron que el estudio fomenta el uso de especies, como medicina alternativa o complementaria para producir la carga de alto costo, efectos secundarios y aumento progresivo de la resistencia a fármacos de los agentes patógenos.

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).

MUNAYAKO Y MURAMI (2013) Realizaron un estudio para determinar el efecto antimicrobiano y antifúngico del extracto de *Allium sativum* L a diversas concentraciones frente a cepas estándares de la cavidad bucal: *Streptococcus mutans*, *Capnocytophaga sputigena*, *Lactobacillus casei* y *Candida albicans*. El extracto se obtuvo por el proceso de maceración y para la experimental se usó el método de difusión mediante discos: Ciprofloxacino y Fluconazol como control positivo de las bacterias y hongos respectivamente y el alcohol 70° como control negativo.

La concentraciones antimicrobiana frente a *Capnocytophaga sputigena*, *Streptococcus mutans* y *Candida albicans* fue de 120 mg/ml, teniendo como referencia estándar al ciprofloxacino a una concentración de 4 mg/ml y al fluconazol a una concentración de 2mg/ml. Concluyendo que el extracto hidroalcoholico de *Allium sativum* presento efecto antimicrobiano frente a las cepas estándares de la cavidad bucal con excepción de *Lactobacillus casei* que presento resistencia.

NUÑEZ Y WILMA (2014) Determinaron la resistencia al fluconazol y nistatina mediante el fungigrama en vaginosis crónica causada por *Candida albicans* en mujeres de 18-35 años que acuden a CEMOPLAF (Centro medico de orientación y planificación familiar) Latacunga, que tuvieron por 2 veces o más infecciones vaginales por *Cándida Albicans* en 6 meses anteriores y acuden a consulta con los mismos síntomas.

Determinaron en esta investigación la resistencia de *Candida albicans* al fluconazol y nistatina en porcentaje, contaron con la colaboración voluntaria de 108 pacientes con candidosis vaginal crónica que acuden a CEMOPLAF Latacunga. De los cuales 78 pacientes se obtuvo resistencia ala nistatina con un porcentaje de 72% y con el fluconazol 60 pacientes mostraron resistencia con un porcentaje de 55%.

SUAREZ et al., (2015) En Nicaragua realizaron el Perfil de resistencia micótica de *Candida sp.* Al clotrimazol, fluconazol y nistatina en mujeres durante la segunda mitad del embarazo con candidosis vulvo-vaginal atendidas en el hospital L. F. M. La Candidosis Vulvo-vaginal es una de las enfermedades más comunes en mujeres embarazadas con una incidencia de un 35% se asocia a parto pre término y sepsis neonatal; representa un problema de índole mundial por cambio epidemiológico en los agentes etiológicos y modificaciones en sus perfiles de resistencia. En Nicaragua no se realizan pruebas de sensibilidad micótica por lo cual es un reto cumplir con el objetivo del milenio enfocado a la reducción de la morbi mortalidad materna. Por esta razón se plantea establecer el perfil de resistencia micótica de *Candida sp.* Con los resultados se espera mejorar la calidad de atención de la mujer embarazada con diagnóstico de candidosis vaginal.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

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, el bulbo de *Allium sativum* L “AJO”, el fruto de ajo fue obtenido en el Mercado Modelo de la ciudad de Chiclayo en el departamento de Lambayeque, durante los meses de Marzo 2017 – Setiembre de 2017.

Se trabajó con cultivos puros de *Candida albicans* resistentes a la nistatina obtenidos a partir de secreciones vaginales, aislados e identificados en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Regional Docente las Mercedes Chiclayo -Lambayeque.

3.2. MÉTODOS Y TÉCNICAS

3.2.1. Población y muestra en estudio

La población son las cepas de *Candida albicans* resistentes a la nistatina aisladas de pacientes con diferentes tipos de candidosis atendidos en el Hospital Regional Docente las Mercedes. Las muestras estarán constituidas por 4 cepas de *Candida albicans* resistentes a la nistatina aisladas de muestras de secreción vaginal,

Las cuáles serán enfrentadas a concentraciones de 25uL/mL, 50uL/mL, 75uL/mL, 100uL/mL y 150uL/mL, del extracto acuoso de *Allium sativum* L (ajo) realizando tres repeticiones por cepa, obteniendo 60 evaluaciones.

Se utilizó como control positivo disco antimicótico de fluconazol de 25 uL/mL y como control negativo se utilizó disco embebido en agua destilada estéril.

3.2.2 Obtención del extracto acuoso a partir del bulbo de *Allium sativum* L. (AJO) (Cobeñas y Ramos 1998).

Se Obtendrá extracto acuoso de *Allium sativum* L. “ajo”

La experimentación se realizó en el laboratorio de Microbiología y Parasitología, de las instalaciones de la Universidad Nacional “Pedro Ruiz Gallo” Lambayeque.

Los bulbos de ajo fresco se pelaron usando guantes, morteros esterilizados.

De los bulbos descascarados se pesó 100g. En una balanza analítica.

Después de ser pesados se procedió a la desinfección para ello se utiliza hipoclorito de sodio al 1% en la cual fueron lavados, luego se procede a la eliminación del exceso de desinfectante, lavando los bulbos con abundante agua destilada estéril, posteriormente fueron escurridos y secados en un recipiente estéril.

Los ajos desinfectados son llevados a un extractor aséptico haciendo uso de guantes estériles durante su manipulación y proporcionando un ambiente adecuado de esterilidad.

El extracto obtenido se coloca en un frasco esterilizado para su uso inmediato.

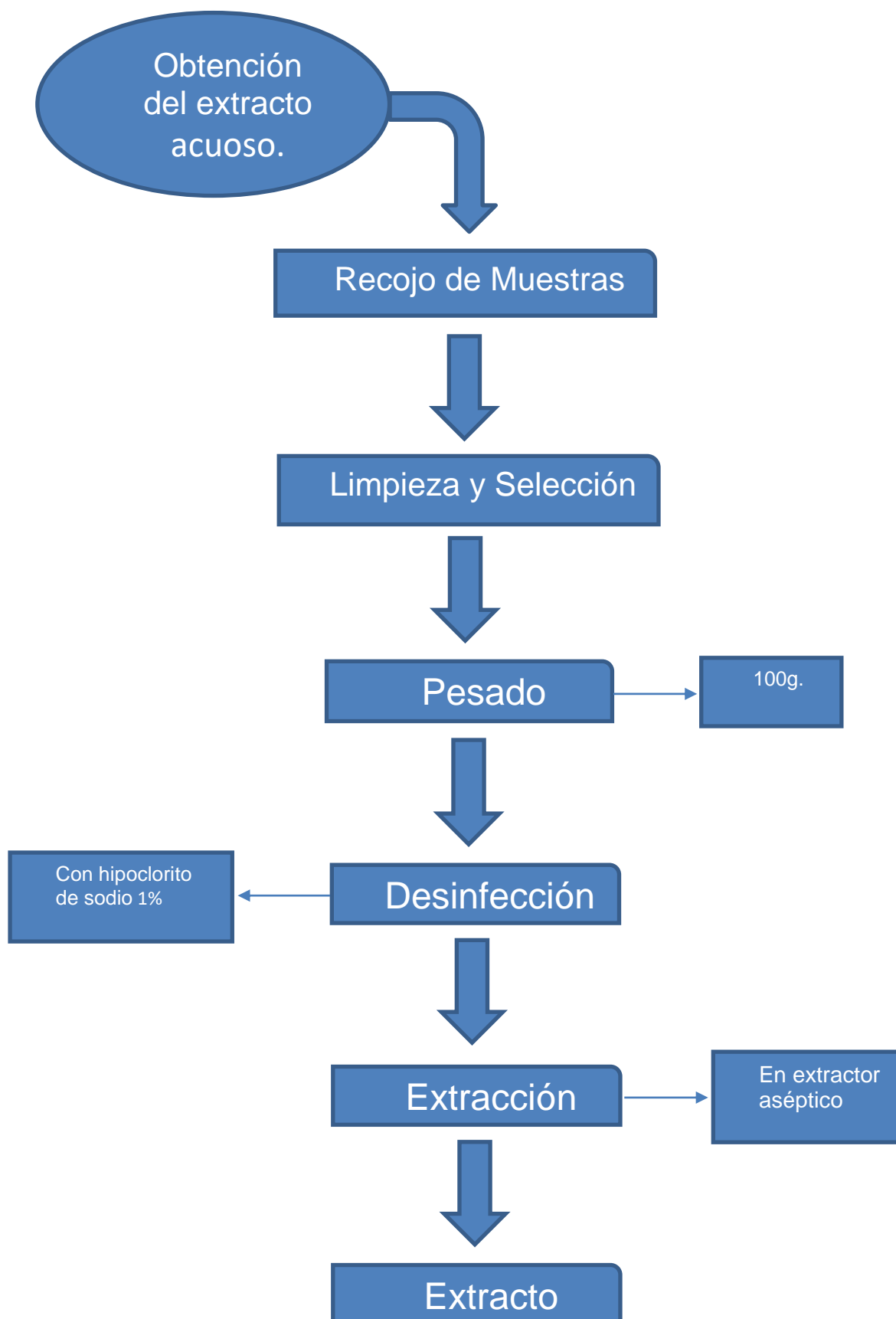


Fig. 1 Diagrama de obtención del extracto acuoso de *Allium sativum* L (Ajo).



A. Fruto de *Allium sativum* L (Ajo). B. Se pelo , peso el bulbo de *Allium sativum* L



C. Desinfección con hipoclorito de sodio al 1% y lavado para la eliminación del exceso del desinfectante del bulbo *Allium sativum* L



D. Extracción en extractor aséptico.



E. Obtención del extracto acuoso.

Figura. 2 Obtención del extracto acuoso de *Allium sativum* L (Ajo).

3.2.3. Concentraciones del extracto acuoso de *Allium sativum* L (Ajo).

La concentración se obtendrá midiendo la densidad del extracto de ajo en uL/mL. A partir de 100 gr de *Allium sativum* L (ajo) se obtendrá 5 ml de concentración. A partir de la solución madre se procederá a realizar diluciones para obtener concentraciones de 25uL/mL, 50uL/mL, 75uL/mL, 100uL/mL, 150uL/mL. Tomando un volumen de solución stock y completando con agua destilada estéril. En relación de 1 en 4.

Tabla 01. Diferentes concentraciones del extracto acuoso de *Allium sativum* L (Ajo).

Extracto acuoso (mg)	Agua (mL)	Concentración (mg/mL)
1 uL	6.7 mL	150 uL/mL
0.5 uL	5 mL	100 uL/mL
0.5 uL	6.7 mL	75 uL/mL
0.5 uL	10 mL	50 uL/mL
0.1 uL	4 mL	25 uL/mL

3.2.4 Efecto inhibitorio del extracto acuoso del bulbo de *Allium sativum* L.

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.
- Otros estudios complementarios fueron, la observación de Clamidosporas, identificación en Chromogenic Candida Agar (CCA) así como también la prueba de Urea de Stuart.

2. Preparación y estandarización del inóculo fúngico

- Las cepas de *Cándida albicans* se sembrarán en 4 tubos con caldo Sabauroud glucosado y se incubaron por 24 horas, se procederá a preparar una suspensión en solución salina.
- La suspensión se ajustará a la escala del nefelómetro de Mc Farland (tubo N° 0,5), cuya densidad poblacional es de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml.

3. Evaluación del efecto inhibitorio de *Candida albicans* resistente a la nistatina frente al extracto acuoso de *Allium sativum* L, según el método de difusión de disco (INS/CNSP, Laboratorio de referencia Nacional de Micología, Tercera edición 2016).

- Se empleó papel filtro Watman N° 01 para obtener los discos de 5 mm de diámetro posteriormente con la ayuda de una pinza esterilizada, los discos se embebieron con de las diferentes concentraciones de extracto acuoso de *Allium sativum* L “Ajo” (25 uL/mL, 50 uL/mL, 75 uL/mL, 100 uL/mL, 150 uL/mL).

Se utilizó como control positivo discos de fluconazol y como control negativo se utilizó discos embebidos en agua destilada estéril.

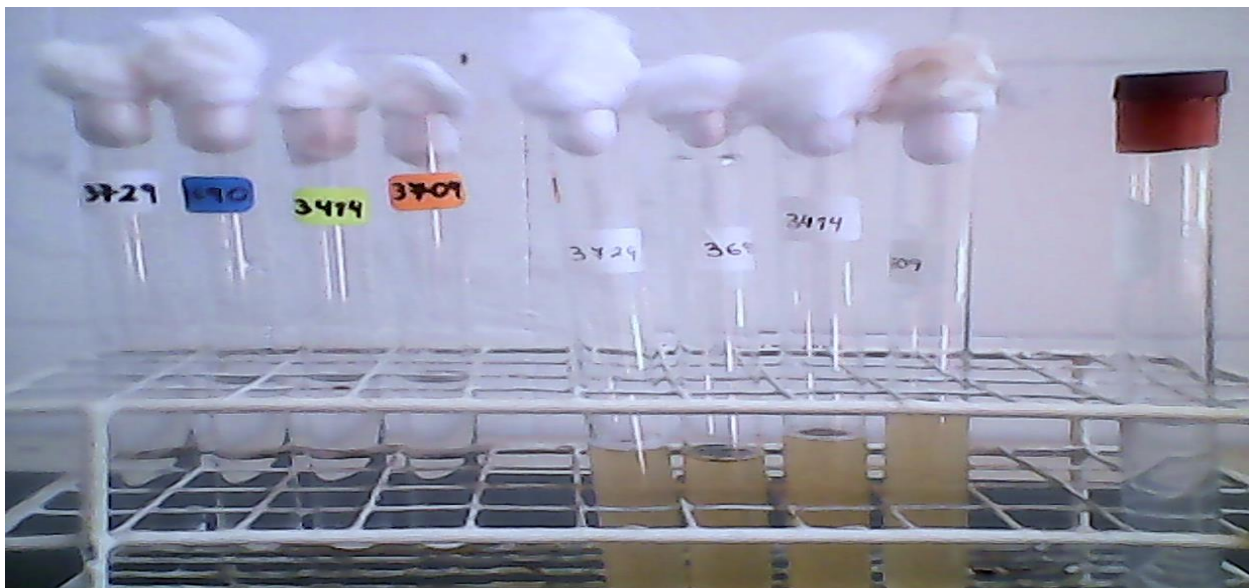
- Del inóculo estandarizado y con ayuda de un hisopo previamente embebido se retiró presionando ligeramente sobre la pared del tubo; luego fue sembrado en agar de Müller Hinton II modificado (MHm) en tres direcciones a fin de asegurar la distribución uniforme del inóculo y se dejó durante 15 minutos 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, en el centro de la placa individual por cada concentración.
- 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.



