



Universidad de Valparaíso

Facultad de Medicina

Escuela de Obstetricia y Puericultura

Casa central

“Efecto de los extractos naturales de Lavanda y Arándano Azul sobre crecimiento de *Candida albicans* en comparación con Fluconazol como tratamiento estándar de la candidiasis, en pruebas de laboratorio durante el año 2015”

Tesis para obtener el Grado de Licenciadas en Obstetricia y Puericultura

Profesor guía: Villena García, Joan

Profesor coguía: Montenegro Venegas, Ivan

Tesistas:

- Aguirre Palma, Natalia
- Bravo Puelles, Camila
- Brito Lillo, Sylvana
- Espinoza Zenteno, Natalia
- Ossandón Fernández Johanna
- Silva Merea, Sara

Valparaíso, 2016

Efecto de los extractos naturales de Lavanda y Arándano Azul sobre crecimiento de *Candida albicans* en comparación con Fluconazol como tratamiento estándar de la candidiasis, en pruebas de laboratorio durante el año 2015.

J. Villena¹, I. Montenegro², N. Aguirre Palma³, C. Bravo Puelles³, S. Brito Lillo³, N. Espinoza Zenteno³, J. Ossandón Fenández³, S. Sara Silva³.

1 Licenciado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Barcelona, España. Doctor en Ciencias Biológicas Mención Bioquímica y Biología Molecular, Universidad Autónoma de Barcelona, España.

2 Licenciado en Bioquímica, Bioquímico, Universidad Austral, Chile. Doctor en Ciencias mención Química, UTFSM-UV, Chile.

3 Estudiantes Cuarto Nivel Obstetricia Y Puericultura, Universidad Valparaíso, Valparaíso.

AGRADECIMIENTOS

Dedicamos de manera especial esta tesis, a nuestras familias que nos han apoyado durante todo nuestro caminar a lo largo de nuestra carrera, apoyándonos incondicionalmente en todo momento.

Agradecemos sinceramente a nuestros profesores guía Joan Villena e Iván Montenegro, quienes sin duda con sus conocimientos, su persistencia, su paciencia con nosotras y sus ganas de enseñar han sabido motivarnos, acompañarnos y alentarnos en nuestra formación profesional, haciendo de nosotras personas más maduras como estudiantes, sabiendo guiarnos en esta etapa y siendo parte fundamental de nuestro paso por esta hermosa carrera y de quienes nos llevamos lo mejor.

También agradecemos a David Astudillo y Alejandra Moller, quienes siempre nos prestaron una mano cuando lo necesitamos durante nuestro paso por el laboratorio y su ayuda incondicional fue esencial para nosotras.

Finalmente agradecemos a todos aquellos académicos que nos han ayudado a lo largo de nuestra formación profesional a ser quienes somos hoy, que nos han inculcado el sentido de responsabilidad y trabajo en equipo lo cual ha sido la base para poder lograr llevar a cabo esta tesis que hoy presentamos. A todos ellos nuestras infinitas gracias.

INDICE

RESUMEN.....	5
DEFINICIÓN DE TÉRMINOS.....	6
INTRODUCCIÓN.....	11
HIPÓTESIS.....	15
OBJETIVOS.....	15
- General.....	15
- Específicos.....	15
MARCO TEÓRICO.....	16
MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
- Variables.....	31
- Diseño.....	32
- Población: universo y muestra.....	33
- Fuentes de información.....	34
- Método.....	35
- Materiales.....	37
- Equipos.....	38
- Reactivos.....	38
- Medios de cultivo.....	39
- Recolección de datos.....	40
RESULTADOS.....	41
DISCUSIÓN.....	56
CONCLUSIÓN.....	60
BIBLIOGRAFÍA.....	61

RESUMEN

Candida albicans corresponde a un hongo de la familia de los Sacaromicetos, responsable principalmente de la candidiasis, infección fúngica de alta prevalencia que ha llevado a muchos investigadores a realizar estudios que ayuden a determinar los elementos necesarios para su tratamiento.

En Chile, el manejo usual para candidiasis simples, según la Guía Clínica del Ministerio de Salud, corresponde a Fluconazol vía oral agregado a Clotrimazol en óvulos y tópico, a utilizarse por el afectado y su pareja. A pesar del uso de fármacos y que la infección se logra eliminar, muchas mujeres vuelven a tener la sintomatología, llegando a generarse una resistencia por parte de la *Candida albicans* a los distintos medicamentos. A partir de este punto, se decidió realizar un estudio con extractos naturales de Lavanda (*Lavandula officinalis*) y Arándano Azul (*Vaccinium corymbosum*) con el fin de observar cómo reacciona la cepa frente a ellos, debido a los compuestos fungicidas y fungistáticos presentes en la Lavanda y el contenido de proantocianidinas presentes en el Arándano Azul.

Para evaluar el efecto de dichos extractos, se llevaron a cabo distintas pruebas de laboratorio, donde se estudió el efecto inhibitorio de los extractos a diferentes concentraciones sobre el crecimiento de *Candida albicans*, utilizando como control de comparación el Fluconazol.

Luego de realizar los ensayos experimentales, del tipo preclínico, y analizar los resultados obtenidos, se determinó que la Lavanda demostró mejores resultados inhibiendo el crecimiento de *Candida albicans*, frente a los resultados obtenidos por el Arándano Azul.

DEFINICIÓN DE TÉRMINOS

Acetato de Linalilo: Es uno de los principales componentes de los aceites esenciales de bergamota y lavanda.

Agar: Elemento solidificante muy empleado para la preparación de medios de cultivo. El agar nutritivo se utiliza como medio de cultivo para el crecimiento de bacterias y hongos, pero no para virus.

Amfotericina B: Antibiótico antifúngico de uso parenteral y oral obtenido por fermentación del *Streptomyces Nodosus*, un actinomiceto del suelo.

Azoles: Son antimicóticos fungistáticos sintéticos.

Bifonazol: Es un derivado imidazólico con un espectro antimicótico amplio que abarca los dermatofitos, las levaduras, los mohos y otros hongos como *Malassezia furfur*.

Candidemia: presencia de candida en la sangre. Corresponde a la manifestación más común de una candidiasis invasiva.

Caspofungina: El acetato de caspofungina inhibe la síntesis del beta (1,3)-D-glucano, un componente esencial de la pared celular de muchas levaduras y hongos filamentosos.

Clotrimazol: El clotrimazol es un imidazólico sintético eficaz frente a los hongos, tanto dermatofitos como levaduras, y los cocos gram positivos (géneros *Staphylococcus* y *Streptococcus* spp.)

Concentración Mínima Inhibitoria: Es la menor concentración de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento de bacterias en un medio de cultivo, tras 18-24 h de incubación.

Dermatofitos: Grupo de hongos queratinofílicos que producen micosis cutánea.

Deuteromicetos: Corresponden a una forma inclasificable de hongos u “hongos imperfectos”, en los cuales nunca se ha observado reproducción sexual ni las estructuras especiales que son consecuencia de la reproducción sexual.

Dispareunia: dolor genital persistente o recurrente que se produce justo antes, durante o después del coito.

Disuria: Dificultad de la micción debida a procesos patológicos.

DMSO: (*dimethyl sulphoxide*) Dimetilsulfóxido. Líquido incoloro usado como reactivo y disolvente sintético. Fácilmente capaz de penetrar la piel y se usa en preparaciones medicinales para aplicación en piel.

Epidermophyton: Es un género de hongos causantes de micosis superficiales y cutáneas, incluyendo a *E. Floccosum*, causal de la Tinea Corporis (Tiña), Tinea Cruris, Tinea pedis (Pie de atleta) y Onicomycosis o Tinea Unguium, una infección fúngica del lecho de la uña.

Ergosterol: esteroide que compone la piel y es precursor de la vitamina D. Predomina en células fúngicas, y es destruido por fármacos antimicóticos, principalmente Azoles.

Esporas: célula reproductora producida por ciertos hongos, plantas (musgos, helechos) y algunas bacterias.

Esteroides: lípidos secretados por las glándulas endocrinas (glándulas que liberan hormonas) presentes tanto en el hombre como en los animales y los vegetales.

Estrógenos: Hormona sexual femenina responsable de la formación de los caracteres sexuales secundarios.

Fluconazol: medicamento antifúngico que se utiliza para curar la micosis.

Fungemia: Presencia de hongos en la sangre.

Fungicida: Agente que destruye los hongos.

Fungistático: agente que inhibe el crecimiento de los hongos.

Gluconato de Clorhexidina: El gluconato de clorhexidina es un agente antimicrobiano tópico que se utiliza para enjuagues bucales en el tratamiento de la gingivitis y de la enfermedad periodontal y tópicamente en la preparación de la piel

del paciente antes de una operación quirúrgica, lavado de heridas, y tratamiento del acné vulgar.

Halo de inhibición: zona alrededor de un disco de antibiótico en un antibiograma en el que no se produce crecimiento bacteriano en una placa de agar inoculada con el germen. Es una medida de la potencia del antibiótico frente al germen.

Inóculo: cantidad o número de gérmenes infectantes que son introducidos accidental o voluntariamente en los tejidos vivos o en medios de cultivos especiales.

Itraconazol: Antimicótico de uso sistémico, derivado del triazol. Antifúngico que interfiere en la síntesis proteica de ergosterol en células micóticas.

Ketoconazol: Fármaco antifúngico de la familia de los imidazoles, activo por vía oral. Tiene la propiedad de inhibir la síntesis de los corticoides adrenales, si bien en dosis superiores a las que tienen actividad antifúngica.

Lactobacillus Acidophyllus: tipo de bacteria que vive de forma natural en el cuerpo humano y se encuentra principalmente en los intestinos y la vagina. *Lactobacillus acidophilus* es el probiótico más comúnmente usado.

Linalol: Alcohol monoterpeno que se encuentra en un gran número de aceites esenciales de plantas aromáticas. En lavanda compone entre el 25 y 40% del aceite esencial.

Mc Farland: Escala útil para poder realizar suspensiones bacterianas ajustadas a un patrón, generalmente se suele usar el 0,5 Mc Farland, para esto se toma una muestra del microorganismo y se inocula en un tubo con solución salina, en el momento en que se produzca un poco de turbidez ya está en el 0,5 (de forma visual).

Microsporum: Hongo del tipo Dermatofito, causantes de micosis superficiales que infectan la queratina de la piel y sus anexos. Causante principalmente de Tiña.

Mononucleosis Infecciosa: Infección causada, por lo general, por el virus de Epstein-Barr. El virus se disemina a través de la saliva y es por ello que a veces se la llama "enfermedad del beso."

Nistatina: medicamento que se usa para tratar las infecciones fúngicas en la piel, boca, vagina e intestinos.

Pie de atleta: Es una infección en los pies provocada por hongos y su denominación médica es tiña podal. Es el tipo más común de infecciones micóticas por tiña.

Polienos: compuesto orgánico que tiene más de dos enlaces dobles.

Proantocianidinas: polímeros de flavanoles-3, también conocidas como "taninos condensados", dotadas de potentes propiedades antioxidantes.

Prurito: hormigueo o irritación de la piel que provoca el deseo de rascarse en la zona afectada.

Pseudohifas: cadenas no ramificadas de células tubulares.

Quitina: biopolímero sumamente abundante en la naturaleza pues forma parte del exoesqueleto de los artrópodos (el grupo animal más diverso y abundante del planeta, que incluye a los insectos, crustáceos y arácnidos). También puede encontrarse en el tejido estructural de algunas especies de moluscos, hongos y microalgas.

Sacaromicetos: es una familia de levaduras (hongos).

Saprófito: planta o microorganismo que se alimenta de materias orgánicas en descomposición.

Tiña: infección cutánea causada por un hongo. Con frecuencia, se presentan varios parches de tiña a la vez en la piel.

Trichophyton: genero de hongos que se caracteriza por el desarrollo de micro y macroconidios de paredes lisas.

UFC: Unidades Formadoras de Colonias. Es un valor que indica el grado de contaminación microbiológica de un ambiente. Expresa el número relativo de microorganismos de un taxón determinado en un volumen de un metro cúbico de agua.

Ulceraciones: lesiones similares a un cráter en la piel o membrana mucosa. Se forma cuando se han quitado las capas superiores de la piel o tejido. Se puede presentar en la boca, el estómago y otras partes del cuerpo. Pueden ser causadas por inflamación o infección.

Urocultivo: examen de laboratorio para analizar si hay bacterias u otros microbios en una muestra de orina. Puede ser utilizado para buscar una infección urinaria en adultos y niños.

Vaginosis Bacteriana: infección vaginal más frecuente en las mujeres de 15 a 44 años y está causada por una cantidad excesiva de ciertas bacterias que provoca un desequilibrio bacteriano en la vagina.

Voriconazol: Pertenece a un grupo de medicamentos denominados antimicóticos triazoles. Estos fármacos se emplean para tratar una amplia variedad de infecciones micóticas.

Vulvovaginitis vaginitis: es la hinchazón o infección de la vulva y la vagina. Puede ser causada por hongos levaduriformes, bacterias, virus y parásitos. La candidiasis es una de las causas más comunes de vulvovaginitis en mujeres.

INTRODUCCIÓN

Una infección es un cuadro en el que un microorganismo ingresa a un lugar susceptible del organismo desencadenando cambios en la fisiología normal de este y desarrollando una enfermedad.¹

A grandes rasgos, existen 4 tipos de infecciones por las que un organismo puede afectarse: las generadas por virus, por bacterias, por parásitos o por hongos. En cada uno de estos grupos, hay mucha variabilidad de especies, por lo que encontrar tratamientos de amplio espectro se hace complicado.¹

Dentro de estos agentes patógenos, encontramos a los hongos. Son organismos primitivos, presentes en todo tipo de ambientes: aire, agua, suelo, plantas, animales y seres humanos. Aproximadamente la mitad de ellos pueden ser dañinos para el huésped en el que se alojan. Los hongos que afectan más comúnmente a humanos son los del tipo Dermatofitos: Epidermophyton, Microsporium y Trichopyton (responsables de la Tiña y el Pie de Atleta); y los de la familia Sacaromicetos: Cándidas (responsables en su mayor parte de los procesos de fermentación).²

A esta segunda familia pertenece *Candida albicans*, un organismo dimorfo, es decir, que puede adoptar dos formas, siendo una de ellas la levadura, en cuyo caso es útil en la fermentación de azúcares y no es invasiva; mientras que su otra forma, la fúngica, es productora de verdaderas ramificaciones llamadas hifas y que en conjunto forman el micelio. Dichas hifas están constituidas por un conjunto de células alargadas envueltas por una pared celular, y su punta es el sitio de secreción de enzimas, las cuales son capaces de degradar proteínas, lípidos y otros componentes celulares, lo cual facilita su infiltración en sustratos sólidos y tejidos.³

El ser humano es el principal reservorio de este tipo de hongos. Por lo general, está presente en pequeñas cantidades en las mucosas de la vagina, boca, el tubo digestivo y en la piel. Su hábitat ideal es en ambientes cálidos y

húmedos, es por esto que es habitual también encontrarla en cepillos dentales, prótesis dentales, lentes de contacto y catéteres, entre otros. La mayor parte del tiempo, no ocasiona infección ni síntomas.⁴

Cándida y muchos otros microorganismos que normalmente viven en las mucosas, se mantienen mutuamente en equilibrio. Sin embargo, en determinadas ocasiones, las condiciones en que conviven estos microorganismos cambian y la armonía de la microbiota se pierde. Al alterarse el estado natural en que se encuentran, puede verse afectada la cantidad de *Candida albicans* presente, aumentando y modificando su estructura, provocando con esto una afección conocida como Candidiasis.⁵

