

UNIVERSIDAD SAN PEDRO

FACULTAD DE MEDICINA HUMANA

PROGRAMA DE ESTUDIOS DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



Actividad antifúngica del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*

L. “romero” y *Eucalyptus globulus* L. “eucalipto”

Tesis para optar el Título de Químico Farmaceutico

Autora:

Salinas Herrera, Mayra Kely

Asesor:

Rubio López, Felipe Rubén

0000-0002-7588-0757

Trujillo – Perú

2021

i. Palabra clave:

Tema	Antifúngicos
Especialidad	Farmacognosia

Topic	Antifungal
Specialty	Pharmacognosy

Línea de investigación:

Línea de Investigación	Recursos naturales terapéuticos y fitoquímica
Área	Ciencias Médicas y de Salud
Subárea	Medicina básica
Disciplina	Farmacología y Farmacia

Line of research:

Line of research	Therapeutic natural resources and phytochemistry
Area	Medical and Health Sciences
Subarea	Basic medicine
Discipline	Pharmacology and Pharmacy

ii. Título

Actividad antifúngica del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. “romero” y *Eucalyptus globulus* L. “eucalipto”.

iii. RESUMEN:

Este estudio de investigación se realizó con la finalidad de demostrar que el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. “romero” y *Eucalyptus globulus* L. “eucalipto” tienen actividad antifúngica; se siguió un diseño de investigación experimental in vitro, se utilizó la metodología de difusión de discos en agar. El efecto de ambos aceites esenciales se comparó con el Fluconazol como sustancia patrón, observando directamente el crecimiento de las levaduras en las placas con medios de cultivo. Los resultados fueron procesados con las pruebas estadística de Fisher y de Tukey, encontrando un nivel de significancia <0.05 , demostrándose que existe actividad antifúngica significativa entre ambos aceites esenciales. Los resultados fueron que el aceite esencial de romero al 50% fue de (11.8 mm), mientras que para las concentraciones del 75% (31.8 mm), al 100% (34 mm) presenta sensibilidad. De igual manera *Cándida Albicans* es resistente al aceite esencial de eucalipto a la concentración del 50% (16.6mm), a diferencia de las concentraciones del 75% (34.8 mm), 100% (39.4 mm) a las cuales si es sensible. Finalmente se puede afirmar que el efecto de los aceites esenciales de romero y eucalipto es dosis dependiente.

Palabras clave: Antifúngicos, Farmacognosia, *Cándida Albicans*.

iv. ABSTRACT:

This research study was carried out in order to demonstrate that the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. "rosemary" and *Eucalyptus globulus* L. "eucalyptus" have antifungal activity; An in vitro experimental research design was followed, the agar disc diffusion methodology was used. The effect of both essential oils was compared with Fluconazole as a standard substance, directly observing the growth of the yeasts in the plates with culture media. The results were processed with the Fisher and Tukey statistical tests, finding a level of significance <0.05 , showing that there is significant antifungal activity between both essential oils. The results were that 50% rosemary essential oil was (11.8 mm), while for concentrations of 75% (31.8 mm), 100% (34 mm) presents sensitivity. Similarly, *Candida Albicans* is resistant to eucalyptus essential oil at a concentration of 50% (16.6mm), unlike concentrations of 75% (34.8 mm), 100% (39.4 mm) to which it is sensitive. Finally, it can be stated that the effect of the essential oils of rosemary and eucalyptus is dose dependent.

Keywords: Antifungals, Pharmacognosy, *Candida Albicans*.

INDICE

	Pag.
I. INTRODUCCION:	1
1.1 ANTECEDENTES Y FUNDAMENTACION CIENTIFICA	1
1.1.1 ANTECEDENTES	1
1.1.2 FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICA	6
1.2 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	11
1.3 PROBLEMA	12
1.4 CONCEPTUACION Y OPERACIONALIZACION DE VARIABLES	13
1.5 HIPÓTESIS	14
1.6 OBJETIVOS	14
1.6.1 Objetivo general	14
1.6.2 Objetivos específicos:	14
II. METODOLOGIA:	15
2. 1 Tipo y Diseño de investigación	15
2.1.1. Tipo de investigación	15
2.1.2. Diseño de la investigación	15
2.2 Población – Muestra	16
2.3 Técnicas e instrumentos de investigación	17
2.3.1 Preparación del medio de cultivo:	17
2.3.2 Prueba de susceptibilidad (Prueba de Disco difusión en agar)	17
III. RESULTADOS	20
IV. ANALISIS Y DISCUSION:	28
V. CONCLUSIONES	32
VI. RECOMENDACIONES	32
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	33
VIII.- AGRADECIMIENTOS	40
XI.- ANEXOS	41

I. INTRODUCCION:

1.1.1 ANTECEDENTES Y FUNDAMENTACION CIENTIFICA:

1.1.2 ANTECEDENTES

Actualmente, el estudio sobre propiedades antimicrobianas de los fitoconstituyentes de muchas plantas, está adquiriendo más valor y teniendo la importancia debida. En la actualidad existen muchos estudios en diversas plantas que demuestran su actividad antimicrobiana, algunos de los cuales se muestran a continuación:

Antecedentes internacionales

Shebi, Geetha y Thangavelu (2019) analizaron las propiedades antimicóticas del aceite de romero y sus componentes principales mediante el método de difusión en disco. Al evaluar la actividad antifúngica del aceite esencial de romero frente a muestras de 25µl, 50µl y 100µl observaron que todas ellas inhibieron las especies de hongos con un grado variable de sensibilidad, con la zona máxima de inhibición de 38 mm para la muestra de 100µl. por lo que recomendaron que el aceite esencial de romero podría ser tomado en cuenta para un posible uso terapéutico.

Saeidi, Forgani, Javadian F y Javadian E (2019) investigaron los efectos del extracto de *Rosmarinus officinalis* en *Cándida albicans* en condiciones de laboratorio. En este estudio experimental, se prepararon extractos metanólicos de *Rosmarinus officinalis* a concentraciones de 0.1, 0.01, 0.001, 0.0004, 0.0002 y 0.0001 g/mL. Los resultados mostraron que el extracto de *Rosmarinus officinalis* en concentración de 100 g/ml tuvo efecto inhibitorio sobre *Cándida albicans*, con un diámetro de inhibición alto (18.3 ± 0.9 mm). Entonces concluyeron que el extracto de romero inhibe el crecimiento de *Candida albicans* y que podría usarse para tratar infecciones por esta levadura.

Oulkheir et al (2019) determinaron la efectividad de los aceites de *Cinnamomum verum*, *Eucalyptus globulus*, *Lavándula angustifolia* contra *Cándida albicans* y algunas bacterias patógenas utilizando el método de difusión en disco y MFC usando un ensayo de macrodilución. Se preparó un intervalo de concentraciones (50 a 0,2 mg/ml). Los resultados obtenidos mostraron que *Cándida albicans* mostró la zona de inhibición de 6 mm al aceite esencial de eucalipto, concluyendo que *Cándida albicans* es resistente al aceite esencial de eucalipto.

Kulaksiz, Sevda, Üstündağ y Saltan (2018) examinaron las actividades antimicrobianas de los aceites específicos de plantas utilizadas tradicionalmente en Turquía, entre ellas romero. Los aceites esenciales se obtuvieron mediante destilación de arrastre con vapor de agua. Las capacidades antimicrobianas se evaluaron con el método Kirby-Bauer. Encontraron que las zonas de inhibición estuvieron en el rango entre 7 y 59 mm. Obteniendo como conclusión que el aceite esencial de romero presenta mayor efecto antifúngica contra *Cándida albicans*.

Nidhi et al (2018) investigaron propiedades antimicrobianas (antifúngicas y antibacterianas) de los aceites esenciales de las hojas de *Eucalyptus globulus*, *Thuja occidentalis*, *Rosmarinus officinalis* y *Lavándula officinalis*. Emplearon la hidrodestilación para obtener los aceites esenciales y evaluaron la actividad antimicrobiana con el método de disco difusión contra cepas bacterianas y cepas de *Cándida albicans* ATCC90028 y MTCC277. El aceite esencial de *Eucalyptus globulus* mostró una zona de inhibición de 21 ± 1.02 mm mientras que el de *Rosmarinus officinalis* formó 14.5 ± 0.5 mm contra *Cándida albicans*. Estos datos confirman que estos aceites esenciales son antifúngicos efectivos y podrían usarse como antimicrobianos contra patógenos fúngicos.

Prajapati et al (2017) llevaron a cabo un trabajo de investigación cuyo objetivo fue evaluar la efectividad antifúngica de los extractos de *Eucalyptus globulus* y 6 plantas medicinales más, contra el crecimiento de *Cándida albicans*, utilizando el método de difusión en agar. En la investigación el control positivo fué el Ketoconazol. De los siete extractos probados, *Eucalyptus globulus* mostró una

zona de inhibición de 13.2 ± 1.30 mm de diámetro, pero el extracto con mayor eficacia fue *Syzygium jambolanum* con 27.0 ± 3.81 mm. Concluyeron que este trabajo de investigación sugiere el rol inhibitorio de los medicamentos homeopáticos contra *Cándida albicans*.

Echevarría (2017) evaluó la actividad antifúngica “in vitro” de aceite esencial y extracto alcohólico de la planta aromática *Eucalyptus globulus* L. “eucalipto”, relacionando el efecto inhibitorio a diferentes concentraciones, 12.500 ppm, 10.500 ppm, 8.500 ppm, 6.500 ppm, 4.500 ppm y 2.500 ppm, sobre *Cándida albicans* cepa ATCC10231. Para dicho fin utilizó el método de difusión de disco en agar con las soluciones experimentales, usando al Fluconazol como control positivo. Observó que el aceite esencial *Eucalyptus globulus* L. tiene mayor efectividad inhibitoria sobre *C. albicans* con un promedio de halo de inhibición de 11,6 mm en 2,500 ppm y 17 mm en 12,500 ppm, y el extracto alcohólico no presentó actividad inhibitoria. Se concluyó que el aceite esencial *Eucalyptus globulus* L. presenta actividad inhibitoria sobre el hongo *Cándida albicans*, de modo que puede ser una alternativa en el control de esta candidiasis.