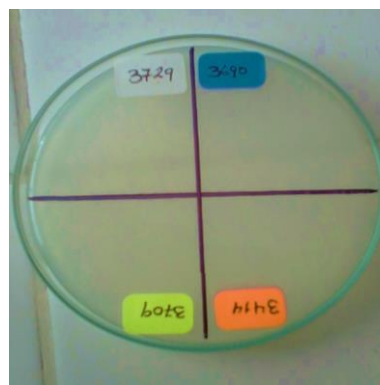
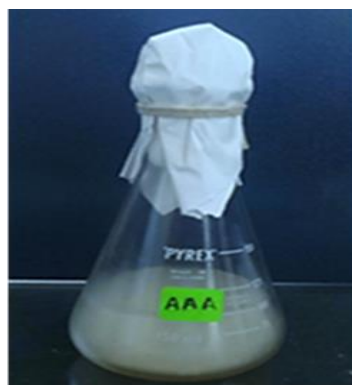
C1: 3729, C2: 3709, C3:3414, C4: 3690 de *Candida albicans* en Agar Sabouraud glucosado.



Cultivo en tubos de *Candida albicans* en Caldo 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.

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

3.2.5 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) del extracto acuoso de *Allium sativum* L sobre *Candida albicans* resistente a la nistatina. Método de macro dilución en tubo según Norma Técnica Peruana N° 30 del INS.

- La Concentración Mínima Inhibitoria para las cepas de *Candida albicans* resistente a la nistatina se realizó siguiendo las recomendaciones del método de macrodilución en tubo según Norma Técnica Peruana N° 30 del INS.
- Las cepas se sembraron en Agar Müller Hinton Modificado y se incubaron a temperatura de 37 °C durante un tiempo de 24 horas, transcurrido ese tiempo se procede a la cosecha, se compara con el tubo número 0.5 del nefelómetro de Mc Farland que indica una densidad poblacional de 1.5×10^8 UFC/ml. Una vez ajustado el inóculo y dentro de los quince minutos de preparada la misma, diluir en caldo para 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 acuoso de *Allium sativum* L 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 – 24 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.

3.2.6 Diseño de Contrastación:

- El Diseño de Investigación utilizado fue el de estímulo creciente, descrito por ALVITRES (1997). Siendo los grupos experimentales las cepas de *Candida albicans* resistente a la nistatina, al cual se le aplicó el estímulo creciente que consistió en las diferentes concentraciones crecientes del extracto acuoso de *Allium sativum* L. (Ajo).
- Según este diseño la variable independiente estuvo constituida por las concentraciones del extracto acuoso (25 uL/mL, 50 uL/mL, 75 uL/mL, 100uL/mL, 150 uL/mL) y la variable dependiente, por el diámetro de los halos de inhibición, en milímetros, de las cepas del microorganismo (*Candida albicans*).

3.2.7 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 acuoso de *Allium sativum* L. (25uL/mL, 50uL/mL, 75uL/mL, 100uL/mL, 150uL/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 acuoso de *Allium sativum* L, este análisis se complementó con la Prueba discriminatoria 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.

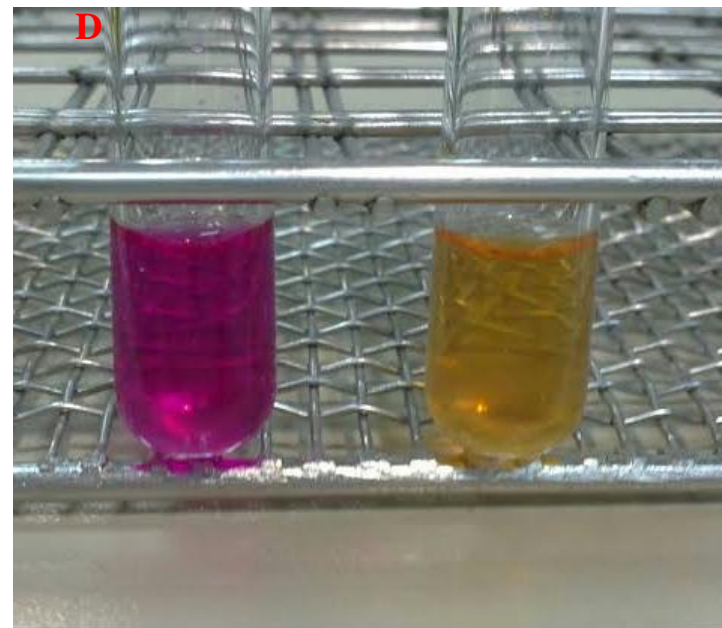
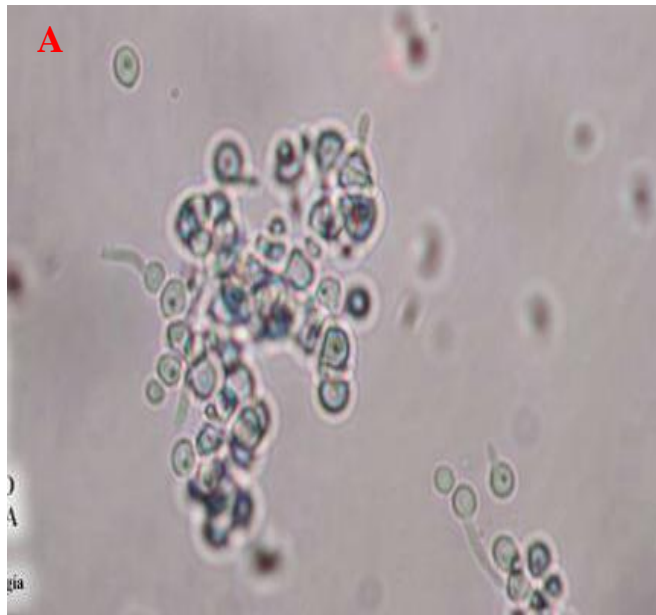


Figura. 4 Identificación de *Candida albicans*. A. Observación microscópica del tubo germinativo de *Candida albicans*; B. Cepas de *Candida albicans* en Chromogenic Candida Agar; C. Cepas de *Candida albicans* en Agar Sabouraud Glucosado; D. Cepas de *Candida albicans* en caldo de Urea de Stuart.

IV. RESULTADOS

El objetivo del presente trabajo de investigación fue determinar el efecto inhibitorio *In Vitro* del extracto acuoso de *Allium sativum* L. (ajo) Frente a cepas de *Candida albicans* resistente a la nistatina, 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 Efecto inhibitorio de cepas de *Candida albicans* resistente a la nistatina a diferentes concentraciones del extracto acuoso del bulbo de *Allium sativum* L.

Los valores obtenidos demostraron que todas cepas de *Candida albicans* resistente a la nistatina en estudio fueron susceptibles al extracto acuoso de *Allium sativum* L., 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 (3729) de *Candida albicans*, se observó que la menor concentración (25uL/mL) alcanzó un promedio de 22 mm de inhibición y la concentración mayor (150uL/mL) alcanzó un promedio de 31,6 mm de inhibición.

La C2 (3709) de *Candida albicans*, la menor concentración (25uL/mL) obtuvo promedio de inhibición de 22,1 mm y la concentración mayor (150uL/mL) obtuvo promedio de inhibición de 37.3 mm.

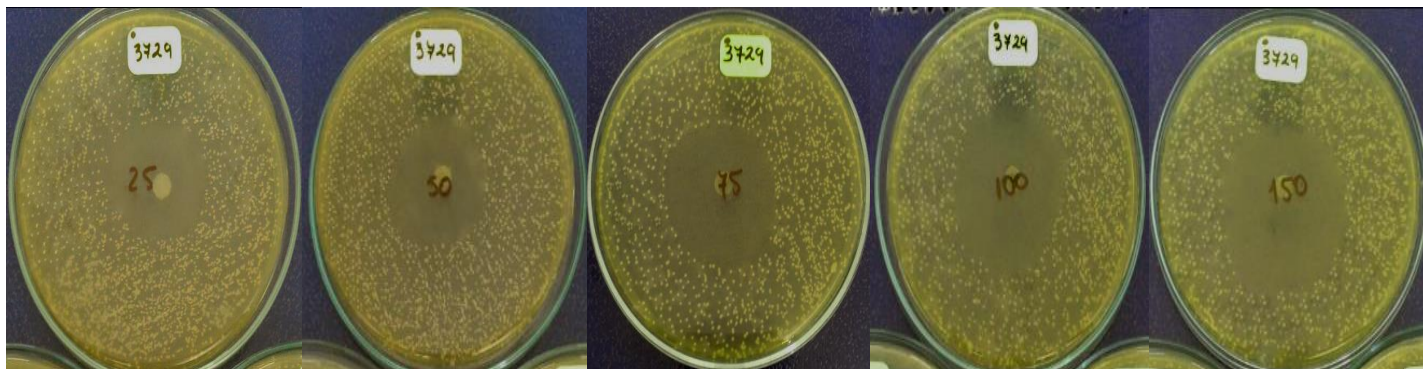
La C3 (3414) de *Candida albicans*, la menor concentración (25uL/mL) obtuvo promedio de inhibición de 24,2 mm., y la concentración mayor (150uL/mL) obtuvo promedio de inhibición de 44,6 mm.

La C4 (3690) de *Candida albicans*, la menor concentración (25uL/mL) obtuvo promedio de inhibición de 23,5 mm., y la concentración mayor (150uL/mL) un promedio de inhibición de 41.6 mm.

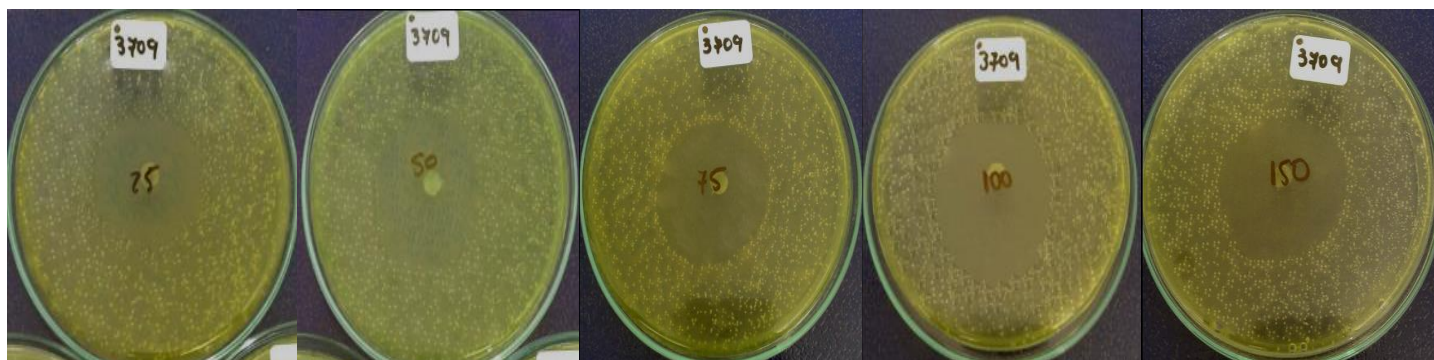
Tabla 02. Promedio de los diámetros de los halos de inhibición de *Candida albicans* resistente a la nistatina a diferentes concentraciones del extracto acuoso de *Allium sativum* L. (Ajo).

Cepas (C)	Concentración (k)	Media	Total
C-1 (3729)	k-25	22,0000	27,6666
	k-50	22,3333	
	k-75	25,0000	
	k-100	32,3333	
	k-150	31,6666	
	f-25	33,3333	
C-2 (3709)	k-25	22,1666	30,6666
	k-50	25,3333	
	k-75	26,3333	
	k-100	35,0000	
	k-150	37,3333	
	f-25	37,8333	
C-3 (3414)	k-25	24,2000	32,4222
	k-50	25,6666	
	k-75	35,0000	
	k-100	31,6666	
	k-150	44,6666	
	f-25	33,3333	
C-4 (3690)	k-25	24,8333	33,1666
	k-50	31,0000	
	k-75	31,0000	
	k-100	35,3333	
	k-150	41,6666	
	f-25	35,1666	