La Candidiasis o Candidosis, es una infección de alta incidencia. Se presenta mayoritariamente en mujeres. Se dice que afecta al 70 y 75% de las mujeres en edad fértil, y se estima que entre el 40 y 50% la experimentará de forma recurrente.⁶ Incluye infecciones que varían desde las superficiales como la Candidiasis oral y la Vulvovaginitis, hasta infecciones sistémicas conocidas como Candidemias. Sus signos y síntomas incluyen ardor, prurito, flujo vaginal blanco y grumoso, disuria, dispareunia, eritema, edema y la formación de manchas blancas en las mucosas.⁵

La existencia de una alta prevalencia de esta infección fúngica, ha llevado a muchos investigadores a realizar estudios que ayuden a determinar cuáles son los elementos necesarios para su tratamiento, dentro de los cuáles encontramos dos alternativas terapéuticas de uso habitual: los polienos y los azoles.⁷ Los polienos (nistatina, anfotericina B) presentan el mayor espectro de acción entre los agentes disponibles: provocan la muerte celular al intercalarse en las membranas que contienen ergosterol, el principal esteroide de las membranas micóticas, produciendo canales que alteran el gradiente de protones con pérdida del contenido celular. Los azoles por su parte, abarcan los imidazoles y los triazoles y su acción consiste principalmente en inhibir la biosíntesis del ergosterol.⁸

En Chile, el tratamiento habitual para Candidiasis simples puede consistir en la administración vía oral de Fluconazol, Itraconazol y Clotrimazol, óvulos de Clotrimazol y Nistatina, y cremas de uso tópico de Clotrimazol y Bifomazol. Según las guías clínicas del Ministerio de Salud, el tratamiento usual es la utilización de Fluconazol vía oral agregado a Clotrimazol en óvulos y tópico, a utilizarse por el afectado y su pareja sexual, además de secado de la zona con toallas de papel y abstinencia sexual.⁷

A pesar del uso de fármacos, y que la infección se logra eliminar, muchas mujeres vuelven a tener la sintomatología y los signos característicos de ella, llegando a padecerla en reiteradas oportunidades. La condición de tratar constantemente esta infección, puede llegar a generar resistencia, en este caso, de *Candida*. Esta resistencia está asociada, en parte, a la formación de biofilm por parte de la *Candida*.⁹

El biofilm se constituye a partir de microcolonias formadas por la *Candida* en las mucosas. Este proceso consta de 3 fases: temprana (0-12 hrs), intermedia (12-30 hrs), madura (38-72 hrs). Cuando se llega al período de maduración, el biofilm ya se ha formado completamente, siendo compuesto por una masa celular, espacios intercelulares, y una matriz extracelular.¹⁰

A partir de los datos recopilados, es que se ha determinado realizar un estudio con extractos naturales de Lavanda y Arándano Azul, con el fin de observar los efectos de estos sobre el crecimiento de *Candida albicans*.

La Lavanda, cuyos componentes principales son el linalol y acetato de linalilo, se ha descrito que actúa como fungicida y fungistático, afectando el crecimiento de la *Candida*.¹¹

El Arándano Rojo contiene diferentes compuestos, entre los cuales se encuentran las proantocianidinas. En estudios previos, estos compuestos se relacionan con la inhibición de la formación del biofilm.¹²

El Arándano Azul es una especie cercana al Arándano Rojo, nativa de Norteamérica, pero con pocos requerimientos de frío, por ello es que se ha podido adaptar al cultivo en Chile. Este arándano tiene compuestos similares (proantocianidinas) al Arándano Rojo, por lo que se pueden realizar estudios relacionados con *Candida albicans*.¹²

Todos estos antecedentes nos llevan a plantear la siguiente hipótesis:

HIPÓTESIS

“Los extractos naturales de la Lavanda (*Lavandula officinalis*) y Arándano Azul (*Vaccinium corymbosum*) disminuyen el crecimiento celular de *Candida albicans*.”

FUNDAMENTACIÓN

La candidiasis, al ser una enfermedad altamente recurrente en la población femenina, y debido a sus repetitivas recidivas, es que se ha determinado buscar nuevas formas de tratamiento, en este caso, naturales con extractos de Lavanda y Arándano Azul, ya que hay estudios donde se han encontrado propiedades de éstos que podrían inhibir el crecimiento de *Candida albicans* y la formación de biofilm.

OBJETIVOS

Objetivo General

- Investigar los efectos de los extractos de Lavanda y Arándano Azul sobre el crecimiento celular de *Cándida Albicans*, comparado con Fluconazol como tratamiento estándar de la patología.

Objetivos Específicos

- Determinar los efectos de los extractos de Lavanda y/o Arándano Azul sobre el crecimiento de *Candida albicans*.
- Comparar los efectos de extractos de Lavanda y/o Arándano Azul con el tratamiento estándar, Fluconazol.

MARCO TEÓRICO

Todos los seres vivos conocidos se organizan en grupos llamados reinos, de acuerdo a las características en común que posean, estos reinos son: Móneras, Protistas, Hongos, Plantas y Animales.

Los microorganismos corresponden a aquellos seres vivos que sólo pueden visualizarse con el microscopio. La ciencia que los estudia se denomina Microbiología, cuyo nombre proviene del griego “Micro” que significa diminuto o pequeño y “Bio” del griego vida, es decir “seres vivos diminutos”. Son organismos dotados de individualidad que presentan, a diferencia de las plantas y los animales, una organización biológica elemental. En su mayoría son unicelulares, aunque en algunos casos se trate de organismos cenóticos (células multinucleadas), o incluso multicelulares. Dentro de los microorganismos se encuentran organismos unicelulares procariotas, como las bacterias, y eucariotas, como los protozoos, una parte de las algas y los hongos, e incluso los organismos de tamaño ultramicroscópico, como los virus.^{1,2}

El reino Fungi incluye a aquellos organismos celulares sin cloroplastos, que poseen paredes celulares compuestas por quitina. Los hongos son organismos eucariotas, que producen esporas y no tienen clorofila. Su nutrición es por absorción, y generalmente se reproducen de forma sexual y asexual. Su cuerpo consiste generalmente en filamentos ramificados con una pared celular quitinosa. Constituyen uno de los grupos de organismos más importantes para la vida del hombre, ya que son los responsables de gran parte de la descomposición de la materia orgánica aumentando su disponibilidad en el suelo; pueden ser comestibles, venenosos o psicotrópicos; muchos son patógenos; otros, producen ciertas sustancias beneficiosas o intervienen en procesos de elaboración de algunos comestibles.^{1,2}

Los hongos tienen una gran importancia económica para los humanos: las levaduras son las responsables de la fermentación de la cerveza y el pan, y el cultivo de setas es una gran industria en muchos países.¹

Los hongos pueden ser clasificados según su forma de crecimiento: hongos filamentosos, en levadura (cándida) y de crecimiento inusual.^{1,2}

Cándida es un género de hongos unicelulares también llamados levaduras. La especie de cándida más significativa por su importancia clínica es *Candida albicans*. Las infecciones causadas por hongos se denominan micosis. *Candida albicans* es un comensal de las mucosas humanas, sobre todo de la mucosa oral, digestiva y genital. Las micosis causadas por *Candida albicans* o por otras especies de cándida se denominan “candidiasis” en humanos y en otros animales.³

Candida albicans es un hongo diploide asexual (forma de levadura), saprófito de la familia de los sacomicetos. Normalmente se encuentra en la cavidad oral, en el tracto gastrointestinal y en la vagina. Está envuelta en un rol relevante en la digestión de los azúcares mediante un proceso de fermentación.³

La candidiasis incluye infecciones que van desde las superficiales, tales como la candidiasis oral y vaginitis, hasta las sistémicas y potencialmente mortales, conocidas como candidemias, y generalmente se limita a personas inmunocomprometidas, como pacientes con cáncer, trasplante o SIDA o incluso pacientes de cirugías de emergencia no traumáticas.^{4,5}

Las infecciones superficiales y de membranas mucosas por cándida que causan inflamación y malestar son comunes en la población humana. Aunque claramente atribuible a la presencia de patógenos oportunistas del género cándida, la candidiasis describe una serie de diferentes síndromes de enfermedades que usualmente difieren en sus causas y resultados.

La candidiasis vaginal es una vaginitis infecciosa producida por una levadura del género cándida, siendo el más común de ellos la *Candida albicans* (85%), seguido por la *Candida glabrata* y la *Candida tropicalis*.^{6,7}

Como se mencionó anteriormente, la cándida es un organismo común en la flora vaginal, lo que ocurre es que se puede presentar bajo dos formas: en su forma como levadura (no patógena, blastoporo) y en su forma micelar donde

desarrolla una especie de raíces, pseudohifas (forma patógena) que se entrelazan entre sí y con las que perforan y se fijan a las células de la mucosa vaginal (formaciones micelares). Esta forma patógena se da cuando existe un sobrecrecimiento originado básicamente por una deficiencia inmunológica o por una carencia de los bacilos de Döderlein (*Lactobacillus*). La inflamación se produce entonces por la fijación de las hifas al epitelio y por la producción de numerosas sustancias tóxicas que la cándida genera, especialmente de tipo proteasa celular (que destruyen el tejido epitelial) y fosfolipasas (que destruyen fosfolípidos) propias del metabolismo de la cándida. En ocasiones también se puede agravar el cuadro por reacciones alérgicas al hongo, cosa que puede ser común en mujeres con un terreno alérgico previo o predispuesto.^{6,8}

Por tanto, la infección por *Candida albicans* no tiene un carácter externo, sino que obedece a un cambio en las condiciones internas que repercuten en el comportamiento y grado de desarrollo de este organismo ya presente (como saprófito) en la propia flora. Es por esta razón que se considera una infección de carácter "oportunista".

Dentro de las características de la vagina, ésta se encuentra cubierta por un tejido epitelial, denominado mucosa vaginal, el cual está abundantemente irrigado. Esta mucosa está habitada por una flora bacteriana también característica y propia en la que se encuentran diversos tipos de bacterias y donde algunas de ellas pueden llegar a ser patógenas al momento de alcanzar proporciones superiores al grado de normalidad que les corresponde. Este equilibrio entre poblaciones bacterianas depende de diversos factores, donde uno de los más destacables es la presencia de *Lactobacillus* en número suficiente para controlar el desarrollo y proliferación de las especies patógenas mediante diversos mecanismos que se mencionarán posteriormente.⁹

La secreción vaginal normal es clara, blanca, foliculada, viscosa, sin olor y con un pH en torno a 4.5, en la observación microscópica no se observan micelios, ni *Trichomonas vaginalis*, esporas, o células guías. Presenta abundantes células de descamación y abundantes *Lactobacillus*.⁹

El mecanismo de defensa vaginal consta básicamente de cuatro elementos: barrera física que impone el tejido mucoso, barrera inmunológica (humoral y celular), la flora endógena (bacilos de Döderlein) y secreción de moco vaginal.

El epitelio de la vagina segrega sustancias tal como lisoenzimas, ácidos débiles, lípidos e inmunoglobulinas (IgA e IgG), las cuales agreden a elementos extraños o crean las condiciones adecuadas para mantener el equilibrio entre los microorganismos que la pueblan.⁹

El epitelio vaginal es pluriestratificado, esto quiere decir que las células del epitelio se disponen en capas superpuestas, normalmente unas cuarenta. Del grosor y condiciones de este tejido depende en gran parte su función como barrera. Los estrógenos favorecen la maduración y formación del epitelio, además de estimular la producción de glucógeno (azúcar) en el interior de sus células.⁹

Todos los epitelios (incluida la piel) tienden a eliminar la capa superficial de células como proceso de renovación y regeneración, el epitelio vaginal se renueva aproximadamente cada ocho días, al desprenderse las células y descomponerse (autólisis celular), los *Lactobacillus* presentes en la vagina degradan a su vez el glucógeno contenido en las mismas convirtiéndolo en glucosa y luego en ácido láctico, es este ácido el que, de forma principal, determina el grado de acidez vaginal.^{10,11} En el proceso de regeneración se eliminan gran número de bacterias patógenas. El pH vaginal normal es ácido, lo que dificulta el desarrollo de otros microorganismos patógenos que precisan de un medio menos ácido para desarrollarse.⁶

Se debe tener en cuenta que los organismos patógenos también se nutren del glucógeno, esto es rigurosamente cierto si se habla de los hongos y en particular de la cándida. También en este sentido es indispensable la presencia de los *Lactobacillus* vaginales ya que compiten fuertemente con los microorganismos dañinos no sólo por el espacio, sino también por el alimento.

Además de esto, los *Lactobacillus* secretan una serie de sustancias de acción antibiótica tales como el peróxido de hidrógeno, bacteriocinas, lactacidina,

acidolina y lactacin B y algunas defensinas, entre otras, las que actúan de forma sinérgica para suprimir ciertas bacterias o inhibir el desarrollo bacteriano. También los *Lactobacillus* se adhieren a determinados receptores de las células de la vagina, impidiendo así la adhesión por parte de otros microorganismos.¹²

Esta población de *Lactobacillus* se encuentran en grandes cantidades en una vagina sana (entre 10 y 100 millones por gramo de fluido) habiéndose descrito distintas especies que se reúnen bajo el nombre común de bacilos de Döderlein, y entre las que se encuentran los *L. acidophilus*, *L. johnsonii*, *L. casei*, *L. cispatus*, entre los más destacados, por ser quizás los que mayor cantidad de peróxido de hidrógeno producen.¹³

Por otro lado esta flora actúa siempre a nivel de la superficie de la mucosa, razón por la que no resulta patógena, sin embargo, las especies que sí lo son invaden y penetran en el tejido, destruyéndolo.

Tanto las células desprendidas del epitelio vaginal, las bacterias muertas, como todos los subproductos del metabolismo de los organismos propios de la flora, secreciones diversas de las células epiteliales y demás, son arrastradas hacia el exterior por el flujo vaginal, cumpliendo así la función de “barrido” y manteniendo el medio interno limpio.

Otros elementos que forman parte activa y fundamental en la defensa de la mucosa vaginal son determinadas células inmunológicas, principalmente monocitos, células dendríticas (células de Langerhans), linfocitos y macrófagos, estas poblaciones forman la inmunología celular, y es parte fundamental en el control de las candidas, de hecho, se pueden suponer problemas en la respuesta de estas células cuando existen candidiasis recurrentes. También, las células epiteliales, cuando se produce una infección, secretan citocinas, defensinas y quimiocinas, sustancias que activan células inmunitarias específicas para luchar contra la infección.⁶

Teniendo en cuenta que dada la diversa función vaginal de ser el espacio de protección genital y cumplir al mismo tiempo las funciones de receptor de la

penetración y del esperma así como ser la vía de expulsión del feto en el parto, su sistema es complejo ya que tiene que alcanzar un necesario equilibrio entre las funciones de defensa y su tolerancia frente al contacto con elementos externos.

Signos y síntomas:

Todas las vaginitis cursan con gran número de signos comunes, distinguiéndose algunas variaciones según los organismos que las produzcan. Principalmente estas diferencias son relativas al flujo, tipo, localización y forma de las lesiones que se pueden producir.

Los síntomas más característicos de una candidiasis vaginal son: prurito, ardor, flujo blanquecino con aspecto de leche cortada y que puede oler a levadura, eritema vulvovaginal, posible ardor al orinar y úlceras vaginales pequeñas.¹⁴

La mayoría de las infecciones por *Candida albicans* son tratables y generan mínimas complicaciones, aunque éstas podrían llegar a ser graves o fatales si no se tratan en ciertas poblaciones. En personas inmunocompetentes, la candidiasis suele ser una infección muy localizada de la piel o membranas mucosas, incluida la cavidad oral (candidiasis oral), la faringe o el esófago, el aparato digestivo, la vejiga urinaria o los genitales (vagina, pene).^{14,15} Los síntomas de una infección en los genitales masculinos incluyen manchas o llagas rojas cerca de la cabeza del pene o en el prepucio, picazón severa o una sensación de ardor. La candidiasis del pene también puede tener una descarga blanca, pero es poco común.²³

La candidiasis es una causa muy común de la irritación vaginal y también puede presentarse en los genitales masculinos. En pacientes inmunocomprometidos, las infecciones por *Candidaalbicans* pueden afectar el esófago con el potencial de volverse sistémico, y causan un padecimiento muchísimo más grave: una fungemia llamada candidemia.¹⁵

La candidiasis oral es muy común en los recién nacidos hospitalizados, aunque no se considera patológica a menos que dure más de un par de semanas. Esto, debido a los procedimientos invasivos que se realizan en UCI o UTI

neonatal, en los cuales se utilizan tubos naso u orofaríngeos, ya que estos son medios de transmisión del hongo.¹⁶⁻¹⁸

Causas:

Las levaduras de *Candida albicans* generalmente están presentes en seres humanos sanos, en particular sobre la piel, pero su crecimiento suele verse limitado gracias al sistema inmune, a la competencia de otros microorganismos, como bacterias que ocupan los mismos lugares del organismo, o por la relativa resequedad de la piel, pues la *Candida albicans* requiere de la humedad para su crecimiento.