Antecedentes Nacionales

Yanquey Mulluni (2019) identificaron la actividad antimicótica del aceite esencial de *Origanum majorana* L. “orégano” y *Rosmarinus officinalis* L. “romero” frente a *Cándida albicans* ATCC 10231, mediante el método Kirby-Bauer y macrodilución para la concentración inhibitoria mínima. Los resultados para la prueba de susceptibilidad de difusión en agar contra *Cándida albicans*, observaron que para el aceite esencial de romero se formaron halos de inhibición de 9.98mm a la concentración de 100%, por lo que concluyen que las cepas de *Cándida albicans* ATCC 10231 presentan resistencia, para todas estas concentraciones evaluadas.

Vallejos (2017) hizo una investigación con la finalidad de evaluar la actividad antifúngica in vitro del extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis* contra *Candida albicans*, a través del método de difusión en pozo de agar. En su estudio

experimental, emplearon 6 muestras de concentraciones 40, 20, 10, 5, 2.5 y 1.25 mg/mL del extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis* y dos cepas de *Cándida albicans*. Obtuvieron halos promedios de 21.12mm, 16.08mm, 9.22mm, 7.12mm para las concentraciones de 40, 20, 10,5mg/mL, respectivamente. Concluyeron que el extracto crudo acuoso de hojas de *Rosmarinus officinalis* presenta actividad antifúngica contra *Cándida albicans*.

Cahuana y Condori (2017) establecieron la actividad inhibitoria del extracto etanólico del *Eucalyptus globulus* al 25%, 50%,75% y 100% contra *Cándida albicans* y *Streptococcus mutans*, mediante la técnica combinada de difusión con pocillos y disco de papel filtro, modificado del método de Kirby-Bauer. Encontraron que la efectividad antifúngica del extracto etanólico de *Eucalyptus globulus* L. sobre *Cándida albicans* se expresó mediante la formación de halos de inhibición de 9.34 mm a la concentración del 25 %, 10.41mm al 50 %,11.39mm al 75 % y 12.45mm al 100 %, llegando a la conclusión que el efecto inhibitorio es mayor a medida que se aumenta la concentración del extracto del *Eucalyptus globulus*, por ello, podría emplearse como agente antifúngico contra *Candida albicans*.

Antecedentes locales

Moreno (2019) comparó la actividad antifúngica entre los extractos hidroetanólicos de *Rosmarinus officinalis* “romero”, propóleo y la combinación de éstos, contra la levadura *Cándida albicans* ATCC 10231, empleando el método de difusión en agar de Kirby-Bauer. Obtuvo como resultado la formación de zonas de inhibición de 14.8mm para el extracto de romero, 13.3 mm para el propóleo y 16.8 mm para la combinación de los dos extractos. Comparó las zonas de inhibición mediante la prueba de Kruskal Wallis, observando que existe diferencia significativa ($p=0.000$). Concluyó que la combinación de los extractos de *Rosmarinus officinalis* y propóleo al 75 % tuvo más actividad antifúngica que por sí solos, contra *Candida albicans*.

Dionicio (2019) desarrolló un trabajo experimental in vitro cuyo objetivo fue establecer el efecto antifúngico del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* contra *Cándida albicans* ATCC 10231, respecto al fluconazol. Preparó el aceite esencial a cuatro concentraciones (100 %, 75 %, 50 % y 25 %) y evaluó mediante el método de difusión en agar de Kirby-Bauer. Evidenció la formación de halos inhibitorios de 18 ± 1.41 mm a la concentración de 100%. Concluye que *Candida albicans* es sensible al aceite esencial de *Eucalyptus globulus* a la concentración de 100 %, por esto se le considera eficaz como antifúngico, en comparación con el Fluconazol.

Macedo y Mejía (2019) efectuaron una investigación para determinar la eficacia antifúngica del extracto etanólico de *Eucalyptus globulus* contra *Candida albicans* en estudio in vitro. En su estudio experimental se evaluó al extracto de eucalipto a las concentraciones de 5 %, 25 %, 50 %, 75 % y 100 %, a través de la técnica de difusión con discos de Kirby-Bauer. Se obtuvieron resultados que indican que al 100% formó una zona de inhibición de 17.4 mm de diámetro, en promedio. Concluyeron que, de manera general, el extracto etanólico de *Eucalyptus globulus* es eficaz contra *Cándida albicans* y el efecto antifúngico se incrementa a medida que aumenta la concentración del extracto.

Solano (2018) evaluó la actividad antifúngica del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. “romero” contra *Candida albicans* ATCC10231, a mediante el método de difusión con discos en agar. Los principios activos antifúngicos del aceite esencial la evaluaron a cuatro concentraciones diferentes, 100 %, 75 %, 50 % y 25 %, en 10 repeticiones por cada grupo de trabajo. Observaron que el aceite esencial de romero al 100% generó zonas de inhibición de 14.7 mm (DS \pm 1.3 IC 95% 16-19). Concluyó que, al aumentar la concentración del aceite esencial de romero, se incrementa el diámetro de la zona de inhibición, pero fue menor que el Fluconazol, por lo que se considera que no es eficaz como antifúngico.

Rodríguez y Santa María (2016) realizaron un estudio cuyo objetivo fue determinar el efecto que producen los extractos etanólicos de *Uncaria tomentosa*

(uña de gato) y *Eucalyptus globulus* (eucalipto) sobre *Cándida* sp, para ello, utilizaron la prueba de difusión con disco en agar. Observaron la creación de zonas de inhibición del crecimiento en los discos con eucalipto de 16 mm de diámetro, mientras que para la uña de gato formó 9.5 mm. Llegaron a la conclusión que el extracto etanólico de *Uncaria tomentosa* (uña de gato) y *Eucalyptus globulus* (eucalipto) presentan actividad antifúngica, sobre *Candida albicans*.

1.1.2 FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICA

Cándida albicans es un hongo comensal que está ubicado en la cavidad oral, el tracto gastrointestinal y el tracto genitourinario; puede causar infecciones graves y recurrentes de la mucosa, como la candidiasis oral y vaginal, también en infecciones invasivas y mortales en personas inmunocomprometidos e inmunocompetentes. El desequilibrio de la microbiota normal, la interrupción de las barreras epiteliales y la disfunción del sistema inmune, favorecen la transición de hongo comensal a patógeno (Madigan, M. et al., 2019; Cruz, S. et al., 2017).

Las células huésped reconocen la condición patogénica cuando aumenta la carga fúngica y las levaduras se convierten en formas hifales que activan la respuesta inmune de la primera línea de defensa, las células epiteliales. El proceso involucrado en la infección se inicia por la contribución de otros factores de virulencia, como la expresión de adhesinas que median la adherencia a las células huésped y las superficies abióticas, la hidrofobicidad relacionada con la adherencia a las superficies abióticas, la secreción de enzimas hidrolíticas (proteinasas y fosfolipasas) adherencia y destrucción del tejido del huésped, y formación de biopelículas. (Borges, A. et al., 2015)

Candida albicans tiene numerosos elementos y mecanismos que le permiten existir en el organismo humano; estas características explican el hecho de que la mayoría de los humanos sanos están colonizados por este organismo. Sin

embargo, sus propiedades metabólicas, morfogenéticas e inmunomoduladoras significan que también es un patógeno pernicioso y común en casi cualquier entorno en el que el vigor inmune se vea comprometido o la integridad de la piel del humano se vea afectada. Como organismo comensal, *Candida albicans* ha adquirido rasgos y propiedades que también le permiten florecer como patógeno. Las células comensales también deben evitar ser eliminadas al superar los mecanismos de vigilancia inmunológica que actúan para proteger la mucosa. (Da Silva, A. et al., 2017; Bennett, J. et al., 2016).

Los factores de riesgo más importantes para las infecciones por *Candida albicans* son la terapia con antibióticos por acceso venoso central, procedimientos quirúrgicos, neutropenia, nutrición parenteral, catéter urinario, así como algunas enfermedades como neoplasia hematológica, cáncer sólido, prematuridad, enfermedad cardíaca, trauma, enfermedad neurológica, enfermedad gastrointestinal, trasplante de órganos, enfermedad pulmonar, enfermedad vascular, VIH, enfermedad genética/malformación congénita, enfermedad renal, diabetes mellitus, enfermedad hepática y enfermedad pancreática. (Dadar, M. et al., 2018).

En individuos gravemente inmunocomprometidos, *Cándida albicans* induce una infección sistémica y puede pasar de infecciones locales oportunistas o comensales de la boca, la garganta y el aparato reproductor a una candidiasis invasiva sistémica que afecta el sistema circulatorio, los huesos y el cerebro. En individuos atópicos y alérgicos, la exposición crónica a *Cándida albicans* actúa como un factor agravante en la dermatitis atópica y conduce a la producción de IgE específica para antígenos de *Cándida albicans*. (Engelkirk, P. y Duben, J., 2015)

Las infecciones por *Candida albicans* son más frecuentes en los últimos años. La gravedad de las candidiasis varía de moderada a fatal y depende del sitio de infección, la virulencia de la cepa infectante y el estado inmunitario del huésped. (Deorukhkar, S. y Roushani, S., et al, 2018)

La candidiasis cutánea es común y puede ocurrir en individuos sanos, es fácil de tratar con higiene básica y tratamiento local. La candidiasis mucocutánea e invasiva a menudo es oportunista y se manifiesta en pacientes con afecciones inmunodeprimidas adquiridas o inducidas. Las infecciones invasivas por *Candida albicans* son las causas más resaltantes de morbilidad y mortalidad en pacientes inmunocomprometidos y críticos. (Hall, R., 2015).

Muchos estudios recientes de varias partes del mundo han documentado un cambio de especies en las candidiasis; y las infecciones por otras especies de *Cándida* se han incrementado notablemente y ha pasado de ser una infección de *Candida albicans* "ubiquas" a especies de *Candida* no *albicans* (NAC) "crípticas". Las especies de NAC causan manifestaciones clínicas similares, pero difieren con respecto a la epidemiología, a los factores de virulencia y, lo más importante, al patrón de susceptibilidad a los medicamentos antimicóticos. (Noble, S., et al 2017; Pineda, J., et al 2017; Koutserimpas, C., et al., 2019).

Las infecciones ocasionadas por especies de *Cándida* se han incrementado progresivamente en las últimas décadas, y este fenómeno se asocia principalmente con la tasa creciente de procedimientos invasivos, el uso extenso de antimicrobianos de amplio espectro y el estado inmunocomprometido más frecuente de pacientes críticos. (Cortegiani, A., et al., 2018).