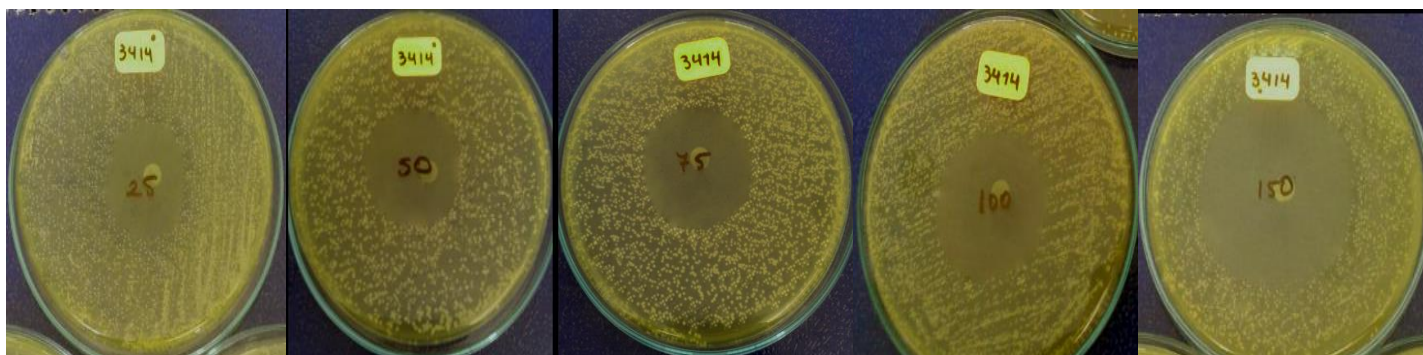
C1: 3729



C2: 3709



C3: 3414



C4: 3690

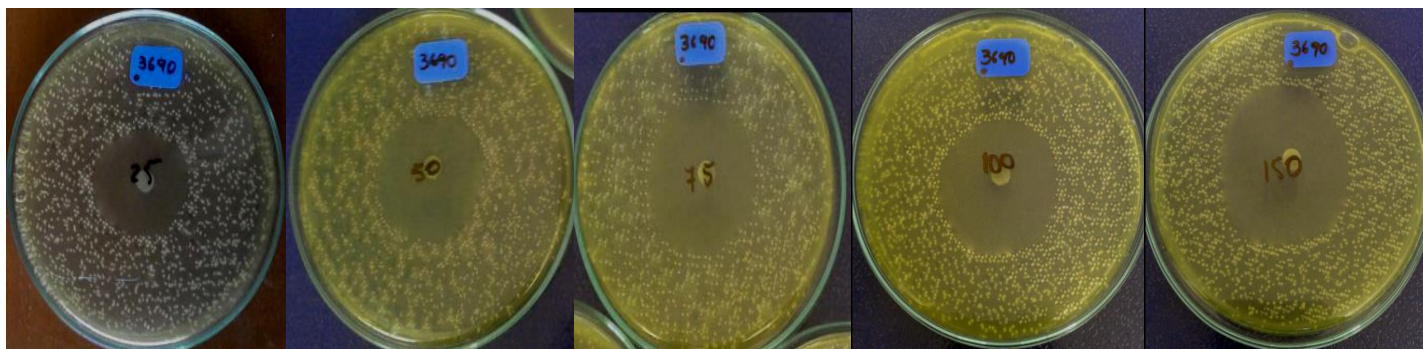
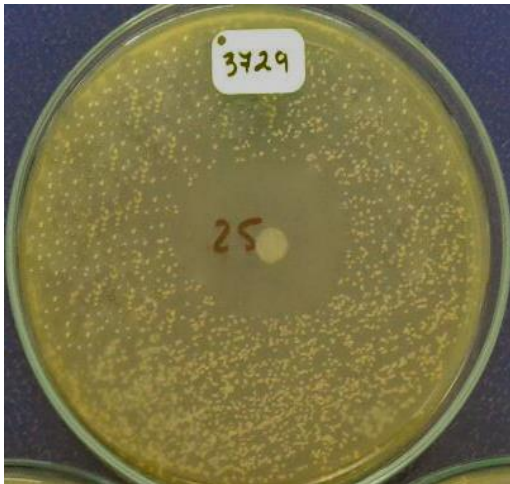
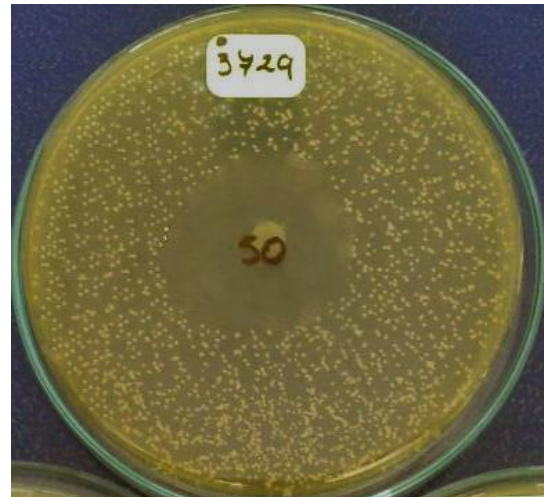


Figura. 5 Cepas de *Candida albicans* resistente a la nistatina (C1:3729 - C2:3709 - C3:3414 - C4:3690) enfrentadas individualmente a las concentraciones Cc. 25ul/mL – Cc. 50ul/MI Cc.75 ul/mL – Cc.100 ul/mL – Cc .150 ul/mL del extracto acuoso de *Allium sativum* L.

C1: 3729



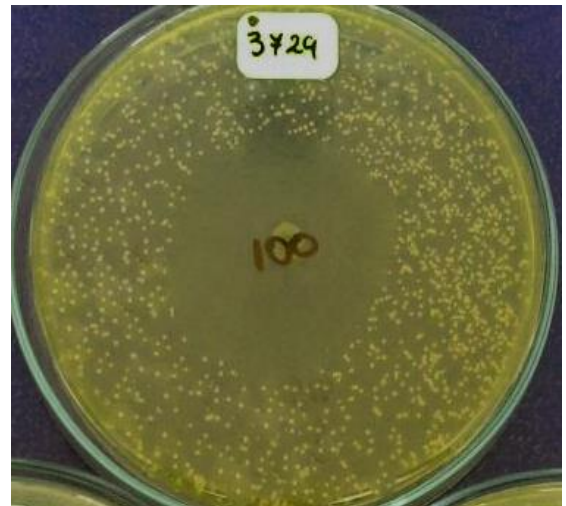
cc 25uL/mL



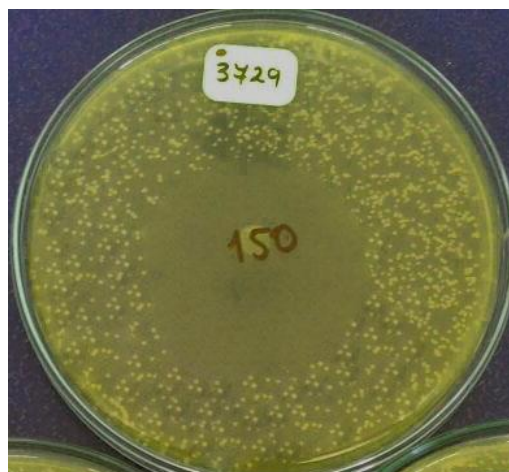
cc 50uL/mL



cc 75uL/mL

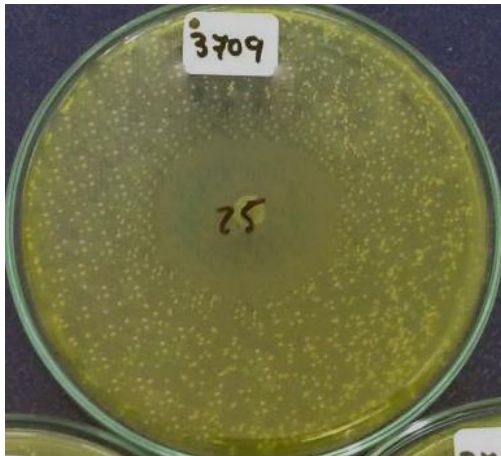


cc 100uL/mL



cc 150uL/mL

C2: 3709



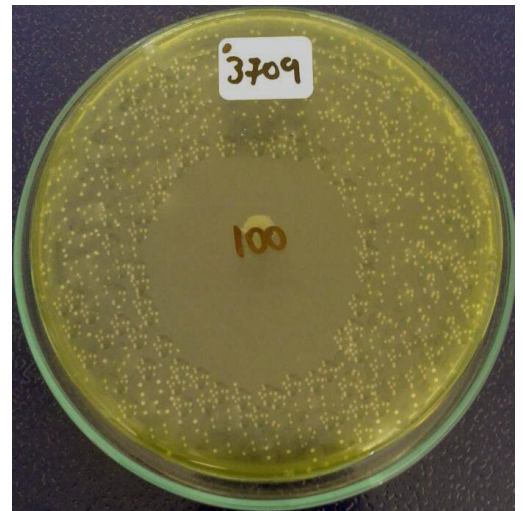
cc 25uL/mL



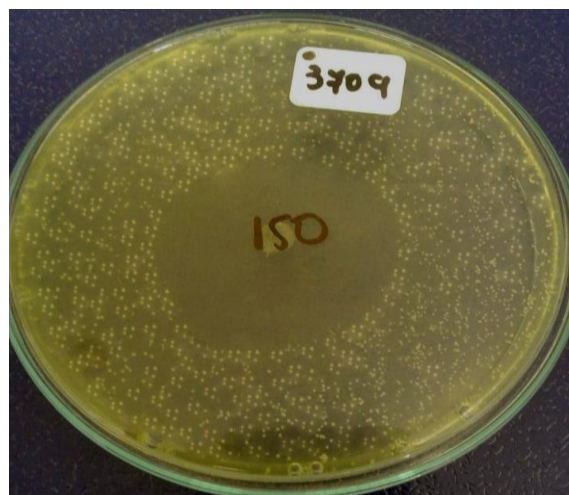
cc 50uL/mL



cc 75uL/mL

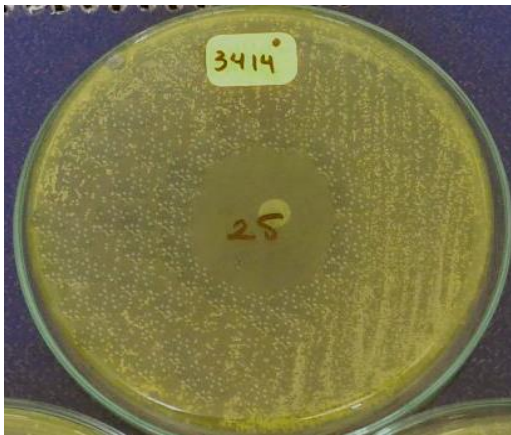


cc 100uL/mL

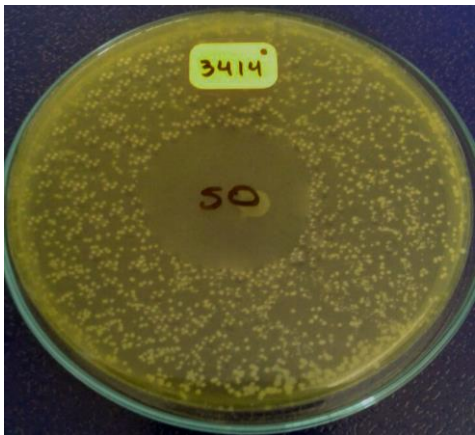


cc 150uL/mL

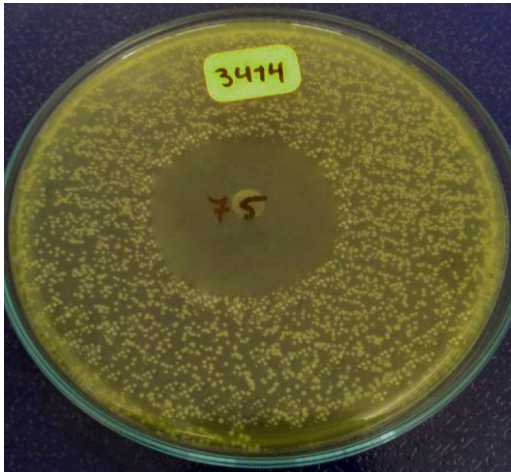
C3: 3414



cc 25uL/mL



cc 50uL/mL



cc 75uL/mL



cc 100uL/mL

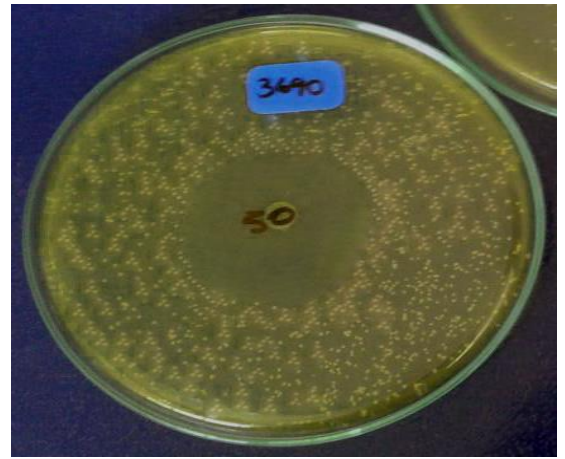


cc 150uL/mL

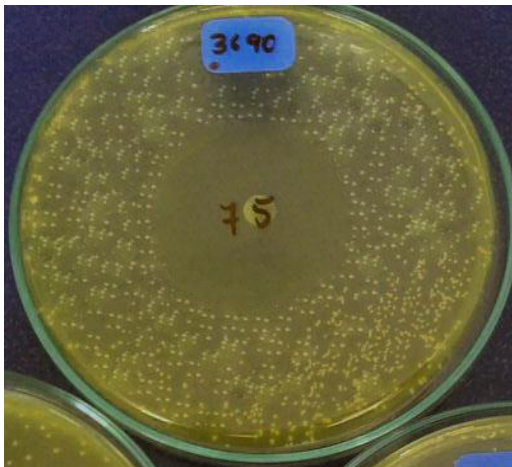
C4: 3690



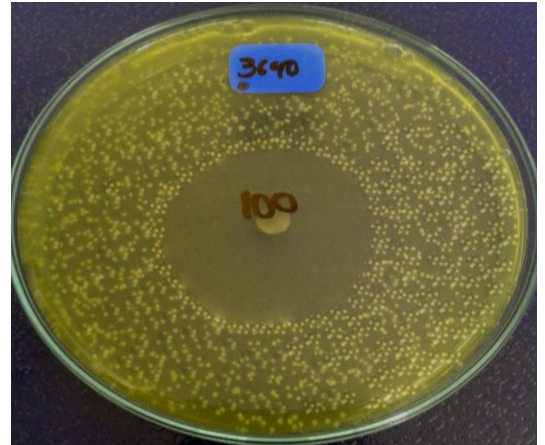
cc 25uL/mL



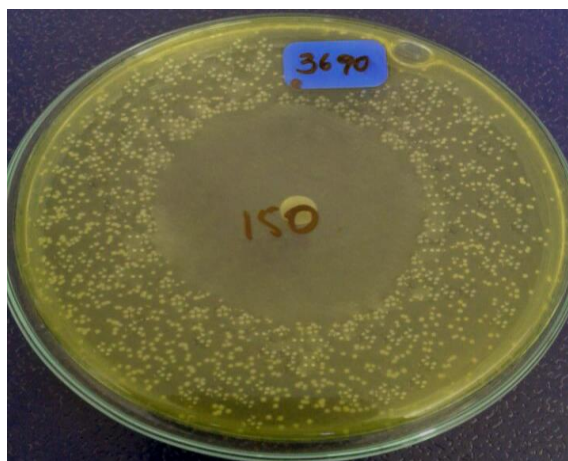
cc 50uL/mL



cc 75uL/mL



cc 100uL/mL



cc 150uL/mL

Figura. 6 Efecto inhibitorio de cepas de *Candida albicans* resistente a la nistatina a diferentes concentraciones del extracto acuoso del bulbo de *Allium sativum* L(Ajo), individual por cada concentración.

Al realizar el Análisis de varianza del efecto inhibitorio de *Candida albicans* resistente a la nistatina a diferentes concentraciones del extracto acuoso de *Allium sativum* L. 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 acuoso de del bulbo de *Allium sativum* L sobre la susceptibilidad *Candida albicans*.

HIPÓTESIS

Cepas:

$H_0 = \text{Cepa1: 3729} = \text{Cepa2: 3709} = \text{Cepa3: 3414} = \text{Cepa4: 3690}$

Concentración:

$H_0 = K\ 25 = K\ 50 = K\ 75 = K\ 100 = K\ 150$

Interacciones:

$H_0 =$ No existen efecto de interacciones entre las cepas de *Candida albicans* y las diferentes concentraciones del extracto acuoso de *Allium sativum* L.

Tabla 03. Análisis de varianza del efecto inhibitorio de *Candida albicans* resistente a la nistatina a las diferentes concentraciones del extracto acuoso de *Allium sativum* L. (Ajo).