Dentro de las causas más comunes existen:^{4-6,19-21,23}

- El uso externo de detergentes o de duchas o algunas irregularidades internas (hormonales o fisiológicas) pueden provocar trastornos en la flora vaginal habitual, que incluye sobre todo bacilos de ácido láctico como, por ejemplo, *Lactobacillus*, que al estar disminuidos en el organismo puede facilitar un crecimiento excesivo de células de *Candida* y provocar síntomas de infección, como inflamación local.
- Duchas vaginales, uso de desodorantes íntimos y/o jabones alcalinos, ya que disminuyen la flora, eliminan la mucosidad de protección y cambian el pH vaginal normal.
- Los anticonceptivos hormonales, principalmente por su contenido en progestágenos (hormonas de síntesis que imitan a la progesterona), y no tanto los estrógenos, ya que producen un espesamiento del moco entre el útero y la vagina, disminuyendo la velocidad del flujo y por tanto la rapidez en la eliminación. Otra razón, quizás más importante, es el hecho de que produce un cierto grado de atrofia del epitelio vaginal, es decir disminuye su espesor volviendo a la vagina, de este modo, más vulnerable a la penetración por parte de agentes patógenos y a sufrir daños irritativos. Además, los progestágenos facilitan la formación de micelios a partir de las

formas levaduriformes del contenido vaginal (facilitan el paso de la forma saprófita e inofensiva a la forma dañina).

- Deficiencia en los niveles de estrógenos, dado que disminuye el desarrollo del epitelio y además disminuye las concentraciones de glucógeno en éste incidiendo esta circunstancia en una disminución de los bacilos de Döderlein.
- La menopausia, ya que al disminuir la cantidad de estrógenos, se produce una hipotrofia de la mucosa vaginal, también disminuyen los niveles de glucógeno en las células de la misma y consiguientemente disminuye la población de bacilos de Döderlein.
- El coito, pero principalmente si existe eyaculación en la vagina, ya que el semen alcaliniza la vagina por un período de horas, condiciones que pueden ser aprovechadas por los patógenos.
- El flujo menstrual alcaliniza la vagina, además los *Lactobacillus* se adhieren a los hematíes (glóbulos rojos) siendo así eliminados con la sangre y disminuyendo consiguientemente el número de estos.
- La diabetes o prediabetes, por mantener elevados niveles de glucosa en el medio extracelular.
- Tratamientos con glucocorticoides. Si bien y principalmente por su efecto depresivo del sistema inmunológico (especialmente sobre las poblaciones de linfocitos T), también influye por otros efectos tales como la disminución de la síntesis proteica (que afecta a la formación de tejidos y por tanto a la formación y desarrollo de la mucosa vaginal) y porque disminuye la disponibilidad de azúcar para las células, con lo que aumenta el contenido extracelular de azúcares y por tanto la disponibilidad para los patógenos.
- El uso de antibióticos de amplio espectro (especialmente las tetraciclinas y derivados), o los que actúan sobre bacterias gram positivas. La razón es obvia, ya que estos antibióticos no distinguen entre bacterias nocivas y amigables y eliminan también a los bacilos de Döderlein. En todo caso,

digamos que elimina a las bacterias amigables pero no a todas las patógenas.

- La otra razón es la inmunodepresión secundaria al uso de antibióticos, que como es sabido disminuyen también al propio sistema inmunológico. Específicamente en el caso de las candidiasis y el uso de antibióticos hay que decir que los antibióticos no matan a los hongos, por tanto ante la desaparición de la flora bacteriana, ya sea esta amigable o patógena, los hongos quedan con el terreno completamente libre para iniciar su proliferación, con el agravante añadido del relativo estado de inmunodepresión que pueda producirse, con lo que el sistema inmunológico también se verá limitado a la hora de frenar el desarrollo de los mencionados hongos.
- Estados de inmunodepresión originados por diversas enfermedades, elementos tóxicos o estrés (tales como las hepatitis, otras infecciones, parasitosis, síndrome de fatiga crónica, VIH, intoxicaciones por metales pesados, etc.)
- Fármacos inmunodepresores y quimioterapia.
- La humedad y el calor, permanecer con el bañador húmedo (cuando se tiene ya la infección), los protectores, y usar tampones por más tiempo del debido (despistes, etc.).
- La ropa muy ajustada, especialmente los vaqueros, son causa de vaginitis infecciosa, incluida la candidiasis.
- El uso de ropa interior de tejidos sintéticos, o prendas íntimas lavadas con lejía o detergentes irritantes y alcalinos.
- Otra posibilidad que debe ser considerada es la menor tolerancia a la glucosa y glucosuria consecuente que presentan algunas embarazadas y que podría aumentar más aún la susceptibilidad.

- Penetración masiva de gérmenes externos ya sea a través de la vulva o de los intestinos por razones que pueden variar desde el prolapso del útero hasta el desgarro perianal mal curado, razones que disminuyen el cierre natural de la vagina hacia el exterior. También una marcada disbiosis (desequilibrio bacteriano patógeno) intestinal y el desplazamiento de estas bacterias desde el medio intestinal hacia el medio urogenital. De este modo, una candidiasis intestinal, puede convertirse en un permanente reservorio de cándidas.

Las infecciones en los genitales masculinos por hongos son menos comunes, y la incidencia de las infecciones es tan sólo una fracción de las que se observan en las mujeres; sin embargo, la infección por hongos en el pene a través de contacto directo en las relaciones sexuales con una pareja infectada no es rara.

Las especies de cándida suelen formar parte de la flora oral e intestinal habituales del cuerpo humano. El tratamiento con antibióticos puede llegar a eliminar a los competidores naturales de los hongos en busca de recursos, y aumenta la gravedad del padecimiento.

Diagnóstico:

El diagnóstico de una infección por levaduras se realiza ya sea a través de un examen microscópico o urocultivos.

Para la identificación por microscopía óptica, un raspado o frotis de la zona afectada se coloca en un portaobjetos de un microscopio. Luego se le añade a la muestra una sola gota de solución de hidróxido de potasio (KOH) al 10%. El KOH disuelve las células cutáneas pero deja las células de *Candida* intactas, y permite la visualización de pseudohifas y las células de la levadura en ciernes típico de muchas especies de *Candida*.^{4,19,22}

Para el método de cultivo, un bastoncillo estéril se frota sobre la superficie de la piel infectada. El bastoncillo se pasa luego por un medio de cultivo. El cultivo es incubado a 37°C por varios días, lo que permite el desarrollo de las colonias de levadura o bacterianas. Las características (la morfología y el color, por ejemplo)

de las colonias puede permitir el diagnóstico inicial del organismo que está causando los síntomas de la enfermedad.^{4,19,22}

En algunos casos las vaginitis infecciosas, incluida la candidiasis, cursan prácticamente de forma asintomática o solo con ligeras molestias. En la observación con el espéculo se visualizan estelas blancas y bajo éstas y alrededor, la vagina se encuentra enrojecida e irritada.

Un diagnóstico diferencial característico de la cándida con otras lesiones blancas orales es que se elimina al raspado.

Tratamiento:

Con el fin de tratar esta infección, es importante, primero que todo, realizar un diagnóstico certero, tener en cuenta los factores de riesgo que se presentan, con tal de corregirlos y que el tratamiento farmacológico sea efectivo.

En la clínica, la candidiasis es comúnmente tratada con antimicóticos, los medicamentos más comunes Clotrimazol, Fluconazol, Nistatina y Ketoconazol.^{19,23,25}

Por ejemplo, se ha informado que una dosis única de Fluconazol (comprimido de 150 mg por vía oral) es 90% eficaz en el tratamiento de una infección vaginal por levaduras. En infecciones graves, se podría utilizar Anfotericina B, Caspofungina o Voriconazol. Los tratamientos locales pueden incluir óvulos vaginales o duchas vaginales medicadas.²⁴

La *Candida albicans* puede desarrollar resistencia contra los fármacos antimicóticos. Las infecciones recurrentes pueden ser tratadas con otros antimicóticos, pero también se podría desarrollar una resistencia contra estos otros agentes antimicóticos.²⁶⁻²⁸

Tratamiento candidiasis genital (alternativas)²³

Medicamento	Dosis	Vía	Frecuencia	Duración
Fluconazol	150 mg.	Oral	Dosis única	-----
Itraconazol	200 mg	Oral	Cada 12 horas	Por 1 día
Clotrimazol	500 mg	Óvulo vaginal	Dosis única	-----
Clotrimazol	100 mg	Óvulo vaginal	Diaria	Por 7 días
Nistatina	100.000 UI	Óvulo vaginal	En la noche	10 días
Clotrimazol	1%	Crema	2 veces	10 días
Bifonazol	1%	Crema	2 veces	10 días

Observación: No existe información adecuada que asegure el uso de Fluconazol e Itraconazol durante el embarazo.

Otros imidazólicos tópicos también son útiles: Ketoconazol, Isoconazol, Tioconazol, Sertaconazol, etc.

Tratar a la pareja, en especial si la mujer sufre de episodios recurrentes.

Si se usa vía oral tener en cuenta que los imidazoles tienen interacción con alcohol astemizol, antagonistas del calcio, cisaprida, warfarina, ciclosporina, hipoglicemiantes orales, fenitoína, inhibidores de la proteasa, tacrolimus, rifampicina.²³

Tratamiento candidiasis recurrente

Medicamento	Dosis	Vía	Duración
Fluconazol	150 mg.	Oral	3 días seguidos
Nistatina	100.000 UI	Óvulo	En la noche

Tratamiento de mantención: (alternativas)

Medicamento	Dosis	Vía	Frecuencia	Duración
Clotrimazol	500 mg	Óvulo	1 vez a la semana	6 meses
Fluconazol	150 mg	Oral	1 vez por semana	6 meses
Itraconazol	200 mg	Oral	Cada 12 horas durante 6 meses	Por un día al mes
Clotrimazol	100 mg	Óvulo vaginal	Diaria	Por 7 días
Nistatina	100.000 UI	Óvulo vaginal	En la noche	10 días
Clotrimazol	1%	Crema	2 veces	10 días

Observación: No existe información adecuada que asegure el uso de Fluconazol e Itraconazol durante el embarazo.

Mantener terapia por 6 meses. Sin embargo el 30% o 40% de las mujeres tendrá recurrencias.^{23,29}

Tratamientos alternativos:

Dentro de los tratamientos naturales para tratar la *Candida albicans* encontramos primero la dieta, que además de tratar la candidiasis vaginal, ayuda en el tratamiento de cualquier tipo de candidiasis y consiste principalmente en eliminar el azúcar en todas sus formas, reduciendo también todos los alimentos procesados que contengan azúcar. Esto se debe a que es el azúcar la principal fuente de alimentación para los hongos del género *Candida*. Se recomienda también no consumir alimentos en fermentación, es decir aquellos que poseen levaduras.

Otro de los tratamientos naturales más conocidos corresponde al uso de antimicrobianos naturales como el ajo y el aceite de orégano, los cuales evitan el sobrecrecimiento, alivian los malestares reduciendo los síntomas y generan mejoras en el sistema inmunológico, lo cual resulta fundamental para eliminar cualquier agente negativo del organismo.³⁰⁻³²

Otra alternativa para tratar la *Candida albicans* de forma natural, es a través del uso de probióticos, ya que pequeños microorganismos como por ejemplo el *Lactobacillus acidophilus* conocido por estar contenido en el yogur, ayuda a mantener controlados a los diferentes organismos que provocan daños, tales como los hongos.⁴

Existen estudios que informan acerca de los componentes de la Lavanda (*Lavandula officinalis*) y Arándano Azul (*Vaccinium corymbosum*), que podrían ser beneficiosos contra la infección por *Candida albicans*.³³⁻⁴⁴

Dentro de los componentes del extracto etanólico de Lavanda, encontramos principalmente el linalol y el acetato de linalilo, los cuales se caracterizan por actuar como fungicida y fungistático. La actividad fungicida corresponde a la reducción del 99,9% de las unidades formadoras de colonias, mientras que agente fungistático es la denominación para aquel que reduce el crecimiento del hongo. Es así como el extracto de Lavanda se convierte en un potencial tratamiento para el crecimiento de la *Candida albicans*.³⁹⁻⁴³

Por otro lado, tenemos el extracto de Arándano Azul, el cual también surge como un potencial tratamiento para *Candida albicans* debido a que dentro de sus componentes encontramos las proantocianidinas, las cuales son definidas como principios activos de los vegetales, y se encuentran también en el Arándano Rojo. Existen estudios previos que relacionan el uso de dichas proantocianidinas con la disminución del crecimiento de *Candida albicans*.^{30,35-38}

Incidencia en Chile:

Se estima que un 75% de las mujeres tiene, al menos, un episodio de vulvovaginitis candidiásica (VVC), mientras el 40% - 45% presentan dos o más episodios. Menos de un 5 % de las mujeres presentan vulvovaginitis candidiásica recurrente (VVCR), definida como cuatro o más episodios por año.^{23,45}

Los factores que incrementan la incidencia de la candidiasis vaginal son estar embarazada, la obesidad, el uso de anticonceptivos orales con altos niveles de estrógeno, las terapias de estrógeno, tener diabetes o estar tomando antibióticos para combatir otras infecciones.⁴⁶ Con respecto a la diabetes, es fundamental que las mujeres diabéticas controlen su nivel de azúcar en la sangre ya que las hongos también proliferan cuando su concentración es elevada, haciéndolas más propensas a desarrollar infecciones vaginales por hongos. Con respecto a los antibióticos, se debe saber que estos además de eliminar a las bacterias patógenas, también eliminan a las bacterias "beneficiosas" que se encargan de mantener bajo control a los hongos, destruyendo de esta forma el equilibrio de la flora vaginal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Variables

1. Determinar los efectos de los extractos de Lavanda y de Arándano Azul sobre el crecimiento de *Candida albicans*.

NOMBRE	DEFINICIÓN	DIMENSIÓN	INDICADORES	SUBINDICADORES
Efectividad del extracto de Arándano Azul.	Efectos del extracto de Arándano Azul sobre el crecimiento de <i>Candida albicans</i> .	Concentración mínima inhibitoria.	Alta. Media. Baja.	mg/ml
		Concentración de compuestos aplicados.		mg/ml
		Acción frente al hongo	Fungistático Fungicida	Si – No Si – No

NOMBRE	DEFINICIÓN	DIMENSIÓN	INDICADORES	SUBINDICADORES
Efectividad del extracto de Lavanda.	Efectos del extracto de Lavanda sobre el crecimiento de <i>Candida albicans</i> .	Concentración mínima inhibitoria.	Alta. Media. Baja.	mg/ml
		Concentración de compuestos aplicados.		mg/ml
		Acción frente al hongo	Fungistático Fungicida	Si – No Si – No

2. Comparar los efectos de extractos de Lavanda y Arándano Azul con tratamiento estándar, Fluconazol.

NOMBRE	DEFINICIÓN	DIMENSIÓN	INDICADORES
Eficacia del extracto de Lavanda en comparación con la del Fluconazol.	Capacidad mejorada del extracto de Lavanda, en comparación con Fluconazol de erradicar la cándida.	- Menor - Igual - Mayor	mg/dL
Eficacia del extracto de Arándano Azul en comparación con la del Fluconazol.	Capacidad mejorada del extracto de Arándano Azul, en comparación con el Fluconazol, de erradicar la cándida.	- Menor - Igual - Mayor	mg/dL

Diseño

El tipo de estudio de investigación es de tipo experimental realizado como ensayo preclínico ya que durante la investigación se estudiarán los efectos que producen los extractos naturales, mencionados anteriormente, sobre *Candida albicans*, en comparación con el tratamiento estándar, Fluconazol, para finalmente obtener la confirmación de la hipótesis.

Población: universo y muestra

Universo:

Se utilizarán cepas estándar código 926-3 del Centro de Referencia en Micología, Facultad de Medicina de la Universidad Austral de Chile, Isla Teja s/n-Valdivia, Chile.

Las cepas se cultivaran en placas Petri con 20 ml de agar Sabouraud-dextrosa con técnica de estrías, manteniéndolas a 37°C en incubadora por 48 h, antes de ser utilizadas. Después de la incubación, se preparara *Candida albicans* en medio líquido (0,5 McFarland)

Los inóculos de células o suspensiones de esporas se obtuvieron de acuerdo con procedimientos publicados y se ajustó a $1-5 \times 10^3$ células/esporas con las unidades formadoras de colonias (UFC)/mL Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2008.

Mecanismo de determinación del universo:

Se utilizarán las cepas comerciales, referenciales o estándar de *Candida albicans*, cuyo código corresponde al 926-3, provenientes del Centro de Referencia en Micología, Facultad de Medicina de la Universidad Austral de Chile, ya que estas cepas representan un estudio universal, que no presenta sesgos investigativos, ni manipulación externa de la cepa, comparable a cualquier estudio internacional.

Muestra:

Será seleccionada la cepa tipo *Candida albicans* 926-3

Mecanismo de determinación de muestra:

La cepa tipo *Candida albicans* 926-3 es una muestra estándar a nivel nacional y mundial, que cumple las características necesarias para este tipo de investigación, debido a su menor susceptibilidad a los cambios del medio.

Para seleccionar este tipo de cepa, se utilizarán los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

Inclusión:

- Muestra de referencia.
- Muestras de cepas *Candida albicans* 926-3.
- Conservación de las cepas de *Candida albicans* en agua bidestilada esteril
- Conservación a temperatura de 4°C.
- Cultivados en agar dextrosa.

Exclusión:

- Cepas diferentes a *Candida albicans* 926-3.
- Cepas muertas antes de que se inicie el experimento.
- Cepas contaminadas antes de que se inicie el experimento.
- Muestras obtenidas de manera clínica.
- Cepas que no sean conservadas en agua bidestilada esteril.
- Cepas conservadas a una temperatura distinta a 4 °C.
- Cepas cultivadas en otro tipo de agar que no sea agar dextrosa.

Fuentes de información

- Unidad de estudio o análisis: Placas de Petri y Placas de Micropocillos en los cuales se encuentran cultivados cepas de *Candida albicans* 926-3.
- Unidad Informante: Datos obtenidos de cada uno de estas placas Petri y Placas de Micropocillo definidas como unidad de estudio o análisis.
- Unidad Referencial: Laboratorio del Edificio Bruno Gunther, Facultad de Medicina, Universidad de Valparaíso.

Método

El tipo de estudio que se utilizará en la presente investigación, corresponde al experimental de diseño ensayo clínico; escogido basado en que durante la investigación serán manipulados extractos naturales como métodos alternativos, además de tratamientos médicos a modo de control para determinar la inhibición del crecimiento de *Candida albicans*, para finalmente confirmar la hipótesis de investigación.

Protocolos experimentales:

1. Ensayo por difusión en agar:

En placas petri con un medio de cultivo agar sabouraud se inoculará una cantidad determinada de *Candida albicans* (0.5 mc farland) sembrándola de forma uniforme con tórula, posteriormente se realizará la técnica de sacabocados periféricos, efectuando 6 de ellos en cada placa Petri. En los espacios resultantes se agregará los extractos previamente preparados de lavanda y arándano azul, ambos a una concentración de 50 mg/ml, utilizando como solvente para la preparación, DMSO.

Las cantidades a agregar en los espacios generados son de 50 microlitros y 100 microlitros de extracto de lavanda, a una concentración de 50 mg/mL extracto de arándano azul en los mismos volúmenes y misma concentración, además de dos controles correspondientes a DMSO, 100 microlitros, y Fluconazol, 100 microlitros, a 50 mg/mL..

Disponer las placas Petri en una incubadora a 37°C y observar el crecimiento a las 24 y 48 horas.

2. Ensayo de inclusión

En placas con micropocillos, de 6 y de 12 pocillos, de cultivo celular se realizará un medio de cultivo mediante la inclusión de extractos naturales de lavanda y arándano azul, por separado, los cuales se encuentran a determinada concentraciones; para ambos extractos, se comenzará con una concentración de

0,5 mg/mL y se aumentará de 0,5 en 0,5 en cada pocillo. Posteriormente al acercarse a la concentración mínima inhibitoria se acotarán las concentraciones, partiendo de 0,5 mg/mL pero avanzando de 0,25 en 0,25 por cada pocillo hasta encontrar el valor de la MIC. También se realizará la inclusión de un control de DMSO, otro con Fluconazol y un último control positivo solo con agar

Se evaluará la eficacia de cada extracto por sí solo, utilizando como comparación el efecto del Fluconazol. Cada ensayo será evaluado mediante 2 parámetros de crecimiento, los que corroborarán si los extractos tienen el efecto antifúngico esperado:

Concentración mínima inhibitoria: define la menor concentración del extracto natural o del fluconazol que resulta en la inhibición (total o parcial, a determinar) de crecimiento visual en comparación con el crecimiento en los pocillos control que no han sido tratados.

Concentración mínima fungistática: define la menor concentración del extracto natural o del fluconazol que resulta en impedir o inhibir la actividad vital de los hongos en comparación con el crecimiento en los pocillos control que no han sido tratados a los 48 horas post siembra.

3. Método de macrodilución en caldo para levadura.

Se procederá de la siguiente forma:

- Preparación de la solución stock de agentes antimicrobianos (levadura): se prepararán soluciones stock de los agentes microbianos a 20X de la máxima concentración a utilizar, en este caso 5120 µg/ml (5,12 mg en 1 ml) en el solvente DMSO (El DMSO no debe exceder el 10% en el medio de cultivo, ya que sobre 100 µl/ml inhiben el crecimiento bacteriano).
- Preparación del inóculo: para preparar el inóculo, al menos 4 a 5 colonias aisladas de menos de 24 h son inoculadas en 4 - 5 ml de un medio líquido e incubado toda la noche . Con un espectrofotómetro se mide la turbidez (Trasmítancia) y se ajusta para lograr un valor de 0,5. Finalmente son diluidas de

modo que la concentración después de la inoculación en sus tubos de macrodilución sea de $1 - 5 \times 10^5$ UFC/ml de caldo (Es decir se debe agregar un inóculo a una concentración de $1 - 5 \times 10^6$).

- Preparación de diluciones agentes antimicrobianos: Las concentraciones a utilizar serán: 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 $\mu\text{g/ml}$, más un control con agua y uno con solvente. El volumen final de las soluciones será 1 ml (900 μl de medio con agente antimicrobiano, más 100 μl de inóculo). Preparar la primera dilución agregando 100 μl del agente antimicrobiano más 800 μl de caldo RPMI (completar 900 μl). Éste corresponderá al tubo 1. Colocar en el resto de los tubos 450 μl de caldo RPMI. Del tubo 1 (con el agente microbiano) tomar 450 μl y verter sobre el tubo 2. Mezclar. Del tubo 2 tomar 450 μl y agregar al tubo 3. Mezclar. Repetir el mismo procedimiento hasta el tubo 9, del cual también se toman 450 μl y se vierten en un tubo de desecho. Agregar 450 μl de caldo RPMI a todos los tubos (deben quedar todos con 900 μl). Preparar los controles agregando 50 μl del solvente o agua destilada estéril más 850 μl de caldo RPMI.

- Inoculación: agregar un inóculo de 100 μl a una concentración de 5×10^6 UFC x ml. Evitar salpicaduras. Se agrega liberando el inóculo suavemente bajo la superficie del medio de cultivo que contiene los agentes antimicrobianos.

- Incubación: incubar en un agitador rotatorio a 26°C y monitorear las poblaciones a los 0, 24, 48, 72 y 96 h contando las UFC en placas RPMI.

- Subcultivos: tomar 10 μl de cada concentración y se esparcen con asa de Drigalsky en medio RPMI e incuban a $26-28^\circ\text{C}$ por 24 a 48 h. Hacer 2 repeticiones por concentración.

Con este último protocolo, se evaluará la eficacia de cada extracto por sí solo y posteriormente se procederá a realizar la mezcla de extractos.

Materiales

- Botellas de vidrio con tapa Duran Schott® de 1000 y 2500 ml.
- Cámara de Neubauer doble W. Schreck Hofheim/TS®.

- Micropipetas Biopette®, modelos p2, p10, p20, p200 y p1000.
- Pipeta graduada HGB® de 10 ml.
- Placas de micropocillos para cultivo celular de 12 pocillos Orange Scientific®.
- Placas Petri plasticas de 60 y 100 mm Orange Scientific®.
- Probeta de 10 ml Duran®.
- Puntas para micropipetas desechables de 10, 100 y 1000 µl.
- Repipeteador Handy Step®.
- Tubos para microcentrífuga de 1,5 y 2 ml Eppendorf®.
- Hisopos de laboratorio
- Guantes latex Topglove
- Tubos de fondo conico polipropileno 50 ml

Equipos

- Balanza analítica modelo METTER Toledo
- Cámara Digital Samsung WB800F
- Congelador Consul®.
- Incubadora FOC 225E VELP® Scientifica .
- Lector de Microplacas Biotek®.
- Microscopio óptico invertido NENSMICROSCOPE®.
- Refrigerador modelo Altus 700 Mademsa®
- Vortex VELP® Scientifica.
- Autoclave JSAC60®
- Elmasonic S10

Reactivos

- Etanol 99% para análisis.
- Dimetil Sulfóxido (DMSO)

Medios de cultivo

Agar Sabouraud cloranfenicol:

- Casein enzymic hydrolysate 5.00 grs/lts
- Peptic digest of animal tissue 5.00 grs/lts
- Dextrose 40.00 grs/lts
- Chloromphenicol 0.05 grs/lts
- Agar 15.00 grs/lts
- Final pH (at 25 °C) 5,6 +/- 0,2

Se adicionará 26 grs. de medio deshidratado a 400 ml de agua destilada y se calentará hasta su completa disolución. Se esterilizará en autoclave a 121°C por 15 minutos. Se distribuirá en placas estériles y se almacenará refrigerado para su mejor conservación.

RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute):

Medio de cultivo líquido compuesto por una mezcla de sales, enriquecida con aminoácidos y otros componentes esenciales para el crecimiento celular.

Medio de cultivo amarillo:

- 1 Lt. De agua bidestilada estéril
- 4.50 grs de extracto de malta
- 2.50 grs de extracto de levadura YEAST
- 6.00 grs Tryptone

Se mezclará todo sobre un mechero bajo campana hasta su hervor y posteriormente se esterilizará en botellas.

Recolección de datos

Se utilizará como instrumento de recolección de datos una tabla especialmente diseñada para este experimento ya que facilitará la recopilación de resultados.

Las tablas hacen que los datos de una tabla o consulta sean más fáciles de comprender, ya que se presentan en diseños visualmente llamativo y simple que otros instrumentos.

RESULTADOS

1. Ensayo por difusión en agar:

En todas las repeticiones se observa un halo de inhibición en ambos extractos, encontrándose los dos a una concentración de 50 mg/mL. En cada espacio de sacabocado existían cantidades diferentes de extracto, siendo una de ellas 50 microlitros y la otra de 100 microlitros, siendo mayor el halo de inhibición en la cantidad de 100 microlitros; y funcionando correctamente el control (-) Fluconazol, donde no crece *Candida albicans*, y el control (+) DMSO donde sí crece. Los resultados se pueden expresar en el siguiente gráfico, el cual promedia todas las repeticiones:



Ensayos de inclusión:

Inclusión de extractos naturales de lavanda y arándano azul, por separado, en placas de micropocillos de 6 y 12. En las tablas presentadas a continuación, se expresan los resultados a las 48 horas de la siguiente forma:

- Se observa crecimiento de *Candida albicans*
- Se observa inhibición del crecimiento de *Candida albicans*
- No se realizó el experimento a ésta concentración.
- Ensayo contaminado, eliminado.

Tabla 1. Ensayo de inclusión para lavanda, utilizando DMSO como solvente para el extracto.

FECHA	EXT LAVANDA mg/ml	20 UL	40 UL	60 UL	70 UL	80 UL	90 UL	100 UL	120 UL	140 UL	160 ul	180 ul	200 ul
		0,5	1	1,5	1,75	2	2,25	2,5	3	3,5	4	4,5	5
24-abr-14	ENSAYO 1	Red	Red	Red	Black	Red	Black	Red	Black	Black	Black	Black	Black
14-may-15	ENSAYO 2	Black	Black	Black	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Green
29-may-15	ENSAYO 3	Black	Black	Black	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Green
05-jun-05	ENSAYO 4	Black	Black	Black	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Green
18-jun-15	ENSAYO 5	CONTAMINADO											

FECHA	EXT LAVANDA mg/ml	100 UL	105 UL	110 UL	115 UL	120 UL	125 UL	130 UL	135 UL	140 UL	145 UL	150 UL	155 UL	160 UL	165 UL	170 UL	175 UL	180 UL	185 UL	190 UL
		2,5	2,625	2,75	2,875	3	3,125	3,25	3,375	3,5	3,625	3,75	3,875	4	4,125	4,25	4,375	4,5	4,625	4,75
26-jun-15	ENSAYO 6	Black	Black	Black	Black	Black	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
01-jul-15	ENSAYO 7	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black
03-jul-15	ENSAYO 8	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
09-jul-15	ENSAYO 9	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
13-jul-15	ENSAYO 10	Black	Black	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
30-jul-15	ENSAYO 11	Black	Black	Black	Black	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
03-ago-15	ENSAYO 12	Black	Black	Black	Black	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
04-ago-15	ENSAYO 13	Black	Black	Black	Black	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
26-ago-15	ENSAYO 14	Black	Black	Black	Black	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
27-ago-15	ENSAYO 15	Black	Black	Black	Black	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
07-sep-15	ENSAYO 16	Black	Black	Black	Black	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red

Tabla 2. Ensayo de inclusión para arándano azul, utilizando DMSO como solvente para el extracto.

FECHA	EXT ARANDANO mg/ml	20 UL	40 UL	60 UL	70 UL	80 UL	90 UL	100 UL	120 UL	140 UL	160 ul	180 ul	200 ul
		0,5	1	1,5	1,75	2	2,25	2,5	3	3,5	4	4,5	5
24-abr-14	ENSAYO 1	Red	Red	Red	Black	Red	Black	Red	Black	Black	Black	Black	Black
14-may-15	ENSAYO 2	Black	Black	Black	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Green
29-may-15	ENSAYO 3	Black	Black	Black	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Green
05-jun-05	ENSAYO 4	Black	Black	Black	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
18-jun-15	ENSAYO 5	CONTAMINADO											

		140 UL	145 UL	150 UL	155 UL	160 UL	165 UL	170 UL	175 UL	180 UL	185 UL	190 UL	195 UL	200 UL
FECHA	EXTARANDANO mg/ml	3,5	3,625	3,75	3,875	4	4,125	4,25	4,375	4,5	4,625	4,75	4,875	5
26-jun-15	ENSAYO 6													
01-jul-15	ENSAYO 7													
03-jul-15	ENSAYO 8													
09-jul-15	ENSAYO 9													
13-jul-15	ENSAYO 10													
30-jul-15	ENSAYO 11													
03-ago-15	ENSAYO 12													
04-ago-15	ENSAYO 13													
26-ago-15	ENSAYO 14													
27-ago-15	ENSAYO 15													
01-sep-15	ENSAYO 16													
07-sep-15	ENSAYO 17													

Debido a que se notó una influencia del solvente DMSO sobre el crecimiento de *Candida albicans*, se decidió utilizar un nuevo solvente para los extractos.

Tabla 3. Ensayo de inclusión de control para solvente DMSO y solvente ETANOL.

DMSO:

FECHA	100 µL	110 µL	120 µL	130 µL	140 µL	150 µL	160 µL	170 µL	180 µL	190 µL	200 µL
23-jul											
30-jul											
03-ago											
01-sep											
07-sep											

ETANOL:

FECHA	100 µL	110 µL	120 µL	130 µL	140 µL	150 µL	160 µL	170 µL	180 µL	190 µL	200 µL	210 µL
26-ago												
01-sep												
05-sep												
08-sep												
10-sep												

Tabla 4. Ensayo de inclusión para lavanda, utilizando ETANOL como solvente para el extracto.

		120 UL	125 UL	130 UL	135 UL	140 UL	145 UL	150 UL	155 UL	160 UL
fecha	LAV + ETANOL mg/ml	3	3,125	3,25	3,375	3,5	3,625	3,75	3,875	4
26/08/2015	ENSAYO 1									
01-sep-15	ENSAYO 2	CONTAMINADO								
07-sep-15	ENSAYO 3									
08-sep-15	ENSAYO 4									
14-sep-15	ENSAYO 5									

Tabla 5. Ensayo de inclusión para arándano azul, utilizando ETANOL como solvente para el extracto.

		140 UL	145 UL	150 UL	155 UL	160 UL	165 UL	170 UL	175 UL	180 UL	185 UL	190 UL
fecha	ARA + ETANOL mg/ml	3,5	3,625	3,75	3,875	4	4,125	4,25	4,375	4,5	4,625	4,75
26/08/2015	ENSAYO 1											
01/09/2015	ENSAYO 2											
07/09/2015	ENSAYO 3											
14/09/2015	ENSAYO 4											

Imagen 1. Ensayos de 48 hrs con Lavanda 26 Agosto 2015.

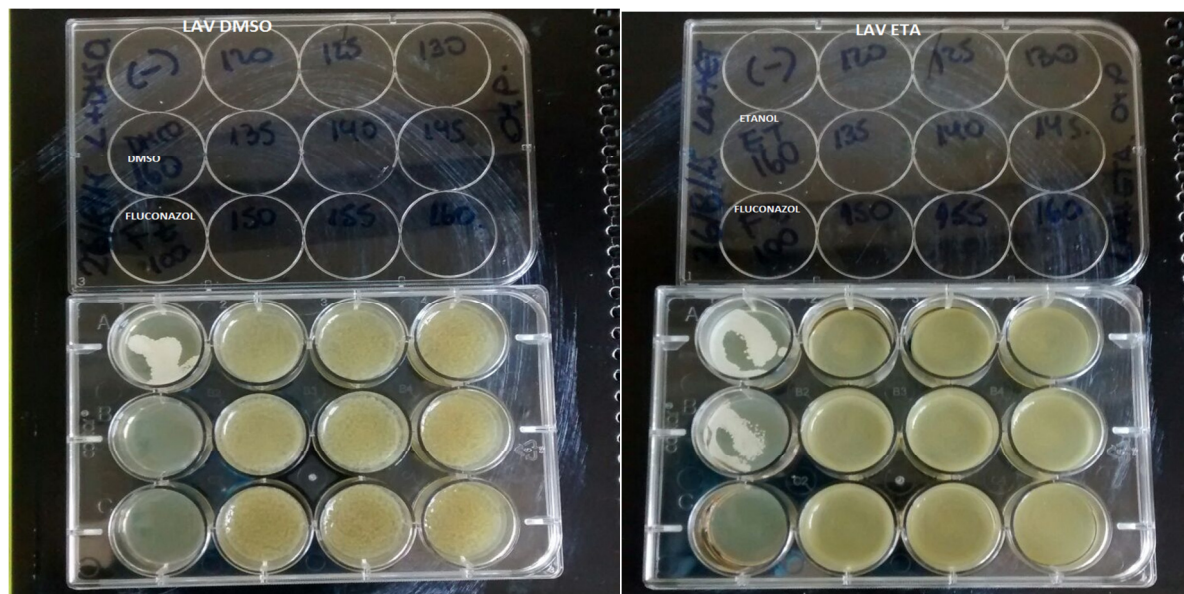
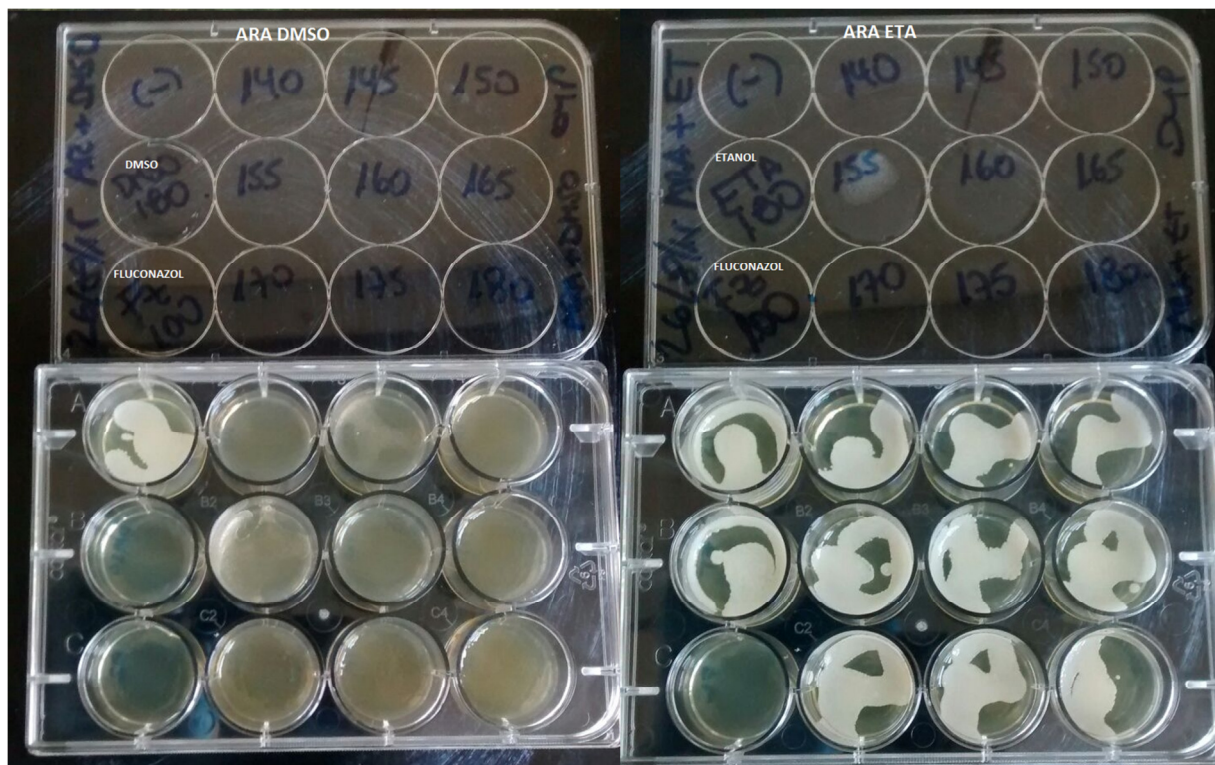


Imagen 2. Ensayos de 48 hrs con Arándano 26 Agosto 2015.



2. Método de macrodilución en caldo para levadura.

Los siguientes resultados se expresarán en tablas, donde se registra conteo de unidades formadoras de colonias (UFC).

12 de Agosto de 2015. Extractos a concentración de 20 mg/ml

48 horas	96 horas
Fluconazol: 104x4 = 416 UFC	Fluconazol: 104x4 = 416 UFC
1A: 942x4 = 3768 colonias	1A: 942x4 = 3768 colonias
Resto: Sin inhibición.	Resto: Sin inhibición

(SIN GRÁFICO)

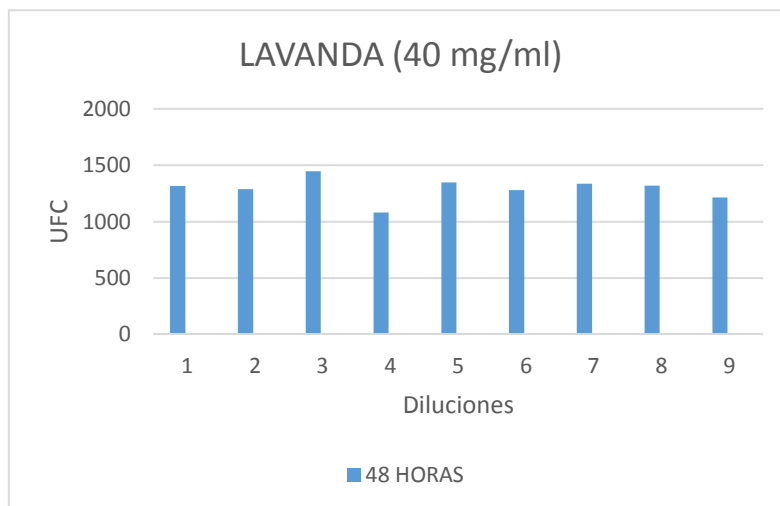
20 de Agosto de 2015. Extractos a concentración de 40 mg/ml.

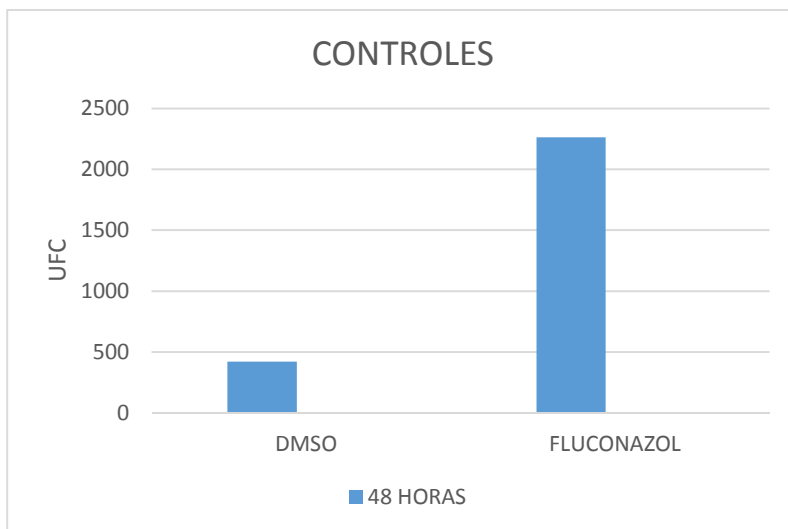
48 horas:

Arándano	Lavanda
1: 353x4 = 1412 UFC	1: 329x4 = 1316 UFC
2: 290x4 = 1160 UFC	2: 322x4 = 1288 UFC
3: 274x4 = 1096 UFC	3: 362x4 = 1448 UFC
4: 371x4 = 1484 UFC	4: 541x2 = 1082 UFC
5: 328x4 = 1312 UFC	5: 674x2 = 1348 UFC
6: 326x4 = 1304 UFC	6: 320x4 = 1280 UFC
7: 360x4 = 1440 UFC	7: 668x2 = 1336 UFC
8: 230x4 = 920 UFC	8: 660x2 = 1320 UFC
9: 232x4 = 928 UFC	9: 608x2 = 1216UFC

DMSO: 105x4 = 420 UFC
Fluconazol: 566x4 = 2264 UFC

96 horas: Sin inhibición.





21 de Agosto de 2015. Extractos a concentración de 40 mg/ml. (Cultivo over night)

48 horas	96 horas
Fluconazol: 216 colonias	Fluconazol: 252 colonias
1L: 200 colonias	1L: 264 colonias
Resto: Sin inhibición.	Resto: Sin inhibición.

(SIN GRÁFICO)

31 de Agosto de 2015. Extractos a concentración de 50 mg/ml.

48 horas:

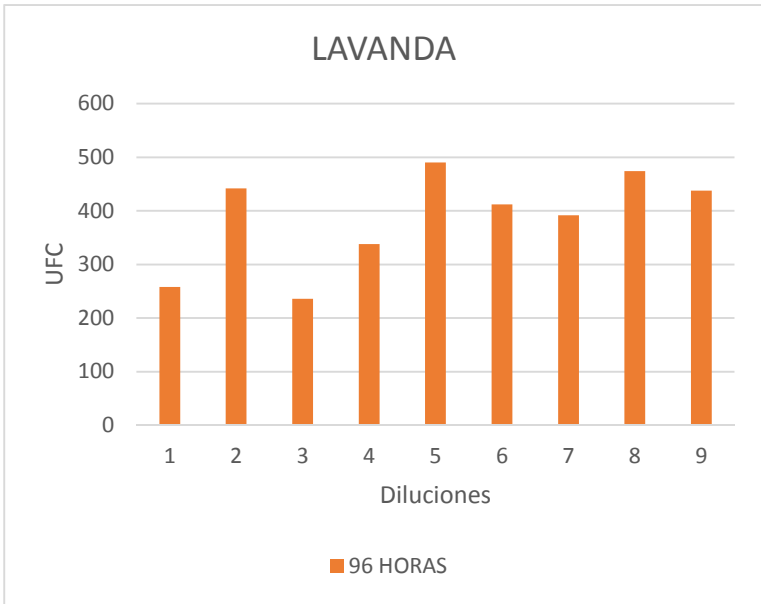
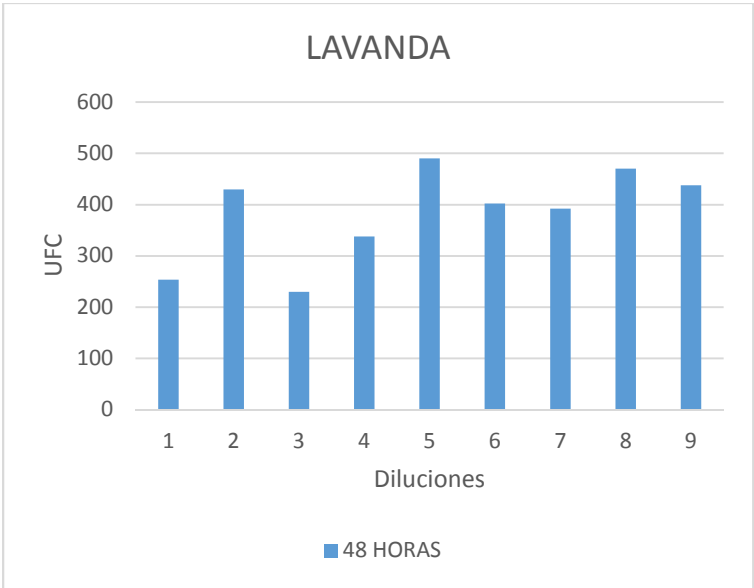
Arándano	Lavanda
1: 275x2 = 550 UFC	1: 127x2 = 254 UFC
2: 152x2 = 304 UFC	2: 215x2 = 430 UFC
3: 190x2 = 380 UFC	3: 115x2 = 230 UFC
4: 164x2 = 328 UFC	4: 169x2 = 338 UFC
5: 122x2 = 244 UFC	5: 245x2 = 490 UFC
6: 216x2 = 432 UFC	6: 201x2 = 402 UFC
7: 195x2 = 390 UFC	7: 196x2 = 392 UFC
8: 80x2 = 160 UFC	8: 235x2 = 470 UFC
9: 146x2 = 292 UFC	9: 219x2 = 438 UFC

DMSO: 60x2 = 120 UFC
Fluconazol: 25x2 = 50 UFC

96 horas:

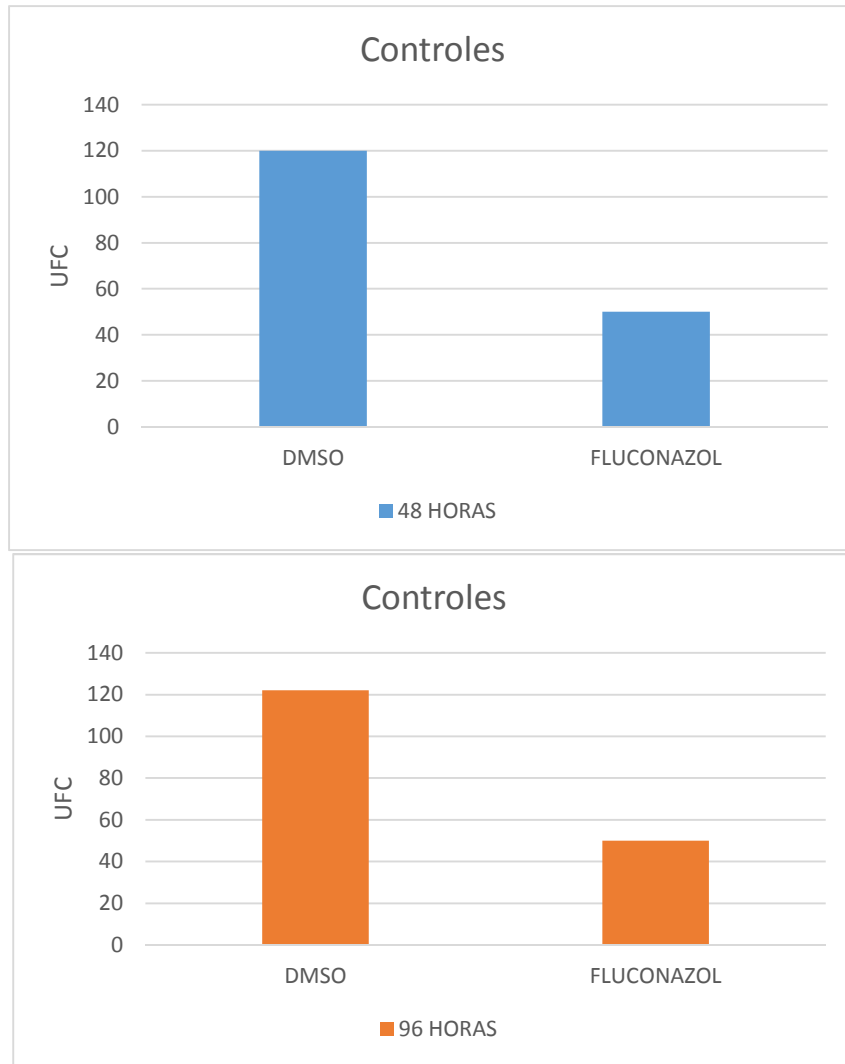
Arándano	Lavanda
1: 275x2 = 550 UFC	1: 129x2 = 258 UFC
2: 152x2 = 304 UFC	2: 221x2 = 442 UFC
3: 220x2 = 440 UFC	3: 118x2 = 236 UFC
4: 172x2 = 344 UFC	4: 169x2 = 338 UFC
5: 130x2 = 260 UFC	5: 245x2 = 490 UFC
6: 221x2 = 442 UFC	6: 206x2 = 412 UFC
7: 201x2 = 402 UFC	7: 196x2 = 392 UFC
8: 86x2 = 172 UFC	8: 237x2 = 474 UFC
9: 156x2 = 312 UFC	9: 219x2 = 438 UFC

DMSO: 61x2 = 122
Fluconazol: 25x2 = 50





Se puede apreciar, que no existe una diferencia significativa entre la gráfica de 24 hrs con la de 48 hrs.



01 de Septiembre de 2015. Extractos a concentración de 50 mg/ml. (Cultivo over night)

48 horas	96 horas
Fluconazol: 1 colonia	Fluconazol: 1 colonia
DMSO: 25 colonias	DMSO:
1L: 1 colonia	1L:2
Resto: Sin inhibición.	Resto: Sin inhibición.

(SIN GRÁFICO)

07 de Septiembre de 2015. Extractos a concentración de 60 mg/ml.

48 horas	96 horas
Sin inhibición.	Sin inhibición.

(SIN GRÁFICO)

08 de Septiembre de 2015. Extractos a concentración de 60 mg/ml. (Cultivo over night)

48 horas	96 horas
Fluconazol: 0 colonias	Fluconazol: 3 colonias
1L: 7 colonias	1L: 9 colonias
Resto: Sin inhibición.	Resto: Sin inhibición.

(SIN GRÁFICO)

Imagen 3. Ensayos con Lavanda (1) a las 48 hrs. 7 Septiembre y Overnight 8 Septiembre 2015.

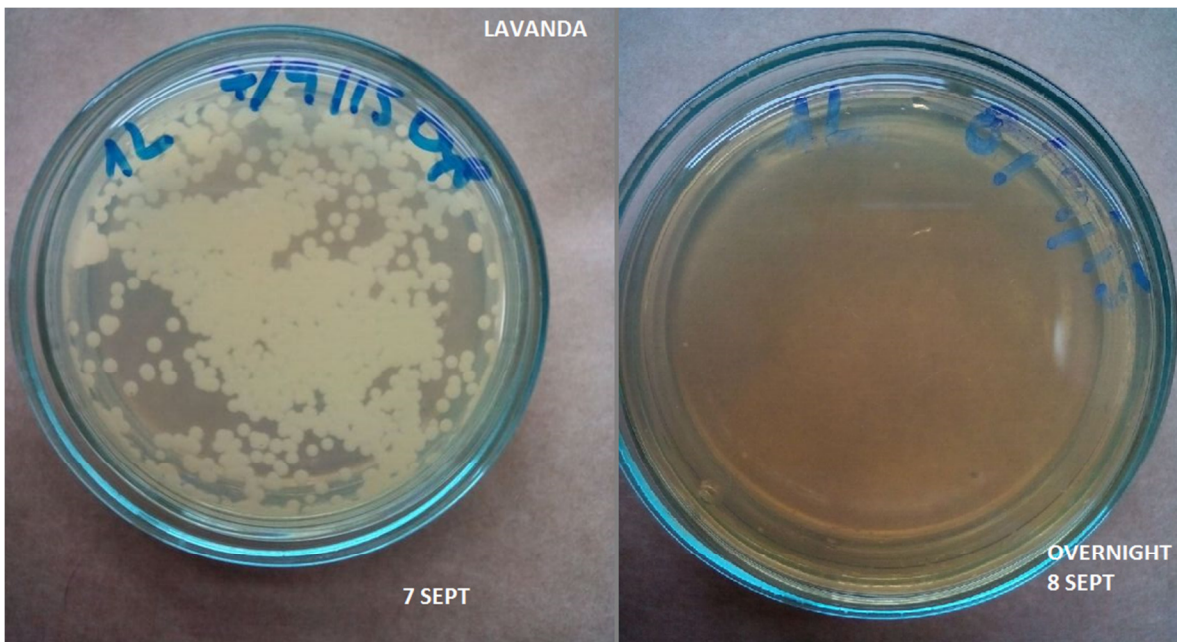


Imagen 4. Ensayos con Lavanda (2) a las 48 hrs. 7 Septiembre y Overnight 8 Septiembre 2015.

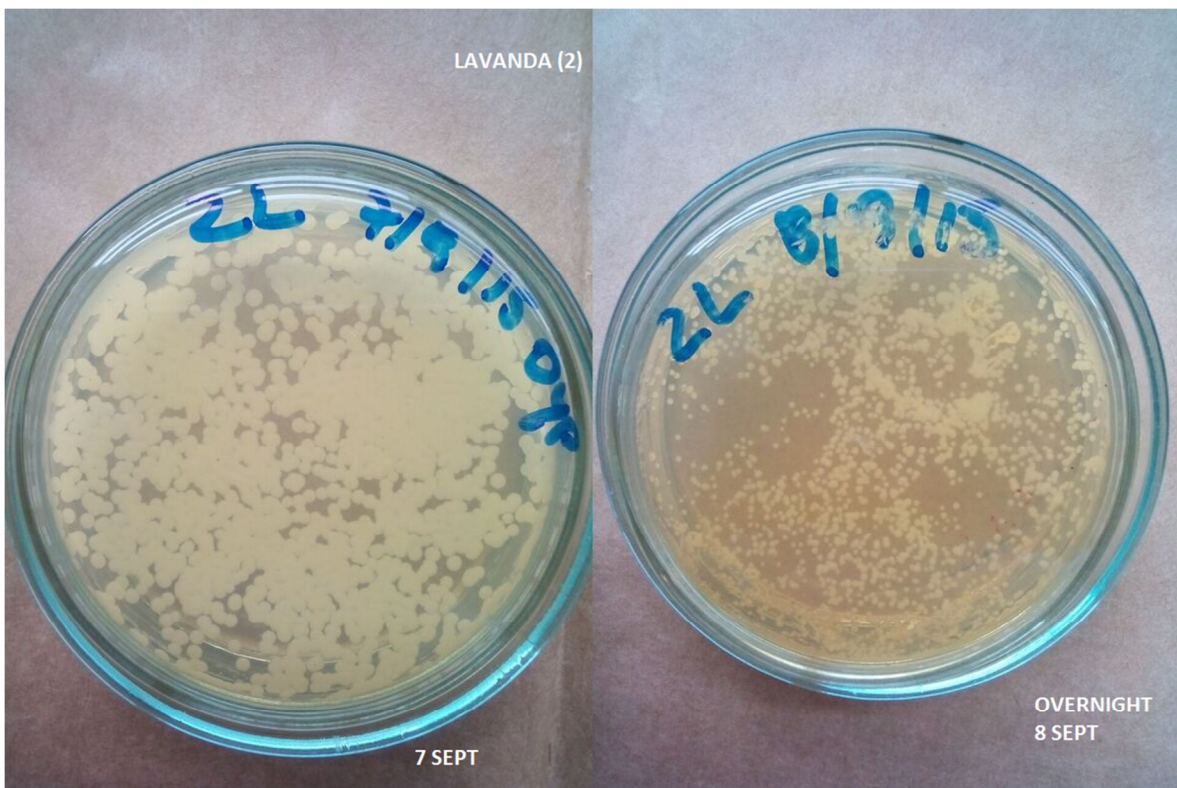


Imagen 5. Ensayos con Lavanda (3) a las 48 hrs. 7 Septiembre y Overnight 8 Septiembre 2015.

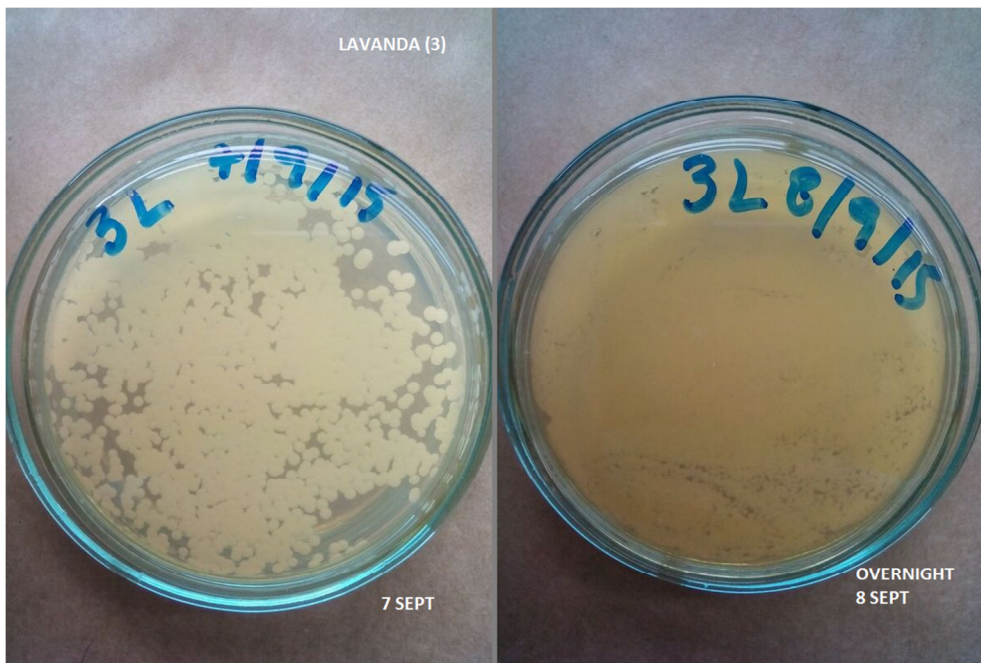


Imagen 6. Ensayos con Arándano (1) a las 48 hrs. 7 Septiembre y Overnight 8 Septiembre 2015.

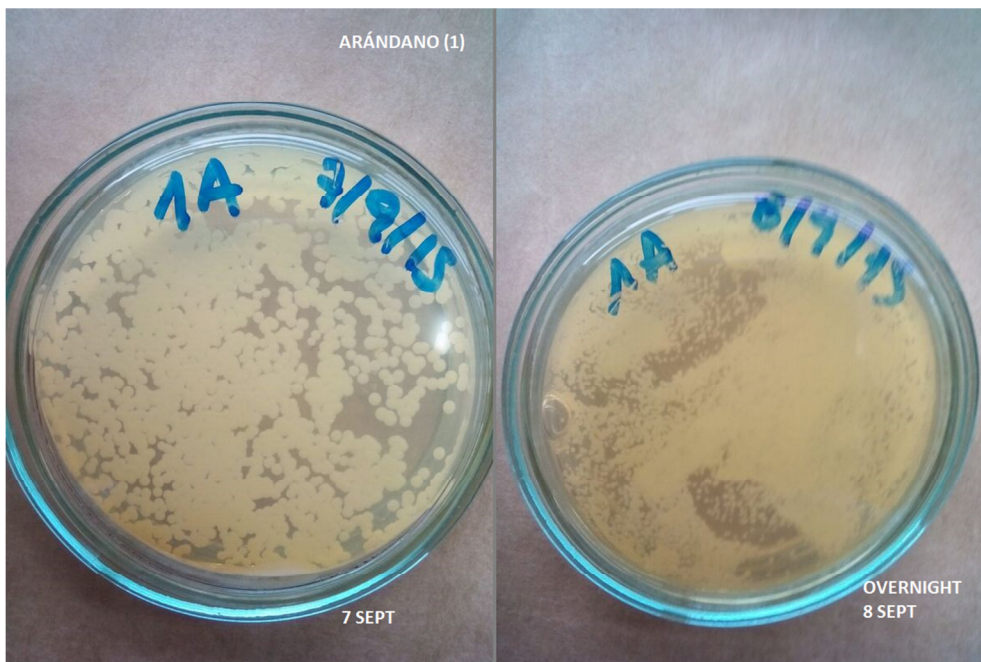


Imagen 7. Ensayos con Arándano (2) a las 48 hrs. 7 Septiembre y Overnight 8 Septiembre 2015.

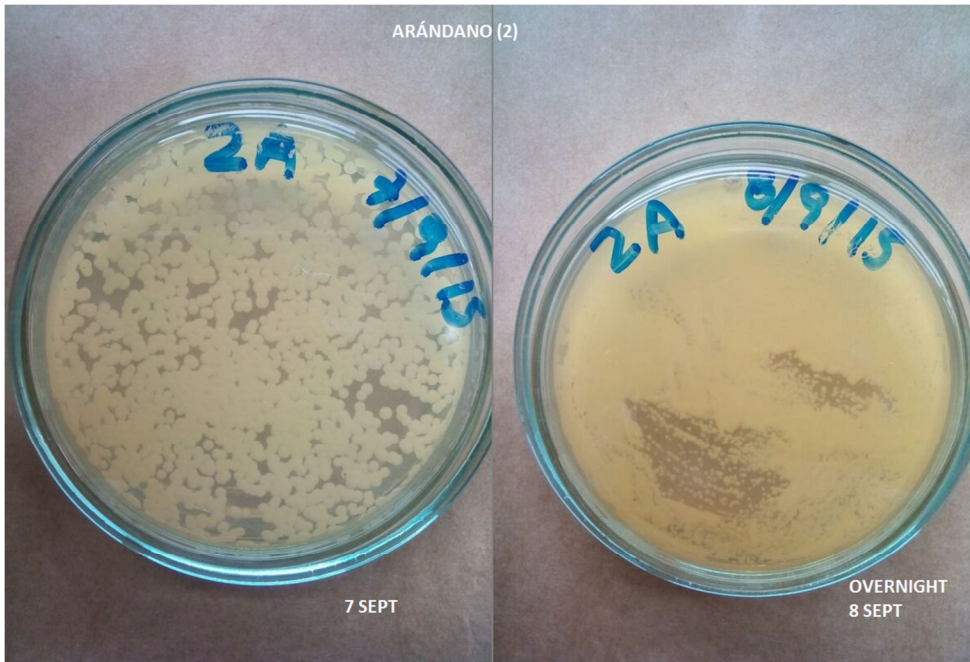
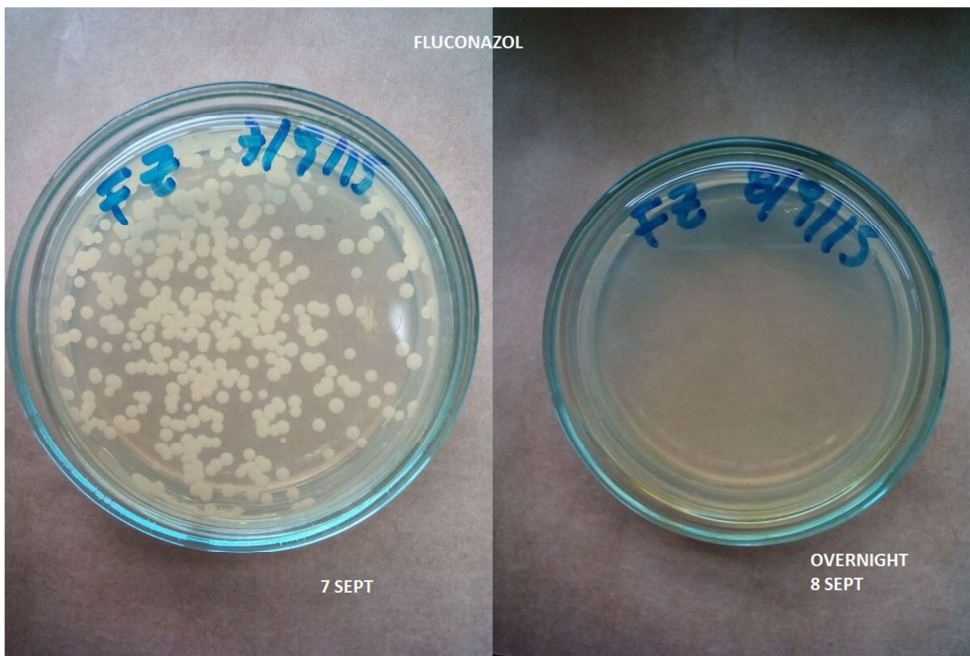


Imagen 8. Ensayos con Fluconazol a las 48 hrs. 7 Septiembre y Overnight 8 Septiembre 2015.



DISCUSIÓN.

En la actualidad existen diversas investigaciones que buscan innovar en los tratamientos de diferentes patologías de la forma más natural posible, utilizando la materia prima que nos brinda la naturaleza. Si bien existen muchos tratamientos farmacológicos efectivos, dichos fármacos provocan a largo plazo una resistencia y tolerancia por parte de los microorganismos.

Existen diversos ensayos que se realizan en la búsqueda de nuevos tratamientos, en los cuales se utilizan elementos naturales ricos en flavonoides y antioxidantes y debido a esto se escogieron los extractos naturales de Lavanda y Arándano azul, con los cuales se realizaron ensayos que dejaron en evidencia diferentes hechos.

Durante todo el proceso se realizaron de forma paralela ensayos de inclusión en los cuales se utilizaron extractos de Lavanda y Arándano azul. En primer lugar, después de la ejecución de diferentes experimentos y de observar visibles alteraciones en el crecimiento de *Candida albicans* se pudo demostrar que el DMSO como solvente altera el comportamiento de esta levadura, si es utilizado en concentraciones que superen el 7% en el medio donde se utiliza, por tanto después de experimentar con un solvente diferente como el etanol y efectuar numerosos controles en donde se comparó el efecto de ambos solventes a iguales concentraciones sobre *Candida albicans*, se llegó a la conclusión de que utilizar etanol no alteraría las propiedades del hongo ni de los extractos naturales.

El efecto del extracto natural de Lavanda con DMSO como solvente a una concentración determinada presenta efecto antifúngico. En los 16 ensayos de inclusión realizados los resultados fueron repetitivos y concluyentes, pues la Lavanda inhibió el crecimiento de *Candida albicans* entre concentraciones que varían desde 3 mg/mL a 3,625 mg/mL, pudiendo calcular con estos datos una concentración promedio de inhibición de 3.035 mg/ml, la cual denominaremos Concentración Mínima Inhibitoria (MIC). Al momento de cambiar el solvente a

etanol, el crecimiento de la levadura se mantuvo en márgenes similares al del ensayo realizado con DMSO y después de varias repeticiones se llegó a una MIC de 3.281 mg/ml en etanol. La MIC varió de forma mínima entre un solvente y otro por lo que se infiere que el DMSO en este caso no tuvo gran incidencia en los resultados.

En el estudio de T. Moon, J.M. Wilkinson , H.M.A. Cavanagh, 2006 ⁷² , refieren que microorganismos entre los cuales se encuentran bacterias y hongos como *Candida albicans*, fueron susceptibles al aceite esencial de Lavanda, lo cual confirma también el estudio de M. Zuzarte et al., 2012 ⁷³ , en el que se comparan los efectos de aceites esenciales de Lavanda con fármacos antimicóticos, los cuales tienen resultados positivos ya que inhiben el crecimiento de ésta.. En el estudio de Vishnu Agarwal, Priyanka Lal, Vikas Pruthi, 2010 ⁷⁴ , se demostró el potencial antifúngico que presentan aceites de plantas seleccionadas entre los cuales se encuentran el Eucalipto y Menta con mayor efectividad y la Lavanda que dentro del mismo estudio se demostró que posee potencial inhibitorio pero en un rango menor. A diferencia de la presente investigación y los estudios recién mencionados, estos presentan comparaciones de múltiples plantas y géneros de Lavanda, comparándolos entre ellos pudiendo determinar cuál es más efectivo que otro, en cambio en esta investigación sólo se determina si la Lavanda presenta o no dicho efecto y a qué concentración.

A diferencia del extracto de Lavanda con DMSO, en el extracto de Arándano azul este solvente sí tuvo gran significancia en los resultados, ya que en la mayoría de los ensayos realizados se inhibía el crecimiento del hongo en casi todas las concentraciones de extracto en el medio de cultivo, las cuales coincidieron con las concentraciones de los controles de DMSO realizados para pesquisar la influencia de este solvente sobre la levadura. Dentro de los resultados obtenidos, se pudo llegar a un valor promedio de MIC de 3.865 mg/ml, sin ser este un valor confiable debido a que los resultados de los ensayos no fueron concluyentes. A diferencia de Lavanda, aquí sí existió una variación mayor al

utilizar como solvente etanol, obteniendo un valor promedio de MIC de 4.468 mg/ml, demostrando de esta forma el bajo poder antifúngico de este extracto en comparación con la Lavanda.

A pesar del Arándano azul poseer flavonoides en su composición, que favorecen la actividad antibacterial y antioxidante como lo refieren en el estudio de Mehnaz Pervin, Md Abul Hasnat, Beong Ou Lim, 2013 ⁷⁵, éste no actúa como un efectivo antimicótico según la presente investigación. Sin embargo el estudio Hallie S. Rane et al., 2014 ⁷⁶, indica que elevadas concentraciones de flavonoides presentes en el Arándano azul podrían reducir la proliferación de *Candida albicans*. La persistencia en este crecimiento puede deberse a los azúcares presentes en este fruto que puedan servir como medio nutritivo para el crecimiento de la levadura.

Los hongos en general se ven favorecidos en su crecimiento en medios húmedos, debido a esto se puede deducir que el agua destilada en combinación con proteínas, aminoácidos y factores de crecimiento, crean un caldo de cultivo óptimo que beneficia el crecimiento de *Candida albicans* y disminuye el efecto que los extractos naturales o el Fluconazol puedan tener sobre él. En este ensayo no influyó el DMSO como solvente, debido a que se encontraba en bajos porcentajes de concentración en el medio.

Para el ensayo de microdilución en caldo para levadura, se utilizaron concentraciones para ambos extractos que fueron desde los 20 mg/ml llegando hasta los 60 mg/ml, siendo este último valor donde se observó alguna actividad antifúngica.

En el caso de la Lavanda, la Concentración Mínima Fungicida fue de 60 mg/ml y la Concentración Mínima Inhibitoria de 30 mg/ml. La levadura en medio líquido expuesta a una alta concentración de extracto de Lavanda demuestra resultados positivos en cuanto a la inhibición, pero sólo después de cultivarla 24

hrs a una temperatura de 36,5°C (cultivo over night). En cambio, en el Arándano Azul, siempre se observó crecimiento, siendo en la mayoría de los casos tipo alfombra, en consecuencia no se pudo calcular ningún valor referencial de inhibición.

Se puede deducir, gracias a los resultados arrojados por los ensayos, que la Lavanda tiene un efecto antifúngico sobre el crecimiento de *Candida albicans*, ya que se pudo cuantificar el valor de la Concentración Mínima Fungicida e Inhibitoria, de forma segura en medio sólido, no así en medio líquido donde se vió alterado el crecimiento. Mientras que el Arándano azul, si bien puede tener actividad antioxidante y antimicrobiana, no reacciona de igual forma ante hongos tipo levadura como *Candida albicans* , ni en medio líquido ni en medio sólido.

CONCLUSIÓN.

Según lo que se buscaba en base a la hipótesis, se obtuvieron resultados positivos, ya que ambos extractos inhibieron el crecimiento de la *Candida albicans*, pero con una diferencia notoria en el valor de Concentración Mínima Fungicida e Inhibitoria, esto asociado a las propiedades particulares de cada extracto.

En base a lo investigado, se demuestra que la lavanda tiene efecto fungicida, al compararlo con los resultados obtenidos en los ensayos clínicos. En cambio, en el caso del Arándano Azul, por condiciones propias e interacción con los solventes utilizados, no se logró una concentración efectiva para lograr un efecto fungicida confiable, el cual estuvo presente pero su efecto fue menor en comparación con la Lavanda. Esto puede ser atribuible además, a que en la investigación se utilizó como referente el Arándano Rojo, el cual posee características fitoquímicas similares al Arándano Azul, y que por restricciones geográficas y climáticas no se pudo conseguir, por lo que se decidió realizar el estudio con Arándano Azul, abundante en territorio chileno.

Gracias a la investigación realizada y los resultados obtenidos, se demuestra que es posible la investigación y posterior desarrollo de nuevos tratamientos en base a extractos naturales, alternativos al tratamiento estándar que se entrega en Chile.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Amézquita Landeros JA, Luis Jiménez Corona JL. Capítulo 8: Infección en cirugía. Introducción a la cirugía. Editorial McGraw-Hill. 2001: pp. 119–134
2. Gispert C. Hongos, Musgos y Helechos. (2006). En Progresiva Enciclopedia Interactiva de Apoyo al Estudio: Tomo II (págs. 335-336). Barcelona: OCEANO.
3. AIDSMEDES. Candidiasis (candidiasis oral; candidiasis vaginal; candidiasis esofágica). 2009. Disponible en: http://www.aidsmeds.com/articles/candidiasis_6837.shtml.
4. Los Hongos. Aula Siglo XXI: Ciencia de la naturaleza y el medio ambiente. 2001; 151-154. Madrid: CULTURAL, S.A.
5. Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. Candidiasis. Microbiología médica. 25ª ed. México (df). Editorial McGraw Hill; 2011: 627-662.
6. Tapia C. Candidiasis vulvovaginal. Revista Chilena de Infectología. 2008, volumen 25, N° 4: 312. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182008000400016
7. MINSAL. Manual de Normas de Manejo y Tratamiento de Infecciones de Transmisión Sexual (ITS), 2008. Disponible en: <http://www.minsal.gob.cl/portal/url/item/85381414c56411a9e04001011e015920.pdf>
8. Thompson L. Panel: Nuevas alternativas en el armamento anti infeccioso que el clínico debe conocer. Revista chilena de Infectología, v.19 supl.1, 2002. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182002019100003
9. Jabra-Rizk MA, Falkler WA y Meiller TF. Biofilms Micóticos y Resistencia a Drogas. Emerging Infectious Diseases. 2004. 10(1):14-19. Disponible en: <http://www.bago.com/BagoArg/Biblio/infectoweb279.htm>
10. Ramage G, VandeWalle K, Wickes BL, López-Ribot JL. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. Revista Iberoamericana de

Micología. 2001; 18: 163-170. Disponible en:
<http://www.reviberoammicol.com/2001-18/163170.pdf>

11. Vergara Lazen MA. Caracterización del aceite esencial de lavanda (*Lavandula angustifolia* Mill.) por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa, en distintas localidades de la Décima Región de Chile. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela De Agronomía. 2015: 8-12. Disponible en:
<http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2005/fav494c/doc/fav494c.pdf>
12. Pino Pinto CM. Descripción del desarrollo vegetativo y de las características físicas y químicas de los frutos de cuatro clones de arándano alto (*Vaccinium corymbosum* L.). Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela de Agronomía. 2007: 15-17. Disponible en:
<http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2007/fap657d/sources/fap657d.pdf>

Marco teórico

1. Gispert C. *Hongos, Musgos y Helechos*. (2006). En Progresiva Enciclopedia Interactiva de Apoyo al Estudio: Tomo II (págs. 335-336). Barcelona: OCEANO.
2. *Los Hongos*. Aula Siglo XXI: Ciencia de la naturaleza y el medio ambiente. 2001; 151-154. Madrid: CULTURAL, S.A.
3. Ryan K J, Ray C G, Sherris J C. *Sherris medical microbiology: an introduction to infectious diseases*. McGraw-Hill, 2004 - 979 páginas.
4. *Candidiosis Vaginal*. MedlinePlus. 2013. Disponible en:
<https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/001511.htm>.
5. *Candidiasis*. DMedicina. 2015. Disponible en:
<http://www.dmedicina.com/enfermedades/dermatologicas/candidiasis.html>.
6. Saavedra V. *Tratamiento natural de la Candidiasis Vaginal Crónica*. Ginecología Natural. Medicina Integral. S.f. Disponible en:
<http://www.medicinaintegral.es/#!candidiasis-vaginal/c1xm3>.
7. Neira Miranda J. *Infecciones Vulvovaginales*. Escuela de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile. Disponible en:

<http://escuela.med.puc.cl/paginas/departamentos/obstetricia/clases/infvag.html>.

8. Gori JR, Lorusso Ginecología de Gori2da ed. Buenos Aires (Argentina): Editorial El Ateneo; 2001.
9. Sloane E. *Chapter 2: Reproductive Anatomy: Vagina*. Biology of Women. 2002. 4 Ed. 35-45.
10. Nessler BR, Kip EK, Hillier LS, et al. *A cluster analysis of bacterial vaginosis associated microflora and pelvic inflammatory disease*. Am J Epidemiol. 2005;162:585-90.
11. Dicson EM, Riggio MP, Macpherson L. *A novel species-specific PCR assay for identifying Lactobacillus fermentum*. J Med Microbiol. 2005;54:299-303.
12. Nigel W, Rosentstein I. *Characterization and selection of a Lactobacillus species to recolonize the vagina of women with recurrent bacterial vaginosis*. J Med Microbiol. 2000; 49: 543-52.
13. Larsen B, Monif G. *Understanding the bacterial flora of the female genital tract*. Clin Infect dis. 2001; 32: 69-77.
14. Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. *Candidiasis*. Microbiología médica. 25^a ed. México (df). Editorial McGraw Hill; 2011: 627-662.
15. OMS. *Prevención de las infecciones nosocomiales: guía práctica*. 2003. 2^o Ed. 51. Disponible en:
<http://www.who.int/csr/resources/publications/drugresist/en/PISpanish3.pdf?ua=1>.
16. Butler KM, Baker CJ *Candida: an increasingly important pathogen in the nursery*. Pediatr Clin N Amer 1988;35: 543- 563.
17. Baley JE, Kliegman RM, Fanaroff AA. *Disseminated fungal infections in very low birth weight infants (<1500 grams)* Pediatrics 1984;73:2138- 2143.
18. Bustos R, Copaja D, Bancalari A. *Candidiasis congénita en un recién nacido de muy bajo peso*. Revista chilena de pediatría. (2003); **74 (2); 193-196**.
19. *Candidiasis Vaginal*. Clinica DAM. Madrid, España. 2009. Disponible en:
<https://www.clinicadam.com/salud/5/001511.html>.

20. *Candidiasis (candidiasis oral; candidiasis vaginal; candidiasis esofágica)*. AIDS MEDS. 2009. Disponible en:
http://www.aidsmeds.com/articles/candidiasis_6837.shtml.
21. Buscemi I, Arechavala A, Negroni R. *Estudio de las vulvovaginitis agudas en pacientes adultas, sexualmente activas, con especial referencia a la candidiasis, en el hospital de infecciosas Francisco J. Muñoz*. Rev. Iberoam Micol(serial online) 2004. (referido en 2008 ene). Disponible en:
<http://www.reviberoammicol.com/2004-21/177181.pdf>
22. Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR) 1993; vol. 42, no rr-14, Disponible en: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00023296.htm>.
23. Manual de Normas de Manejo y Tratamiento de Infecciones de Transmisión Sexual (ITS), 2008. Disponible en:
<http://www.minsal.gob.cl/portal/url/item/85381414c56411a9e04001011e015920.pdf>.
24. Moosa MY, Sobel J D, Elhalis H, Du W, Akins R A. *Fungicidal activity of fluconazole against Candida albicans in a synthetic vagina-simulative médium*. Antimicrob Agents Chemother. 2004. 48(1): 161–167.
25. Sánchez Carazo JL, Obón Losada L, Pont Sanjuan V. *Tratamiento actual de las micosis superficiales*. Rev Iberoam Micol, 1999; 16: S26-S30. <http://www.reviberoammicol.com/1999-16/S26S30.pdf>.
26. Cowen L E, Nantel A, Whiteway M S, Thomas D Y, Tessier D C, Kohn L M, Anderson J B. *Population genomics of drug resistance in Candida albicans*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002; 99(14): 9284–9289.
27. Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouér SA, Arthington-Skaggs B, Da Matta DA et al. for the Brazilian Network Candidemia Study. *Epidemiology of Candidemia in Brazil: a Nationwide Sentinel Surveillance of Candidemia in Eleven Medical Centers*. J Clin Microbiol. 2006. 44: 2816 – 2823
28. Sobel JD. *Candida Vulvovaginitis*. Sem Dermatol, 1996; 15: p.17-28.
29. Sabel J, Wiesenfeld H, Martens M, Danna P, Hooton T, Rampallo A, et al. *Maintenance Fluconazole Thrapy for Recurrent Vulvovaginal Candidiasis*. N

Engl J Med (serial online) 2004 (Referido en 2008 ene 18); 351(6) (8 páginas en pantalla). Disponible en:

<http://content.nejm.org/cgi/content/short/351/9/876>

30. L.A. Betancur Galvis A.C. Mesa Arango, J.G. Bueno Sánchez. *Productos naturales con actividad antimicótica*. Rev Esp Quimioterap, Diciembre 2004; Vol.17 (N° 4): p.325-331.
31. Khodavandi A, Alizadeh F, Harmal NS, Sidik SM, Othman F, Sekawi Z, Chong PP. *Expression analysis of SIR2 and SAPs1-4 gene expression in Candida albicans treated with allicin compared to fluconazole*. Trop Biomed. 2011 Dec;28 vol.3. p.589-98.
32. Khodavandi A, Harmal NS, Alizadeh F, Scully OJ, et al. *Comparison between allicin and fluconazole in Candida albicans biofilm inhibition and in suppression of HWP1 gene expression*. Phytomedicine. 2011 Dec 15;19(1). p.56-63.
33. P.J. Houghton, P.J. Hylands, A.Y. Mensah, A. Hensel, A.M. Deters. *Journal of Ethnopharmacology 100 (2005) 100-107: In vitro tests and ethnopharmacological investigations: Wound healing as an example*.
34. Peter J Houghton, Abraham Y. Mensah. *Pharmacognosy Research Laboratories, Department of Pharmacy. Biologically – Active Compounds from Buddleja Species*.
35. Pervin M, Hasnat Md, Ou Lim B. *Antibacterial and antioxidant activities of Vaccinium corymbosum L. leaf extract*. Asian Pacific Journal of Topical Disease (serial online) 2013; 3: 444-453. Disponible en:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2222180813600997>
36. Arándano. Medline Plus. 2014. Disponible en:
<https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/druginfo/natural/1013.html>.
37. *Vaccinium Corymbosum*. (s.f.). Natural Medicines Comprehensive Database. Disponible en:
[http://naturaldatabase.therapeuticresearch.com/\(X\(1\)S\(xphaor45optv4evfi1xnio45\)\)/nd/Search.aspx?cs=&s=ND&pt=9&Product=Vaccinium+corymbosum&btnSearch.x=12&btnSearch.y=11&AspxAutoDetectCookieSupport=1](http://naturaldatabase.therapeuticresearch.com/(X(1)S(xphaor45optv4evfi1xnio45))/nd/Search.aspx?cs=&s=ND&pt=9&Product=Vaccinium+corymbosum&btnSearch.x=12&btnSearch.y=11&AspxAutoDetectCookieSupport=1)

38. Silva S, Costa E.M., Pereira M.F., Costa M.R., Pintado M.E. *evaluation of the antimicrobial activity of aqueous extracts from dry Vaccinium corymbosum extracts upon food microorganism*. Food Control (version online) 2013; 34: 645-650. Disponible en:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713513002958>.
39. Zhao J, Xu F, Huang H, Ji T, Li C, Tan W, Chen Y, Ma L. *Evaluation on bioactivities of total flavonoids from Lavandula angustifolia*. Pakistan Journal Pharmaceutical Sciences. (2015); 4; 1245-1251. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26142514>.
40. Zuzarte M, Gonçalves MJ, Cavaleiro C, Canhoto J, Vale-Silva L, Silva MJ, Pinto E, Salgueiro L. *Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of Lavandula viridis L'Her*. Journal of Medical Microbiology (2011); 60; 612-8. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21321363>.
41. R. Giordani, P. Regli, J. Kaloustian, C. Mikail, L. Abou, H. Portugal. Antifungal effect of various essential oils against *Candida albicans*. Potentiation of antifungal action of amphotericin B by essential oil from *Thymus vulgaris*. Phytotherapy Research, December 2004, Vol 18, Is 12, p. 990-995.
42. *Hierbas medicinales*. Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile. (pags. 26) Disponible en:
<http://web.minsal.cl/sites/default/files/files/Libro%20MHT%202010.pdf>.
43. Baptista R, Madureira A, Jorge R, Adão R, Duarte A, Duarte N, Manuel Lopes M, Teixeira G. *Antioxidant and antimycotic activities of two Lavandula species native from Portugal*. 2015. 22 págs.
44. Silva Ferreira G, Alves de Lima Pérez A, Martins Rocha I, Abreu Pinheiro M, Dias de Castro R, Lemes Carlo H, de Oliveira Lima E, Castellano L. *Does Scientific Evidence for the Use of Natural Products in the Treatment of Oral Candidiasis Exist? A Systematic Review*. Hindawi Publishing Corporation 2015, 8 pages.

45. Marrazzo J. *Vulvovaginal candidiasis*. British Medical Journal. (2003); 326(7397): 993–994.
46. Sobel J D, Chaim W. *Vaginal microbiology of women with acute recurrent vulvovaginal candidiasis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 1996: 2497-2499.
47. Gonzales-Pedraza AA, Ortiz ZA, Dávila MR, Valencia GCM. *Infecciones cervicovaginales más frecuentes: prevalencia y factores de riesgo*. Rev. Cub Obstet Ginecol (Serial online). 2007 mayo-ago (referido en 2008 ene 13);33 (2):0. Disponible en la World Wide Web:
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-600X2007000200007
48. MINSAL. Libro digital "*Medicamentos Herbarios Tradicionales*". p. 195-196. Disponible en:
<http://www.minsal.gob.cl/portal/url/item/7d97b17d7fbaa351e04001011f0103f2.pdf>.
49. Wroblewska MM, Swoboda-Kopec E, Rokosz A, Krawczyk E, Marchel H, Luczak M. *Epidemiology of clinical isolates of Candidaalbicans and their susceptibility to triazoles*. Int J Antimicrob 2002. 20: 472 – 475.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12458145>
50. Torrez K, Soto A, Sandra D, Villalobos M, Rodriguez A. *Candidiasis vaginal en primigestas*. Rev. Obstet Ginecol Venez (serial online) 2005; 65(2) :(4 páginas en pantalla). Disponible en:
http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0048-77322005000200002
51. Wroblewska MM, Swoboda-Kopec E, Rokosz A, Krawczyk E, Marchel H, Luczak M. *Epidemiology of clinical isolates of Candidaalbicans and their susceptibility to triazoles*. Int J Antimicrob (2002). 20: 472 – 475.
52. Martinez MA, Barria PA, Meneses R, Oyarzún P, Sandoval J. *Vulvovaginitis en la adolescencia: Estudio etiológico*. Rev. Chil Obstet ginecol (serial online) 2003 (referido en 2008 ene 13); 68 (6) (3 páginas en pantalla). Disponible en:

- http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-5262003000600008&script=sci_arttext.
53. Ringdahl EN. *Treatment of recurrent vulvovaginal candidiasis*. Am Fam Physician (serial online) 2000 (referido en 2008 ene 18); 61(11):3306-3317. Disponible en: <http://www.aafp.org/afp/20000601/3306.html>.
54. OMS. *Infecciones de Transmisión Sexual*. Nota descriptiva N°110 Agosto de 2011. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs110/es>
55. Moussa A, Nouredine D, Saad A, Abdelmelek M, Abdelkader B. *Antifungal activity of four honeys of different types from Algeria against pathogenic yeast: Candida albicans and Rhodotorula sp*. Asian Pacific Journal of Topical Biomedicine (serial online) 2012; 2: 554-557. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2221169112600963>
56. OMS, *Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections*. 2008. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75181/1/9789241503839_eng.pdf.
57. OPS. *Enfermedades venéreas*. OMS. 1971. Disponible en: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/170144/1/40267.pdf?ua=1>.
58. Geiger A M, Foxman B, Sobel J D. *Chronic vulvovaginal candidiasis: characteristics of women with Candida albicans, Cglabrata and no candida*. Genitourin Med. 1995; 71(5): 304–307.
59. Brammer KW, Farrow PR, Faulkner JK. *Pharmacokinetics and tissue penetration of fluconazole in humans*. Rev Infect Dis 1990,12 (Suppl.): S138-S126.
60. Montero-Gei F, Perera A. *Therapy with fluconazole for tinea corporis, tinea cruris and tinea pedis*. Clin Infect Dis 1992; 14 (Suppl): S77-S81.
61. Drake L, Babel D, Stewart DM. *Once weekly fluconazole (150, 300 or 450 mg) in the treatment of distal subungual onychomycosis of the fingernail*. J Am Acad Dermatol 1998; 38: S87-S94
62. Sandven P, Bjorneklett A, Maeland A, and the Norwegian Yeast Study Group. *Susceptibilities of Norwegian Candida albicans strains to fluconazole:*

- emergence of resistance*. Antimicrob Agents Chemother.1993; 37: 2443-2448.
63. Khodavandi A, Alizadeh F, Harmal NS, Sidik SM, Othman F, Sekawi Z, Chong PP. *Expression analysis of SIR2 and SAPs1-4 gene expression in Candida albicans treated with allicin compared to fluconazole*. Trop Biomed. 2011 Dec; 28 vol.3. p.589-98.
64. Dicson EM, Riggio MP, Macpherson L. *A novel species-specific PCR assay for identifying Lactobacillus fermentum*. J Med Microbiol. 2005; 54: 299-303.
65. Sloane E. *Chapter 9: Gynecological Difficulties: Candidiasis*. Biology of Women. 2002. 4 Ed. 252-254.
66. Nigel W, Rosentein I. *Characterization and selection of a Lactobacillus species to recolonize the vagina of women with recurrent bacterial vaginosis*. J Med Microbiol. 2000; 49: 543-52.
67. Sardi J C O, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida A M and Mendes Giannini M J S. *Candida species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options*. Journal of Medical Microbiology. 2013, 62, 10–24.
68. Tobudic S, Kratzer C, Lassnigg A, Presterl E. *Antifungal susceptibility of Candida albicans in biofilms*. Mycoses, 2012, 55, 199–204.
69. Ali D. Alnuaimi, Neil M. O'Brien-Simpson, Eric C. Reynolds & Michael J. McCullough. *Clinical isolates and laboratory reference Candida species and strains have varying abilities to form biofilms*. FEMS Yeast Res 13 (2013) 689–699.
70. Cuéllar-Cruz M, Vega-González A, Mendoza-Novelo B, López-Romero E, Ruiz-Baca E, Quintanar-Escorza M A, Villagómez-Castro J C. *The effect of biomaterials and antifungals on biofilm formation by Candida species: a review*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis (2012); 31: 2513–2527.
71. Taraszkievicz A, Fila G, Grinholc M, Nakonieczna J. *Innovative strategies to overcome biofilm resistance*. BioMed Research International. 2013, 13 pages.

72. T. Moon, J.M. Wilkinson , H.M.A. Cavanagh. *Antibacterial activity of essential oils, hydrosols and plant extracts from Australian grown Lavandula spp.* The International Journal of Aromatherapy (2006) 16, 9–14
73. M. Zuzarte, M.J. Gonçalves, M.T. Cruz, C. Cavaleiro, J. Canhoto, S. Vaz, E. Pinto, L. Salgueiro. *Lavandula luisieri essential oil as a source of antifungal drugs.* Food Chemistry 135 (2012) 1505–1510
74. Vishnu Agarwal, Priyanka Lal, Vikas Pruthi. *Effect of Plant Oils on Candida albicans.* J Microbiol Immunol Infect 2010;43(5):447–451
75. Mehnaz Pervin, Md Abul Hasnat, Beong Ou Lim. *Antibacterial and antioxidant activities of Vaccinium corymbosum L. leaf extract.* Asian Pac J Trop Dis 2013; 3(6): 444-453
76. Hallie S. Rane, Stella M. Bernardo, Amy B. Howell and Samuel A. Lee. *Cranberry-derived proanthocyanidins prevent formation of Candida albicans biofilms in artificial urine through biofilm- and adherence-specific mechanisms.* J Antimicrob Chemother 2014; 69: 428 –436.0