Los agentes antifúngicos más utilizados tenemos, los azoles son los fármacos preferidos y con mayor uso para el tratamiento de las infecciones por *Cándida*. Dependiendo del tipo de infección, el sitio anatómico en el que ocurre y el perfil de sensibilidad de las especies, también se pueden usar otros antifúngicos. Entre estos, hay polienos, equinocandinas, análogos de nucleósidos y alilaminas. El fluconazol (FLZ), un tipo de azol, inhibe la 14 α -esterol desmetilasa, codificada por el gen ERG11, que es una enzima implicada en la biosíntesis del ergosterol de membrana específico de hongos ergosterol. Sin embargo, hay muchos informes en la literatura sobre el desarrollo de resistencia entre las especies de *Cándida*, especialmente en relación con los azoles. (De Oliveira, G., et al., 2018; Whaley, S., et al., 2017).

A pesar de las nuevas opciones terapéuticas, como los inhibidores de la síntesis de β -glucano y los triazoles de tercera generación Posaconazol y Voriconazol, los medicamentos antimicóticos tienen un impacto modesto en la reducción de la alta tasa de mortalidad, en parte debido al retraso en el diagnóstico. Problemas no resueltos como toxicidad, interacciones farmacológicas, rutas restringidas de administración, espectro estrecho, biodisponibilidad reducida en los tejidos objetivo y resistencia emergente, subrayan la necesidad de desarrollar nuevas moléculas para superar estas dificultades. (González, M., et al., 2017)

Aunque *Cándida albicans* sigue siendo el principal agente de infección micótica adquirida en el hospital, varias especies de *Cándida* no *albicans*, como, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. krusei* suman a la creciente incidencia de infecciones invasivas con altas tasas de fracaso terapéutico, principalmente relacionado con la resistencia a equino candinas y azoles. El incremento actual de la resistencia a las medicinas antimicóticas no solo está relacionado con el mecanismo adquirido después de la administración de agentes antifúngicos, sino que también se ha registrado resistencia intrínseca a varias clases de antimicrobianos entre diferentes especies no *albicans*. (Cortegiani, A., et al., 2018)

El advenimiento de la aparición original y la reaparición de enfermedades fúngicas clásicas se han producido como consecuencia del desarrollo del fenómeno de resistencia a los antimicóticos. El diseño de medicamentos originales de medicinas tradicionales ofrece nuevas promesas en la clínica moderna. La necesidad urgente incluye el desarrollo de medicamentos alternativos que sean más eficientes y tolerantes que los tradicionales que ya están en uso. La identificación de nuevas sustancias con potencial efecto antifúngico a bajas concentraciones o en combinación también es una posibilidad. (De Oliveira, G., et al., 2018)

Varias especies de plantas han mostrado actividad efectiva contra *Cándida albicans*, algunas de ellas tienen una concentración inhibitoria mínima (CIM) prometedora, como la menta (0.08 $\mu\text{g/mL}$), *Thymus villosus* (0.64 $\mu\text{g/mL}$),

Eucalipto (0.05 µg/mL), aceite de hierba de limón (0.06 µg/mL), *Cinnamomum zeylanicum* (0,01 µg/ml), aceite de hierba de jengibre (0,08 µg/ml), cilantro (0,2 µg/ml), entre otros, sin embargo, nunca se han estudiado a fondo como medicamentos contra la *Cándida* para el mercado. Los mecanismos de acción anti-*Cándida* iniciados por los productos naturales de la planta pueden implicar la inhibición de la germinación y la formación de biopelículas, el metabolismo celular, la integridad de la pared celular, la plasticidad de la membrana celular o pueden implicar la inducción de apoptosis. (Soliman, S., et al., 2017; Murtaza, G., et al., 2015).

Las plantas medicinales se han utilizado durante mucho tiempo para tratar diferentes enfermedades en países desarrollados y en desarrollo. En esta última década, las plantas medicinales han atraído mucha atención porque sus usos han tenido muchos beneficios, como la disminución de los gastos y menos efectos secundarios. El uso de productos a base de plantas para combatir infecciones fúngicas, bacterianas y parasitarias también se ha considerado como un enfoque eficaz (Rivas, C., et al., 2016). Además, se pueden tomar ciertas medidas para producir medicamentos identificando los compuestos activos de las plantas. Ya se han demostrado los efectos antifúngicos de algunas plantas, como el jengibre, *Narcissus tazetta*, *Myrtus communis*, eneldo, cilantro, ajo, cebolla, henna, roble, frijol negro, tomillo, sobre las infecciones por hongos. Los flavonoides, alcaloides, taninos, citronelol, geraniol, timoquinona y compuestos fenólicos son algunos de los compuestos antimicóticos u otros compuestos microbianos activos que se encuentran en estas plantas. (Sepahvand, A., et al., 2018).

La actividad antimicrobiana que muestran los aceites esenciales se debe principalmente a una serie de compuestos fenólicos y terpenoides, que tienen actividad antibacteriana o antifúngica. Los fitoquímicos de los aceites esenciales actúan de manera distinta a los antifúngicos sintéticos, contra *Cándida albicans*, sin embargo, los agentes antifúngicos azólicos y sus derivados continúan dominando como medicamentos de primera elección para tratar las infecciones

por *Cándida albicans*, como aplicaciones tópicas o medicamentos orales. (Agarwal, V., et al., 2010).

Los aceites esenciales son mezclas de metabolitos secundarios naturales volátiles producidos por las plantas aromáticas. Cada aceite esencial es una mezcla compleja de terpenos (monoterpenos, sesquiterpenos y sus derivados oxigenados, como alcoholes, aldehídos, ésteres, éteres, cetonas, fenoles y óxidos), y también compuestos fenólicos y fenilpropanoides derivados del ácido acetomevalónico y vías del ácido shikímico, respectivamente (Basak, S. y Guha, P.). La composición química de los aceites esenciales de plantas difiere entre especies; se ve afectado por factores que incluyen la ubicación geográfica, el medio ambiente, la etapa de madurez y el método de extracción. Los aceites esenciales representan uno de los productos naturales más prometedores para la inhibición de hongos. De hecho, muchos tipos de aceites esenciales obtenidos de diferentes plantas o hierbas exhiben propiedades antifúngicas bien definidas. (Nazzaro, F., et al., 2017)

1.2 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

El motivo del estudio se debe a la creciente resistencia que tienen los hongos a los agentes antifúngicos convencionales por ello es importante buscar otra alternativa en el tratamiento de la *Candida albicans* utilizando los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* L. “eucalipto” y de *Rosmarinus officinalis* L. “romero”.

El propósito de este estudio es demostrar la eficacia que tienen estos aceites esenciales en el tratamiento de la *Candida albicans* y los resultados que se obtengan servirán como una ventana abierta y como base científica para seguir investigando los beneficios que tienen los aceites esenciales de las plantas ya que en nuestro medio le dan muy poca importancia; donde los más beneficiados serán las personas que padecen esta patología donde podrán tener varias

alternativas como medio de tratamiento, ya que en nuestro medio es muy frecuente.

1.3 PROBLEMA:

¿Tienen actividad antifúngica los aceites esenciales de *Rosmarinus officinalis* L. “romero” y *Eucalyptus globulus* L. “eucalipto” sobre *Candida albicans*?

1.4 CONCEPTUACION Y OPERACIONALIZACION DE VARIABLES:

VARIABLES	Definición conceptual	Definición operacional	Dimensión	Indicador
VI - 1 Aceite esencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	El aceite esencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. es una mezcla compleja, oleosa, incoloro a amarillo claro, insoluble en agua y con un aroma característico de alcanfor, conformada por cientos de compuestos volátiles en proporciones que varían según la etapa vegetativa y las condiciones bioclimáticas. (Andrade, J., et al., 2018)	Se obtiene por arrastre con vapor de agua y se prepararán 3 muestras a concentraciones diferentes, mediante diluciones con Dimetilsulfóxido (DMSO).	Concentración en porcentaje V/V	Aceite esencial de Romero al 100% 75% 50%
VI - 2 Aceite esencial de <i>Eucalyptus globulus</i> L.	El aceite esencial de <i>Eucalyptus globulus</i> L. es una mezcla de compuestos orgánicos volátiles que incluyen hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos, éteres y ésteres, obtenidos de las hojas, ramas desnudas, capullos o frutos maduros, mediante una técnica de destilación. (Hayat, U., et al., 2015)	Se obtiene por arrastre con vapor de agua y se prepararán 3 muestras a concentraciones diferentes, mediante diluciones con Dimetilsulfóxido (DMSO).	Concentración en porcentaje V/V	Aceite esencial de Eucalipto al 100% 75% 50%
VD Actividad antifúngica	Capacidad que presenta una sustancia química natural o sintética (agente antifúngico) para ocasionar en los hongos un estado de inhibición (fungistático o fungicida) del crecimiento y desarrollo. (Nett, J. y Andes, D., 2015).	El efecto antifúngico de los aceites esenciales se evidenciará por la formación de un halo de inhibición en la placa Petri con el cultivo, al cual se le determina la longitud del diámetro	El grado de susceptibilidad, se obtiene según el estándar M60 del CLSI. (CLSI, 2017) Sensible: ≥ 17 mm Intermedio: 14 a 16 mm Resistente: ≤ 13 mm	Eficaz ≥ 17 mm No eficaz < 17 mm

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute
 Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio

1.5 HIPÓTESIS:

Los aceites esenciales de *Rosmarinus officinalis* L. “romero” y *Eucalyptus globulus* L. “eucalipto” tienen actividad antifúngica sobre *Candida albicans*.

1.6 OBJETIVOS:

1.6.1 Objetivo general:

Evaluar la actividad antifúngica de los aceites esenciales de *Rosmarinus officinalis* L. “romero” y *Eucalyptus globulus* L. “eucalipto” sobre *Candida albicans* in vitro.