Origen	SC	GL	CM	F	Sig.	Decisión
Cepa (C)	321.023	3	107.0078	11.12	0.0000116686485500672	Rechazar H ₀
Concentración (K)	1,996.567	5	399.3133	41.50	0.00000000000000022204	Rechazar H ₀
Interaction	387.550	15	25.8367	2.69	0.00484064446397114	Rechazar H ₀
Error	461.840	48	9.6217			
Total	3,166.980	71				

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

S.C = Suma de Cuadrados

G.L = Grados de libertad

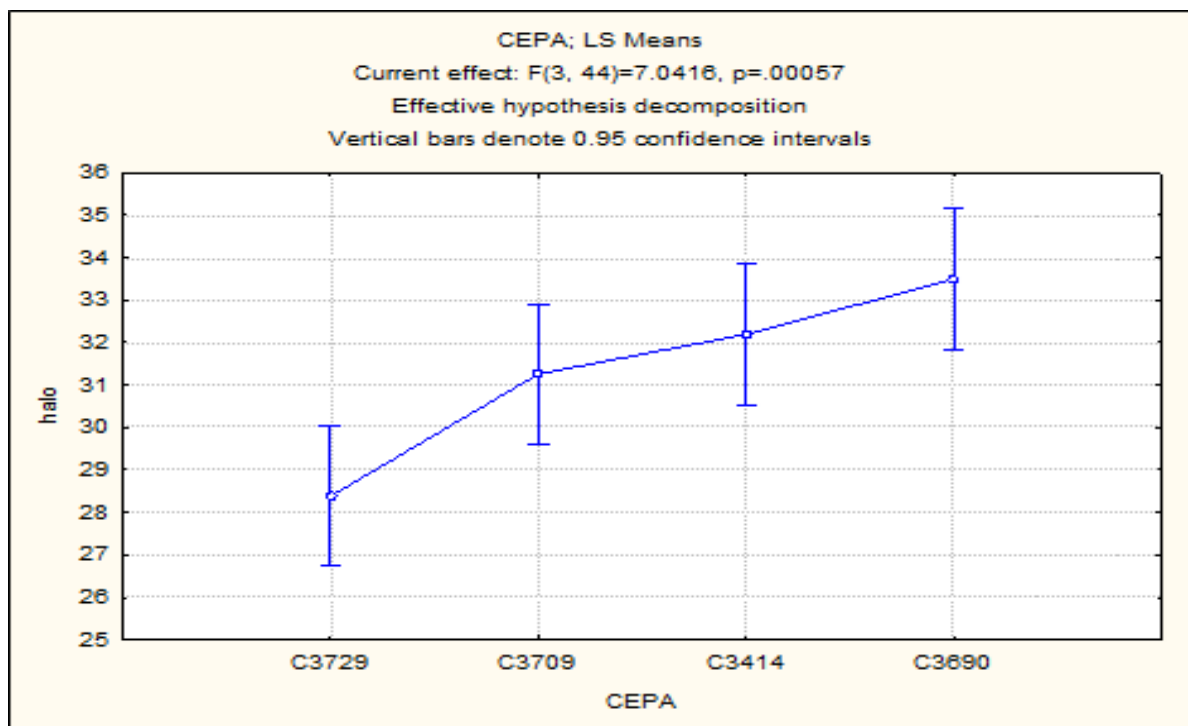
C.M = Cuadrado Medio

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 acuoso de *Allium sativum* L., para el factor cepas (C1:3729, C2:3709, C3:3414, C4:3690) se demostró estadísticamente que la cepa C1:3729, la cepa C2:3709 y la cepa C3:3414 presentaron comportamiento similar; sin embargo se evidenció que existe diferencia de la cepa C4:3690 ante las ya mencionadas.

Se determinó el grado de susceptibilidad de cada cepa de *Candida albicans*, frente al extracto acuoso de *Allium sativum* L.

Tabla 04. Prueba de significancia de Tukey (0,05) de los promedios de los diámetros de los halos de inhibición de *Candida albicans* resistente a la nistatina frente a las diferentes concentraciones del extracto acuoso de *Allium sativum* L (Ajo).

Cepa	Promedio	Significancia
C1:3729	27.66667	a
C2:3709	30.66667	b
C3:3414	32.42222	b
C4:3690	33.16667	b



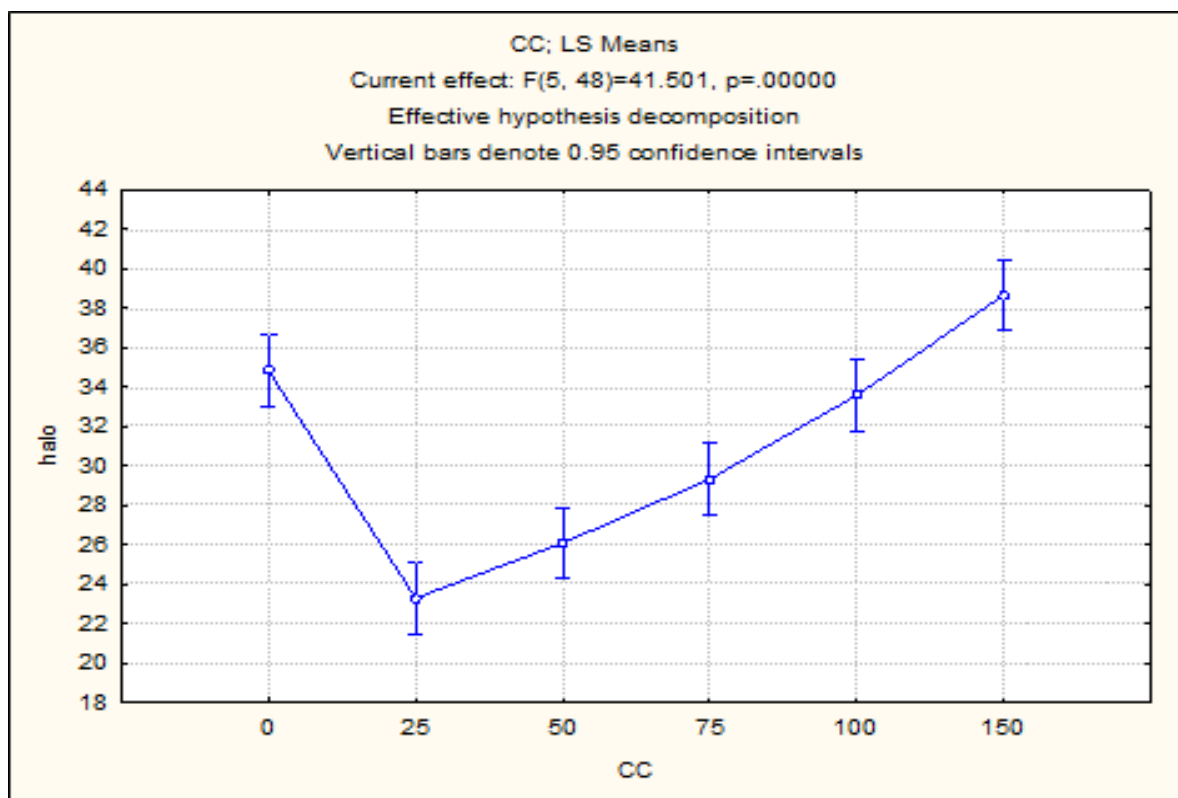
- **Letras diferentes** = Diferencia significativa
- **Letras iguales** = No existe diferencia significativa

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. 25 uL/mL, Cc. 50 uL/mL, Cc. 75 uL/mL, Cc. 100 uL/mL, Cc. 150 uL/mL) del extracto acuoso de *Allium sativum* L. 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 acuoso, 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* resistente a la nistatina en función a las diferentes concentraciones del extracto acuoso del bulbo de *Allium sativum* L.

Cc	Promedio	Significancia
25	23.30000	a
50	26.08333	a b
75	29.33333	b
100	33.58333	c
fluconazol	34.83333	c
150	38.66667	d

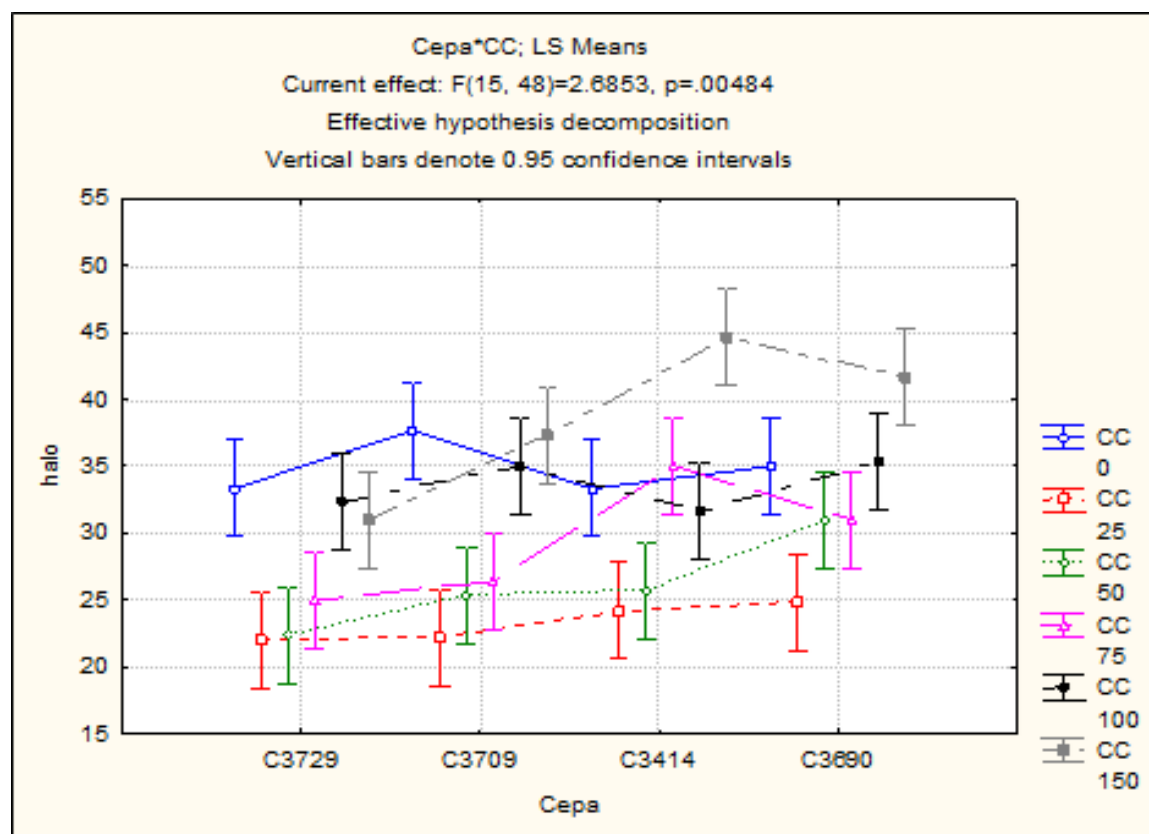


- **Letras diferentes** = Diferencia significativa
- **Letras iguales** = No existe diferencia significativa

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 acuoso de *Alluim sativum* L. 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 acuoso de *Alluim sativum* L., se va a ver influenciada tanto por las concentraciones del extracto (Cc 25 uL/mL, Cc 50 uL/mL, Cc 75 uL/mL, Cc 100 uL/mL, Cc 150 uL/mL), como por diferencias existentes entre las cepas de *Candida albicans* (C1:3729, C2:3709, C3:3414, C4:3690), notándose mayor diferencia a partir de la K25, 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 acuoso del bulbo de *Allium sativum* L y cepas de *Candida albicans* resistente a la nistatina.

Cepa	Cc	Promedio	Significancia					
C1:3729	25	22.00000	a					
C2:3709	25	22.16667	a					
C1:3729	50	22.33333	a					
C3:3414	25	24.20000	a	b				
C4:3690	25	24.83333	a	b				
C1:3729	75	25.00000	a	b				
C2:3709	50	25.33333	a	b	c			
C3:3414	50	25.66667	a	b	c	d		
C2:3709	75	26.33333	a	b	c	d		
C1:3729	150	31.00000	a	b	c	d	e	
C4:3690	75	31.00000	a	b	c	d	e	
C4:3690	50	31.00000	a	b	c	d	e	
C3:3414	100	31.66667	a	b	c	d	e	
C1:3729	100	32.33333		b	c	d	e	f
C1:3729	fluconazol	33.33333		b	c	d	e	f
C3:3414	fluconazol	33.33333		b	c	d	e	f
C3:3414	75	35.00000			c	d	e	f g
C2:3709	100	35.00000			c	d	e	f g
C4:3690	fluconazol	35.16667			c	d	e	f g
C4:3690	100	35.33333				d	e	f g
C2:3709	150	37.33333					e	f g
C2:3709	fluconazol	37.83333					e	f g
C4:3690	150	41.66667						f g
C3:3414	150	44.66667						g



4.2 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del extracto acuoso del bulbo de *Allium sativum* L (Ajo) sobre cepas de *Candida albicans* resistente a la nistatina.

Para determinar la Concentración mínima inhibitoria del extracto acuoso del bulbo de *Allium sativum* L (Ajo) sobre cepas de *Candida albicans*, se trabajó el método de macrodilución en tubo, aplicado según Norma Técnica Peruana N° 30 del INS.

Para la realización del experimento, se utilizaron las cuatro cepas de *Candida albicans* (C1:3729, C2:3709, C3:3414, C4:3690) y la concentración de 25uL/mL del extracto acuoso del bulbo de *Allium sativum* L, se trabajó con dicha concentración debido a que fue la menor concentración que ejerció susceptibilidad sobre todas las cepas de *Candida albicans* resistente 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 acuoso de *Allium sativum* L (Cc 25 mg/mL).

Se pudo observar la susceptibilidad de cada una de la cepas, y se obtuvo como resultado que para la C3:3414 y C4:3690de *Candida albicans* la concentración mínima que no permite su desarrollo visible es 3,125 uL/mL, sin embargo para la C2:3709 de *Candida albicans* la concentración mínima que impide su desarrollo es 6,25 uL/mL, a diferencia de la C1:3729 cuya concentración mínima Inhibitoria es 12,5 uL/mL, lo cual se observa en la Tabla N° 07.

Tabla 07. Concentración Mínima Inhibitoria del extracto acuoso del bulbo de *Allium sativum* L sobre cepas de *Candida albicans* resistente a la nistatina.

