

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



EFFECTO ANTIMICÓTICO DEL ACEITE ESENCIAL DE  
*Minthostachys mollis* (MUÑA) EN CEPAS DE *Cándida*  
*albicans*. PUNO – 2015.

TESIS

PRESENTADO POR:

**Br. ALEX MARIO SALAS APAZA**

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PUNO – PERÚ

2016

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

EFFECTO ANTIMICÓTICO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Minthostachys mollis* (MUÑA) EN CEPAS DE *Cándida albicans*. PUNO – 2015.

TESIS

PRESENTADO POR:  
Br. ALEX MARIO SALAS APAZA

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

APROBADO POR EL JURADO REVISOR COMFORMADO POR:

PRESIDENTE :

  
-----  
Dra. MARIA TRINIDAD ROMERO TORRES

PRIMER MIEMBRO :

  
-----  
Ing. M. Sc. FELIX RODOLFO MEZA ROMUALDO

SEGUNDO MIEMBRO :

  
-----  
Lic. HILVER CHARCA MAMANI

DIRECTOR DE TESIS :

  
-----  
M. Sc. VICKY CRISTINA GONZALES ALCOS

ASESOR DE TESIS :

  
-----  
Ing. OMAR PAUCAR BAUTISTA

PUNO – PERÚ  
2016

AREA: Microbiología y Laboratorio clínico.  
TEMA: Micología clínica.

## AGRADECIMIENTOS

*A la Universidad Nacional del Altiplano - Puno, mi alma mater. Al cuerpo docente de la Facultad de Ciencias Biológicas, en especial al área de Microbiología y Laboratorio Clínico, por sus enseñanzas vertidas durante mi formación profesional.*

*Mi especial agradecimiento a la M. Sc. Vicky Cristina Gonzales Alcos, por su apoyo y su orientación incondicional bajo su dirección, en el desarrollo y elaboración de este trabajo.*

*Al Ing. Omar Paucar Bautista, por la inestimable ayuda que me ha prestado en la parte estadística de la investigación.*

*A mi familia por su gran apoyo y comprensión.*

*A toda mi familia de mascotas que siempre me acompañaron en las noches duras de desvelaciones.*

*Mis más sinceros agradecimientos.*



NACIONAL DEL  
*DEDICATORIA*

*A mis queridos padres Mario Salas Machaca y Matilde L. Apaza Condori, mi eterna gratitud. A mi hermana Virginia y su familia y a Angela persona maravillosa, a todos ellos por ser una fuente de motivación e inspiración inagotable y de alegría en mi día a día.*

*Atte. Al.x*



## INDICE

RESUMEN.....	9
I. INTRODUCCIÓN .....	11
OBJETIVO GENERAL.....	12
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	12
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	13
2.1. ANTECEDENTES .....	13
2.2. MARCO TEÓRICO .....	16
2.3. MARCO CONCEPTUAL .....	31
III. MATERIALES Y MÉTODO.....	32
3.1. AREA DE ESTUDIO .....	32
3.2. TIPO DE ESTUDIO .....	33
3.4. METODOLOGÍA.....	33
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
V. CONCLUSIONES .....	49
VI. RECOMENDACIONES .....	50
VII. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA.....	51
ANEXOS.....	56

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Cuadro estandarizado de medida de halos de inhibición (mm).....	38
<b>Tabla 2:</b> Análisis de varianza (ANVA) para la determinación del efecto antimicótico del aceite esencial de la muña en cepas de <i>Cándida albicans</i> .....	42
<b>Tabla 3:</b> Prueba de comparación múltiple de TUKEY. Comparación de todas las pruebas para la contrastación con mayor rigurosidad.....	43
<b>Tabla 4:</b> Datos reales de las diferentes concentraciones, de medidas del diámetro de los halos de inhibición en (mm). Comparando con el control positivo. (6 tratamientos y 15 repeticiones).....	46
<b>Tabla 5:</b> Datos redondeados de las diferentes concentraciones, de medidas del diámetro de los halos de inhibición en (mm). Comparando con el control positivo. (6 tratamientos y 15 repeticiones).....	59
<b>Tabla 6:</b> Datos redondeados de las diferentes concentraciones, de medidas del diámetro de los halos de inhibición en (mm). Interpretado entre resistente, intermedio y sensible. .....	59

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> <i>Mintostachys mollis</i> .....	18
<b>Figura 2:</b> Destilación por arrastre de vapor de agua (Método directo). ....	21
<b>Figura 3:</b> Destilación por arrastre de vapor de agua (Método indirecto). ....	21
<b>Figura 4:</b> Pared celular micótica, de levaduras. ....	26
<b>Figura 5:</b> Patogenia de las infecciones por <i>Cándida albicans</i> . ....	27
<b>Figura 6:</b> Zona de colección, procesamiento y ejecución de la investigación. ....	32
<b>Figura 7:</b> Diámetro de halos de inhibición (mm), a diferentes concentraciones.....	44
<b>Figura 8:</b> Proceso de extracción del aceite de muña. ....	57
<b>Figura 9:</b> Muña ( <i>Mintostachys mollis</i> ).....	57
<b>Figura 10:</b> Siembra de esputo con Tuberculosis. ....	57
<b>Figura 11:</b> Esquema de software de extracción de aceites. ....	57
<b>Figura 12:</b> Plaqueo de medios selectivos con agar Saboraud dextrosa al 2%. ....	57
<b>Figura 13:</b> Cepas aisladas de <i>Cándida albicans</i> .....	57
<b>Figura 14:</b> Medios, concentraciones y demás materiales para procesamiento.....	58
<b>Figura 15:</b> Concentraciones (1/25, 1/50, 1/100, 1/150, 1/200, 1/250). ....	58
<b>Figura 16:</b> Halos de inhibición de control positivo y negativo. ....	58
<b>Figura 17:</b> Medios selectivos de agar Saboraud dextrosa al 2% para antibiograma. ....	58
<b>Figura 18:</b> Medidas de halos de inhibición. ....	58
<b>Figura 19:</b> Halos de inhibición a diferentes concentraciones.....	58



## RESUMEN

La investigación se realizó en los meses de Noviembre del 2015 a Abril del 2016. Teniendo como objetivo: Determinar el efecto antimicótico del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) en cepas de *Cándida albicans*. La recolección de la muña se realizó en la ciudad de Puno, la obtención del aceite esencial de la muña se efectuó en el Laboratorio de Operaciones y Procesos Unitarios de la Facultad de Ingeniería Química de la UNA – Puno, las muestras de esputo se obtuvieron de pacientes con tuberculosis del Hospital Regional “Manuel Núñez Butrón”, el aislamiento, identificación y la determinación del efecto antimicótico, se realizó en el laboratorio de Microbiología y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNA – Puno. El efecto antimicótico se determinó midiendo 105 halos de inhibición, utilizando el método de Kirby – Bauer (antibiograma antimicótico), se utilizó una cepa clínica de *Cándida albicans* aislados de pacientes con tuberculosis. Los grupos de estudio fueron concentraciones de 1ml/25 $\mu$ l (T1), 1ml/50 $\mu$ l (T2), 1ml/100 $\mu$ l (T3), 1ml/150 $\mu$ l (T4), 1ml/200 $\mu$ l (T5), 1ml/250 $\mu$ l (T6), donde (ml/ $\mu$ l es la proporción de agua destilada y aceite de muña respectivamente), un grupo control positivo (Fluconazol), y un grupo control negativo (agua destilada estéril) El análisis estadístico empleado fue ANVA para determinar el efecto antimicótico y Tukey, para la concentración inhibitoria adecuada y la evaluación de los halos de inhibición. Los resultados fueron: La media de los halos de inhibición del T1 fue de 3,4mm (0,0 – 4,9); del T2 11,1mm (10,1 – 11,9); del T3 15,7mm (14,4 – 16,9); del T4 19,0mm (17,9 – 20,0); del T5 24,1mm (23,4 – 25,2); del T6 29,2mm (28,3 – 30,0); y del grupo de Fluconazol 25,5mm (24,8 – 26,8). No se obtuvo halos de inhibición en el grupo de control negativo. Se encontró diferencia significativa entre el T1 – T6 y el grupo de Fluconazol a ( $p < .0001$ ), a un  $\alpha = 0.05$ . Concluyendo que de los seis tratamientos, el sexto demostró una concentración inhibitoria adecuada de 1ml/250 $\mu$ l (T6), resultando ser superior con un diámetro de halo de inhibición mayor, en comparación al Fluconazol (control positivo), demostrándose que el aceite de *Minthostachys mollis* tiene efecto antimicótico sobre cepas de *Cándida albicans*.

Palabras clave: Planta medicinal, aceite esencial, antifúngico, inmunosupresión, oportunismo, efecto antimicótico, halo de inhibición, *Cándida albicans*, *Minthostachys mollis*.

## ABSTRACT

The research was conducted in the months of November 2015 through April 2016. Aiming To determine the antifungal effect of essential oil of *Minthostachys mollis* (muña) in strains of *Candida albicans*. Collection muña was held in the city of Puno, obtaining essential oil muña was performed at the Laboratory of Operations and Processes Unitarian School of Chemical Engineering A - Puno, sputum samples were obtained from patients with tuberculosis of the Regional Hospital "Manuel Nunez Butron," the isolation, identification and determination of antifungal effect, was conducted in the laboratory of Microbiology and Biotechnology of the Faculty of Biological Sciences of the UNA - Puno. The antifungal effect was determined by measuring inhibition halos 105, using the method of Kirby - Bauer (antifungal susceptibility testing), a strain of *Candida albicans* clinical isolates from patients with tuberculosis was used. Study groups were concentrations of 1 ml / 25ul (T1), 1ml / 50ul (T2), 1ml / 100ul (T3), 1 ml / 150ul (T4), 1ml / 200ul (T5), 1ml / 250uL (T6), where (ml / ul is the ratio of distilled water and oil muña respectively), a positive control (fluconazole), and a negative control group (sterile distilled water) the statistical analysis used was ANOVA to determine the antimycotic effect and Tukey, for adequate inhibitory concentration and evaluation of the inhibition halos. The results were: The mean T1 inhibition halos was 3.4mm (0.0 to 4.9); T2 11,1mm (10.1 to 11.9); T3 15.7mm (14.4 to 16.9); T4 19,0mm (17.9 to 20.0); T5 24,1mm (23.4 to 25.2); T6 29,2mm (28.3 to 30.0); fluconazole group and 25,5mm (24.8 to 26.8). I no inhibition halos obtained in the negative control group. significant difference between T1 found - T6 and fluconazole group ( $p < 0.0001$ ),  $\alpha = 0.05$ . Concluyendo to that of the six treatments, the sixth demonstrated adequate 1ml / 250uL inhibitory concentration (T6), resulting in higher diameter halo greater inhibition compared to fluconazol (positive control) demonstrating mollis *Minthostachys* oil has antifungal effect on *Candida albicans* strains.

Keywords: Medicinal plant, essential oil, antifungal, immunosuppression, opportunism, antifungal effect, inhibiting halo, *Candida albicans*, *Minthostachys mollis*.

## I. INTRODUCCIÓN

La candidiasis, micosis causada por diversas especies de levaduras del género *Cándida*, correspondientes a un grupo de hongos identificados con más de 100 especies cada uno con la capacidad de afectar al ser humano. Los microorganismos de este género constituyen los marcadores de inmunosupresión etiológica por excelencia, ya sea por diversos factores predisponentes<sup>(1)</sup>, por tal motivo en la actualidad se vienen registrando un aumento significativo y muy considerable de las infecciones producidas por levaduras, es por eso que la presencia de *Cándida* en cavidad bucal oscila y se encuentra frecuentemente en un 20% - 70%.<sup>(1, 2)</sup>

Cualquier tejido y órgano puede ser afectado a lo que se presentan diferentes cuadros clínicos, cada uno de ellos asociado directamente al estado inmunológico de la persona.<sup>(1)</sup> *Cándida albicans* es la especie con mayor implicancia, siendo este un inocuo, que puede pasar de comensal a patógeno dependiendo de diversas condiciones del hospedero, hongo y demás factores que alteren el microambiente predisponente.<sup>(3)</sup>

*Cándida albicans*, principal representante de esta familia y otras especies de *Cándida*, presentan diferentes manifestaciones patológicas siendo las más frecuentes, infecciones superficiales (vulvovaginitis o candidiasis oral).<sup>(4)</sup> Muchas veces producen compromiso específico de algunos órganos en pacientes que en general, presentan enfermedades crónicas que los sitúan en una condición de deprimencia (candidiasis esofágica). En menor proporción de pacientes, sobre todo aquellos que se encuentran hospitalizados, y presentan terapia con antimicrobianos siendo estos de amplio espectro, que se encuentran invadidos con dispositivos biomédico, quirúrgicos, etc., presentan infecciones invasoras por hongos.<sup>(1)</sup>

En pacientes hospitalizados en pediatría, las infecciones fúngicas son un problema con mayor frecuencia. El aumento de estas infecciones se atribuye a diferentes factores, tales como la permanencia en unidades de cuidado intensivo (UCI), tiempos prolongados de cateterización, prematurez, nutrición parenteral, cirugías, operaciones, trasplantes, terapia inmunosupresora, uso de antibióticos de amplio espectro y la mayor sobrevivencia de los individuos inmunosuprimidos.<sup>(5)</sup> Ya sea por la resistencia antimicótica, o por el rechazo del paciente frente a los tratamientos que en muchos casos son de tiempo muy prolongado, hoy en día se plantea con fuerza el uso y aplicación de la medicina natural para el cuidado

y la restauración de la salud, y una de ellas es la muña que tiene propiedades antimicóticas.<sup>(6)</sup>

La muña, una de las pocas plantas que han validado su uso en la medicina tradicional debido a sus diferentes propiedades presentes (principios activos)<sup>(7, 8)</sup> el cual es utilizado para el tratamiento de diferentes dolencias como de las vías estomacales, respiratorias, y muchas otras afecciones presentes,<sup>(9, 10)</sup> esta planta habita en los diferentes pisos ecológicos de nuestra serranía Peruana donde se encuentra en una muy buena proporción.<sup>(11, 12)</sup> Razones sobran para maximizar el uso y aprovechamiento de nuestro recurso natural<sup>(11)</sup> ya que diversos estudios demuestran su efecto antibacteriano,<sup>(13-15)</sup> sin embargo, poco se conoce y se ha explorado sobre su capacidad antimicótico y menos aún aplicado en pacientes con afecciones presentes o inmunocomprometidos. Motivo por lo cual se realizó la presente investigación, que servirá como una alternativa de tratamiento terapéutico de menor costo y mayor eficacia, en el restablecimiento y mejora de la salud.

#### **OBJETIVO GENERAL**

- Determinar el efecto antimicótico del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) en cepas de *Cándida albicans*. Puno 2015.

#### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar la concentración inhibitoria adecuada del aceite esencial de muña frente a cepas de *Cándida albicans* en comparación al Fluconazol mediante el método de concentraciones “in vitro”.
- Evaluar el halo de inhibición de cepas de *Cándida albicans* con el aceite esencial de muña mediante el antibiograma antimicótico.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. ANTECEDENTES

Investigaciones realizadas acerca de la frecuencia de micosis en pacientes inmunosuprimidos del H. R. G. Ignacio Zaragoza, demostraron que de un total de 108 pacientes, la mayoría de pacientes presentaron un cuadro clínico de tuberculosis pulmonar y de síndrome de inmunodeficiencia adquirida. Siendo el 41.6% micosis asociada al síndrome de inmunodeficiencia adquirida y a tuberculosis pulmonar.<sup>(16)</sup> Asimismo otro estudio donde identificaron especies de *Cándida* aislados de pacientes ambulatorios, hospitalizados, e inmunocomprometidos. Mostraron que de 310 cepas, 188 (60,6%) pertenecían a *Cándida albicans*, siendo la especie con mayor frecuencia. El 81% eran de origen comunitario y el 58%, de pacientes inmunosuprimidos.<sup>(17)</sup> Finalmente en una revisión sobre infecciones oportunistas en pacientes adultos inmunocomprometidos no VIH describieron que las infecciones por hongos oportunistas. *Cándida albicans*, es la causa principal de las complicaciones de enfermedades presentes que tenga el paciente, siendo este un problema de difícil solución y con un fuerte aumento durante estos últimos años.<sup>(18)</sup>

Por otro lado estudios acerca de la evaluación y la susceptibilidad de especies de *Cándida* al Fluconazol demostraron que de 2.139 aislamientos de especies de *Cándida* provenientes de pacientes de consulta externa y en salas de hospitalización de centros asistenciales en Colombia, Ecuador y Venezuela. *Cándida albicans* frecuente en un (62%), seguido por *Cándida parapsilosis* (11%), *Cándida tropicalis* (8,5 %), *Cándida glabrata* (3,5%) y finalmente por *Cándida krusei* (2,2%). Concluyendo que el 88,1% fueron susceptibles al Fluconazol, asimismo el 92,1% de la especie *Cándida. albicans* presento susceptibilidad.<sup>(19)</sup>

En cuanto a investigaciones acerca de la composición química y contenido de fenoles en aceites esenciales de muña (*Minthostachys setosa* Briq, Epl), y anís (*Pimpinella anisum* L). Reportaron 18 compuestos volátiles siendo estos isomentona en un 39%, pulegona 32%, isopulegona 6% y timol 5% principalmente.<sup>(8)</sup> También otro estudio que demuestran la actividad antimicótica y metabolitos del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña). encontraron los siguientes monoterpenos: Pulegona, mentona, limoneno y mirceno y también se demostró la actividad antimicótica atribuidas

a la acción de los monoterpenos presentes encontrados.<sup>(20)</sup> Asimismo en otro estudio acerca de la actividad antimicótica y elucidación estructural del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* “muña”. Demostraron que los diámetros formados por la prueba de difusión en agar, *Cándida albicans*, obtuvo un halo de 30 mm al 100 %, 35 mm al 50% siendo inhibido su crecimiento por el aceite esencial de la muña.<sup>(21)</sup>

Finalmente investigaciones sobre la actividad antimicótica del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña) en comparación al Fluconazol. Demostraron que el aceite esencial al 100 % tuvo mayor eficacia contra la *Cándida albicans*, que el Fluconazol.<sup>(6)</sup> Asimismo otra investigación acerca del efecto antifúngico del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano) y *Cymbopogon citratus* (hierba luisa), en cepas de *Cándida albicans* comparando con la nistatina. Demostraron su eficacia de los dos grupos de aceites siendo muy superior a la Nistatina.<sup>(22)</sup> De igual manera un estudio sobre la actividad antimicótica del extracto etanólico del propóleo sobre el desarrollo y crecimiento de *Cándida albicans*. Se presenció que a mayor concentración, se presentó mayor efecto, el 100% fue mejor, pero no superior a la nistatina.<sup>(23)</sup>

Estudios realizados sobre la actividad antifúngica de *Rosmarinus officinalis* (romero) y *Melissa officinalis* (toronjil) frente a especies del género *Cándida*, obtenidas y aisladas de pacientes con vulvovaginitis los dos grupos de aceites presentaron capacidad antifúngica sobre las especies del género *Cándida*, pese a que el aceite de toronjil produjo halos de inhibición de diámetro considerable.<sup>(24)</sup> Asimismo un estudio de la actividad antimicótica del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum breym* “canela” frente a *Cándida albicans*. Demostró que *Cándida albicans* presento un alto índice de sensibilidad frente al aceite esencial de la canela.<sup>(25)</sup> Siendo estas investigaciones corroborada por el estudio sobre la actividad antifúngica del extracto de etanol *Schinus molle* y el Fluconazol sobre *cándida albicans*. El aceite de *Schinus molle* mostró capacidad fúngica en proporción de 25µg/ml, un halo de inhibición  $\geq 20$ mm, el Fluconazol a una concentración de 25 µg/ml, un halo de inhibición de  $\geq 31$ mm.<sup>(26)</sup>

Finalmente Estudios sobre la concentración inhibitoria mínima (CMI) del *Minthostachys mollis* (muña) frente al *Streptococcus mutans*, demostraron que a una concentración de 50% se presenció efecto inhibitorio y esto va de la mano con el incremento de la proporción.<sup>(13)</sup> Asimismo otro estudio de la actividad antifúngica de extractos vegetales del género *Baccharis* frente a *Cándida albicans*. confirmaron la actividad antifúngica

sobre estas cepas.<sup>(27)</sup> También en una investigación sobre el efecto del aceite esencial de *Matricaria chamomilla* (manzanilla) frente a *Cándida albicans* se demostró la susceptibilidad de *Cándida*, al aceite esencial de la manzanilla confirmando que el aceite de manzanilla se comporta como un excelente fungistático.<sup>(28)</sup> Siendo similar a estudios donde demuestran que el aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor), *Cinnamomun zeylanicum* (canela) presentan efecto antifúngico sobre *Aspergillus flavus*.<sup>(29)</sup>



## 2.2.MARCO TEÓRICO

### 2.2.1. Las plantas medicinales

#### **Definición:**

Son aquellos vegetales que elaboran productos propios denominados principios activos, que son sustancias que ejercen una acción farmacológica, benéfica o perjudicial, sobre el ser vivo. Su utilidad principal, a veces es muy específica, sirve muchas veces como droga o medicamento, puede aliviar la enfermedad o reestablecer la salud decaída; es decir, que tiende a disminuir o neutralizar el desequilibrio orgánico de la enfermedad. Constituyen aproximadamente la séptima parte de las especies existentes de plantas.<sup>(9)</sup> Asimismo el número de plantas medicinales utilizadas en el campo de la salud tradicional es muy extenso y está en constante ampliación a medida que van siendo exploradas nuevas especies como la muña, la cual posee muchas propiedades, y vienen siendo aprovechadas por la humanidad de diferentes maneras.<sup>(10)</sup>

#### **Formas de utilización de las plantas medicinales.**

##### **Infusiones:**

Las plantas medicinales se toman en forma de preparados o infusiones,<sup>(30)</sup> las hojas, flores, y algunos frutos troceados se preparan en infusiones.

##### **Mejorando la respiración:**

Algunos aceites esenciales de plantas son más eficaces si se aspiran a través de la nariz mejorando la respiración sintiendo mejoría y frescura al momento de respirar.

##### **Lavados, cataplasmas y enjuagues:**

En las gárgaras, la infusión no se traga sino que se expulsa, mejorando el área afectada.<sup>(30)</sup>



### 2.2.2. Aceites esenciales

Son compuestos que están formados por varias sustancias orgánicas volátiles, estas pueden ser alcoholes, acetonas, cetonas, éteres, aldehído; que se producen y almacenan en los canales secretores de las plantas. Los constituyentes oloríferos de una planta poseen una textura aceitosa y un aroma muy profundo, se encuentra en muchas especies de diferentes familias.<sup>(9)</sup> Los aceites esenciales de las plantas aromáticas son una mezcla de sustancias concentradas en forma de minúsculas gotas en diferentes partes de la planta: las hojas, la raíz, las flores, el tallo y las semillas.

Están presentes en forma líquida a temperatura ambiente, por su volatilidad son obtenidos a partir de una materia prima vegetal, extraíbles por destilación en corriente de vapor de agua, procedimientos mecánicos o por destilación en seco.<sup>(31)</sup> Son también desechos del metabolismo de la planta. Comprende las esencias de los vegetales y las resinas. Se presentan en emulsiones que tienden a formar gotitas. A menudo la planta los vierte al exterior, por medio de los canales excretores. Las esencias vegetales, que son volátiles, se difunden a través de la epidermis de las hojas y de las flores; expanden a menudo un olor pronunciado y dan perfume a los vegetales.<sup>(9)</sup>

#### **Utilización de los aceites esenciales.**

En la medicina natural (aromaterapia), y en la industria farmacológica, en la industria de alimentos como saborizantes, en perfumería y la cosmética.<sup>(32)</sup> Por esta razón en los últimos años se ha generado un mercado ecológico que demanda estos productos obtenidos de plantas aromáticas andinas.<sup>(32)</sup>

### 2.2.3. *Minthostachys mollis* (Muña).

Sinonimia vulgar: muña, chancua, tinto, ayamanchana, chancas, chancua blanca.<sup>(12)</sup>



**Figura 1:** *Minthostachys mollis*.

**Fuente:** fotografía propia.  
Se muestra la muña en su hábitat natural.

#### **Descripción morfológica.**

Es un arbusto o sufrútice que mide hasta 2,0 m de alto, muy aromático, ramificado con tallos semileñosos y glabros en la base que crecen apoyándose en arbustos o árboles, pueden alcanzar varios metros de longitud.<sup>(11, 12)</sup> Hojas fragantes a mentol, opuestas, pecioladas, flores blancas pequeñas, dispuestas en espigas densas, terminales. Cáliz tubular, 12 – 13 nervado, 5 dentado, garganta hirsuta por fuera, corola inclusa en el cáliz, bilabiada, lóbulos superiores 2 y los inferiores 3. Estambres 4 didinamos. Fruto esquizocarpio tipo terraquenico, con núculas lisas.<sup>(12)</sup>

#### **Eco geografía.**

Características edáficas: Desarrolla en suelos arcillosos, areno – arcilloso, franco areno – arcilloso, franco limo – arcilloso. Su hábitat son laderas abiertas, rocosas y pedregosas, laderas de arbustos, bordes de carreteras, terrenos pedregosos, y borde de campos de cultivo, cercos.

Características climáticas: Clima: Templado o templado cálido. Temperatura (°C): 10 – 26. Precipitación (mm): 500 – 2000. Humedad atmosférica (%): 60 – 90.

Características fitogeográficas: Distribución altitudinal: 500 – 3500 m.s.n.m. distribución por Departamentos: Piura, Cajamarca, Amazonas, La libertad, Ancash, Junín, Cusco, Arequipa y Puno.

Características fenológicas: Época de floración y fructificación a lo largo de todo el año. Propagación mediante semillas.

Información etnomedicinal: Se prepara en forma de infusión. Usos etnomedicinales: Estimulante, carmitativa, anti flatulenta, antidiarreico. También se usa como aspecto culinario.<sup>(11)</sup>

### ***Minthostachys mollis.***

#### **Clasificación taxonómica.**

Reino: Plantae

Sub reino: Fanerógamas

División: Angiospermae

Clase: Dicotyledonea

Sub clase: Metachlamydeae

Orden: Tubliflorae

Familia: Lamiaceae

Género: *Minthostachys*

Especie: *M. mollis.*<sup>(12)</sup>

#### **Composición química del aceite esencial de la muña.**

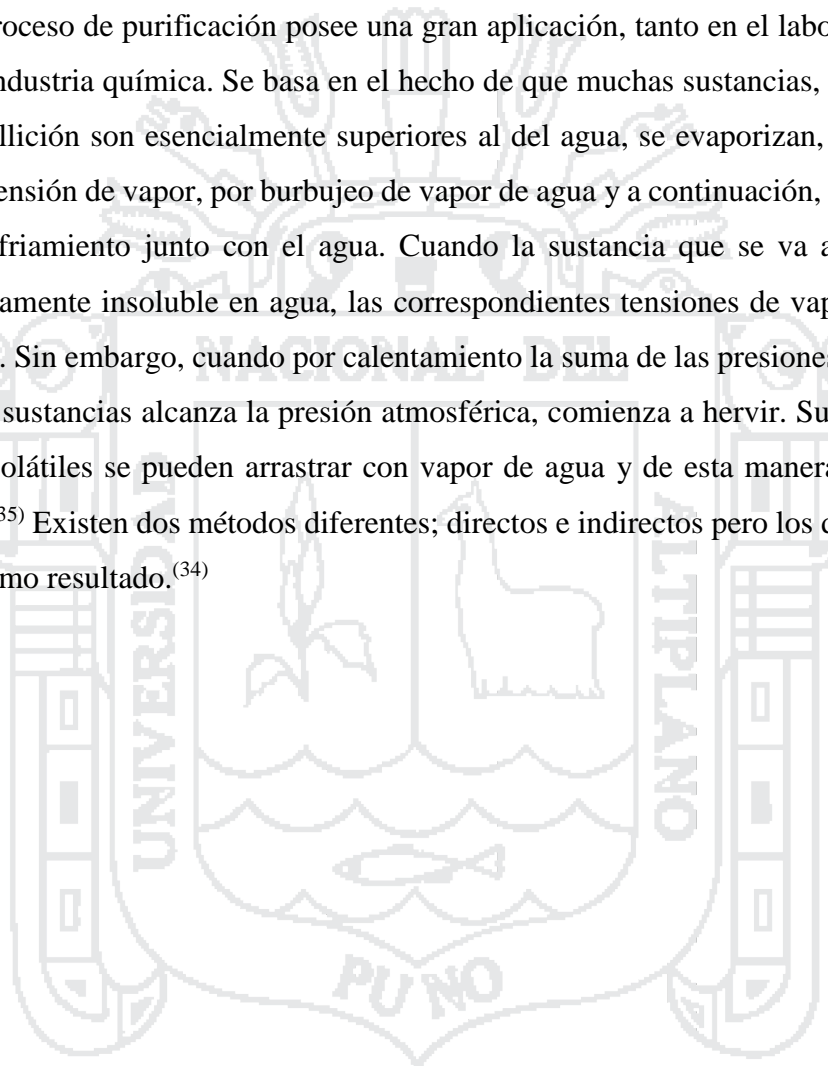
El aceite esencial de muña está compuesto principalmente por monoterpenos,<sup>(8, 20)</sup> como son: pulegona (19,3%), mentona (18,4%), carvona (1,7%); además se han reportado la presencia de limoneno, isomentona,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, ácido piperínico, mentol, y eucaliptol.<sup>(7)</sup>