1.6.2 Objetivos específicos:

1. Determinar la actividad antifúngica del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. “romero” al 100%, 75% y 50% sobre *Candida albicans*.
2. Determinar la actividad antifúngica del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* L. “eucalipto” 100%, 75% y 50% sobre *Candida albicans*.
3. Determinar la actividad antifúngica del Fluconazol (medicamento patrón), sobre *Candida albicans*.
4. Comparar la actividad antifúngica entre los aceites esenciales de *Rosmarinus officinalis* L. “romero” y de *Eucalyptus globulus* L. “eucalipto” sobre *Candida albicans*.
5. Comparar la actividad antifúngica entre el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. y el Fluconazol (medicamento patrón), sobre *Candida albicans*.
6. Comparar la actividad antifúngica entre el aceite esencial de *Eucalyptus globulus* L. y el Fluconazol (medicamento patrón), sobre *Candida albicans*.

II. METODOLOGIA:

2. 1 Tipo y Diseño de investigación

2.1.1. Tipo de investigación:

La presente investigación es del tipo básica, cuantitativa y experimental. La información se obtuvo mediante el método empírico-analítico para generar nuevos conocimientos con fundamento hipotético-deductivo. (Cabezas, et al., 2018)

2.1.2. Diseño de la investigación:

Para el desarrollo de nuestra investigación se realizaron repeticiones múltiples, con post prueba, considerando un control positivo y un control negativo. (Hernández, Fernández y Baptista, 2014)

RG1	X1	O1
RG2	X2	O2
RG3	X3	O3
RG4	X4	O4
RG5	X5	O5
RG6	X6	O6
RG7	X7	O7
RG8	X8	O8
RG9	X9	O9
RG10	X10	O10
RG11	X11	O11
RG12	X12	O12
RG513	X13	O13
RG14	X14	O14
RG15	X15	O15

En donde:

- RG1-5 : Son los Grupos en Examen (*Cándida albicans*)
- X1 : Aceite esencial al 100% (de romero o eucalipto)
- X2 : Aceite esencial al 75% (de romero o eucalipto)
- X3 : Aceite esencial al 50% (de romero o eucalipto)
- X4 : Fluconazol “FLZ” (Control positivo)
- X5 : DimetilSulfóxido “DMSO” (Control negativo)
- O1-5 : Tamaño del halo de inhibición (Actividad antifúngica)

2.2 Población – Muestra

Población: Por ser una investigación experimental en la cual se trabajó con la cepa de *Candida albicans* pura, cepa ATCC 10231, no es necesario consignar una población.

Muestra: Estuvo constituida por todos los cultivos de *Candida albicans* derivados de la cepa ATCC 10231.

Las Cepas ATCC son herramientas indispensables para el control de calidad en los laboratorios microbiológicos, son microorganismos certificados utilizados en diferentes disciplinas, para el control de calidad en microbiología.

Criterios de inclusión: Todos los cultivos de *Candida albicans*, sembrados con 20 horas de anticipación y provenientes de la cepa ATCC 10231.

Criterios de exclusión: Aquellos cultivos de *Candida albicans*, que resulten contaminados después de la siembra.

2.3 Técnicas e instrumentos de investigación:

2.3.1 Preparación del medio de cultivo:

Se usó Agar Sabouraud Dextrosa (SDA) como medio de cultivo; se empleó el medio de cultivo con la finalidad del crecimiento de las levaduras según indicaciones del laboratorio Merck (65g por cada 1000 ml de agua destilada). Para el presente estudio se preparó 500 ml de medio de cultivo, por lo que se añadió 32.5 g de SDA deshidratado a medio litro de agua destilada. Se disolvió y se calentó en una cocina eléctrica hasta hervir por 1 minuto. Después, se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos. (Ver anexo 4).

2.3.2 Determinación de sensibilidad antimicrobiana por difusión

Utilizando el método de Kirby-Bauer de difusión de discos en agar se evaluó la sensibilidad de *Candida albicans*. Para esto, se consideró los criterios del Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI de Estados Unidos de América. Se tuvo en cuenta los estándares M44-A2 (Sensible: ≥ 17 mm; Intermedio: 14 a 16 mm y Resistente: ≤ 13 mm) y M60.

2.3.2.1. Preparación del inóculo de *Candida albicans*:

Para la preparación del inóculo se colocó de 3-4 ml de suero fisiológico en un tubo de ensayo estéril, al cual se le adicionó alícuotas del microorganismo *Candida albicans* cultivado desde 24 horas antes, hasta que se observó una turbidez equivalente al estándar N.º 0.5 de la escala de McFarland (1.5×10^8 UFC/ml).

2.3.2.2 Siembra en placa por estriado de *Candida albicans*:

Se sembró el microorganismo *Candida albicans*, embebiendo un hisopo estéril en el inóculo y se deslizó sobre toda la superficie del medio de cultivo en las Placas Petri; de esta manera el microorganismo quedó como una capa en toda la superficie.

2.3.2.3 Preparación de las concentraciones del Aceites Esenciales

Utilizando los aceites esenciales, se prepararon 3 concentraciones (100%, 75% y 50%) tanto para el romero como para el eucalipto respectivamente, se empleó como solvente Dimetil Sulfoxido (DMSO); para esto, se rotularon 3 tubos de ensayo de 13x100mm estériles con las 3 concentraciones y se colocó 500 µL de aceite esencial y 500 µL de DMSO al tubo de 50%, 750 µL de aceite esencial y 250 µL de DMSO al tubo de 75% y 100 µL del aceite esencial puro.

2.3.2.4 Preparación de los discos de sensibilidad con los aceites esenciales:

Para la preparación de los discos con los aceites esenciales se utilizó papel filtro Whatman N° 1 de 6 mm de diámetro, esterilizados con anticipación. Para cada una de las concentraciones, se colocó 10 µL en cada disco. Este procedimiento se repitió por 15 veces para cada concentración.

2.3.2.5 Prueba de sensibilidad con los aceites esenciales:

Se utilizó una pinza metálica estéril, se colocaron los discos de sensibilidad preparados, uno de cada concentración con el aceite esencial, y se colocaron en la superficie del agar sembrado con el microorganismo *Cándida Albicans*, de esta manera quedaron los discos (uno de cada concentración) a un cm del borde de la Placa Petri y de forma equidistante, en forma de cruz. Por último, se colocó el disco con Fluconazol 10 µg (control positivo). Se tuvieron en reposo por 15 min y después las placas se incubaron de forma invertida en la estufa a 35 – 37 °C por 48 horas.

2.3.2.5. Lectura final de cada uno de los cultivos:

Una vez culminado el procesado de incubación se procede a medir los halos de inhibición respectivamente, se usa una regla y se mide el radio del halo de inhibición partiendo desde donde el centro del disco hasta donde se inhibió el crecimiento. La interpretación fue como sensible o resistente, según lo indicado en el Estándar M60 del CLSI.

III. RESULTADOS:

Tabla 1

Valores promedio de los halos de inhibición al evaluar la actividad antifúngica de los aceites esenciales de Rosmarinus officinalis L. “romero”, Eucalyptus globulus L. y Fluconazol sobre Candida albicans, en estudio in vitro

Concentración	Aceite esencial	Aceite esencial	Fármaco Patrón
	Romero	Eucalipto	Fluconazol
50%	11.80	16.60	
75%	31.80	34.80	
100%	34.00	39.40	
FLUCONAZOL			32.60

Nota: Tamaño de los halos de inhibición de los aceites esenciales según la concentración de ambos aceites.

Interpretación.

En la Tabla 1 se obtuvieron los resultados promedio de la actividad antifúngica de las sustancias en evaluación. Cada uno de estos valores es el promedio de 5 repeticiones para cada concentración de cada uno de los aceites esenciales en ensayo; y también para el Fluconazol, que es el fármaco patrón en cinco repeticiones, siendo su diámetro promedio de la zona de inhibición de 32.60 mm, estableciendo, para esta investigación, que el Fluconazol tiene actividad antifúngica (Sensible: ≥ 17 mm) sobre *Candida albicans*, en estudio in vitro.

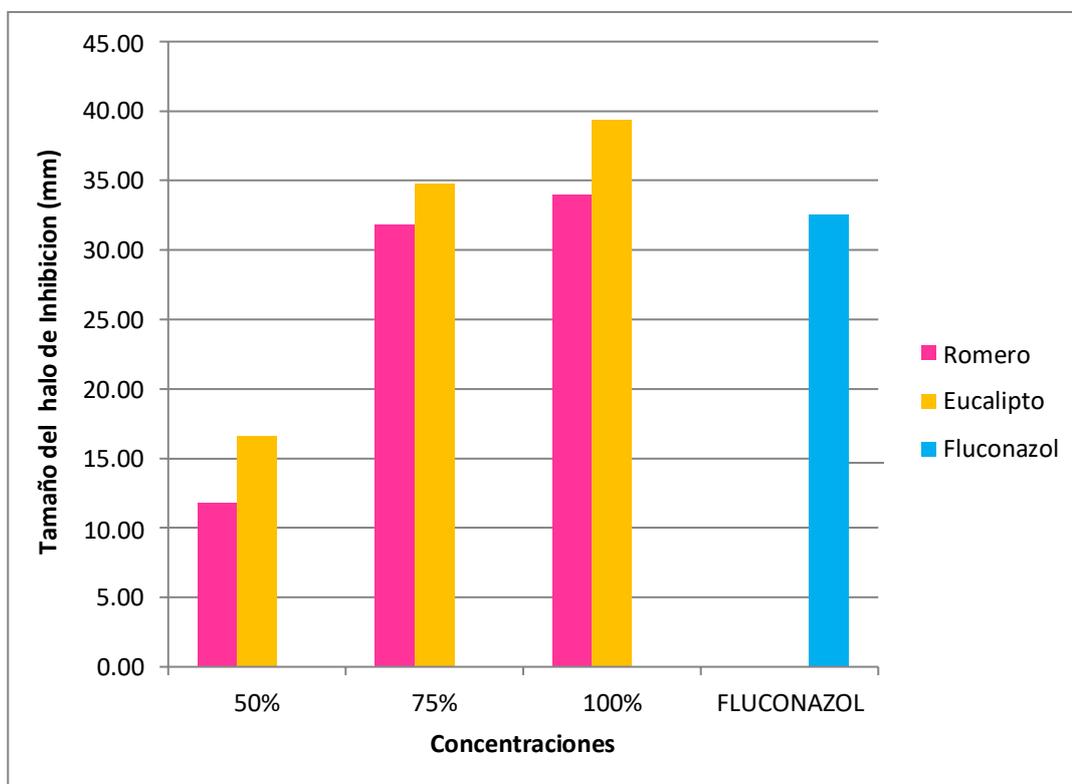


Figura 1. Valores promedio de los halos de inhibición al evaluar la actividad antifúngica de los aceites esenciales de *Rosmarinus officinalis* L. “romero”, *Eucalyptus globulus* L. y Fluconazol sobre *Candida albicans*, en estudio in vitro.