Cepas de *Candida albicans* - Concentración 25 uL/mL

Tubo		C1: 3729	C2: 3709	C3: 3414	C4: 3690
1	Control positivo (*)	-	-	-	-
2	25 uL/mL	-	-	-	-
3	12,5 uL/mL	-	-	-	-
4	6,25 uL/mL	+	-	-	-
5	3,125 uL/mL	+	+	-	-
6	1,56 uL/mL	+	+	+	+
7	0,78 uL/mL	+	+	+	+
8	0,39 uL/mL	+	+	+	+
9	0,19 uL/mL	+	+	+	+
10	Control negativo (**)	+	+	+	+
Control	Control del Extracto (***)	-	-	-	-
Flu.	Testigo (****)	-	-	-	-

(*) Extracto + inóculo

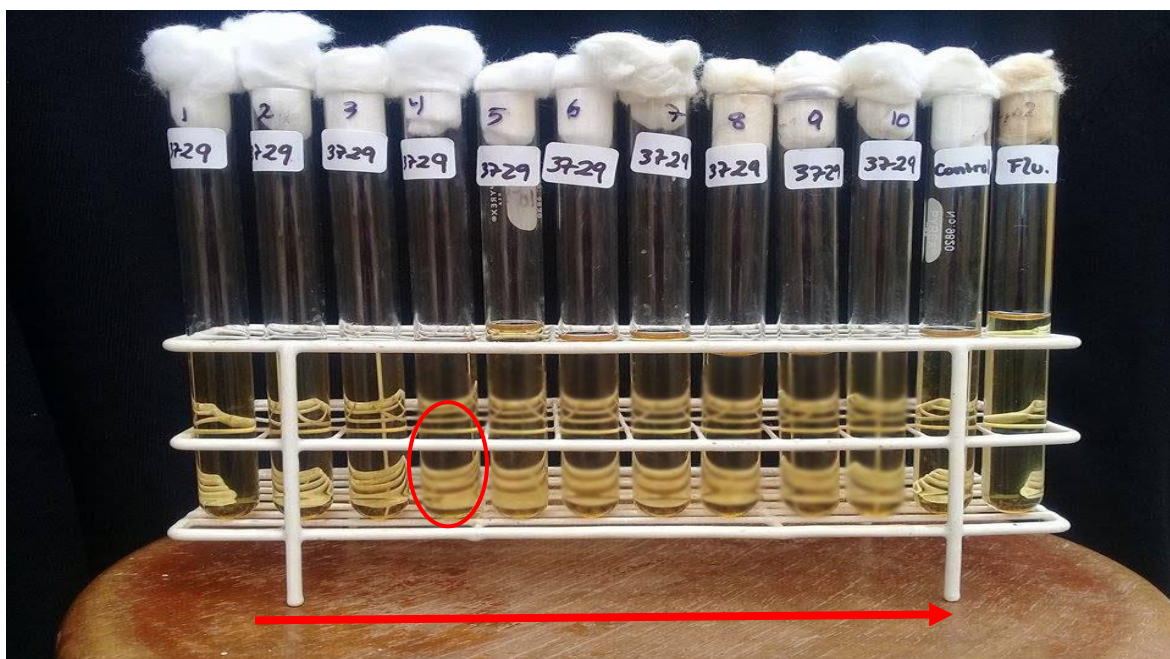
(**) Caldo sabouraud + inóculo + agua

(***) Caldo sabouraud + extracto acuoso

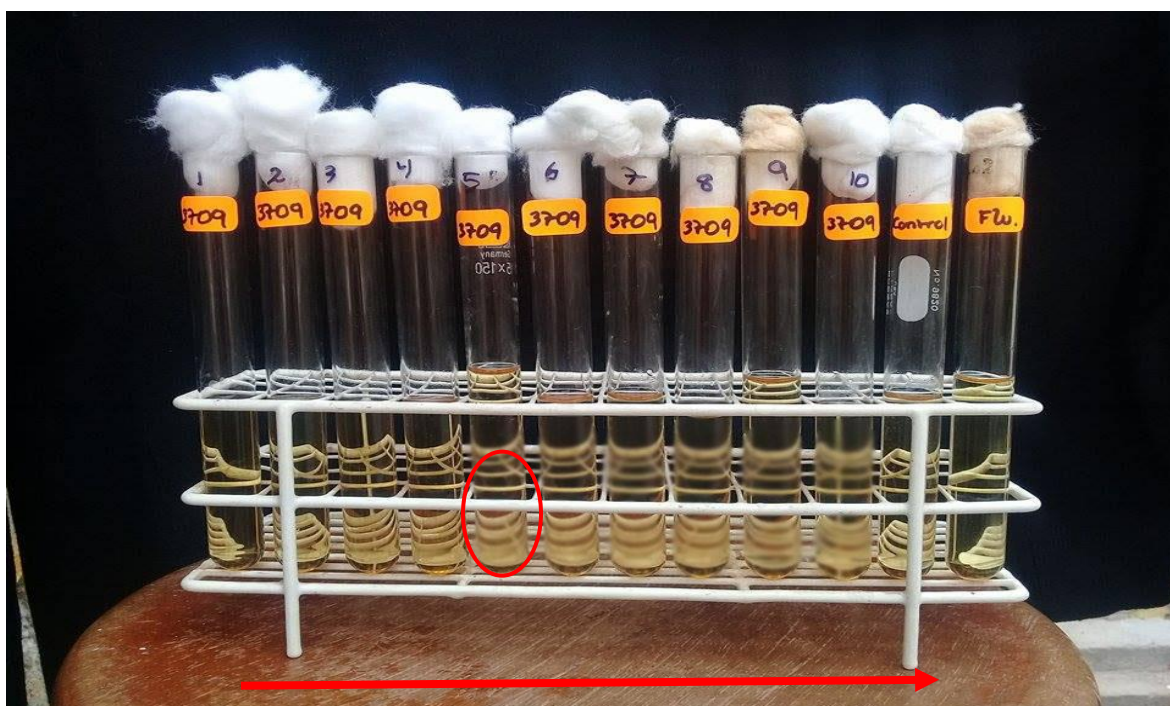
(****) Caldo sabouraud + inóculo + fluconazol

(+) Crecimiento

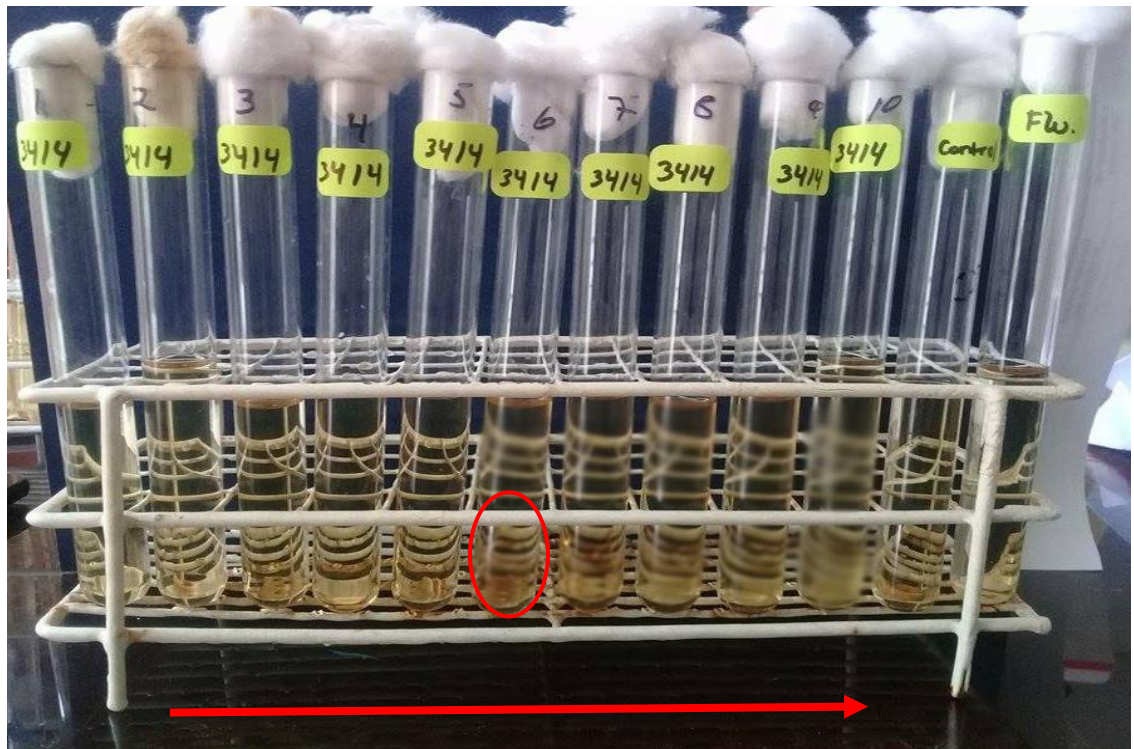
(-) No hay crecimiento



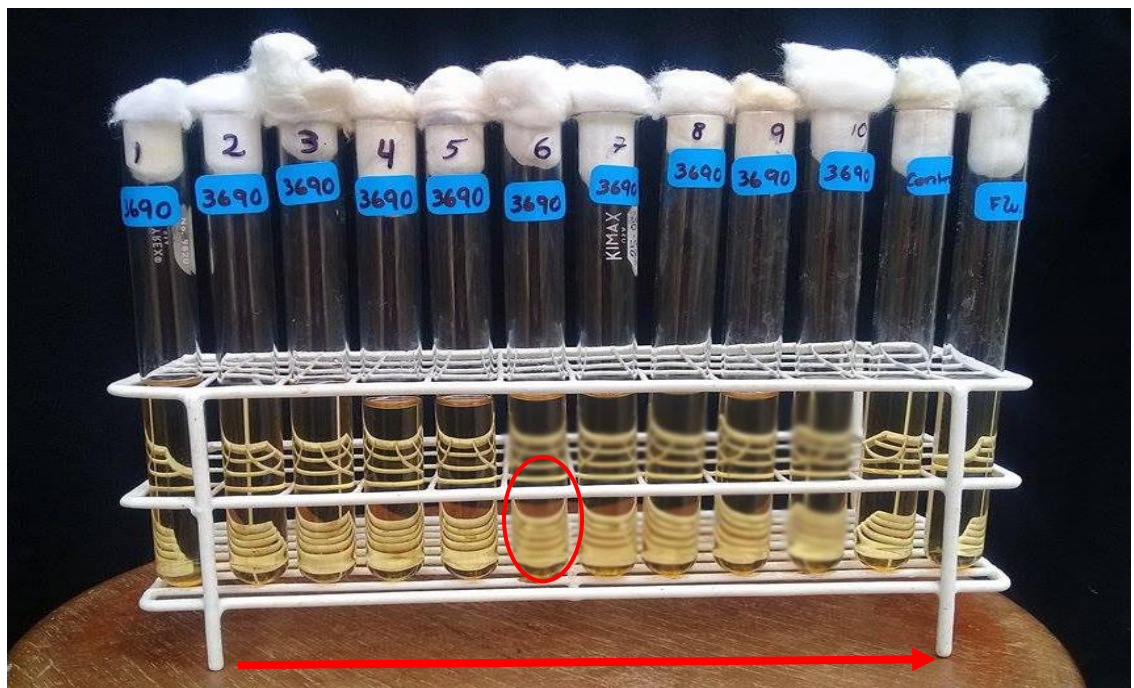
C1:3729 Cc. 25 uL/mL. CMI 12,5 uL/mL. Evidencia de crecimiento del tubo 4 – 9



C2:3709 Cc. 25 uL/mL. CMI 6,25 uL/mL. Evidencia de crecimiento del tubo 5 – 9



C3:3414 Cc. 25 μ L/mL. CMI 3,125 μ L/mL. Evidencia de crecimiento del tubo 6 – 9



C4:3690 Cc. 25 μ L/mL. CMI 3,125 μ L/mL. Evidencia de crecimiento del tubo 6 – 9

Figura. 7 Concentración Mínima Inhibitoria del extracto acuoso del bulbo de *Allium sativum* L. sobre cepas de *Candida albicans* (C1:3729 - C2:3709 - C3:3414 - C4:3690).

V. DISCUSIÓN

En el presente trabajo de investigación se determina la susceptibilidad de cepas de *Candida albicans* resistentes a la nistatina a diferentes concentraciones del extracto acuoso del bulbo de *Allium sativum* L., el cual busca contribuir con el desarrollo de nuevas alternativas en la terapia antimicótica.

Los resultados obtenidos nos indican que el extracto acuoso del bulbo de *Allium sativum* L. ejerce mecanismos de acción de actividad antifúngica sobre *Candida albicans* resistente a la nistatina.

Los estudios revelan que esto puede ser debido a la acción de los compuestos activos del bulbo, ya que esta contiene Alicina, Dialil y Vinilodetiinas; donde aproximadamente 20% es de Dialil y Vinilodetiinas totales altamente concentrados incluyendo un alto porcentaje 80% de Alicina.

Un análisis realizado del bulbo de Ajo muestra compuestos detectados, los cuales incluyen: glucosa, ácido glutamínico, arginina, ácido aspártico, leucina, lisina, valina, aliina, aminoácidos azufrados como la S-alilcisteina o sulfóxido de alicisteina que se transforma en alicina, disulfuro de dialilo y también contiene compuestos como: fructosanos (inulina), quercetina, flavonoides, vitamina B6, vitamina C y minerales (potasio, manganeso, calcio, selenio y fosforo). El mismo estudio reveló el efecto de los extractos del bulbo de Ajo 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 *Allium sativum* L. el presente estudio fue realizado a partir del extracto acuoso del bulbo de Ajo, a concentraciones de 25 uL/mL - 150 uL/mL sobre cepas de *Candida albicans*, obteniendo resultados de 23,30000 mm hasta 38,66667 mm de halos de inhibición; con una CMI de 12,5 uL/mL, 3,125 uL/mL. Según LORA et al., (2010). encontró que *Allium sativum* liofilizado sobre *Candida albicans* en su CMI produjo un halo de inhibición promedio de 7.3 mm siendo la concentración del ajo 25mg/ml; cabe señalar que el tipo de extracto y la

concentración de metabolitos responsables de la inhibición, que se encuentran en el bulbo de Ajo puedan marcar las diferencias entre las experimentaciones.

Para HUAMANI Y RUIZ (2005) la actividad antifúngica *In Vitro* de diez extractos etanolicos correspondientes a diez plantas medicinales peruanas; *Annona cherimolia* mill. (hojas) , *Annona muricata* L. (corteza y hojas) , *Bidens pilosa* L. (partes aéreas) , *Hypericum laricifolium* L. (partes aéreas), *Juglans neotropica* Diels (corteza) , *Piper spp.*(hojas) , *Plantago major* L.(hojas) , *Psidium guajava* L.(hojas) , *Schinus molle* L.(corteza y hojas) y *Spartium junceum* L. (planta entera). Recolectaron a las especies en el departamento de Amazonas, excepto *Schinus molle* L. (Apurimac) y *Annona muricata* L. (Lima). 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* ATCC1 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 mostro 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 ug/ml para *Hypericum laricifolium* L, *Juglans neotropica* Diels, *Psidium guajava* L. y *Schinus molle* L. (un exracto de corteza y una de hojas) y de 500 ug/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), los antifungicos Nistatina y Fluconazol fueron incluidos en el estudio como controles positivos.

