

**UNIVERSIDAD INTERAMERICANA PARA EL  
DESARROLLO**



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
CARRERA PROFESIONAL DE FARMACIA Y  
BIOQUÍMICA**

Efecto antifúngico *in vitro* del extracto acuoso de *Morinda citrifolia*  
“noni” frente a *Cándida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae*.

**AUTOR:**

Ayala Huaman, Regina  
Pecho Ramírez, Kadjitja Magaly  
Ácaro Chuquicaña Fidel Ernesto

**LIMA- PERÚ**

**2018**

## DEDICACIÓN

A mi hija con infinito amor, motor de mis días e inspiración para los más grandes retos en la vida.

Regina

Con mucha gratitud a mis padres, ejemplos vivos de esfuerzo y disciplina, por la educación que me dieron y su apoyo incondicional en los momentos más difíciles.

Kaditja

## **AGRADECIMIENTO**

A los docentes, por brindarnos sus enseñanzas, experiencias y motivaciones, vitales para nuestro crecimiento como profesionales.

A la Universidad Interamericana para el Desarrollo por permitirnos en sus aulas formarnos como personas y profesionales de bien para el país

## INDICE GENERAL

	Pág
Dedicatoria	
Agradecimiento	
Índice general	
Índice tablas	
Índice de figuras	
Resumen	
Abstract	
Introducción	1
<b>CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>2</b>
1.1. Descripción de la realidad problemática	2
1.2. Formulación del Problemas	3
1.2.1. Problema general	3
1.2.2. Problemas específicos	3
1.3. Objetivos	4
1.3.1. Objetivo general	4
1.3.2. Objetivos específicos	4
1.4. Justificación	4
<b>CAPÍTULO II: FUNDAMENTOS TEÓRICOS</b>	<b>6</b>
2.1. Antecedentes	6
2.1.1. Antecedentes Nacionales	6
2.1.2. Antecedentes Internacionales	7
2.2. Bases teóricas	12
2.3. Marco conceptual	25
2.4. Formulación de la hipótesis	27

2.5. Operacionalización de las variables	27
<b>CAPÍTULO III: MÉTODODOLOGÍA</b>	<b>28</b>
3.1. Tipo y nivel de investigación	28
3.2. Descripción del método y diseño	28
3.3. Población y muestra	31
3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos	32
3.5. Técnicas de procesamiento y análisis de datos	32
<b>CAPÍTULO IV: PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS</b>	<b>34</b>
4.1. Presentación de resultados	34
4.2. Discusión	39
<b>CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	<b>43</b>
5.1. Conclusiones	43
5.2. Recomendaciones	43
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>44</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>56</b>

## RESUMEN

Las plantas son una gran fuente de fitoquímicos útiles, que tienen efectos inhibidores contra algunos microorganismos y son eficaces en el tratamiento de diversas afecciones, ya que con los fármacos disponibles suelen aparecer cepas fármacoresistentes. Se ha observado el resurgimiento de enfermedades oportunistas generados por el hongos del género *Cándida*. El objetivo principal fue determinar la actividad antifúngica del extracto acuoso de *Morinda citrifolia* en cultivos de *Cándida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae*. El diseño del estudio fue analítico, experimental, prospectivo y longitudinal, la muestra estuvo conformada por placas en agar Sabouraud – Dextrosa con cepas de *Cándida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae*, el análisis de la actividad antifúngica fue por difusión en Agar, donde se empleó discos de papel filtros embebidos con 20uL del extracto acuoso de noni al 50%,75% y 100%. Entre los resultados el extracto acuoso de *Morinda citrifolia* al 100 % demostró mayor sensibilidad que la concentración de 50%, en contraste la concentración al 75 % demostró un rango superior de sensibilidad frente a las anteriores muestras a las 24 y 48 horas. Concluimos que nuestra investigación da una validación científica al hecho de que los componentes bioactivos en la planta *Morinda citrifolia* se extraen sustancialmente en extracto acuoso, los mismos poseen efecto antimicótico y exhiben una actividad inhibidora fúngica altamente prometedora.

**Palabras clave:** *Morinda citrifolia*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, antifúngico

## ABSTRACT

Plants are a great source of useful phytochemicals, which have inhibitory effects against some microorganisms and are effective in the treatment of various conditions, since drug-resistant strains usually appear with drug-resistant strains. The resurgence of opportunistic diseases generated by the fungi of the genus *Candida* has been observed. The main objective was to determine the antifungal activity of the aqueous extract of *Morinda citrifolia* in cultures of *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. The design of the study was analytical, experimental, prospective and longitudinal, the sample consisted of plates on Sabouraud - Dextrose agar with strains of *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*, the analysis of the antifungal activity was by diffusion in Agar, where disks were used. paper filters embedded with 20uL of 50%, 75% and 100% aqueous noni extract. Among the results, the aqueous extract of *Morinda citrifolia* 100% showed greater sensitivity than the 50% concentration, in contrast the 75% concentration showed a higher sensitivity range compared to the previous samples at 24 and 48 hours. We conclude that our research gives a scientific validation to the fact that the bioactive components in the *Morinda citrifolia* plant are extracted substantially in aqueous extract, they have an antifungal effect and exhibit a highly promising fungal inhibitory activity.

Key words: *Morinda citrifolia*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, antifungal

## INTRODUCCIÓN

Los antimicóticos son una de nuestras armas más importantes para combatir las infecciones patógenas y han beneficiado enormemente la calidad de vida humana relacionada con la salud desde su admisión. Sin embargo, durante las últimas décadas, estos beneficios para la salud están amenazados, ya que muchos de ellos de uso común son menos efectivos contra ciertas enfermedades, además producen reacciones tóxicas y la aparición de hongos resistentes a medicamentos.

Hemos discutido estos problemas y decidido desarrollar un trabajo experimental para el mayor interés de los estudiantes e investigadores, para llenar el vacío en la publicación del tema tratado. Esperamos e intentamos que el resultado de estos esfuerzos en la forma de dar alternativas de solución al problema y sirva como un recurso valioso para toda la comunidad científica y académica. Confiamos que esta investigación no solo contenga la literatura reciente en este campo, sino que también ilumine temas relacionados para los beneficios de la enseñanza, la investigación y el descubrimiento de medicamentos.

Se presume que muchos productos herbales tienen propiedades antifúngicas, pero se han realizado pocos estudios científicos para validar estas afirmaciones. Es esencial investigar nuevos medicamentos con menor resistencia. Los medicamentos derivados de fuentes naturales desempeñan un papel importante en la prevención y el tratamiento de enfermedades humanas.

Nuestro estudio estuvo conformado para una mejor comprensión y orden cronológico, en cinco capítulos que incluyen: planteamiento del problema, marco teórico, metodología, análisis de resultados, conclusiones, recomendaciones, finalizando con las referencias y recomendaciones que abordan diversos aspectos relacionados con *Morinda citrifolia* sobre la actividad antifúngica.

Este estudio se realizó con el objetivo de determinar la actividad antifúngica del extracto acuoso de *Morinda citrifolia* "noni" en cultivos de *Cándida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae*.

## CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

### 1.1. Descripción de la realidad problemática

Las infecciones fúngicas invasivas causadas por organismos resistentes a los medicamentos son una amenaza emergente para los pacientes inmunodeprimidos con neoplasias hematológicas. Las estrategias modernas de tratamiento antifúngico temprano, como la profilaxis y la terapia empírica y preventiva, dan como resultado una exposición prolongada a agentes antifúngicos, que es una fuerza impulsora importante para el desarrollo de resistencia <sup>(1)</sup>.

La incidencia global de enfermedad fúngica ha aumentado dramáticamente en los últimos años. Las estimaciones actuales (probablemente infra) sugieren que hay aproximadamente 300 millones de infecciones fúngicas que amenazan la vida anualmente, lo que resulta en 1.6 millones de muertes. Los impactos en la salud en todo el mundo incluyen una alta mortalidad de 30 a 80%. Las limitaciones de las terapias actuales, que incluyen una o más de toxicidad, escasa biodisponibilidad y relativa ineficacia, se amplifican aún más por el surgimiento y la escalada de la resistencia a los antimicóticos <sup>(2)</sup>.

La incidencia de infecciones por hongos aumenta cada año, con un mayor número de infecciones entre los pacientes que pertenecen a grupos de alto riesgo, como las personas infectadas por el VIH y los pacientes con SIDA, los receptores de trasplantes y los pacientes inmunodeprimidos tratados con quimioterapéuticos o corticosteroides, al igual que aquellos que sufren trastornos hematológicos y pacientes con enfermedades <sup>(3)</sup>.

De lo descrito se desencadena la terminología de las infecciones fúngicas invasivas (IFI), se asocian con una morbilidad, mortalidad y carga económica desproporcionadamente altas. Es probable que muchos factores hayan contribuido a la aparición de la IFI, incluida la epidemia de VIH, un aumento espectacular en el número de pacientes que reciben una

gama cada vez mayor de terapias inmunosupresoras y el aumento de las poblaciones con frecuente exposición e intervenciones nosocomiales <sup>(4)</sup>.

La enfermedad micótica más frecuente que afecta a las poblaciones del mundo es la candidiasis, esta infección puede afectar tanto a personas inmunocomprometidas como a personas sanas. La candidemia es otra infección debida a *Candida* spp. y es la infección fúngica nosocomial más relevante y prevalente asociada con una alta tasa de mortalidad (49%) en pacientes con un sistema inmunitario comprometido. La candidemia es una infección tan importante que en 10 a 40% de los casos se asocia con sepsis o shock séptico, mientras que las especies de *Candida* como agente principal de sepsis o shock séptico son responsables de no más del 5% del número total de casos <sup>(5)</sup>.

Aquí, en una investigación preliminar, evaluamos la actividad *in vitro* de *Morinda citrifolia* contra patógenos, así lograr evidenciar su actividad farmacológica y dar una alternativa de solución ante la amenaza creciente de las infecciones fúngicas.

## **1.2. Formulación del problema.**

### **1.2.1. Problema general:**

1. ¿En qué medida el extracto acuoso de *Morinda citrifolia* tendrá efecto antifúngico frente a los cultivos de *Cándida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae*?

### **1.2.2. Problema específico.**

1. ¿Cuál serán los componentes activos del extracto acuoso de *Morinda Citrifolia* frente a los cultivos de *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae*?
2. ¿Cuál será el grado de sensibilidad que presentan los cultivos de *Cándida albicans* frente al extracto acuoso de *Morinda citrifolia* mediante la técnica de difusión en disco.

3. ¿Cuál será la dosis porcentual que tiene mayor actividad antifúngica en el extracto acuoso de *Morinda citrifolia* en cultivo de *Cándida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae*?

### **1.3. Objetivos de la investigación.**

#### **1.3.1. Objetivo generales.**

1. Determinar la actividad antifúngica del extracto acuoso de *Morinda citrifolia* en cultivos de *Cándida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae*.

#### **1.3.2. Objetivos especiales.**

1. Identificar los componentes activos del fruto de *Morinda citrifolia* frente a los cultivos de *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae*
2. Evaluar el grado de sensibilidad que presentan los cultivos de *Cándida albicans* frente al extracto acuoso de *Morinda citrifolia* mediante la técnica de difusión en disco.
3. Calcular la dosis porcentual que tiene mayor actividad antifúngica del extracto acuoso de *Morinda citrifolia* en cultivo de *Cándida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae*.

### **1.4. Justificación de la investigación.**

Se cree que los medicamentos herbarios están libres de efectos secundarios, menos tóxicos y más baratos que los medicamentos convencionales. Sin embargo, debe investigarse los medicamentos derivados de plantas. Las plantas sintetizan compuestos bioactivos que son responsables de la actividad antimicrobiana in vitro de los extractos de plantas. Estos componentes pueden luego servir como plantillas en el desarrollo de fármacos antifúngicos después de ser modificados para lograr

el efecto farmacológico propuesto. Por eso con investigaciones adicionales, posiblemente se podrían desarrollar nuevos agentes quimioterapéuticos a partir de estas plantas <sup>(6)</sup>.

Sin embargo, la preocupación actual se ha expresado acerca de su uso extensivo de medicamentos contra hongos patógenos debido a los posibles problemas ambientales, la toxicidad para los humanos, la resistencia a los hongos y, en ocasiones, los altos costos. Por estas razones, la búsqueda de agentes antifúngicos de origen natural para la protección de la salud es de suma importancia y requiere mucha atención. Por ello, a pesar del uso de productos naturales para la protección antimicótica no es nuevo, ahora se ha redescubierto, con una considerable investigación con exigencia científica y que sean seguros para la salud.

Es de gran interés incluso profundizar nuestro conocimiento sobre los mecanismos moleculares de acción de los extractos acuosos de plantas nativas. Posteriormente, esto puede ayudar a los investigadores a buscar nuevos agentes antifúngicos.

Teniendo en cuenta la etiología fúngica de diferentes enfermedades con gran impacto en la salud pública e informes sobre el uso de plantas del género *Morinda* en la literatura médica, el presente informe contribuirá a dar una respuesta al aumento de resistencia a los antifúngicos disponibles en los esquemas actuales de tratamiento en base a una alternativa terapéutica, permitirá orientar a la población de menores recursos económicos a su producción con fines terapéuticos.

En otros contextos, serán beneficiados con los resultados, la industria farmacéutica y la comunidad científica, permitirá estimular futuros estudios para beneficio de los pacientes al brindar sustento científico sobre el uso seguro del fruto en estudio y beneficio de los productores y comercializadores, porque al demostrar su efectividad se generará mayor demanda de compra.

## CAPÍTULO II: FUNDAMENTOS TEÓRICOS

### 2.1. Antecedentes de la investigación

#### 2.1.1. Antecedentes Nacionales

Nakamura et al., (2018), tuvieron el objetivo de determinar las actividades hipoglucemiante y antioxidante del extracto alcohólico del fruto de *Morinda citrifolia* (noni), en ratas normales e inducidas a diabetes mellitus tipo 2 por aloxano. El método de estudio fue experimental, utilizaron siete grupos de seis animales cada uno; un grupo sin diabetes y los restantes con diabetes inducida por aloxano (80 mg/kg). La determinación de la actividad antioxidante *in vitro* e *in vivo* se realizó mediante el método de neutralización del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) y midiendo los niveles de malondialdehído (MDA) y óxido nítrico (NO), respectivamente; finalmente se realizó el estudio histopatológico del páncreas. Los resultados en el test de tolerancia a la glucosa fueron significativos ( $p < 0,05$ ) a dosis de 50 mg/kg. En el ensayo con ratas diabéticas hubieron resultados significativos ( $p < 0,05$ ) a dosis de 50 y 150 mg/kg. La actividad antioxidante fue de 33,74% a una concentración de 50  $\mu\text{g/mL}$  y los niveles de MDA (1,539  $\mu\text{mol/L}$ ) y de NO (30,82  $\text{mmoles/L}$ ) a dosis de 250 mg/kg disminuyeron significativamente ( $p < 0,05$ ). Los autores concluyeron que el extracto presenta actividades hipoglucemiante y antioxidante en ratas con diabetes mellitus tipo 2 inducida por aloxano <sup>(7)</sup>.

Tapia R. (2018), en su estudio, el objetivo fue evaluar el aceite esencial de las hojas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara”, la actividad antifúngica frente a *Candida albicans*, aplicó el método analítico. La determinación de la actividad antifúngica *in vitro* del aceite esencial, se realizó empleando el método de difusión en agar mostrando actividad significativa frente a *Candida albicans* en concentraciones de 100, 75 y 50 por ciento, utilizando la nistatina como control positivo. El autor concluye que la actividad antifúngica se debería a la presencia de los siguientes terpenos identificados en el aceite esencial, se destacan: linalool,

terpinen-4-ol, endoborneol, citronelal, eucaliptol, gamma-terpineno, D-limoneno; que actuarían en sinergismo <sup>(8)</sup>.

Espinoza-Gutiérrez et al., (2014), se plantearon el objetivo de investigación evaluar la actividad tóxica y citotóxica del fruto de *Morinda citrifolia* “noni” cultivada en Perú. El método fue experimental, se extrajo el extracto acuoso y etanólico del jugo del fruto de *M. citrifolia*; se usaron ratas Holtzmann hembras de 170 a 200 g y *Tetrapygus niger* “erizo de mar. Las ratas se distribuyeron al azar en 3 grupos, el primero recibió solución salina fisiológica 2 mL/kg, el segundo extracto etanólico y el tercero extracto acuoso, ambos a la concentración de 1000 mg/kg, la toxicidad a dosis repetidas se realizó durante 60 días. La citotoxicidad se llevo a cabo en huevos fertilizados de *T. niger* y se consideró variación e inhibición en los estadios de desarrollo. Entre los resultados, se observó disminución del peso corporal en 7 y 6 %, y ausencia de variación en los parámetros hematológicos, bioquímicos y patológicos. Las dos sustancias evaluadas inhibieron el desarrollo de los huevos fertilizados de *T. niger*. Los investigadores concluyeron que el extracto al ser administrada por vía oral durante 60 días es segura en ratas y posee citotoxicidad en los huevos de *T. niger* <sup>(9)</sup>.

### **2.1.2. Antecedentes Internacionales**

Hermansyah et al., (2018), tuvieron como objetivo explorar los genes implicados en el efecto antiproliferativo de la fruta de *Morinda citrifolia* (noni) para *Saccharomyces cerevisiae*. El método fue analítico longitudinal y prospectivo, aplicaron la cadena reactiva de polimerasa (CRP) en tiempo real. La expresión de algunos genes cambió en presencia del extracto metanólico al 1% del fruto de noni. El nivel transcripcional del gen CDC28 (ciclina dependiente de quinasa 28), CLN2, CLN3, dan SWI6 cambió 2.25, 2.79, 4.87 y 7.21 veces, respectivamente. Los resultados obtenidos demuestran que la transcripción de genes inhibe la progresión del ciclo celular, CDC28 es un regulador de los ciclos

celulares mitóticos y meióticos, CLN2 y CLN3 son ciclinas G1 que desempeñan un papel importante en la regulación del ciclo celular, y SWI6 es un cofactor de transcripción donde se forman complejos con SWI4 y MBP1 en la regulación de la transcripción de G1 a la transición de fase S. Los autores concluyeron que el extracto metanólico de la fruta de noni (*Morinda citrifolia*) puede inhibir el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*. Este hallazgo sugiere que la fruta de noni tiene efecto antiproliferativo <sup>(10)</sup>.

El Zawawy et al., (2017), se plantearon el objetivo de evaluar la eficacia del extracto de la hoja de *Pluchea dioscoridis* en el crecimiento, la supervivencia, la morfogénesis y la expresión del gen de virulencia de *Candida albicans*. El método de estudio fue analítico y longitudinal. La actividad anticandida se estudió utilizando el método de placa de orificio contra cuatro cepas patógenas de *C. albicans*. El efecto del extracto sobre el perfil de crecimiento de la levadura también se examinó a través de un ensayo de muerte temporal. Se realizaron observaciones microscópicas utilizando microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía electrónica de transmisión (TEM) para determinar las principales alteraciones en la microestructura de *C. albicans*. Los cambios cuantitativos en la expresión de los genes de fosfolipasa, hemolisina y aspartil proteinasa secretada (SAP1 y SAP10) como factores de virulencia se analizaron utilizando la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RCP-TR). Los resultados obtenidos se exhibió alta actividad anticandidal, con las zonas de inhibición entre 0,5 y 6 cm, y registró un valor de concentración mínima inhibitoria (CMI) de 30 mg / ml. El estudio de muerte temporal sugirió que el extracto poseía propiedades ovicidas en concentraciones más altas y erradicó el crecimiento de las células de levadura. Las micrografías SEM y TEM mostraron grandes anomalías que se produjeron en las células de levadura después de haber sido expuestas al extracto., resultando en alteraciones completas en su morfología. A la CMI, la expresión del gen de fosfolipasa, proteinasa y hemolisina se

redujo a 90%, 70%, 90% para SAP1 y 40% para SAP10, respectivamente, en comparación con la obtenida de *C. albicans* no tratada, como lo demuestra la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RCP-TR). Los autores concluyeron que el extracto de hoja de *P. dioscoridis* puede ser un agente anticandidal eficaz para tratar las infecciones por levaduras patógena <sup>(11)</sup>.

Filho et al., (2017), tuvieron el objetivo de evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos de hojas de *Buchenavia tetraphylla* frente a muestras aisladas de *Candida albicans*. Los extractos se obtuvieron utilizando diferentes disolventes (hexano: BTHE; cloroformo: BTCE; acetato de etilo: BTEE; y metanol: BTME). La actividad antimicrobiana se determinó mediante el método de microdilución en caldo utilizando nueve cepas de *C. albicans* aisladas de secreciones vaginales y una cepa estándar. Los resultados demostraron que todos los extractos mostraron actividad anticandida, incluso contra las cepas resistentes a los azoles. Los valores de la CMI oscilaron entre 156 y 2500 µg / mL para el BTHE; 156 a 1250 µg / mL para el BTCE; 625 a 1250 µg / mL para el BTME y 625 µg / mL a 2500 µg / mL para el BTEE. BTME mostró el mejor actividad anti *Candida albicans*. Este extracto demostró interacciones aditivas / sinérgicas con fluconazol. Los investigadores concluyeron que el extracto metanólico de *Buchenavia tetraphylla* es una gran fuente de compuestos antimicóticos que pueden mejorar la acción del fluconazol contra diferentes cepas de *C. albicans*; esta acción parece estar relacionada con la inhibición de la división celular <sup>(12)</sup>.

Peixoto et al., (2017), propusieron el objetivo de demostrar el potencial antifúngico del aceite esencial (AE) de *Laurus nobilis* L. contra *Cándida* spp. Adhesión y formación de biopelículas (biofilm), además estableció su modo de acción sobre *C. albicans*. El método fue de tipo analítico, los AE de *Laurus nobilis* se obtuvo y analizó la concentración mínima inhibitoria y fungicida mínima (CMI / CMF) contra *Candida* spp. Así como la interacción

con la biosíntesis de la pared celular y la permeabilidad iónica de la membrana. Luego evaluaron sus efectos sobre la adhesión, formación y reducción en 48 horas de las biopelículas de *C. albicans*. El perfil fitoquímico de los AE se determinó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC / MS). Entre los resultados se evidenció que los valores de la CMI y CMF de los AE oscilaron entre (250 y 500) µg / ml. Los valores de la CMI aumentaron en presencia de sorbitol y ergosterol, lo que indica que los AE puede afectar la biosíntesis de la pared celular y la permeabilidad iónica de la membrana, respectivamente. Cuando se aplicó durante 1 minuto, cada 8 horas, durante 24 horas y 48 horas, los AE redujeron la cantidad de biopelículas maduras de *C. albicans* sin diferencia en relación con la nistatina ( $p > 0,05$ ). El análisis fitoquímico identificó el isoeugenol como el compuesto principal (53.49%) en la muestra. Los autores concluyeron que los AE de *Laurus nobilis* tiene actividad antifúngica probablemente debido a monoterpenos y sesquiterpenos en su composición. Estos pueden afectar la biosíntesis de la pared celular y la permeabilidad de la membrana, y tuvo efectos nocivos contra las biopelículas de *C. albicans* <sup>(13)</sup> .

Gaspar L, et al (2016)., formularon el objetivo de evaluar la composición química y el potencial biológico del aceite esencial (AE) obtenido de las hojas de *Cymbopogon nardus*, centrándose en su perfil antifúngico contra las especies de *Cándida*. El método aplicado fue analítico, el aceite esencial se obtuvo por hidrodestilación y se analizó por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS). La prueba del potencial antifúngico contra cepas estándar y clínicas se realizó mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), el tiempo de muerte, la inhibición del crecimiento de hifas de *Cándida albicans* y la inhibición de las biopelículas maduras. Los resultados a partir de los compuestos principales de los AE fueron los monoterpenos que contienen oxígeno: citronellal, geranial, geraniol, citronellool y neral. Los resultados mostraron un importante potencial antifúngico para todas las cepas

analizadas con valores de CMI entre 250 y 1000  $\mu\text{g} / \text{ml}$ , excepto por dos aislados clínicos de *C. tropicalis* (CMI > 1000  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ). El ensayo de eliminación temporal mostró que los AE, eran que inhibían el crecimiento de la levadura y la formación de hifas de las cepas de *C. albicans* en concentraciones que oscilaban entre 15.8 y 1000  $\mu\text{g} / \text{ml}$ . La inhibición de biopelículas maduras de cepas de *C. albicans*, *C. krusei* y *C. parapsilosis* se produjo a una concentración de 10  $\times$  CMI. Los autores afirman que los AE son compuestos prometedores para inhibir las especies de *Candida*, especialmente considerando su acción contra la biopelícula <sup>(14)</sup>.

Salari S et al (2016), tuvieron el objetivo de determinar si *Salvia rhytidea* podría ser eficaz contra las infecciones por hongos. En este estudio, al principio se determinó el contenido de ácido rosmarínico del extracto vegetal. Se analizaron 96 muestras de *Cándida*, incluidas las siguientes especies: *Cándida albicans* (n = 42), *Cándida glabrata* (n = 16), *Cándida tropicalis* (n = 11), *Cándida krusei* (n = 9), *Cándida parapsilosis* (n = 9), *Cándida lusitaniae* (n = 7) y *Cándida guilliermondii* (n = 2). La actividad antifúngica *in vitro* de los extractos metanólicos de *S. rhytidea* fue evaluado contra *Cándida* aislada y se compara con el medicamento antifúngico nistatina mediante el uso de un método de microdilución en caldo. Los resultados del cribado fitoquímico mostraron que el extracto metanólico de *S. rhytidea* contiene flavonoides y taninos. Los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima fungicida (CMF) osciló entre 3.125 a > 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$  y 6.25 a > 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$  respectivamente. El valor de inhibición del crecimiento mostró que los aislamientos de *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. albicans* eran los más susceptibles a la *S. rhytidea*. Los investigadores concluyeron que *S. rhytidea* posee un efecto contra los aislamientos de *Cándida* <sup>(15)</sup>.

Faria et al (2015). Se propusieron el objetivo de evaluar el efecto de las fracciones en polímeros de proantocianidinas de *Stryphnodendron*

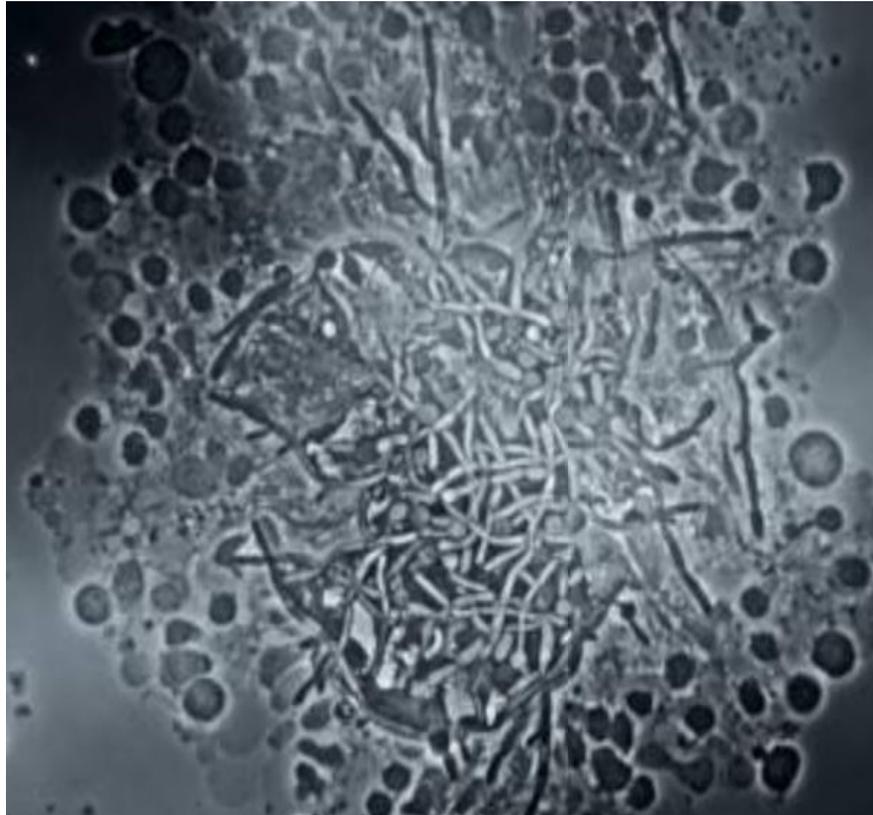
*adstringens* (fracción F2 y subfracción F2.4) contra las biopelículas (biofilm) de *Cándida albicans*. Aplicaron el método analítico y utilizando el método de microdilución en caldo. El efecto anti-biofilm de F2 y F2.4 se evaluó durante la formación o en biofilm maduro de *C. albicans* y se comparó con los antifúngicos estándar anfotericina B y fluconazol. Los resultados obtenidos en los tratamientos con F2 y F2.4 redujeron la actividad metabólica, formación y madurez del biofilm, a diferencia del fluconazol, que solo previene la formación del biofilm. Los tratamientos con F2, F2.4 o fluconazol redujeron la biomasa de biopelículas durante la formación de biopelículas, pero no en biopelículas maduras. La anfotericina B presentó un mayor efecto inhibitorio sobre la formación de biopelículas y sobre las biopelículas maduras de *C. albicans*. Los autores concluyeron que las fracciones en polímeros de proantocianidinas de *S. adstringens* inhibieron exitosamente el crecimiento de *C. albicans* y el desarrollo de biofilm, asimismo representan un nuevo agente potencial para el tratamiento de la candidiasis asociada a biofilm <sup>(16)</sup>.

## **2.2. Bases teórica.**

### **2.2.1. *Cándida albicans***

*Cándida albicans* (*C. albicans*) es una de las pocas especies de hongos que causan enfermedades en los seres humanos (Figura 1), pero otras millones no lo hacen. Es un miembro de la microbiota saludable, que coloniza asintóticamente el tracto gastrointestinal el tracto reproductivo, la cavidad oral y la piel de la mayoría de los humanos <sup>(17)</sup>.

En individuos con sistemas inmunes saludables, *C. albicans* a menudo es inofensivo, se mantiene en equilibrio con otros miembros de la microbiota local.



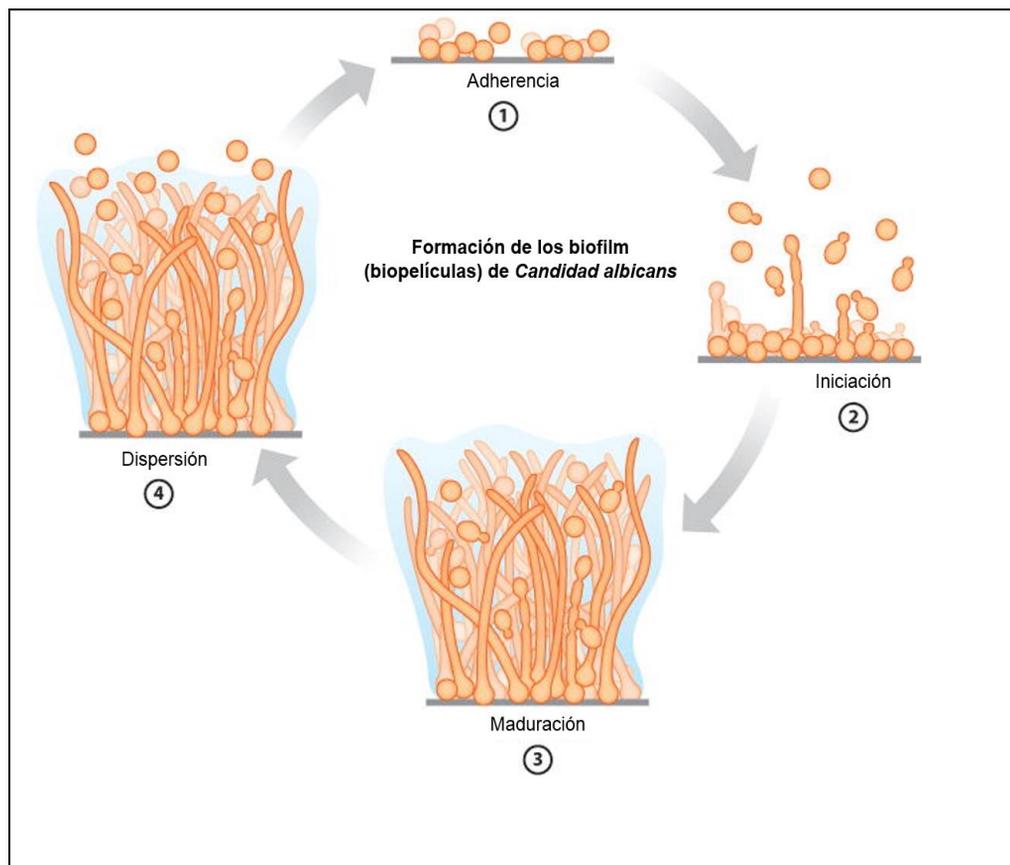
**Figura 1.** *Candida albicans* <sup>(17)</sup>.

Sin embargo, alteraciones en la microbiota del huésped (por ejemplo, debido a los antibióticos), cambios en la respuesta inmune del huésped (durante el estrés, infección por otro microbio o terapia inmunosupresora), o variaciones en el entorno local (cambios en el pH o contenido nutricional) puede permitir que *C. albicans* crezca demasiado y cause infección. Estas infecciones van desde infecciones superficiales de la mucosa y la dermis, como la candidiasis bucal, infecciones vaginales por levaduras y la erupción del pañal, hasta la infección por diseminación hematológica con tasas de mortalidad considerables (cerca del 40% en algunos casos).

Las infecciones por *Cándida albicans* son especialmente graves en personas inmunocomprometidas (como las que tienen SIDA o las que se someten a tratamientos anticancerosos o inmunosupresores) y personas sanas con dispositivos médicos implantados <sup>(17)</sup>.

### a) *Cándida* y biofilm

*C. albicans* produce biofilm altamente estructuradas compuestas de múltiples tipos de células (es decir, células redondas en forma de levadura; células pseudohifas ovaladas y células hifales cilíndricas alargadas) encerradas en una matriz extracelular (Figura 2).



**Figura 2.** Etapas de la formación de biopelículas de *Cándida albicans*.

- ① Adherencia de células en forma de levadura a una superficie.
- ② Iniciación de la proliferación celular, formando una capa basal
- ③ Maduración, incluido el crecimiento de hifas concomitantes con la producción de material de matriz extracelular.
- ④ Dispersión de células en forma de levadura desde el biofilm para Sembrar nuevos sitios <sup>(18)</sup>

Contabilizando el 15% de todos los casos de sepsis adquiridos en el hospital, además son la cuarta causa más frecuente de infecciones del

torrente sanguíneo en entornos clínicos y son las especies de hongos predominantes aislado de infecciones de dispositivos médicos.

Los catéteres urinarios y venosos centrales, los marcapasos, las válvulas cardíacas mecánicas, las prótesis articulares, las lentes de contacto y las prótesis dentales son susceptibles a los biofilms de *C. albicans*. Una vez que se forma en un dispositivo médico implantado, un biofilm de *Candida* tiene el potencial de sembrar infecciones diseminadas en el torrente sanguíneo y provocar infecciones sistémicas invasivas de tejidos y órganos. Más de cinco millones de catéteres venosos centrales se colocan cada año en los Estados Unidos <sup>(18)</sup> .

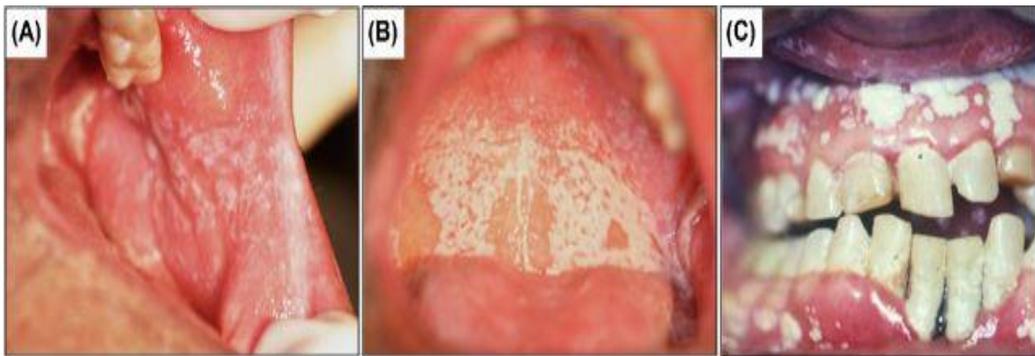
#### **b) Patogénesis:**

*Cándida albicans* es el patógeno fúngico humano más común que causa enfermedades que van desde la mucosa hasta las infecciones sistémicas. Como comensal, *C. albicans* coloniza asintóticamente las superficies de las mucosas; sin embargo, cualquier interrupción en el entorno del huésped o en condiciones de disfunción inmune, puede proliferar e invadir virtualmente cualquier sitio en el huésped <sup>(19)</sup> .

Las infecciones se asocian con la formación de biopelículas en el huésped o en superficies abióticas, como dispositivos médicos permanentes, que conllevan una alta morbilidad y mortalidad. Significativamente, las biopelículas formadas por *C. albicans* son inherentemente tolerantes a la terapia antimicrobiana y, por lo tanto, la susceptibilidad de las biopelículas de *Candida* a los agentes terapéuticos actuales sigue siendo baja.

La candidiasis pseudomembranosa es la infección oportunista oral más común en personas VIH positiva y otras personas inmunocomprometidas. Esta afección, comúnmente conocida como candidiasis bucal, se presenta como lesiones cremosas de color blanco en el paladar, la mucosa bucal y la lengua, y puede extenderse a la faringe (candidiasis orofaríngea) (Figura 3). Una característica diagnóstica de esta infección es que estas

placas, que consisten en células epiteliales descamadas e inmaduras, junto con levadura e hifas, pueden eliminarse mediante un raspado suave que deja una superficie de mucosa eritematosa subyacente.



**Figura 3.** Candidiasis oral. Manifestación clínica de la candidiasis oral en un huésped humano caracterizado por lesiones blancas formadas en las superficies de la mucosa oral: (A) mucosa bucal, (B) paladar y (C) gingival (19).

Es importante destacar que, además de las personas VIH positivas, la candidiasis se presenta en el 35% de los pacientes con cáncer que reciben quimioterapia y radioterapia, pacientes con síndrome de Sjogren, ancianos, bebés, en condiciones de desnutrición y supresión inmunitaria local (por ejemplo, inhaladores de esteroides para el asma).

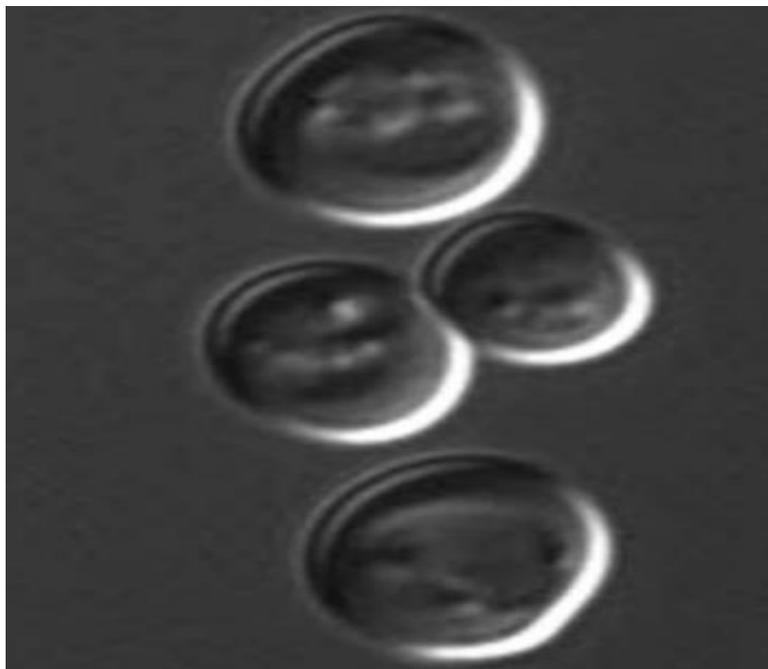
Los pacientes con diabetes y otros trastornos metabólicos u hormonales o con antibióticos también están predispuestos a la candidiasis. La candidiasis clínica es una manifestación de la adherencia de las células de levadura al tejido de la mucosa seguida de una invasión hifal que causa un daño extenso, en parte mediado por enzimas proteolíticas secretadas (19).

Aunque las infecciones por candidiasis son en su mayoría superficiales, afectan la superficie de la mucosa en el lugar de la infección, su naturaleza invasiva puede conducir a infecciones sistémicas mucho más graves con un alto grado de mortalidad. De hecho, los estudios han indicado que la colonización de la mucosa por *Candida* es un factor de riesgo significativo

para infecciones sistémicas posteriores en pacientes. Dado el estado inmunocomprometido de muchos pacientes hospitalarios, esto ha llevado a que las infecciones por *Candida* sean la tercera o cuarta infección más común en el torrente sanguíneo nosocomial <sup>(20)</sup>.

### 2.2.2. *Saccharomyces cerevisiae*

*Saccharomyces cerevisiae* ha sido ampliamente utilizado por los seres humanos durante miles de años y es una de las especies microbianas más importantes de la historia humana. Debe esta distinción a un solo rasgo: su capacidad para producir alcohol a partir de azúcar. Si bien también es útil para cultivar pan, producir combustible y expresar proteínas de ingeniería deseables, fue la demanda de bebidas alcohólicas lo que motivó el estudio científico de la levadura de Pasteur (1897) y los Laboratorios de Investigación Carlsberg (Hansen 1896). Desde entonces, *S. cerevisiae* ha logrado una segunda distinción: es el organismo modelo genético mejor comprendido (Figura 4).



**Figura 4.** *Saccharomyces cerevisiae* <sup>(21)</sup>.

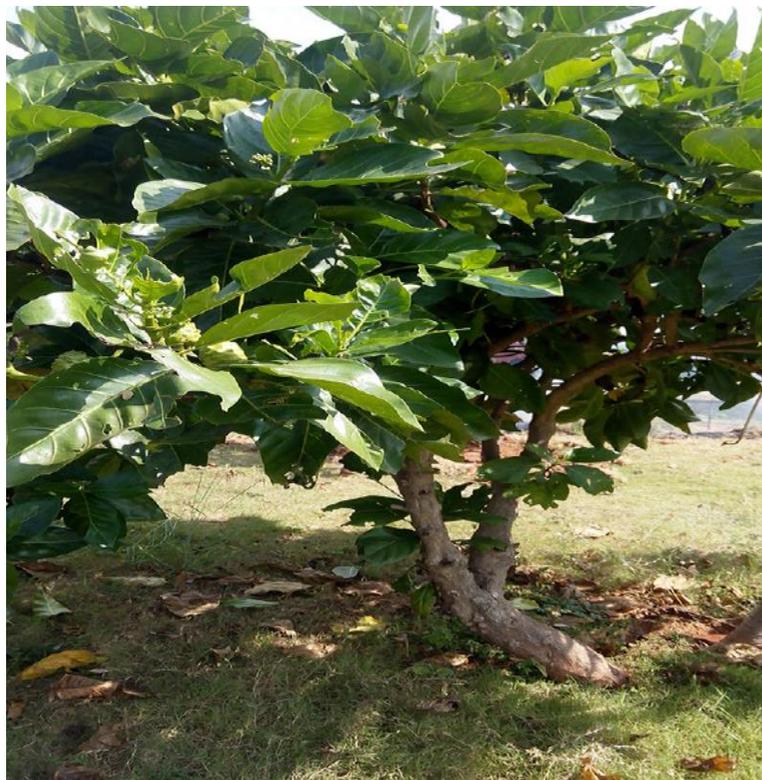
*Saccharomyces cerevisiae* fue el primer eucariota en tener su genoma completamente secuenciado, y su genoma sigue siendo el mejor anotado y más manejable para las manipulaciones y análisis genéticos. Enormes

proyectos están en proceso de determinar las funciones biológicas y las interacciones genéticas de cada parte del genoma en una escala sin precedentes en ningún organismo. *Saccharomyces cerevisiae* ha sido clave para numerosos avances importantes en genética, bioquímica y biología celular <sup>(22)</sup>.

### 2.2.3. *Morinda citrifolia* L.

#### a) Características botánicas

*Morinda citrifolia* L. ha sido reconocida como una hierba importante para el tratamiento de diversos trastornos fisiológicos en todo el mundo. *M. citrifolia*. Identificables de esta planta son sus enormes hojas brillantes de color verde oscuro y elípticas <sup>(23,24)</sup> (Figura 5).



**Figura 5.** Planta de *Morinda citrifolia* <sup>(23)</sup>.

Las flores son tubulares blancas que consisten de 75-90 ovoides a cabezas globosas, corola blanca de 5 lóbulos (Figura 6).



**Figura 6.** Flores de *Morinda citrifolia* <sup>(23)</sup>.

El fruto de cuerpo ovalado ovoide de color blanco amarillento, de aproximadamente 12 cm de tamaño, compuesto por numerosos ovarios fusionados y maduros, cada uno separado de la flor blanca.



**Figura 7.** Fruto de *Morinda citrifolia* <sup>(23)</sup>.

La fruta verde es de color verde oscuro y la fruta madura libera un fuerte ácido butírico que tiene un olor descompuesto. La pulpa es jugosa y amarga, ligera de color blanco amarillento opaco, gelatinosa cuando se

rasga la fruta; Se encuentran numerosos hoyos triangulares duros de color marrón rojizo (Figura 7) <sup>(23,24)</sup> .

### **b) Uso etnobotánico**

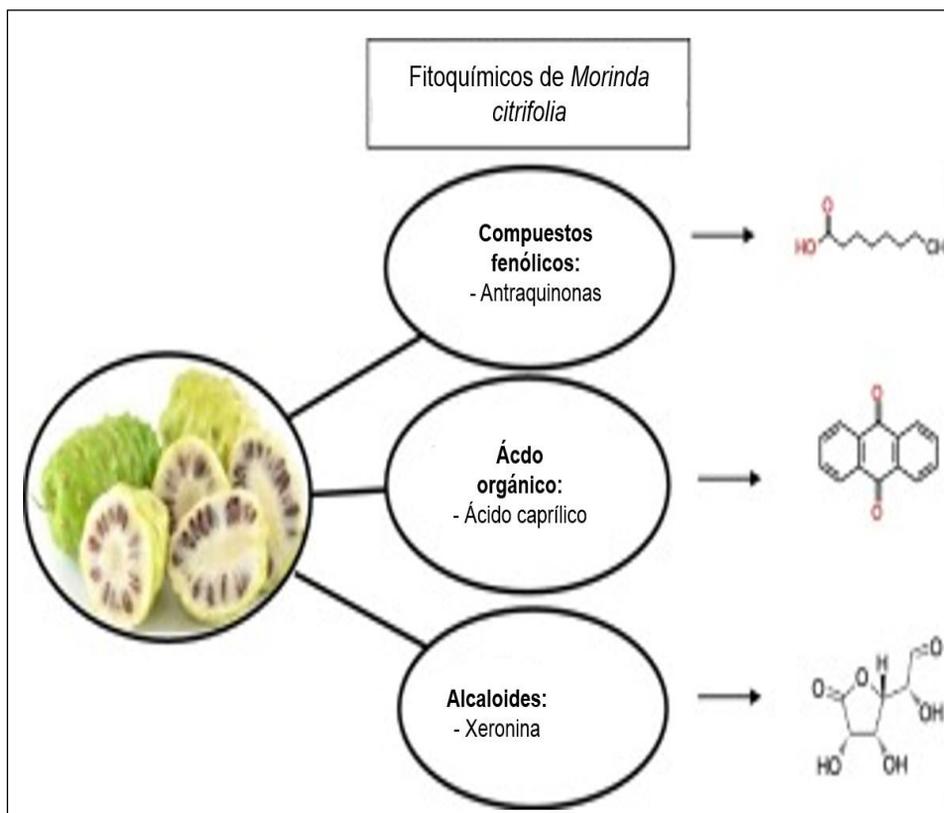
Se ha informado de que *M. citrifolia* tiene una amplia gama de usos terapéuticos en enfermedades como artritis, quemaduras, cefaleas, heridas e infecciones de la piel.

En Polinesia se ha cultivado el noni durante más de 1000 años, donde se utiliza como agente colorante, medicina y alimento. Los australianos e indios han utilizado la raíz como agente para teñir en diferentes de colores rojo, púrpura y amarillo.

Las hawaianas y tahitianas utilizan tradicionalmente varias partes de la planta de noni, como el tallo, la corteza, la raíz, la hoja y las frutas. En el tratamiento de enfermedades como la tos, el resfriado, el dolor y las enfermedades del hígado, hipertensión, presión arterial, tuberculosis, malaria, gusanos intestinales, diabetes, pérdida del apetito, hernias, infección del tracto urinario, trastorno menstrual, cáncer, enfermedades cardiovasculares, artritis, etc. <sup>(23,24)</sup> .

### **c) Fitoquímica**

Se ha informado de que diferentes partes de la planta de noni contienen más de 160 fitoconstituyentes de los cuales más de 120 constituyentes tienen propiedades nutraceuticas con actividad biológica probada. Los componentes presentan los no volátiles y volátiles, compuestos fenólicos, ácidos orgánicos, alcaloides (Figura 8), cetonas, lactonas, betacarotenoides, terpenoides, proxeronina.



**Figura 8.** Principales metabolitos activos del noni (25).

A continuación desarrollaremos los principales fitoquímicos:

### - **Ácido gálico**

El ácido gálico reduce la inmunoglobulina E (IgE) que indujo la liberación de histamina de los mastocitos. El efecto inhibitorio del ácido gálico en la liberación de histamina fue mediado por la modulación del cAMP y el calcio intracelular. El ácido gálico disminuye la expresión y producción del gen de citocina proinflamatoria estimulada por el ácido 12-miristato y el ionóforo de calcio A23187, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y la interleucina-6 (IL-6) en mastocitos humanos.

### - **Ácido ursólico**

Posee un efecto anticancerígeno que previene el crecimiento externo e interno de células cancerosas e induce la apoptosis mediante la modulación del proceso inmunológico del cuerpo.

#### **- Alizarina y limoneno**

Se informan que inhiben la formación tumores en los de vasos sanguíneos por sus propiedades antiangiogénesis. Así, el noni inhibe el crecimiento y las mutaciones de las células malignas e induce la muerte celular programada o la apoptosis.

#### **- Betacaroteno**

Los betacaroteno reducen el radical libre de oxígeno y previene el daño oxidativo. También informaron que el uso a largo plazo de dosis moderadas de betacaroteno redujó significativamente la incidencia de cáncer de próstata en fumadores masculinos.

#### **- Citrifolinósido**

El citrifolinósido aislado de las hojas de la planta de *M. citrifolia* mostró una inhibición significativa de la actividad de la Proteína Activadora-1 (AP-1) inducida por UV- B en cultivos celulares.

#### **- Damnacanthal**

Damnacanthal, es una antraquinona, que inhibe la función de células cancerígenas. Además, se encontró que Damnacanthal induce la detención del ciclo celular (CC) en el punto de control G1 en células MCF-7. El resultado proporcionó pruebas significativas para demostrar que el damnacantal mediado por p53 indujo apoptosis a través de la activación de p21 y caspasa-7.

#### **- Monoterpeno**

Se ha demostrado que un monoterpeno, limoneno presente en la fruta de noni, previene el cáncer de mama, hígado, pulmón y otros tipos de cáncer. El limoneno estimula la glándula del timo para segregar más células T que destruyen las células del carcinoma.

### **- Polisacáridos**

El ácido glucorónico, la galactosa, la arabinosa, la ramnosa, los glucósidos y el éster de ácido graso trisacárido mostraron actividad inmunoestimuladora, inmunomoduladora, antibacteriana, antitumoral y anticancerígena. El pentaacetato de 6-D-glucopiranososa son polisacáridos sulfatados, que minan la interacción entre glucosaminilil proteínas. Esto ayuda a bloquear la capacidad de las células mutadas para adherirse a nuevas células que detienen la metástasis.

### **- Xeronina**

Noni contiene proxeronina que se combina con la enzima presente en el cuerpo humano denominada proxeroninasa para formar xeronina, que puede ayudar a aumentar el tamaño de los poros de las células tumorales y permitir que los medicamentos contra el cáncer ingresen a las células más fácilmente. Además, la xeronina aumenta la permeabilidad de los iones  $K^+$  y previene la formación de ácido láctico a partir de la glucosa (23,26,27).

## **d) Propiedades farmacológicas**

### **- Actividad inmunoestimulante**

La administración conjunta de zumo de noni e inmunosupresores redujo el efecto inmunoestimulador en ratones, lo que confirma la acción del noni como agente inmunomodulador que puede interferir en la respuesta inmune en diferentes condiciones patológicas.

Tanto el extracto hidroalcohólico como el extracto acuoso de noni incrementaron la proliferación de esplenocitos *in vitro* y estimularon la actividad de los linfocitos B y T (28).

### **- Actividad antitumoral**

En la medicina popular, *M. citrifolia* se usa como complemento alimenticio en pacientes con diferentes tipos de cáncer. En el modelo murino, se demostró que el extracto etanólico de hojas de noni actúa sobre las

células tumorales y sobre las vías involucradas en la respuesta inmunológica a través de la supresión de la ciclooxigenasa 2 (COX2), un importante marcador inflamatorio y el aumento del gen supresor de tumores <sup>(29)</sup>.

El papel de los hongos que se encuentran en las hojas y frutos de noni se ha demostrado que inhiben las células tumorales *in vitro*, fue estudiada por Wu et al. (2015), quienes demostraron que los endófitos presentes en las hojas de *M. citrifolia* que inhiben el crecimiento en las líneas celulares de cáncer en humanos <sup>(30)</sup>.

#### **- Actividad antibacteriana y antiséptica**

Los hidrocoloides irreversibles se utilizan en odontología como material de moldeo en la confección de restauraciones dentales. El uso de extracto de *M. citrifolia* con polvo hidrocoloide. en la preparación de impresiones dentales disminuyó. contaminación por microorganismos, sin dañar el medio calidad del material <sup>(31)</sup>.

El extracto de fruta etanólica también actúa. contra *E. coli* e inhibe el crecimiento *in vitro* de los *Staphylococcus aureus* <sup>(32)</sup>.

#### **- Actividad neuroprotectora**

Recientemente, se han realizado varios estudios para evaluar los efectos de *M. citrifolia* en el sistema nervioso. La mayoría de ellos evaluaron el comportamiento de ratas o ratones en pruebas de preferencia de lugar condicionadas, inducidas por la administración de drogas como el alcohol y la heroína. En ambos casos, se demostró que la administración del extracto metanólico de frutos de *M. citrifolia* disminuyó los efectos de la heroína y la dependencia del alcohol <sup>(33,34)</sup>.

## 2.3. Marco conceptual

### - Antifúngico

Medicamento que contrarresta la reproducción o eliminación de hongos patógenos. Un agente antifúngico ideal debería cumplir los siguientes: a) Tener un amplio espectro de actividad contra una variedad de hongos de levadura y filamentosos, b) ser fungicida en lugar de fungistático, c) estar dirigida a una diana fúngica específica , y d) tener efectos secundarios o toxicidades mínimos. <sup>(35)</sup>.

### - Candidiasis invasiva

La candidiasis invasiva ocurre con frecuencia en pacientes hospitalizados, y se asocia con altas tasas de mortalidad debido a retrasos en el reconocimiento e inicio de antifúngicos apropiados. <sup>(36)</sup>.

### - Candidiasis oral

La candidiasis oral es la infección micótica oportunista más común entre los individuos inmunocomprometidos <sup>(37)</sup>.

### - Candidiasis vulvovaginal

Candidiasis vulvovaginal es una enfermedad de alta incidencia que afecta seriamente la calidad de vida de las mujeres en todo el mundo, particularmente en sus formas crónicas y recurrentes y sin una cura definitiva ni medida preventiva <sup>(38)</sup>.

### - Fitoquímicos

Los fitoquímicos son metabolitos secundarios estructuralmente diversos sintetizados por las plantas y también por microorganismos endófitos no patógenos que viven dentro de las plantas. <sup>(39)</sup>.

### - Hongos oportunistas

Los hongos oportunistas son una causa importante de infecciones nosocomiales invasivas, particularmente en pacientes con estadías prolongadas en unidades de cuidados intensivos; catéteres venosos

centrales; cirugía reciente e inmunosupresión, como aquellas con trasplante de células madre hematopoyéticas y tumores malignos hematológicos <sup>(40)</sup>.

#### **- Levadura: *Saccharomyces cerevisiae***

El organismo modelo *Saccharomyces cerevisiae* se conoce comúnmente como levadura de panadería o levadura de cerveza. Para los científicos, *S. cerevisiae* se clasifica como un hongo o levadura, es un eucariota unicelular y, por lo tanto, contiene orgánulos unidos a la membrana, como un núcleo, un sistema endomembrana y mitocondrias <sup>(41)</sup>.

#### **- Micosis de la piel**

Estas son infecciones por hongos que afectan las capas superficiales de la piel, el cabello y las uñas <sup>(42)</sup>.

#### **- Micosis sistémica**

Las infecciones micóticas sistémicas incluyen tanto la micosis oportunista como la endémica, y se asocian con altas tasas de mortalidad si no se diagnostican y tratan fácilmente <sup>(43)</sup>.

#### **- Micosis superficial**

Las micosis superficiales reales son infecciones por hongos de la capa córnea o de la cutícula del cabello, en las cuales la respuesta inmune mediada por las células del huésped es mínima o está ausente. La presencia de hongos rara vez es sintomática, lo que hace que la infección sea crónica. Son: piedra blanca, piedra negra, tiña negra y pitiriasis versicolor <sup>(42)</sup>.

#### **- Resistencia antifúngica**

Las células fúngicas deben adaptarse comúnmente a la presencia de drogas tóxicas; las estrategias de supervivencia molecular primaria incluyen la mutación de dianas farmacológicas que reduce su afinidad por el fármaco, la sobreexpresión de la proteína diana por modificación de la región promotora del gen y la expresión de un sistema de flujo de salida <sup>(44)</sup>.

## **2.4. Formulación de la hipótesis**

**H1:** El extracto acuoso de *Morinda citrifolia* “Noni” tiene efecto antifungico frente a *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae*.

**H0:** El extracto acuoso de *Morinda citrifolia* “Noni” no tiene efecto antifungico frente a *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae*.

## 2.5. Operacionalización de las variables

Variables	Definición operacional	Dimensión	Indicadores	Escala de medición
<b>Independiente:</b> Extracto acuoso de <i>Morinda citrifolia</i>	Mezcla compleja, con multitud de compuestos químicos, obtenible por procesos físicos, químicos y/o microbiológicos a partir de una fuente natural.	Concentración del extracto acuoso	50%  75%  100%	Cualitativa  Nominal
<b>Dependiente:</b> Efecto antifungico sobre <i>Candida albicans</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Los hongos del genero <i>Candida</i> y <i>Saccharomyces</i> son susceptibles a los antimicóticos, aunque existe la posibilidad del efecto con plantas con actividad antifúngica	Inhibición del crecimiento	Sensibilidad  Resistencia	Cualitativa  Nominal

## CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

### 3.1. Tipo y nivel de la investigación

El presente trabajo de investigación pertenece al tipo analítico, experimental, prospectivo y longitudinal.

Se utilizó la metodología descriptiva porque se observó y describió el efecto antifúngico y los productos vegetales al utilizar la técnica de microdilución en placa sobre *Candida albicans* ATCC 90028 y *Saccharomyces cerevisiae* Según la participación del estudio es experimental. La investigación tipo experimental se presenta mediante la manipulación de una variable experimental, en condiciones rigurosamente controladas, con el fin de describir de qué modo o por qué causa se produce una situación o acontecimiento particular (Baena Paz et al 2014) <sup>(45)</sup>.

De acuerdo los criterios expuestos de Hernández, Fernández y Baptista (2010), la investigación es de tipo aplicada ya que modificara la variable dependiente por medio de la aplicación de la variable independiente, buscando con ello aportar a la solución de la realidad de la problemática <sup>(46)</sup>

### 3.2. Descripción del método y diseño

#### 3.2.1. Recolección y preparación de la muestra

Se adquirió 2 kg de frutos de *Morinda Citrifolia* “noni” en el mercado de Ate-Vitarte de la ciudad de Lima, los frutos fueron provenientes de Tingo María ubicado en el distrito de Rupa Rupa, Provincia de Leoncio Prado, Departamento de Huánuco; a una altitud de 660 m.s.n.m., a 09° 17' 08" de Latitud Sur, a 75° 59' 52" de Latitud Oeste, con clima tropical húmedo y con una humedad relativa media de 84% y temperatura media anual de 24 °C.

Para los análisis cualitativos de identificación de metabolitos secundarios se aplicó el método de Eswar et al 2015 <sup>(47)</sup>.

De acuerdo al método modificado de Guevara (2015), se seleccionaron seis frutos maduros de aspecto turgente sin magulladuras, color grisáceo, 8 cm de longitud. Los frutos fueron lavados, desmenuzados y sometidos a un licuado suave, luego se filtró dos veces el licuado para descartar todo tipo de materia grosera y extraña <sup>(48)</sup>.

Del filtrado se tomaron 5 gramos, los cuales fueron diluidos en 1000 mL de agua destilada, para obtener una solución madre de noni, de esta solución se prepararon la dilución experimental al 5%. Lo cual se utilizó de referencia para la todo el proceso de la obtención de nuestro extracto, se trabajó con el extracto acuoso al 50%, 75% y 100% utilizándose como disolvente agua destilada <sup>(48)</sup>.

### **3.2.2. Obtención del jugo de noni**

Con el método de Cabrera variado (2012), de los frutos de noni obtenidos se seleccionaron aproximadamente unos 3 a 4 frutos maduros por tratamiento, los mismos fueron lavados con agua potable, luego triturados con todo y semilla en una licuadora, seguidamente se separaron las semillas y cascarillas mediante un colador. Después de obtener el jugo puro se colocó en un recipiente, el cual se llevó a las concentraciones del 4% v/v, 7% v/v y 10% v/v <sup>(49)</sup>.

Aplicamos el método, según Sullón (2009), una vez obtenida la fruta de noni (*Morinda citrifolia* L.) en el laboratorio, estas fueron lavadas y separadas los pintones, maduros y sobre maduros para la obtención del jugo de la fruta de los tres estados de madurez, estas fueron cortadas en trozos pequeños para extraer las semillas, luego para el pintón se utilizó un extractor para obtener el jugo el cual fue recibido en un vaso de precipitado. Para el caso de la fruta madura y sobre madura se procedió a cortar en partes muy pequeñas, se colocó en una gasa y se presionó para obtener el jugo <sup>(50)</sup>.

Una vez obtenido el jugo estas fueron diluidas con metanol al 96% en una concentración de 10 mL de metanol con 3 mL de jugo (300 mg/mL). Esta

primera concentración es agitada y separada en micro tubos para ser sometido a centrifugación a una velocidad de 10,000 rpm durante 5 minutos a una temperatura de 20°C. A partir de esta concentración se prepararon las demás concentraciones de 10, 30 y 100 mg/mL se almacenó en frasco color ámbar de boca ancha y se conserva en el refrigerador hasta posterior uso <sup>(50)</sup>.

### **3.2.3. Análisis microbiológico**

El método que se aplicó para el análisis de la actividad antifúngica fue el método por difusión en Agar, donde se empleó discos de papel filtros embebidos con 20uL del extracto acuoso de noni al 100%, 75%, 50% sobre *Cándida Albicans* y *Saccharomyces cerevisiae* y como controles positivos se utilizó fluconazol 150mg, clotrimazol 1% y como control negativo suero fisiológico.

### **3.2.4. Evaluación de la actividad antifúngica**

Para la evaluación de actividad antifúngica con la cepa de *Cándida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae* y con dos fármacos fluconazol, clotrimazol fue para comprobar su efecto del extracto acuoso de *Morinda citrifolia*, luego se realizó lo siguiente: la activación de la cepa, la preparación del inóculo, inoculación (Difusión en agar).

### **3.2.5. Activación de la cepa micótica**

Se utilizó ocho placas Petri con agar Sabouraud Dextrosa para la activación de la cepa de *Cándida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae* por 7 días a 37°C.

### **3.2.6. Preparación de los medios de cultivo**

El medio de cultivo con agar Sabouraud – Dextrosa fue preparado siguiendo las indicaciones del fabricante, distribuyéndose luego en 6 placas Petri a razón de un espesor de 4mm por placa. Se dejó de

reposar a temperatura ambiental y por último se rotulo con las sustancias de estudio.

### **3.2.7. Inoculación**

Se inocularon las cepas de *Cándida Albicans* y *Saccharomyces cerevisiae*, en las 6 placas Petri (en Agar Sabouraud Dextrosa), empleando un asa de siembra para asegurar una distribución uniforme del inóculo, posteriormente se cerró las placas y se dejó secar durante 3 a 5 minutos a temperatura ambiente antes de colocar los discos con las respectivas sustancias antifungica. Una vez absorbido el inóculo y con la ayuda de una pinza estéril se procedió a colocar 4 discos (con las diferentes sustancia a estudiar) por cada placa.

Se realizó 8 repeticiones por cada tratamiento para luego colocarlas en la incubadora para darle la temperatura idónea. Las placas fueron llevadas a la incubadora de 37°C por el resto de la investigación, siendo únicamente retirados de la estufa para medir los halos de inhibición, generados a partir de las 24 y 48 horas.

### **3.2.8. Lectura**

Se realizó midiendo los halos de inhibición con el calibrador vernier o regla pie de rey sobre el crecimiento de los hongos alrededor del disco. Estos datos fueron plasmados en la ficha de recolección de datos.

## **3.3. Población y muestra:**

### **3.3.1. Población**

La población estuvo constituida por placas de agar Sabouraud Dextrosa con cepas de *Cándida Albicans* ATCC 10231 y *Saccharomyces cerevisiae* cepas de adquirida de la Instituto Nacional de Salud (INS) - Lima, estas fueron cultivadas en el laboratorio de la Universidad Interamericana para el Desarrollo, donde se lleva a cabo la ejecución de esta investigación.

### 3.3.2. Muestra

La muestra estuvo conformada por 4 placas de agar Sabouraud Dextrosa con cepas de *Cándida Albicans* y 4 placas con cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Ambos crecieron a temperatura de 37°C, en 1-4 días y 2- 5 días respectivamente.

#### a) Criterios de inclusión

- Planta que ha cumplido con los requisitos mencionados en la selección de la muestra (noni)
- Hongos de la especie *Cándida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae* en agar Sabouraud Dextrosa que no estén contaminados con otros microorganismos patógenos.
- Extracto acuoso de *Morinda citrifolia* realizado en la Universidad Interamericana para el Desarrollo.

#### b) Criterios de exclusión:

- Hongos *Cándida Albicans* y *Saccharomyces cerevisiae* que no han sido cultivadas bajo las condiciones adecuadas para su crecimiento.
- Hongo *Cándida Albicans* y *Saccharomyces cerevisiae* cultivadas en Agar, que no tengan las características en cuanto forma, color, espesor y crecimiento inadecuado.

### 3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos:

La técnica de datos se realizó a través de la observación y los instrumentos de aplicación serán con la ficha de control.

### 3.5. Técnicas de procesamiento y análisis de datos:

Para el procesamiento de la base de datos se empleó el programa estadístico SPSS versión 21 empleando la prueba T de Student para muestras relacionadas y el programa Excel para la elaboración de gráficos.

### **3.6. Aspectos éticos**

El desecho de las muestras en el presente estudio se basó en las normas dadas por el protocolo de eliminación de desechos biológicos del laboratorio de la Universidad Interamericana para el Desarrollo.

## CAPITULO IV: PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

### 4.1. Presentación de resultados

Aplicando el método de análisis cualitativo se identificó los principales metabolitos, véase Tabla 1.

**Tabla 1.** Identificación de los metabolitos secundarios de la especie *Morinda citrifolia* L. “noni”

Metabolitos secundarios	Reactivo	Observación	Resultados
	Blanco del extracto sin reactivos.	Coloración característica del extracto	Solubilidad total
Flavonoides	Shinoda	Coloración roja	+
	AlCl <sub>3</sub>	Fluorescencia amarilla (luz U.V)	+
Alcaloides	Dragendorff	Precipitado rojo naranja	+
	Mayer	Precipitado blanco	+
	Popoff	Precipitado amarillo	+
	Wagner	Precipitado pardo oscuro	+
Compuestos fenólicos	FeCl <sub>3</sub>	Coloración verde azulado	+
Taninos	Gelatina	Precipitado blanco	+
Saponinas	Solvente agua destilada	Precipitado en el borde superior espuma	+

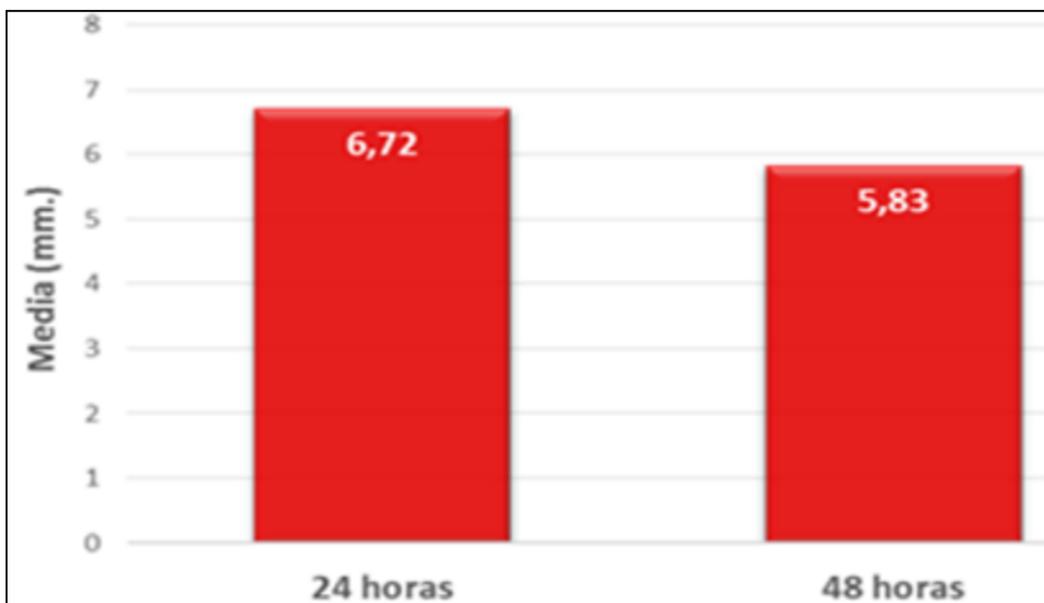
Los hallazgos fueron los flavonoides, alcaloides, compuestos fenólicos, taninos y saponinas. No se ubicó ni carbohidratos, proteínas o aminoácidos. Estos principios fitoquímicos nos dan un indicio de sus capacidades de presentar efectos fitofarmacológicos sobre la actividad en especies de hongos, aunque es importante resaltar que en los análisis preliminares generalizan su presencia en la especie vegetal.

En la Tabla 2 y Gráfico 2, se evidencia el grado de eficacia del extracto acuosa de *Morinda citrifolia* al 50% en la inhibición del crecimiento de *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae* a las 24 y 48 horas.

**Tabla 2.** Medición del efecto antifúngico del extracto acuoso de *Morinda citrifolia* al 50%

Tiempo	Eficacia antifúngica		P
	Media (mm)	Desviación Estándar (mm)	
24 horas	6,72	0.37	0,012
48 horas	5,83	0.51	

El Test de Student:  $p=0,012 < 0,05$  destaca que existe diferencia estadísticamente significativamente.



**Gráfico 2.** Grado de eficacia del efecto antifúngico del extracto acuoso de *Morinda citrifolia* al 50%

El grado de eficacia de *Morinda citrifolia* al 50% fueron los siguientes:

- A las 24 horas  $6.72 \pm 0.37\text{mm}$
- A las 48 horas  $5.83 \pm 0.51\text{mm}$

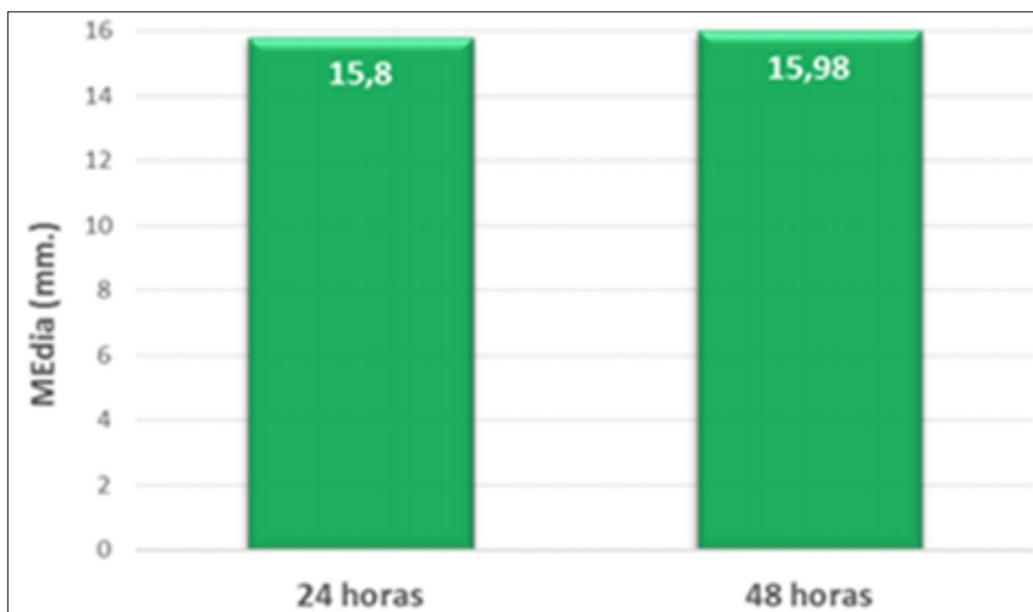
Diferencia que fue estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) por lo tanto se observa una disminución de la eficacia del extracto acuoso al 50%.

Referente a la Tabla 3 y Gráfico 3, se observa el grado de eficacia del extracto acuoso de *Morinda citrifolia* al 75%.

**Tabla 3.** Medición del efecto antifúngico del extracto acuoso de *Morinda citrifolia* al 75%

Tiempo	Eficacia antifúngica		P
	Media (mm)	Desviación Estándar (mm)	
24horas	15,80	0,73	0,570
48 horas	15,98	0,80	

T de Student:  $p=0,570 > 0,05$ . No existe diferencia estadísticamente significativa.



**Gráfico 3.** Grado de eficacia del efecto antifúngico del extracto acuoso de *Morinda citrifolia* al 75%

El grado de eficacia del extracto acuoso al 75% en la inhibición del crecimiento de *Cándida Albicans* y *Saccharomyces cerevisiae* fueron los siguientes:

- A las 24 horas  $15.80 \pm 0.73\text{mm}$
- A las 48 horas  $15.98 \pm 0.70\text{mm}$

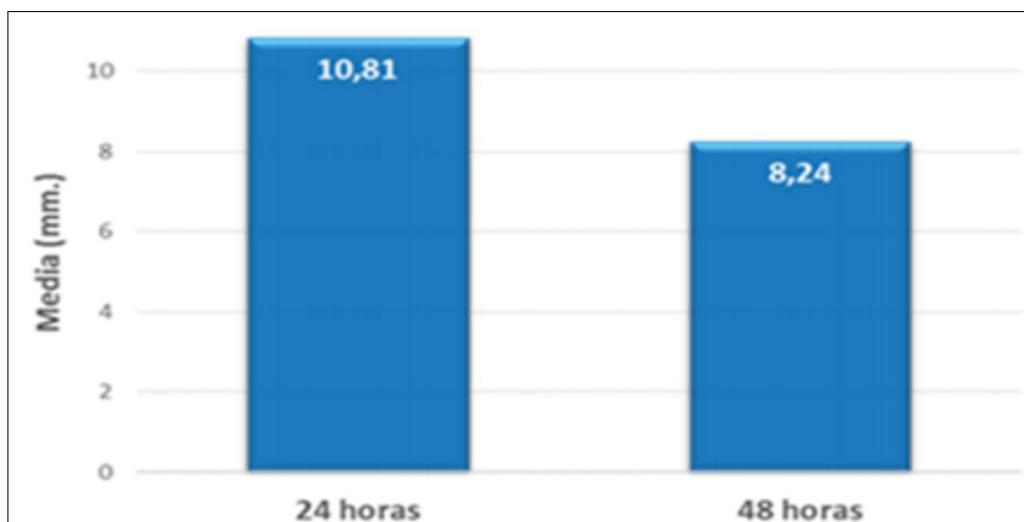
La diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p>0,05$ ) por lo tanto se observa una disminución de la eficacia del extracto acuoso de noni

Se observa en la Tabla 4 y Gráfico 4, las medias (mm) del noni a la concentración del 100%.

**Tabla 4.** Medición del extracto acuoso de *Morinda citrifolia* al 100%

Tiempo	Eficacia antifúngica		P
	Media (mm)	Desviación Estándar (mm)	
24 horas	10,81	0,79	,360
48 horas	8,24	0,75	

T de Student:  $p=0,360>0,05$  No existe diferencia estadísticamente significativa.



**Gráfico 4.** Grado de eficacia del efecto antifúngico del extracto acuoso de *Morinda citrifolia* al 100%

El grado de eficacia del extracto acuoso de noni al 100% en la inhibición fueron los siguientes:

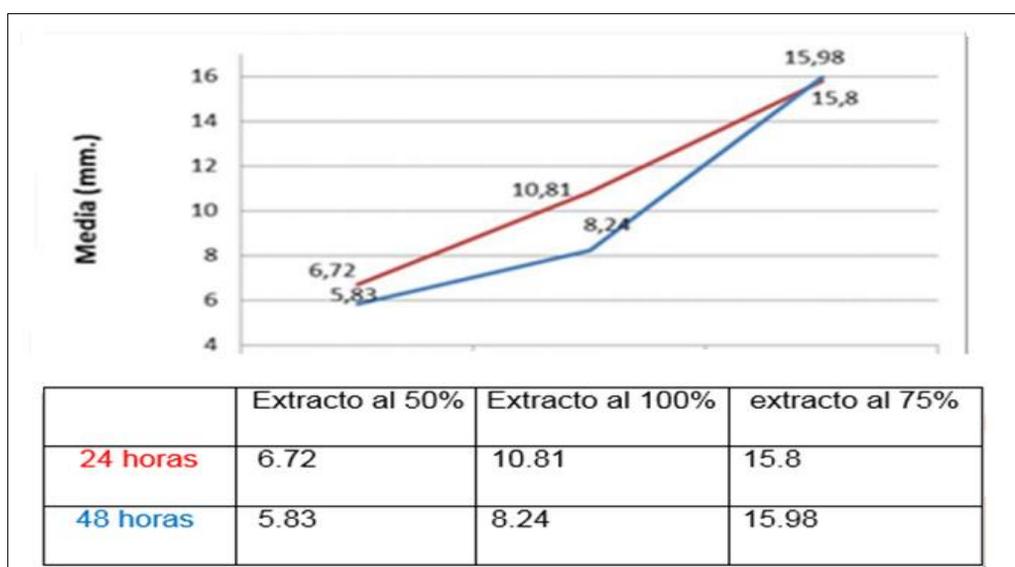
- A las 24 horas  $10.81 \pm 0.79\text{mm}$
- A las 48 horas  $8.24 \pm 0.75\text{mm}$

Diferencia que no fue estadísticamente significativa ( $p>0,05$ ) por lo tanto se observa una disminución de la eficacia del extracto acuoso de noni.

En la Tabla 5 y Gráfico 5, observamos las diferencias entre las concentraciones

**Tabla 5.** Medición del extracto acuoso de *Morinda citrifolia* en las concentraciones de 50%, 75% y 100%.

	Tiempo			
	24 horas		48 horas	
Medición	Media(mm)	D.S.(mm)	Media(mm)	D.S.(mm)
Extracto al 50%	6 - 6.72	0.37	5.83	0.51
Extracto al 75%	15.80	0.73	15.98	0.80
Extracto al 100%	10 - 10.81	0.79	8.24	0.75



**Gráfico 5.** Grado de eficacia del extracto acuoso de *Morinda citrifolia* a concentración de 50%, 75% y 100%

El extracto acuoso de *Morinda citrifolia* al 100 % demostró mayor sensibilidad que la concentración de 50%. Sin embargo la concentración al 75 % demostró un rango superior de sensibilidad frente a las muestras de *Cándida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae* a las 24 y 48 horas.

#### 4.2. Discusión

De los resultados en la Tabla 1, entre los principales metabolitos secundarios que presenta el fruto de *Morinda citrifolia* L se encuentran los alcaloides, compuestos fenólicos, flavonoides taninos y saponinas. Coinciden con los obtenidos por Suurbaar et al (2016) confirmando las propiedades antifúngicas sobre *Candida albicans*, de *Ricinus communis* y mostró que los fitoquímicos biológicamente relevantes de las hojas de esta planta se pueden extraer con los disolventes acuosos, metanol y etanol. La presencia de taninos, saponinas, flavonoides, alcaloides y antraquinonas puede originar actividad antimicótica. Los taninos y flavonoides poseen un mecanismo similar al proporcionar una fuente de radicales libres estables y también forman complejos con aminoácidos nucleofílicos en proteínas que conducen a la inactivación de la proteína y la pérdida de la función, su potencial efecto antifúngico es grande, ya que probablemente se dirigen a las células microbianas de la superficie. Las saponinas tienen la capacidad de causar fugas de proteínas y ciertas enzimas de la célula <sup>(51)</sup>.

En otras investigaciones, los fitoquímicos presentes en las hojas de *Carya illinoensis* fueron identificados por primera vez por Bottari et al. (2017), y se determinó la actividad antimicrobiana de sus extractos acuosos y etanólicos. Ambos extractos efectos contra siete cepas de referencia de *Cándida*. Los flavonoides (rutina) y los taninos (catequinas y epicatequinas) probablemente fueron responsables, en parte, de la actividad contra las cepas de *Cándida* <sup>(52)</sup>.

Correia et al. (2016) evaluaron las propiedades antifúngicas de seis plantas en Brasil que se usan comúnmente en medicina popular (extractos etanólicos y acuosos) contra diferentes cepas de referencia de *Cándida* mediante el método de difusión en disco. Entre estas plantas, las más

prometedoras fueron *Eugenia dysenterica* y *Pouteria ramiflora*. Mostraron excelente actividad contra el género *Candida*. Un análisis fitoquímico de extractos activos de estas plantas se describe como componentes principales flavonoides y catequinas (taninos) <sup>(53)</sup>.

En la revisión de Negri et al (2014), reporta que el alcaloide 2-hidroxi-9-metoxiaporfina, aislado del extracto de la especie *Beilschmiedia*, mostró una potente actividad contra *C. albicans* con una CIM de 8 µg / mL. Otra planta, *Chelidonium majus*, contenía los alcaloides 8-hidroxihidrosanguinarina y 8-hidroxihidrocelerytrina en su extracto de etanol, y estos compuestos mostraron una fuerte actividad antifúngica cuando se probaron contra *Candida* spp. También resalta que ocho saponinas esteroideas de *Tribulus terrestris* L., evaluaron sus actividades antifúngicas *in vivo* frente a seis levaduras resistentes a fluconazol (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. neoformans*). Dos compuestos fueron muy efectivos contra varias especies patógenas de *Candida* y *C. neoformans*. Por lo tanto las saponinas es terapéuticamente prometedora, en particular para los pacientes que no responden a la terapia convencional <sup>(54)</sup>.

En cuanto a las Tablas y Gráficos de medición y sensibilidad del extracto noni, a la dosis porcentual del 75 % con un grado de sensibilidad de 15,8 mm y 15,98 mm, demostró un rango superior de sensibilidad frente a 50% (6,72 mm y 5,48 mm) y 100% (10,81 mm y 8,24 mm) en *Cándida Albicans* y *Saccharomyces cerevisiae* a las 24 y 48 horas. Nuestros hallazgos se confirman con el estudio de Khan et al (2017), con seis plantas y sus extractos de mostraron una buena actividad antimicrobiana contra aislados de *Cándida* resistentes a múltiples fármacos aislados de especímenes clínicos. Se encontró que las zonas de inhibición, particularmente el extracto de *Allium sativum*, mostraron la mayor actividad con una zona de inhibición de 18 mm contra el aislado de hongos del género *Candida*. Los extractos de *Azadirachta indica*, *Cordia dichotoma*, *Syzigium cumini*, *Trigonella foenum grecum* y *Ocimum sanctum* también mostraron una actividad significativa contra cepas con los resultados 17 mm, 17 mm, 17

mm, 17 mm, 16 mm y 15 mm respectivamente a una concentración de 300 mg / mL analizada. <sup>(55)</sup>.

Otros autores también han observado zonas de inhibición más altas con extracto etanólico de *Azadirachta* y *Trigonella*, lo que apoya nuestros resultados <sup>(56)</sup>. Sin embargo Otang et al (2012), con los extractos de hexano y acetona fueron activos contra al menos uno de los hongos con zonas de inhibición que varían de 8 a 32 mm, mientras que ninguno de los extractos acuosos fue activo contra ninguno de los hongos. La actividad inhibitoria de los extractos activos, basada en los diámetros de inhibición medios globales, Los hongos más susceptibles, basados en el diámetro medio total de la inhibición del crecimiento, fueron *Candida glabrata*, *C. krusei* y *Microsporium canis* <sup>(57)</sup>.

En la investigación de Shirani et al (2017), mediante el extracto hidroalcohólico de *Allium tripedale* contra las especies de *Cándida* (*C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. krusei*) utilizando el ensayo de difusión por disco, evidenció una fuerte actividad anti-cándida (zona de inhibición  $\geq 20$  mm), actividad contra *Cándida* moderada (zona de inhibición <12-20 mm) y ninguna inhibición (zona <12 mm). Además, el extracto hidroalcohólico exhibió las propiedades antifúngicas más altas contra las cepas de *Candida albicans* <sup>(58)</sup>.

Nasrollahi et al (2015), examinaron las propiedades antifúngicas de los extractos de hojas de olivo contra *Cándida albicans* PTCC-5027. La actividad antifúngica del extracto se analizó midiendo la concentración inhibitoria mínima (CMI) y la concentración fungicida mínima (CFM), utilizando la prueba de microdilución y el ensayo de difusión en disco. Los extractos acuosos de la hoja de olivo mostraron efectos antifúngicos contra la levadura con una CMI de 24 mg / ml, CFM de 48 mg / ml y un diámetro de zona de inhibición de 21 mm. Los resultados indicaron la sensibilidad de *Cándida albicans* PTCC-5027 a extractos acuosos de hojas de olivo <sup>(59)</sup>.

En otra investigación Rani et al (2011), con la especie *Embelia ribes* se evaluó en ocho especies de hongos diferentes empleando varias concentraciones de extracto de semilla (0.5-2.0 mg). Todas las concentraciones de extracto de semilla inhibieron el crecimiento de hongos, mientras que la actividad máxima se observó a una concentración de 2,0 mg de extracto de semilla. Entre las diferentes dosis, el diámetro de las zonas de inhibición varió de 9 a 18 mm en varias especies de hongos y aumentó con el aumento de la concentración de la solución de prueba. En contraste con *Candida albicans* mostraron menos zonas de inhibición (16.0 mm) en comparación con otros organismos <sup>(60)</sup>.

Se puede afirmar que *Morinda citrifolia* contiene varios compuestos bioactivos importantes. Por ello, es una especie vegetal de importancia fitoquímica y farmacéutica. Aunque se requieren estudios adicionales para aislar los ingredientes activos del extracto y dilucidar su mecanismo de acción en diversas enfermedades. Además los diferentes extractos de plantas tienen una actividad significativa contra el género *Cándida* patógena resistente a múltiples fármacos antifúngicos de uso común, como fluconazol, itraconazol, clotrimazol, miconazol, ketoconazol y anfotericina-B. Estos extractos de plantas pueden ser las alternativas potenciales de los antibióticos para evitar su uso excesivo y los efectos secundarios sobre la salud humana y el medio ambiente. También se requieren estudios adicionales para evaluar su eficacia clínica.

## CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1. Conclusiones:

- Los componentes activos del fruto de *Morinda citrifolia* identificados fueron alcaloides, compuestos fenólicos, flavonoides taninos y saponinas
- El grado de mayor sensibilidad que presenta el extracto acuoso de *Morinda citrifolia* mediante la técnica de difusión en disco, se obtuvieron al 50% resultó 6,72 mm y 5,48 mm, el 75 % con un grado de sensibilidad de 15,8 mm y 15,98 mm, y 100% 10,81 mm y 8,24 mm en *Candida Albicans* y *Saccharomyces cerevisiae* a las 24 y 48 horas respectivamente.
- La dosis porcentual del extracto acuoso de noni fue del 100 %, la misma demostró mayor sensibilidad que la concentración de 50%. Sin embargo la concentración al 75 % demostró un rango superior de sensibilidad frente a las anteriores muestras mencionadas de *Cándida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae* a las 24 y 48 horas.

### 5.2. Recomendaciones:

- Se recomienda la continuación de este estudio, ya que es importante la implementación de antimicóticos a base de plantas medicinales para tratar infecciones producidas por hongos como *Cándida albicans* y otros agentes patógenos.
- Se propone realizar futuras investigaciones para evaluar posibles efectos citotóxicos de extracto acuoso de *Morinda citrifolia*.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gamaletsou M, Walsh T, Sipsas N. Invasive Fungal Infections in Patients with Hematological Malignancies: Emergence of Resistant Pathogens and New Antifungal Therapies. *Turk J Haematol.* 2018 Mar; 35(1): 1–11. DOI: 10.4274/tjh.2018.0007.
2. Beardsley J, Halliday C, Chen S, Sorrell T. Responding to the emergence of antifungal drug resistance: perspectives from the bench and the bedside. *Future Microbiol.* 2018; 13(10): 1175–1191. DOI: 10.2217/fmb-2018-0059.
3. Góralaska K, Blaszkowska J, Dzikowiec M. Neuroinfections caused by fungi. *Infection.* 2018; 46(4):443–459. DOI: 10.1007/s15010-018-1152-2.
4. Webb B, Ferraro J, Rea S, Kaufusi S, Goodman B, Spalding J. Epidemiology and Clinical Features of Invasive Fungal Infection in a US Health Care Network. *Open Forum Infect Dis.* 2018 Aug; 5(8): 187. DOI: 10.1093/ofid/ofy187.
5. Oliveira G, Vasconcelos C, Lopes A, Cartágenes M, Filho A, do Nascimento, et al. *Candida* Infections and Therapeutic Strategies: Mechanisms of Action for Traditional and Alternative Agents *Front Microbiol.* 2018; 9:1351. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01351.
6. Mapfunde S, Sithole S, Mukanganyama S. In vitro toxicity determination of antifungal constituents from *Combretum zeyheri*. *BMC Complement Altern Med.* 2016; 16: 162. DOI: 10.1186/s12906-016-1150-9.

7. Nakamura C, Demarini N, Whu D, Arroyo J, Condorhuamán Y. Actividades hipoglucemiante y antioxidante del fruto de *Morinda citrifolia* en ratas con diabetes mellitus inducida por Aloxano. Ciencia e Investigación [Internet]. 2018 [citado 13 de febrero de 2019]; 21(1):3-9. Disponible en:  
<http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/farma/article/view/15736/13415>.
8. Tapia E. Composición química, actividad antioxidante y anti *Cándida albicans* del aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara”. [Tesis doctoral]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2018.
9. Espinoza E, Leto F, Arroyo J, Domínguez L, Braulio Cisneros C, Fuentes C. Evaluación tóxica y citotóxica del fruto de *Morinda citrifolia* “noni” cultivada en Perú. Conocimiento para el desarrollo [Internet]. 2014 [citado 13 de febrero de 2019]; 5 (19). Disponible en:  
<https://revista.usanpedro.edu.pe/index.php/CPD/article/view/142>.
10. Hermansyah, Susilawati, Subositi, D. Growth Retardation of *Saccharomyces cerevisiae* by Noni Fruit (*Morinda citrifolia*) Extract Occurred in G1 to S Transition of the Cell Cycle. Journal of Physics: Conference Series [Internet]. 2018 [citado 13 de febrero de 2019]; 1095,012019. Disponible en:  
<https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1742-6596/1095/1/012019/pdf>.
11. El Zawawy A, Hafez E. Efficacy of *Pluchea dioscoridis* leaf extract against pathogenic *Candida albicans*. J Infect Dev Ctries [Internet] . 2017 Apr [citado 13 de febrero de 2019]; 11(4):334-342. Disponible en:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28459225>.

12. Filho R, Silva T, Nobre Q, Oliveira de Souza LI, Figueiredo CS. de Gusmão NB. Antimicrobial activity of *Buchenavia tetraphylla* against *Candida albicans* strains isolated from vaginal secretions. *Pharm Biol*. [Internet]. 2017 Dec [citado 13 de febrero de 2019]; 55(1):1521-1527. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/13880209.2017.1304427?needAccess=true>.
13. Peixoto R, Rosalen L, Ferreira L, Freires A, De Carvalho G, Castellano R, et al. Antifungal activity, mode of action and anti-biofilm effects of *Laurus nobilis* Linnaeus essential oil against *Candida* spp. *Arch Oral Biol* [Internet]. 2017 Jan [citado 13 de febrero de 2019]; 73:179-185. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27771586>.
14. Gaspar L, Dos Santos M, Spósito L, Castilho E, Rogério F, De Oliveira E, et al. Essential Oil of *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle: A Strategy to Combat Fungal Infections Caused by *Candida* Species. *Int J Mol Sci*. [Internet]. 2016 Aug [citado 13 de febrero de 2019]; 17(8): 1252. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5000650/pdf/ijms-17-01252.pdf>.
15. Salari S, Bakhshi T, Sharififar F, Naseri A, Ghasemi Nejad Almani P. Evaluation of antifungal activity of standardized extract of *Salvia rhytidea* Benth. (Lamiaceae) against various *Candida* isolates. *J Mycol Med* [Internet]. 2016 Dec [citado 13 de febrero de 2019]; (4):323-330. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27499461>.

16. Faria R, Machado T, Palazzo J, Vataru C, Rozenta S, Ishida K. Proanthocyanidins polymeric tannin from *Stryphnodendron adstringens* are active against *Candida albicans* biofilms. *BMC Complement Altern Med* [Internet]. 2015 [citado 13 de febrero de 2019]; 15: 68. Disponible en: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4369060/pdf/12906\\_2015\\_Article\\_597.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4369060/pdf/12906_2015_Article_597.pdf).
17. Da Silva D, Lee K, Raziunaite I, Schaefer K, Wagener J, Yadav B, et al. Cell biology of *Candida albicans* host interactions. *Curr Opin Microbiol* [Internet]. 2016 Dec [citado 13 de febrero de 2019]; 34:111-118. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5660506/pdf/main.pdf>.
18. Nobile C, Johnson A. *Cándida albicans* Biofilms and Human Disease. *Annu Rev Microbiol* [Internet]. 2015 [citado 13 de febrero de 2019]; 69: 71–92. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4930275/pdf/nihms797234.pdf>.
19. Tsui C, Kong E, Jabra-Rizk M. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. *Pathog Dis* [Internet]. 2016 Jun [citado 13 de febrero de 2019]; 74(4): ftw018. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5975230/pdf/ftw018.pdf>.
20. Moyes D, Richardson J, Naglik J. *Cándida albicans* epithelial interactions and pathogenicity mechanisms: scratching the surface. *Virulence* [Internet]. 2015 [citado 13 de febrero de 2019]; 6(4): 338–346. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4601190/pdf/kvir-06-04-1012981.pdf>.
21. Figura I, Pouteaux M, Canonge M, Genet M, Thierry Chardot T, Guillot A, et al. Regulation of lipid droplet dynamics in *Saccharomyces*

- cerevisiae* depends on the Rab7-like Ypt7p, HOPS complex and V1-ATPase. *Biology Open*. 2015; 4, 764-775. DOI:10.1242/bio.20148615.
22. Goddard M, Greig D. *Saccharomyces cerevisiae*: a nomadic yeast with no niche?. *FEMS Yeast Res* [Internet]. 2015 May [citado 13 de febrero de 2019]; 15(3): fov009. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4444983/pdf/fov009.pdf>
23. Ali M, Kenganora M, Manjula SM. Health Benefits of *Morinda citrifolia* (Noni): A Review. *Pharmacognosy Journal*. 2016; 8 (4): 321-34. DOI: 10.5530/pj.2016.4.4.
24. Honey J, Batra N, Bairwa R. Scientific basis of Noni Plant (*Morinda citrifolia*). *Asian J Res Pharm Sci*. 2012;2(2):45-7.
25. Ahmad, A. N., Mat Daud, Z. 'Azuan, & Ismail, A. (2016). Review on potential therapeutic effect of *Morinda citrifolia* L. *Current Opinion in Food Science*. 2016; 8: 62–67. doi:10.1016/j.cofs.2016.03.002
26. Nagalingam S, Changam SS, Kotturathu MC. Extraction and preliminary phytochemical screening of active compounds in *Morinda citrifolia* fruit. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* [Internet]. 2012 [citado 17 de febrero de 2019]; 52(2):179-81. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/285902397\\_Extraction\\_and\\_preliminary\\_phytochemical\\_screening\\_of\\_active\\_compounds\\_in\\_Morinda\\_Citrifolia\\_fruit](https://www.researchgate.net/publication/285902397_Extraction_and_preliminary_phytochemical_screening_of_active_compounds_in_Morinda_Citrifolia_fruit).
27. Mahanthesh C, Manjappa S, Shindhe V, Jamkhandi M, Jalapure S. *Morinda citrifolia* Linn; A medicinal plant with diverse phytochemicals and

- its medicinal relevance. World Journal of Pharmaceutical research. 2013; 3(1): 215-32.
28. Torres M, Magalhães I, Mondêgo R, De Sá J, Rocha A, Abreu-Silva A. One Plant, Many Uses: A Review of the Pharmacological Applications of *Morinda citrifolia*. Phytother. Res. 2017; DOI: 10.1002/ptr.5817.
29. Lim L, Goh M, Noordin M, et al. *Morinda citrifolia* edible leaf extract enhanced immune response against lung cancer. Food Funct. 2016; 7: 741–751. DOI: 10.1039/c5fo01475a.
30. Wu Y, Girmay S, Da Silva M, et al. The role of endophytic fungi in the anticancer activity of *Morinda citrifolia* Linn.(Noni). Evid Based Complement Alternat Med. 2015; DOI: 10.1155/2015/393960.
31. Ahmed S, Charles D, Cholan R, et al.. Antibacterial efficacy and effect of *Morinda citrifolia* L. mixed with irreversible hydrocolloid for dental impressions: a randomized controlled trial. J Pharm Bioallied Sci [Internet]. 2015 [citado 17 de febrero de 2019] ; 7: S597–S599. Disponible en:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4606668/>
32. Candida T, França P, Chaves L, et al. Evaluation of antitumoral and antimicrobial activity of *Morinda citrifolia* L. grown in Southeast Brazil. Acta Cir Bras [Internet]. 2014 [citado 17 de febrero de 2019] ; 29: 10–14. Disponible en:  
<http://www.scielo.br/pdf/acb/v29s2/0102-8650-acb-29-s2-00010.pdf>.
33. Pandey V, Khan Y. Noni (*Morinda citrifolia* Linn.) fruit juice attenuates the rewarding effect of ethanol in conditioned place preference in mice. Exp

- Anim [Internet]. 2016 Nov [citado 17 de febrero de 2019]; 65(4):437-445. Disponible en:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5111847/pdf/expanim-65-437.pdf>.
34. Narasingam M, Pandey V, Mohamed Z. Noni (*Morinda citrifolia* L.) fruit extract attenuates the rewarding effect of heroin in conditioned place preference but not withdrawal in rodents. Exp Anim [Internet]. 2016 [citado 17 de febrero de 2019]; 65(2): 157–164. Disponible en:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4873484/pdf/expanim-65-157.pdf>.
35. Mazu T, Bricker B, Flores-Rozas H, Ablordeppey S. The Mechanistic Targets of Antifungal Agents: An Overview. Mini Rev Med Chem [Internet]. 2016 [citado 18 de febrero de 2019]; 16(7): 555–578. Disponible en:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5215921/pdf/nihms838207.pdf>.
36. Ben-Ami R. Treatment of Invasive Candidiasis: A Narrative Review. J Fungi (Basel) [Internet]. 2018 Sep [citado 18 de febrero de 2019]; 4(3): 97. Disponible en:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6162658/pdf/jof-04-00097.pdf>.
37. Mushi M, Bader O, Taverne L, Bii C, Gro U, Mshanaa S. Oral candidiasis among African human immunodeficiency virus-infected individuals: 10 years of systematic review and meta-analysis from sub-Saharan Africa. J Oral Microbiol [Internet]. 2017 [citado 18 de febrero de 2019]; 9(1): 1317579. Disponible en:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5508360/pdf/zjom-9-1317579.pdf>.

38. Cassone A, Sobel J. Experimental Models of Vaginal Candidiasis and Their Relevance to Human Candidiasis. *Infect Immun* [Internet]. 2016 May [citado 18 de febrero de 2019]; 84(5): 1255–1261. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4862719/pdf/zii1255.pdf>.
39. Leonov A, Arlia-Ciommo A, Piano A, Svistkova V, Lutchman V, Medkour Y. Longevity Extension by Phytochemicals. *Molecules* [Internet]. 2015 Apr [citado 18 de febrero de 2019]; 20(4): 6544–6572. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6272139/pdf/molecules-20-06544.pdf>.
40. Strollo S, Lionakis M, Adjemian J, Steiner C, Prevots R. Epidemiology of Hospitalizations Associated with Invasive Candidiasis, United States, 2002–2012. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2017 Jan [citado 18 de febrero de 2019]; 23(1): 7–13. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5176241/pdf/16-1198.pdf>
41. Duina A, Miller M, Keeney J. Budding Yeast for Budding Geneticists: A Primer on the *Saccharomyces cerevisiae* Model System. *Genetics* [Internet]. 2014 May [citado 18 de febrero de 2019]; 197(1): 33–48. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4012490/pdf/33.pdf>.
42. Veasey JV, Avila RB, Miguel BAF, Muramatu LH. White piedra, black piedra, tinea versicolor, and tinea nigra: contribution to the diagnosis of superficial mycosis. *An Bras Dermatol* [Internet]. 2017 May-Jun [citado 18 de febrero de 2019]; 92(3): 413–416. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5514591/pdf/abd-92-03-0413.pdf>.
43. Souza A, Amaral A. Antifungal Therapy for Systemic Mycosis and the Nanobiotechnology Era: Improving Efficacy, Biodistribution and Toxicity.

- Front Microbiol [Internet]. 2017 [citado 18 de febrero de 2019]; 8: 336.  
Disponible en:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5340099/pdf/fmicb-08-00336.pdf>.
44. Parente J, Bailão A, Amaral A, Taborda C, Paccez J, Borges C, et al. Antifungal Resistance, Metabolic Routes as Drug Targets, and New Antifungal Agents: An Overview about Endemic Dimorphic Fungi. Mediators Inflamm [Internet]. 2017 [citado 18 de febrero de 2019]; 2017: 9870679. Disponible en:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5485324/pdf/MI2017-9870679.pdf>.
45. Baena P, Guillermina M. Metodología de la investigación. México, D.F.: Grupo Editorial Patria; 2014.
46. Hernández R, Fernández C y Baptista P. Metodología de la investigación. Quinta edición por. Buenos aires: McGraw-Hill; 2010.
47. Eswar A, Isha Z, Shanmugasundaram S, Ramamoorthy K, Nanda R. Evaluation of preliminary qualitative analysis of Clam *Paphia malabarica* extracts from Girgon chowpatty Creek, Mumbai. J Pharm Chem Biol Sci, 2015; 3(4):461-468. Disponible en:  
[https://www.jpCBS.info/2015\\_3\\_4\\_04\\_Eswar.pdf](https://www.jpCBS.info/2015_3_4_04_Eswar.pdf).
48. Guevara R. Efecto reparador del extracto acuoso del fruto de *Morinda citrifolia* L. en el índice mitótico de *Vicia faba* L. expuesto a tartrazina. [Tesis]. Trujillo: Univeridad Nacional de Trujillo, La Libertad; 2015.
49. Cabrera Y. Efecto de tres Concentraciones del Jugo de *Morinda Citrifolia* “noni” Sobre la Toxicidad del Dicromato de Potasio en Meristemas Radiculares de *Alliun cepa*. [Tesis]. Trujillo: Univeridad Nacional de Trujillo, La Libertad; 2012.

50. Sullón J. Evaluación de la actividad antioxidante del noni (*Morinda citrifolia* L.) en tres estados de madurez en Tingo María. [Tesis]. Tingo María: Universidad Nacional Agraria de la Selva, Huánuco; 2009.
51. Suurbaar J, Mosobil R, Donkor AM. Antibacterial and antifungal activities and phytochemical profile of leaf extract from different extractants of *Ricinus communis* against selected pathogens. *BMC Res Notes* [Internet]. 2017 [citado 20 de febrero de 2019]; 10: 660. Disponible en: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5709865/pdf/13104\\_2017\\_Article\\_3001.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5709865/pdf/13104_2017_Article_3001.pdf).
52. Bottari B, Lopes Q, Pizzuti K., Filippi, Dos Santos A, Corrêa S, Bolzan P, et al. Antimicrobial activity and phytochemical characterization of *Carya illinoensis*. *Microb. Pathog.* 2017; 04 190–195. DOI: 10.1016 / j.micpath.2017.01.037.
53. Correia F, Dâmaris Silveira D, Fonseca M, Magalhães O, Fagg W, Da Silva EC, et al. Activity of crude extracts from Brazilian cerrado plants against clinically relevant *Candida* species. *BMC Complement. Altern. Med.* 2016; 16 : 203. DOI: 10.1186 / s12906-016-1164-3.
54. Negri M, Salci T, Shinobu-Mesquita C, Capoci I, Svidzinski T, Kioshima E. Early State Research on Antifungal Natural Products. *Molecules* [Internet]. 2014 Mar [citado 20 de febrero de 2019]; 19(3): 2925–2956. Disponible en:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6271505/pdf/molecules-19-02925.pdf>.

55. Khan S, Imran M, Imran M, Pindari N. Antimicrobial activity of various ethanolic plant extracts against pathogenic multi drug resistant *Candida* spp. Bioinformation. 2017; 13(3): 67–72. doi: 10.6026/97320630013067.

56. Batta B, et al. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research. 2013;8:42.

57. Otang W, Grierson D, Ndip R. Antifungal activity of *Arctotis arctotooides* (L.f.) O. Hoffm. and *Gasteria bicolor* Haw. against opportunistic fungi associated with human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome. Pharmacogn Mag. 2012 Apr-Jun; 8(30): 135–140. DOI: 10.4103/0973-1296.96564.

58. Shirani M, Samimi A, Kalantari H, Madani M, Zanganeh A. Chemical composition and antifungal effect of hydroalcoholic extract of *Allium tripedale* (Tvautev.) against *Candida* species. Curr Med Mycol. 2017 Mar; 3(1): 6–12. DOI: 10.29252/cmm.3.1.6.

59. Nasrollahi Z, Abolhasannezhad M. Evaluation of the antifungal activity of olive leaf aqueous extracts against *Candida albicans* PTCC-5027. Curr Med Mycol [Internet]. 2015 Dec [citado 20 de febrero de 2019]; 1(4): 37–39. Disponible en:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5490280/pdf/cmm-1-037.pdf>

60. Rani S, Saritha S, Nagamani V, Sulakshana G. In vitro Evaluation of Antifungal Activity of the Seed Extract of *Embelia Ribes*. Indian J Pharm Sci [Internet]. 2011 Mar-Apr [citado 20 de febrero de 2019];73(2): 247–249. Disponible en:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3267316/>.

## ANEXOS

### Testimonios fotográficos



**Anexo 1.** Selección del fruto *Moringa citrifolia* para realizar el lavado y la selección del fruto para luego proceder a triturar.



**Anexo 2.** Licuado de noni se procede a pesar para poder trabajar con las concentraciones.



**Anexo 3.** Extracción del extracto acuoso de *Moringa citrifolia* mediante colación.



**Anexo 4.** Separación del extracto acuoso de *Moringa citrifolia* en el matraz en 50%,75%,100%.



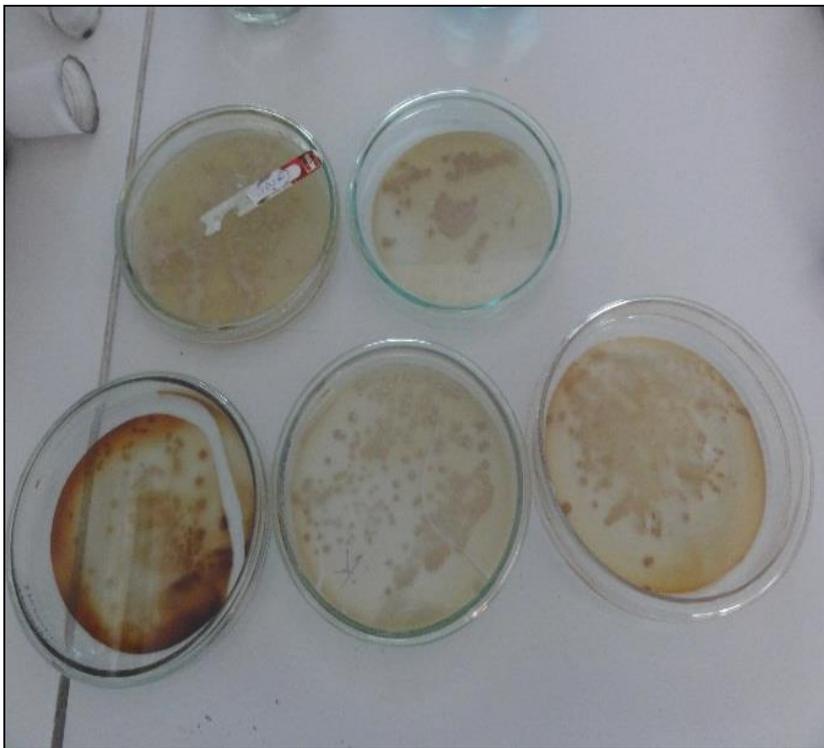
**Anexo 5.** Auto clavar las placas Petri y el agar Sabouraud Dextrosa



**Anexo 6.** Siembra de las cepas madre Candida y Saccharomyce con los antimicóticos tenemos fluconazol, clotrimazol y cloruro de sodio.



**Anexo 7.** Siembra de las cepas madre de Candida y Saccharomyces al agar Sabouraud.



**Anexo 8.** Observación después de unos días de las placas