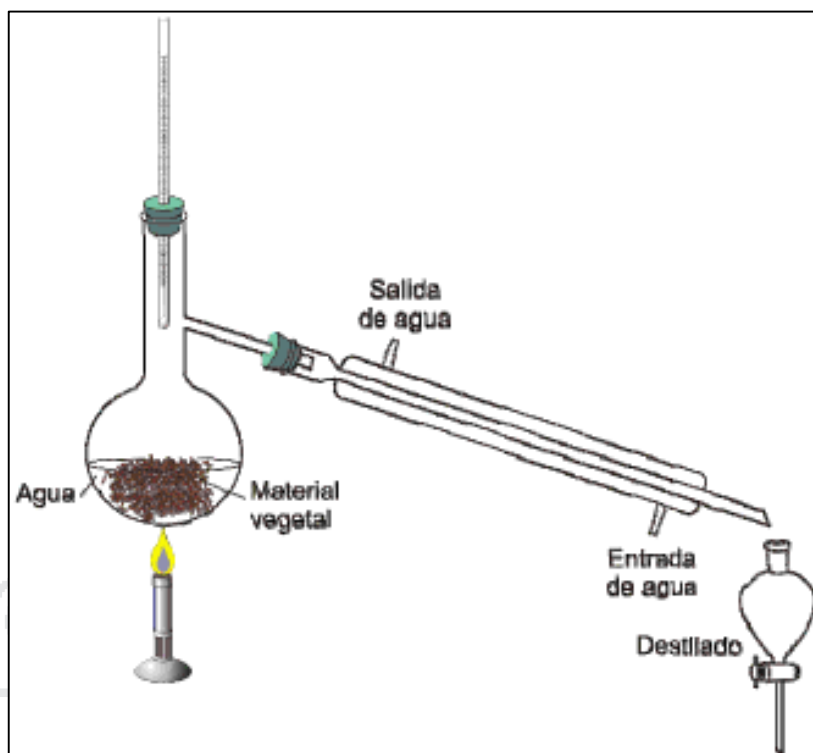
#### **2.2.4. Método de destilación por arrastre de vapor con agua.**

El término destilar proviene del latín “destilare”: Separar por medio de calor, alambiques u otros vasos de una sustancia volátil llamada esencia, de otras más fijas, enfriando luego su vapor para reducirla nuevamente a líquido. Por la temperatura del vapor (100°C) en un cierto tiempo, el tejido vegetal se rompe liberando el aceite esencial. La destilación por arrastre de vapor es una técnica aplicada en la separación

de sustancias poco solubles en agua y se emplea para separar una sustancia de una mezcla que posee un punto de ebullición muy alto y que se descomponen al destilar.<sup>(33)</sup> Es el más sencillo de los métodos y se asemeja a la obtención de licores en los antiguos alambiques. Este método usa gracias a la propiedad que tienen las moléculas de agua en estado de vapor de asociarse con moléculas de aceite.<sup>(34)</sup>

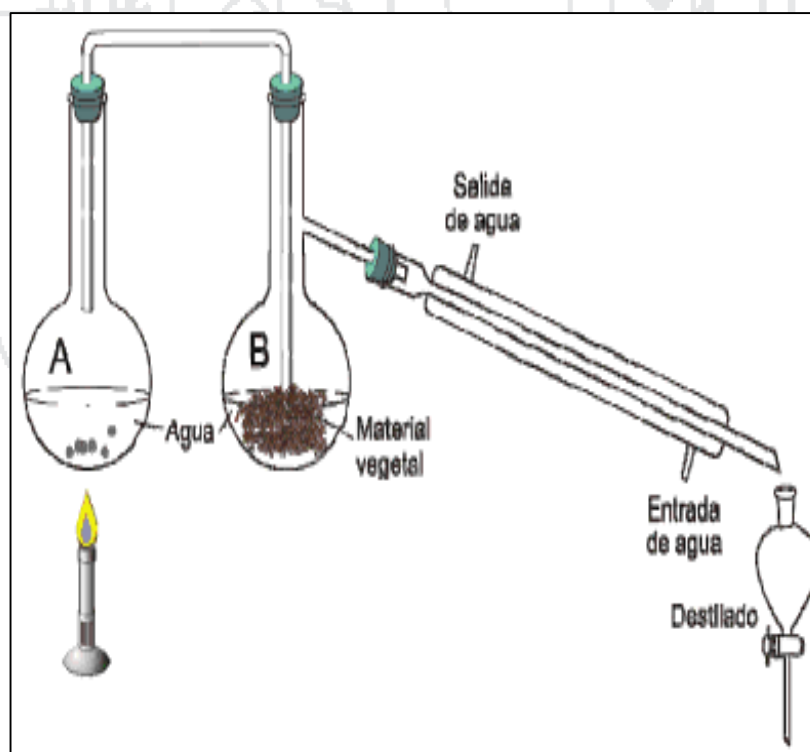
Este proceso de purificación posee una gran aplicación, tanto en el laboratorio como en la industria química. Se basa en el hecho de que muchas sustancias, cuyos puntos de ebullición son esencialmente superiores al del agua, se evaporizan, dependiendo de su tensión de vapor, por burbujeo de vapor de agua y a continuación, se condensan por enfriamiento junto con el agua. Cuando la sustancia que se va a purificar es prácticamente insoluble en agua, las correspondientes tensiones de vapor apenas se alteran. Sin embargo, cuando por calentamiento la suma de las presiones parciales de ambas sustancias alcanza la presión atmosférica, comienza a hervir. Sustancias muy poco volátiles se pueden arrastrar con vapor de agua y de esta manera se obtienen puras.<sup>(35)</sup> Existen dos métodos diferentes; directos e indirectos pero los dos conllevan un mismo resultado.<sup>(34)</sup>





**Figura 2:** Destilación por arrastre de vapor de agua (Método directo).

**Fuente:** Curso Práctico de Química Orgánica. Enfocado a Biología y Alimentos.<sup>(35)</sup>



**Figura 3:** Destilación por arrastre de vapor de agua (Método indirecto).

**Fuente:** Curso Práctico de Química Orgánica. Enfocado a Biología y Alimentos.<sup>(35)</sup>

### 2.2.5. Micosis oportunista.

Un microorganismo oportunista es por lo general inofensivo en su ambiente habitual, pero se vuelve patógeno en un huésped con el sistema inmune comprometido. Un huésped comprometido está sumamente débil y tiene disminuida su resistencia a una infección presente.<sup>(36)</sup> Los hospedadores con deterioro de sus defensas inmunitarias son susceptibles a muchos hongos de amplia distribución, siendo expuestas personas sanas, y por lo común resistentes. En muchos casos, se puede identificar el tipo de hongo y el curso natural de la micosis por el cuadro predisponente y primario del hospedador. *Cándida* y levaduras similares, miembros de la flora bacteriana normal, se tornan oportunistas endógenos. Las micosis por otros oportunistas son causados por hongos exógenos que en forma natural vive en la tierra, el agua y el aire.<sup>(37)</sup>

Desde hace más de 30 años se utiliza el termino micosis oportunistas para denominar a un grupo de afecciones por hongos que viven normalmente saprobios en el ambiente o cavidades naturales de los seres humanos pueden ser termo tolerantes y tiene la capacidad de presentar cambios bioquímicos y morfológicos de acuerdo a los mecanismos de defensa que presenta el huésped. La incidencia de estas infecciones muestra un índice elevado de casos, en inmunodeprimidos por deficiencia de la inmunidad, sea celular (caquexia, SIDA) o humoral (leucemia, mieloma, etc.) por alteraciones de la fagocitosis (lupus, diabetes); granulocitopenia (citotóxicos, radioterapia) o en inmunodepresión consecuente, o administración de glucocorticoides y quimioterapia, principalmente en trasplantados, también se tornan en los que sufrieron quemaduras graves, así como en pacientes con híper alimentación parenteral y con catéteres intravasculares. Algunas de estas micosis no se diagnostican sino hasta el momento de la necropsia.<sup>(38)</sup> Los agentes etiológicos que producen micosis oportunistas por levaduriformes son *Cándida albicans*.<sup>(39)</sup>

### 2.2.6. Inmunosupresión y la presencia de micosis oportunista.

El oportunismo muchas veces es favorecido por un gran número de factores, principalmente a procesos terapéuticos, uso indiscriminado de antibióticos, esteroides, cito tóxicos, trasplantes órganos, nutrición parenteral, drogadicción, neoplasias, SIDA, Tuberculosis, colagenopatías, diabetes mellitus, ect. La severidad de las micosis oportunistas depende principalmente de la incapacidad del sistema inmune de la persona para frenar el proceso infeccioso, de los factores de virulencia del hongo y de las condiciones del microambiente en que se lleva a cabo la interacción entre el hospedero y el parásito. Cada día es mayor el índice de infecciones en pacientes inmunosuprimidos, causadas por hongos de bajo potencial patógeno como *Cándida*, que son causa de un número creciente de infecciones en este tipo de pacientes.<sup>(40)</sup>

El aislamiento de hongos, considerados no patógenos primarios, a partir de especímenes que contienen una flora diversa y abundante, representa un problema en la interpretación del rol patógeno, por lo que es necesario establecer y reunir ciertos parámetros para definir su participación en la infección o enfermedad.<sup>(16)</sup> Un estudio realizado en México, demostró que de 108 pacientes estudiados, 45 tuvieron algún tipo de micosis, de las cuales la candidiasis fue la más frecuente (35 casos), predominando de ésta la forma pulmonar (32 casos). Los 35 casos presentaban por diferentes factores inmunosupresión, de los cuales 24 casos, tuvo la presencia de *Cándida albicans* siendo esta la más frecuente, lo cual estuvo asociado a tuberculosis (14 casos), y el SIDA (7 casos).<sup>(16)</sup>

### 2.2.7. Candidiasis.

#### Sinonimia.

Candidiasis, moniliasis, muguet, algodoncillo.<sup>(38)</sup>

La candidiasis es la micosis producida por el hongo dimórfico *Cándida albicans*, que a diferencia de otros hongos patógenos, *Cándida albicans* pertenece a la microbiota normal del tracto digestivo, las vías respiratorias, el área vaginal y la boca. En individuos sanos *Cándida albicans* no es patógeno, sin embargo si se altera la microbiota normal *Cándida* se puede multiplicar rápidamente y producir candidiasis.<sup>(36)</sup> Se ha determinado que las especies del género *Cándida* conforman el

grupo más importante de hongos patógenos oportunistas. Las especies incluidas en este género constituyen la cuarta causa más frecuente de infecciones nosocomiales septicémicas adquiridas en el hospital (IS) y superan a cualquier patógeno gramnegativo individual.<sup>(39)</sup>

Entre 1980 y la actualidad, la frecuencia de IS por *Cándida* se ha incrementado a un ritmo constante en hospitales de cualquier tamaño y en todos los grupos de edades.<sup>(38)</sup> Se han descrito más de 100 especies del género *Cándida*, aunque tan sólo un pequeño número de ellas se ha implicado en infecciones clínicas. *C. albicans* es la especie aislada con una mayor frecuencia a partir de muestras clínicas y generalmente representa entre un 90% y un 100% de las cepas aisladas de muestras de mucosa, y entre un 50% y 70% de las cepas procedente de pacientes con IS. Alrededor de un 95% de estas últimas corresponde a cuatro especies: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*. De ellas, *C. glabrata* es la única especie que se considera emergente como causa de IS, debido, en parte, a su resistencia intrínseca y adquirida a los azoles y otros antifúngicos empleados de forma frecuente. El 5% restante de IS por *Cándida* engloba entre 12 y 14 especies diferentes, como *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis* y *C. rugosa*.<sup>(36)</sup> Aunque estas especies se consideran causas infrecuentes de candidiasis, se ha observado que varias de ellas se aglutinan en grupos nosocomiales o bien presentan una resistencia innata o adquirida a uno o más fármacos antifúngicos conocidos.<sup>(39)</sup>

### Morfología e identificación

En cultivos o en los tejidos, especies de *Cándida* proliferan en la forma de levaduras ovales gemantes de 3 a 6  $\mu\text{m}$  de diámetro. También forman pseudohifas cuando las yemas siguen creciendo, pero no se desprenden y así producen cadenas de células alargadas que muestran muescas o constricciones en los tabiques entre célula y célula. A diferencia de otras especies de *Cándida*, *C. albicans* es dimórfica; además de las formas de levadura y pseudohifas también produce hifas verdaderas.<sup>(36)</sup> En medios de agar en un término de 24 horas a 37°C o a temperatura ambiente, las especies de *Cándida* producen colonias blandas de color crema con olor a levadura. Las pseudohifas se caracterizan por proliferar en un plano por debajo de la superficie del agar. Dos técnicas morfológicas sencillas permiten diferenciar *C. albicans*, que es el patógeno más frecuente, de otras especies de *Cándida*: después de incubación en suero durante unos 90 minutos a 37°C, las levaduras de *C. albicans* comienzan a

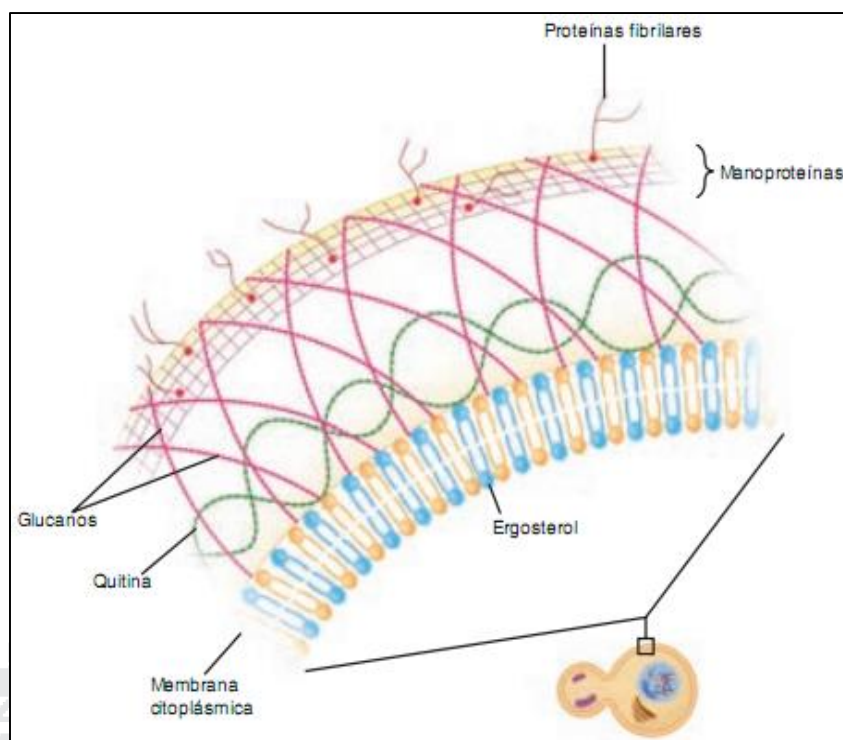


formar hifas verdaderas o también llamados tubos germinativos, y en medios con deficiencia de nutrientes *C. albicans* produce grandes clamidosporas esféricas.<sup>(37)</sup>

### **Estructura molecular de *Cándida albicans***

Las células micóticas de *Candida albicans* tienen una pared celular rígida externa a la membrana citoplásmica, cuya constitución química difiere de la observada en plantas y bacterias. Una diferencia importante con las células de mamíferos es que las membranas citoplásmicas están constituidas por esteroides. En hongos, el esteroide dominante es el ergosterol, en tanto que en células de mamíferos es el colesterol.<sup>(39)</sup>