Dependiendo del tipo de extracto y la parte de la planta utilizada, se deduce que los extractos de *Allium sativum* L. son eficaces contra *Candida albicans* resistente a la nistatina, y que la susceptibilidad de la levadura es directamente proporcional a la concentración del extracto; notándose mayor efectividad con el extractos acuoso del bulbo del Ajo, 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 *Allium sativum* L. posee efectos antifúngicos similares al fluconazol, importante en el tratamiento antifúngico; un estudio comparativo de extracto hidroalcohólico demostró que *A. sativum* L. en concentraciones de 30 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.

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

La CMI obtenida en este estudio fue de 3,125 uL/mL, coincidiendo con los reportes de otras investigaciones que obtuvieron CMI de 0.125 ug / mL, 0.128 mg/ mL - 1.024 mg / mL, 0.5 – 1 mg/mL; estos experimentos fueron realizados con extracto etanólico de *Allium sativum*. Los resultados sugieren al extracto de ajo como agente antimicótico prometedor.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, demuestran la susceptibilidad de *Candida albicans* resistente a la nistatina procedente de infecciones vaginales, frente al extracto acuoso del bulbo de *Allium sativum* L. contribuyendo en la investigación de nuevas alternativas para la terapia antimicótica.

VI. CONCLUSIONES

Al realizar el estudio sobre el efecto inhibitorio del extracto acuoso de *Allium sativum* L. frente a cepas de *Candida albicans* resistentes a la nistatina obtenidas del Hospital Regional Docente Las Mercedes se concluye que:

- Las cepas en estudio (C1:3729 - C2:3709 - C3:3414 - C4:3690) de *Candida albicans* resistente a la nistatina son susceptibles al extracto acuoso del bulbo de *Allium sativum* L. a concentraciones de 25 uL/mL; 50 uL/mL; 75 uL/mL; 100 uL/mL y 150 uL/mL, lo cual fue evidenciado por la presencia de halos de inhibición, notándose que la cepa más resistente fue la C1:3729 con un halo de inhibición de 27,66 mm y la cepa más susceptible es la C4:3690 con un halo de inhibición de 33,16 mm.
- Con respecto a la CMI del extracto acuoso del bulbo de *Allium sativum* L. sobre cepas de *Candida albicans* resistente a la nistatina, se concluyó que la cepa más resistente C1:3729 es inhibida a una concentración mínima de 12,5 uL/mL; mientras que la cepa más sensible C4:3690 se inhibió a una concentración mínima de 3,125 uL/mL.

VII. RECOMENDACIONES

- Continuar con el trabajo de investigación ya realizado, enfatizando en el estudio de los beneficios que posee *Allium sativum* L, evaluar la variedad de propiedades que ofrece dicha planta y enfrentarla a otros microorganismos.
- Realizar otros tipos de extracciones con la finalidad de optimizar la obtención de los 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 el efecto inhibitorio *In Vitro* de las cepas de *Candida albicans* resistente a la nistatina frente al extracto acuoso del bulbo de *Allium sativum* L.

Se trabajó con 4 cepas de *Candida albicans* (C1:3729 - C2:3709 - C3:3414 - C4:3690) y 5 concentraciones diferentes del extracto acuoso del bulbo de *Allium sativum* L. (25 uL/mL, 50 uL/mL, 75 uL/mL, 100 uL/mL, 150 uL/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/CNSP, formación de clamidosporas, crecimiento en caldo de Urea Stuart y aislamiento e identificación en Chromogenic Candida Agar (CCA). Además de la obtención del extracto acuoso del bulbo de *Allium sativum* L.

La prueba de susceptibilidad de las cepas de *Candida albicans* resistente a la nistatina frente al extracto acuoso de *Allium sativum* L. se realizó mediante el método de Disco de difusión (INS/CNSP), y para la evaluación de la CMI se trabajó con el método de macrodilución en tubo según Norma Técnica Peruana N° 30 del INS.

El Diseño de Investigación utilizado fue el de estímulo creciente, descrito por (Alvitres, 1997) 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 acuoso del bulbo de *Allium sativum* L. (25 uL/mL, 50 uL/mL, 75 uL/mL, 100 uL/mL, 150 uL/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 discriminadora de Tukey a 0,05 nivel de significación (STELL y TORRIE, 1983).

Como resultado se obtuvo que todas cepas de *Candida albicans* resistente a la nistatina en estudio fueron susceptibles al extracto acuoso del bulbo de *Allium sativum* L. 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 *Allium sativum* L.

La Concentración Mínima Inhibitoria del extracto del bulbo de *Allium sativum* L. sobre cepas de *Candida albicans* resistente a la nistatina se determinó utilizando la concentración más baja (25 uL/mL) que causó susceptibilidad de todas las cepas en estudio (C1:3729 - C2:3709 - C3:3414 - C4:3690), los valores obtenidos fueron para la C1:3729 de *Candida albicans* CMI 12,5 uL/mL.; para la C2:3709 *Candida albicans* CMI 6,25 uL/ mL; para la C3:3414 y C4:3690 de *Candida albicans* CMI 3,125 uL/ mL.

IX. ANEXOS

Anexo 1. Clasificación Taxonómica de *Allium sativum* L.

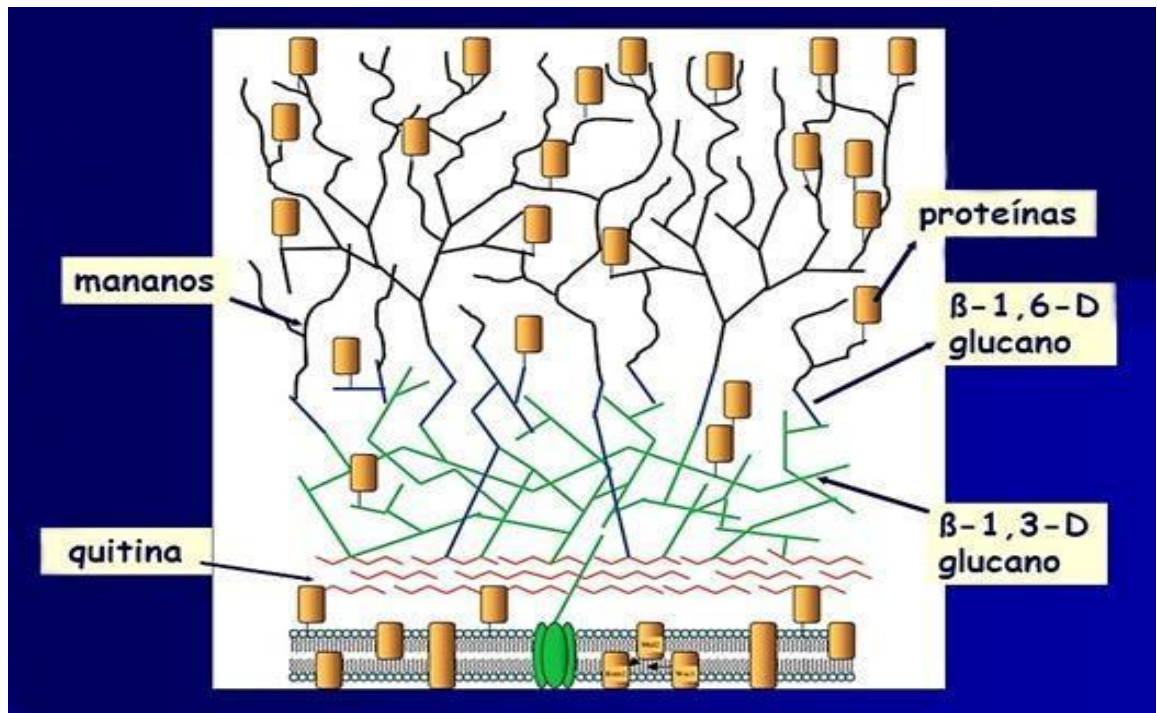


CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

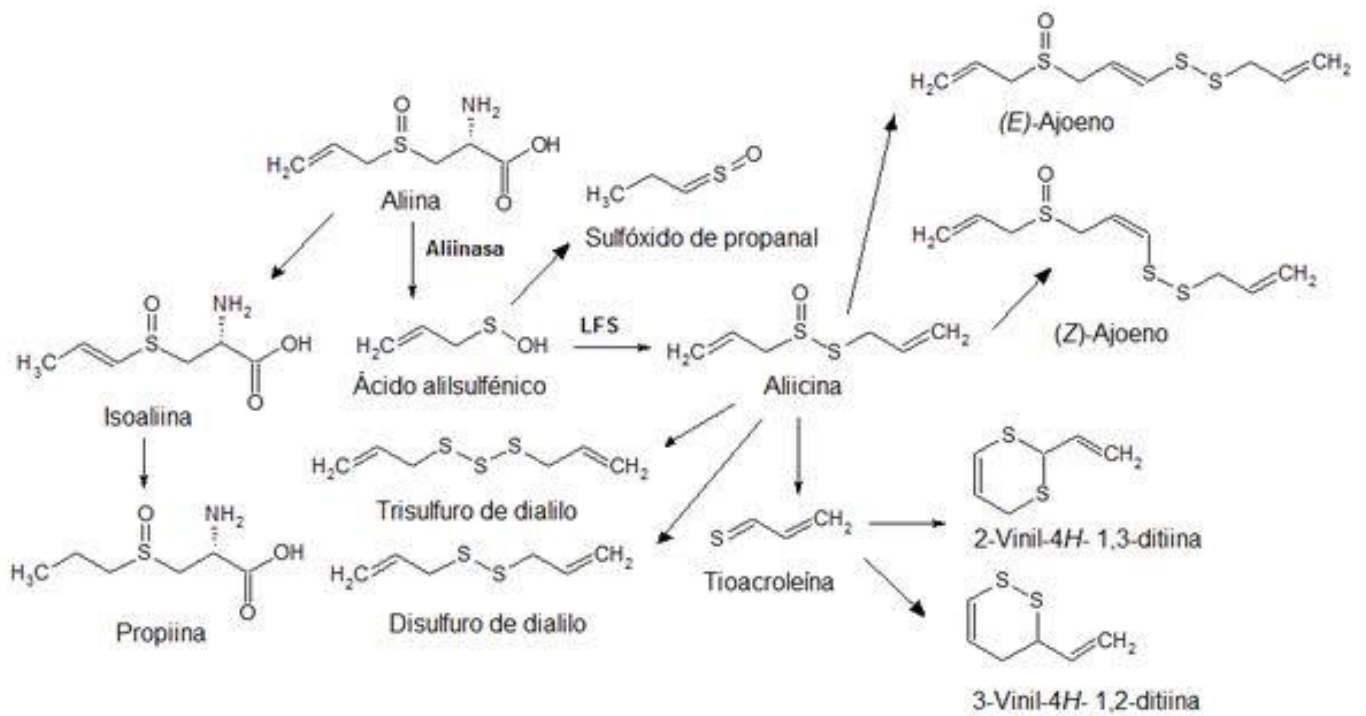
Reino	:	Plantae
División	:	Magnoliophyta
Clase	:	Liliopsida
Orden	:	Asparagales
Familia	:	Amaryllidaceae
Subfamilia	:	Allioideae
Género	:	<i>Allium</i>
Especie	:	<i>Allium sativum</i>

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

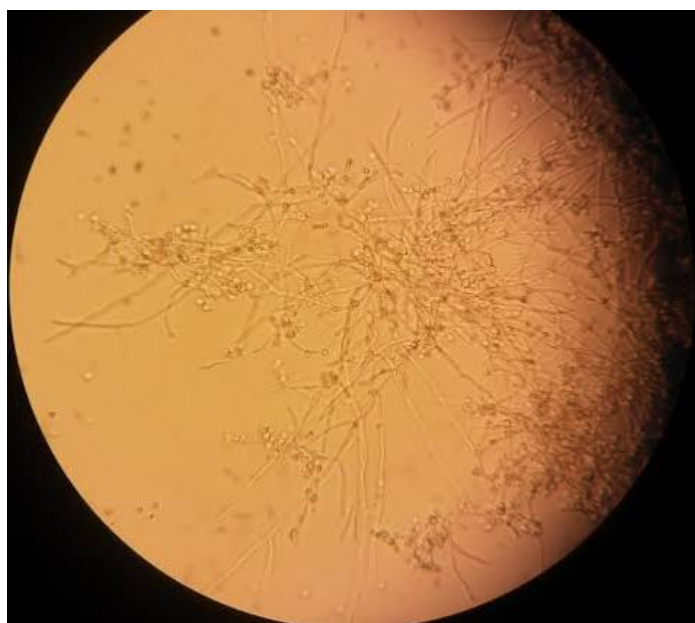
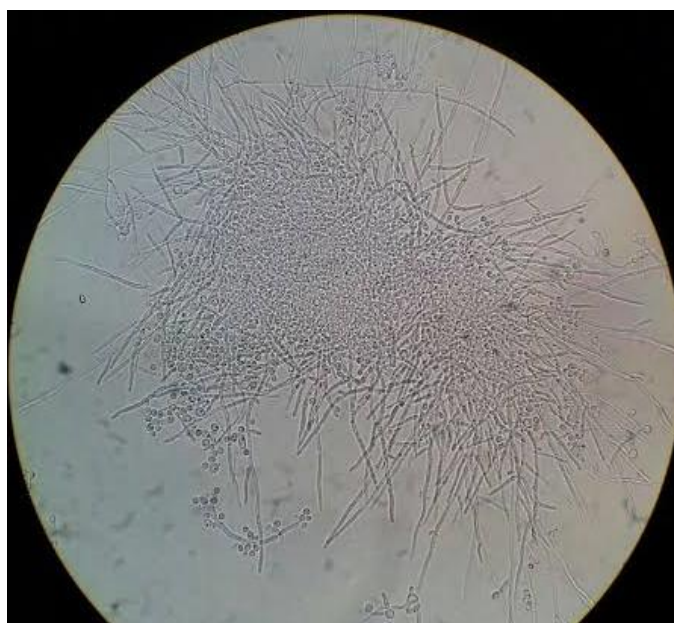
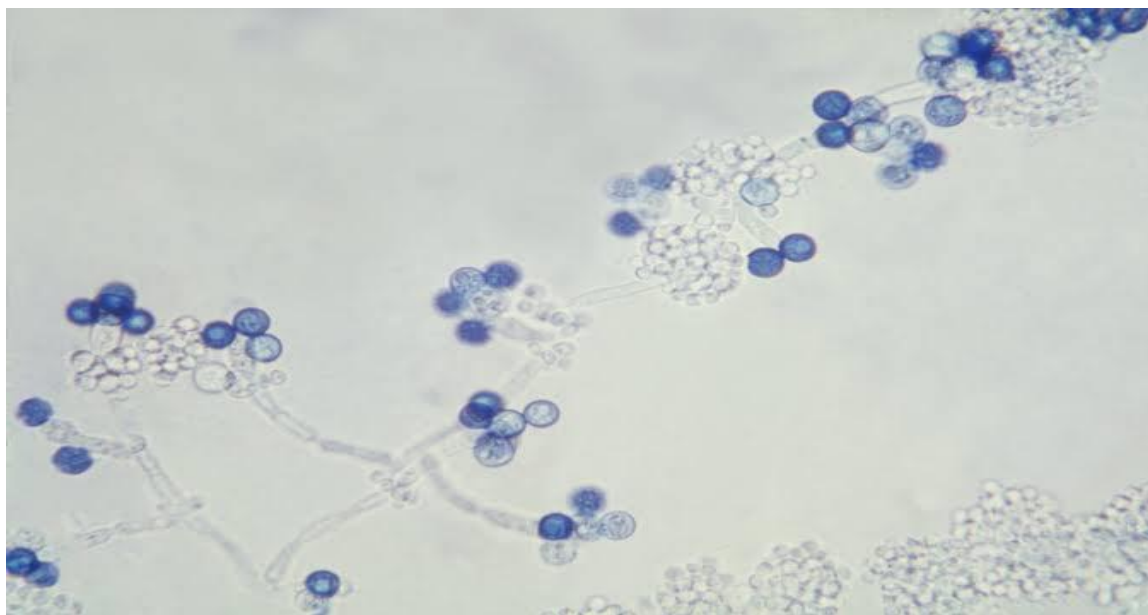
Anexo 2. Pared celular de *Candida albicans*.



