

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

ESCUELA DE POSGRADO



MAESTRÍA EN CIENCIAS

MENCIÓN: BIOTECNOLOGÍA

TESIS

**EFFECTO ANTIMICÓTICO DE EXTRACTOS SECO Y ACUOSOS DE TRES
VARIETADES DE *Stevia rebaudiana* Bertoni ADAPTADAS AGRONÓMICAMENTE
EN LA PROVINCIA DE SAN IGNACIO. DEPARTAMENTO DE CAJAMARCA**

Para optar el Grado Académico de

MAESTRO EN CIENCIAS

Presentado por:

Luis Gilberto García Izquierdo

Asesor:

Dr. Carlos Rosales Loredo

CAJAMARCA, PERÚ

2018

COPYRIGHT © 2018 by
LUIS GILBERTO GARCÍA IZQUIERDO
Todos los derechos reservados

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

ESCUELA DE POSGRADO



MAESTRÍA EN CIENCIAS

MENCIÓN: BIOTECNOLOGÍA

TESIS

EFFECTO ANTIMICÓTICO DE EXTRACTOS SECO Y ACUOSOS DE TRES VARIEDADES DE *Stevia rebaudiana* Bertoni ADAPTADAS AGRONÓMICAMENTE EN LA PROVINCIA DE SAN IGNACIO. DEPARTAMENTO DE CAJAMARCA

Para optar el Grado Académico de

MAESTRO EN CIENCIAS

Presentado por:
Luis Gilberto García Izquierdo

COMITÉ CIENTÍFICO

Dr. Carlos Rosales Loredo
Asesor

Dr. Pedro Ortiz Oblitas
Miembro del Comité

M.Cs. Rodolfo Gamarra Ramírez
Miembro del Comité

Dra. Carmen Medina Rodríguez
Miembro del Comité

CAJAMARCA, PERÚ

2018



Universidad Nacional de Cajamarca

"NORTE DE LA UNIVERSIDAD PERUANA"

Escuela de Posgrado

CAJAMARCA - PERÚ

ACTA DE SUSTENTACIÓN PÚBLICA DE TESIS

Siendo las 08:15 de la mañana del día 30 de abril de 2018, reunidos en el Auditorio de la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Cajamarca, los miembros del Jurado Evaluador presidido por el **Ph.D. PEDRO ORTIZ OBLITAS**, y como Miembros del Jurado Evaluador, **Dra. CARMEN MEDINA RODRÍGUEZ** y **M.Cs. RODOLFO GAMARRA RAMÍREZ**, en calidad de Asesor **Dr. CARLOS ROSALES LOREDO**; actuando de conformidad con el Reglamento de la Escuela de Posgrado, se dio inicio a la SUSTENTACIÓN PÚBLICA de la tesis titulada: "EFECTO ANTIMICÓTICO DE EXTRACTOS SECO Y ACUOSOS DE TRES VARIETADES DE *Stevia rebaudiana* Bertoni ADAPTADAS AGRONÓMICAMENTE EN LA PROVINCIA DE SAN IGNACIO, DEPARTAMENTO DE CAJAMARCA"; presentada por el Bach. en Ciencias Biológicas **LUIS GILBERTO GARCÍA IZQUIERDO**, con la finalidad de optar el Grado Académico de MAESTRO EN CIENCIAS, en la Unidad de Posgrado de la Facultad de Ciencias de la Salud, con Mención en BIOTECNOLOGÍA.

Realizada la exposición de la Tesis y absueltas las preguntas formuladas por el Jurado Evaluador, y luego de la deliberación, se acordó APROBAR..... la mencionada Tesis con la calificación de EXCELENTE (17).....; en tal virtud el alumno Bach. en Ciencias Biológicas **LUIS GILBERTO GARCÍA IZQUIERDO**, está apto para recibir en ceremonia especial el Diploma que lo acredita como MAESTRO EN CIENCIAS, en la Unidad de Posgrado de la Facultad de Ciencias de la Salud, con Mención en BIOTECNOLOGÍA.

Siendo las 09:30 horas del mismo día, se dio por concluido el acto.

Ph.D. Pedro Ortiz Oblitas
JURADO EVALUADOR

Dr. Carlos Rosales Loredo
ASESOR

Dra. Carmen Medina Rodríguez
JURADO EVALUADOR

M.Cs. Rodolfo Gamarra Ramírez
JURADO EVALUADOR

CONTENIDO

Item	Pág.
DEDICATORIA	vii
AGRADECIMIENTOS	viii
LISTA DE ILUSTRACIONES	ix
LISTA DE ABREVIACIONES	xii
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
CAPÍTULO I	1
Introducción	1
CAPÍTULO II	5
Marco Teórico	5
Aspecto relevantes de la candidiasis	5
Implicancias del tratamiento de la candidiasis vaginal	5
Tratamiento mediante el uso de plantas medicinales	9
<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni. Características y propiedades	10
Propiedades físico-químicas de estevia para la industria farmacéutica y de alimentos	11

Beneficios potenciales de estevia para la salud	12
Variedades de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni	15
Variedad Criolla o Nativa (paraguaya)	15
Variedad EIRETE mejorada	16
Variedad Criolla San Ignacio	
Pruebas para determinar la actividad inhibitoria de los antimicrobianos	18
CAPÍTULO III	20
Diseño de contrastación de la hipótesis	20
Tipo, diseño y nivel de investigación	20
Localización del estudio	20
Unidad de análisis, población y muestra	20
Diseño de investigación	22
Diseño metodológico	23
Técnicas e instrumentos de recolección de datos	23
Obtención y preparación de las muestras vegetales	23
Obtención de extractos	24
Extracto acuoso frío	24
Extracto acuoso caliente	25
Extracto seco	26
Extracción de cristales de glicósidos diterpénicos totales	26
Verificación de la presencia de glicósidos diterpénicos totales	28
Preparación de los discos de sensibilidad	28
Preparación de discos de sensibilidad con extracto acuoso frío y extracto acuoso caliente	29

Preparación de discos de sensibilidad con extracto seco	29
Preparación de las cepas de <i>Candida albicans</i>	29
Evaluación <i>in vitro</i> del efecto inhibitorio del crecimiento de <i>Candida albicans</i>	30
CAPÍTULO IV	32
Resultados y Discusión	32
Efecto de los extractos por variedad ensayada	32
Variedad Criolla Paraguaya	32
Variedad Criolla San Ignacio	36
Variedad EIRETE	39
CAPÍTULO V	43
Conclusiones	43
Recomendaciones	44
Lista de Referencias	45
Apéndices	51

DEDICATORIA

A mi Padre espiritual: “Jesucristo” por darme la serenidad, la calma y la fortaleza de poder culminar este proyecto personal en mi vida profesional.

A mis padres: Luis Miguel y María Lucila. A mis hermanos: María Cleofé, Margarita Isabel, Víctor Raúl, Eloy Ramiro, Inés Socorro y Zoila Cruz: por su apoyo y comprensión en todo momento.

A la Universidad Nacional de Cajamarca por permitirme la culminación de un anhelo de muchos años.

A Cajamarca, mi terruño, esperando que logre su desarrollo de acuerdo con los ingentes recursos con que cuenta, eliminando de manera progresiva los estándares de analfabetismo, pobreza extrema, morbilidad y mortalidad infantil, especialmente.

A la memoria de todos y cada una de las personas que, en el transcurso de mi vida, sea como docentes, como compañeros, como amigos o como discípulos me ayudaron a comprender el significado de ser humano y el de ser profesional, más allá de los imponderables de la cotidiana vida.

Luis Gilberto García Izquierdo

AGRADECIMIENTO

Hago extensivo mi eterno agradecimiento a las siguientes personas e instituciones que sin su ayuda y apoyo no hubiese sido posible la culminación de este trabajo:

- _ Q.F. Mayer Luis Ganosa Yupanqui: Profesor de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo.
- _ M.C. Carmen Eddy Medina Rodríguez: Profesora de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Cajamarca.
- _ Q.F. Érica Jessica Bardales Valdivia: Profesora de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Privada Antonio Guillermo Urrelo de Cajamarca.
- _ Blgo. Mblgo. Horacio Quiroz Cueva: Ex - Profesor de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Cajamarca.

El Autor

LISTA DE ILUSTRACIONES

Item	Pág.
Figuras	
Figura 1. <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni. Plantas en cultivo controlado.	11
Figura 2. Diagrama de flujo de la extracción de los glicósidos totales.	27
Figura 3. Diagrama de evaluación del efecto antimicótico de las tres variedades de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni.	31
Figura 4. Efecto de extracto acuoso frío (EAF), extracto acuoso caliente (EAC) y extracto seco (ES) de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni, variedad criolla paraguaya sobre el crecimiento <i>in vitro</i> de <i>Candida albicans</i> . C(+): control positivo (fluconazol).	35
Figura 5. Efecto de extracto acuoso frío (EAF), extracto acuoso caliente (EAC) y extracto seco (ES) de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni, variedad criolla San Ignacio sobre el crecimiento <i>in vitro</i> de <i>Candida albicans</i> . C(+): control positivo.	38
Figura 6. Efecto de extracto acuoso frío (EAF), extracto acuoso caliente (EAC) y extracto seco (ES) de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni, variedad EIRETE sobre el crecimiento <i>in vitro</i> de <i>Candida albicans</i> . C(+): control positivo.	40
Figura 7. Efecto comparativo conjunto a nivel de los extractos obtenidos por variedad de estevia.	42
Figura 8. Representación estadística de la distribución estadística normal de los resultados obtenidos.	53
Figura 9. Contrastación del efecto promedio de inhibición, para verificar el efecto inhibitorio conjunto por variedad y por extracto.	55
	ix

Figura 10. Análisis de la interacción combinada de los efectos promedios de los extractos y variedades estudiadas.	57
Figura 11. Análisis cromatográfico mediante HPLC del extracto seco de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni. Cromatograma del patrón de estevia (producto comercial)	58
Figura 12. Cromatograma al extracto seco con glicósidos totales extraídos de las hojas de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni.	59

Cuadros

Cuadro 1. Composición química de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni	14
Cuadro 2. Descripción del diseño experimental aplicado	22
Cuadro 3. Distribución de los discos de sensibilidad para las pruebas de efecto antimicótico	28

Tablas

Tabla 1. Actividad <i>in vitro</i> de extractos acuosos y seco de la variedad criolla Paraguaya de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni sobre cepas de <i>Candida albicans</i> , mediante tres repeticiones.	33
Tabla 2. Actividad <i>in vitro</i> de extractos acuosos y seco de la variedad criolla de San Ignacio de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni sobre cepas de <i>Candida albicans</i> , determinada mediante tres repeticiones.	37
Tabla 3. Actividad <i>in vitro</i> de extractos acuosos y seco de la variedad EIRETE de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni sobre cepas de <i>Candida albicans</i> , determinada mediante tres repeticiones.	39

Fotografías

Foto 1. Hojas desecadas de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni	60
Foto 2. Extractos acuosos de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni	60
Foto 3. Extracto seco de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni	61
Foto 4. Cepa de <i>Candida albicans</i> recuperada en laboratorio	61
Foto 5. Cultivos de <i>Candida albicans</i> sometidas al efecto de los extractos	62
Foto 6. Efectos antimicóticos positivos de los extractos	62
Foto 7. Efectos antimicóticos positivos de los extractos	63

LISTA DE ABREVIACIONES

CICET-BIOTEC:	Centro de Investigación y Control de Enfermedades Transmisibles – Área de Biotecnología.
EDAC:	Equipo de Desarrollo Agropecuario Cajamarca
HPLC:	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia o High Performance Liquid Chromatography
EAF:	extracto acuoso frío de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni
EAC:	extracto acuoso caliente de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni
ES:	extracto seco de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo determinar *in vitro* el grado de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* por parte de tres extractos: acuoso frío, acuoso caliente y extracto seco obtenidos a partir de tres variedades criolla paraguaya, criolla de San Ignacio y mejorada EIRETE de *Stevia rebaudiana* Bertoni (estevia), adaptadas agronómicamente en la provincia de San Ignacio del Departamento de Cajamarca. Para tal finalidad se aplicó un diseño experimental con grupo control post test con tres repeticiones a través del cual 30 cepas de *Candida albicans* obtenidas a partir de pacientes mujeres con candidiasis vaginal que acudieron al servicio del Laboratorio del Hospital Regional de Cajamarca fueron sometidas al efecto de los extractos. Los resultados mostraron diferencias significativas ($p < 0.01$), en los efectos de los extractos probados, encontrándose que los extractos acuosos fríos (extractos crudos), de las tres variedades evaluadas, mostraron el mayor efecto inhibitorio y los extractos secos produjeron el menor efecto, los extractos acuosos calientes mostraron efectos intermedios. En relación al efecto por variedad, la criolla paraguaya mostró el menor efecto respecto a las variedades criolla San Ignacio y EIRETE y de éstas últimas la variedad EIRETE mostró, a través del extracto acuoso frío, el mayor efecto inhibitorio del crecimiento de las cepas patógenas de *Candida albicans*, en algunos casos los efectos inhibitorios fueron semejantes o mayores que los efectos producidos por los antimicóticos control. Se concluye que el extracto acuoso frío de la variedad EIRETE de *Stevia rebaudiana* Bertoni posee el mejor efecto inhibitorio del crecimiento de *Candida albicans* causante de la candidiasis vaginal de las pacientes que acudieron al servicio del laboratorio del Hospital Regional de Cajamarca.

Palabras clave: *Stevia rebaudiana* Bertoni, *Candida albicans*, efecto antimicótico, extracto crudo, extracto acuoso, extracto seco

ABSTRACT

The objective of the present investigation was to determine *in vitro* the degree of growth inhibition of *Candida albicans* by three extracts: cold aqueous, hot aqueous and dry extract obtained from three Criolla Paraguaya, Criolla de San Ignacio and improved EIRETE of *Stevia rebaudiana* Bertoni (stevia) varieties, adapted agronomically in the province of San Ignacio, Department of Cajamarca. For this purpose, an experimental design with a post-test control group with three repetitions was applied, through which 30 strains of *Candida albicans* obtained from female patients with vaginal candidiasis who attended the laboratory service of the Regional Hospital of Cajamarca were subjected to the effect of the extracts. The results showed significant differences ($p < 0.01$) in the effects of the tested extracts, finding that the cold aqueous extracts (crude extracts), of the three varieties evaluated, showed the greatest inhibitory effect and the dry extracts produced the least effect, the hot aqueous extracts showed intermediate effects. In relation to the effect by variety, the Criolla Paraguaya showed the least effect with respect to the Criolla San Ignacio and EIRETE varieties, and of the latter, the EIRETE variety showed, through the cold aqueous extract, the highest inhibitory effect of the growth of the pathogenic strains of *Candida albicans*, in some cases the inhibitory effects were similar or greater than the effects produced by the control antifungals. It is concluded that the cold aqueous extract of the EIRETE variety of *Stevia rebaudiana* Bertoni has the best growth inhibitory effect of *Candida albicans*, which causes vaginal candidiasis in the patients who attended the laboratory service of the Regional Hospital of Cajamarca.

Key words: *Stevia rebaudiana* Bertoni, *Candida albicans*, antifungal effect, raw extract, aqueous extract, dry extract

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

En el último decenio se ha incrementado la incidencia de infecciones micóticas y el mecanismo patogénico de los hongos aún es poco entendido. La mayor parte de las micosis y entre ellas la candidiasis vaginal, son difíciles de tratar. Por fortuna, hay un creciente interés en los hongos de importancia médica, así como en la búsqueda de los factores de virulencia y de los posibles blancos terapéuticos¹.

Uno de los agentes relacionados con infecciones vaginales es *Candida albicans*, un organismo muy extendido. Normalmente se encuentra en pequeñas cantidades en la vagina, boca, tracto digestivo y en la piel, sin causar enfermedad ni síntomas (aproximadamente el 25% de las mujeres tienen este organismo presente en la cavidad vaginal sin manifestar sintomatología alguna). Los síntomas aparecen cuando crece el número de hongos y se altera el balance respecto a otros microorganismos que normalmente se encuentran en la vagina². *Candida albicans* generalmente aparece después de algún tratamiento con antibióticos que se ha prescrito para otra afección, porque los antibióticos cambian el balance normal de la microflora de la vagina. Igualmente la candidiasis puede aparecer en asociación con otras enfermedades como la diabetes, el embarazo, la toma de píldoras anticonceptivas o problemas que afectan al sistema inmune (infección por virus VIH o en cuadros de SIDA). En la vagina se produce una descarga vaginal blanquecina exagerada y anormal con características muy particulares, además de vulvovaginitis, caracterizada por irritación y prurito³.

El método más común para tratar la candidiasis vaginal es usar medicamentos en crema o dispositivos de inserción como los supositorios que se colocan dentro de la vagina, pero en la mayoría de los casos, los medicamentos más comunes para la candidiasis vaginal se compran sin

receta médica y se consiguen en muchos de los establecimientos farmacéuticos con bastante facilidad. La mayoría de las cremas y supositorios pueden debilitar el material de que están hechos los condones y los diafragmas anticonceptivos, lo cual aumenta el riesgo de embarazo y transmisión del VIH³. A pesar de estos inconvenientes se sugieren como antimicóticos: nistatina, cotrimazol, anfotericina B, fluconazol, entre otros⁴.

Ante las desventajas o inconvenientes que se presentan en relación a la efectividad de los medicamentos antimicóticos vaginales se viene investigando alternativas de nuevos productos con capacidad antibiótica sobre todo que no produzcan los inconvenientes relacionados con reacciones adversas y de generación de resistencias indeseables. Entre estos productos se han hecho estudios sobre medicamentos naturales dentro de la fitoterapia, ya sea bajo la forma de probióticos o de fitoantibióticos, de los cuales muchos ya se comercializan con bastante aceptación y comprobación de bajo riesgo de su uso respecto a los problemas antes mencionados⁵.

De otra parte, uno de los recursos vegetales que viene siendo estudiado con bastante interés es *Stevia rebaudiana* Bertoni (estevia), de la cual se puede obtener un edulcorante no calórico muy beneficioso y con propiedades muy favorables para la salud y desde hace poco ha sido reportada su capacidad antibiótica. En algunas investigaciones⁶⁻⁸ se afirma también que dicha capacidad no sólo está limitada a controlar el crecimiento de bacterias sino también el de hongos y virus y en relación a su efecto antimicótico también vienen realizándose estudios⁹ sobre los principios activos que tienen capacidad de inhibir el crecimiento de hongos que afectan la salud humana, entre ellos *Candida albicans* vaginal.