La estructura química de la pared celular en los hongos es notablemente diferente de la observada en células bacterianas porque no contiene peptidoglucano, glicerol, ácido teicoico de ribitol, o lipopolisacáridos. En su lugar, los polisacáridos manano, glucanos y quitina se encuentran en estrecha asociación unos con otros y con proteínas estructurales.<sup>(39)</sup> Las manoproteínas son polímeros de manosa (manano) que se encuentran en la superficie de la matriz estructural de la pared celular, donde se encuentran unidas a proteínas. Son los principales determinantes de la especificidad serológica por las variaciones en la composición y uniones de las cadenas laterales de polímeros. Los glucanos son polímeros de glucosilo, algunos de los cuales forman fibrillas que incrementan la fuerza de la pared de las células micóticas, a menudo en estrecha asociación con quitina. La quitina está compuesta de cadenas largas, no ramificadas, de poli-N-acetilglucosamina siendo el principal componente de la pared celular de hongos filamentosos. En las levaduras, la quitina parece ser de la mayor importancia en la formación de tabiques cruzados y conductos a través de los cuales pasa el núcleo de la célula madre a la célula hija durante la división celular.<sup>(41)</sup>



**Figura 4:** Pared celular micótica, de levaduras.

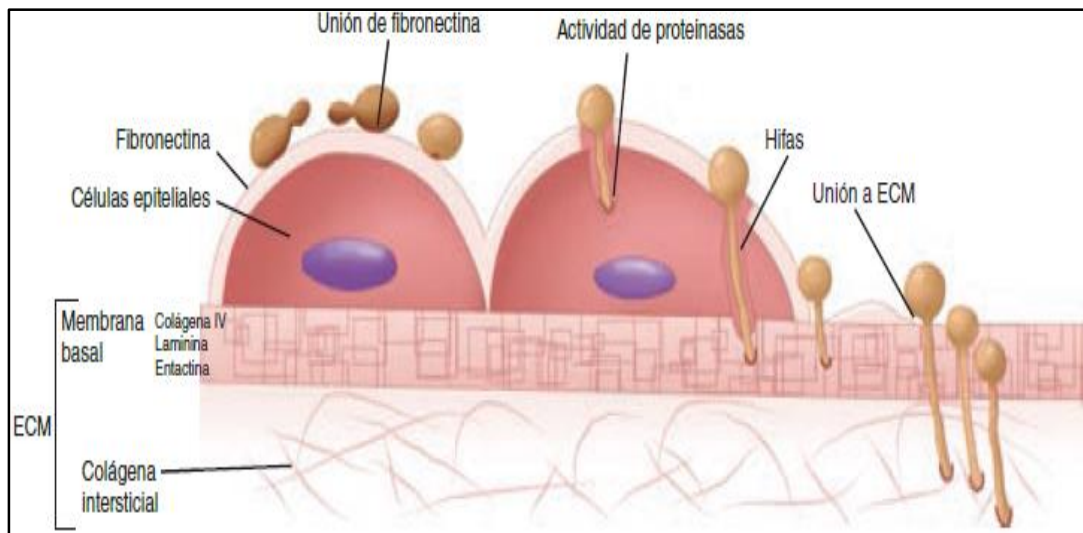
**Fuente:** Microbiología médica.<sup>(41)</sup>

Se muestra la superposición de elementos de mananos, glucanos, quitina y elementos proteínicos. Los complejos de mananos y elementos proteínicos, las manoproteínas se extienden más allá de la pared celular.

### Patogenia y anatomía patológica

La candidiasis superficial (cutánea o de mucosas) surge por un incremento en el número local de células de *Cándida* y daño de la piel o del epitelio, que permite la invasión local por las levaduras y por las pseudohifas. Aparece candidiasis sistémica cuando *Cándida* penetra en la corriente sanguínea y las defensas del hospedador no bastan para contener la proliferación y la diseminación de dichas células. Desde la sangre *Cándida* infecta riñones se fija a las prótesis valvulares del corazón o produce candidiasis en cualquier otro sitio (como artritis, meningitis o endoftalmítis). La arquitectura histológica local de las lesiones cutáneas o mucocutáneas se caracteriza por reacciones inflamatorias que van desde abscesos piógenos hasta granulomas crónicos. Las células contienen innumerables levaduras gemantes y pseudohifas.<sup>(37)</sup>

El incremento importante del número de *Cándida* en vías gastrointestinales suele surgir después de administrar antibióticos antibacterianos por la boca, y las levaduras se incorporan a la circulación al cruzar la mucosa intestinal.<sup>(41)</sup>



**Figura 5:** Patología de las infecciones por *Cándida albicans*.

**Fuente:** Microbiología médica.<sup>(41)</sup>

Se muestran los mecanismos propuestos para la unión e invasión por *C. albicans*. Los receptores de superficie de glucomanano en la levadura pueden unirse a la fibronectina que cubre las células epiteliales o a los elementos de la matriz extracelular (ECM) cuando se pierde la superficie epitelial o cuando *Cándida* ha invadido más allá de ésta. La invasión se asocia con formación de hifas y producción de proteinasas, las cuales pueden digerir elementos hísticos.

### Manifestaciones clínicas.

#### Candidiasis cutánea y de mucosas

Los factores de riesgo para que surja candidiasis superficial comprenden SIDA, embarazo, diabetes, edades muy tempranas o muy tardías (lactantes o ancianos), píldoras anticonceptivas y traumatismos (quemaduras, maceración de la piel). El algodoncillo aparece en la lengua, los labios, las encías o el paladar blando. Es irregular y también puede presentar lesiones seudomembranosas blanquecinas y confluentes compuestas de células epiteliales, levaduras y pseudohifas. El algodoncillo aparece en casi todos los enfermos de síndrome de inmunodeficiencia adquirida.<sup>(37)</sup>

Otros factores de peligro comprenden la corticoterapia o la antibioticoterapia, hiperglucemia e inmunodeficiencia mediada por células. La invasión de la mucosa vaginal por levaduras origina vulvovaginitis que se caracteriza por irritación, prurito y secreción vaginal; antes de que surja tal cuadro a veces actúan factores como diabetes, embarazo o administración de antibacterianos que alteran la flora microbiana, el pH ácido local o secreciones.<sup>(37,39)</sup> Otras formas de candidiasis cutánea incluyen la invasión de la piel, cuando este órgano es debilitado por traumatismos, quemaduras o maceración. La infección intertriginosa aparece en zonas húmedas y calientes del cuerpo como axilas, y pliegues interglúteo o inframamario y es más

común en personas obesas y en los diabéticos. Las zonas infectadas se tornan rojas y húmedas y en ellas pueden surgir vesículas. La afección en el espacio interdigital aparece después de la inmersión duradera y repetida en agua y es más frecuente en amas de casa, cantineros, cocineros y personas que manipulan verduras y pescado. La invasión de las uñas y alrededor de la placa ungueal por *Cándida* origina onicomicosis que es una hinchazón dolorosa y eritematosa del pliegue ungueal que se asemeja a la paroniquia piógena y al final puede destruir la uña.<sup>(37)</sup>

### **Candidiasis sistémica**

La candidemia puede ser causada por catéteres o sondas a permanencia, operaciones, abuso de drogas intravenosas, broncoaspiración o daño de la piel o las vías gastrointestinales. En casi todos los sujetos con defensas normales las levaduras son eliminadas y la candidemia es transitoria. Sin embargo, en sujetos con deficiencia innata de fagocitos, como células de defensa, pueden surgir en cualquier sitio lesiones ocultas, en particular en riñones, piel (lesiones macronodulares), ojos, corazón y meninges.<sup>(37, 41)</sup> La candidiasis sistémica surge más a menudo con la administración a largo plazo de corticoesteroides y otros inmunodepresores; en caso de enfermedades hematológicas como leucemia, linfoma y anemia aplásica, y en enfermedad granulomatosa crónica. La endocarditis por *Cándida* suele acompañar al depósito y la proliferación de las levaduras y las pseudohifas en prótesis valvulares del corazón o vegetaciones. Las infecciones renales suelen ser una manifestación de índole general, en tanto que las de vías urinarias suelen aparecer con factores como sondas de Foley, diabetes, embarazo y antibióticos antibacterianos.<sup>(37)</sup>

### **Candidiasis mucocutánea crónica**

Casi todas las formas de esta enfermedad rara comienzan en la niñez temprana, acompañan a inmunodeficiencias de índole celular y endocrinopatías y originan infecciones crónicas y superficiales con desfiguración en cualquier zona de la piel o las mucosas o en todas ellas.<sup>(37)</sup>

### Diagnóstico de laboratorio

Para el diagnóstico de laboratorio de la candidiasis es necesaria la obtención de material clínico adecuado para su estudio mediante microscopia directa y cultivo. Las muestras de raspado de las lesiones mucosas o cutáneas se pueden examinar directamente después de ser tratadas con hidróxido de potasio (KOH) al 10% o el 20% que contenga blanco calcoflúor. Las formas levaduriformes de gemación y las pseudohifas se detectan con facilidad por medio de la microscopia de fluorescencia.<sup>(37)</sup> Los cultivos en medios micológicos estándar se emplean con la finalidad de aislar el microorganismo para su posterior identificación a nivel de especie. Con una frecuencia en constante, estas muestras se inoculan directamente en un medio cromogénico selectivo, como CHRO – M agar, el cual hace posible la detección de la presencia de varias especies de *Cándida* en la muestra y la rápida identificación de *C. albicans* (colonias verdes) y *C. tropicalis* (colonias azules) en función de sus características morfológicas.<sup>(39)</sup>

El diagnóstico de los restantes tipos de infección implica la realización de cultivos, excepto cuando sea posible la obtención de muestras tisulares para su examen anatomopatológico. En todos los casos en que sea posible, se deben biopsiar las lesiones cutáneas y se deben teñir los cortes histológicos con GMS o cualquier otra tinción específica para hongos. La visualización de las levaduras de gemación y las pseudohifas características es suficiente para elaborar el diagnóstico de la candidiasis.<sup>(37)</sup> Normalmente se deben efectuar hemocultivos, cultivos tisulares y cultivos de los líquidos corporales estériles. La identificación de cepas de *Cándida* a nivel de especie tiene una gran importancia como consecuencia de las diferentes respuestas a los distintos tratamientos anti fúngicos que se han observado en las especies de este género. Se lleva a cabo a través de la prueba del tubo germinativo (*C. albicans*), varios medios/pruebas cromogénicas y paneles de asimilación de azúcares.<sup>(39)</sup>

### **Tratamiento, prevención y control**

Se dispone de un amplio abanico de opciones terapéuticas frente a la candidiasis. Las infecciones mucosas y cutáneas se tratan por medio de diversas cremas tópicas, lociones, pomadas y supositorios que contienen distintos fármacos antifúngicos del grupo de los azoles. El tratamiento sistémico por vía oral se basa en la administración de Fluconazol o Itraconazol.<sup>(39)</sup> Al igual que sucede en la mayoría de los procesos infecciosos, la prevención es preferible al tratamiento de una infección establecida por *Cándida*. Es preciso evitar los antimicrobianos de amplio espectro, manipular cuidadosamente los catéteres, y cumplir de forma rigurosa las directrices de control de infecciones. Se ha comprobado que la disminución de la colonización asociada a la profilaxis con Fluconazol es eficaz cuando se emplea en grupos específicos de alto riesgo.<sup>(39)</sup>

### **Epidemiología**

*Cándida albicans* en condiciones normales es parte de la flora orofaríngea, gastrointestinal y del aparato reproductor femenino.<sup>(39)</sup> Las infecciones son endógenas excepto en casos de contacto directo de la mucosa con lesiones de otras personas (p. ej., contacto sexual). *C. albicans* es una causa común de infecciones nosocomiales, pero los hongos con frecuencia se derivan de la propia flora del paciente más que de infecciones cruzadas. Los procedimientos con penetración corporal y los dispositivos a permanencia pueden actuar como sitio de entrada para la infección y el número de microorganismos de *Cándida* disponibles puede incrementarse con el uso de fármacos antibacterianos.<sup>(41)</sup>

### 2.3.MARCO CONCEPTUAL

**Aceite esencial.** Líquido oleoso volátil, generalmente insaponificable, algo soluble, contiene terpenos, alcoholes, cetonas, fenoles, ácidos, aldehídos, éteres, se encuentran generalmente en las flores, hojas y tallos de plantas.<sup>(9)</sup>

**Antimicótico.** Sustancia que tiene la capacidad de evitar el crecimiento de algunos tipos de hongos.<sup>(6)</sup>

**Candidiasis.** Infección producida por el género *Cándida*.<sup>(38)</sup>

**Concentración mínima inhibitoria (CMI).** Concentración mínima de una sustancia necesaria para impedir el crecimiento microbiano.<sup>(13)</sup>

**Cepa.** Conjunto de virus bacterias u hongos que tienen el mismo patrimonio genético.<sup>(37)</sup>

**Destilación.** Separación de una mezcla de varios componentes aprovechando sus distintas volatilidades, o bien separar los materiales volátiles de los no volátiles.<sup>(35)</sup>

**Destilación por arrastre de vapor con agua.** Destilación por medio de una corriente de vapor que arrastra selectivamente algunos compuestos de la mezcla.<sup>(34)</sup>

**Hongo.** Organismo eucariota que pertenece al reino fungi.<sup>(38)</sup>

**Inhibición.** Impedir o reprimir el ejercicio de facultades o hábitos.<sup>(19)</sup>

**Inmunosupresión.** Disminución o anulación de la respuesta inmunológica del organismo mediante tratamiento médico u otras causas.<sup>(16)</sup>

**Levadura.** Hongo unicelular redondeado u ovoide que se reproduce sexual o asexualmente.<sup>(38)</sup>

**Método kirby – Bauer.** Método utilizado para determinar la sensibilidad de agentes patógenos ante nuevas sustancias en investigación.<sup>(39)</sup>

**Micosis.** Enfermedad infecciosa producida por hongos microscópicos que puede afectar a cualquier parte del organismo.<sup>(41)</sup>

**Muña.** Especie de planta arbustiva leñosa, que alcanza de 80 – 120 cm de altura.<sup>(11)</sup>

**Planta medicinal.** Especie vegetal que contiene en toda o en alguna de sus partes constitutivas, principios activos útiles para combatir enfermedades.<sup>(10)</sup>





### 3.2.TIPO DE ESTUDIO

Es de tipo experimental e inferencial, con pruebas y controles, distribuidos en tres grupos: Un grupo control positivo (antibiótico de Fluconazol), un control negativo (agua destilada estéril); y el tercer grupo representada por el aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña),

### 3.3.POBLACIÓN Y MUESTRA

Constituida por:

- Cepas de *Cándida albicans*.
- Aceite esencial de muña (*Minthostachys mollis*).

### 3.4.METODOLOGÍA

La investigación se realizó en tres fases, de los cuales en la fase pre analítica se realizó todos los procedimientos necesarios para el cumplimiento de cada objetivo planteado en la investigación, describiéndose en forma ordenada y detallada por objetivo, en la fase analítica y post analítica.

#### FASE PRE ANALÍTICA

##### Recolección del material vegetal.

La muestra de la muña se colecta teniendo en cuenta, donde se encuentran los principios activos, etapa de crecimiento, parte de la planta, momento de recolección del día y hora.<sup>(42)</sup>

##### Procedimiento:

- La muestra se colecto en estado fresco y estado fenológico de crecimiento vegetativo (juvenil).
- Se colecto 60 Kg, de planta entera, del barrio San José (Zona alta).
- Utilizando un objeto punzocortante (tijera de podar), se seleccionaron impurezas (ramas secas, tallos secos o dañados, tierra, otras plantas, etc.), en lo cual no se encuentra la presencia de los aceites esenciales.
- Se almaceno en bolsas de papel kraft previamente etiquetados, y sellados, con la finalidad de evitar su deterioro o maltrato de la planta durante su traslado.
- Se extrajo todo el material vegetal de las bolsas de papel kraft.

- Se separó solo las hojas ya que solo esa parte contiene la mayor cantidad de aceite esencial.

### **Extracción del aceite esencial.**

#### **Método:**

Destilación por arrastre de vapor de agua.

#### **Fundamento:**

Se basa en el hecho de que muchas sustancias, cuyos puntos de ebullición son esencialmente superiores al del agua, se evaporizan por burbujeo de vapor de agua y a continuación, se condensan por enfriamiento junto con el agua<sup>(9, 35)</sup>

#### **Procedimiento:**

- Se colocó los 20 kg de muña fresca (hojas) en el envase de vidrio de material pírrex, resistente a altas temperaturas.
- Posteriormente se calentó, con el equipo generador de vapor llegando a un punto de ebullición de 84° C.
- El vapor atravesó las hojas de la muña que se encontraban en el envase de vidrio.
- El aceite y el agua se separaron de la muña, en vapor saliendo estos por un conducto, el cual se condensa en un sistema de refrigeración, por diferencia de densidades el aceite se separó del agua en una pera de decantación.
- Finalmente para su conservación se colocó en un frasco oscuro a temperatura baja.
- Todo el proceso se realizó en periodo 2 horas y 30 minutos.

### **Aislamiento e identificación de *Cándida albicans*.**

#### **Aislamiento.**

#### **Método:**

Aislamiento en medio selectivo Agar Saboraud Dextrosa (ASD), al 2%, con antibiótico.<sup>(43)</sup>

#### **Fundamento:**

El medio de cultivo que funciona como un medio de enriquecimiento para hongos, al añadirle cloranfenicol se convierte en un medio selectivo, inhibiendo el crecimiento

bacteriano, que a su vez contiene peptonas y una elevada concentración de glucosa que favorece el crecimiento de los hongos sobre bacterias .<sup>(44, 45)</sup>

**Procedimiento:**

- Con un asa de Kolle de punta redonda, se sembró las muestras de esputo en Agar Saboraud Dextrosa al 2%.
- Se incubo a 37° C durante 72 horas.
- Una vez desarrollado las colonias, se procedió a la prueba de identificación.

**Identificación.****Método:**

Prueba del tubo germinativo.<sup>(43)</sup>

**Fundamento:**

Las levaduras de *C. albicans* en contacto con suero sanguíneo humano o de conejo hace reacción en la producción de blastosporos elongados que es característica específica de *C. albicans* durante el lapso de dos horas, lo cual es específico para la identificación en clínica.<sup>(46)</sup>

**Procedimiento:**

- Se suspendió un inóculo de cepa pura de *Cándida* con 24 horas de desarrollo en 0,5 ml de suero humano.
- Se incubo a 37°C por 2 horas.
- Posteriormente se colocó 2 o 3 gotas de la suspensión en una lámina portaobjeto cubriendo con su respectivo cubre objetos.
- Se observó al microscopio con objetivo de 40X.
- Se observó las estructuras elongadas o blastosporos a través del microscopio.
- Una vez confirmada se conservó las cepas puras de *Cándida albicans* en Agar Saboraoud dextrosa al 2% a una temperatura de 5 °C.

### Preparación de concentraciones y controles.

#### Procedimiento:

- Se utilizó micropipetas automáticas de 5 – 50µl; 10 – 200µl y 200 – 1000µl. Y se procedió a la preparación de concentraciones de muña el cual estuvo conformado de la siguiente manera:
  - o 1ml de agua destilada y 25µl de aceite de muña.....(1/25)
  - o 1ml de agua destilada y 50µl de aceite de muña.....(1/50)
  - o 1ml de agua destilada y 100µl de aceite de muña.....(1/100)
  - o 1ml de agua destilada y 150µl de aceite de muña.....(1/150)
  - o 1ml de agua destilada y 200µl de aceite de muña.....(1/200)
  - o 1ml de agua destilada y 250µl de aceite de muña.....(1/250)
- A su vez cada una de estas concentraciones se les considero como tratamientos, (T1, T2, T3, T4, T5 y T6), respectivamente.
- Finalmente se preparó los controles siendo estos los siguientes:
  - o Fluconazol de 150mg en 100ml de agua destilada estéril.
  - o 100ml de agua destilada estéril.
- La preparación de los controles fueron considerados como tratamiento control positivo (TC<sup>+</sup>) y tratamiento control negativo (TC<sup>-</sup>) respectivamente.

#### FASE ANALÍTICA

**Para determinar la concentración inhibitoria adecuada del aceite esencial de muña frente a cepas de *Cándida albicans* en comparación al Fluconazol mediante el método de concentraciones “in vitro”, se realizó los siguientes procedimientos:**

**Siembra de cepas de *Cándida albicans*, (Antibiograma antimicótico).**

**Método:** Kirby - Bauer (método de [difusión](#) en [agar](#)).<sup>(43)</sup>

#### Fundamento:

Es la disminución o inhibición del desarrollo y crecimiento de un microorganismo en un medio de cultivo solido en presencia de diferentes cantidades conocidas de antimicrobianos o compuestos.<sup>(47)</sup>

**Procedimiento:**

- Con la ayuda de hisopos estériles impregnados con el inóculo de cepa de *Cándida albicans*, se sembró en placas preparadas de agar Saboraud dextrosa al 2%, extendiéndolo en forma horizontal y vertical rotando la placa en cada extensión hasta que esté totalmente dispersa y cubierta la superficie de la placa.
- Se realizó el procedimiento repitiendo todo, en cada placa preparada con medio.
- Todo ese procedimiento se realizó para la colocación de los patrones.

**Uso y aplicación de patrones.****Fundamento:**

Consiste en la exposición de cepas en estudio, a diferentes concentraciones de antimicrobianos y observar el crecimiento de los microorganismos para luego definir la concentración inhibitoria adecuada,<sup>(48, 49)</sup> comparando con el control de crecimiento.<sup>(50, 51)</sup>

**Procedimiento:**

- Se colocó cada concentración: 1ml/25 $\mu$ l (T1), 1ml/50 $\mu$ l (T2), 1ml/100 $\mu$ l (T3), 1ml/150 $\mu$ l (T4), 1ml/200 $\mu$ l (T5), 1ml/250 $\mu$ l (T6); respectivamente en cada placa con agar Saboraud dextrosa al 2%, impregnada con cepas de *Cándida albicans* por el método de Kirby Bauer.
- A su vez se añadió el control positivo (Fluconazol de 250mg) y su control negativo (agua destilada estéril) respectivamente, para su comparación.
- Se incubó a 37 °C durante 72 horas, para su posterior lectura e interpretación.

**FASE POST ANALITICA**

**Para evaluar el halo de inhibición de cepas de *Cándida albicans* con el aceite esencial de muña mediante el antibiograma antimicótico, se realizó lo siguiente:**

**Lectura e interpretación de halos de inhibición.**

El diámetro de cada zona de inhibición se midió con una regla milimetrada, para su interpretación de acuerdo al siguiente cuadro estandarizado recomendado por él. Instituto estandarizado de laboratorios clínicos (Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI).

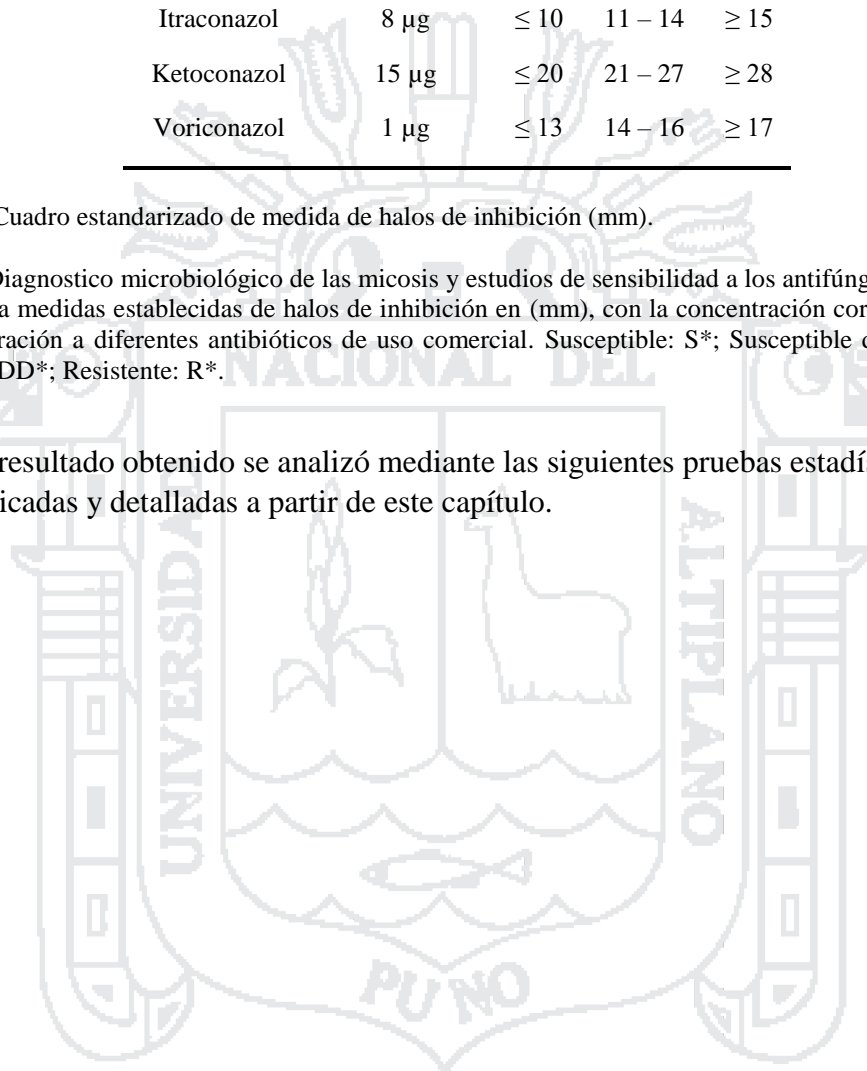
Antifúngico	Concentración	Halo de inhibición (mm)		
		R*	S - DD*	S*
Fluconazol	25 µg	≤ 14	15 – 18	≥ 19
Anfotericina B	10 µg	≤ 10	11 – 14	≥ 15
Itraconazol	8 µg	≤ 10	11 – 14	≥ 15
Ketoconazol	15 µg	≤ 20	21 – 27	≥ 28
Voriconazol	1 µg	≤ 13	14 – 16	≥ 17

**Tabla 1:** Cuadro estandarizado de medida de halos de inhibición (mm).

**Fuente:** Diagnostico microbiológico de las micosis y estudios de sensibilidad a los antifúngicos.<sup>(52)</sup>

Se muestra medidas establecidas de halos de inhibición en (mm), con la concentración correspondiente y en comparación a diferentes antibióticos de uso comercial. Susceptible: S\*; Susceptible dependiente de dosis: S - DD\*; Resistente: R\*.

Todo el resultado obtenido se analizó mediante las siguientes pruebas estadísticas que son explicadas y detalladas a partir de este capítulo.



## MÉTODO ESTADÍSTICO.

Se utilizó el **diseño completo al azar (DCA)** para la determinación del efecto antimicótico del aceite esencial de la muña en las cepas de *Cándida albicans*.

### Diseño Completo Al Azar (DCA).

#### Fundamento:

Los tratamientos son asignados en forma aleatoria a cada unidad experimental, en un diseño balanceado y homogéneo, sin ninguna restricción, por lo tanto se considera que es un diseño eficiente, debido a su simplicidad.<sup>(53)</sup>

#### Características:

- Los tratamientos se distribuyen en forma aleatoria en todas las unidades experimentales, y el número de repeticiones o unidades por tratamientos fue homogénea.
- Este diseño es útil ya que las unidades experimentales tienen una variabilidad uniformemente repartida.
- Proporciona al máximo número de grados de libertad para la estimación del error experimental; además, no requirió estimar datos faltantes, es decir, el diseño puede analizarse con diferentes números de repeticiones por tratamiento.

#### Modelo lineal simple

En este diseño el valor de cada unidad experimental  $Y_{ij}$  se aplica según el siguiente modelo estadístico lineal:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij} \begin{cases} i = 1, 2, 3, \dots, 7, t \\ j = 1, 2, 3, \dots, 15, r \end{cases}$$

**Dónde:**

$Y_{ij}$  = Es la observación en la j-ésima unidad experimental, sujeta a la i-ésima tratamiento.

$\tau_i$  = Es el efecto del i-ésimo tratamiento.

$\mu$  = Es el efecto de la media general o constante común.

$\epsilon_{ij}$  = Efecto verdadero de la j-ésima unida experimental (replica), sujeta al i-ésimo tratamiento (error experimental).

**Hipótesis a probarse son:**

$H_0: \tau_i = 0$  (todos los tratamientos tienen el mismo efecto)

$H_a: \tau_i \neq 0$  (al menos unos de los tratamientos es diferente de los otros).

**Nivel de significación:**

$\alpha = 0.05$ , o

$\alpha = 0.01$

También se realizó **pruebas de comparación múltiple** para determinar la concentración inhibitoria adecuada y la evaluación de los halos de inhibición.

**PRUEBAS DE COMPARACIÓN MÚLTIPLE DE MEDIAS**

De la prueba de F en el análisis de varianza, las conclusiones que se obtienen respecto a la hipótesis planteada de igualdad de medias de tratamientos, es aceptarla o rechazarla a un nivel de significancia dado, comparando entre medias de tratamientos según los objetivos planteados en el experimento,<sup>(54)</sup> el cual se tomó la siguiente prueba:

- Prueba de comparación múltiples de Tukey.<sup>(55)</sup>



**PRUEBA DE COMPARACIÓN MÚLTIPLE DE TUKEY.****Características:**

- Es más riguroso que otras pruebas por tal motivo el nivel de significación debe ser más amplio ya que comparaciones que realmente son significativas esta prueba las puede “declarar” no significativa, el nivel de significación  $\alpha$  se mantiene constante.
- Es más precisa cuando los tratamientos tienen igual número de repeticiones.
- No es necesario ordenar promedios de tratamientos, sin embargo es muy usual en la práctica. Utiliza un solo valor tabular para calcular la ALS (T) (Amplitud Limite Significativa de Tukey).
- Es más exigente y precisa que las pruebas de DLS, Dunnett, Duncan y S-N-K se caracteriza por no tener en cuenta el orden de los promedios de los tratamientos.

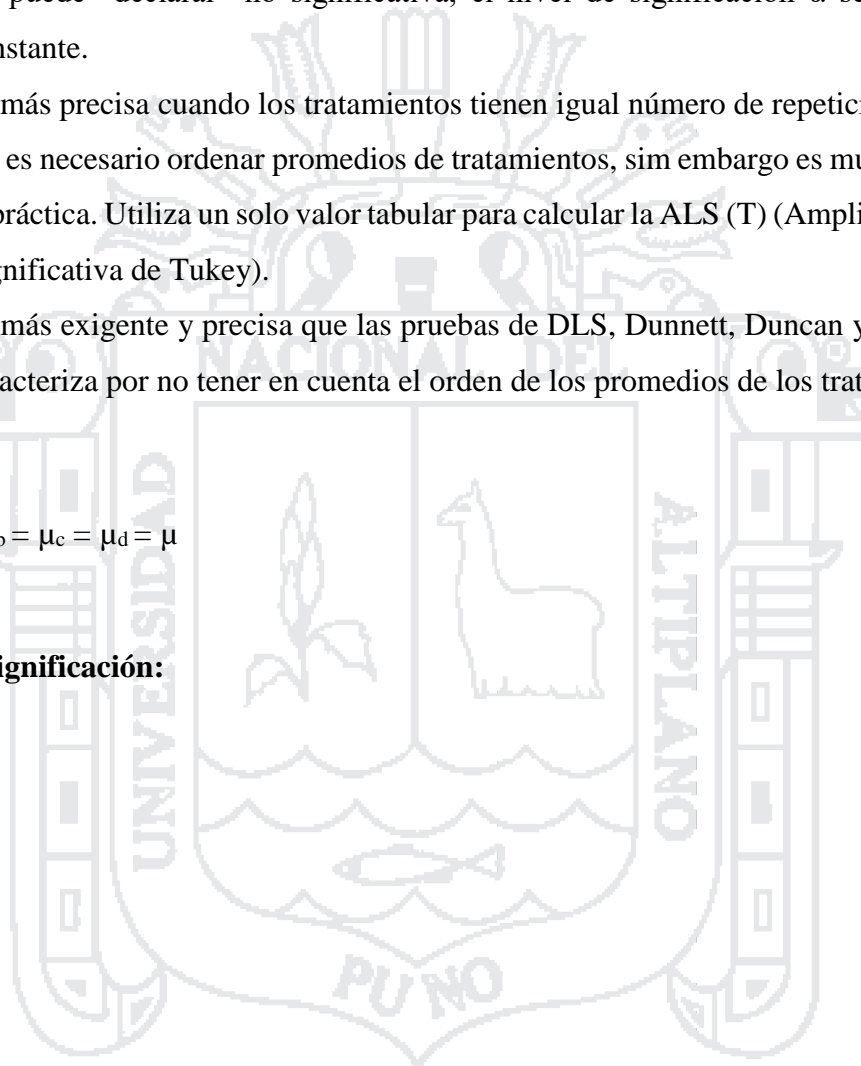
**Hipótesis:**

$$H_0: \mu_a = \mu_b = \mu_c = \mu_d = \mu$$

$$H_a: \mu_i \neq \mu_j$$

**Nivel de significación:**

$$\alpha = 0.05$$



#### IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

##### 4.1. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA ADECUADA DEL ACEITE ESENCIAL DE MUÑA FRENTE A CEPAS DE *Cándida albicans* EN COMPARACION AL FLUCONAZOL MEDIANTE EL MÉTODO DE CONCENTRACIONES “IN VITRO”.

Para determinar la concentración inhibitoria adecuada en comparación al Fluconazol se realizó primero, la prueba de análisis de varianza para determinar la significancia de la prueba y si al menos una de las concentraciones es diferente a los demás; que posteriormente se corroboró con la prueba de contraste de Tukey.

**Tabla 2:** Análisis de varianza (ANVA) para la determinación del efecto antimicótico del aceite esencial de la muña en cepas de *Cándida albicans*.

<i>Análisis de Varianza (ANVA) <math>\alpha = 0.05</math></i>					
<i>Fuente</i>	<i>G.L</i>	<i>S.C</i>	<i>C.M</i>	<i>F-Valor</i>	<i>Pr &gt; F</i>
<i>Modelo</i>	6	7278.15981	1213.026635	1891.57	<.0001
<b>Tratamiento</b>	<b>6</b>	<b>7278.15981</b>	<b>1213.026635</b>	<b>1891.57</b>	<b>&lt;.0001</b>
<i>Error</i>	98	62.845333	0.641279		
<i>Total corregido</i>	104	7341.005143			

**Fuente:** Elaboración propia. Salida SAS Versión: 3.6 (Edición Basic). Versión SAS: 9.04.01 M4P11092016. Nombre del site: UNIVERSITY EDITION 2.49.4M4.

De un total de 6 tratamientos y 15 repeticiones.

El valor de ( $p < .0001$ ) a un  $\alpha = 0.05$ , el cual estadísticamente es altamente significativo. Demuestra que al menos uno de los tratamientos es diferente y posee efecto antimicótico del aceite esencial de muña en las cepas de *Cándida albicans*. (Tabla 2).

Teniendo en cuenta la alta significancia de la prueba de análisis de varianza, se procedió a realizar la prueba de contraste de Tukey para determinar la concentración inhibitoria adecuada en comparación al Fluconazol.

**Tabla 3:** Prueba de comparación múltiple de TUKEY. Comparación de todas las pruebas para la contrastación con mayor rigurosidad.

*Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.  $\alpha = 0.05$*

<i>Tukey Agrupamiento</i>	<i>Media</i>	<i>N</i>	<i>TRAT</i>
<b>A</b>	<b>29.2867</b>	<b>15</b>	<b>T6</b>
<b>B</b>	<b>25.5333</b>	<b>15</b>	<b>TC</b>
C	24.12	15	T5
D	19.0667	15	T4
E	15.76	15	T3
F	11.1133	15	T2
G	3.48	15	T1

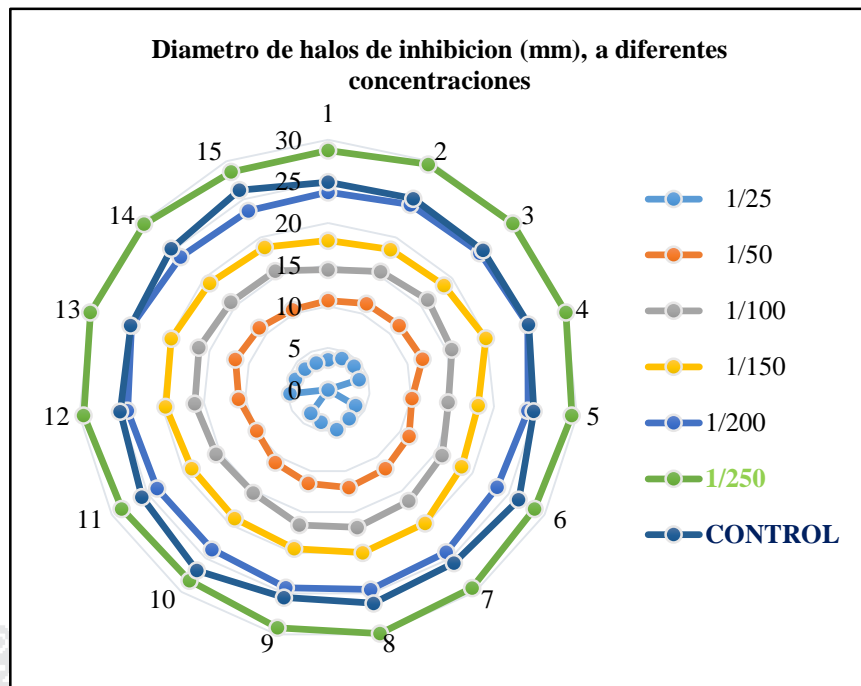
**Fuente:** Elaboración propia. Salida SAS Versión: 3.6 (Edición Basic). Versión SAS: 9.04.01 M4P11092016. Nombre del site: UNIVERSITY EDITION 2.49.4M4.

De un total de 6 repeticiones y 15 tratamientos.

A un  $\alpha = 0.05$ , se determina que la concentración inhibitoria adecuada es de 1ml/250ul (T6) representada por el color amarillo; mostrando una superioridad en cuanto a su media de (29.2867mm), ocupándose en el primer lugar del cuadro muy por encima de los demás tratamientos (T1 con media de 3,48mm); (T2 con media de 11,11mm); (T3 con media de 15,76mm); (T4 con media de 19,06mm); (T5 con media de 24,12mm); y a su vez muy por encima del tratamiento control (TC con una media de 25.53mm), representada por el color rojo. (Tabla 3).

También el cuadro nos demuestra el grado de significancia  $\alpha = 0.05$  demostrándonos que si existe diferencia significativa entre todos los tratamientos, al no mostrarnos la misma letra repetida en diferentes tratamientos, siendo todas estas diferentes y ordenadas de acuerdo a su media en forma descendente (A, B, C, D, E, F, G).

Se obtuvo las medias de los 6 tratamientos (T1, T2, T3, T4, T5), a sus diferentes concentraciones respectivamente, (1ml/25 $\mu$ l, 1ml/50 $\mu$ l, 1ml/100 $\mu$ l, 1ml/150 $\mu$ l, 1ml/200 $\mu$ l, 1ml/250 $\mu$ l), asimismo del control positivo Fluconazol (TC). No se obtuvo halos de inhibición para el grupo de control negativo. La media del halo de inhibición de la concentración de 1ml/250 $\mu$ l (T6); Fue superior que los demás incluso con respecto al Fluconazol, a un  $\alpha = 0.05$ , siendo esta significativo estadísticamente, tal como lo demuestra la prueba de Tukey siendo muy rigurosa.



**Figura 7:** Diámetro de halos de inhibición (mm), a diferentes concentraciones.

**Fuente:** Paquete ofimático (Excel), gráfico de radiales.

Demuestra que la concentración inhibitoria adecuada es de 1ml/250 $\mu$ l (T6), representada por el color verde, en comparación al control positivo Fluconazol (TC) representada por el color azul oscuro, en forma circular y ascendente de acuerdo al punto medio, asemejándolos a los halos de inhibición “in vitro”, obtenidos en la investigación. (Figura 7).

La bibliografía refiere que si existe efecto antimicótico del aceite esencial de la muña en cepas de *Cándida albicans*, a su vez la concentración inhibitoria adecuada varía, mas no deja de mostrar su eficacia tal como lo demuestran y corroboran las siguientes investigaciones:

A una concentración de 100% de muña, la media fue más alta que los demás, haciendo que esta concentración (tratamiento), sea la adecuada, demostrándonos su alta eficacia antifúngica sobre las cepas de *Cándida albicans*.<sup>(6, 20)</sup> Asimismo se demuestra que el diámetro de halo obtenido, es en base a la concentración aplicada entendiéndose que a mayor concentración, mayor el diámetro de halo de inhibición por tanto a una concentración de 100% en comparación a una concentración menor el tratamiento eficaz es el de 100%.<sup>(21)</sup>

Por otro lado también se refiere que a concentraciones de 100% de *Origanum vulgare* (orégano) y *Cymbopogon citratus* (hierba luisa), también existe un efecto inhibitor frente a cepas de *Cándida albicans*.<sup>(22)</sup> Así como lo demuestran también especies del genero *Baccharis*, *Schinus molle*, *Cinnamomun zeylanicum* (canela), *Rosmarinus officinalis* (romero), *Melissa officinalis* (toronjil) (24) y *Matricaria chamomilla* (manzanilla), inhibiendo el crecimiento fúngico y demostrando su alta actividad antifúngica, siendo incluso mejor que los antimicóticos de uso comercial aplicado.<sup>(25-28)</sup>

Finalmente investigaciones demuestran que el aceite esencial de la muña al 100% no solo posee un efecto inhibitor frente a cepas e *Cándida albicans*, sino que también tiene efecto inhibitor frente a bacterias como es *Streptococcus mutans*, y este efecto se incrementa en relación directa con el aumento de la concentración.<sup>(13)</sup>



#### 4.2. EVALUACIÓN DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DE CEPAS DE *Cándida albicans* CON EL ACEITE ESENCIAL DE MUÑA MEDIANTE EL ANTIBIOGRAMA ANTIMICÓTICO.

**Tabla 4:** Datos reales de las diferentes concentraciones, de medidas del diámetro de los halos de inhibición en (mm). Comparando con el control positivo. (6 tratamientos y 15 repeticiones).

Repeticiones	CONCENTRACIONES (TRATAMIENTOS) ml/μl						CONTROL (+)
	1/25	1/50	1/100	1/150	1/200	1/250	
1	3.6	10.7	14.4	17.9	23.7	28.7	24.9
2	4.1	11.3	15.5	18.4	24.3	29.6	25.1
3	4.2	11.5	16.1	18.7	24.5	29.8	25
4	3.9	11.9	15.6	19.9	25.2	30	25.3
5	0	10.1	14.5	18.1	24.1	29.4	24.8
6	3.8	11.2	15.8	18.5	23.4	28.6	26.4
7	4.3	11.7	16.5	19.8	24.1	29.4	25.7
8	4.9	12	16.9	20	24.5	29.9	26.2
9	4	11.5	16.6	19.5	24.3	29.2	25.5
10	3.5	10.8	15.3	19.1	23.7	28.3	26.8
11	0	9.9	15.5	18.9	23.7	28.6	25.8
12	4.6	10.8	16.1	19.6	24.2	29.5	25.1
13	4.1	11.7	16.3	19.8	24.8	30	24.9
14	3.7	11.1	15.7	19.1	23.8	29.7	25.3
15	3.5	10.5	15.6	18.7	23.5	28.6	26.2
<b>Media (promedio)</b>	<b>3.4mm</b>	<b>11.1mm</b>	<b>15.7mm</b>	<b>19.0mm</b>	<b>24.1mm</b>	<b>29.2mm</b>	<b>25.5mm</b>

**Fuente:** Elaboración propia. Salida SAS Versión: 3.6 (Edición Basic). Versión SAS: 9.04.01 M4P11092016. Nombre del site: UNIVERSITY EDITION 2.49.4M4.

De un total de 6 tratamientos y 15 repeticiones.

Datos reales en (mm), obtenidos a partir de la utilización de las diferentes concentraciones; y sus promedios de las medidas de diámetros de los halos de inhibición, a su vez comparando con el control positivo de Fluconazol (TC<sup>+</sup>). (Tabla 4).

Se detallan de la siguiente manera:

- (T1) 1ml/25μl: 3.4mm.
- (T2) 1ml/50μl: 11.1mm.
- (T3) 1ml/100μl: 15.7mm.
- (T4) 1ml/150μl: 19.0mm.
- (T5) 1ml/200μl: 24.1mm.
- (T6) 1ml/250μl: 29.2mm.
- (TC): 25.5mm.

La tabla se acogió a modificaciones, sacando la media (promedio) de todos los datos, ya que para la evaluación e interpretación se necesitó datos fijos o promediados. (Tabla 5).

Se detallan de la siguiente manera:

- (T1) 1ml/25 $\mu$ l: 4mm.
- (T2) 1ml/50 $\mu$ l: 11mm.
- (T3) 1ml/100 $\mu$ l: 16mm.
- (T4) 1ml/150 $\mu$ l: 19mm.
- (T5) 1ml/200 $\mu$ l: 24mm.
- (T6) 1ml/250 $\mu$ l: 29mm.
- (TC<sup>+</sup>): 26mm.