Anexo 3. Clasificación de la Aliina



Anexo 4. Formación de clamidosporas de las cepas de *Candida albicans*.



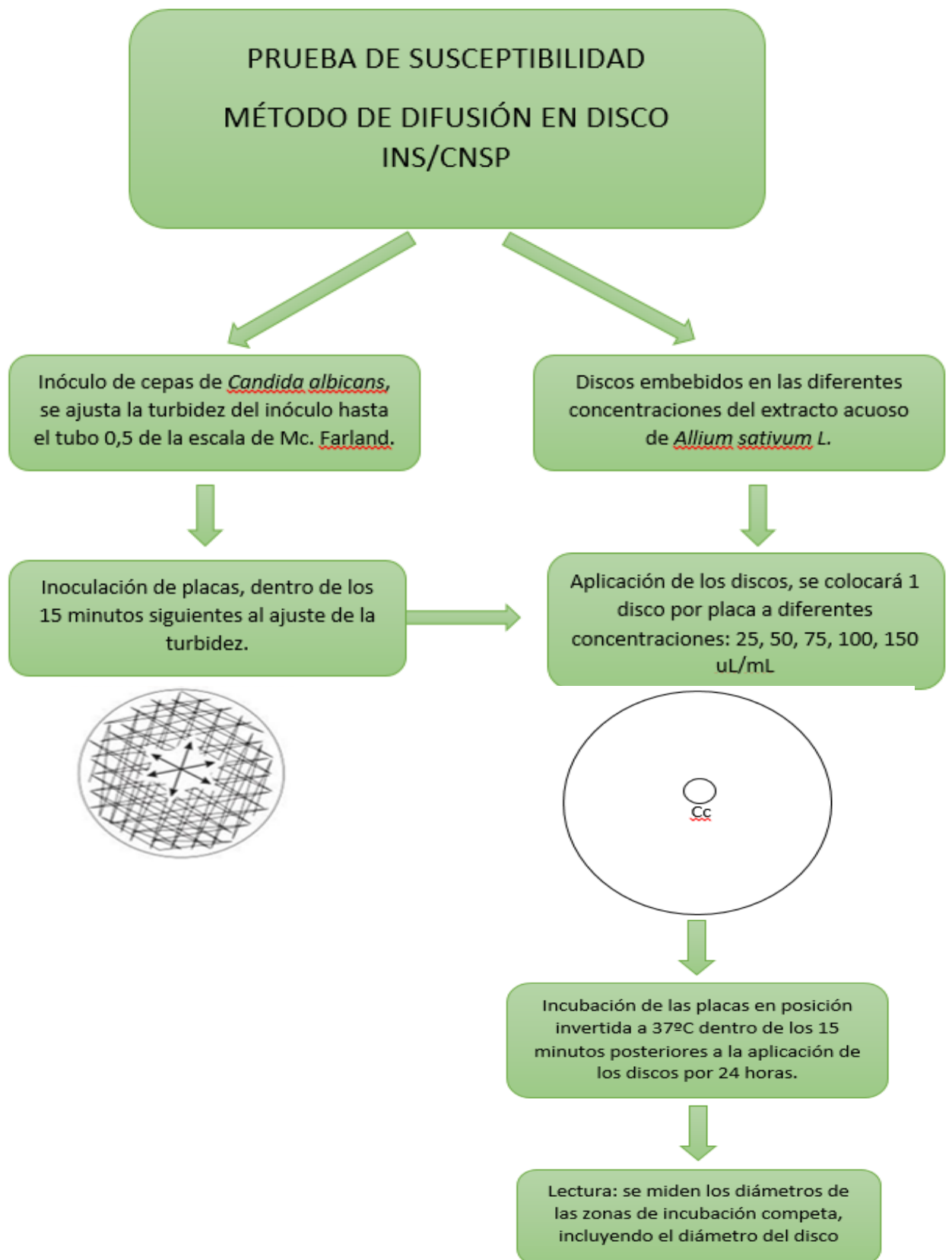
Anexo 5. Tabla referencial del procedimiento para realizar la macrodilución en Caldo

	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 acuoso de <i>Allium sativum L.</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

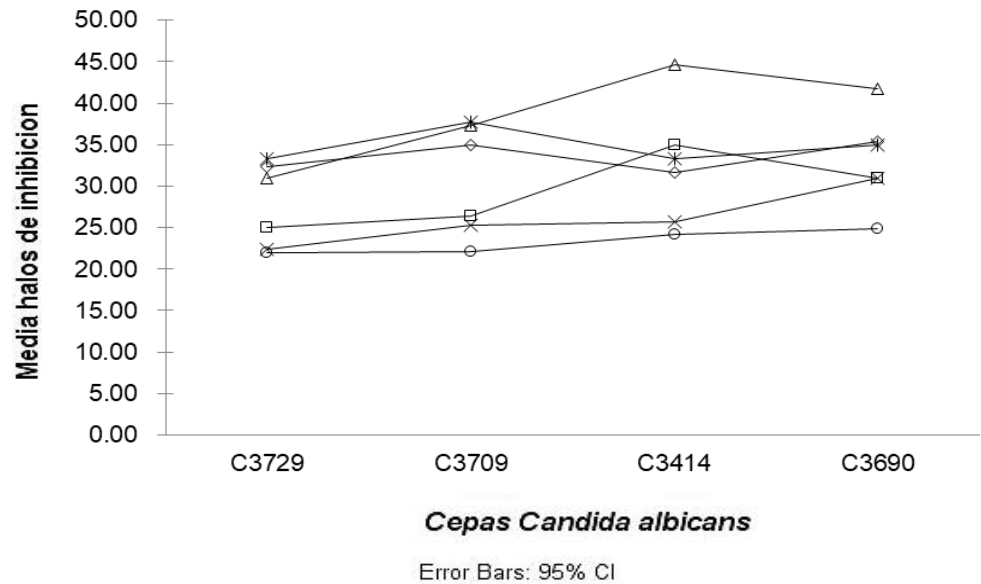
C.I = Control de inóculo

C.E = Control de esterilidad

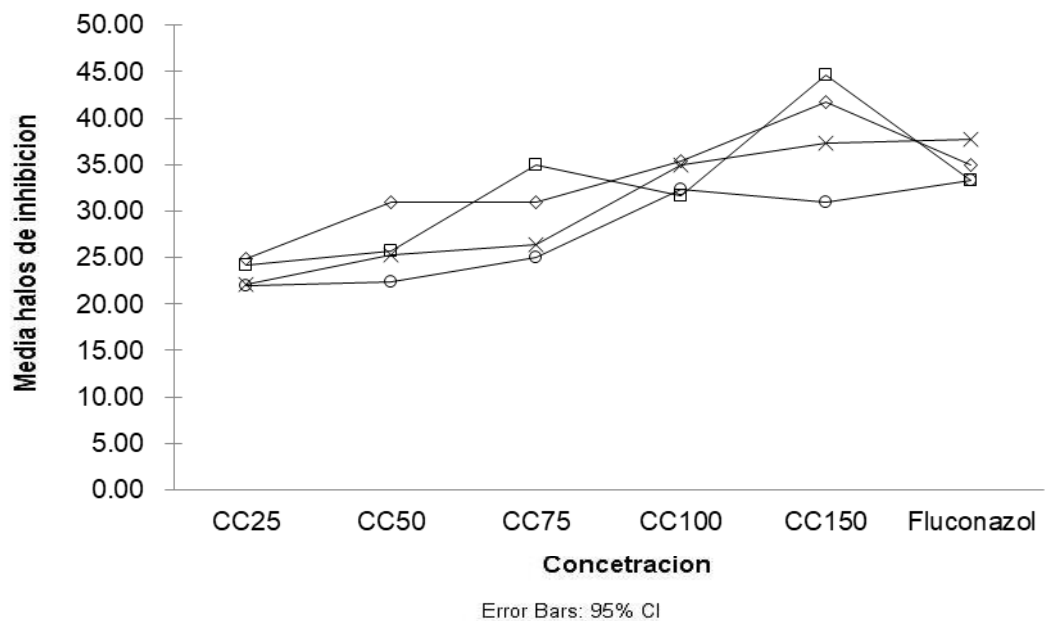
Anexo 6. Prueba de susceptibilidad método de difusión en disco INS/CNSP



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 *Candida albicans* frente al extracto acuoso de *Allium sativum* L.



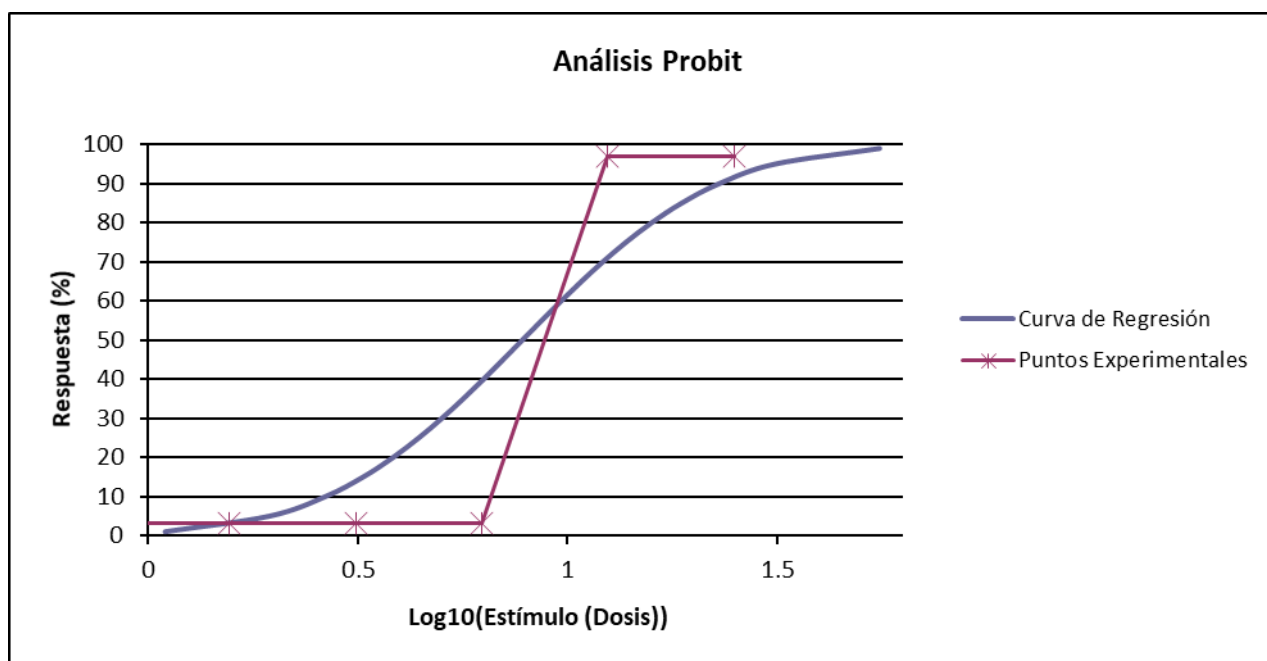
Anexo 8. Gráfico de la prueba de significancia de Tukey (0,05) de los promedios de los diámetros de los halos de inhibición de *Candida albicans* en función a las diferentes concentraciones del extracto acuoso de *Allium sativum* L.



Anexo 9. Comparaciones múltiples en Percentil de Dosis.