Teniendo en cuenta lo afirmado anteriormente y en razón a que ha sido reportado⁸ de que en nuestro país, sobre todo en regiones de ceja de selva del departamento de Cajamarca se ha adaptado agronómicamente el cultivo de estevia, ya se viene cultivando dicho recurso vegetal de

manera creciente, con la finalidad de ser usada para diferentes usos terapéuticos y preventivos en relación a la salud humana⁶⁻⁸, pero sin tener aún identificada la variedad más adecuada para determinado tratamiento medicinal y considerando la necesidad de investigar más sobre el aspecto poco aclarado en relación al efecto anti candidiásico de *Stevia rebaudiana* Bertoni, es que a través del presente trabajo se planteó la realización de un estudio comparativo del efecto antimicótico de extractos seco y acuosos de tres variedades de *Stevia rebaudiana* Bertoni, adaptadas en la provincia de San Ignacio del departamento de Cajamarca⁸, sobre el crecimiento *in vitro* de *Candida albicans* causante de candidiasis vaginal, proponiéndose como hipótesis que existen diferencias en el efecto antimicótico inhibitorio del crecimiento de *Candida albicans* vaginal entre los tres tipos de extractos y también entre las tres variedades de *Stevia rebaudiana* Bertoni, adaptadas agronómicamente en la provincia de San Ignacio del departamento de Cajamarca. Perú.

La investigación se realizó en el Laboratorio del Centro de Investigación y Control de Enfermedades Transmisibles de la Universidad Nacional de Cajamarca (CICET-BIOTEC), Área de Biotecnología, donde se obtuvieron extractos acuosos crudo y caliente, además extracto seco, a partir de muestras de hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni, obtenidas de plantas adaptadas agronómicamente en la provincia de San Ignacio del departamento de Cajamarca, como resultado de la ejecución de un proyecto de desarrollo⁸, llevado a cabo por el Equipo de Desarrollo Agropecuario – Cajamarca (EDAC), la Asociación Regional de Productores Ecológicos – Cajamarca (ARPEC) y la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cajamarca.

Los objetivos propuestos fueron los siguientes:

OBJETIVO GENERAL

Determinar *in vitro* las diferencias en el grado de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* por acción de los extractos acuoso frío, acuoso caliente y extracto seco de las variedades criolla paraguaya, criolla de San Ignacio y mejorada EIRETE de *Stevia rebaudiana* Bertoni adaptadas agronómicamente en la provincia de San Ignacio del Departamento de Cajamarca.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el grado de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* de cada variedad de *Stevia rebaudiana* Bertoni probada.
- Comparar los grados de inhibición entre las variedades probadas para establecer similitudes o diferencias en el efecto antimicótico.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Aspectos relevantes de la candidiasis

Según Arenas¹¹, la candidiasis es una infección causada por un hongo común denominado *Candida albicans*. Este hongo se encuentra en el cuerpo de casi todas las personas. Un sistema inmunitario sano lo mantiene bajo control. La candidiasis generalmente aparece como una infección oportunista en la boca, la garganta o la vagina. Puede desarrollarse meses y hasta años antes que otras enfermedades oportunistas más graves como el síndrome de la inmunodeficiencia humana (VIH). En la boca la infección se llama candidiasis bucal o aftas. Cuando la infección se disemina hacia el interior de la garganta se llama esofagitis. Tiene el aspecto de parches blancos, similares al queso cottage, o aparece como manchas rojas. Puede causar dolores de garganta, dolor al tragar, náuseas y pérdida de apetito. En la vagina, la infección se llama vaginitis. La candidiasis vaginal es una infección común. Los síntomas incluyen picazón, quemazón y flujo blanquecino y espeso a nivel vaginal. Aún no ha sido establecida alguna manera de prevenir la exposición a la cándida, dado que en organismos que tienen funcionamiento normal su presencia es banal. Generalmente no se usan medicamentos para prevenir la candidiasis vaginal, debido a los siguientes motivos:

- No es una condición muy peligrosa.
- Existen medicamentos efectivos para tratarla.
- El hongo podría desarrollar resistencia a los medicamentos.

2.2. Implicancias del tratamiento de la candidiasis vaginal

Young y Jewell¹² sostienen que un sistema inmunitario sano mantiene un buen balance. Las bacterias normales de la cavidad vaginal también sirven para mantener al hongo bajo control. En

situaciones en que algunos antibióticos eliminan este tipo de bacterias beneficiosas, puede propiciar el desarrollo de candidiasis. El tratamiento de la candidiasis vaginal no elimina al hongo pero lo mantiene bajo control. Dicho tratamiento puede ser localizado o sistémico. El tratamiento localizado se aplica sobre la zona infectada. El tratamiento sistémico afecta a todo el cuerpo. Muchos proveedores de servicios de salud prefieren durante el embarazo usar primero el tratamiento local. Éste permite que el medicamento actúe directamente en la zona infectada. Causa menos efectos secundarios que el tratamiento sistémico.

Adicionalmente Arenas¹¹ sostiene que existe menos riesgo de que la cándida desarrolle resistencia a los medicamentos. Los medicamentos que se usan para combatir la candidiasis son anti-hongos incluyen a clotrimazol, nistatina, fluconazol, itraconazol, anfotericina B.

Los tratamientos locales incluyen:

- Cremas
- Supositorios para la vaginitis
- Líquidos
- Pastillas que se disuelven en la boca

El tratamiento local puede causar irritación o punzadas. El tratamiento sistémico es necesario si el local no funciona o si la infección se ha diseminado al esófago (esofagitis) u en otras partes del cuerpo. Algunos tratamientos sistémicos están disponibles en pastillas. Los efectos secundarios más comunes pueden ser náuseas, vómitos y dolor abdominal. Menos del 20% de las personas padecen estos efectos secundarios. La candidiasis vaginal puede reaparecer muchas veces. Algunos proveedores de servicios de salud recetan medicamentos anti-hongos a largo plazo. Esto puede provocar resistencia. El hongo puede mutar y el medicamento deja de funcionar. Algunos casos graves no responden a los medicamentos de elección. En esta instancia se recomienda usar

otros medicamentos como anfotericina B. Éste se administra en forma oral o intravenosa, es muy potente, pero tóxico. También ha sido establecido¹¹ que los efectos secundarios principales son problemas renales y anemia, pero también pueden ocurrir escalofríos, fiebre, náuseas, vómitos y dolores de cabeza, que generalmente desaparecen después de las primeras dosis.

A pesar del incremento de las micosis, vivimos época de grandes esperanzas terapéuticas, debido a la aparición de nuevas formulaciones de fármacos de utilidad comprobada y por la próxima comercialización de más agentes multifúngicos. Además, es un tiempo de asimilación de lo aprendido en el pasado por hechos como la aparición de candidiasis orales recalcitrantes en pacientes infectados por el VIH que recibe tratamientos continuos de fluconazol, la aparición de especies nuevas productoras de candidiasis (*C. dublines*) o la emergencia de especies que anteriormente eran aisladas con frecuencia menor en hemocultivos (como *C. krusei* o *C. glabrata*), han propiciado el incremento del desarrollo de métodos *in vitro* de la sensibilidad a los antifúngicos y de unas aproximaciones terapéuticas más racionales¹³, el mencionado autor resalta que tales pruebas no estaban consideradas como soporte de las intervenciones terapéuticas de hace algunos años atrás.

Como ha sido mencionado, los fármacos que actualmente se utilizan para este trastorno son fluconazol, caspofungina, voriconazol, anfotericina B, entre otros. Este último ha sido el más utilizado durante tres décadas, sin embargo la preocupación por su toxicidad ha limitado su empleo. Además, desde la introducción en 1990 de los triazoles, como el fluconazol, éstas han sido las terapias de uso más frecuente en los últimos años. No obstante, estos medicamentos no están exentos de riesgos y una administración inadecuada ha generado resistencias microbianas. Por este motivo, la industria farmacéutica sigue investigando en nuevas opciones para tratar incluso la candidiasis invasiva. Sin embargo, para demostrar que un nuevo producto es superior a otros ya existentes, se precisan ensayos con un gran número de participantes, algo que supone

costos elevados. Por este motivo, los estudios que se suelen realizar sólo van dirigidos a confirmar que el nuevo fármaco no es inferior a los viejos medicamentos, algo que requiere muchos menos participantes y supone un gasto bastante inferior para las empresas. Tal estrategia ha sido realizada en un estudio, publicado en 'The New England Journal of Medicine' y realizado por investigadores de diferentes universidades de Estados Unidos y de Canadá, para evaluar un nuevo fármaco, anidulafungina. En el ensayo, patrocinado por Vicuron, compañía productora del nuevo fármaco y que ha sido comprada por Pfizer, han participado 245 pacientes con candidiasis invasiva. A 127 participantes se les administró anidulafungina y a 118 fluconazol. Al final de la infusión intravenosa de estos medicamentos, se observó que la terapia fue un éxito en 75% de los enfermos que recibieron el nuevo producto frente al 60% de los que habían sido tratados con fluconazol. Los efectos secundarios fueron similares entre los dos grupos¹⁴.

En este sentido, cabe resaltar que en los últimos años se ha acrecentado el interés en estudiar otras alternativas terapéuticas como el uso de plantas, especialmente las usadas como medicinales, debido a que como es sabido, son fuente de compuestos novedosos y farmacológicamente activos, esto ha contribuido al surgimiento de un campo aún poco explorado científicamente como es la fitoterapia. El gran interés suscitado en la actualidad en torno a la fitoterapia o las técnicas de microdosis no obedece a una moda. Nuestra época está marcada por la búsqueda de una vida más sana y una mejora de la calidad de vida, para conseguirlo el hombre se ha dado cuenta de la necesidad de volver los ojos a los valores esenciales que siguen estando básicamente en la naturaleza. Si bien es verdad que la medicina "clásica o alopática" obtiene excelentes resultados en el tratamiento de múltiples dolencias, también lo es su implicación en la aparición paulatina de efectos secundarios, a veces importantes. La principal ventaja de la fitoterapia (uso de plantas medicinales), reside en su propio modo de acción: ejerce un efecto más suave y profundo sin agredir significativamente al organismo¹⁵.

2.3. Tratamiento mediante el uso de plantas medicinales

Ismael¹⁶ resalta el significado que han tenido las plantas medicinales en la farmacopea de todas las culturas del mundo, a tal punto que desde 1975 la Organización Mundial de la Salud (OMS), también reconoce la importancia de las medicinas tradicionales en el control de la salud generando un programa orientado a promover la medicina tradicional sobre todo en los países en desarrollo. En la actualidad existe la tendencia mundial para el rescate de la medicina tradicional, tanto en los países ricos como en los pobres, por razones diversas. En los países desarrollados esta consideración se debe a la escasa toxicidad que presenta esta alternativa terapéutica a comparación de la gran nocividad de los medicamentos de síntesis química. En los países en vías de desarrollo el uso de la medicina tradicional se ha intensificado porque la mayoría de su población no dispone de recursos suficientes para adquirir los costosos medicamentos disponibles y además, porque existe una cultura de tradición desde tiempos ancestrales para el uso de plantas medicinales. Esta realidad se ve reforzada por los datos de la OMS que confirman que alrededor del 80% de la población mundial recurre habitual o exclusivamente a la medicina natural, por ser para la mayor parte de esa población la única disponible. En este sentido, Farnsworth¹⁷ sostiene que el uso de plantas medicinales con fines terapéuticos se ha incrementado exponencialmente en el último cuarto de siglo.

Según lo definido por Moglia y Castiglione¹⁸ una planta medicinal es aquella especie vegetal que contiene en toda o alguna de sus partes constitutivas, principios activos útiles para combatir enfermedades. La parte de la planta empleada medicinalmente se conoce con el nombre de droga vegetal. Entre las múltiples ventajas que el tratamiento alternativo de plantas medicinales proporciona, se mencionan las siguientes:

- No tiene efectos colaterales, ni secundarios.

- No hay riesgos de intoxicación ni envenenamiento (el uso inapropiado de las plantas medicinales, no preparados adecuadamente pueden ser perjudiciales).
- No crea dependencia ni adicción.
- Se puede utilizar como una terapia preventiva.
- Es de efectos inmediatos (su acción terapéutica de absorción es de 2 a 5 segundos aproximadamente sobre o debajo de la lengua).
- No se contrapone con ningún medicamento de farmacia u algún otro tratamiento alternativo y puede combinarse para complementar un tratamiento alopático.
- Se pueden tratar simultáneamente varias enfermedades.
- En algunas afecciones de la piel como: alergias, ronchas, quemaduras, heridas, manchas, la microdosis también es de uso externo.

De acuerdo a lo anteriormente expuesto y ante la necesidad de buscar alternativas terapéuticas frente a las candidiasis, se vienen intensificando los estudios sobre las propiedades curativas o preventivas de plantas medicinales, sobre todo de sus potenciales principios activos. En este sentido existen propuestas de uso terapéutico en relación a plantas medicinales vienen siendo sugeridas para el tratamiento de la candidiasis vaginal¹⁹, dentro de lo cual se viene estudiando con bastante interés a *Stevia rebaudiana* (estevia), una planta nutracéutica que está siendo utilizada por sus propiedades edulcorantes e hipoglicemiantes ampliamente difundidas y a la que también se le atribuye un potencial efecto antibacteriano y antimicótico que viene concitando estudios serios por las implicancias de aportes significativos a las posibilidades de promover alternativas terapéuticas naturales²⁰.

2.4. *Stevia rebaudiana* Bertoni. Características y propiedades

Stevia rebaudiana Bertoni, conocida comúnmente como “estevia”, es una planta originaria del hábitat semiárido de las laderas montañosas de Paraguay, específicamente de la región de la

Cordillera de Amambay. No obstante, puede crecer relativamente bien en una gran variedad de terrenos y climas²¹. Es un arbusto que posee en sus hojas una concentración mayor de principios activos definidos como glucósidos diterpenos conocidos comúnmente como esteviósidos. Es empleada como edulcorante natural de alta potencia, (300 veces más dulce que el azúcar de caña), termoestable, hipoglicemiante, no produce caries, es hipotensiva, no calórica, inocua para la salud y con actividad antimicrobiana contra algunos microorganismos^{22,23}.



Figura 1. *Stevia rebaudiana* Bertoni. Plantas en cultivo controlado

A continuación, de acuerdo a lo reportado en algunas investigaciones²⁴⁻²⁶ se describe las principales propiedades de la estevia:

Propiedades físico- químicas de estevia para la industria farmacéutica y de alimentos

- El edulcorante de estevia es resistente al calor (hasta 200°C).
- Se funde a 238°C. Por lo tanto presenta estabilidad a las temperaturas habituales en el procesamiento de alimentos y productos medicinales.

- Resistencia al pH: es suficientemente estable entre pH 3 a 9.
- Incoloro, no se observa oscurecimiento, aún en las condiciones más rigurosas de procesado de alimentos.
- No fermenta.
- Refuerza sabores y olores.
- No tiene calorías por ser no metabolizable y es natural.
- Es un edulcorante no tóxico y no adictivo.
- El extracto obtenido directamente de hojas secas es entre 20-35 veces más dulce que el azúcar de caña (sacarosa).
- En su forma procesada (extracto seco, pulverizado), es entre 250 a 300 veces más dulce que la sacarosa
- Es fuente de antioxidantes.
- Enaltecedor de bebidas alcohólicas (agente de envejecimiento y catalizador).
- Altamente soluble en agua, alcohol etílico y metílico e insoluble en éter.
- Capacidad osmótica: presenta buenas propiedades osmóticas.

Beneficio potenciales de estevia para la salud

Dado el interés del presente estudio se resaltan algunas de las propiedades terapéuticas de la estevia señaladas por Oviedo²⁶:

- Acción hipoglicémica en el tratamiento contra la diabetes.
- Acción cardiovascular.
- Acción antimicrobiana como agente bactericida y antimicótico
- Acción tónica digestiva.
- Previene las caries y retarda la placa.
- Controla el eczema y el acné, agente curativo rápido para el cuidado de la piel.

- Cero calorías.
- Para el tratamiento de la hipertensión y el control de la presión arterial.
- Antagonista del calcio.

Cabe resaltar que en el año 2009 fue presentada una investigación⁸ que demostró el logro de adaptación de tres variedades de estevia en el departamento de Cajamarca, concretamente en algunas comunidades de las provincias de San Ignacio y Chota. Dicha investigación estuvo a cargo de investigadores de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cajamarca y fue patrocinada por las siguientes organizaciones: ONG EDAC (Equipo de Desarrollo Agropecuario de Cajamarca), Asociación INCAGRO y Asociación de Agricultores Ecológicos de Cajamarca. Adicionalmente en el reporte de la ONG EDAC²⁷ se incluyó el estudio más detallado sobre los principios edulcorantes, los esteviósidos (azúcar de estevia), de las variedades adaptadas agronómicamente en los nichos ecológicos mencionados.

De manera complementaria, Gil y Carmona²⁸, han señalado que además de las potenciales propiedades nutracéuticas mencionadas, la estevia no es tóxica y no metabolizable en el hígado, con una consiguiente ausencia de efecto negativo a dicho órgano, contrariamente a lo que produce el azúcar de caña en su ruta de utilización metabólica. Los autores mencionados también han señalado que estevia no es acumulable en el organismo y al parecer en relación a su poder antimicótico no generaría situaciones de adquisición de resistencia, características que en suma convierten a la estevia en una candidata adecuada como fuente de principios inhibitorios antimicóticos, debido que la estevia no solamente tienen efecto hipoglicemiante, usado para contrarrestar los efectos de la diabetes, sino también otras potencialidades terapéuticas relacionadas con problemas cardiovasculares y también como agente bactericida y antimicótico, reportándose efectos contra *Candida albicans*⁹, entre otros efectos no menos importantes.

De otro lado, ha sido determinado que existen variedades de estevia, de las cuales se pueden obtener extractos líquidos y extractos secos (glicósidos diterpénicos totales), con diferencias en sus capacidades edulcorantes y antibióticas²³. Así mismo se viene adaptando a la estevia a los diferentes nichos ecológicos, que conjugados con la obtención de la hoja (materia prima), en diferentes etapas durante el período de cosecha, están permitiendo obtener resultados alentadores en cuanto al potencial de dicho recurso^{21,30}.

Cuadro 1. Composición química de *Stevia rebaudiana* Bertoni

CLASE	SUSTANCIAS (% w/w máximo obtenido)
Glucósidos diterpénicos	Esteviósido (7,0), Rebaudiósido A (1,43), Rebaudiósido B (0,44), Rebaudiósido C (0,4), Rebaudiósido D (0,03), Rebaudiósido E (0,03), Dulcósido A (0,029), Esteviolviósido (0,04)
Diterpenos labdánicos	Jhanol (0,0063), Austroinulina (0,06), 6-o-acetilaustroinulina (0,15)
Triterpenos	Acetato de B-amirina (-), Lupeol (-)
Esteroides	B-sitosterol (-), Estigmasterol (-)
Glucósidos flavonoides	Rutina (0,0073), Centaureidina (-), Quercitrina (-)
Taninos	No identificados
Aceites volátiles	Porcentaje masivo total: 0,12%
Alcanos	Octano-3-ol (0,00036), Oct-1-en-3-ol (0,00084)
Aldehídos	Hexan-1-ol (0,0011)
Alcoholes aromáticos	Alcohol bencílico (0,0012)
Monoterpenos	Canfor (0,0017), 1,8 cineol (0,00084), p-cymeno (0,00084), Geraniol (0,0016), Linalol (0,0067), Limoneno (0,0012), Oxido de linalol (0,0055), α -pineno (0,0048), β -pineno (0,0023), λ -terpineno (0,00024)
Sesquiterpenos	λ -Cadineno (0,0036), δ -Cadineno (0,0012), α -Cadinol (0,0017), tert-cadinol (0,0028), α -Colacoreno (0,0012), Calameneno (0,0018), β -Cariofileno (0,0013), α -Copaeno (0-00012), Oxido de cariofileno (0,019), α -cubebeno (0,00012), β -elemeno (0,0006)

Fuente: Pasquel³²

Los esteviósidos y los rebaudiósidos (principios activos más relacionados con los efectos edulcorantes de la estevia), tienen la estructura química diferente a las de las moléculas de azúcar común (sacarosa), de allí que el extracto seco obtenido industrialmente de la estevia viene a ser

una combinación de varios de los glucósidos que contiene este vegetal (Cuadro 1), cuyas proporciones varían de acuerdo a las variedades de estevia y también en función a los terrenos y las condiciones geoclimáticas donde se han cultivado³⁰.

Variedades de *Stevia rebaudiana* Bertoni

En la actualidad ha sido reportado³⁰ que existe un número importante de variedades cultivables de la especie *Stevia rebaudiana* Bertoni. De tales variedades a continuación se describen las características más resaltantes de las variedades evaluadas en el presente trabajo.

Variedad Criolla o Nativa paraguaya

Casaccia y Álvarez³⁰ sostienen que esta variedad es la más utilizada comúnmente por los productores actualmente. Esta variedad, es producto de la selección empírica efectuada por años por productores, llegando la misma a presentar ciertas características propias. Una ventaja de esta variedad es que puede ser propagada por semilla botánica y es de esperar que los tipos de plantas que aparecen en la descendencia de la variedad, correspondan mayormente a los mismos tipos de plantas que se encuentran en la población madre, pues se aduce que la población está en equilibrio. Sin embargo es posible esperar recombinaciones en la población, lo cual puede ser bien aprovechada para realizar selecciones de genotipos superiores.

La variedad Criolla, está constituida por una mezcla de varios tipos de plantas (varios genotipos), que varían en sus características morfológicas y fenológicas. Por esta razón, esta variedad presenta florecimiento heterogéneo afectando esto, negativamente la calidad de las hojas producidas, debido a que el productor no puede realizar en el momento oportuno la cosecha de las mismas. En su conjunto presenta un porte bajo, llegando a alcanzar un promedio de altura de 60 cm. en los meses de Diciembre o Enero. Presenta un potencial de rendimiento, en condiciones

experimentales, en el primer año de cultivo, de 1.889 Kg./ha./año (en tres cortes). Este rendimiento es sin riego y con una densidad de 100.000 plantas/ha. A nivel de cultivo comercial manejado con buenas prácticas agrícolas, el promedio de rendimiento es de 1.000 a 1.200 kg./ha/año.

El contenido promedio de la suma de Esteviósido y Rebaudiósido A, alcanza valores de 14%, en la segunda cosecha, que es la cosecha más productiva y con mayor contenido de glicósidos totales. Del total de ambos glicósidos, el 11% corresponde al Esteviósido; por su parte el Rebaudiósido A observa valores de 3 %; por lo que se deduce que solamente el 21 % del total de glicósidos corresponde al Rebaudiósido A. y el 79 % corresponde al Esteviósido, que es conocido de su sabor dulce pero amargo, lo cual se refleja en el sabor de las hojas de esta variedad. A nivel de campo en finca de agricultores, es común observar valores de 12 % de glicósidos totales, pues el producto cosechado viene mezclado con ramillas u otras impurezas, que inciden en la calidad final del producto.

Variedad EIRETE mejorada

Respecto a esta variedad, Casaccia y Álvarez³⁰ reportaron que en el año 2005 se lanzó oficialmente una nueva variedad de estevia, la variedad clonal, genéticamente mejorada, denominada IAN / VC – 142 (EIRETE), desarrollada en el Instituto Agronómico Nacional (IAN) de Caacupé (Paraguay), con características agronómicas ampliamente superiores a la variedad Criolla paraguaya. A los efectos de mantener la identidad genética del material, esta variedad, debe ser única y exclusivamente propagada asexualmente, es decir multiplicada por esquejes. Si se la multiplicara por semilla botánica, la descendencia se mostraría muy heterogénea en sus características morfológicas y fenológicas, por causa de la segregación genética. De hecho se cuentan con datos, que las progenies de esta variedad exhiben 29 % de merma en su rendimiento de hojas.

La variedad EIRETE presenta un ciclo más tardío que la variedad Criolla paraguaya (en general 10 a 12 días más largos), es de porte alto, pudiendo alcanzar 1.20 m. de altura en el mes de Diciembre y/o Enero. Posee hojas grandes y abundantes y tiene un tallo poco ramificado, permitiendo alta densidad en el cultivo. Florece totalmente en forma uniforme, lo cual facilita la realización del corte en el momento más oportuno, lo cual ocurre cuando aparecen los primeros botones florales. El rendimiento potencial de la variedad, obtenido en condiciones experimentales en el IAN, sin riego complementario, a una densidad de 100.000 plantas/ha., en el primer año de producción, es de 4.990 kg./ha/año.

Otra característica resaltante es la concentración de principios edulcorantes. EIRETE presenta 7% más que la variedad criolla, principalmente en lo que respecta al Rebaudiósido A. La suma de Esteviósido y Rebaudiósido A, en la cosecha alcanza valores promedios de 19 % del contenido total de glicósidos, el 10% pertenece al Rebaudiósido A y el 9 % al Esteviósido, deduciéndose que del total de glicósidos en hojas, el 52 % corresponde al Rebaudiósido A y el 48 % al Esteviósido, lo cual se traduce en una ventaja comparativa muy importante frente a las otras dos variedades de estevia en relación al sabor de la hoja, que se presenta muy dulce y sobre todo menos amargo.

Variedad Criolla San Ignacio

Esta variedad está referida a la variedad criolla paraguaya que fue introducida al Perú por agricultores interesados en esta planta hace aproximadamente 20 años atrás, conforme avanzaron los años fue asumida como variedad local y no fue caracterizada ni identificada agronómicamente sino hasta el año 2008 en que a través del estudio realizado por Tirado et al.⁸ se la evaluó en relación a su adaptabilidad y rendimiento de acuerdo a su cultivo agronómico en diferentes zonas agroecológicas del norte del Departamento de Cajamarca en las provincias de San Ignacio y Chota²⁷. Presenta características similares a la variedad criolla paraguaya tanto de cultivo como en

rendimiento en campo, pero a nivel de producción de glicósidos totales (rebaudiósidos y esteviósidos), presenta un nivel un poco mayor en contenido de los mencionados principios activos edulcorantes, pero de acuerdo a lo indicado por Jiménez et al.³⁴ su concentración aún es menor respecto a la variedad EIRETE mejorada, sobre todo si se cultiva en suelos de textura franca, arenosa, con buena permeabilidad y drenaje, pH de 6,5 a 7,0 (tendencia a neutro), en campos de similares características tal como los evaluados en la provincia de San Ignacio del departamento de Cajamarca. Si se cultivase en suelos de la zona de costa, los mismos tendrían que tener poca o nula salinidad.

2.5. PRUEBAS PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LOS ANTIMICROBIANOS

Para determinar la actividad inhibitoria de los antimicrobianos se han establecido técnicas de análisis de laboratorio^{1,2} conocidas también como evaluaciones de susceptibilidad *in vitro*. Precisamente en el laboratorio se puede estudiar la susceptibilidad de agentes infecciosos, aislados de las distintas muestras biológicas frente a un conjunto de antimicrobianos bajo ciertas normas previamente estandarizadas. Esta información, junto con las consideraciones sobre la probable identidad del agente infectante y tomando en cuenta los factores del hospedero, constituyen las bases para la elección del antimicrobiano correcto como parte de la terapia antimicrobiana.

Los métodos más utilizados para evaluar, *in vitro*, la susceptibilidad de los agentes infecciosos son:

2.5.1. Antibiograma en dilución²

Según lo indicado por Murray et al.², en este tipo de prueba se mide la mínima concentración de antimicrobiano que es capaz de inhibir el crecimiento del agente infeccioso. También permite determinar la concentración mínima que corresponde a la mínima cantidad de antimicrobiano

capaz de inhibir el crecimiento del agente infeccioso. Es la técnica de referencia de la mayoría de los estudios de susceptibilidad antimicrobiana. Sus limitaciones principales son la complejidad y el costo de la metodología utilizada.

2.5.2. Antibiograma en difusión en agar (Método de Kirby Bauer)

Según Bauer³⁷, esta técnica consiste en el inóculo del agente infeccioso en concentración conocida en una placa con medio sólido y la aplicación en la superficie de discos de papel impregnados en concentraciones conocidas de antimicrobianos de prueba. El efecto antimicrobiano se manifiesta por la presentación de un halo de inhibición alrededor del disco que contiene el antimicrobiano probado. De acuerdo al diámetro del halo de inhibición alrededor del disco, que es medido en milímetros, se califica al agente infeccioso como sensible o resistente al antimicrobiano evaluado. Es una técnica simple y económica, pero aporta solo datos semi cuantitativos o cualitativos respecto a la susceptibilidad de la bacteria. No es útil para la mayoría de los microorganismos de crecimiento lento o difíciles de cultivar y no ha sido estandarizado para bacterias anaerobias.

2.5.3. Método de los pocillos

Estrada et al.²⁹ han descrito este método que consiste en enfrentar al agente patógeno diseminado sobre la superficie de la placa de un medio de cultivo sólido (agar), a la cual se le practica orificios de igual diámetro en los que se deposita cantidades conocidas del agente antimicrobiano.

CAPÍTULO III

DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE LA HIPÓTESIS

3.1. Tipo, diseño y nivel de investigación

Investigación aplicada, de diseño experimental, de nivel analítico - explicativo.

3.2. Localización del estudio

La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio del área de Biotecnología del Centro de Investigación para el Control de Enfermedades Transmisibles e Investigaciones Biológicas y Biotecnológicas (CICET-BIOTEC), de la Universidad Nacional de Cajamarca (Av. Atahualpa N° 1050 Edificio 1Q-101– Cajamarca). Así mismo, se contó con la colaboración del Laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital Regional de Cajamarca para la obtención de las cepas de *Candida albicans* de pacientes que acudieron al servicio de laboratorio. Los análisis de composición de los extractos secos, mediante cromatografía de capa fina (HPLC), fueron realizados en el Laboratorio de Análisis de la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad Nacional de Trujillo.

3.3. Unidad de análisis, población y muestra

3.3.1. Unidad de análisis

Se constituyó en unidad de análisis la cepa de *Candida albicans* aislada de su correspondiente paciente que acudió al servicio de análisis del Laboratorio del Hospital Regional de Cajamarca y que fue diagnosticada como infectada por dicho agente micótico.

Criterios de inclusión

Se consideraron los siguientes criterios:

- Cepas provenientes de pacientes diagnosticadas con infección por *Candida albicans*.
- La cepa proporcionada para el estudio fue aislada previamente en el laboratorio hospitalario en medio de cultivo adecuado (Agar Sabouraud).
- Cada cepa a utilizar en el estudio fue obtenida a partir de una réplica de laboratorio desde la cepa hospitalaria constituida como cultivo puro, previamente identificado.

Criterios de exclusión

Fueron descartadas del estudio:

- Cepas que no provinieron del servicio de análisis de Laboratorio del Hospital Regional de Cajamarca.
- Cepas que no provinieron de cultivo puro aislado en laboratorio.
- Cepas contaminadas a partir de los cultivos hospitalarios.
- Cepas que no provinieron a partir de la réplica correspondiente.

3.3.2. Población

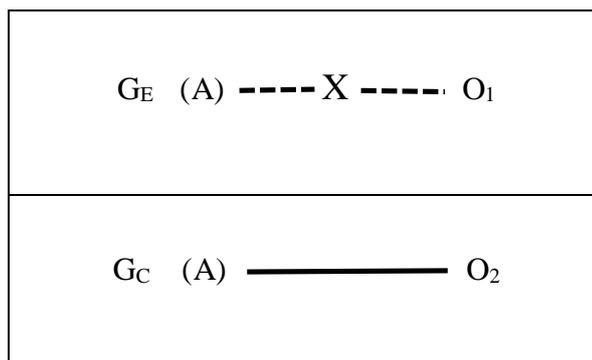
La población estuvo conformada por todas las cepas de *Candida albicans* aisladas a partir de las pacientes que acudieron al servicio de análisis del Laboratorio del Hospital Regional de Cajamarca.

3.3.3. Muestra

La muestra estuvo constituida por 30 cepas de *Candida albicans* obtenidas al azar a partir de pacientes con candidiasis vaginal que acudieron al servicio de análisis del Laboratorio del Hospital Regional de Cajamarca que resultaron positivas de infección con dicho agente micótico.

3.4. Diseño de Investigación

El presente estudio fue realizado bajo el tipo de diseño experimental con grupo de control post-test, con tres repeticiones. El diseño experimental se ha basado en lo propuesto por Sánchez³³, de acuerdo al siguiente esquema:



Donde:

G_E : Grupo experimental (30 cepas de *Candida albicans* obtenidas por réplica en laboratorio a partir de cada cepa hospitalaria).

G_C : Grupo control (30 cepas de *Candida albicans* obtenidas por réplica en laboratorio a partir de cada cepa hospitalaria).

(A) : Criterio de aleatorización o selección al azar de los grupos experimental y control

X : Variable independiente (experimental): aplicación de los extractos de las tres variedades de estevia.

— : Línea continua de no aplicación de la variable independiente

O_1 : Post test al grupo experimental (resultados del efecto de los extractos de estevia).

O_4 : Post test al grupo control (resultados de la no aplicación de los extractos de estevia).

De manera más detallada el diseño experimental se resume en el Cuadro 2 que se muestra a continuación:

Cuadro 2. Descripción del diseño experimental aplicado

Muestra	n	Grupos de Trabajo	n	Tratamiento aplicado	Resultado esperado
Cepas de <i>Candida albicans</i> obtenidas al azar de pacientes con candidiasis vaginal que acudieron al Servicio de Análisis del Laboratorio del Hospital Regional de Cajamarca.	30	Grupo experimental: Cepas recuperadas mediante cultivo en laboratorio. Dichas cepas fueron sometidas al tratamiento.	30	Extractos de estevia contenidos en discos para pruebas de sensibilidad microbiana: - Extracto acuoso frío: EAF - Extracto acuoso caliente: EAC - Extracto seco: ES Controles de sensibilidad Control positivo: - Disco de fluconazol (25µg) Control negativo: - Disco con agua destilada estéril	Presencia o ausencia de halo de inhibición (expresado en mm.), del crecimiento de la cepa sometida al tratamiento.
		Grupo control: Réplicas individuales en cultivo de cada cepa experimental que no fueron sometidas al tratamiento.	30	No fue sometido al efecto de los extractos de estevia. Control negativo: - Disco con agua destilada estéril	Crecimiento de la cepa en el medio de cultivo con ausencia de halo de inhibición del crecimiento.

3.5. Diseño metodológico

Técnicas e instrumentos de recolección de datos

3.5.1. Obtención y preparación de las muestras vegetales

La obtención de las muestras vegetales se realizó a partir del stock de plantas que fueron cosechadas en la zona de cultivo de la comunidad de Dos de Mayo de la provincia de San Ignacio, Departamento de Cajamarca. La zona de cultivo formó parte del proyecto de

investigación de adaptación agrícola de estevia en zonas agroecológicas de la provincia de San Ignacio²⁷. Los criterios de selección de las muestras vegetales fueron los siguientes: plantas completas correspondientes a las variedades criolla San Ignacio, criolla paraguaya y la variedad mejorada EIRETE, de tamaño regular (en promedio 70 cm. de altura), que presentaron hojas enteras, de bordes completos, de color verde claro, que no estén deterioradas por insectos ni picaduras y sin manifestación de plagas (manchas foliares). Además se consideró el hecho de haber sido cosechadas al 10% de floración, dado que esta condición es la más favorable para que las plantas tengan una alta concentración de glicósidos³². Para la obtención de las muestras vegetales se utilizó guantes de látex. Las plantas colectadas fueron colocadas en sacos de polietileno de primer uso hasta completar 5 Kg. por cada variedad en estudio. Luego fueron trasladadas al laboratorio del CICET. Posteriormente, con el uso de guantes de látex y tijeras limpias, se recolectó, en bolsas plásticas de primer uso, las hojas de estevia por cada variedad estudiada. A continuación las hojas fueron lavadas con agua destilada estéril en recipientes limpios de plástico, luego desinfectadas con solución de hipoclorito de sodio a una concentración de 200 ppm., finalmente, las hojas fueron enjuagadas con suficiente agua destilada estéril para retirar los residuos de hipoclorito y luego oreadas al aire a temperatura ambiente, protegidas convenientemente de la contaminación externa con papel kraft de primer uso.

Adicionalmente, con un primer grupo de hojas, por cada variedad, se procedió a la obtención de extracto acuoso frío (extracto crudo). De otro lado, con un segundo grupo de hojas desinfectadas y oreadas, se procedió, protegidas con papel kraft, a desecarlas en estufa a 40°C por 24 horas, finalmente se las mantuvo en paquetes de 250 g. dentro de bolsas plásticas ziploc de primer uso. A partir de estas hojas se obtuvo los extractos acuosos calientes y los extractos secos.

3.5.2. Obtención de extractos

Extracto acuoso frío (crudo): EAF (solución p/v 1:1)

Este extracto se conoce también como extracto crudo ya que no es sometido a ningún tratamiento adicional más que el triturado o machacado de las hojas. El procedimiento fue elaborado por el tesista. Se procedió de la siguiente manera:

Se pesó 10 g. de hoja fresca de cada variedad y por separado se colocó en mortero esterilizado de porcelana, procediéndose luego a machacar dicha muestra vegetal, adicionalmente se añadió 10 mL. de agua destilada estéril mezclándose todo el contenido para luego proceder a filtrar dicha mezcla a través de un filtro de papel de celulosa y recoger el filtrado en un vaso de precipitación de 50 ml. de capacidad, luego el filtrado fue esterilizado mediante filtros bacteriológicos (Creative Biomedics) y recolectado en frascos pequeños de vidrio esterilizados, tapados con tapa de goma y conservados luego a temperatura ambiente.

Extractos acuoso caliente: EAC (infusión al 10%)

El procedimiento para obtener dicho extracto se basó en el método propuesto por Jiménez et al.³⁴ tal como se describe a continuación:

Preparación previa de la especie vegetal

Se procedió a una molienda previa en mortero para desnervarlas y luego continuar con la molienda hasta obtener aproximadamente 500 g. de pulverizado grueso, el que fue colocado en un envase de vidrio ámbar con tapa esmerilada para su conservación a temperatura ambiente.

Preparación del extracto acuoso caliente

Se pesó 100 g. de pulverizado de cada variedad y por separado se colocó en vaso de precipitación de 2 Lt. Se añadió 900 mL. de agua destilada caliente entre 70 - 80°C,

(previamente hervida), luego se tapó el vaso con papel aluminio dejando reposar la mezcla por 1 hora. En este lapso de tiempo se mantuvo el rango de temperatura mencionado, con una cocina eléctrica. Luego se filtró la mezcla a través de gasa y algodón esterilizados. El filtrado se colocó en frasco ámbar con tapa roscada de 1 Lt. de capacidad y se conservó a temperatura ambiente.

Extracto seco: ES (cristales de glicósidos diterpénicos totales)

Este extracto obtenido como polvo seco blanquecino contiene solamente los cristales de glicósidos diterpénicos totales. La extracción de los glicósidos mediante el método establecido³⁵ que se describe a continuación:

Extracción de cristales de glicósidos diterpénicos totales

1. Colocar 100 g de hojas de estevia en 2 L. de agua destilada a una temperatura de 60°C por el lapso de 4 horas. Añadir 150 g de CaO a fin de incrementar el pH a 14, dejar reposar por 2 horas.
2. Filtrar e insuflar CO₂ hasta que el filtrado disminuya su pH a 8 y dejar reposar por 1 hora.
3. Filtrar y adicionar 150 g de carbón activado granulado y dejar reposar por 2 horas.
4. Filtrar y concentrar hasta la tercera parte, luego adicionar alcohol etílico de 96° G.L. en proporción de 3:2 respecto al concentrado. Centrifugar a 3500 r.p.m. por el lapso de 15 minutos.
5. Pasar el sobrenadante por una columna de resina de intercambio catiónico ácido fuerte (Amberlite IR 120) y luego por otra columna de resina de intercambio aniónico base débil (Amberlite IRA 68). Repetir el paso 8, pero con columnas nuevas.
6. Concentrar y cristalizar. El polvo obtenido se coloca en frascos pequeños de vidrio de color ámbar para su conservación a temperatura ambiente.

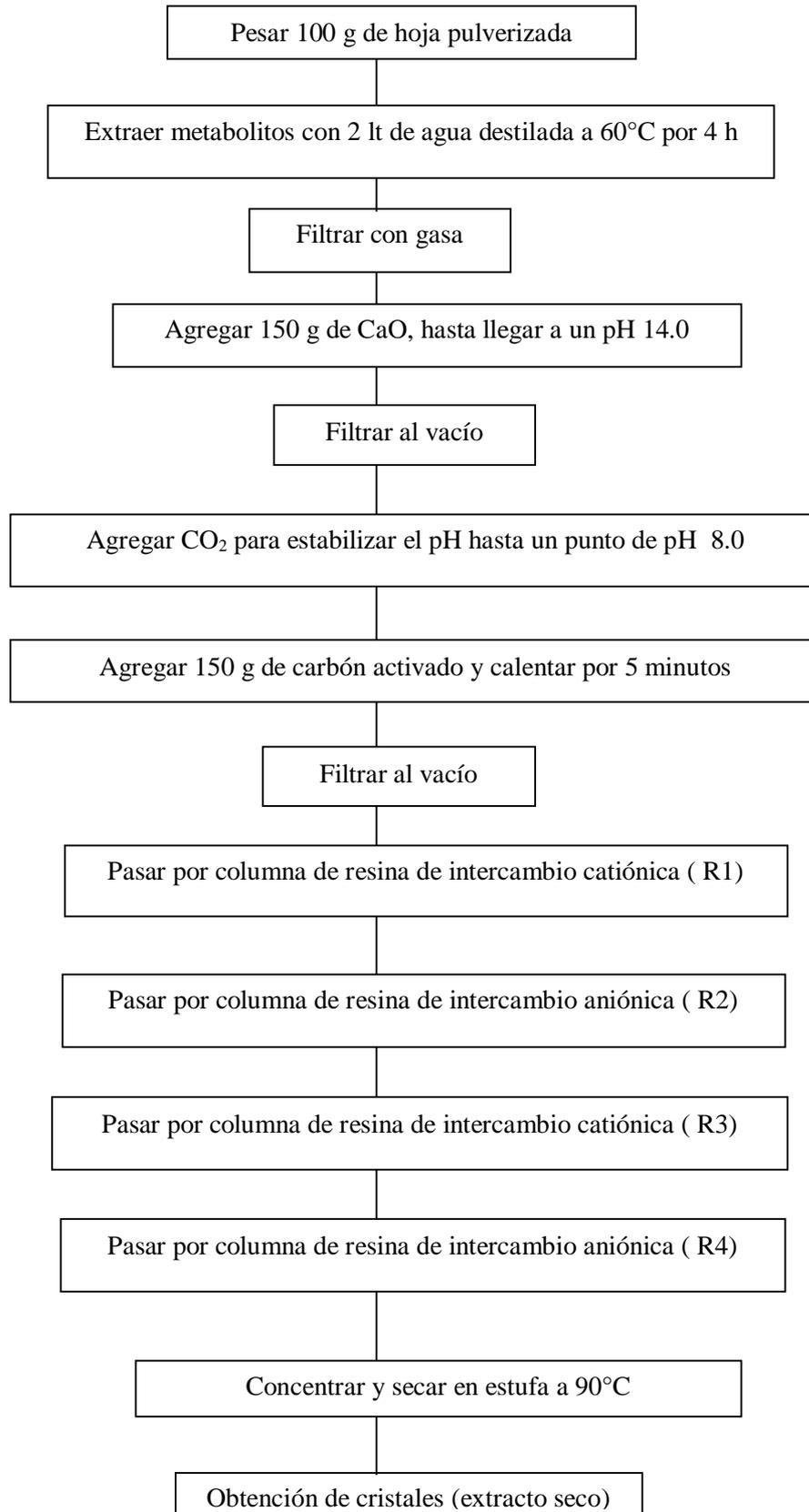


Figura 2. Diagrama de flujo de la extracción de los glicósidos totales.
(Basado en el método propuesto por Payzant et al.³⁵)

Verificación de la presencia de glicósidos diterpénicos totales:

Esta verificación estuvo orientada a la identificación de glicósidos diterpénicos totales (posibles metabolitos antimicóticos), mediante Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC) (ver Apéndice).

Fundamento

La Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC) se basa en hacer pasar una fase móvil (eluyente), líquido donde arrastra a una muestra muy diluida, por una fase estacionario de polaridad invertida al de la muestra, generando retenciones en el tiempo según la característica química de cada metabolito³⁶.

Procedimiento

Se prepara la fase móvil (acetonitrilo 80%, agua 20%), en una mezcla isocrática. Se inyecta 20 μ L de una solución que contiene 2 mg/mL (patrón o muestra), siendo arrastrada por el eluyente en una columna que contiene una fase estacionaria de silica-NH₂ (250 mm x 4,6 mm, de 5 μ m de tamaño de partícula), a una temperatura de 30 °C, con un flujo de 0,8 mL/min, a una longitud de onda de 190 nm³⁶.

Preparación de los discos de sensibilidad

Los discos de sensibilidad fueron preparados en grupos de 100 unidades teniendo en cuenta la variedad en estudio y el tipo de extracto según el Cuadro 3 adjunto:

Cuadro 3. Distribución de los discos de sensibilidad para las pruebas de efecto antimicótico

Variedad de estevia	Tipo de extracto		
	Extracto acuoso frío (EAF)	Extracto acuoso caliente (EAC)	Extracto seco (ES)
Criolla paraguaya	100	100	100
Criolla San Ignacio	100	100	100
EIRETE mejorada	100	100	100

Preparación de discos de sensibilidad con extracto acuoso frío y extracto acuoso caliente

Para la preparación de los discos de sensibilidad se tomó en cuenta el método establecido^{37,38}.

Previo a cada prueba de sensibilidad, se procedió a lo siguiente:

En cada disco de sensibilidad (de papel de filtro grueso para transferencia de proteínas 3MM), de 5 mm de espesor, previamente esterilizados en autoclave a 121°C por 15 min. a 15 lb. de presión y desecados en estufa a 37°C por 24 h., se colocó, por separado 50µL. de extracto acuoso frío y 50µL. de extracto acuoso caliente, por cada variedad en estudio, directamente de los frascos que contenían los extractos obtenidos. Luego se procedió a su desecación en estufa a 37°C por 24 h., dentro de una placa Petri de vidrio esterilizada. A continuación se conservaron los discos, dentro de la placa Petri, a temperatura ambiente.

Preparación de discos de sensibilidad con extracto seco

En este caso también se tuvo en cuenta el método establecido^{37,38}. Para lo cual previamente se diluyó el polvo de estevia, obtenido por cada variedad en estudio, en agua destilada estéril en una concentración de 100 mg/ml, para luego en cada disco especial de sensibilidad (de papel de filtro grueso para transferencia de proteínas 3MM), de 5 mm de espesor colocar por separado 50 µL. de extracto seco, por cada variedad en estudio. Luego se procedió a su desecación en estufa a 37°C por 24 h., dentro de una placa Petri de vidrio esterilizada. A continuación se conservaron los discos, dentro de la placa Petri, a temperatura ambiente.

Preparación de las cepas de *Candida albicans*

Se utilizaron para el estudio 30 cepas de *Candida albicans*, identificadas y aisladas en Agar Sabouraud a 35°C por 24 a 48 h. a partir de pacientes con candidiasis vaginal que acudieron al Servicio de Laboratorio del Hospital Regional de Cajamarca. Las cepas fueron identificadas en dicho laboratorio luego de cultivo previo, en tubos de ensayo que contenían Agar Sabouraud, para ser posteriormente replicadas y aisladas en el laboratorio del CICET-BIOTEC, con la finalidad de

obtener cultivos puros, en placas Petri conteniendo también Agar Sabouraud. Antes de seleccionar el cultivo puro se procedió a la verificación macroscópica directa de las características de las colonias típicas aisladas de *Candida albicans*, complementadas con observación microscópica directa de las características típicas de levadura y de tubos germinales, mediante coloración con cristal violeta, para posteriormente conservar los aislamientos en refrigeración entre 2 a 8°C.

Antes de proceder a la evaluación de la sensibilidad a los antimicóticos de prueba, se procedió a la obtención, en placa Petri con Agar Sabouraud, de cultivos frescos de cada cepa cuyos tiempos de incubación oscilaran entre 24 a 48 h. a 35°C. La obtención de cultivos frescos se hizo a partir de los aislados refrigerados mencionados en el párrafo anterior.

EVALUACION *in vitro* DEL EFECTO INHIBITORIO DEL CRECIMIENTO DE *Candida albicans* (Prueba de sensibilidad *in vitro* a los antimicóticos)

La evaluación de la sensibilidad de *Candida albicans* a los antimicóticos contenidos en los extractos de estevia se realizó tomando como referencia dos métodos estandarizados para la evaluación de la susceptibilidad *in vitro* de microorganismos: 1) el método de Kirby Bauer³⁷, a través del cual se determina el diámetro de los halos de inhibición en mm. y su consiguiente comparación con patrones establecidos para determinar grados de sensibilidad o resistencia a los agentes antibacterianos y 2) test de susceptibilidad de *Candida albicans* a fluconazol mediante discos de difusión^{38,39}, que al igual que el método de Kirby-Bauer, también mide diámetros de zonas de inhibición del crecimiento de las levaduras patógenas. Estos métodos son conocidos también como antifungigramas⁴⁰. En el presente estudio se ha seguido el siguiente esquema de trabajo (Figura 3):

Procedimiento General:

1. Sembrar mediante estriado con hisopos de algodón las cepas de *Candida albicans* en Agar Sabouraud.
2. Colocar asépticamente los discos conteniendo extractos acuoso frío, acuoso caliente y extracto seco, así como los controles (positivo y negativo), respectivos, sobre el cultivo de *Candida albicans*.
3. Incubar a 37°C por 24 a 48 horas.
4. Leer los resultados mediante la medición del diámetro de inhibición del crecimiento de *Candida albicans*.

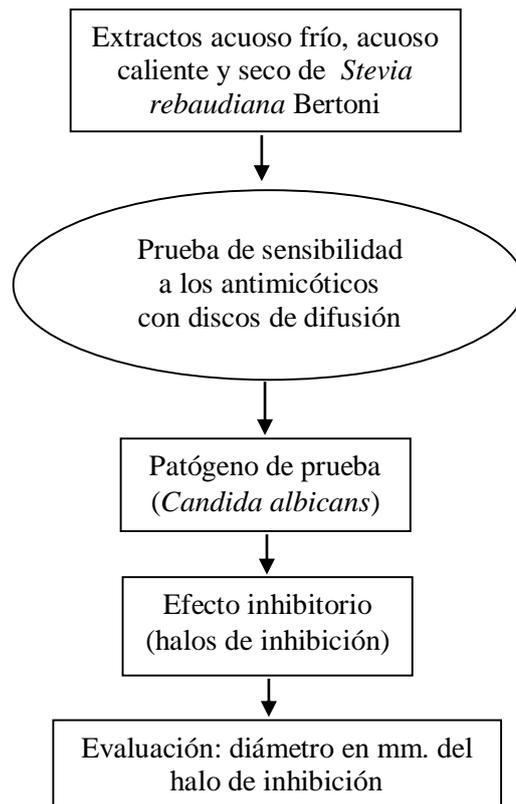


Figura 3. Diagrama de evaluación del efecto antimicótico de las tres variedades de *Stevia rebaudiana* Bertonii (según Kirkpatrick et al. y Barry et al.^{38,39,40})

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El uso de productos naturales con propiedades terapéuticas tiene una larga historia. Estos productos obtenidos a partir de plantas, animales o fuentes minerales han sido las principales fuente de medicinas. Muchos esfuerzos se han hecho para descubrir nuevos compuestos antimicrobianos a partir de varias fuentes tales como microorganismos, animales y plantas. Estos esfuerzos se han llevado a cabo mediante evaluaciones sistemáticas que han permitido descubrir nuevos y potencialmente efectivos compuestos antimicrobianos⁴¹, aunque en relación a *Stevia rebaudiana*, a pesar que en otras latitudes vienen llevándose a cabo pruebas de su potencial antimicrobiano⁴², en nuestro país no se han hecho estudios sobre su potencial antimicótico y menos específicamente contra *Candida albicans*.

A través del presente estudio, se ha determinado que *Stevia rebaudiana* Bertoni tiene efecto anti *Candida albicans*, causante de infecciones vaginales, pero tal efecto es diferenciado dependiendo de las condiciones de obtención de los principios activos, así como de la variedad de estevia que se ha llegado a adaptar agronómicamente en la zona norte de la región Cajamarca, concretamente en la provincia de San Ignacio.

El análisis de los resultados obtenidos a través del presente estudio, se muestran a continuación:

Efecto de los extractos por variedad ensayada

Variedad Criolla Paraguaya

El efecto de los extractos acuosos frío y caliente y el extracto seco de esta variedad se muestra en la Tabla 1 y Figura 4, mediante los cuales puede evidenciarse que el efecto mayor es mostrado por el extracto acuoso frío, pero respecto al efecto mostrado por el antimicótico usado como control (fluzonazol), dicho efecto resulta ser significativamente menor, mostrando halos de

inhibición menores a 15 mm. de diámetro, frente a los valores de halos inhibitorios entre 24 y 30 mm. de diámetro causados por el control. Cabe resaltar que analizado el efecto de cada extracto de manera independiente se observa cierta homogeneidad en dichos efectos lo que puede evidenciar, por parte de las cepas hospitalarias de *Candida albicans*, una susceptibilidad bastante similar frente a los metabolitos antimicóticos presentes en cada uno de los extractos probados.

Tabla 1. Actividad *in vitro* de extractos acuosos y seco de la variedad criolla Paraguaya de *Stevia rebaudiana* Bertoni sobre cepas de *Candida albicans*, mediante tres repeticiones.

Cepa	Diámetros promedio de halos de inhibición (mm)				
	EAF	EAC	ES	C(+)	C(-)
1	12.0 ± 1.73*	7.0 ± 1.73*	2.0 ± 1.73*	28.0 ± 4.36*	s.a.
2	14.0 ± 1.00*	6.7 ± 1.15*	1.0 ± 1.00 *	28.0 ± 1.73*	s.a.
3	12.0 ± 2.64*	7.0 ± 2.64*	2.3 ± 1.52*	27.7 ± 1.15*	s.a.
4	13.0 ± 2.64*	9.6 ± 3.05*	1.0 ± 1.00*	29.0 ± 3.60*	s.a.
5	13.0 ± 2.00*	7.6 ± 1.52*	1.0 ± 1.00*	30.7 ± 4.72*	s.a.
6	14.2 ± 3.21 *	6.3 ± 1.15*	3.0 ± 2.00*	28.3 ± 2.51*	s.a.
7	13.3 ± 2.51*	8.3 ± 2.30*	3.3 ± 1.52*	28.3 ± 4.04*	s.a.
8	12.3 ± 1.52*	8.3 ± 2.08*	2.3 ± 2.51*	25.3 ± 1.52*	s.a.
9	11.6 ± 3.05*	6.0 ± 2.64*	3.3 ± 1.52*	24.3 ± 5.70*	s.a.
10	11.0 ± 1.00*	7.3 ± 2.08*	3.3 ± 2.51*	27.0 ± 3.60*	s.a.
11	11.0 ± 2.64*	8.3 ± 1.52*	2.3 ± 1.52*	28.0 ± 3.60*	s.a.
12	11.3 ± 1.52*	7.3 ± 1.52*	2.0 ± 1.73*	26.3 ± 2.08*	s.a.
13	11.6 ± 3.51*	7.0 ± 1.00*	3.0 ± 1.00*	25.3 ± 2.30*	s.a.
14	13.3 ± 2.51*	6.6 ± 2.51*	2.0 ± 2.00*	30.7 ± 0.57*	s.a.
15	11.3 ± 2.51*	6.3 ± 2.51*	1.0 ± 2.64*	26.0 ± 2.00*	s.a.
16	12.6 ± 3.05*	8.6 ± 2.51*	2.0 ± 2.00*	28.0 ± 2.00*	s.a.
17	11.3 ± 3.50*	6.0 ± 3.00*	2.0 ± 1.73*	28.7 ± 2.08*	s.a.
18	13.3 ± 2.08*	7.3 ± 2.08*	2.3 ± 2.88*	24.3 ± 3.51*	s.a.
19	11.2 ± 3.05*	6.0 ± 2.64*	1.7 ± 0.57*	27.7 ± 2.88*	s.a.
20	15.0 ± 2.00*	6.0 ± 1.00*	2.3 ± 1.52*	29.6 ± 2.30*	s.a.
21	10.0 ± 1.73*	6.3 ± 1.52*	2.7 ± 1.52*	24.7 ± 2.51*	s.a.
22	12.3 ± .08*	5.6 ± 1.52*	2.3 ± 2.08*	29.0 ± 3.00*	s.a.
23	10.0 ± 2.64*	5.0 ± 2.64*	2.0 ± 2.00*	28.3 ± 3.51*	s.a.
24	13.4 ± 3.05*	5.6 ± 1.52*	2.7 ± 2.51*	29.0 ± 2.00*	s.a.
25	11.0 ± 2.64*	7.0 ± 2.00*	2.7 ± 2.08*	25.0 ± 2.64*	s.a.
26	13.2 ± 4.04*	6.3 ± 2.08*	1.0 ± 1.00*	26.0 ± 4.00*	s.a.
27	12.6 ± 3.05*	7.7 ± 0.57*	2.3 ± 1.52*	29.7 ± 3.21*	s.a.
28	13.0 ± 4.00*	5.6 ± 0.57*	2.0 ± 2.00*	26.0 ± 2.00*	s.a.
29	11,3 ± 2,51*	6.3 ± 1.52*	1.3 ± 0.57*	29.0 ± 4.00*	s.a.
30	14.0 ± 3.05*	5.0 ± 2.64*	2.0 ± 1.00*	28.6 ± 3.05*	s.a.

Fuente: datos del experimento

EAF: extracto acuoso frío **EAC:** extracto acuoso caliente **ES:** extracto seco **C(+):** control positivo (fluconazol)

C(-): control negativo **s.a.** sin actividad.

Se muestran los promedios a partir de tres repeticiones de los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* con sus respectivas desviaciones estándar.

* No hay diferencia significativa cuando $p < 0.01$

Este hecho permite considerar que los tratamientos a los que se sometió a los extractos acuoso caliente (tratamiento de extracción con calor) y en especial al extracto seco (tratamiento de extracción mediante agua caliente y la acción adicional de sustancias químicas, alcalinizantes y acidificantes), de alguna manera, han influido alterando la composición de los extractos en relación a sus componentes activos antimicrobianos, que de cierta forma y sobre todo en los extractos acuosos fríos, pueden actuar de manera concomitante con los otros componentes termorresistentes para ejercer específicamente su efecto antimicótico contra las cepas de *Candida albicans*. En este último caso, el extracto seco está compuesto en gran mayoría por los glucósidos diterpénicos (esteviósido y rebaudiósidos), tal como lo demuestra el análisis cromatográfico por HPLC (ver Apéndice), aunque algunos estudios⁴³, señalan que en los extractos secos de hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni, contienen además de glicósidos diterpénicos, flavonoides, alcaloides, clorofilas solubles en agua y xantofilas, también contienen ácidos hydroxycynámico, oligosacáridos neutros solubles en agua, azúcares libres, aminoácidos, lípidos, aceites esenciales y otros elementos traza. Esta composición no está referida a la obtención de extracto seco mediante el método modificado a partir del referido por algunas investigaciones³⁵, que permite obtener un extracto más purificado. Lo anteriormente afirmado permite considerar que los glicósidos diterpénicos (componentes edulcorantes de estevia), que están en mayor concentración en el extracto seco obtenido a través del presente estudio y aún los otros componentes referidos, no serían, precisamente, los elementos que tienen actividad antimicótica contra *Candida albicans*, dada la poca actividad mostrada mediante la Tabla 1 y Figura 4, respectivamente.

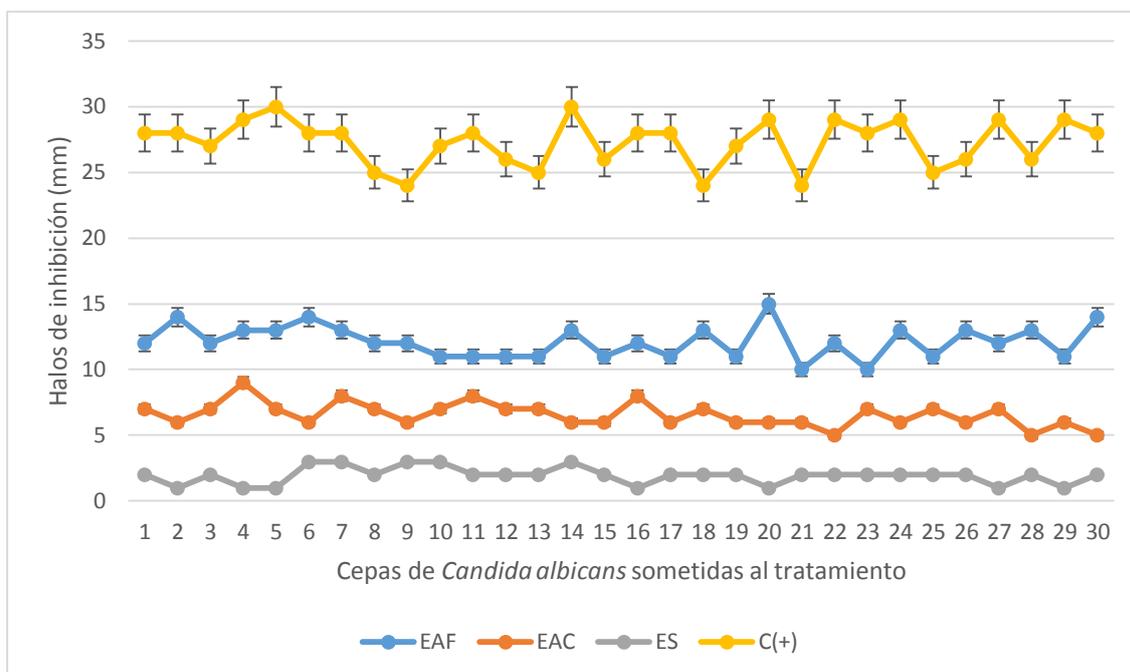


Figura 4. Efecto de extracto acuoso frío (**EAF**), extracto acuoso caliente (**EAC**) y extracto seco (**ES**) de *Stevia rebaudiana* Bertoni, variedad criolla paraguaya sobre el crecimiento *in vitro* de *Candida albicans*. C(+): control positivo (fluconazol). Valores obtenidos a partir de la Tabla 1.

De manera complementaria, de acuerdo a investigaciones previas^{41,42,43}, se puede afirmar que el contenido de las hojas de estevia, sobre todo en extractos que no han sido sometidos al procedimiento de obtención de extractos secos, es mucho más variable y diferenciado, ya que además de los dulcósidos, en las hojas frescas de estevia están presentes compuestos como: ácido ascórbico, β -caroteno, cromo, cobalto, magnesio, hierro, potasio, fósforo, riboflavina, tiamina, estaño, zinc, apigenina, austroinulina, avicularin, β -sitoesterol, ácido caféico, campesterol, cariofileno, centaureidin, ácido clorogénico, kaempferol, luteolina, quercetina, estigmasterol, además de compuestos fenólicos, entre otros mencionados por Geuns⁴⁵, como Labdans (diterpenoides): jhanol, austroinulina, varias esterebinas. Triterpenoides: acetato de amyrina, palmitato de lupeol. Esteroles: β -sitosterol, estigmasterol, campesterol. Flavonoides: apigenina, kampferol, luteolina, varias quercetinas, centaureidina, cosmosiina. Aceites volátiles: numerosos monoterpenos, sesquiterpenos, alcanoles, aldehídos y alcoholes aromáticos. Otros fitoquímicos: clorofilas A y B, betacaroteno, taninos, ácido tartárico, ácido cítrico y ácido fórmico. Componentes

inorgánicos adicionales como: calcio, sodio. Toda esta variedad de compuestos, cuya mayoría puede estar presente sobre todo en los extractos acuosos crudos fríos, explicaría el efecto diferencial mayor de este tipo de extracto sobre los extractos acuosos calientes y más sobre el efecto del extracto seco, obtenido como ya se mencionó, mediante tratamiento por calor y con compuestos químicos que podrían ejercer efectos desnaturalizantes sobre los componentes activos contra microorganismos en especial contra *Candida albicans*.

Variedad Criolla San Ignacio

Los efectos producidos por esta variedad se muestran en el Tabla 2 y Figura 5. En este caso y de forma similar al resultado obtenido con la variedad criolla paraguaya, se puede evidenciar que el extracto seco ha producido el menor efecto antimicótico y el extracto acuoso frío el mayor efecto inhibitorio. Aun así el efecto de los tres extractos se mantiene por debajo del efecto del control positivo (fluconazol), ya que no superan el límite de 25 mm. de diámetro de los halos de inhibición, aunque cabe resaltar que a pesar de esta limitante, el efecto de los extractos en especial el acuoso caliente y el acuoso frío (con halos de inhibición entre 9 a 25 mm. de diámetro), es superior a los valores mostrados por la variedad criolla paraguaya que no supera los 15 mm. de diámetro de sus halos de inhibición. Igualmente el efecto de cada uno de los extractos probados se mantiene bastante similar cuando se analizan tales efectos por separado respecto a las cepas de *Candida albicans* a las que se sometió al tratamiento *in vitro*.

Tabla 2. Actividad *in vitro* de extractos acuosos y seco de la variedad criolla de San Ignacio de *Stevia rebaudiana* Bertoni sobre cepas de *Candida albicans*, determinada mediante tres repeticiones.

Cepa	Halos de inhibición (mm)				
	EAF	EAC	ES	C(+)	C(-)
1	16.0 ± 2.00*	11.7 ± 1.52*	2.3 ± 1.52*	27.3 ± 6.11*	s.a.
2	18.7 ± 2.08*	11.0 ± 2.64*	1.6 ± 2.51*	32.7 ± 4.73*	s.a.
3	18.7 ± 2.51*	10.0 ± 2.51*	2.3 ± 1.52*	26.0 ± 2.00*	s.a.
4	21.0 ± 2.64*	13.7 ± 3.05*	1.0 ± 1.00*	28.0 ± 3.60*	s.a.
5	16.0 ± 2.00*	14.6 ± 1.52*	1.0 ± 1.00*	28.7 ± 4.72*	s.a.
6	18.7 ± 4.16*	10.3 ± 1.15*	3.0 ± 2.00*	28.7 ± 2.51*	s.a.
7	18.6 ± 2.51*	10.3 ± 2.30*	3.3 ± 1.52*	33.3 ± 4.04*	s.a.
8	22.3 ± 1.52*	10.3 ± 2.08*	2.3 ± 2.51*	32.3 ± 1.52*	s.a.
9	18.6 ± 3.05*	9.0 ± 2.64*	3.2 ± 1.52*	32.3 ± 5.69*	s.a.
10	21.0 ± 1.00*	9.3 ± 2.08*	3.3 ± 2.51*	29.0 ± 3.60*	s.a.
11	20.0 ± 2.64*	9.3 ± 1.53*	2.3 ± 1.52*	29.0 ± 3.60*	s.a.
12	25.3 ± 1.52*	10.3 ± 1.53*	2.0 ± 1.73*	30.3 ± 2.08*	s.a.
13	19.6 ± 3.51*	9.0 ± 1.00*	2.0 ± 1.00*	29.3 ± 2.31*	s.a.
14	18.3 ± 2.51*	10.7 ± 2.52*	3.0 ± 2.00*	30.7 ± 0.57*	s.a.
15	19.3 ± 2.51*	10.3 ± 2.51*	2.0 ± 2.64*	28.0 ± 2.00*	s.a.
16	21.6 ± 3.05*	12.7 ± 2.51*	1.0 ± 2.00*	30.0 ± 2.00*	s.a.
17	19.3 ± 3.51*	10.0 ± 3.00*	2.0 ± 1.73*	29.7 ± 2.08*	s.a.
18	20.3 ± 2.08*	10.3 ± 2.08*	2.3 ± 2.89*	28.3 ± 3.51*	s.a.
19	20.7 ± 3.05*	10.0 ± 2.65*	2.7 ± 0.57*	31.6 ± 2.89*	s.a.
20	18.0 ± 2.00*	10.0 ± 1.00*	1.3 ± 1.52*	29.7 ± 2.31*	s.a.
21	20.0 ± 1.73*	9.3 ± 1.53*	2.7 ± 1.52*	30.7 ± 2.51*	s.a.
22	22.3 ± 2.08*	10.7 ± 1.53*	2.3 ± 2.08*	31.0 ± 3.00*	s.a.
23	18.0 ± 2.65*	10.0 ± 2.64*	2.0 ± 2.00*	28.3 ± 3.51*	s.a.
24	19.7 ± 3.05*	9.7 ± 1.53*	2.7 ± 2.52*	28.0 ± 2.00*	s.a.
25	21.0 ± 2.65*	11.0 ± 2.00*	2.7 ± 2.08*	29.0 ± 2.64*	s.a.
26	19.7 ± 4.04*	9.3 ± 2.08*	2.0 ± 1.00*	29.0 ± 4.00*	s.a.
27	19.6 ± 3.05*	9.7 ± 0.57*	1.3 ± 1.52*	30.7 ± 3.21*	s.a.
28	19.0 ± 4.00*	11.7 ± 0.57*	2.0 ± 2.00*	30.0 ± 2.00*	s.a.
29	21.3 ± 2.51*	10.3 ± 1.53*	1.3 ± 0.57*	30.0 ± 4.00*	s.a.
30	19.7 ± 3.05*	13.0 ± 2.65*	2.0 ± 1.00*	29.7 ± 3.06*	s.a.

Fuente: datos del experimento

EAF: extracto acuoso frío. **EAC:** extracto acuoso caliente **ES:** extracto seco **C(+):** control positivo (fluconazol) **C(-):** control negativo **s.a.** sin actividad.

Se muestran los promedios a partir de tres repeticiones de los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* con sus respectivas desviaciones estándar.

* No hay diferencia significativa cuando $p < 0.01$

Como se puede notar, la diferencia mostrada en esta comparación estaría en relación a lo que ha sido reportado³², quienes determinaron en un estudio distinto sobre el nivel edulcorante (azúcares totales), mediante refractometría, de extractos acuosos de tres variedades de *Stevia rebaudiana* Bertoni, procedentes de seis localidades de las provincias de San Ignacio y Chota del departamento de Cajamarca, obtenidos mediante agua a 60 °C de temperatura, que la concentración de edulcorantes y de otros principios acompañantes en las 3 variedades evaluadas en la presente investigación, fue en el siguiente orden de menor a mayor: criolla paraguaya, criolla San Ignacio

y EIRETE mejorada. Esta diferenciación estaría mostrando, de una parte, que el nivel mayor de componentes edulcorantes y otros acompañantes que no fueron afectados por el tratamiento de calentamiento mayor a 60°C, sobre todo estos últimos, reportados en algunas investigaciones^{44,45} han podido contribuir a un efecto superior sobre *Candida albicans* por parte de la variedad criolla San Ignacio respecto a la variedad criolla paraguaya. De otra parte, es probable que la concentración mayor de componentes activos de la variedad criolla San Ignacio respecto a la de los componentes de la variedad Criolla paraguaya, esté en relación a la capacidad productiva de la misma variedad, dado que ha sido demostrado⁷ que la concentración de metabolitos también está influenciada por las condiciones genéticas propias de la variedad, que responden de manera diferenciada frente a condiciones de suelo, temperatura, luminosidad, como factores ambientales determinantes en la productividad de las plantas que son sometidas a condiciones de cultivo en campo.

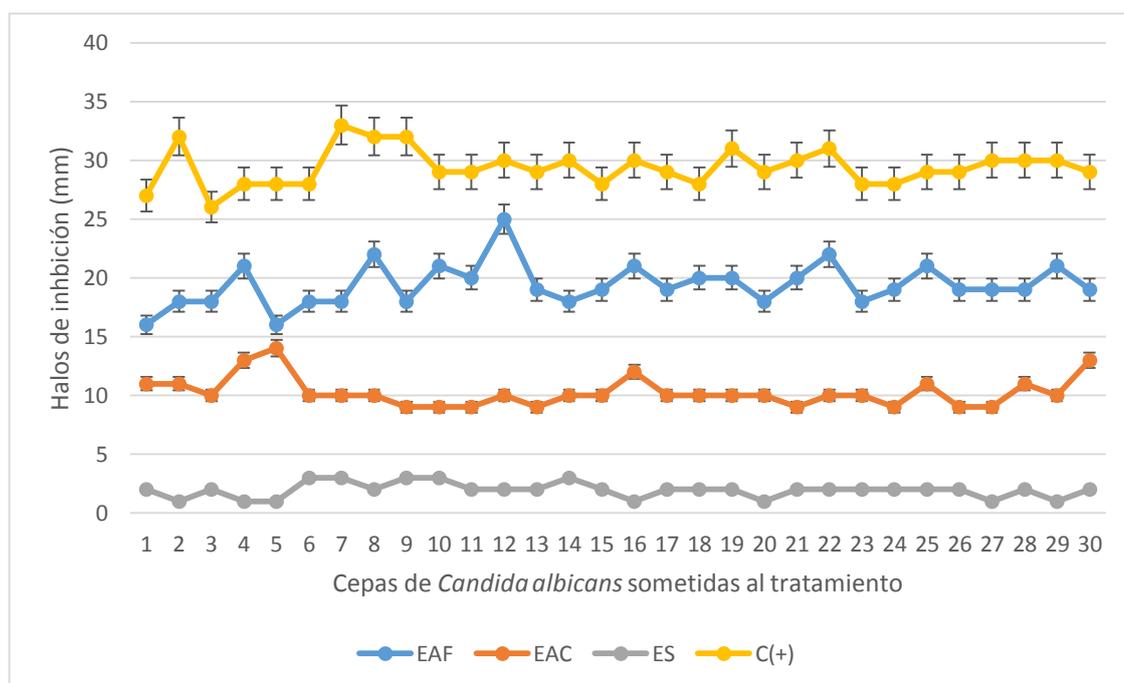


Figura 5. Efecto de extracto acuoso frío (EAF), extracto acuoso caliente (EAC) y extracto seco (ES) de *Stevia rebaudiana* Bertoni, variedad criolla San Ignacio sobre el crecimiento *in vitro* de *Candida albicans*. C(+): control positivo (fluconazol). Valores obtenidos a partir de la Tabla 2.

Variedad EIRETE

En relación al efecto producido por los extractos de esta variedad (Tabla 3 y Figura 6), se comprueba que es significativamente mayor respecto al efecto producido por las otras dos variedades, sobre todo del extracto acuoso frío cuyos halos de inhibición oscilan entre 15 y 35 mm., incluso algunos de los extractos produjeron un efecto superior al control positivo (fluconazol). Estos efectos pueden estar en relación con las características de mejoramiento de esta variedad, las mismas que a continuación se mencionan.

Tabla 3. Actividad *in vitro* de extractos acuosos y seco de la variedad EIRETE de *Stevia rebaudiana* Bertoni sobre cepas de *Candida albicans*, determinada mediante tres repeticiones.

Cepa	Halos de inhibición (mm)				
	EAF	EAC	ES	C(+)	C(-)
1	17.7 ± 3.06*	8.3 ± 1.53*	2.3 ± 1.53*	29.7 ± 3.06*	s.a.
2	16.7 ± 2.08*	9.7 ± 2.52*	2.3 ± 2.08*	28.7 ± 4.04*	s.a.
3	20.0 ± 2.00*	9.7 ± 1.53*	2.7 ± 2.08*	27.3 ± 2.08*	s.a.
4	21.3 ± 2.31*	10.7 ± 1.53*	2.0 ± 2.64*	33.3 ± 3.06*	s.a.
5	32.0 ± 2.00*	11.7 ± 1.53*	2.0 ± 1.00*	27.0 ± 3.61*	s.a.
6	20.0 ± 5.29*	10.7 ± 2.08*	4.7 ± 1.53*	29.0 ± 4.58*	s.a.
7	19.0 ± 3.00*	10.7 ± 0.58*	4.0 ± 1.73*	28.3 ± 4.04*	s.a.
8	25.7 ± 1.15*	10.0 ± 2.00*	2.7 ± 1.53*	29.0 ± 4.36*	s.a.
9	19.0 ± 2.65*	9.0 ± 1.00*	2.0 ± 1.00*	30.7 ± 6.66*	s.a.
10	18.3 ± 2.51*	10.0 ± 1.00*	2.0 ± 2.65*	31.7 ± 2.08*	s.a.
11	32.0 ± 3.61*	9.3 ± 1.53*	2.0 ± 1.00*	26.3 ± 1.53*	s.a.
12	22.0 ± 2.00*	9.0 ± 1.00*	2.7 ± 1.53*	29.0 ± 2.65*	s.a.
13	18.7 ± 2.51*	7.7 ± 1.53*	2.0 ± 1.00*	27.0 ± 2.64*	s.a.
14	20.0 ± 2.65*	10.0 ± 1.00*	2.0 ± 1.00*	28.3 ± 2.51*	s.a.
15	17.7 ± 1.53*	10.7 ± 2.08*	2.3 ± 1.53*	28.7 ± 2.08*	s.a.
16	18.3 ± 1.53*	10.0 ± 2.00*	2.3 ± 2.08*	30.7 ± 2.08*	s.a.
17	20.7 ± 1.53*	10.0 ± 1.00*	2.7 ± 1.15*	29.3 ± 3.05*	s.a.
18	20.3 ± 2.08*	11.7 ± 1.53*	2.3 ± 1.53*	28.7 ± 2.52*	s.a.
19	35.7 ± 4.93*	10.0 ± 2.65*	1.0 ± 1.00*	29.7 ± 2.52*	s.a.
20	35.7 ± 3.05*	10.0 ± 1.00*	2.0 ± 1.00*	26.7 ± 2.08*	s.a.
21	20.0 ± 3.61*	9.7 ± 1.53*	2.0 ± 1.00*	29.7 ± 2.31*	s.a.
22	21.7 ± 4.16*	9.3 ± 1.15*	1.7 ± 1.53*	29.3 ± 2.30*	s.a.
23	21.3 ± 3.05*	10.0 ± 2.00*	3.3 ± 1.15*	29.0 ± 3.61*	s.a.
24	21.0 ± 2.00*	10.7 ± 1.53*	1.0 ± 2.00*	29.3 ± 4.16*	s.a.
25	19.7 ± 3.05*	10.3 ± 1.53*	1.3 ± 2.31*	29.0 ± 1.00*	s.a.
26	18.7 ± 1.53*	9.3 ± 1.53*	2.0 ± 1.00*	29.0 ± 3.61*	s.a.
27	35.3 ± 3.05*	9.7 ± 0.58*	2.3 ± 1.53*	26.0 ± 2.00*	s.a.
28	21.7 ± 4.16*	9.3 ± 2.08*	2.3 ± 2.52*	29.0 ± 3.00*	s.a.
29	20.7 ± 1.53*	9.3 ± 0.58*	2.7 ± 1.53*	29.3 ± 4.16*	s.a.
30	22.7 ± 3.51*	10.3 ± 1.15*	2.3 ± 1.53*	29.0 ± 3.60*	s.a.

Fuente: datos del experimento

EAF: extracto acuoso frío. **EAC:** extracto acuoso caliente **ES:** extracto seco **C(+):** control positivo (fluconazol) **C(-):** control negativo **s.a.** sin actividad.

Se muestran los promedios a partir de tres repeticiones de los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* con sus respectivas desviaciones estándar.

* No hay diferencia significativa cuando $p < 0.01$

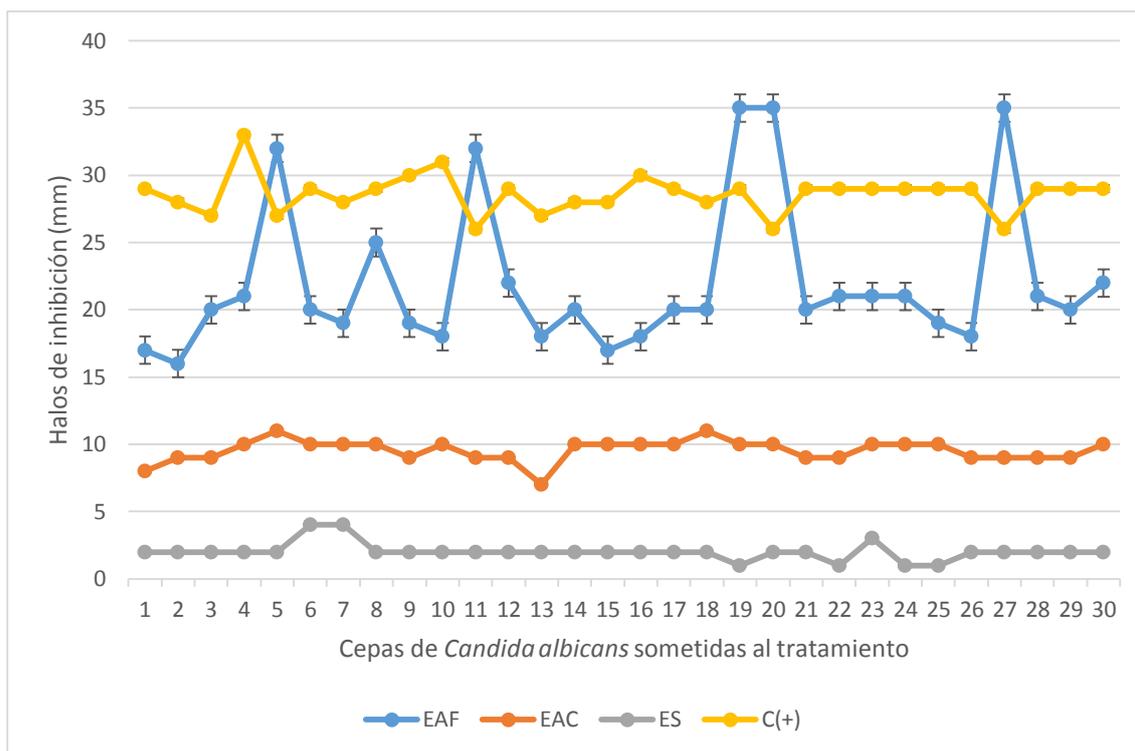


Figura 6. Efecto de extracto acuoso frío (**EAF**), extracto acuoso caliente (**EAC**) y extracto seco (**ES**) de *Stevia rebaudiana* Bertoni, variedad EIRETE sobre el crecimiento *in vitro* de *Candida albicans*. **C(+)**: control positivo (fluconazol). Valores obtenidos a partir de la Tabla 3.

De una parte cabe resaltar que a nivel del contenido total de principios activos, la diferencia de la variedad EIRETE respecto a las otras variedades se hace notoria coincidente con algunos estudios³² donde ha sido reportado que la concentración de glicósidos totales, determinada por refractometría, del extracto caliente de la variedad EIRETE mejorada era superior a la de otras variedades analizadas en la presente investigación. Estos hechos diferenciales también encuentran fundamento a favor de un mejor potencial fitoterapéutico de la variedad EIRETE en el sentido de poseer ventajas de índole genético dado que según algunos reportes³⁰, la variedad EIRETE es una variedad clonal de estevia, denominada IAN / VC – 142 (Eirete), desarrollada en el Instituto Agronómico Nacional (IAN) de Caacupé (Paraguay), con características agronómicas ampliamente superiores respecto a la variedad criolla paraguaya y de acuerdo al estudio de adaptación agroecológica realizado con las tres variedades en el departamento de Cajamarca⁸, la variedad EIRETE posee mejores posibilidades de adaptación agronómica incluso respecto a la

variedad criolla San Ignacio, además la concentración de principios activos edulcorantes es mayor, de acuerdo a lo reportado³², también a comparación de la variedad criolla San Ignacio.

Finalmente, también ha sido determinada³⁰ otra característica resaltante en la variedad EIRETE en relación a la concentración de principios edulcorantes, esta variedad contiene una concentración de 7% más de tales principios, principalmente en lo que respecta al Rebaudiósido A, del contenido total de glicósidos, que la variedad criolla paraguaya, lo que de acuerdo a lo reportado³² se puede afirmar que el contenido mayor de principios activos y por lo tanto del potencial terapéutico de la variedad EIRETE también es mayor respecto a la variedad criolla San Ignacio.

Así mismo, cabe resaltar que la variedad EIRETE produce, a través del extracto acuoso frío y a comparación con las otras variedades, un efecto más notorio respecto a la inhibición del crecimiento de *Candida albicans*, que incluso supera el efecto del control positivo (fluconazol), sobre las cepas de Candida N° 5, 11, 19, 20 y 27 (ver Figura 6). Además el rango del halo de inhibición de la variedad EIRETE que oscila entre 15 y 36 mm., resultó ser mucho mayor respecto al rango del halo de inhibición de la variedad criolla paraguaya (entre 10 y 15 mm.) e igualmente, respecto al rango del halo de inhibición de la variedad criolla San Ignacio (entre 15 y 25 mm.). Este resultado permite inferir, de una parte, que el efecto mayor podría deberse a que según algunos estudios³⁰, los componentes activos antimicrobianos estarían en mayor concentración o que la calidad de inhibición del crecimiento de Candida, podría deberse a las condiciones genéticas mejoradas de la variedad EIRETE.

Al hacer una comparación conjunta para verificar el efecto de cada tipo de extracto (acuoso frío, acuoso caliente y extracto seco), según las variedades probadas (Figura 7), se puede evidenciar mejor la diferencia de dicho efecto ya que en la figura correspondiente se muestra en la parte inferior el efecto comparativo del extracto seco obtenido de cada variedad evaluada en el presente

estudio mostrándose que en conjunto el efecto del extracto seco de cualquiera de las tres variedades de estevia evaluadas es menor respecto al efecto de los otros dos extractos (acuoso caliente y acuoso frío).

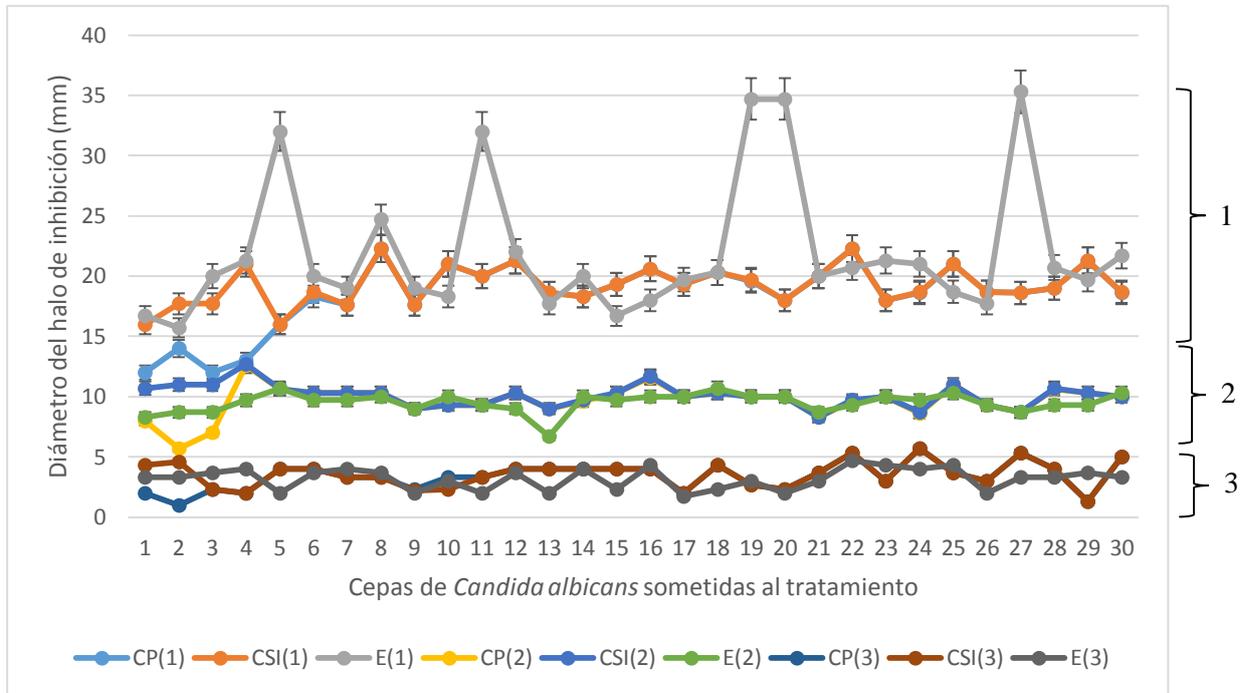


Figura 7. Efecto comparativo conjunto a nivel de los extractos obtenidos por variedad de estevia. (1): extracto acuoso frío, (2): extracto acuoso caliente, (3): extracto seco. CP: variedad criolla paraguaya, CSI: variedad criolla San Ignacio, E: variedad EIRETE. Valores obtenidos a partir de la Tablas 1, 2 y 3.

Así mismo, el efecto del extracto acuoso caliente de cualquiera de las tres variedades de estevia resultó ser de nivel medio, pero menor que el efecto de los extractos acuosos fríos de las tres variedades de estevia probadas en la presente investigación. En este último caso el efecto conjunto de cualquiera de los extractos acuosos fríos de las variedades de estevia estudiadas se muestra como el de mayor nivel, pero debe resaltarse que el extracto acuoso frío de la variedad EIRETE es el que produjo el mayor efecto coincidentemente con el resultado obtenido en el análisis estadístico cuando se compararon los efectos medios de los extractos respecto a las variedades probadas (ver Apéndice).

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

1. Existe diferencia significativa ($p < 0.01$) en el efecto antimicótico inhibitorio *in vitro* de las tres variedades y los tres extractos de *Stevia rebaudiana* Bertoni en el crecimiento de *Candida albicans*.
2. En relación al efecto de acuerdo a la variedad de *Stevia rebaudiana* Bertoni, la que manifiesta el mayor efecto inhibitorio *in vitro* del crecimiento de *Candida albicans* es la variedad mejorada EIRETE. La variedad que presenta un efecto inhibitorio medio es la criolla San Ignacio. La variedad que manifiesta el menor efecto inhibitorio es la criolla Paraguaya.
3. Cabe resaltar que aunque estadísticamente la variedad EIRETE de *Stevia rebaudiana* Bertoni no manifiesta una notoria diferencia significativa respecto a su efecto inhibitorio frente a la variedad criolla San Ignacio, tal diferencia si se hace evidente a nivel de los ensayos *in vitro*.
4. En relación al efecto de acuerdo a los extractos probados de *Stevia rebaudiana* Bertoni, el que manifiesta el mayor efecto inhibitorio *in vitro* del crecimiento de *Candida albicans* es el extracto acuoso frío (extracto crudo). El extracto que presenta el efecto medio es el acuoso caliente (infusión), y el extracto que presenta el menor efecto es el extracto seco (polvo o cristales de estevia).

RECOMENDACIONES

1. Deben promoverse investigaciones relacionadas con el presente tema de investigación con la finalidad de determinar a qué se debe la diferencia de efecto antimicótico encontrada entre las variedades, así como entre los extractos de *Stevia rebaudiana* Bertoni que se cultiva en el Perú.
2. Deben realizarse investigaciones para determinar diferencias en el contenido y tipo de principios activos contenidos en las variedades de *Stevia rebaudiana* Bertoni peruanas.
3. Deben continuarse con pruebas de efectividad comparativa más específicas con la variedad EIRETE de *Stevia rebaudiana* Bertoni, a fin de establecer dosis de acción antimicótica.

Lista de Referencias

1. Brooks G, Butel J, Stephen M. Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 18ª Edición. México: Editorial El Manual Moderno. S.A. de C.V.; 2005.
2. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. Microbiología Médica. 7ª ed. Barcelona: Editorial Elsevier España S.L.; 2014.
3. MD-SAÚDE. Candidiasis vaginal. Causas. Síntomas y tratamiento. [en línea] [Fecha de acceso 04 Marzo, 2017] Disponible en: www.mdsaude.com/es/2015/candidiasis-vaginal.html
4. Diccionario Mosby Pocket de la Medicina, Enfermería y Ciencias de la Salud. 4ta. Edición en español. Madrid: Editorial Elsevier España S.A.; 2006. Candidiasis; p. 213.
5. Falzone F. Tratamiento de candidiasis con aceites esenciales. Sociedad Española de Fitoterapia. (SEFIT). [en línea] [Fecha de acceso 04 Marzo, 2017] Disponible en: <http://www.sefit.es/tratamiento-candidiasis-aceites-esenciales/2015>
6. Alonso J. Tratado de Fitomedicina. Bases Clínicas y Farmacológicas. España. Isis Ediciones. 1998.
7. Oviedo M. Stevia Paraguaya. Historia y Bondades, uso medicinal [en línea] [Fecha de acceso 12 Enero, 2005]. Disponible en: <http://www.steviaparaguaya.com>
8. Tirado C, Plasencia E, Roncal M. Adaptabilidad Biológica para la introducción de la estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) en seis zonas agroecológicas andinas de San Ignacio y Chota. Departamento de Cajamarca. Universidad Nacional de Cajamarca. Perú. 2008. Informe Técnico sobre producción de Stevia. Disponible en Informe Ejecutivo de Equipo de Desarrollo Agropecuario Cajamarca. EDAC: 25 años al servicio de Cajamarca. 2008. [en línea] 2010 [Fecha de acceso 28 de marzo, 2015]. Disponible en: ([http:// www.edac.org.pe/](http://www.edac.org.pe/)
9. Satishkumar J, Sarvanan M, Seethalakshmi I. In vitro antimicrobial and antitumor activities of *Stevia rebaudiana* (Asteraceae) leaf extracts. Trop J Pharm Res 2008; 7:1143–1149.

10. Osorio C. Estevia. El dulce sabor de tu vida. Plan Estratégico. BOGOTA COMMUNITY COLLEGE. ADMINISTRACION COMERCIAL Y MERCADEO. PRINCIPIOS DE ADMINISTRACION. Bogotá; 2007.
11. Arenas R. Micología Médica Ilustrada. Segunda Edición. México: Editorial Mc Graw Hill. México D.F.; 2003.
12. Young G, Jewell D. Tratamiento tópico para la candidiasis vaginal (muguet) del embarazo. The Cochrane Library [en línea] [fecha de acceso 7 de mayo 2009] <http://www.cochrane.org/es/CD000225/tratamiento-topico-para-la-candidiasis-vaginal-muguet-del-embarazo>
13. Quindós G. 2002. Las micosis en el amanecer del siglo XXI. Rev. Iberoam. Micol. 2002; 19: 1-4 [en línea] [fecha de acceso 7 de mayo 2009] Disponible en: <http://reviberoammicol.com/2002-19/001004.pdf>
14. Vives E, Ventriglia M, Medvedovsky D, Gacitúa M. Rothlin R. Farmacología II. DROGAS ANTIMICÓTICAS. 2004.
15. Martínez E. 2000. "Microdosis: Medicina para un Nuevo Milenio. Universidad Autónoma de Zacatecas. México". Plantas que curan. [en línea] [fecha de acceso 24 de junio 2015]. Disponible en: www.plantasquecuran.com (<http://fcf.unse.edu.ar/pdf/Quebracho/ne-a12.pdf>).
16. Ismael M. Fitofármacos. Intervención Educativa. Sector La Esperanza. Estado Vargas. Enero - julio 2007. República Bolivariana de Venezuela Misión Barrio Adentro Estado Vargas. Caracas; 2008.
17. Farnsworth N. Ethnopharmacology and future of drug development: The North American experience. Journal of Ethnopharmacology. 1993 (38): 145-152.
18. Moglia J, Castiglione M. Microdosis de plantas medicinales: Una alternativa para la utilización sustentable de los recursos vegetales del Bosque Chaqueño. Rev. Quebracho N°

- 15 (64-67). Facultad de Ciencias Forestales. Universidad Nacional de Santiago del Estero. Argentina; 2007.
19. Duarte M, Figueira G, Sartoratto A, García V, Delarmelina C. Anti-Candid activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 2005 (97): 305-311
20. Sumida T. Estudios sobre *Stevia rebaudiana* como edulcorante. *Japan Journal Crops Science*. Tokio. Japón. 1975.
21. Álvarez et al. Propagación de especies olerícolas, frutícolas e industriales. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Dirección de Investigación Agrícola. Instituto Agronómico Nacional. Asunción. Paraguay. 1996.
22. Atencio F. Enciclopedia práctica de las medicinas alternativas. 1ra. Edición. Buenos Aires, Argentina: Editorial Ediciones LEA S.A.; 2005.
23. Morales V. Glicósidos de Esteviol: Evaluación Química y Técnica. Steviol glycosides (CTA). [en línea] 2007 [fecha de acceso 12 de abril 2013]. Disponible en <http://www.info@munidoalimentario.com>
24. Jarra et al. Aspectos nutricionales y metabolismo de *Stevia rebaudiana* Bertoni. Una revisión de *Agronomía Colombiana*. Vol XXVIII. Nro. 2. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. Colombia. pp. 199-208. [en línea] 2008 [fecha de acceso 8 de febrero 2010]. Disponible en <http://www.redalyc.org/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=180315602009>
25. Ferández E. Plantas medicinales presentes en el Vivero del Centro Ambiental de Itaipú Binacional (Paraguay): Revisión crítica, Catalogación y creación de una base de datos. [Tesis de Grado]. Madrid: Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Forestal. Universidad Politécnica de Madrid; 2014.
26. Oviedo. M. *Stevia* Paraguaya. Historia y Bondades, uso medicinal. [en línea] 2005 [fecha de acceso 8 de febrero 2015]. Disponible en: <http://www.steviaparaguaya.com>

27. Equipo de Desarrollo Agropecuario de Cajamarca (EDAC); Innovación y Competitividad para el Agro Peruano (INCAGRO). Manual Técnico de Producción de Stevia. Proyecto: Adaptabilidad biológica para la introducción de Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) en seis zonas agroecológicas andinas de San Ignacio y Chota. Cajamarca. Perú. 2008.
28. Gil R, Carmona J. 23 especies botánicas con potencialidad terapéutica. Revista de la Facultad de Farmacia. Universidad de los Andes. Colombia. 2001; Vol. 42.
29. Estrada A, Gutierrez L, Montoya O. Evaluación *in vitro* del efecto bactericida de cepas nativas de *Lactobacillus* sp. contra *Salmonella* sp. y *Escherichia coli*. Revista de la Facultad Nacional Agraria de Medellín. 2005; Vol. 58. N° 1.
30. Casaccia J, Alvarez E. Recomendaciones técnicas para una producción sustentable del *Ka'a he'e* (estevia) en el Paraguay. Manual Técnico N° 8. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Dirección de Investigación. Instituto Agronómico Nacional Agrícola. Caacupe. Paraguay. 2006.
31. Pasquel A. Extracto de dos glicósidos de estevia con fluidos presurizados. [Tesis Doctoral]. Campinas. Brasil: Tesis presentada a la Comisión de Pos-Grado de la Facultad de Ingeniería de Alimentos. Universidad Estadual de Campinas; 1999.
32. Ganoza M., Rosales C. Análisis del nivel edulcorante de tres variedades de estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni), instaladas en seis localidades de las provincias de San Ignacio y Chota. Cajamarca. Informe Técnico. Cajamarca. Perú. Facultad de Ingeniería. Universidad Privada Antonio Guillermo Urrelo. Centro de Investigación y Control de Enfermedades Transmisibles (CICET-UNC). Área de Biotecnología. Universidad Nacional de Cajamarca. 2008.
33. Sánchez H, Reyes C. Metodología y Diseños en la Investigación científica. 4ta. Edición. Lima. Perú. Editorial Visión Universitaria. 2009.
34. Jiménez T., Cabrera G., Alvarez E., Gómez F. Evaluación del contenido de esteviósido y rebaudiósido A en una población de *Stevia rebaudiana* Bertoni (ka' he'e) cultivada

- comercialmente. Estudio preliminar. Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud. 2010. Vol. 8(1): 47-53.
35. Payzant JD., Laidler JK., Ipolito RM. Method of extracting selected sweet glycosides from the *Stevia rebaudiana* plant. US. Patent. 1999. 5962678
36. Ciola R. Fundamentos da Cromatografía Líquida de Alto Desempenho (HPLC). 1ra. Edición. Sao Paulo. Brasil: Editora Edgar Blucher; 1998.
Disponibile en: <http://www.submarino.com.br/produto/1/130423/?franq=143007>
37. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. American Journal of Clinical Pathology. 1966 Apr; 45(4):493-496.
38. Kirkpatrick WR, Turner TM, Fothergili AW, MacCarthy DI, Redding SW, Rinaldi MG, Patterson TF. Fluconazole Disk Diffusion Susceptibility Testing of Candida Species. Journal of Clinical Microbiology. 1998. Nov; Vol. 36 No. 11: 3429-3432
39. Barry A, Bille J, Brown S, Ellis D, Meis J, Pfaller M, Rennie R, Rinaldi M, Rogers T, Traczewski M. Quality Control Limits for Fluconazole Disk Susceptibility Tests on Mueller-Hinton Agar with Glucose and Methylene Blue. Journal of Clinical Microbiology. 2003. Jul; 41(7): 3410–3412.
40. Winn WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schrenckenberger PC, Woods GL. Koneman; Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas en color. 6ª. Edición. Editorial Médica Panamericana S.A. Buenos Aires. Argentina. 2008.
41. Tomoko N, Takashi A, Hiromu T, Yuka I, Hiroko M, Munekaju I, Totshiyuki T, Tetsuro I, Fujio A, Iriya I, Tsutomu N, Kazuhito W. Antibacterial activity of extracts prepared from tropical and subtropical plants on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Health Sci., 2002; 48: 273–276.

42. Manish T. Subhash R. In Vitro Antimicrobial Activity of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, June 2006; 5 (1): 557-560
43. Komissarenko N., Derkach A., Kovalyov I. and Bublik N. Diterpene glycosides and phenylpropanoids of *Stevia rebaudiana* Bertoni (Asteraceae). Rast. Res. 1994; 1-2: 53-64.
44. Sharma N, Kaushal N, Chawla A, Mohan M, Sethi A, Sharma Y. *Stevia rebaudiana*-A review. Agrobios Newslett 2006. 5:46–8.
45. Geuns J. Stevioside. Phytochemistry. 2003. 64 (5). 913-921

APÉNDICES

Análisis estadístico de la prueba de hipótesis

De manera complementaria se presenta el análisis estadístico en relación a la consistencia de los resultados obtenidos teniendo en cuenta el diseño experimental para probar la hipótesis, para lo cual se tomó en cuenta la propuesta de las hipótesis H_1 y H_0 como se describe a continuación:

H_1 . Las variedades criolla paraguaya, criolla de San Ignacio y mejorada EIRETE de *Stevia rebaudiana* Bertoni adaptadas agronómicamente en la provincia de San Ignacio **difieren entre sí** en su efecto inhibitorio del crecimiento de *Candida albicans*.

H_0 . Las variedades criolla paraguaya, criolla de San Ignacio y mejorada EIRETE de *Stevia rebaudiana* Bertoni adaptadas agronómicamente en la provincia de San Ignacio **no difieren entre sí** en su efecto inhibitorio del crecimiento de *Candida albicans*

Para los efectos considerados se tomó en cuenta un modelo estadístico de Diseño Factorial 2^3 , es decir con dos factores a 3 niveles cada factor:

Distribución de las variedades y extractos de *Stevia rebaudiana* Bertoni según nivel, para un modelo estadístico de diseño factorial 2^3 .

Factores	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3
Variedades	Variedad Criolla Paraguaya (1)	Variedad Criolla de San Ignacio (2)	Variedad EIRETE (3)
Extractos	Extracto Acuoso Frío (1)	Extracto Acuoso Caliente (2)	Extracto Seco (3)

Modelo Estadístico

Para comprobar la hipótesis se tomó en cuenta el siguiente modelo:

$$X_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde $i = 1, 2, 3$. $J = 1, 2, 3$. $K = 1 - 30$

μ = Efecto inhibitorio promedio

α_i = Efecto del i -ésima variedad

β_j = Efecto del j -ésimo Extracto

$(\alpha\beta)_{ij}$ = Efecto de la interacción entre la i -ésima variedad y el J -ésimo Extracto ensayado.

ε_{ijk} = Error aleatorio asociado al proceso de muestreo.

Restricciones teóricas del modelo:

Modelo a efectos fijos.

Los ε_{ijk} son variables aleatorias independientes con distribución normal $N(0, \sigma^2)$

Nota: Si $p < 0.01$, H_0 se rechaza, caso contrario se trabaja aceptando H_1

De acuerdo a lo propuesto en el modelo estadístico, los resultados obtenidos muestran una distribución estadística normal (Figura 8), es decir, cumplen o están concordantes con la restricción teórica propuesta del diseño experimental de la presente investigación y que se ha tomado en cuenta para el correspondiente análisis.

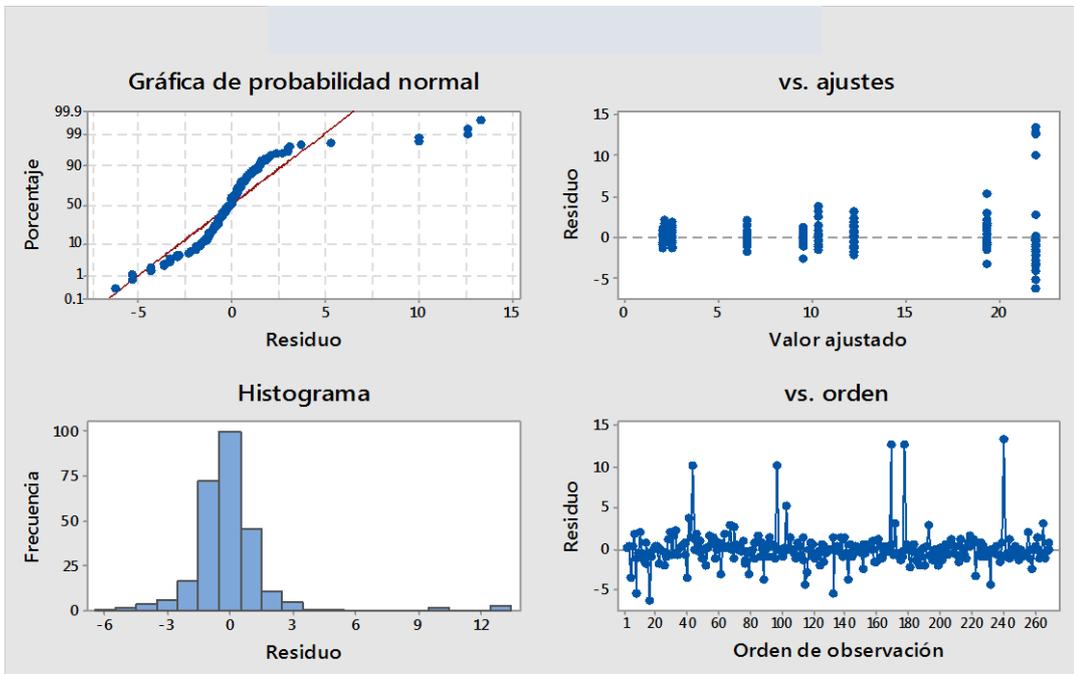


Figura 8. Representación estadística de la distribución estadística normal de los resultados

Procesamiento estadístico del modelo en base a los resultados obtenidos

Resultado de la Ecuación de regresión

$$X_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

RESULTADO = 9.618 - 2.685 VARIEDAD_1 + 1.126 VARIEDAD_2 + 1.559 VARIEDAD_3
+ 8.236 EXTRACTO_1 - 0.830 EXTRACTO_2 - 7.407 EXTRACTO_3 - 2.961 VARIEDAD*EXTRACTO_1 1
+ 0.464 VARIEDAD*EXTRACTO_1 2 + 2.497 VARIEDAD*EXTRACTO_1 3
+ 0.397 VARIEDAD*EXTRACTO_2 1 + 0.396 VARIEDAD*EXTRACTO_2 2 - 0.793 VARIEDAD*EXTRACTO_2 3
+ 2.564 VARIEDAD*EXTRACTO_3 1
- 0.859 VARIEDAD*EXTRACTO_3 2 - 1.704 VARIEDAD*EXTRACTO_3 3

Resumen del resultado

S	R-cuadrado	R-cuadrado Ajustado	R-cuadrado (Predictivo)
2.16176	91.35%	91.08%	90.74%

De acuerdo al resultado del procesamiento de la ecuación de regresión ($X_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}$) y teniendo en cuenta el modelo propuesto, el valor del coeficiente de regresión (R-cuadrado), resulta ser mayor a 90%, lo que implica que el modelo se cumple respecto al grado de significancia de los resultados obtenidos en los experimentos de prueba realizados, debido a que el análisis de varianza nos indica lo siguiente:

Análisis de Varianza (ANOVA)

Fuente	GL	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	VALOR F	VALOR P*
MODELO	8	12877.7	1609.71	344.46	0.000
LINEAL	4	12086.3	3021.58	646.57	0.000
VARIEDAD	2	981.8	490.90	105.05	0.000
EXTRACTO	2	11104.5	5552.26	1188.10	0.000
INTERACCIONES DE 2 TÉRMINOS	4	791.4	197.85	42.34	0.000
VARIEDAD X EXTRACTO	4	791.4	197.85	42.34	0.000
ERROR	261	1219.7	4.67		
TOTAL	269	14097.4			

* $p < 0.01$ (Existe diferencia significativa entre los efectos y las variedades de los extractos).

1. Que el efecto inhibitorio promedio de las diversas variedades ensayadas resulta significativamente diferente en relación al nivel $\alpha = 0.05$, dado que el valor de $P = 0.000$ obtenido mediante el software correspondiente es menor al valor de p ($p < 0.01$)
2. De igual manera se contrastó que el efecto inhibitorio de los extractos ensayados también es significativamente diferente entre ellos, en relación al nivel de $\alpha = 0.05$, puesto que el valor de $P = 0.000$ obtenido mediante el software correspondiente es menor al valor de p ($p < 0.01$)
3. Al contrastar el efecto promedio de inhibición para las diversas interacciones Variedad y Extracto, éstas resultan significativamente diferentes, puesto que $P = 0.000$ valor mucho menor a $p < 0.01$

En relación a la contrastación del efecto promedio de inhibición, cuando se verifica el efecto inhibitorio por variedad y por extracto, por separado (Figura 9), puede resaltarse que:

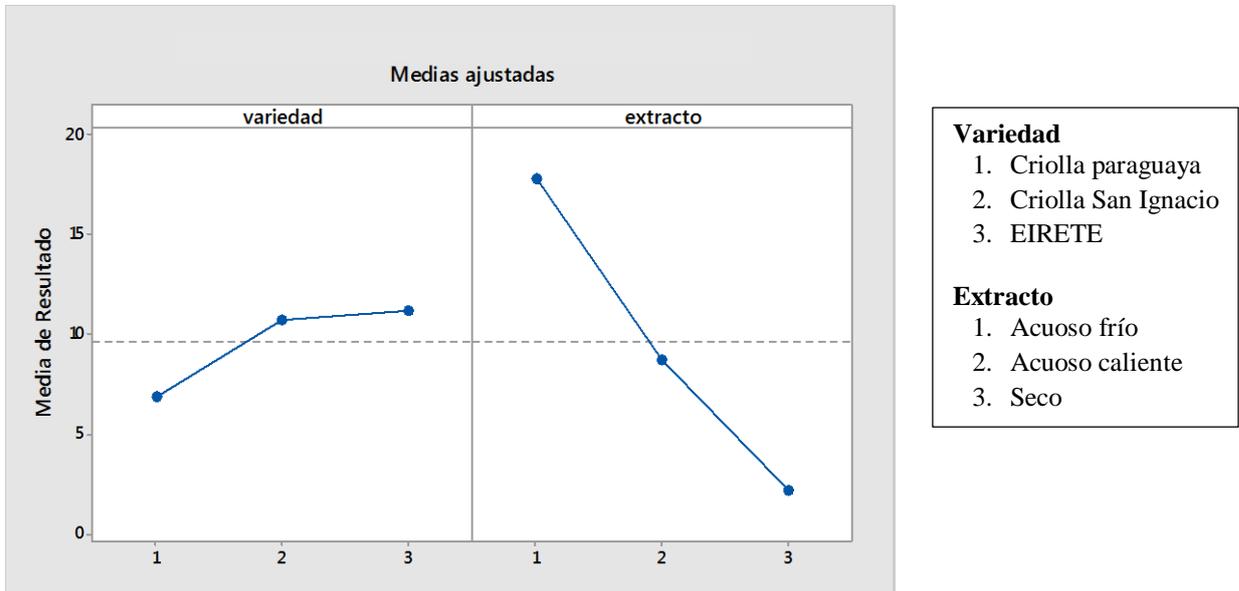


Figura 9. Contrastación del efecto promedio de inhibición, para verificar el efecto inhibitorio conjunto por variedad y por extracto.

el efecto inhibitorio de la variedad 2 (criolla San Ignacio) y la variedad 3 (mejorada EIRETE), son significativamente diferentes en relación al efecto de la variedad 1 (criolla Paraguaya). Sin embargo, cuando se compara el efecto inhibitorio entre las variedades 2 y 3 no se muestra una notoria diferencia significativa entre ambas, en el análisis estadístico.

Así mismo, en relación al análisis del efecto de los extractos, por separado, la Figura 5 muestra que el efecto inhibitorio para estos tres niveles son significativamente diferentes (ver ANOVA), además muestra que el extracto acuoso en frío (1), tiene mayor efecto que el extracto acuoso en caliente (2), y a su vez éste tiene un mayor efecto inhibitorio que el extracto en seco (3), resaltándose que existe una diferencia estadísticamente significativa del efecto del extracto acuoso frío, respecto a los extractos acuoso caliente y extracto seco.

De otro lado, cuando se analiza la interacción combinada de los efectos promedios, de lo mostrado en el Figura 9, se puede deducir lo siguiente:

- a) De un lado (sector izquierdo de la Figura 9), el mayor valor del efecto inhibitorio *in vitro* en base a la interacción variedad – extracto.

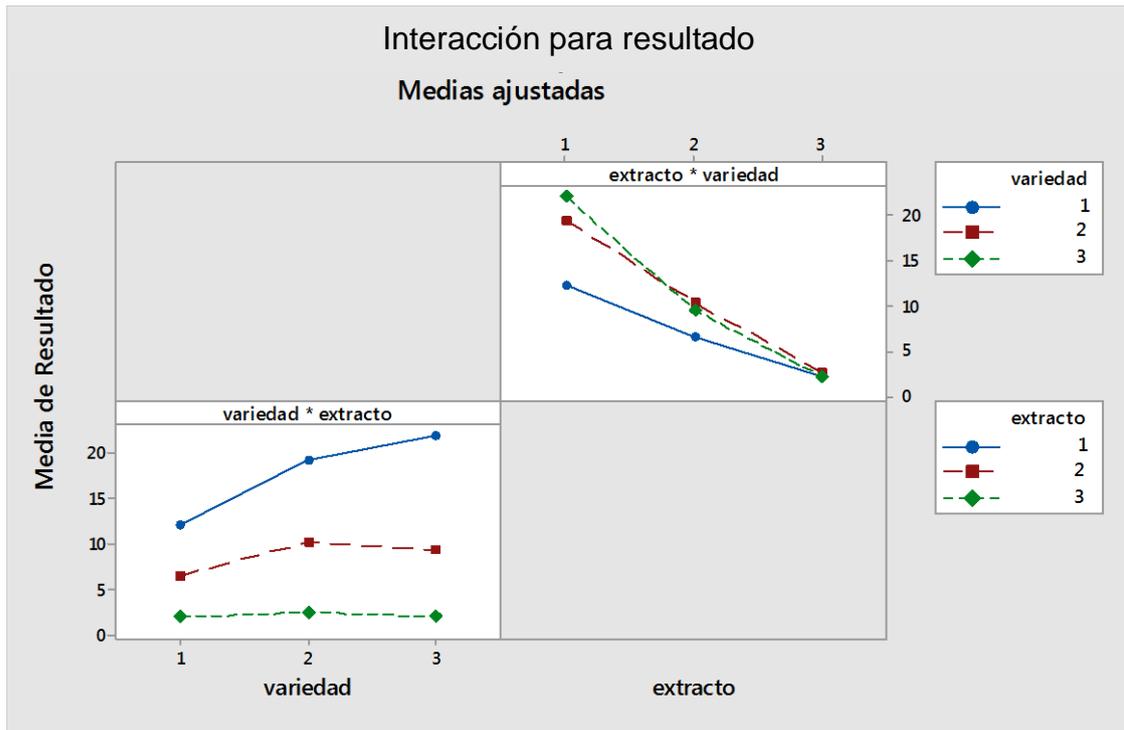
En este sentido se puede apreciar que:

1. Las variedades 1 (criolla Paraguaya), 2 (criolla San Ignacio) y 3 (mejorada EIRETE), en su presentación como extracto seco (3), tienen el menor efecto inhibitorio.
2. Las variedades (1), (2) y (3), en su presentación como extracto acuoso caliente (2), tienen un efecto inhibitorio mediano.
3. Las variedades (1), (2), y (3), en su presentación como extracto acuoso en frío (1), tienen el máximo efecto inhibitorio, pero el mayor efecto se logra con la variedad (3), en su presentación como extracto acuoso frío.

- b) De otro lado, también se muestra (sector derecho de la Figura 9), la mayor capacidad inhibitoria *in vitro* de la interacción extracto – variedad, sobre el crecimiento de *Candida albicans*, determinándose que:

El extracto 1 (acuoso frío), de la variedad 3 (mejorada EIRETE), muestra la mayor capacidad de inhibir *in vitro* el crecimiento de *Candida albicans*, le sigue en capacidad inhibitoria el extracto (1) de la variedad 2 (criolla San Ignacio), y el extracto (1) de la variedad 1 (criolla paraguaya), posee la menor capacidad inhibitoria del crecimiento de *Candida albicans*.

En consecuencia, el mejor efecto inhibitorio *in vitro* lo proporciona el extracto acuoso frío (1) de la variedad mejorada EIRETE (3).



Extracto

- (1) Extracto acuoso frío
- (2) Extracto acuoso caliente
- (3) Extracto seco

Variedad

- (1) criolla Paraguaya
- (2) criolla San Ignacio
- (3) mejorada EIRETE

Figura 10. Análisis de la interacción combinada de los efectos promedios de los extractos y variedades estudiadas.

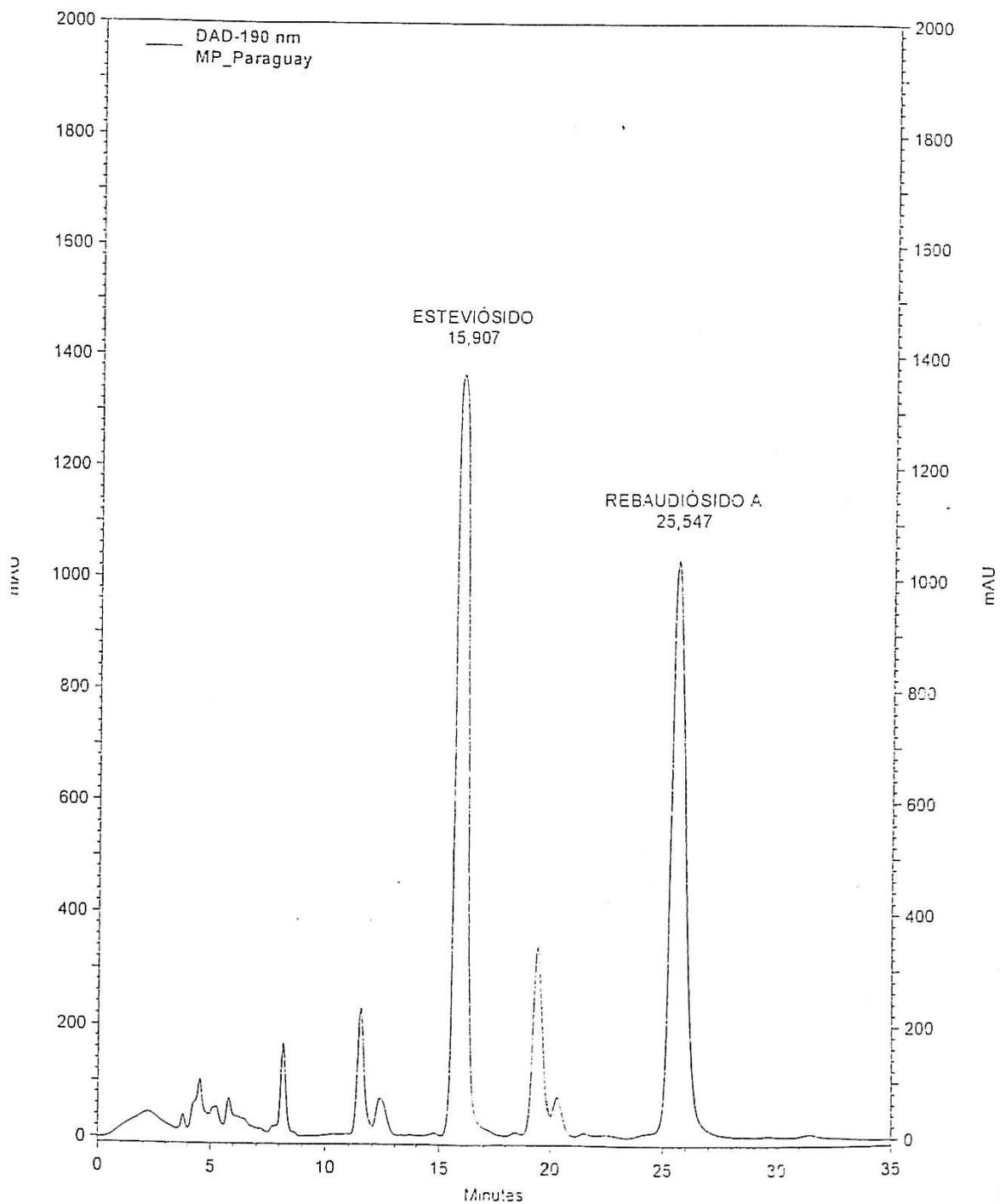


Figura 11. Análisis cromatográfico mediante HPLC de extractos de *Stevia rebaudiana* Bertoni
Cromatograma del patrón de estevia (producto comercial)

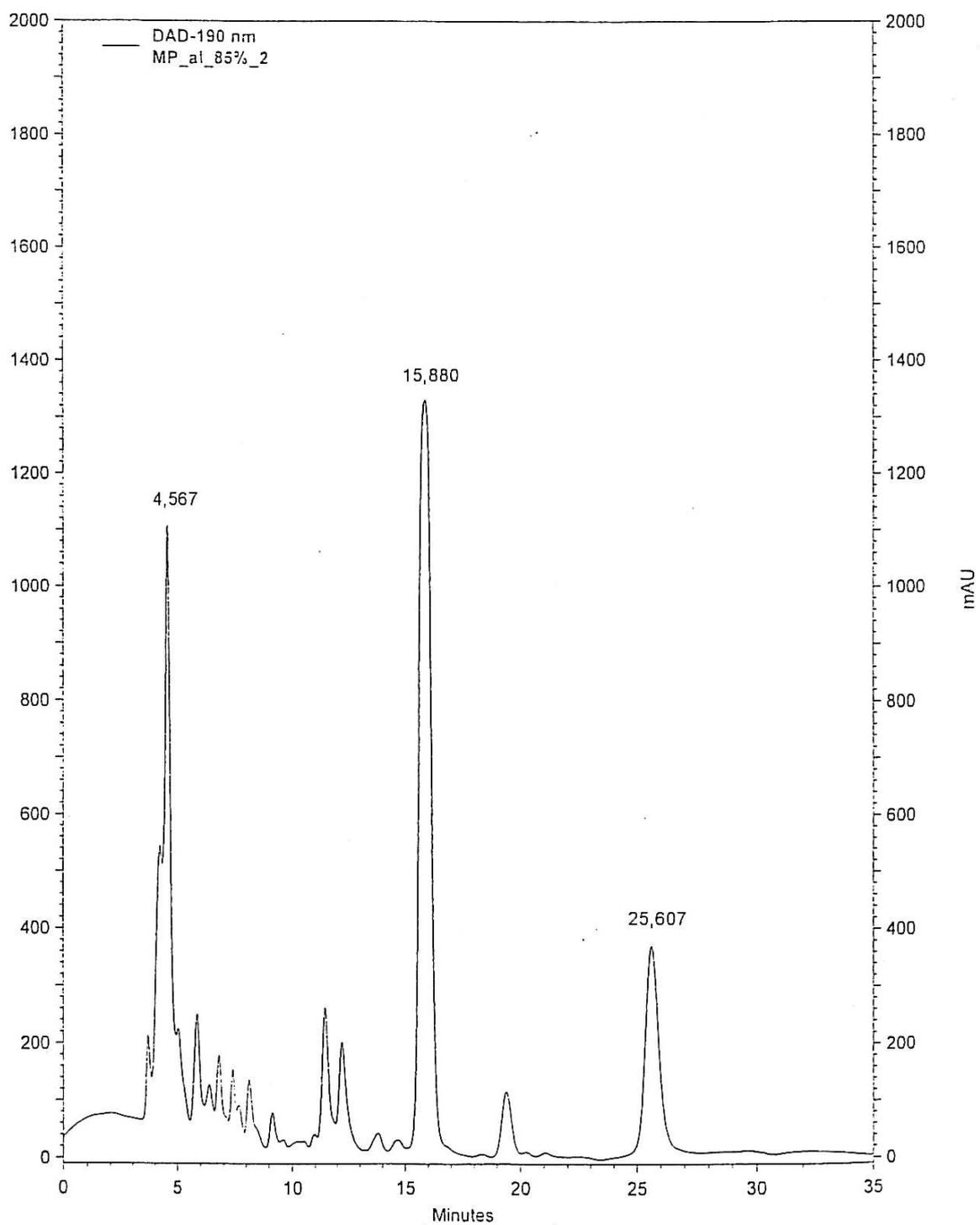


Figura 12. Cromatograma al extracto seco con glicósidos totales extraídos de las hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni.



Foto 1. Hojas desecadas de *Stevia rebaudiana* Bertoni

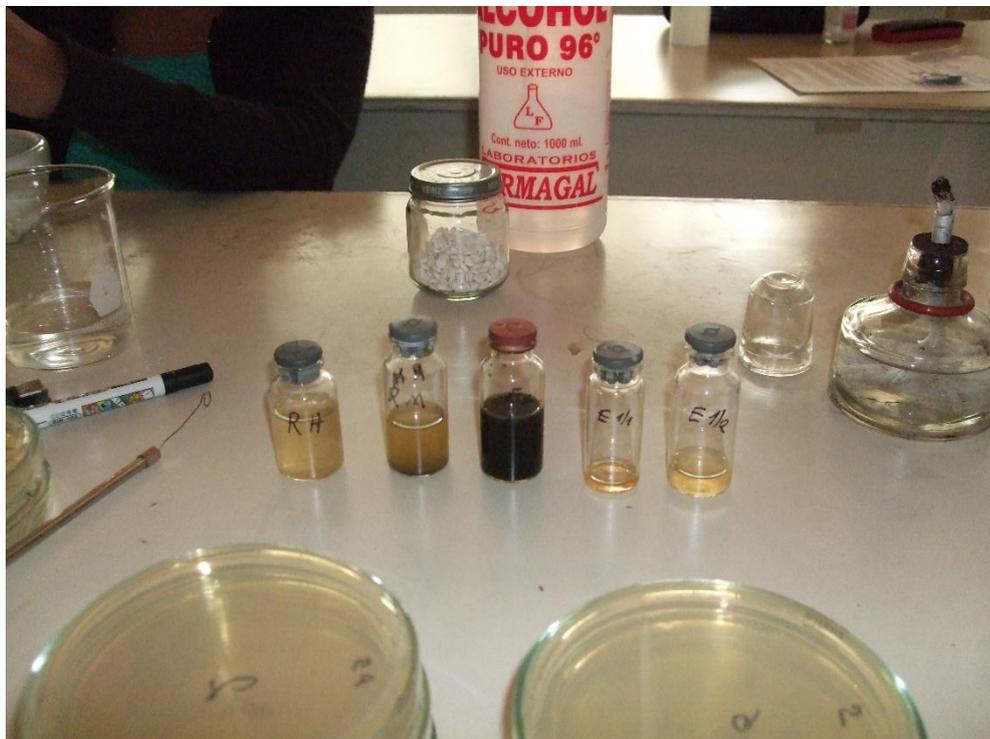


Foto 2. Extractos acuosos de *Stevia rebaudiana* Bertoni



Foto 3. Extracto seco de *Stevia rebaudiana* Bertonii

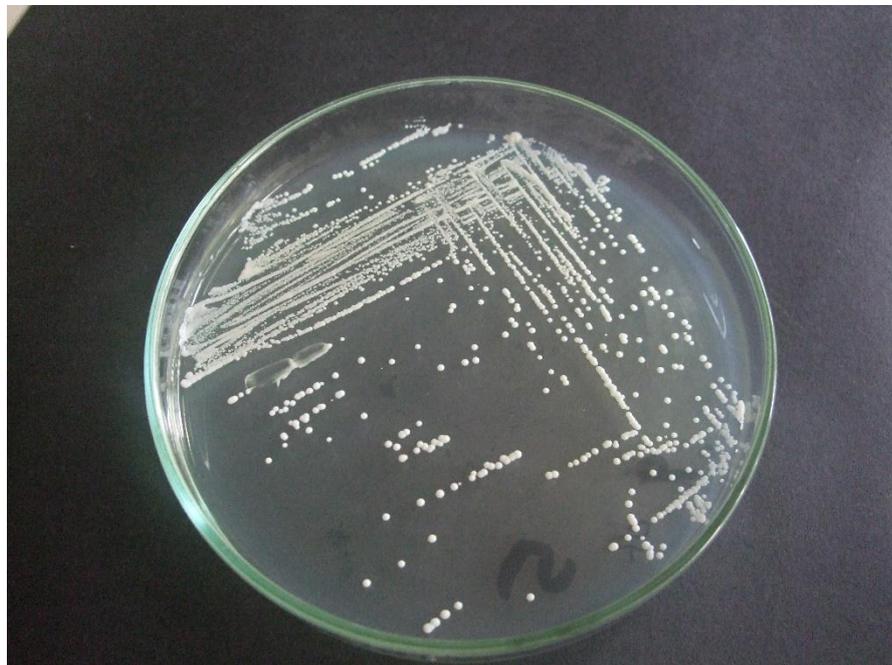


Foto 4. Cepa de *Candida albicans* recuperada en laboratorio



Foto 5. Cultivos de *Candida albicans* sometidas al efecto de los extractos.



Foto 6. Efectos antimicóticos positivos de los extractos



Foto 7. Efectos antimicóticos positivos de los extractos