Tabla 2

Evaluación de la actividad antifúngica de los aceites esenciales de Rosmarinus officinalis L. y Eucalyptus globulus L. sobre Candida albicans, en estudio in vitro.

ANOVA						
<i>Rosmarinus officinalis L. "romero" vs Eucalyptus globulus L. vs Fluconazol</i>						
Fuente de variación	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sg	
Entre grupos	3183.143	6	530.524	322.928	0.000	
Dentro de grupos	46.00	28	1.643			
Total	322.143	34				

POST ANOVA						
HSD Tukey						
Grupo	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
Romero 50%	5	11.8				
Eucalipto 50%	5		16.6			
Romero 75%	5			31.80		
FLUCONAZOL	5			32.60	32.60	
Romero 100%	5			34.00	34.00	
Eucalipto 75%	5				34.80	
Eucalipto 100%	5					39.40
Sig.		1.000	1.000	0.132	1.000	1.000

Fuente: Salida SPSS 25.0

Interpretación.

En la Tabla 2 se muestra que el valor calculado de la prueba estadística F-Fisher es $F = 322,928$ con nivel de significancia del análisis de varianza (ANOVA) de sig. = 0,000 la cual es menor al 5% ($p < 0.05$), quedando demostrado que existe actividad antifúngica significativa de los aceites esenciales de *Rosmarinus officinalis L.* y *Eucalyptus globulus L.* sobre *Candida albicans*, en estudio in vitro. También se evidencia que la prueba de Tukey (POST ANOVA) agrupa los aceites esenciales en cinco grupos distintos, siendo cada uno de ellos heterogéneos y dentro de ello homogéneos, en el que el eucalipto de 100% tiene mayor efecto (es más efectivo) en la actividad antifúngica sobre *Candida albicans*, en estudio in vitro.

Tabla 3

Determinación de la actividad antifúngica del aceite esencial de Rosmarinus officinalis L. al 100%, 75% y 50% sobre Candida albicans, en estudio in vitro.

ANOVA					
<i>Rosmarinus officinalis L.</i>					
Fuente de variación	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig
Entre grupos	1496.133	2	748.067	510.045	0.000
Dentro de grupos	17.600	12	1.467		
Total	1513.733	14			
POST ANOVA					
HSD Tukey	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
Grupo		1	2	3	
Romero 50 %	5	11.8			
Romero 75%	5		31.8		
Romero 100 %	5				34.00
Sig		1.000	1.000		1.000

Fuente: Salida SPSS 25.0

Interpretación.

En la Tabla 3 se muestra que el valor calculado de la prueba estadística F-Fisher es $F = 510,045$ con nivel de significancia del análisis de varianza (ANOVA) de $\text{sig.} = 0,000$ la cual es menor al 5% ($p < 0.05$), quedando demostrado que existe actividad antifúngica significativa de los aceites esenciales de *Rosmarinus officinalis L.* sobre *Candida albicans*, en estudio in vitro. También se muestra que la prueba de Tukey (POST ANOVA) agrupa las concentraciones de los aceites esenciales en tres grupos distintos, siendo cada uno de ellos heterogéneos y dentro de ello homogéneos, en el que el aceite de romero al 100% tiene mayor efecto (es más efectivo) en la actividad antifúngica sobre *Cándida albicans*, respecto a los aceites de romero del 75% y del 50%, en estudio in vitro.

Tabla 4

Determinación de la actividad antifúngica del aceite esencial de Eucalyptus globulus L. 100%, 75% y 50% sobre Candida albicans, en estudio in vitro.

ANOVA					
<i>Eucalyptus globulus L.</i>					
Fuente de Variación	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig
Entre grupos	1453.733	2	726.867	375.966	0.000
Dentro de grupos	23.200	12	1.933		
Total	1476.933	14			
POST ANOVA					
HDS Tukey					
Grupo	N	Subconjunto para alfa = 0.005			
Eucalipto	5	1	2	3	
50% Eucalipto	5	16.6			
75% Eucalipto	5		34.8		
100% Eucalipto	5				39.40
Sig		1.000	1.000		1.000

Fuente: Salida SPSS 25.0

Interpretación.

En la Tabla 4 se muestra que el valor calculado de la prueba estadística F-Fisher es $F = 375,966$ con nivel de significancia del análisis de varianza (ANOVA) de $\text{sig.} = 0,000$ la cual es menor al 5% ($p < 0.05$), quedando demostrado que existe de *Eucalyptus globulus L.* sobre *Cándida albicans*, en estudio in vitro. También se observa que la prueba de Tukey (POST ANOVA) agrupa las concentraciones de los aceites esenciales en tres grupos distintos, siendo cada uno de ellos heterogéneos y dentro de ello homogéneos, en el que el aceite de eucalipto al 100% tiene mayor efecto (es más efectivo) en la actividad antifúngica sobre *Candida albicans*, respecto a los aceites de eucalipto del 75% y del 50%, en estudio in vitro.

Tabla 5

Comparación de la actividad antifúngica entre los aceites esenciales de Rosmarinus officinalis L. y de Eucalyptus globulus L. sobre Candida albicans.

ANOVA						
<i>Rosmarinus officinalis L. y de Eucalyptus globulus L. sobre Cándida albicans.</i>						
Fuente de variación		Suma se cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig
Entre grupos		3095.067	5	619.013	364	0.000
Dentro de grupos		40.800	24	1.700		
Total		3135.867	29			
POST ANOVA						
HSD Tukey						
Grupo	N	Subconjunto para alfa = 0.005				
		1	2	3	4	5
Romero 50 %	5	11.80				
Eucalipto 50%	5		16.60			
Romero 75 %	5			31.80		
Romero 100 %	5			34.00		
Eucalipto 75%	5				34.00	
Eucalipto 100%	5				34.80	39.40
Sig		1.000	1.000	0.119	0.923	1.000

Fuente : Salida SPSS 25.0

Interpretación.

En la Tabla 5 se observa que el valor calculado de la prueba estadística F-Fisher es $F = 364,125$ con nivel de significancia del análisis de varianza (ANOVA) de $\text{sig.} = 0,000$ la cual es menor al 5% ($p < 0.05$), quedando demostrado que existe actividad antifúngica significativa de los aceites esenciales de *Rosmarinus officinalis L.* y *Eucalyptus globulus L.* sobre *Cándida albicans*, en estudio in vitro. También se observa que la prueba de Tukey (POST ANOVA), agrupa las concentraciones de los aceites esenciales en cinco grupos distintos, siendo cada uno de ellos heterogéneos y dentro de ello homogéneos, donde el aceite de eucalipto al 100% tiene mayor efecto (es más efectivo) en la actividad antifúngica sobre *Candida albicans*, a diferencia de las otras concentraciones de aceites de eucalipto y de romero, en estudio in vitro.

Tabla 6

Comparación de la actividad antifúngica entre el aceite esencial de Rosmarinus officinalis L. y el medicamento patrón “Fluconazol” sobre Candida albicans, en estudio in vitro.

ANOVA					
<i>Rosmarinus officinalis L.</i> vs Fluconazol					
Fuente de Variación	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig
Entre grupos	1666.150	3	555.383	389.743	0.000
Dentro de grupos	22.800	16	1.425		
Total	1688.950	19			
POST ANOVA					
HDS Tukey					
Grupo	N	Subconjunto para alfa = 0.005			
		1	2	3	
Romero 50 %	5	11.80			
Romero 75 %	5		31.80		
Fluconazol			32.60		32.60
Romero 100 %	5				34.00
Sig		1.000	0.718		0.286

Fuente: Salida SPSS 25.0

Interpretación.

En la Tabla 6 se muestra que el valor calculado de la prueba estadística F-Fisher es $F = 389,743$ con un nivel de significancia del análisis de varianza (ANOVA) de $\text{sig.} = 0,000$ la cual es menor al 5% ($p < 0.05$), quedando demostrado que existe actividad antifúngica significativa de los aceites esenciales de *Rosmarinus officinalis L.* y el Fluconazol sobre *Candida albicans*, en estudio in vitro. También se observa que la prueba de Tukey (POST ANOVA), agrupa las concentraciones de los aceites esenciales en tres grupos distintos, siendo cada uno de ellos heterogéneos y dentro de ello homogéneos, donde el aceite de romero al 100% tiene mayor efecto (es más efectivo) en la actividad antifúngica sobre *Candida albicans*, a diferencia de las otras concentraciones de aceites de romero (75% y 50%) y el Fluconazol, en estudio in vitro.

Tabla 7

Comparación de la actividad antifúngica entre el aceite esencial de Eucalyptus globulus L. y el medicamento patrón “Fluconazol” sobre Candida albicans, en estudio in vitro

ANOVA					
<i>Eucalyptus globulus L.</i> vs Fluconazol					
Fuente de Variación	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig
Entre grupos	1474.150	3	491.1383	276.836	0.000
Dentro de grupos	28.400	16	1.775		
Total	1502.550	19			
POST ANOVA					
HDS Tukey					
Grupo	N	Subconjunto para alfa = 0.005			
		1	2	3	
Eucalipto 50 %	5	16.60			
Fluconazol	5		32.60		
Eucalipto 75 %	5		34.80		
Eucalipto 100 %	5				39.40
Sig.		1.000	0.080		1.000

Fuente: Salida SPSS 25.0

Interpretación.

En la Tabla 7 se muestra que el valor calculado de la prueba estadística F-Fisher es $F = 276,836$ con nivel de significancia del análisis de varianza (ANOVA) de $\text{sig.} = 0,000$ la cual es menor al 5% ($p < 0.05$), quedando demostrado que existe actividad antifúngica significativa de los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus L.* y el fluconazol sobre *Cándida albicans*, en estudio in vitro. También se observa que la prueba de Tukey (POST ANOVA), agrupa las concentraciones de los aceites esenciales en tres grupos distintos, siendo cada uno de ellos heterogéneos y dentro de ello homogéneos, donde el aceite de eucalipto al 100% tiene mayor efecto (es más efectivo) en la actividad antifúngica sobre *Candida albicans*, a diferencia de las otras concentraciones de aceites de eucalipto (75% y 50%) y el Fluconazol.

IV. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN:

En este trabajo de investigación se determinó el diámetro promedio del halo de inhibición del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. “romero” a la concentración del 50% es de 11.80 mm. Al comparar este valor con CLSI (Clinical and Laboratory Estándar Institute, 2017) que considera resistente la formación de halos de inhibición ≤ 13 mm demostró que el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. “romero” a la concentración del 50% no tiene acción antifúngica sobre la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231.

En el presente trabajo de investigación se determinó el diámetro promedio del halo de inhibición del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* L. “eucalipto” a la concentración del 50% es de 16.60 mm. Al comparar este valor con CLSI (Clinical and Laboratory Estándar Institute, 2017) que considera como Intermedio la formación de halos de inhibición dentro del rango de 14 a 16 mm se confirmó que el promedio es 16.60 mm, no alcanza para considerar que el aceite esencial de *Eucalyptus globulus* L. “eucalipto” a la concentración del 50% tiene acción antifúngica sobre la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231.

En el presente trabajo de investigación se determinó que el diámetro promedio del halo de inhibición del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. “romero” y del *Eucalyptus globulus* L. “eucalipto” a concentraciones del 75% y 100% son de 31.80 mm y 34.80 mm respectivamente; y para concentraciones de 100% son de 34.00 mm y 39.40 mm respectivamente. Al comparar todos estos valores con CLSI (Clinical and Laboratory Estándar Institute, 2017) que considera sensible la formación de halos de inhibición ≥ 17 mm, entonces tenemos que el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. “romero” y del *Eucalyptus globulus* L. “eucalipto” claramente tienen acción antifúngica sobre la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231.

En la Tabla 1, se observó que tanto el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. “romero” como el aceite esencial de *Eucalyptus globulus* L. “eucalipto”, a concentraciones del 75% y del 100%, tienen una efectividad similar (31.80 mm para el aceite esencial de romero al 75% frente al 32.60 mm del Fluconazol) o mejor (34.8 mm y 39.4 mm para el aceite esencial de eucalipto al 75% y 100% respectivamente; y 34.00 mm para el aceite esencial de romero al 100%, todos comparados con los 32.60 mm del Fluconazol). Finalmente, todo esto demuestra que ambos aceites esenciales tienen una efectividad similar al Fluconazol sobre *Cándida albicans*, de acuerdo con CLSI (Clinical and Laboratory Estándar Institute, 2017) que considera que el microorganismo es sensible si el halo de inhibición es ≥ 17 mm.

Así mismo, según los datos consignados en la Tabla 1 se puede deducir que la actividad antifúngica sobre la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231 del aceite esencial de las 2 especies vegetales en estudio, es dependiente de la concentración, ya que al aumentar la concentración aumenta su efecto, siendo relevante, ya que diversos estudios nos muestran resultados similares como Macedo y Mejía (2019).

También, de los datos consignados en la Tabla 1, Comparando la actividad antifúngica frente a *Candida albicans* del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. “romero” y del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* L. “eucalipto” a las 3 concentraciones ensayadas nos muestra que el aceite esencial de eucalipto es mejor que la actividad del aceite esencial de romero. Todo esto corroborado por el análisis estadístico mostrado en la tabla 7.

Además, con respecto al aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. “romero”, debemos destacar que tal y como vemos en la Tabla 1 el aceite esencial de romero al 50 % no es eficaz como antifúngico sobre *Candida albicans* ya que formo un halo de inhibición de 11.8 mm, llegando a considerarse resistente por los rangos establecidos del CLSI (<13). Este

resultado es completamente diferente al reportado en el trabajo de Shebi, Geetha y Thangavelu (2019) en el que el aceite esencial de romero a la concentración de 50µl obtuvo una zona de inhibición de 29 mm.

Por otro lado, el resultado obtenido para el aceite de romero al 100% que alcanza el tamaño de un halo de inhibición de 34 mm de diámetro comparable con el Fluconazol que formo un halo de inhibición de 32 mm; encontramos que nuestro resultado es similar al obtenido en el trabajo de Shebi, Geetha y Thangavelu (2019) en el que el aceite esencial de romero a la concentración de 100µl obtuvo una zona máxima de inhibición de 38 mm.

Sobre el aceite de eucalipto al 50 % podemos inferir a partir de los resultados mostrados en la Tabla 1, que no es eficaz ya que al formar un halo de inhibición de 16.6 mm de diámetro se considera una efectividad intermedia según los criterios del CLSI (14 a 16 mm) para el efecto antifúngico frente a *Candida albicans*, lo cual si es comparable con lo reportado en la investigación de Dionicio (2019), en el que el aceite esencial de eucalipto a la concentración del 50% formo un halo de inhibición de 12.2 mm de diámetro considerándose resistente según los criterios del CLSI (<13), demostrando así que no presenta actividad antifúngica contra *Candida albicans* a esta concentración.

También es conveniente mencionar que Macedo y Mejía (2019) efectuaron una investigación para determinar la eficacia antifúngica del extracto etanólico de *Eucalyptus globulus* contra *Candida albicans* en estudio in vitro. En dicho estudio los autores evaluaron el efecto antifúngico frente a *Cándida albicans* del extracto etanólico de eucalipto a las concentraciones de 5%, 25%, 50%, 75% y 100%, a través de la técnica de difusión con discos de Kirby-Bauer. En los resultados obtenidos tenemos que la concentración al 100% formó un halo de inhibición de 17.4 mm de diámetro, en promedio. Por lo que concluyeron

que, de manera general, el extracto etanólico de *Eucalyptus globulus* es eficaz contra *Candida albicans* y que el efecto antifúngico se incrementa a medida que incrementa la concentración del extracto del aceite esencial.

V. CONCLUSIONES:

- El aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. “romero” obtuvo una baja actividad antifúngica sobre *Candida albicans* a una concentración del 50%, la concentración de 75% tuvo una actividad intermedia y la concentración al 100% tuvo una actividad alta.
- El aceite esencial de *Eucalyptus globulus* L “eucalipto” tuvo una baja actividad antifúngica sobre *Candida albicans* a una concentración del 50%, la concentración del 75% tuvo actividad intermedia y la concentración al 100% tuvo una actividad alta.
- El Fluconazol tuvo una alta actividad antifúngica sobre *Candida albicans*.
- El aceite esencial de *Eucalyptus globulus* L “eucalipto” tuvo un mejor efecto antifúngico que el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. “romero” sobre *Candida albicans* en cada una de las concentraciones.
- El aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. “romero” al 75% tuvo un efecto antifúngico, similar al Fluconazol y la concentración al 100% fue más efectivo que el Fluconazol.
- El aceite esencial de *Eucalyptus globulus* L “eucalipto” al 75% su efecto fue similar al Fluconazol y al 100% fue más efectivo que el Fluconazol sobre *Candida albicans*.

VI. RECOMENDACIONES:

- Se recomienda continuar con estudios biofarmacéuticos.
- Realizar más estudios sobre los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* L. “eucalipto” y de *Rosmarinus officinalis* L. “romero” como agentes antifúngicos.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Shebi S, Geetha RV, & Lakshmi Thangavelu, L. (2019). Evaluation of the antimycotic activity of Rosemary Oil Against *Candida albicans*. *International Journal of Research In Pharmaceutical Sciences*, 10(2), 1228-1232. <https://doi.org/10.26452/ijrps.v10i2.412>
- Saeidi, S., Forгани, F., Javadian, F. y Javadian, E. (2019). Effects of *Rosmarinus Officinalis* Plant Extract on *Trichomonas Vaginalis* Parasites and *Candida albicans* under Laboratory Conditions: An Experimental Study. *Gene, Cell and Tissue*, 6(3), 1-6. <https://sites.kowsarpub.com/gct/articles/92867.html>
- Oulkheir, S., Boumariem, H., Dand, H., Aghrouch, M., Ounine, K., Douira, A. y Chadli, S. (2019). Antimicrobial activity of four essential oils extracted from plants commonly used in traditional medicine against some clinical strains. *HerbaPolonica*, 65(2), 22-29. <https://doi.org/10.2478/hepo-2019-0010>
- Kulaksiz, B., Er, S., Üstündağ Okur, N., & Saltan İşcan, G. (2018). Investigation of antimicrobial activities of some herbs containing essential oils and their mouthwash formulations. *The Turkish Journal Of Pharmaceutical Sciences*. 15(3), 370-375. <https://doi.org/10.4274/tjps.37132>
- Nidhi, P., Kumari, R., Thakur, S., & Devi, R. (2018). Role of Essential Oils of Medicinal Plants (*Eucalyptus Globulus*, *Thuja Occidentalis*, *Rosmarinus Officinalis*, *Lavandula Officinalis*) to Treat Broad Spectrum Bacterial and Fungal Pathogens and as Antioxidants in Food and Health. *ResearchGate*, 1–22. <https://doi.org/10.2139/ssrn.3299291>
- Gupta, P., Prajapati, S., Sharma, M., Kumar, M., Dwivedi, B., & Arya, B. (2017). *Evaluation of antifungal activity of different homoeopathic*

mother tinctures against Candida albicans. Indian Journal of Research in Homoeopathy, 11(4), 237. https://doi.org/10.4103/ijrh.ijrh_31_17

- Echeverría, A. E. (2017). *Actividad anti fúngica “in vitro” de aceite esencial y extracto alcohólico de eucalipto “Eucalyptus globulus” sobre Candida albicans cepa ATCC 10231* [tesis de pregrado, Universidad nacional de Chimborazo - Ecuador]. <http://dspace.unach.edu.ec/bitstream/51000/4454/1/UNACH-EC-FCS-ODT-2017-0034.pdf>
- Yanque, J. P. y Mulluni, D. (2019). *Actividad antifúngica in vitro del aceite esencial de hojas de Origanum majorana L. y Rosmarinus officinalis L. sobre Candida Albicans*. [Tesis de licenciatura no publicada] Universidad Privada Autónoma del Sur-Perú.
- Vallejos, E. C. (2017). *Efecto antifúngico in vitro del extracto acuoso de Rosmarinus officinalis “romero” contra Candida albicans* [Tesis de pregrado, Universidad Señor de Sipán]. https://alicia.concytec.gob.pe/vufind/Record/USSS_ba0e59b5159125b0b2e2ed439bc429bc
- Cahuana, L. V. y Condori, T. V. (2017). *Efectividad inhibitoria in vitro del extracto etanólico del Eucalyptus globulus sobre cepas de Streptococcus mutans y Cándida albicans Puno 2017* [Tesis de pregrado, Universiada Nacional del Altiplano]. <http://repositorio.unap.edu.pe/handle/UNAP/4181>
- Moreno, G. J. (2019). *Comparación in vitro del efecto antifúngico entre los extractos hidroetanólicos de Rosmarinus officinalis (romero) y propóleo sobre cepas de Candida albicans ATCC 10231, Trujillo – 2018* [Tesis de pregrado, ULADECH]. <http://repositorio.uladech.edu.pe/handle/123456789/10690>
- Dionicio, M. A. (2019). *Efecto antimicótico in vitro del aceite esencial de Eucalyptus globulus comparado con fluconazol, sobre Cándida albicans ATCC 10231* [Tesis de pregrado, Universidad Cesar Vallejo-Perú]. <https://hdl.handle.net/20.500.12692/35669>

- Macedo, Y. (2019). Eficacia antifúngica del extracto etanólico de *Eucalyptus globulus* sobre *Candida albicans* in vitro. *Revista médica de Trujillo*, 14(2), 79–91. <https://doi.org/10.17268/rmt.2019.v14i02.02>
- Solano, L. L. (2018). *Efecto antifúngico del aceite esencial de Rosmarinus officinalis L. “romero” sobre cepas de Candida albicans ATCC 10231 comparado con fluconazol* [Tesis de pregrado, Universidad Cesar Vallejo- Perú]. <https://hdl.handle.net/20.500.12692/25513>
- Rodríguez, B. y Santa María, L. (2016). *Eficacia antifúngica in vitro de Uncaria tomentosa frente a Eucalyptus globulus sobre Cándida sp* [Tesis de pregrado, Universidad Privada Antenor Orrego]. <https://repositorio.upao.edu.pe/handle/20.500.12759/2421>
- Agarwal, V. (2017). Effect of Plant Oils on *Candida albicans*. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 43(5), 447–451. [https://doi.org/10.1016/S1684-1182\(10\)60069-2](https://doi.org/10.1016/S1684-1182(10)60069-2)
- Andrade, J. (2017). *Rosmarinus officinalis L.: an update review of its phytochemistry and biological activity. Future Science*, 4(4), 1–18. <https://doi.org/10.4155/fsoa-2017-0124>
- Basak, S, & Guha, P. (2018). A review on antifungal activity and mode of action of essential oils and their delivery as nano-sized oil droplets in food system. *Association of Food Scientists & Technologists*, 55(12), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3394-5>
- Bennett, J. E., Dolin, R. y Blaser, M. J. (2016). *Mandell, Douglas y Bennett Enfermedades Infecciosas Principios y práctica*. Elsevier.
- Borges, A. C., Pereira, C. A. y Brito, G. N. (2015). Mini-review – *Candida albicans* biofilms: characteristics, clinical relevance, and drug susceptibility. En A. Méndez-Vilas. (Ed.), *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and educational Programs* (413-421). Badajoz, España: FORMATEX.

- Cabezas, E. D., Andrade, D. y Torres, J. (2018). *Introducción a la Metodología de la Investigación Científica*. 1ra ed. Sangolquí, Ecuador: Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.
- CLSI. (2017). M60, *Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts*, 2 Ed. Supplement Pennsylvania.
- Cortegiani, A., Misseri, G., Fasciana, T., & Gianmarco, A. (Eds.). (2018). Epidemiology, clinical characteristics, resistance, and treatment of infections by *Candida auris*. *Journal of Intensive Care*, 6(2), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s40560-018-0342-4>
- Cruz, S., Diaz, P., & Mazon, G. (2017, 12 julio). Genoma de *Candida albicans* y resistencia a las drogas. *Salud Uninorte*, 33(3). <http://www.scielo.org.co/pdf/sun/v33n3/2011-7531-sun-33-03-00438.pdf>
- Da Silva, A., Lee, K., Raziunaite, I., Schaefer, K., & Wagener, J. Yadav, B. y Gow, N. A. (2016). Cell biology of *Candida albicans*–host interactions. *Current Opinion Microbiol*, 34(1), 111–118. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5660506/pdf/main.pdf>
- Dadar, M, Tiwari, R., Karthik, K., Chakraborty, S., Shahali, Y., Dhama, K. (2018). *Candida albicans* - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control – An update. *Microbial Pathogenesis*, 117(1), 128–138. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.02.028>
- De oliveira, G., Vasconcelos, Lopes., A. J., De Sousa, M., Filho, A. K. D., Do Nascimento, F. R. F., Ramos, R. M., Pires, E. R. R. B., De Andrade, M. S., Rocha, F. M. G., y De Andrade, C. (2018). *Candida* Infections and Therapeutic Strategies: Mechanisms of Action for Traditional and Alternative Agents. *Frontiers in Microbiol*, 9, 1–23. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01351>

- Deorukhkar, S. C. y Roushani, S. (2018). Identification of Candida Species: Conventional Methods in the Era of Molecular Diagnosis. *Annals of Microbiology and Immunology*, 1(1), 1–6. <http://www.remedypublications.com/open-access/identification-of-candida-species-conventional-methods-in-the-era-of-molecular-diagnosis-775.pdf>
- Engelkirk, P. G. y Duben, J. (2015). *Burton's Microbiology for the Health Sciences*. 10th ed. Philadelphia, USA: Wolters Kluwer Health.
- Gonzales, M, Sifuentes, J. y Ostrosky, L. (2017). Drugs in Clinical Development for Fungal Infections. *PubMed*, 77, 1–14. <https://doi.org/10.1007/s40265-017-0805-2>
- Guerra, M. A. T. (2014). *Bioestadística*. 1ra. Ed. México D.F.: FES Zaragoza.
- Hall, R. (2015). Dressed to impress: impact of environmental adaptation on the Candida albicans cell wall. *Molecular Microbiology*, 97(1), 7–17. <https://doi.org/10.1111/mmi.13020>
- Hayat, U., Idrees, M., Rehman, R., y Nadeem, F. (2015). A Review on Eucalyptus globulus: A New Perspective in Therapeutics. *International Journal of Chemical and Biochemical Sciences*, 8, 85–91. <http://www.iscientific.org/wp-content/uploads/2019/09/12-IJCBS-15-08-12.pdf>
- Hernández, R., Fernández, C. y Baptista, P. (2014). *Metodología de la Investigación*. 6ta ed. México D.F.: McGraw-Hill Education.
- Christos, K. Zervakis, S. G., Maraki, S., Alpantaki, K., Ioannidis, A., Kofteridis, D. P. y Samonis, G. (2019). Non-albicans Candida prosthetic joint infections: A systematic review of treatment. *World Journal of Clinical Cases*, 7(12), 1430–1443. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v7.i12.1430>

- Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M. y Stahl, D. A. Brock Biology of Microorganisms. 15th ed. New York, USA: Pearson Education Limited.
- Murtanza, G., Sarfraz, A., y Mukhtar, M. (2015). A Review: Antifungal Potentials of Medicinal Plants. *Journal of Bioresource Management*, 2(2), 23–31. <https://doi.org/10.35691/JBM.5102.0018>
- Nazzaro, F., Fratianni, F., Coppola, R. y De Feo, V. (2017). Essential Oils and Antifungal Activity. *Pharmaceuticals*, 10(4), 1–20. <https://doi.org/10.3390/ph10040086>
- Nett, J., & Andes, D. (2015). Antifungal Agents Spectrum of Activity, Pharmacology, and Clinical Indications. *Infect Dis Clin N Am*, 15(2), 51–83. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2015.10.012>
- Noble, S., Gianetti, B., y Witchley, J. (2017). Candida albicans cell type switches and functional plasticity in the mammalian host. *Nat Rev Microbiol*, 15(2), 96–108. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.157>
- Pineda, J., Cortés, A. A., Uribarren, T. N. J. y Castañón, L. R. (2017). Candidosis vaginal. Revisión de la literatura y situación de México y otros países latinoamericanos. *Revista Médica Risaralda*, 23(1), 38–44. <http://www.scielo.org.co/pdf/rmri/v23n1/v23n1a09.pdf>
- Rivas, C., Oranda y, M. A. y Verde, M. J. (2016). Investigación en plantas de importancia médica. Nuevo León, México, OmniaScience.
- Sepahvand, A. Eliasy, H., Mohammadi, M., Safarzadeh, A., Azarbaijani, K., Shahsavari, S., Alizadeh, M. y Beyranvand, F. (2018). A review of the most effective medicinal plants for dermatophytosis in traditional medicine. *Biomedical Research and Therapy*, 5(6), 2378--2388. <http://www.bmrat.org/index.php/BMRAT/article/view/450>
- Soliman, S., & Alnajdy, D., El-Keblawy, A. A., Mosa, K. A., Khoder, G. y Noreddin, A. M. (2017). Plants' Natural Products as Alternative Promising Anti-Candida Drugs. *Pharmacognosy Reviews*, 11(22), 104–122. https://doi.org/10.4103/phrev.phrev_8_17

- Triola, M. F. (2018). Estadística. 12va ed. México D.F.: Pearson Education.
- Whaley, S. G., Berkow, E. L., Rybak, J. M., Nishimoto, A. T., Barker, K. S. y Rogers, P. D. (2017). Azole Antifungal Resistance in *Candida albicans* and Emerging Non-*albicans* *Candida* Species. (2017). *Frontiers in Microbiology*, 7(10), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02173>
- Guadix. (2006). siembra en medio de cultivo sólido. En M. j. Garcia, Centros Hospitalarios de Alta Resolución de Andalucía (pág. 290). España: MAD.
- Ruiz, V. A. (2005). Fluconazol espectro de actividad. En V. A. Ruiz, Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica (pág. 119). Barcelona: Panamericana.

VIII.- AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primero a Dios quien permitió que pudiera seguir estudiando a pesar de las dificultades.

Quiero agradecer a mis queridos padres, y en especial a mi mamá quien me apoyó en el cuidado de mi menor hijo Alessandro Mael Ferrer Salinas para que yo pudiera asistir a las clases de farmacia.

Quiero agradecer a mi esposo quien fue el quien me animó y apoyo moralmente a seguir estudiando.

XI.- ANEXOS:

ANEXO 1

Hoja de recolección de datos

N° Repeticiones	Tamaño del halo de inhibición (mm)						FLUCONAZOL
	Aceite esencial de romero			Aceite esencial de eucalipto			
	50%	75%	100%	50%	75%	100%	
1	12	33	35	18	36	40	34
2	13	31	35	14	35	38	32
3	12	30	32	17	36	39	33
4	12	33	34	16	33	39	33
5	10	32	34	18	34	41	31
PROMEDIO	11.8	31.8	34	16.6	34.8	39.4	32.6

ANEXO 2



Figura 1: *Eucalyptus globulus* L “eucalipto”



Figura 2: Secado de *Eucalyptus globulus* L “eucalipto”



Figura 3: *Rosmarinus officinalis* L. “romero”



Figura 4: Secado de *Rosmarinus officinalis* L. “romero” a 40°



Figura 5: Material de Laboratorio necesario para realizar nuestra investigación



Figura 6: Equipo para destilación por arrastre de vapor necesario para realizar nuestra investigación

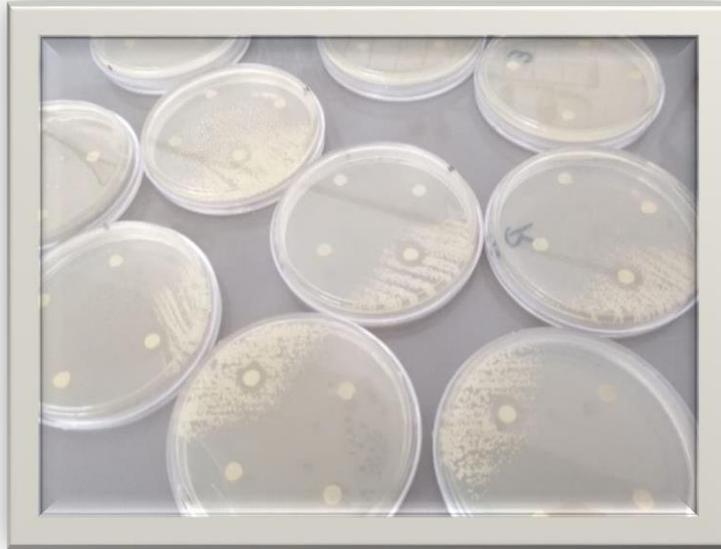


Figura 7: Antibiograma de *Cándida albicans*



Figura 8: Preparación de los discos con aceite esencial a diferentes concentraciones



Figura 9: Siembra del *Cándida Albicans* en las placas Petri.



Figura 10: Preparación del aceite esencial a diferentes concentraciones

ANEXO 3



Figura 11: Constancia de ejecución de proyecto

ANEXO 4



Technical Data Sheet

Sabouraud-4 % Dextrose Agar

acc. harm. EP/USP/JP

Ordering number: 1.05438.0500 / 1.05438.5000

Sabouraud-4 % Dextrose Agar is designed for the determination of the total count of yeasts and molds.

This medium complies with the recommendations of the harmonized methods of EP, USP, JP for Microbial Examination of Non-sterile Products: Microbial Enumeration Test and Tests for Specified Microorganisms.

Mode of Action

Sabouraud-4 % Dextrose Agar is a complex medium for cultivation and isolation of yeasts and molds as well as the absence test for *Candida albicans*. The high concentration of dextrose in addition with the low pH promotes the growth, the formation of spores (*Conidia* and *Sporangia*) as well as the formation of pigments of yeasts and molds. On the other side, growth of bacteria is inhibited.

Typical Composition

Peptone from Casein	5 g/l
Peptone from Meat	5 g/l
D(+)-Glucose (= Dextrose)	40 g/l
Agar-Agar	15 g/l

Preparation

Suspend 65 g/l. Autoclave 15 min at 121 °C. Do not overheat.

The appearance of the medium is clear and yellowish-brown.

The pH value at 25 °C is in the range of 5.4-5.8.

Experimental Procedure and Evaluation

The plates are inoculated with sample material according to the instructions. The fungi colonies which have grown are judged macro- and microscopically.

Incubation: up to 7 days at 28 °C aerobically, for *Candida albicans* and *Aspergillus brasiliensis* (formerly *A. niger*) up to 5 days at 30-35 °C

EMD Millipore Corp. is a subsidiary of Merck KGaA, Darmstadt, Germany

Storage

The product can be used for sampling until the expiry date if stored upright, protected from light and properly sealed at +15 °C to +25 °C.

After first opening of the bottle the content can be used up to the expiry date when stored dry and tightly closed at +15 °C to +25 °C.

Disposal

Please mind the respective regulations for the disposal of used culture medium (e.g. autoclave for 20 min at 121 °C, disinfect, incinerate etc.).

Quality Control

Control Strains	ATCC #	Incubation	Expected Results
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	18748	7 days at 28 °C	Growth fair to very good
<i>Trichophyton rubrum</i>	28188	7 days at 28 °C	Growth fair to good
<i>Microsporum gallinae</i>	12108	7 days at 28 °C	Growth fair to very good
<i>Trichophyton ajelloi</i>	28454	7 days at 28 °C	Growth fair to good
<i>Microsporum canis</i>	36299	7 days at 28 °C	Growth good to very good
<i>Geotricum candidum</i>	1240	7 days at 28 °C	Growth good to very good
<i>Penicillium commune</i>	10428	7 days at 28 °C	Growth good to very good

Please refer to the actual batch related Certificate of Analysis.

Quality Control (Spiral Plating Method)

Control Strains	ATCC #	Inoculum CFU	Incubation	Expected Results
<i>Candida albicans</i>	10231	10-100	5 days at 20-25 °C	Recovery ≥ 70 %
<i>Aspergillus brasiliensis</i> (formerly <i>A. niger</i>)	16404	10-100	5 days at 20-25 °C	Recovery ≥ 50 %

Please refer to the actual batch related Certificate of Analysis.



Trichophyton rubrum



We provide information and advice to our customers on application technologies and regulatory matters to the best of our knowledge and ability, but without obligation or liability. Existing laws and regulations are to be observed in all cases by our customers. This also applies in respect to any rights of third parties. Our information and advice do not relieve our customers of their own responsibility for checking the suitability of our products for the envisaged purpose.

EMD Millipore and the M logo are registered trademarks of Merck KGaA, Darmstadt, Germany. Lit. No. TN1360ENUS

Literature

European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare. (2014): The European Pharmacopoeia. 8th Ed. Chapter 2.6.12 Microbiological examination of non-sterile products: Microbial enumeration tests and Chapter 2.6.13 Microbiological examination of non-sterile products: Test for specified products. Strasbourg, France.

Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare. (2011): The Japanese Pharmacopoeia. 16th Ed. Chapter 4.05 Microbial Limit Test I. Microbiological examination of non-sterile products: Total viable aerobic count and II. Microbiological examination of non-sterile products: Test for specified products. Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare. Tokyo, Japan.

Sabouraud R.J.A. (1892). Ann. Dermatol. Syphil. 3: 1061.

Sabouraud R.J.A. (1910). Les Teignes. Masson, Paris.

United States Pharmacopeial Convention. (2014): The United States Pharmacopeia 38/National Formulation 33, Supp. 2. Chapter <61> Microbiological examination of non-sterile products: Microbial enumeration tests and Chapter <62> Microbiological examination of non-sterile products: Test for specified products. Rockville, Md., USA.

Ordering Information

Product	Cat. No.	Pack size
Sabouraud-4 % Dextrose Agar	1.05438.0500	500 g
Sabouraud-4 % Dextrose Agar	1.05438.5000	5 kg

EMD Millipore Corporation
290 Concord Road
Billerica, MA 01821, U.S.A.
mibio@emdmillipore.com
www.emdmillipore.com/biomonitoring

Find contact information for your country at:
www.emdmillipore.com/offices
For Technical Service, please visit:
www.emdmillipore.com/techservice



We provide information and advice to our customers on application technologies and regulatory matters to the best of our knowledge and ability, but without obligation or liability. Existing laws and regulations are to be observed in all cases by our customers. This also applies in respect to any rights of third parties. Our information and advice do not relieve our customers of their own responsibility for checking the suitability of our products for the envisaged purpose.

EMD Millipore and the M logo are registered trademarks of Merck KGaA, Darmstadt, Germany. Lit. No. TN1360ENUS

ANEXO 5



CONSTANCIA

El que suscribe:

Director del Herbario CPUN "Isidoro Sánchez Vega-UNC", de la Universidad Nacional de Cajamarca, hace constar, que de parte de **MAYRA KELY SALINAS HERRERA**, bachiller de la Facultad de Medicina Humana, de la Escuela Académico Profesional de Farmacia y Bioquímica, de la **Universidad Privada San Pedro, Filial Trujillo**; he recibido dos muestras botánicas, las mismas que fueron ubicadas taxonómicamente, en esta dependencia, como:

CATEGORÍA TAXONÓMICA	MUESTRA "A"	MUESTRA "B"
Reino	Plantae	Plantae
División	Magnoliophyta	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida	Magnoliopsida
Orden	Lamiales	Myrtales
Familia	Lamiaceae	Myrtaceae
Género	Rosmarinus	Eucalyptus
Especie	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	<i>Eucalyptus globulus</i> L.

La especie "A" conocida en el medio como "romero", fue colectada en el lugar llamado El Porvenir, distrito de Otuzco, provincia de Otuzco, departamento de La Libertad a 2,641 msnm, en las coordenadas siguientes: S 7°54'16" O 78°33'49", y la especie "B", llamado "eucalipto" o "alcanfor" colectada en el distrito de Laredo, provincia de Trujillo y departamento de La Libertad en las coordenadas siguientes: S 8°05'12" O 78°57'35", a una altitud de 89 msnm.

Se extiende la presente, a solicitud de la parte interesada, para los fines que estime conveniente.

Cajamarca, 29 de marzo de 2021



M.Sc. Gustavo IBERICO VELA

DIRECTOR

Av. Atahualpa 1050 Ciudad Universitaria. Edificio 1D-204 - Cajamarca

