



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE
ESTOMATOLOGÍA

TESIS

EFFECTO ANTIFÚNGICO *in vitro* DEL
EXTRACTO ACUOSO DE *Rosmarinus*
officinalis* “ROMERO” CONTRA *Candida
albicans

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
CIRUJANO DENTISTA

Autor:
Bach. Vallejos Campos Elmer Cesar

Asesor:
MsC. Blgo. Pérez Delgado Orlando

Línea de investigación:
Respuestas Biológicas En Terapias Estomatológicas

Pimentel, octubre 2017

EFFECTO ANTIFÚNGICO *in vitro* DEL EXTRACTO ACUOSO DE
Rosmarinus officinalis "ROMERO" CONTRA *Candida albicans*

Aprobación de la tesis

Mg. CD. Paola Beatriz La Serna Solari
Asesor metodólogo

Mg. CD. Roberto Carlos Ojeda Gómez
Presidente del jurado de tesis

Mg. CD. Jorge Ruíz Cárdenas
Secretario del jurado de tesis

MSc. Blgo. Pérez Delgado Orlando
Vocal del jurado de tesis

I. DEDICATORIA

A Dios quien me guía, día a día con su infinita sabiduría, conocimientos y es inspiración en mi preparación profesional

A mi adorada madre Ormecinda Campos Fonseca, por su inmenso y dedicado sacrificio que me sirven de ejemplo, para poder lograr mis metas

A mi querido Padre Felipe Vallejos Toro, por haber inculcado a sus hijos, valores morales y saber valorar el sacrificio de ellos.

A mis hermanos José Luis Vallejos Campos y Elizabeth Vallejos Campos, por su alentadora inspiración, su comprensión y porque siempre estarán a mi lado cuando los necesite.

II. AGRADECIMIENTOS

A mi Asesor y profesor Orlando Pérez Delgado, quién me dio la confianza, al brindarme la oportunidad de llevar a cabo este trabajo de tesis, con disciplina, constancia, responsabilidad, por sus enseñanzas y sobre todo por compartir su tiempo para la culminación del presente trabajo.

Al jurado integrado por por los docentes, MsC. Blgo. Pérez Delgado Orlando, Mg. CD. Jorge Ruíz Cardenas y Mg. CD. Roberto Carlos Ojeda Gomez, por sus correcciones oportunas y completa disposición en la evaluación del trabajo.

A todos mis docentes que me formaron y me orientaron en la parte investigativa, y como ejemplo de imagen docente en sus enseñanzas en mi formación de pos grado.

A mis amigos Melany Díaz Montenegro, Kaplan Alcántara y colegas, quienes sin estar involucrados directamente, me dieron su apoyo para seguir adelante.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	III
AGRADECIMIENTOS.....	IV
RESUMEN.....	V
ABSTRACT.....	VI
INTRODUCCIÓN.....	VII
CAPÍTULO I	
Situación Problemática.....	3
Formulación del Problema.....	5
Justificación e Importancia.....	6
Objetivos.....	7
CAPÍTULO II	
Antecedentes de investigación.....	8
Estado del arte.....	12
Base teórico.....	20
Definición de términos.....	32
CAPÍTULO III	
Tipo de investigación.....	33
Diseño de investigación.....	33
Población y muestra.....	34
Hipótesis.....	34
Preparación del extracto acuoso.....	36
Preparación del agente antifúngico.....	37
Preparación del inóculo.....	38
Actividad antifúngica.....	38
CAPÍTULO IV	
Resultados.....	42
Discusión.....	46
CAPÍTULO V	
Conclusiones.....	48
Recomendaciones.....	49
Referencias Bibliográficas.....	50
ANEXOS.....	53

ÍNDICES DE TABLAS, FIGURAS, GRÁFICAS

TABLAS

Tabla 1.....	45
Tabla 2.....	46

FIGURAS

Figura 1.....	43
Figura 2.....	44
Figura 3.....	45
Figura 4.....	53
Figura 5.....	53
Figura 6.....	54
Figura 7.....	54
Figura 8.....	55
Figura 9.....	55
Figura 10.....	56
Figura 11.....	56

GRÁFICAS

Gráfica 1.....	45
----------------	----

RESUMEN

Objetivo: Determinar el efecto antifúngico *in vitro* del extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis* "Romero" contra *Candida albicans*

Material y métodos: Estudio experimental, diseño de estímulo creciente. Se emplearon 12 unidades experimentales, se emplearon 6 concentraciones diferentes del extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis* y dos cepas de la especie de *C. albicans*. Con el método de dilución doble seriada se determinaron las diferentes concentraciones, para el efecto antifúngico se empleó el método de Kirby-Bauer y el método de difusión en pozo.