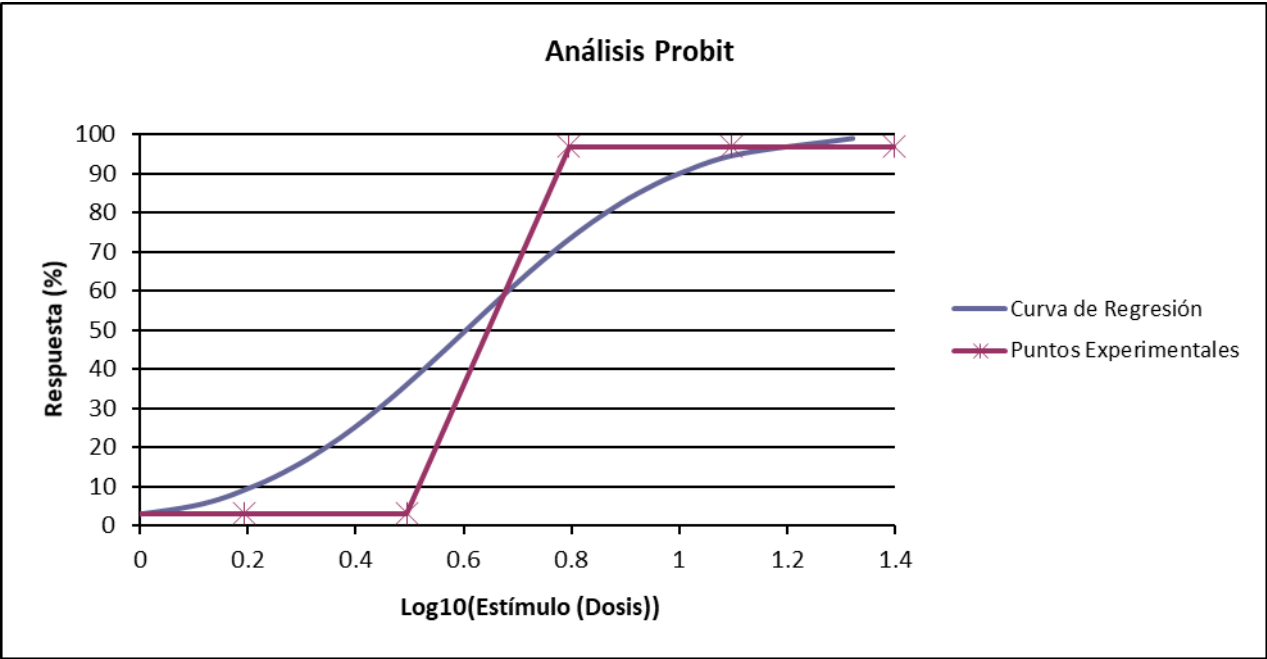
C1:3729

LD50	7.8079	LD50 Error Estándar	1.5361
<i>LD50 LCL</i>	5.5426	<i>LD50 UCL</i>	11.9266
<i>Log10[LD50]</i>	0.8925	<i>Error Estándar</i>	0.0849
<i>Beta</i>	2.7311	<i>Intercepto</i>	2.5624
<i>Beta Error Estándar</i>	0.4148		



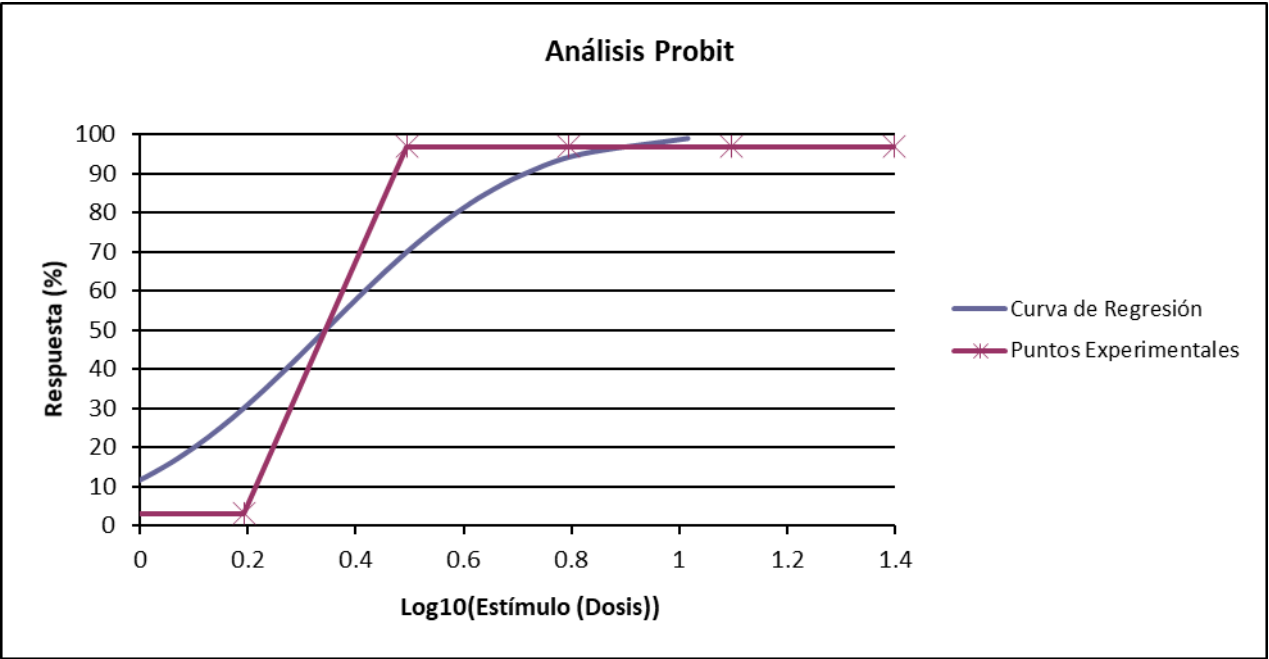
C1:3709

LD50	4.0237	LD50 Error Estándar	0.6553
<i>LD50 LCL</i>	2.9698	<i>LD50 UCL</i>	5.6077
<i>Log10[LD50]</i>	0.6046	<i>Error Estándar</i>	0.0704
<i>Beta</i>	3.2444	<i>Intercepto</i>	3.0383
<i>Beta Error Estándar</i>	0.4603		



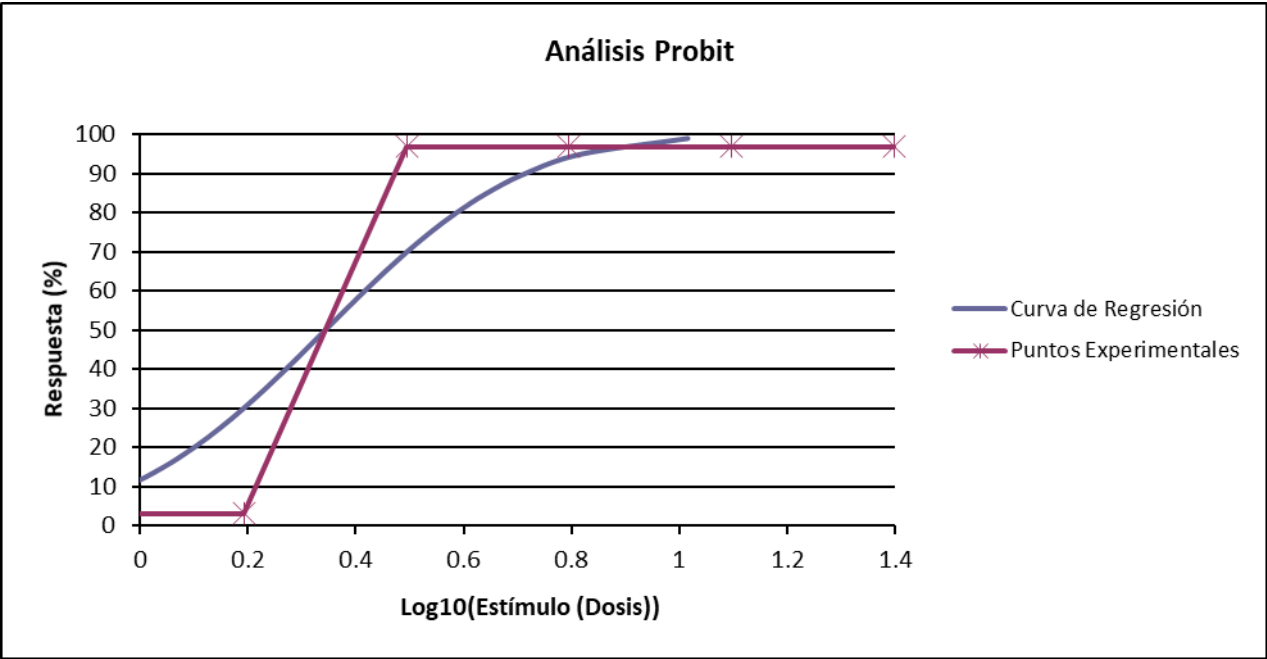
C1:3414

LD50	2.2061	LD50 Error Estándar	0.3406
<i>LD50 LCL</i>	1.6320	<i>LD50 UCL</i>	2.9823
<i>Log10[LD50]</i>	0.3436	<i>Error Estándar</i>	0.0668
<i>Beta</i>	3.4607	<i>Intercepto</i>	3.8108
<i>Beta Error Estándar</i>	0.4870		



C1:3690

LD50	2.2061	LD50 Error Estándar	0.3406
<i>LD50 LCL</i>	1.6320	<i>LD50 UCL</i>	2.9823
<i>Log10[LD50]</i>	0.3436	<i>Error Estándar</i>	0.0668
<i>Beta</i>	3.4607	<i>Intercepto</i>	3.8108
<i>Beta Error Estándar</i>	0.4870		



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

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvitres, L (1997).** “Diseño clásico y de estímulo creciente”. Diseño de Contrastación.
- Bajo, J; Lailla, M; Vins, J (2009).** “Infecciones Micóticas” .Fundamentos Micología (pag 129-133).Madrid. Panamericana Editorial Médica.
- Burnett, Ch (1982).** Enfermedades infecciosas. Principios y práctica. 2 Edición.
- Bustamante, O (2006).** “Efecto inhibitorio In-Vitro de los extractos etanolicos de (matico) *Piper aduncum* y (cedron) *Alloysia triphylla* sobre *Candida albicans*”. Tesis para optar el título de Licenciado en Biología, Microbiología – Parasitología. UNIVERSIDAD NACIONAL “PEDRO RUIZ GALLO”, LAMBAYQUE – PERU.
- Chim, J (2001).** Decimoseptima edición. “Control de las enfermedades Transmisibles”. (pag38-40).California.
- Cobeñas & Ramos (1998).** “Técnicas para la obtención del extracto acuoso y preparación de las concentraciones de *Allium sativum* L. “ajo”.
- Cordova, V y Garcia, 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.
- Cordova, M (2010)** “Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L): Implicaciones analíticas”. Tesis MSc. En ciencias en conservación y aprovechamiento de recursos naturales. Instituto Politécnico Nacional.
- Cubas, J y Mejia, E (2004).** “Efecto inhibitorio In- Vitro del extracto etanolic de propoleo sobre *Candida albicans*. Tesis para optar el título de Licenciado en Biología, Microbiología – Parasitología. UNIVERSIDAD NACIONAL “PEDRO RUIZ GALLO”, LAMBAYEQUE- PERU.

Dias, S; Carvalho, M; Szeszs, F & Hahn, T (2011) “Realizaron que el tratamiento sindrómico de la candidosis vulvovaginal aumenta la posibilidad de crear resistencia en las agentes causales *Candida albicans* y *Candida krusei*”. Cuadros clínicos de *Candidosis* en Mujeres.

<https://www.google.com.pe/search?tbm=bks&hl=es&q=cuadros+clinicos+de+candida+albicans+en+mujeres#hl=es&tbm=bks&q=fallas+terapeuticas+de+antimicoticos>.

Espinoza y Vidaurre (2004). “Prevalencia de *Trichomonas vaginalis*, *Candida albicans*, *Gardenella vaginalis* en gestantes de los Centros de Salud Paul Harris, Atusparias, Tupac Amaru y Cerropon Chiclayo”. Tesis para optar el título de Licenciado en Biología, Microbiología – Parasitología. UNIVERSIDAD NACIONAL “PEDRO RUIZ GALLO”, LAMBAYEQUE – PERU.

Fernandez, C y Echemendia, Y (2001) “Sensibilidad In Vitro a la nistatina de aislamientos vaginales de *Candida* spp”. Revista Cubana de Medicina Tropical. CUBA.

Garcia, R y Herrera, A (2007). “Evaluación de la inhibición del crecimiento de cinco cepas bacterianas patógenas por extractos acuosos de *Allium sativum* L, *Allium fistulosum* y *Allium cepa*: estudio preliminar In-Vitro”. Facultad de ciencias Basicas, Departamento de Microbiologia, Grupo de Investigacion en Ciencias aplicadas, (GICA - UP). “UNIVERSIDAD DE PAMPLONA”. Colombia.

Gull, I; Saeed, M; Shaukat, H; Aslam, S; Samra, Z and Athar, A (2012). Inhibitory effect of *Allium sativum* and *Zingiber officinale* extracts on clinically important drug resistant pathogenic bacteria. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*.11 (8). <http://www.ann-clinmicrob.com/content/11/1/8>.

Huamani, M y 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 – PERU.

INS/CNSP, (2016). “Laboratorio de referencia Nacional de Micología, Tercera edición LIMA –

- Kedrridge y cols, (1986).** Resistencia a los antifúngicos. Revista Bomédica Medwave
<http://www.medwave.cl/link.cgi/Medwave/PuestaDia/Cursos/3549>.
- Lora, C; Lujan, M; Robles, H; Saravia, V & Cabeza, J (2010).** Efecto In – Vitro de diferentes concentraciones de *Allium sativum* “ajo” frente a dermatofitos y *Candida albicans*. UCV – Scientia 2(2).
- Mamani, E y Mercado, S (2009).** “Efecto In- Vitro del ajo (*Allium sativum* L) liofilizado, sobre *Candida albicans*”. Revista Estomatológica Del Altiplano – Juliaca.
- Manzano, P; Mendez, L; Hernandez, F; Lopez, R (2007).** “Resistencia a los antifungicos un problema emergente en Mexico” Recuperado 14 octubre.
<http://www.anmm.org.mx16MM/2008/ni/23-vol-144-n1.pdf>
- Martines, G (2000).** “Estudios de cepas resistentes a los antifungicos”. Revista Técnicas de Laboratorio Para la Orientación de un Tratamiento adecuado.
- Munayako, E y y Murami, T (2013).** “Efecto antimicrobiano y antifúngico del extracto de *Allium sativum* a diversas concentraciones frente a cepas estándares de la cavidad bucal: *Streptococcus mutans*, *Capnocytophaga sputigena*, *Lactobacillus casei* y *Cándida albican*”. Tesis cirujano Dentista. Facultad de Odontología de la UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS.
- Nuñez, S y Wilma, E (2014).** “Determinación de la resistencia al fluconazol y nistatina mediante el fungigrama en vaginosis crónica causada por *Candida albicans* en mujeres de 18 - 35 años que acuden a CEMOPLAF (Centro Medico de Orientacion y Planificación Familiar) LATACUNGA”. Tesis previa para optar por el Título de Licenciado en Laboratorio Clínico. FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO – ECUADOR.
- 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 (PROCETSS) 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 – PERU.

Saravia, N y Guillintia, G (2012). “Actividad antifúngica del extracto de etanol *Schinus molle* y el Fluconazol sobre *Candida albicans*”. Facultad de Odontología – UNIVERSIDAD DE SAN MARTIN DE PORRES, LIMA – PERU.

Suárez, A; Castillo, I; Octavio, L (2015). “Perfil de resistencia micótica de *Candida* sp. al clotrimazol, fluconazol y nistatina en mujeres durante la segunda mitad del embarazo con candidiasis vulvo-vaginal atendidas en el hospital L. F. M. en el período de Octubre-Noviembre de 2015”. Tesis para optar el título de Doctor en Medicina y Cirugía. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA RECINTO UNIVERSITARIO “RUBÉN DARÍO” FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS.