



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA

**Eficacia fungicida in vitro del extracto hidroetanólico de corteza
Juglans neotropica comparado con fluconazol en cepa de
Candida albicans.**

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

Médico Cirujano

AUTORA:

Díaz Callo, Blanca Wendyth (ORCID: 0000-0002-2857-6488)

ASESORES:

Dra. Chian García, Ana María (ORCID: 0000-0003-0907-5482)

Mg. Polo Gamboa, Jaime Abelardo (ORCID: 0000-0002-3768-8051)

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

Enfermedades Infecciosas y Transmisibles

TRUJILLO - PERÚ

2020

DEDICATORIA

Ofrezco este estudio muy especialmente a mi madre la Sra. LUSMILA MARGOT CALLO PAYÉ, (heroína de la salud) todo el esfuerzo que representa mi tesis, es la persona a quien admiro porque con sus enseñanzas y ejemplo, supo prepararme para la vida. Lamentablemente tuvo que partir a la casa del Padre Dios, dejándome las enseñanzas para continuar triunfando.

Para ti MADRE QUERIDA con mucho amor.

AGRADECIMIENTO

Gracias a Dios por permitirme tener a José Walter Ortíz Barboza y a mi familia , quienes me apoyaron en mis decisiones para este proyecto, gracias a la vida por permitirme disfrutarla, aprender cada día y conocer que siempre hay algo nuevo cada amanecer, por cada una de las personas que aportaron para lograr este momento.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Dedicatoria.....	ii
Agradecimiento	iii
Índice	iv
Índice de Tablas.....	v
Índice de Figuras	vi
Resumen	vii
Abstract.....	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO.....	4
III. METODOLOGÍA.....	10
3.1. Tipo y diseño de investigación:	10
3.2. Variable y Operacionalización	10
3.3. Población, muestra, muestreo, unidad de análisis.	11
3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos	11
3.5. Procedimientos.....	11
3.6. Método de análisis de datos	12
3.7. Aspectos éticos	12
IV. RESULTADOS	13
V. DISCUSION	17
VI. CONCLUSIONES.....	20
VII. RECOMENDACIONES	21
REFERENCIAS	22
ANEXOS.....	27

Índice de Tablas

Tabla 1. <i>Análisis descriptivo de los halos de inhibición de la Eficacia fungicida del extracto hidroetanólico de corteza Juglans neotropica (en mm)</i>	13
Tabla 2. <i>Análisis descriptivo de los halos de inhibición de la Eficacia del fluconazol en cepa de Candida albicans (en mm)</i>	14
Tabla 3. <i>Análisis factorial de los halos de inhibición de la Eficacia fungicida del extracto hidroetanólico de corteza Juglans neotropica comparado con fluconazol en cepa de Candida albicans (en mm)</i>	15
Tabla 4. <i>Análisis Post ANOVA de los halos de inhibición de la Eficacia fungicida del extracto hidroetanólico de corteza Juglans neotropica comparado con fluconazol en cepa de Candida albicans (en mm)</i>	16

Índice de Figuras

FIGURA 1.- Distribución de la Mediana de los halos de inhibición, de la Eficacia fungicida del extracto hidroetanólico de corteza <i>Juglans neotropica</i> comparado con fluconazol en cepa de <i>Candida albicans</i>	16
FIGURA 2.- Validación de la planta <i>Juglans neotropica</i>	41

RESUMEN

El objetivo de la investigación es determinar la eficacia fungicida in vitro del extracto hidroetanólico de corteza *Juglans neotropica* sobre *Candida albicans* comparado con fluconazol, para lo cual se realizó una investigación de diseño experimental con posprueba, obteniéndose el extracto hidroetanólico, mediante el método de maceración, para luego utilizar soluciones en proporciones de 50%, 75% y 100% en la misma que se determinó la eficacia fungicida mediante el método de difusión de discos de Kirby y Bauer. Entre las conclusiones se obtuvo que el extracto hidroetanólico de corteza de *Juglans neotropica* sobre cepas de la *Candida albicans* presenta eficacia fungicida a las concentraciones de 50%, 75% y 100%, siendo la del 100% donde se obtiene mayor actividad fungicida; el fluconazol presenta una eficacia media de 31.7 con una desviación estándar de 1.83 sobre la *Candida albicans* in vitro; el extracto hidroetanólico de corteza *Juglans neotropica* en una concentración al 100% tiene una eficacia fungicida similar al fluconazol en cepa de *Candida albicans* in vitro, por lo tanto debe tenerse en cuenta como alternativa terapéutica.

Palabras clave: Extracto hidroetanólico, *Juglans neotropica*, *Cándida albicans*

ABSTRACT

The objective of the research is to determine the fungicidal efficacy in vitro of the hydroethanolic extract of *Juglans neotropica* bark on *Candida albicans* compared to Fluconazole, carrying out an investigation of experimental design, with post-test, obtaining the hydroethanolic extract, by means of the maceration method, and then use solutions in proportions of 50%, 75% and 100% determining the fungicidal efficacy by means of the Kirby and Bauer disc diffusion method. Among the conclusions, it was obtained that the hydroethanolic extract of *Juglans neotropica* bark on strains of *Candida albicans* presents fungicidal efficacy at concentrations of 50%, 75% and 100%, being 100% where the highest fungicidal activity is obtained; fluconazole has a mean efficacy of 31.7 with a standard deviation of 1.83 over *Candida albicans* in vitro; The hydroethanolic extract of *Juglans neotropica* bark in a 100% concentration has a fungicidal efficacy similar to Fluconazole in the *Candida albicans* strain in vitro, therefore it should be considered as a therapeutic alternative.

Keywords: Hydroethanolic extract, *Juglans neotropica*, *Candida albicans*

I. INTRODUCCIÓN

En cuanto a la medicina folclórica, alternativa o tradicional la Organización Mundial de la Salud plantea que dicha medicina resulta segura, eficaz y de calidad, influye en la accesibilidad a la atención primaria en el sistema sanitario. Para millones de individuos en el mundo, el tratamiento basado en el uso de hierbas y medicina tradicional constituye muchas veces la fuente principal de atención sanitaria, debido a que culturalmente se acepta y tienen la confianza de un sector importante de la población.^{1, 2}

Uno de los árboles que es usado en la medicina tradicional peruana es el *Juglans neotropica*, reconocida por sus diversos efectos beneficiosos sobre la salud. Su corteza y hojas usadas mediante extractos, decocción e infusión ayudan en la terapia hipoglucemiante de diabetes mellitus; en el tratamiento de infecciones bacterianas, y algunas antimicóticas, entre otros efectos.³

Desde hace cinco décadas se viene evidenciando una elevación de procesos infecciosos ocasionadas por hongos, entre las infecciones fúngicas la candidiasis se sitúa cerca del 20 %, la cual se deben a factores asociadas al huésped, comorbilidades, resistencia de los antifúngicos, donde los pacientes con VIH/SIDA, representan un grupo proclive de presentar infección fungoide.⁴

A inicios del año 2017 se publicó que la incidencia anualizada de enfermedades ocasionadas por hongos, ha incrementado de tres hasta veinte veces su frecuencia en las últimas 4 décadas. Estas infecciones ocasionadas por hongos oportunistas son de tipo nosocomial siendo *Candida albicans* el causante de sepsis en el 10 % al 15 % incrementado en dos veces la probabilidad de mortalidad. Entre las condiciones que se asociaron con una mayor probabilidad de candidemia en varios hospitales del Ministerio de Salud se describieron la cirugía 39 %, la ventilación asistida 38 % y nutrición por vía parenteral con 36 %.^{5, 6}

En función a lo explicado se plantea el problema de investigación: ¿Cuál es la eficacia fungicida in vitro del extracto hidroetanólico de corteza de *Juglans neotropica* comparado con fluconazol en cepas de *Candida albicans*?

En el Perú culturalmente la medicina alternativa y tradicional, constituyen una forma de abordaje de los problemas de salud por su practicidad y costo económico. De allí la necesidad de evaluar la utilidad del uso de la corteza de *Juglans neotropica* como agente antifúngico específicamente con la *Candida albicans*.

Las conclusiones que se obtengan permitirán clarificar si el extracto de naturaleza hidroetanólica de la corteza de *Juglans neotropica*, puede ser usado en el tratamiento de la candidiasis de manera que exista la posibilidad de aplicarlo en el tratamiento de dicho hongo.

El objetivo general planteado es determinar la eficacia fungicida in vitro del extracto hidroetanólico de la corteza de *Juglans neotropica* al comparar con fluconazol en cepas de *Candida albicans*.

Y se planteó los siguientes objetivos específicos: Establecer el efecto del extracto hidroetanólico de corteza de *Juglans neotropica* sobre cepas de la *Candida albicans* según su concentración in vitro de 50%, 75% y 100%. Establecer el efecto que ocasiona el fluconazol sobre las cepas de la *Candida albicans* in vitro. Comparar el efecto in vitro del compuesto extracto hidroetanólico obtenido de la corteza de *Juglans neotropica* según su concentración de 50%, 75% y 100% con fluconazol en las cepas de la *Candida albicans*.

Ante el problema planteado se estableció la siguiente hipótesis: Hi.- El extracto hidroetanólico obtenido de la corteza de *Juglans neotropica* tiene igual o mayor eficacia fungicida que el fluconazol como antifúngico en cepas de *Candida albicans* in vitro. Mientras que la Ho.- El extracto hidroetanólico

de la corteza de *Juglans neotropica* tiene menor eficacia fungicida que el fluconazol como antifúngico en cepas de *Candida albicans* in vitro

II. MARCO TEÓRICO

Entre los trabajos previos se ha considerado los que se detallan a continuación:

Cañar et al⁷ (Ecuador, 2017), realizaron la determinación de la actividad de extractos de vegetales con propiedades germicidas y antifungoide en el que se incluyó al *Juglans neotropica* contra la *Candida albicans*. Se halló que el fluconazol en concentraciones que estuvieron entre 0.5 y 64 µg/ml, demostraron que no hubo variación en su actividad, obteniéndose mediciones con un valor de p que fluctuó entre 0.05 hasta 0,367. Así mismo el extracto hidroetanólico del *Juglans neotropica* mostro actividad antifúngica efectiva contra la *Candida albicans*, a una concentración de 128 microgramos/ml.

Sytykiewicz et al⁸ (Polonia, 20215), evaluaron el potencial antifúngico de cuatro tipos de extracto derivados de *Juglans* (metanol, acetato de etilo, alcaloide y metanol esferentado hidrolónico) contra cepas patógenas de *Candida albicans*. Se estudiaron 140 muestras de orofarínge, recto, lesiones cutáneas, esputo, orina, heces, y una cepa de referencia (*C. albicans* ATCC 90029). En cuanto al componente extracto metanólico obtenido a partir de las hojas del nogal tuvo una acción anticándidiasica más alta, mientras que la fracción de alcaloides, como el acetato de etilo y preparados metanólicos hidrolizados inhibieron la tasa de crecimiento de los patógenos fúngicos examinados en el grado más bajo. Además, el grupo de antimicóticos azoles se caracterizó por tener una menor eficacia contra la *Candida albicans*.

Huaracha⁹, (Perú, 2019), evaluó los halos inhibitorios del desarrollo de la *Candida albicans* tras la aplicación de fluconazol para lo cual usaron las recomendaciones de la Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI). En el cual a una concentración de 25 microgramos el punto de corte de la sensibilidad fue ≥ 19 , susceptible depende de la dosis 15 a 18 mm y resistente menor o igual a 14mm. Hallaron que la inhibición del fluconazol

tuvo un valor mínimo de 25.7 mm y máximo de 25.78mm, con media de 26.1 mm.

Bardales et al¹⁰ (Perú, 2017), estudiaron el uso antifúngico de las infusiones de *Juglans neotropica Diels* sobre la *Candida albicans* (ATCC10231) en el 2017; en prótesis dental. Prepararon tres concentraciones de 10%, 20% y 30% usándose como control la solución de clorhexidina al 0,12%. Midieron su efecto en el tiempo: 10, 20, 30, 60 y 480 minutos. Apreciaron que las diversas concentraciones de la infusión de *Juglans neotropica Diels* tuvo acción anti fúngica a partir de los 60 minutos de exposición, Concluyeron que para lograr una actividad contra la *Candida albicans* debe aplicarse *Juglans neotropica Diels* bajo la forma de infusión en cepas de cultivo de *Candida albicans* en vidrio como mínimo una hora.

Bustamante¹¹ (Perú, 2016), demostró la actividad antifúngica en vidrio de la corteza de *Juglans neotropica Diels* bajo la forma de extracto etanólico frente a la Candidiasis. Se conformaron con dos grupos, uno con la administración de fluconazol y el extracto etanólico al 10%, 50% y 100%, Los resultados demostraron que el grupo del extracto tuvo una actividad anticandidiasis obteniendo halo de inhibición según la concentración: 33 mm para el 100 %; 27 mm para el 50 % y 24 mm para el 10 %, mientras que el grupo con fluconazol se llegó a obtener un halo de inhibición de: 30 mm para el 100%; 26 mm para el 50% y 16 mm para el 10%, y Se halló una diferencia significativa entre ambos grupos, donde la corteza que se obtiene de *Juglans neotropica Diels* bajo la forma de extracto etanólico fue mayor al fluconazol.

Huamaní et al¹² (Perú, 2015), en su investigación plantearon establecer la actividad antifúngica de 10 plantas peruanas entre las que se halló la *Juglans neotropica Diels*. Obtuvieron el siguiente resultado: El extracto etanólico obtenido a partir de la corteza de la *Juglans neotropica Diels* presentó un halo inhibitorio de 24mm y una CMI 250 microgramos/ml en las placas con *Candida albicans* ATCC 10231, mientras las placas con *Candida albicans* de cepa clínica obtuvieron un halo de 17mm, el análisis indicó que

la presencia de componentes fenólicos, taninos y componentes flavonoides actúan inhibiendo el crecimiento, mientras que la actividad que elimina la cándida está a cargo de la beta-sitosterol, eugenol y quercetina.

Ruiz¹³ (Perú, 2015), analizó el accionar contra el hongo in vitro de ciertos extractos compuesto por metanol, etanol e hidroalcohol de la corteza de la *Juglans neotropica Diels*. Las propiedades antifúngicas sobre la *Candida albicans* se realizaron usando el método Kirby-Bauer (difusión en agar) frente a *Candida albicans*, *Aspergillus niger* y *Microsporum canis* cepa clínica y la Concentración Mínima Inhibitoria por el método de microdilución colorimétrico, aplicando como controles ketoconazol y fluconazol, con un tiempo de incubación de 24 h. Uno de los extractos con alta actividad antifúngica fue la *Juglans neotropica Diels* con CMI concentración mínima inhibitoria de 15.6 µg/mL, que va de 6-195 µg/mL, concluyó que el análisis fitoquímico realizado previamente expuso la existencia de compuestos fenólicos, quinonas, cumarinas, taninos, y flavonoides son los que realizan la actividad antifúngica.

La *Juglans neotropica Diels*, también conocido como el nogal peruano cuyas especies consideradas como similares se halla el *Juglans equatoriensis Linden* y *Juglans granatensis Linden*, se halla distribuido en la región oriental como norte del territorio peruano, incluye las regiones de: La Libertad, Amazonas, Cajamarca, Junín, Cuzco y Puno, dicho árbol es más conocido por su uso en la coloración textil, sin embargo se ha descubierto otros beneficios en la salud.^{14, 15}

Entre los compuestos que tiene la corteza de *Juglans neotropica Diels* en mayor cantidad comparado con las hojas y frutos son los taninos.¹⁸ que son parte de un grupo de compuestos polifenólicos que se caracteriza por tener propiedades antifúngicas y antimicrobianas, incluso afectan muchas enzimas de los hongos afectando su actividad patógena, aquí se incluye los flavonoides,¹⁷ que conjuntamente con los taninos son toxinas que llegan a acoplarse con proteínas que interactúan inhibiendo la acción de las enzimas

por medio de la oxidación, las cuales son parte de los procesos de transcripción y reparación del ADN, conllevando a la destrucción de la célula, en este caso de la *Candida albicans*.^{18, 19}

La fase extractiva representa el inicio de la separación de elementos innecesario de insumo natural a usar como materia prima. El método de extracción incorpora la fase extractiva de disolventes, luego pasa por la etapa de destilación, prensado, finalizando con la sublimación considerando el principio de extracción. La extracción de disolventes es el método más utilizado. Cualquier factor que mejore la difusión y la solubilidad facilitará la extracción. Las propiedades del disolvente de extracción, el tamaño de partícula de las materias primas, la cantidad de disolvente, la temperatura y duración de extracción afectarán a la eficiencia de extracción. La selección del disolvente es crucial para la extracción de disolventes. La selectividad, la solubilidad, el costo y la seguridad deben considerarse en la selección de disolventes. Los alcoholes como el etanol y metanol son disolventes universales en la extracción de disolventes para la investigación fitoquímica.²⁰

Cuanto más fino es el tamaño de partícula, mejor resultado en la extracción. Las altas temperaturas aumentan la solubilidad y difusión. Las temperaturas demasiado altas, sin embargo, pueden causar la pérdida de disolventes, lo que conduce a extractos de impurezas indeseables y a la descomposición de componentes termolábiles. La eficiencia de extracción aumenta con el aumento en la duración de la extracción en un cierto rango de tiempo. Cuanto mayor sea la relación disolvente-sólido, mayor será el rendimiento de extracción; sin embargo, una relación de disolvente a sólido que es demasiado alta causará un disolvente de extracción excesiva y requiere un largo tiempo para la concentración.^{21, 22}

Entre los patógenos fúngicos que afectan al ser humano se describe a la *Candida albicans* caracterizada por tratarse de un hongo oportunista que modula el pH, colonizando muchas veces de manera asintomática diversas

áreas corporales en especial el tracto genitourinario como el gastrointestinal. Considerado un hongo comensal aerobio, se convierten en oportunistas patógenos en personas inmunocomprometidas, ocasionando infecciones de mucosas o en todo el sistema. Su reproducción es asexual por gemación. El cambio de levadura hacia hifa es necesario para desarrollar la infección; en el momento que invaden los tejidos se detecta bajo la forma de hifas, en cambio un bajo pH o ambientes adversos que bloquean su transformación se forman las levaduras, si el pH se eleva por encima de 7 crece en modo de hifa.^{23, 24}

Taxonómicamente la *Candida albicans* pertenece al *Phylum ascomycota*, orden *endomycetale*, a la que también pertenecen los *Saccharomyces cerevisiae* aunque separados por más de 500 millones de años de tiempo evolutivo. La *Candida albicans* llega a colonizar de forma asintomática varias zonas del organismo, especialmente el tracto genitourinario y gastrointestinal.^{25, 26}

El fluconazol es un triazol que llega a inhibir al citocromo P450-3-A de la estructura celular fúngica, mediante su inactivación de la enzima denominada C14 alfa di - metilasa, que afecta la elaboración del compuesto ergosterol que se produce en la superficie membranosa de la célula. A causa de la ausencia del ergosterol se acumula esteroides de tipo tóxico intermedio que aumenta la permeabilidad de estructura membranosa interrumpiéndose el desarrollo de los hongos.^{27, 28}

Fluconazol (FLZ) es un fármaco usado en el manejo de infecciones sistémicas de *Cándida*. Las tasas de curación de la candidiasis sintomática después de una sola terapia con dosis de FLZ de 150 mg superan el 90% in vitro, sin embargo, FLZ es fungicida sistémico y hongostático sólo en un rango de pH estrecho y no es eficaz en el pH vaginal.²⁹ Tiene actividad fungicida a concentraciones de 8 g/ml. La mayoría de los cultivos de *Candida albicans* que tuvieron resistencia a FLZ en condiciones estándar fueron eliminadas por la FLZ más acetato.^{30, 31}

Las especies de cándidas son los patógenos fúngicos responsables del 80% de las infecciones fúngicas, incluyendo la candidiasis orofaríngea y esofágica, especialmente en inmunocomprometidos, hasta la candidiasis vulvovaginal, que afecta a un gran número de mujeres, donde el 75% de todas las mujeres experimentarán un episodio de vaginitis de *Candida albicans* una vez en su vida, con hasta un 5% mostrando recurrencia. En los últimos años, agentes azoles se han transformado en los fármacos de elección usados en el tratamiento para la candidiasis orofaríngea y vulvovaginal.^{32, 33}

III. METODOLOGÍA

3.1. Tipo y diseño de investigación:

3.1.1. Tipo:

Básica.

3.1.2. Diseño:

Diseño, Experimental de estímulo creciente con pos prueba.³⁴

RG ₁	O ₁	X ₁	O ₆
RG ₂	O ₂	X ₂	O ₇
RG ₃	O ₃	X ₃	O ₈
RG ₄	O ₄	---	O ₉

X₁: extracto hidroetanólico de corteza de *Juglans neotropica* solución 50%

X₂: extracto hidroetanólico de corteza de *Juglans neotropica* solución 75%

X₃: extracto hidroetanólico de corteza de *Juglans neotropica* solución al 100%

X₄: Fluconazol 25ug

O= Medición

G= Grupo de experimentación

R= Obtenido al azar

3.2. Variable y Operacionalización

Variable independiente:

Tratamiento antifúngico

a. Tratamiento con extracto hidroetanólico de la corteza de *Juglans neotropica*

b. Tratamiento con fluconazol

Variable dependiente:

Eficacia antifúngica

(Ver Anexo 3. Operacionalización de las variables)

3.3. Población, muestra, muestreo, unidad de análisis.

La población estudiada está constituida por la *Candida albicans* en forma de cultivos tratados y la *Juglans neotropica* (Nogal), de la cual se extrajo extracto hidroetanólico de la corteza de la mismas, que se acondicionó y estabilizó en laboratorio para obtener soluciones en concentración de 50%, 75% y 100%; así mismo, se empleó fluconazol.

Se tomó una muestra de 10 pruebas por cada grupo de estudio³⁵ (Ver Anexo 4), aplicándose muestreo aleatorio, tomando como unidad de análisis cada uno de los cultivos con *Candida albicans* tratados con extracto hidroetanólico de la corteza de *Juglans neotropica* en concentración de 50%, 75% y 100% y con fluconazol.

3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

3.4.1. Técnica

Se aplicó la técnica experimental para estimar la susceptibilidad anti fúngica, eligiéndose en esta oportunidad la técnica denominada difusión en agar de Kirby-Bauer.

Se utilizó una ficha de recolección de datos (*Anexo 5*) como instrumento de recolección de datos, la cual consta de cuatro tablas una para el tratamiento como es el fluconazol y las otras tres para las diversas concentraciones del extracto hidroetanólico de *Juglans neotropica*. Cada tratamiento incluye diez placas Petri y cada placa cuatro discos, es decir cada tratamiento incluye 40 pruebas, las cuales serán medidas a las 24, 48 y 72 horas.

3.5. Procedimientos

Se procedió a reconocer la corteza de la *Juglans neotropica Diels* con el apoyo de un biólogo de la Universidad César Vallejo.

Se obtuvo la materia prima que es la corteza del *Juglans neotropica Diels*, recolectada en la Provincia de Cajamarca, Distrito de Cajamarca (*Anexo 7*). El procedimiento para la obtención del extracto como también el cultivo y medición de halo inhibitorio se describe en el anexo 6.

3.6. Método de análisis de datos

Estadística descriptiva.- En este acápite se llevó a cabo la presentación de los resultados como frecuencias relativas porcentuales, así como las de medida de tendencia central denominada media aritmética con su desviación estándar.

Estadística analítica.- Se empleó pruebas estadísticas tales como análisis factorial y análisis de varianza (ANOVA) por tratarse de variable cuantitativa para comparar los promedios. Finalmente se aplicó la prueba Tukey y Duncan, que permitió establecer cuál de las diluciones expresó el tamaño mayor del halo inhibitorio. Es el SPSS para llevar a cabo la determinación dicha efectividad.^{36, 37}

Estadígrafo del Estudio.

TRATAMIENTO	EHE 50%	JN	EHE 75%	JN	EHE 100%	JN	Fluconazol 25 ug
EHE JN 50%							
EHE JN 75%							
EHE JN 100%							
Fluconazol 25ug							

- EHE-JN = Extracto Hidroetanólico de corteza de *Junglans neotropica*

3.7. Aspectos éticos

Para éste estudio consideró la aplicación del reglamento destinado para la ejecución de ensayos clínicos para investigaciones de tipo experimental in vitro. Por otro lado se dio cumplimiento a la normatividad de bioseguridad que establece pautas para el manejo de muestras biológicas en el personal de laboratorio.³⁸ Así mismo, se dio cumplimiento a la Ley N° 29763, Ley Forestal y de la Fauna Silvestre, Art. 24³⁹

IV. RESULTADOS

4.1. Efectos del extracto hidroetanólico de corteza de *Juglans neotropica* sobre cepas de la *Candida albicans* según su concentración in vitro de 50%, 75% y 100%.

TABLA 1

Análisis descriptivo de los halos de inhibición medido en milímetros, de la Eficacia fungicida del extracto hidroetanólico de corteza Juglans neotropica

Concentración	L Inferior	L Superior	Desv. Error	Media	Me	D.E.	Min	Máx
50%	21.57	23.84	0.219	22.7	23	0.95	21	24
75%	24.61	27.09	0.156	25.8	26	1.55	23	28
100%	26.70	29.51	0.251	28.1	28.5	1.85	24	31

Fuente: Reporte SPSS en base a Ficha de recolección de datos.

Se evidencia que la eficacia fungicida del extracto hidroetanólico de corteza *Juglans neotropica* en la concentración del 100% es la más efectiva, presentando un valor medio de 28.1 y una desviación estándar de 1.85.

4.2. Efecto que ocasiona el fluconazol sobre las cepas de la *Candida albicans* in vitro.

TABLA 2:

Análisis descriptivo de los halos de inhibición, de la Eficacia del fluconazol en cepa de Candida albicans (en mm)

	95% IC		Media	Desv.				
	L	L	Error	Media	Me	D.E.	Min.	Máx.
	Inferior	Superior						
Fluconazol	30.12	33.29	0.275	31.7	32	1.83	28	34

Fuente: Reporte SPSS en base a Ficha de recolección de datos.

Se evidencia que el fluconazol presenta una eficacia media de 31.7 con una desviación estándar de 1.83 sobre la *Candida albicans*.

4.3. Comparación in vitro del efecto del compuesto extracto hidroetanólico obtenido de la corteza de *Juglans neotropica* según su concentración de 50%, 75% y 100% con fluconazol en las cepas de la *Candida albicans*

TABLA 3

Análisis factorial de los halos de inhibición de la Eficacia fungicida del extracto hidroetanólico de corteza Juglans neotropica comparado con fluconazol en cepa de Candida albicans (en mm)

ANOVA

DIAMETRO DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	89,535	3	29,625	39 ,008	,000
Dentro de grupos	29,845	36	,819		
Total	119,380	39			

Fuente: Reporte SPSS en base a Ficha de recolección de datos.

Como $p=0.000 < 0.05$, se concluye que existen diferencias entre los grupos evaluados y fluconazol.

TABLA 4

Análisis Post ANOVA de los halos de inhibición medida en milímetros, de la Eficacia fungicida del extracto hidroetanólico de corteza *Juglans neotropica* comparado con fluconazol en cepa de *Candida albicans*.

HSD Tukey

alfa = 0.05

Proporción	N	1	2
EHE JN 50%	10	22.70	
EHE JN 75%	10	25.80	
EHE JN 100%	10		28.10
Fluconazol	10		31.70
Sig.		,401	,269

Fuente: Reporte SPSS en base a Ficha de recolección de datos.

El extracto hidroetanólico de corteza *Juglans neotropica* en una concentración al 100% tiene una eficacia fungicida similar al Fluconazol en cepa de *Candida albicans* in vitro.

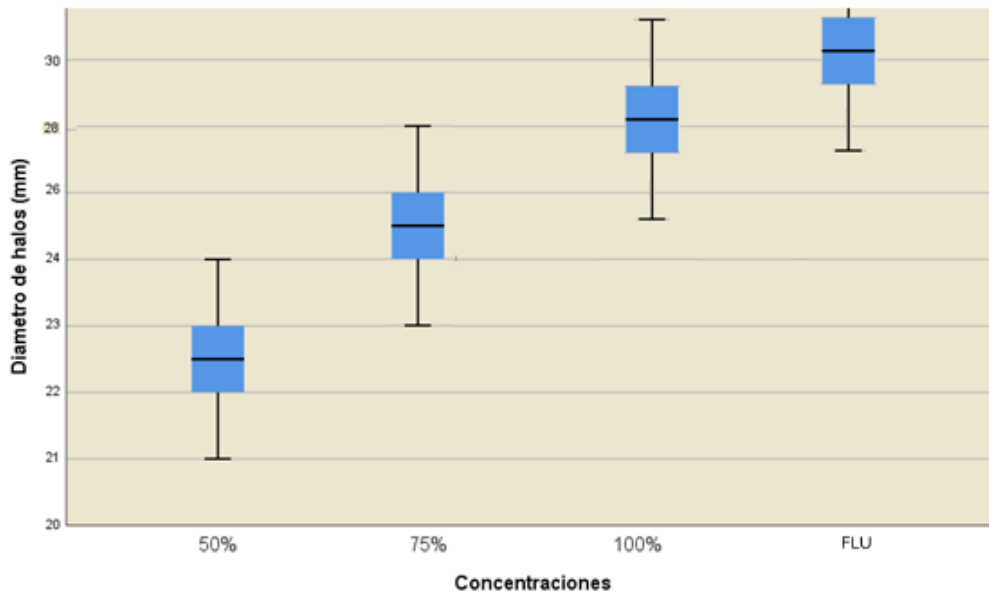


Figura 1: Distribución de la Mediana de los halos de inhibición, de la Eficacia fungicida del extracto hidroetanólico de corteza *Juglans neotropica* comparado con fluconazol en cepa de *Candida albicans*

V. DISCUSIÓN

La *Juglans neotropica*, es usada ya desde hace mucho tiempo, como planta de uso medicinal, siendo así que su corteza y hojas son utilizadas como extractos, decoctios e infusiones, la cual tiene diversos beneficios tanto en la terapia hipoglucemiante de diabetes mellitus; como en el tratamiento de infecciones bacterianas, y algunas antimicóticas, entre otros efectos, por tal motivo la presente investigación se realizó para conocer la eficacia antifúngica del extracto hidroetanólico de corteza *Juglans neotropica* sobre *Candida albicans*³.

En la Tabla 1. Se evidencia que el extracto hidroetanólico de corteza *Juglans neotropica* en sus diferentes concentraciones, tiene eficacia antifúngica sobre *Candida albicans*. Siendo así que la concentración al 100%, (28.10 mm) fue la que obtuvo la mayor actividad antifúngica, evidenciándose que a mayor concentración mayor será el efecto antifúngica del extracto hidroetanólico de corteza *Juglans neotropica* sobre *Candida albicans*.

Estos resultados se asemejan a los encontrados por Bardales et al (Perú, 2017), quienes evaluaron la utilización de las infusiones de la corteza de *Juglans neotropica* sobre la *Candida albicans*, para determinar si tiene efecto antifúngico, para lo cual prepararon concentraciones de 10%, 20% y 30%, obteniendo como resultado que todas las concentraciones de la infusiones utilizadas en la investigación tienen efecto antifúngico contra *Candida albicans* a partir de los 60 minutos de exposición¹⁰.

Así mismo Bustamante L. (Perú, 2016) demostró que la corteza de *Juglans neotropica* preparado como extracto etanólico, tiene efecto antifúngico contra *Candida albicans*. Para lo cual se conformaron dos grupos, uno representado por el Fluconazol y otro conformado por las concentraciones al 10%, 50% y 100% del extracto etanólico. Obteniendo como resultados que el extracto etanólico de *Juglans neotropica* en sus diversas concentraciones presenta actividad antifúngica, siendo estos: 33mm para el 100%; 27mm para el 50% y 24mm para el 10%, mientras que el grupo que contiene Fluconazol obtuvo halos de inhibición de: 30mm para el 100%; 26mm para el 50% y 16mm para

el 10%, por lo que se concluye que los extractos etanólicos de la corteza de *Juglans neotropica* presentan mayor efecto que Fluconazol.¹¹

El efecto o actividad antifúngica se debe a que la corteza contiene entre sus componentes compuestos químicos, tales como taninos (tanino elágico). Así mismo la pulpa del fruto contiene ácido málico y oxálico, en las hojas contiene juglandina, juglona y polifenol que es un aceite esencial y alcaloide, así mismo contiene juglona, una naftaquinona, la que es obtenida de las raíces, y tiene efecto icotóxico y fungistática.

En la Tabla 2. Se evidencia que el fluconazol presenta una eficacia media de 31.7 con una desviación estándar de 1.83 sobre la *Candida albicans*, estos resultados coinciden con los de Huaracha O, (Perú, 2019), quien evaluó los halos inhibitorios del desarrollo de la *Candida albicans* tras la aplicación de fluconazol, en el cual a una concentración de 25 microgramos el punto de corte de la sensibilidad fue ≥ 19 , susceptible depende de la dosis 15 a 18 mm y resistente menor o igual a 14mm. Hallaron que la inhibición del fluconazol tuvo un valor mínimo de 25.7 mm y máximo de 25.78mm, con media de 26.1 mm.⁹

Fluconazol (FLZ) es un fármaco usado en el manejo de infecciones sistémicas de Cándida. Las tasas de curación de la candidiasis sintomática después de una sola terapia con dosis de FLZ de 150 mg superan el 90% in vitro, sin embargo, FLZ es fungicida sistémico y hongostático sólo en un rango de pH estrecho y no es eficaz en el pH vaginal.²⁹ Tiene actividad fungicida a concentraciones de 8 g/ml. La mayoría de los cultivos de *Candida albicans* que tuvieron resistencia a FLZ en condiciones estándar fueron eliminadas por la FLZ más acetato.^{30, 31}

En la Tabla 3. realizamos el análisis de varianza ANOVA, en el cual se obtiene una significancia de 0.000, por lo que concluimos que existen diferencias entre los grupos evaluados y fluconazol, por otro lado, en la Tabla 4 realizamos el análisis post ANOVA mediante el método de Tukey para comparaciones múltiples (HSD Tukey) mediante el cual concluimos que el extracto

hidroetanólico de corteza *Juglans neotropica* en una concentración al 100% tiene una eficacia fungicida similar al Fluconazol en cepa de *Candida albicans* in vitro.

Estos resultados se asemejan a los encontrados por Ruiz J. (Perú, 2015), quien evaluó el accionar contra *Candida albicans* de ciertos extractos compuesto por metanol, etanol e hidroalcohol de la corteza de la *Juglans neotropica*, utilizando como controles ketoconazol y fluconazol, en el cual obtuvo como resultados que el extracto etanólico de la *Juglans neotropica* demostró tener mayor actividad antifungico, con concentración mínima inhibitoria (CMI) de 15.6 µg/mL, que va de 6-195 µg/mL¹³.

Entre las especies de plantas medicinales se encuentra la *Juglans neotropica*, la cual posee compuestos mayormente en la corteza que son los taninos, los que son parte de un grupo de compuestos polifenólicos que se caracteriza por tener propiedades antifúngicas y antimicrobianas, incluso afectan muchas enzimas de los hongos afectando su actividad patógena, aquí se incluye los flavonoides, que conjuntamente con los taninos son toxinas que llegan a acoplarse con proteínas que interactúan inhibiendo la acción de las enzimas por medio de la oxidación, las cuales son parte de los procesos de transcripción y reparación del ADN, conllevando a la destrucción de la célula, en este caso de la *Candida albicans*.^{17, 18}

Por lo descrito, podemos afirmar que la corteza de *Juglans neotropica* posee efecto fungicida sobre *Candida albicans*, siendo tan eficaz como el fluconazol, lo cual debe tenerse en cuenta como alternativa terapéutica.

VI. CONCLUSIONES

1. El extracto hidroetanólico de corteza de *Juglans neotropica* tiene eficacia fungicida en cepas de la *Candida albicans*, a las concentraciones de 50%, 75% y 100%, siendo a la concentración del 100% donde se obtiene mayor actividad fungicida.
2. El fluconazol evaluado in vitro presenta eficacia fungicida sobre la *Candida albicans*.
3. El extracto hidroetanólico de corteza de *Juglans neotropica* al 100% tiene una eficacia fungicida similar al fluconazol contra *Candida albicans* in vitro, por lo que, debe tenerse en cuenta para posteriores estudios de investigación científica.

VII. RECOMENDACIONES

1. Realizar investigaciones posteriores, donde se realicen ajustes en la concentración de dosis y se determine la concentración exacta a la que se produce la actividad fungicida.
2. Realizar estudios para determinar la seguridad del extracto hidroetanólico de corteza *Juglans neotropica*.

REFERENCIAS

1. Verdú F. Sobre las medicinas tradicionales y complementarias. *Medicina naturista*, (Citado 2 de febrero del 2020) 2018; 12 (1): 40-46. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/6267067.pdf>.
2. Organización Mundial de la Salud. *Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional*. Genova: Organización Mundial de la Salud; 2014.
3. Toro E, Roldán I. Propagación y conservación de Juglans neo trópica en zonas andinas. *Rev Madera y Bosques* 2018 (citado 4 febrero del 2020);24(1):e2411560. Disponible en: <http://myb.ojs.inecol.mx/index.php/myb/article/view/1560/1720>
4. Instituto Mexicano del Seguro Social. Diagnóstico y tratamiento de candidiasis orofaríngea en Adultos en el primer nivel de atención, México. (Internet) CENECET: 2016. (citado 6 de febrero del 2020) Disponible en: http://www.cenetec-difusion.com/CMG_PC/IMSS-794-16/RR.pdf.
5. Zurita S. Situación de la resistencia antifúngica de especies del género *Candida* en Perú. *Rev. perú. med. exp. salud púb* [Internet]. 2018 [citado 2 de febrero 2020];35(1):126-131. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sciarttext&pid=S1726-46342018000100019&lng=es>.
6. Bustamante B, Campos P, Denning D. Serious fungal infections in Peru. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017;36 (6):943-948. doi: 10.1007/s10096-017-2924-9.
7. Cañar E, Paguay E. Estandarización de la técnica de microdilución de actividad antifúngica de extractos hidrofílicos y lipofílicos de plantas medicinales frente a *Candida albicans* ATCC 90028. [Tesis de grado]. Cuenca: Universidad de Cuenca;(citado: 29/03/2017) Disponible en: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/27351/1/TESIS%20alexandra%20ca%C3%B1ar%20eva%20paguay.pdf>
8. Sytykiewicz H, Sprawka I, Leszczyński P, Chrzanowski G, Krzyżanowski R, Czerniewicz P. Antifungal Activity of Juglans regia Leaf Extracts Against *Candida albicans* Isolates. *Pol. J. Environ. Stud.* (citado 3 de abril del

- 2020))2015; 24(3):,1339-1348 Disponible en:
https://www.researchgate.net/publication/276025122_ANTIFUNGAL_ACTIVITY_OF_JUGLANS_REGIA_L_LEAF_EXTRACTS_AGAINST_CANDIDA_ALBICANS_ISOLATES
9. Huaracha O, Efecto antimicótico in vitro del aceite esencial de Cinnamomum Zeylanicum “Canela” sobre Candida Albicans. [Tesis de grado] Puno, Universidad Nacional del Altiplano de Puno. (citado: 02/09/2019) Disponible en: http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/11686/Olinda_Huaracha_Yucra.pdf?
 10. Bardales A, Soledad Y. Actividad antifúngica con infusión de Juglans neotropica Diels (nogal) en colonias de Candida albicans (ATCC 10231). [Tesis de grado]. Cajamarca: Universidad Privada Antonio Guillermo Urrelo; Disponible en: <http://repositorio.upagu.edu.pe/bitstream/handle/UPAGU/207/TesisActividad%20antif%3%bangica%20con%20infusi%3%b3n%20de%20Juglans%20neotropica%20Diels%20%28nogal%29%20en%20colonias%20de%20Candida%20albicans-BardalesUreta?sequence=1&isAllowed=y>
 11. Bustamante L. Huaccha M. Determinación de la actividad antimicótica in vitro del extracto etanólico de la corteza de Juglans neotropica Diels “Nogal” frente a Candida albicans. [Tesis de grado] Cajamarca: Universidad Privada Antonio Guillermo Urrelo;(citado:05/2017) Disponible en: <http://repositorio.upagu.edu.pe/handle/UPAGU/354>
 12. Huamaní M, Ruiz J, Determinación de la actividad antifúngica contra Candida Albicans y Aspergillus Niger de 10 plantas medicinales de 3 departamentos del Perú. [Tesis de grado]. Lima: Universidad Nacional mayor de San Marcos; 2015 Disponible en: https://alicia.concytec.gob.pe/vufind/Record/UNMS_61067d46986f8191bb7c003103ab4a80
 13. Ruiz J. Actividad antifungica in vitro y concentración mínima inhibitoria mediante microdilución de ocho plantas medicinales. [Tesis de grado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; (citado: 20/08/2013). Disponible en: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/1278>
 14. Ministerio de Agricultura Distribución de las especies forestales del Perú. Lima: OSINFOR; 2016. (citado 4 de marzo del 2020). Disponible en:

- https://www.osinfor.gob.pe/portal/data/destacado/adjunto/especies_forestales.pdf
15. Aranda J, Villacrés J, García D, Sotero S, Vásquez D, Monteiro U, la. Actividad antioxidante in vitro y antidiabética in vitro e in vivo del extracto de *Juglans neotropica* Diels (nogal peruano). *Revista Peruana de Medicina Integrativa*. 2016 (citado 12 de marzo del 2020);1(4):16-24. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/319660542_Toxicidad_actividad_antioxidante_in_vitro_e_hipoglicemiantes_in_vitro_e_in_vivo_del_extractoacuoso_de_Juglans_neotropica_Diels_nogal_peruano/fulltext/59b89e45458515bb9c445dc7.pdf
 16. Veloz R, Marín R, López M, Muñoz C, Torres I, Guevara C, la Evaluación del efecto de concentrado de taninos sobre crecimiento de Hongos Celaya. Instituto Tecnológico de Celaya. (Internet) 2016. (citado 3 /03/2020) Disponible en: https://smbb.mx/congresos%20smbb/veracruz01/TRABAJOS/AREA_IV/CIV-26.pdf
 17. Hurtado P, Calixto M, Ramos E, Jurado B. Evaluación de la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico estandarizado de hojas de *Juglans Neotropica* Diels (nogal peruano). *Revista de la Sociedad Química del Perú* 2015 (citado 04/03/2020), 81(3), 283-291. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rsqp/v81n3/a10v81n3.pdf>
 18. Espinoza G. Tintes vegetales de la sierra y selva del Perú: un estudio etnobotánico en los departamentos de Ancash, Loreto y Cusco. [Tesis de grado]. Lima: Universidad Cayetano Heredia; 2016. Disponible en: http://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/upch/723/Tintes_EspinozaYauri_Geraldine.pdf?sequence=1&isAllowed=y
 19. Mesa V, Monsalve Z, Calle J, Marín P, Ocampo O. Fungicidas a partir de extractos vegetales: una alternativa en el manejo integrado de hongos fitopatógenos. *Antioquia: Revista de Investigaciones Agropecuarias*; 2019 (citado: 12/03/2020); 45(1):11-15. Disponible en: <https://www.redalyc.org/jatsRepo/864/86458941001/html/index.html>
 20. Zhang Q, Ye W, Lin L. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chin Med*. 2018 (citado: 02/03/2020)

- ;13:20. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5905184/>
21. Atanasov A, Linder T, Wang L, Schwaiger S, Waltenberger B, Pferschy M, et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: a review. *Biotechnol Adv.* 2015 (citado: 07/03/ 2020);33(8): 1582–1614. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4748402/>
 22. Cruz S; Calderón M, Herrera A. Arias D, Mazón G, Díaz P. Genoma de *Candida albicans* y resistencia a las drogas, *Salud Uninorte*, (citado: 03/03/2020) 2017; 33(3): 438-450. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/817/81753881018.pdf>
 23. Willems H, Krom B, Jabra M, Kos K. *Candida albicans* in oral biofilms could prevent caries. *Pathog Dis.* Jul 2016;74(5): 39-43. doi: 10.1093/femspd/ftw039.
 24. Nobile CJ, Johnson, AD . *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. *Annu Rev Microbiol.* 2015;69:71-92. doi: 10.1146/annurevmicro-091014-104330
 25. Anderson M, Bennett R. Budding off: bringing functional genomics to *Candida albicans*. *Brief Funct Genomics.* Mar 2016;15(2):85-94. doi: 10.1093/bfgp/elv035.
 26. Min K, Mitchell A, Woolford C, Ichikawa Y. *Candida albicans* Gene Deletion with a Transient CRISPR-Cas9 System. Imperiale MJ, ed. *mSphere.* 2016;1(3):e00130-16. doi:10.1128/mSphere.00130-16.
 27. Brunton L, Knollmann B, Chabner B. Goodman & Gilman: Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 13ª edición. Barcelona Mc Graw Hill. 2019
 28. Sanchis M. Evaluación experimental de terapias antifúngicas frente a hongos oportunistas emergentes. (tesis doctoral). Reus: Universitat Rovira I Virgili. 2016. Disponible en: [https://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/396316/TESIS %20FINAL.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/396316/TESIS%20FINAL.pdf?sequence=1&isAllowed=y).
 29. Gonzalez M, Sifuentes J, Ostrosky L. *Drugs in Clinical Development for Fungal Infections.* Mexico. Springer International Publishing AG. 2017.

- Disponible en: <https://medicinainterna.net.pe/sites/default/files/NUEVOS%20ANTIFUNGICOS.pdf>
30. Ebelle R, Hiol M, Masoche A, Hopogap M, Assam J, Mouokeu R, Potentiating Antifungal Activity of Fluconazole or Nystatin with Methanol Bark Extract of *Harungana madagascariensis* Stem Bark. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research* (citado 3 de marzo del 2020) 2017; 9(5); 674-679 Disponible en: <http://impactfactor.org/PDF/IJPPR/9/IJPPR,Vol9,Issue5,Article 13.pdf>
 31. Twinkle N. Mannu R, Gandhi S, Patel D, Manish G. Antifungal susceptibility of candida against six antifungal drugs by disk diffusion method isolated from vulvovaginal candidiasis. *Int J Cur Res Rev June* (citado:03/03/ 2020) 2015; 7 (11): 20-27 Disponible en: https://www.ijcrr.com/uploads/525_pdf.pdf
 32. Castaño J. Principios básicos de hongos fitopatógenos. Caldas: Editorial Universidad de Caldas; 2016 360 p
 33. Hirakawa M, Gujja S, Berlin A, Martínez D, Anderson M, Sakthikumar S, et al. Genetic and phenotypic intra-species variation in *Candida albicans*. *Genome Res.* 2015;25:413- 425. doi:10.1101/gr.174623.114
 34. Hernández R, Baptista C. Fernández P. Metodología de la investigación 6ª ed. Editorial Mac Graw Hill. 2017
 35. García J. López J. Reding A, Cálculo del tamaño de la muestra en investigación en educación médica. *Inv Ed Med* (citado: 03/03/2020) 2013; 2(8):217-224. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/iem/v2n8/v2n8a7.pdf>
 36. Gauchi V, Estudio de los métodos de investigación y técnicas de recolección de datos utilizadas en bibliotecología y ciencia de la información. *Rev Esp de Documentación Científica* (citado: 06/03/2020) 2017; 40(2): 75-82. Disponible en: http://www.urp.edu.pe/pdf/clase_recoleccion%20de%20datos.06Feb.pdf.
 37. Argimón J, Jiménez J. Métodos de investigación clínica y epidemiológica. 4ª ed. Barcelona: Elsevier España. 2013.
 38. Asociación Médica Mundial (AMM), Declaración de Helsinki de La Asociación Médica Mundial. Principios éticos para las investigaciones

- médicas en seres humanos. 2013 (Citado: 05 /03/ 2020). Disponible en:
http://www.wma.net/es/30publications/10policies/b3/17c_es.pdf
39. Ley N° 29763, Ley Forestal y de la Fauna Silvestre, Disponible en:
<http://www.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2017/04/Ley-N%C2%B0-29763.pdf>
40. Zapata F, Cardona N, Lo que debemos saber sobre los métodos de sensibilidad a los antifúngicos Revista CES Medicina (citado: 03/03/2020);26(1):2-12. Disponible en <http://www.scielo.org.co/pdf/cesm/v26n1/v26n1a07>
41. Sacsquispe R, Velásquez R. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de Disco Difusión Lima: Instituto Nacional de Salud, 2016
42. Clinical Laboratory Standards Institute. Method for Antifungal Disk diffusion Susceptibility Testing M51-A. Wayne P.A. CLSI. (citado: 03/03/ 2020) 2016. Disponible en: https://clsi.org/media/2480/m51ae_sample.pdf

ANEXOS

ANEXO 1

Operacionalización de las variables

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADORES	ESCALA DE MEDICIÓN
Variable Independiente Tratamiento antifúngico.	Es un compuesto que se obtiene a través del extractos hidroetanólicos de la corteza de la <i>Juglans neotropica</i> Diels. ^{16, 17}	Se considerará la solución de 100 mg/ml del compuesto denominado extracto hidroetanólico de corteza <i>Juglans neotropica</i> separándose según sus diluciones correspondientes: RG 1 dilución 50% RG 2 Dilución 75% RG 3 Dilución 100%	G ₁ G ₂ G ₃	Cualitativo nominal
	Fluconazol. Antifúngico que deriva de triazoles. inhiben a la citocromo P-450-3-A del hongo inactivando la enzima C-14- α -dimetilasa. ²⁷	Se cargará las placas con 25 μ g/ml de fluconazol, ¹⁰ correspondiendo al RG ₄	Si No	Cualitativo nominal
Variable Dependiente Eficacia anti fúngica	Se denomina al producto de la actividad de un principio activo , con el propósito de exterminar células fúngicas. ²⁴	Para la clasificación se estimará el diámetro en milímetros del halo inhibitorio: Resistente < 16 mm , Intermedio de 16-18 mm Sensibles > 19mm	No eficaz Eficaz	Cualitativo nominal

ANEXO 2

CÁLCULO DE LA MUESTRA

Se llevará a cabo la selección de la muestra mediante la siguiente fórmula.

$$n = \frac{(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 2\delta^2}{(X_1 - X_2)^2}$$

Teniendo en cuenta:

Z_{α} = valor del nivel de significancia 1.96

Z_{β} = valor de la potencia es de 0.84

δ^2 = Valor de la varianza 1,3 mm

X_1 = valor del halo inhibitorio 19 mm¹².

X_2 = valor del halo inhibitorio 17 mm¹².

Reemplazando:

$$n = \frac{(1.96 + 0.84)^2 \times 2(1.3)}{(19 - 17)^2}$$

$$n = 8$$

Se utilizarán 10 muestras para cada uno de los tratamientos totalizando 40 pruebas.

ANEXO 3

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Eficacia fungicida in vitro del extracto *Juglans neotropica* comparado con fluconazol en cepa de *Candida albicans*

N° Repe tic	Zonas de inhibición (mm)				
	Extracto hidroetanólico de <i>Juglans</i>			Fluconazol	DMSO
	100%	75%	50%		
1	29	28	22	33	0
2	27	24	23	30	0
3	24	23	21	32	0
4	28	27	22	32	0
5	29	27	24	34	0
6	31	26	23	32	0
7	27	26	23	33	0
8	28	25	23	30	0
9	29	27	24	28	0
10	29	25	22	33	0

ANEXO 4

PROCEDIMIENTO

Selección del material vegetal:

Se eliminó las muestras de corteza que presentaron daño en su superficie con cambios en su coloración, empleándose grosor en promedio 10 mm. La muestra de la corteza obtenida se lavó utilizando el método de arrastre con agua a presión para posteriormente enjuagar los trozos de la corteza con agua destilada para luego proceder al secado.

Secado de la muestra:

Lo trozos de corteza de 4 cm por 4 cm se secaron a una temperatura medioambiental utilizando el papel Kraft durante un día, luego se colocó la muestra en una estufa, envueltas en papel Kraft con agujeros a una temperatura de 40 ° C por día. Tras secar la muestra se realizó la molienda utilizando un pulverizador de cuchilla y luego un mortero de porcelana, separando mediante un tamiz N° 18 para lograr partículas uniformes las mismas que se almacenaron en envases de vidrio cubiertas con papel aluminio.⁴⁰

Obtención del Extracto Hidroetanólico de *Juglans neotropica* Diels:

Se separó 10 g del polvo de la corteza de *Juglans neotropica* Diels que se combinó con arena lavada y tratada, aplicándose 200 ml de alcohol etílico de 96° GL, mediante el método Soxhlet, para obtener el extracto hidroetanólico considerando el método de evaporación en baño María a una temperatura de 50° C, posteriormente se obtuvo un volumen de 100ml, del cual se extrajo 10 ml para colocarlo en una placa Petri para su secado usando estufa a temperatura de 50°C⁴¹.

Preparación de dilución de extracto hidroetanólico de *Juglans neotropica* Diels:

Se tomó en cuenta la concentración de 100 mg/ml del extracto hidroetanólico preparándose diluciones al 100%, 75%, y 50%.

%	Concentración (mg/ml)
100	100
75	75
50	50

Preparación del inóculo:

Al cultivo de la cándida se colocó 20 cc de solución fisiológica al 0.9%, tras 20 minutos se retiró la colonia completa introduciéndose en un recipiente matraz estéril, agitándose fuertemente para lograr el desprendimiento de esporas.

Se decantó en un balón esterilizado de 100ml, realizándose el conteo de esporas mediante el uso de la cámara de Neubauer visualizándose mediante la microscopía a un zoom de aumento de 40x, obteniéndose un promedio de 2500 levaduras por mililitro de solución. Se consideró la concentración de levaduras por cada placa de $0,5 \times 10^3$ hasta $2,5 \times 10^3$.⁴¹

Sembrado de placas con Agar Sabouraud:

Usando micropipetas se obtuvo 100 ul del inóculo para proceder a su colocación en cada placa con agar Sabouraud, la misma que se extendió de manera uniforme en la superficie del medio de cultivo contándose con el apoyo del asa de Drigalsky. Para el proceso de inoculación se obtuvo de cada dilución de extracto hidroetanólico de la corteza la cantidad de 5 uL, mediante micropipetas, para colocarlo en su respectivo disco.

Preparación del antifúngico:

Se utilizó una tableta de 150mg de fluconazol, la que se pulverizó y combinó con una solución de cloruro de sodio al 0.9%, formando una concentración de 25ug/ml. Tras un periodo de incubación de 48 horas considerando una temperatura cercana 25°C se estimó el diámetro del halo inhibitorio haciendo uso de la regla de vernier. Para proceder a establecer el diámetro del halo inhibitorio de la *Candida Albicans* se usó el método estándar M51-S1 del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) en E.U.A.⁴²

ANEXO 5

FIGURA 2: VALIDACIÓN DE LA PLANTA *Juglans neotropica*.