Se realizó todo este procedimiento para poder interpretar cada resultado de acuerdo a lo siguiente. (Tabla 6).

- Resistente (R): < 15
- Intermedio (I): = 15
- Sensible (S): > 15

Esto está estandarizado de acuerdo a tablas ya establecidas de sensibilidad a diferentes antimicrobianos.<sup>(52)</sup>

Se detallan de la siguiente manera:

- (T1) 1ml/25 $\mu$ l: 4mm. (RESISTENTE).
- (T2) 1ml/50 $\mu$ l: 11mm. (RESISTENTE).
- (T3) 1ml/100 $\mu$ l: 16mm. (SENSIBLE).
- (T4) 1ml/150 $\mu$ l: 19mm. (SENSIBLE).
- (T5) 1ml/200 $\mu$ l: 24mm. (SENSIBLE).
- (T6) 1ml/250 $\mu$ l: 29mm. (SENSIBLE).
- (TC): 26mm. (SENSIBLE).

La bibliografía refiere que los datos obtenidos y posteriormente calificados entre resistente, intermedio y sensible, se evalúan de acuerdo a las medidas de los halos obtenidos, corroborados por los siguientes autores indicando que:

Los halos obtenidos mayores a 15 mm de diámetro se les califica como sensibles, y los halos formados menores a este se les atribuye como resistentes. También se menciona que halos superiores a 19 mm de diámetro se les califica como sumamente sensible.<sup>(22)</sup>

La calificación atribuida a los halos de inhibición, de acuerdo a su medida del diámetro del halo nos da una mejor interpretación y por ende una buena evaluación, mostrando halos de 30 mm de diámetro con la aplicación del aceite de muña al 100%, calificándolo como sensible, tal como lo refieren.<sup>(20, 21)</sup> Las investigaciones demuestran que el aceite esencial de muña tiende a ser un antimicótico eficaz, de acuerdo a la concentración suministrada frente a las cepas de *Cándida albicans*, ya sea de cualquier procedencia tal como lo demuestra.<sup>(6)</sup> Formando halos de inhibición de 46 – 48 mm de diámetro, teniendo mayor eficacia frente al Fluconazol.<sup>(6)</sup>

Por otro lado, la aplicación de aceites esenciales de diferentes especies de plantas como *Schinus molle*, *Cinnamomun zeylanicum* (canela) y *Matricaria chamonilla* (manzanilla), muestran una inhibición similar a la de la muña formando halos iguales o mayores a 20mm.<sup>(25, 26, 28)</sup> en comparación al Fluconazol de 31mm.<sup>(26)</sup> Y a la nistatina de 10mm.<sup>(22)</sup>

Finalmente el aceite esencial de muña no solo demuestra ser eficaz frente a la aplicación de *Cándida albicans*, si no también ser eficaz frente a *Aspergillus flavus*, mostrando halos de 15 mm de diámetro, calificándolos estos como intermedio o sensibles.<sup>(29)</sup> Y *Streptococcus mutans*.<sup>(13)</sup>



## V. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en la presente investigación se llegó a las siguientes conclusiones:

1. Existe efecto antimicótico del aceite esencial de la muña en las cepas de *Cándida albicans* a un ( $p < .0001$ ), y un  $\alpha = 0.05$ , siendo esto altamente significativa.
2. Se determinó la concentración inhibitoria adecuada, siendo esta 1ml/250 $\mu$ l (T6), con una media de 29.2867mm, superior en comparación al Fluconazol (TC) con una media de 25.5333mm, y los demás tratamientos, a un  $\alpha = 0.05$ , altamente significativo, con la prueba de comparación múltiple de Tukey.
3. Se evaluó los halos de inhibición obteniendo las medias (promedio), en comparación al Fluconazol: Tratamiento 1(1ml/25 $\mu$ l): 4mm. “Resistente”; Tratamiento 2(1ml/50 $\mu$ l): 11mm. “Resistente”; Tratamiento 3(1ml/100 $\mu$ l): 16mm. “Sensible”; Tratamiento 4(1ml/150 $\mu$ l): 19mm. “Sensible”; Tratamiento 5(1ml/200 $\mu$ l): 24mm. “Sensible”; Tratamiento 6(1ml/250 $\mu$ l): 29mm. “Sensible”; Tratamiento Control: 26mm. “Sensible”.

## VI. RECOMENDACIONES

Realizar investigaciones determinando la actividad antimicótica del aceite esencial de *Minthostachys mollis* “muña”, frente a otros fármacos de interés terapéutico, en el tratamiento de afecciones por causa de *Candidiasis*.

Realizar investigaciones con otros protocolos de aplicación de los aceites de la muña, con una mayor cantidad de ensayos, para determinar la concentración inhibitoria exacta del aceite de muña frente a *Cándida albicans*, así como con otros hongos, bacterias u otros patógenos de importancia clínica.

Finalmente también realizar estudios acerca de diferentes plantas de uso tradicional, para su aplicación en la medicina frente a muchas afecciones.



## VII. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

1. Tobar E, Silva F, Olivares R, Gaete P, Luppi M. Candidiasis invasoras en el paciente crítico adulto. *Revista chilena de infectología*. 2011;28(1):41-9.
2. Lazarde L, Pacheco A. Identificación de especies de *Cándida* en un grupo de pacientes con candidiasis atrófica crónica. *Acta odontol venez*. 2001;39(1):13-8.
3. Urizar JA. Candidiasis orales. *Rev Iberoam Micol*. 2002;19:17-21.
4. Lazarde J, Añez O. Candidiasis Multifocal bucal: Reporte de un caso. *Acta odontológica venezolana*. 2003;41(2):131-4.
5. Giusiano GE, Mangiaterra ML, Deluca G, Usandizaga G. Hongos levaduriformes emergentes y su sensibilidad antifúngica en pacientes pediátricos hospitalizados. *Comunicaciones Científicas y tecnológicas*. 2000.
6. Alcalá-Marcos KM, Alvarado-Gamarra AG, Alejandro-Paredes LA, Huayané-Linares E. Actividad antimicótica del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña) comparado con el Fluconazol en cultivo de *Candida albicans*. *Ciencia e Investigación Medico Estudiantil Latinoamericana*. 2012;16(2).
7. Zegarra G. Actividad Deterrente y Acaricida de Principios Activos de Quinas Amargas, Aceites Esenciales y Tarwi: Tesis para optar el Título de Licenciado en Química. Facultad De Ciencias E Ingeniería. Pontificia Universidad Católica Del Perú. Lima; 2010.
8. Chaquilla-Quilca G, Escalante W, Torres M, Ballinas C, Gastélum F, Nevárez-Moorillón G. Composición química y contenido de fenoles totales en aceites esenciales de muña (*Minthostachys setosa*) Briq Epl y anís (*Pimpinella anisum*) L. *Revista ECIPERÚ*. 2011;8(2):107-11.
9. Muñoz López de Bustamante F. Plantas medicinales y aromáticas: estudio, cultivo y procesado. Mundi-Prensa, 2002 847114624X.
10. Muñoz M, Barrera E, Meza I. El uso medicinal y alimenticio de plantas nativas y naturalizadas en Chile. 2015.
11. Mostacero J, Castillo F, Mejía C, Gamarra T, Charcape R, Ramirez V. Plantas Medicinales del Perú. Taxonomía, Ecogeografía, Fenología y Etnobotánica. Asamblea Nacional de Rectores, Lima. 2011.
12. Mostacero J, Mejía F, Gamarra O. Fanerógamas del Perú: taxonomía, utilidad y ecogeografía. Editora Normas Legales SAC Trujillo. 2009.

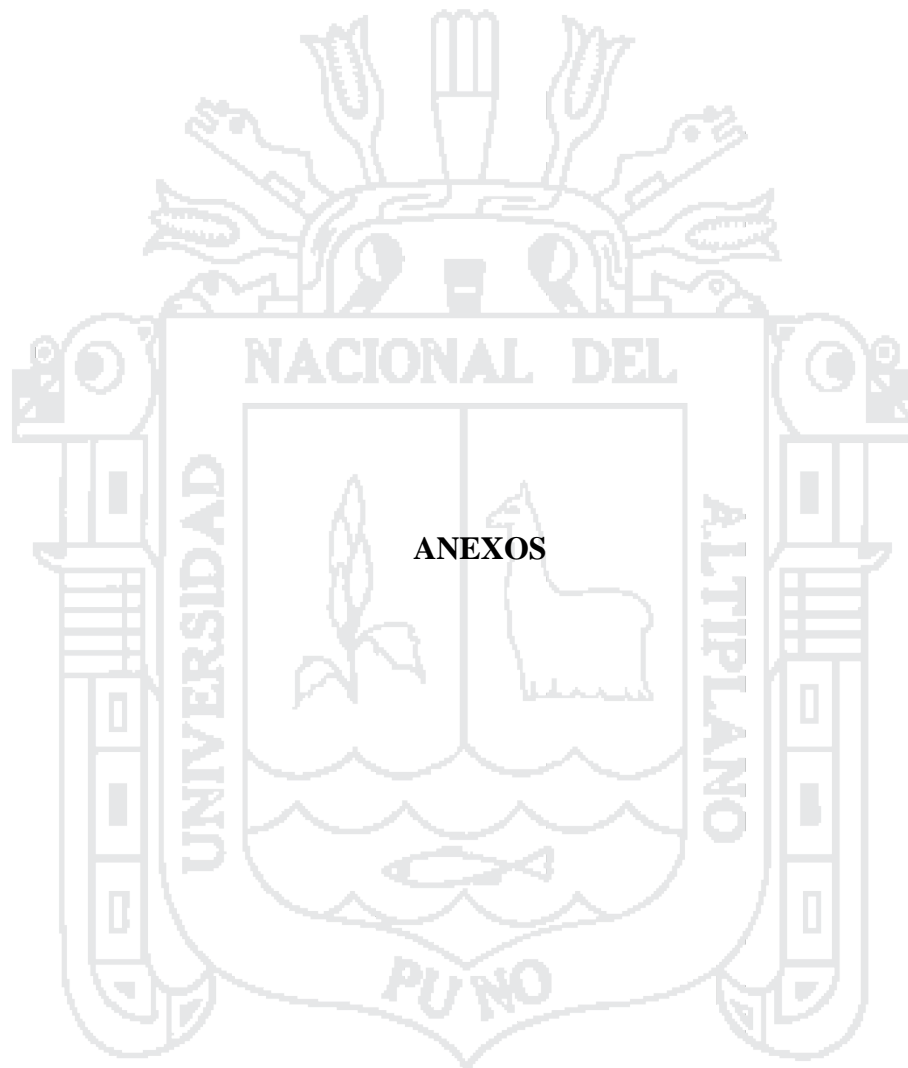
13. Cruzado Donato JL. Concentración inhibitoria mínima “in vitro” del *Minthostachys mollis* (muña) frente al *Streptococcus mutans* ATCC 35668. 2012.
14. Inga A, Guerra B. Efecto del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) contra algunas bacterias y hongos de interés en la salud: Tesis de bachiller para Químico Farmacéutico. Lima: UNMSM; 2000.
15. Güisa D, Rincón L. Estudio del efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Minthostachys mollis* combinado con inactivación térmica, sobre cepas de *Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus*: Tesis de bachiller para Microbiólogo industrial. Bogotá: PUJ; 2007.
16. Hernández-Hernández F, Córdova-Martínez E, Manzano-Gayosso P, López-Alvarez R, Bazán-Mora E, López-Martínez R. Frecuencia de micosis en pacientes inmunosuprimidos de un hospital regional de la Ciudad de México. *Salud publica de Mexico*. 2003;45(6):455-60.
17. Ledesma G, Laconich Romero M, Rodríguez H. Identificación de especies de *Candida* aisladas de pacientes ambulatorios, hospitalizados, e inmunocomprometidos en Paraguay. 2006.
18. Esposto AS. infecciones oportunistas en pacientes adultos inmunocomprometidos no VIH.
19. de Bedout C, Ayabaca J, Vega R, Méndez M, Santiago AR, Pabón ML, et al. Evaluación de la susceptibilidad de especies de *Candida* al fluconazol por el método de difusión de disco. *Biomédica*. 2003;23(1):31-7.
20. Cano C, Bonilla P, Roque M, Ruiz J. Actividad antimicótica in vitro y metabolitos del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña). *Revista peruana de medicina experimental y salud pública*. 2008;25(3):298-301.
21. Cano C. Actividad antimicótica in vitro y elucidación estructural del aceite de las hojas de *Minthostachys mollis* “muña”: Tesis para optar el grado de Magister en Recursos Vegetales y terapéuticos de la Facultad de Farmacia y Bioquímica-Lima: UNMSM; 2007.
22. Pascal C, Maritsa L. Efecto antifúngico del aceite esencial del *origanum vulgare* (orégano) y *cymbopogon citratus* (hierba luisa), sobre cepas de *Candida albicans* en comparación con la nistatina estudio invitro. 2015.
23. De La Cruz León ME. Actividad antimicótica del extracto etanólico de propoleo sobre el crecimiento in vitro de *Candida albicans*. 2013.

24. Márquez R, Greisy C. Actividad antifúngica de *Rosmarinus officinalis* (romero) y *Melissa officinalis* (toronjil) contra especies del género *Candida*, aisladas de pacientes con vulvovaginitis. 2012.
25. Marca Cuello MR. Actividad Antimicótica “in vitro” del Aceite Esencial *Cinnamomum zeylanicum* Breyn “canela” Frente a *Cándida albicans* ATCC 6538, Tacna, 2012 2013.
26. Saravia-León N. Actividad antifúngica del extracto de etanol *schinus molle* y el fluconazol sobre *candida albicans*. *Revista Kiru*. 2015;9(1).
27. Martínez<sup>1</sup> S, Mollinedo<sup>1</sup> P, Almanza G, Terrazas E. Estudio in vitro de la actividad antifúngica de extractos vegetales del género *Baccharis* sobre *Candida albicans*. *Revista Boliviana de Química*. 2011;28(1):35-40.
28. Castillo. Efecto del aceite esencial de *Matricaria chamomilla* (manzanilla) sobre *Cándida albicans*.: Universidad Nacional del Altiplano. Facultad de Ciencias Biologicas.; 2009.
29. Vásquez CP. Efecto del aceite esencial de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y su combinación sobre la acción antifúngica en *Aspergillus flavus* en agar chicha de maíz (*Zea mays* L.), variedad morado. *Revista Oficial de la Universidad Privada Antenor Orrego*.123.
30. Barnes J, Anderson LA, Phillipson JD, Ódena MÁM. *Plantas medicinales: guía para los profesionales de la salud*: Pharma; 2005.
31. Bruneton J. *Farmacognosia: fitoquímica, plantas medicinales*. 2001.
32. Huamantupa I, Cuba M, Urrunaga R, Paz E, Ananya N, Callalli M, et al. Riqueza, uso y origen de plantas medicinales expandidas en los mercados de la ciudad del Cusco. *Revista Peruana de Biología*. 2011;18(3):283-92.
33. Castro NPP, Verbel JTO. *Química verde: un nuevo reto green chemistry: a new challenge*. Scielo; 2011.
34. Araneda X, Quilamán E, Martínez M, Morales D. Elaboración y evaluación de jugo de maqui (*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz) por arrastre de vapor. *Scientia Agropecuaria*. 2014;5(3):149-56.
35. Ocampo R, Ríos LA, Betancur LA, Ocampo DM. *Curso práctico de química orgánica. Enfocado a biología y alimentos*: Universidad de Caldas; 2008.
36. Prescott LMH, Klein JP, Prescott DALM, Harley JP, Klein DA. *Microbiología*: McGraw-Hill; 2004.

37. Brooks G, Jawetz, Melnick y Adelberg: microbiología médica (25a: McGraw Hill Mexico; 2011.
38. Arenas R. Micología médica ilustrada 2003.
39. Murray P, Rosenthal K, Kobayashi G, Pfaller M. Microbiología Médica. 4ta. Edición Madrid, España: Editorial Mosby. 2002.
40. Durán MT, Velasco D, Canle D, Moure R, Villanueva R. Susceptibilidad antifúngica de aislados de *Candida* spp. de hemocultivos en un periodo de cinco años (1997-2001). Enfermedades infecciosas y microbiología clínica. 2003;21(9):488-92.
41. Ryan K, Ray G, Ahmad N, Drew L, Plorde J. Microbiología Médica Sherris. México: Editorial McGrawHill Interamericana; 2011.
42. Camasca Vargas A. Estudio de la demanda y estimación del valor cultural y económico de plantas medicinales comercializadas en la ciudad de Ayacucho. 2012.
43. INS M-. Manual de procedimientos y técnicas de laboratorio para la identificación de los principales hongos oportunistas causantes de micosis humanas. 44, editor: Fimart S.A.C; 2007.
44. Arechavala AI, Bianchi MH, Robles AM, Santiso G, Negroni R. Identificación y sensibilidad frente a fluconazol y albaconazol de 100 cepas de levaduras aisladas de flujo vaginal. Revista Iberoamericana de Micología. 2007;24(4):305-8.
45. MINSA. Manual de procedimientos y técnicas de laboratorio para la identificación de los principales hongos oportunistas causantes de micosis humanas. Medicina y laboratorio. 2010;16.
46. Koneman EW, Allen S. Koneman. Diagnóstico Microbiológico/Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/Text and Color Atlas: Ed. Médica Panamericana; 2008.
47. Cercenado E, Saavedra J. El antibiograma. Interpretación del antibiograma, conceptos generales (I). Anales de Pediatría Continuada. 2009;7(4):1.
48. Picazo J. Procedimientos en Microbiología Clínica. Seguridad en el Laboratorio de Microbiología Clínica. 2000.
49. INS. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco de difusión. Organismo Público Descentralizado de Sector Salud. 2002;30.
50. Rodríguez-Angeles G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. salud pública de México. 2002;44(5):464-75.

51. Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of antimicrobial Chemotherapy*. 2001;48(suppl 1):5-16.
52. Gironés IG. *Procedimientos en Microbiología Clínica, diagnóstico microbiológico de las micosis y estudio de sensibilidad a antifúngicos*. 7, editor: EIMC; 2006.
53. Pulido HG, De la Vara Salazar R, González PG, Martínez CT, Pérez MdCT. *Análisis y diseño de experimentos*: McGraw-Hill Interamericana; 2012.
54. Vladimiro IQ. *Análisis y diseño de experimentos*. Editorial Universitaria. 2009;1.
55. Montgomery DC, Bermúdez Rojas T, Walker H, Maisel L, Arley NB, Maddala G, et al. *Probabilidad y estadística aplicadas a la ingeniería* Applied statistics and probability for engineers: CATIE, Turrialba (Costa Rica); 2006.







ANEXO 1

**Figura 9:** Muña (*Minthostachys mollis*).



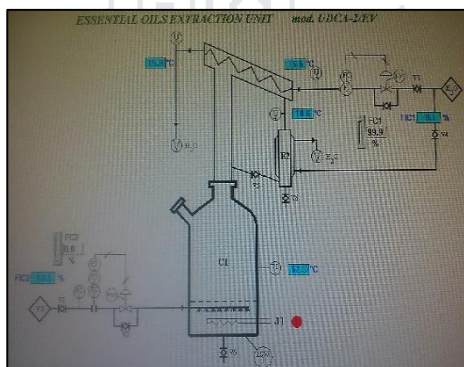
Fuente: Fotografía propia.

**Figura 8:** Proceso de extracción del aceite de muña.



Fuente: Fotografía propia.

**Figura 11:** Esquema de software de extracción de aceites.



Fuente: Fotografía propia.

**Figura 10:** Siembra de esputo con Tuberculosis.



Fuente: Fotografía propia.

**Figura 13:** Cepas aisladas de *Cándida albicans*.



Fuente: Fotografía propia.

**Figura 12:** Plaqueo de medios selectivos con agar Sabouraud destrosa al 2%.



Fuente: Fotografía propia.

**Figura 15:** Concentraciones (1/25, 1/50, 1/100, 1/150, 1/200, 1/250).



Fuente: Fotografía propia.

**Figura 14:** Medios, concentraciones y demás materiales para procesamiento.



Fuente: Fotografía propia.

**Figura 17:** Medios selectivos de agar Saboraud dextrosa al 2% para



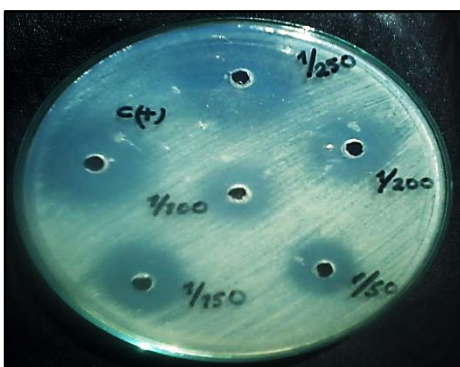
Fuente: Fotografía propia.

**Figura 16:** Halos de inhibición de control positivo y negativo.



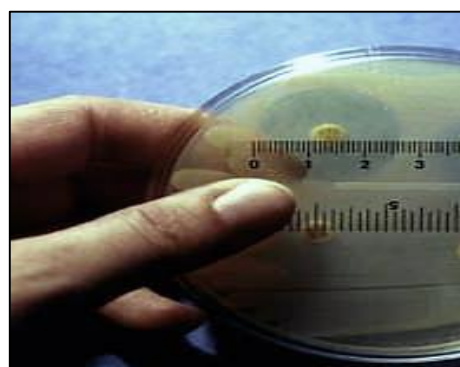
Fuente: Fotografía propia.

**Figura 19:** Halos de inhibición a diferentes concentraciones.



Fuente: Fotografía propia.

**Figura 18:** Medidas de halos de inhibición.



Fuente: Fotografía propia.

ANEXO 2

**Tabla 5:** Datos redondeados de las diferentes concentraciones, de medidas del diámetro de los halos de inhibición en (mm). Comparando con el control positivo. (6 tratamientos y 15 repeticiones).

CONCENTRACIONES (TRATAMIENTOS) ml/μl							
Repeticiones	1/25	1/50	1/100	1/150	1/200	1/250	CONTROL (+)
1	4	11	14	18	24	29	25
2	4	11	16	18	24	30	25
3	4	12	16	19	25	30	25
4	4	12	16	20	25	30	25
5	0	10	15	18	24	29	25
6	4	11	16	19	23	29	26
7	4	12	17	20	24	29	26
8	5	12	17	20	25	30	26
9	4	12	17	20	24	29	26
10	4	11	15	19	24	28	27
11	0	10	16	19	24	29	26
12	5	11	16	20	24	30	25
13	4	12	16	20	25	30	25
14	4	11	16	19	24	30	25
15	4	11	16	19	24	29	26
<b>Media (promedio)</b>	<b>4mm</b>	<b>11mm</b>	<b>16mm</b>	<b>19mm</b>	<b>24mm</b>	<b>29mm</b>	<b>26mm</b>

**Fuente:** Elaboración propia. Salida SAS Versión: 3.6 (Edición Basic). Versión SAS: 9.04.01 M4P11092016. Nombre del site: UNIVERSITY EDITION 2.49.4M4.

**Tabla 6:** Datos redondeados de las diferentes concentraciones, de medidas del diámetro de los halos de inhibición en (mm). Interpretado entre resistente, intermedio y sensible.

CONCENTRACIONES (TRATAMIENTOS) ml/μl							
Repeticiones	1/25	1/50	1/100	1/150	1/200	1/250	CONTROL (+)
1	R	R	R	S	S	S	S
2	R	R	S	S	S	S	S
3	R	R	S	S	S	S	S
4	R	R	S	S	S	S	S
5	R	R	I	S	S	S	S
6	R	R	S	S	S	S	S
7	R	R	S	S	S	S	S
8	R	R	S	S	S	S	S
9	R	R	S	S	S	S	S
10	R	R	I	S	S	S	S
11	R	R	S	S	S	S	S
12	R	R	S	S	S	S	S
13	R	R	S	S	S	S	S
14	R	R	S	S	S	S	S
15	R	R	S	S	S	S	S

*Fuente: Elaboración Propia. (Salida Paquete Ofimático Excel.)*

## ANEXO 3

Información sobre SAS estudio.



**Versión: 3.6 (Edición Basic)**

**Navegadores compatibles:**

- Microsoft Internet Explorer 9, 10, 11
- Mozilla Firefox 21+
- Google Chrome 27+
- Apple Safari 6.0+ (con Apple OS X)

**Fecha de desarrollo:** 10/11/2016 2:33:12

**Versión SAS Mid-tier:** 2/11/2016 19:00:00

**Versión Java:** 1.7.0\_111

**Versión SAS:** 9.04.01M4P11092016

**Plataforma SAS:** Linux LIN X64 2.6.32-642.6.2.el6.x86\_64

**Nombre del site:** UNIVERSITY EDITION 2.4 9.4M4

**Número de site:** 70208402

**Copyright © 2012-2016, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.**

### NOTAS LEGALES

Copyright © 2012-2016, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. All Rights Reserved. This software is protected by copyright laws and international treaties.

U.S. GOVERNMENT RESTRICTED RIGHTS Use, duplication, or disclosure of this software and related documentation by the United States government is subject to the license terms of the Agreement with SAS Institute Inc. pursuant to, as applicable, FAR 12.212, DFAR 227.7202-1(a), DFAR 227.7202-3(a) and DFAR 227.7202-4 and, to the extent required under United States federal law, the minimum restricted rights as set out in FAR 52.227-19 (DEC 2007).

### Third Party Notice

Copyright © 2005-2012, The Dojo Foundation All rights reserved.

Redistribution and use in source and binary forms, with or without modification, are permitted provided that the following conditions are met:

- Redistributions of source code must retain the above copyright notice, this list of conditions and the following disclaimer.
- Redistributions in binary form must reproduce the above copyright notice, this list of conditions and the following disclaimer in the documentation and/or other materials provided with the distribution.

- Neither the name of the Dojo Foundation nor the names of its contributors may be used to endorse or promote products derived from this software without specific prior written permission.

THIS SOFTWARE IS PROVIDED BY THE COPYRIGHT HOLDERS AND CONTRIBUTORS "AS IS" AND ANY EXPRESS OR IMPLIED WARRANTIES, INCLUDING, BUT NOT LIMITED TO, THE IMPLIED WARRANTIES OF MERCHANTABILITY AND FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE ARE DISCLAIMED.

IN NO EVENT SHALL THE COPYRIGHT OWNER OR CONTRIBUTORS BE LIABLE FOR ANY DIRECT, INDIRECT, INCIDENTAL, SPECIAL, EXEMPLARY, OR CONSEQUENTIAL DAMAGES (INCLUDING, BUT NOT LIMITED TO, PROCUREMENT OF SUBSTITUTE GOODS OR SERVICES; LOSS OF USE, DATA, OR PROFITS; OR BUSINESS INTERRUPTION) HOWEVER CAUSED AND ON ANY THEORY OF LIABILITY, WHETHER IN CONTRACT, STRICT LIABILITY, OR TORT (INCLUDING NEGLIGENCE OR OTHERWISE) ARISING IN ANY WAY OUT OF THE USE OF THIS SOFTWARE, EVEN IF ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGE.

Código:

DATA ANTIMICOTICO;	T3 R4 15.7	TC R2 25.1
OPTIONS NODATE NOCENTER	T3 R5 15.6	TC R3 25
NONUMBER;	T4 R1 17.9	TC R4 25.3
INPUT TRAT \$ REP \$ RDTO;	T4 R2 18.4	TC R5 24.8
DATALINES;	T4 R3 18.7	TC R1 26.4
T1 R1 3.6	T4 R4 19.9	TC R2 25.7
T1 R2 4.1	T4 R5 18.1	TC R3 26.2
T1 R3 4.2	T4 R1 18.5	TC R4 25.5
T1 R4 3.9	T4 R2 19.8	TC R5 26.8
T1 R5 0	T4 R3 20	TC R1 25.8
T1 R1 3.8	T4 R4 19.5	TC R2 25.1
T1 R2 4.3	T4 R5 19.1	TC R3 24.9
T1 R3 4.9	T4 R1 18.9	TC R4 25.3
T1 R4 4	T4 R2 19.6	TC R5 26.2
T1 R5 3.5	T4 R3 19.8	:
T1 R1 0	T4 R4 19.1	PROC PRINT; RUN;
T1 R2 4.6	T4 R5 18.7	PROC GLM;
T1 R3 4.1	T5 R1 23.7	CLASS TRAT;
T1 R4 3.7	T5 R2 24.3	MODEL RDTO = TRAT;
T1 R5 3.5	T5 R3 24.5	MEANS TRAT / TUKEY;
T2 R1 10.7	T5 R4 25.2	RUN.
T2 R2 11.3	T5 R5 24.1	
T2 R3 11.5	T5 R1 23.4	
T2 R4 11.9	T5 R2 24.1	
T2 R5 10.1	T5 R3 24.5	
T2 R1 11.2	T5 R4 24.3	
T2 R2 11.7	T5 R5 23.7	
T2 R3 12	T5 R1 23.7	
T2 R4 11.5	T5 R2 24.2	
T2 R5 10.8	T5 R3 24.8	
T2 R1 9.9	T5 R4 23.8	
T2 R2 10.8	T5 R5 23.5	
T2 R3 11.7	T6 R1 28.7	
T2 R4 11.1	T6 R2 29.6	
T2 R5 10.5	T6 R3 29.8	
T3 R1 14.4	T6 R4 30	
T3 R2 15.5	T6 R5 29.4	
T3 R3 16.1	T6 R1 28.6	
T3 R4 15.6	T6 R2 29.4	
T3 R5 14.5	T6 R3 29.9	
T3 R1 15.8	T6 R4 29.2	
T3 R2 16.5	T6 R5 28.3	
T3 R3 16.9	T6 R1 28.6	
T3 R4 16.6	T6 R2 29.5	
T3 R5 15.3	T6 R3 30	
T3 R1 15.5	T6 R4 29.7	
T3 R2 16.1	T6 R5 28.6	
T3 R3 16.3	TC R1 24.9	