Resultados: Se emplearon 2g de residuo seco de *Rosmarinus officinalis*, se obtuvieron las siguientes concentraciones 40 mg/mL, 20 mg/mL, 10 mg/mL, 5 mg/mL, 2,5 mg/mL y 1,25 mg/mL. Presentó efecto antifúngico a 40 mg/mL, 20 mg/mL, 10 mg/mL respectivamente.

Conclusiones: El extracto acuoso de hojas de *Rosmarinus officinalis* tiene efecto antifúngico contra *Candida albicans*

Palabras clave: Antifúngico, extracto acuoso, *Candida albicans* (Fuente: BIREME)

ABSTRACT

Objective: To determine the in vitro antifungal effect of the aqueous extract of *Rosmarinus officinalis* "Romero" against *Candida albicans*

Material and methods: Experimental study, design of increasing stimulus. Twelve experimental units were used, 6 different concentrations of the aqueous extract of *Rosmarinus officinalis* and two strains of *C. albicans* species were used. With the double serial dilution method, the different concentrations were determined, the Kirby-Bauer method and the well diffusion method were used for the antifungal effect.

Results: 2 g dry residue of *Rosmarinus officinalis* were used, the following concentrations were obtained: 40 mg / mL, 20 mg / mL, 10 mg / mL, 5 mg / mL, 2.5 mg / mL and 1.25 mg / mL. It presented antifungal effect at 40 mg / mL, 20 mg / mL, 10 mg / mL, respectively.

Conclusions: The aqueous extract of *Rosmarinus officinalis* leaves has an antifungal effect against *Candida albicans*

Key words: Antifungal, aqueous extract, *Candida albicans* (**Source:** MeSH NLM)

INTRODUCCIÓN

La candidiasis oral es una infección oportunista de la cavidad oral. Es común y subdiagnosticados entre los ancianos, particularmente en aquellos que usan dentaduras postizas y en muchos casos es evitable con un buen régimen de cuidado de la boca. También puede ser un riesgo de enfermedad sistémica, como la diabetes mellitus y es un problema común entre los inmunocomprometidos¹.

La incidencia de *C albicans* aislados de la cavidad oral ha sido de 45% en neonatos, 45% -65% de niños sanos, 30% -45% de adultos sanos, 50% -65% de personas que usan prótesis removibles, 65% -88% en aquellos que residen en centros de cuidados agudos y de larga duración, 90% de los pacientes con leucemia aguda sometidos a quimioterapia, 13 y 95% de los pacientes con VIH¹.

Por tal motivo el presente estudio tuvo como objetivo Determinar el efecto antifúngico *in vitro* del extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis* "Romero" contra *Candida albicans*, Además, no existen reportes de trabajos que revelen el efecto antifúngico del extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis* "Romero" contra *Candida albicans*.

Los resultados de este estudio permitirán determinar si el extracto acuoso tiene actividad antifúngica.

En el primer capítulo encontramos a la situación problemática sobre candidiasis en diferentes tipos de pacientes.

Para poder analizar esta problemática fue necesario mencionar las causas y buscar el mecanismo de controlar su inhibición a nivel in vitro con extracto acuoso.

En el segundo capítulo encontraremos antecedentes clasificados por el investigador para dar énfasis a la investigación.

En el tercer capítulo se encuentra el marco metodológico, en la investigación se empleó un enfoque cuantitativo, de tipo experimental con estímulo creciente.

CAPÍTULO I: PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Situación Problemática

La candidiasis se define como una infección causada por un hongo del género *Candida*, y el término candidiasis oral sólo se utiliza cuando se describe una lesión clínicamente visible en la cavidad oral. La lesión puede variar en tamaño, forma y color, dependiendo en gran medida de los factores predisponentes detrás de la enfermedad².

Candida albicans es un microorganismo comensal oral, su ocurrencia en la cavidad oral es de un 50-70% de los individuos sanos. Su efecto sobre la ecología oral se ha estudiado principalmente utilizando modelos de especies duales, lo que desatiende la naturaleza compleja de los biofilms orales. *C. albicans* es capaz de proliferar en biofilms cultivadas en condiciones aerobias. Sin embargo, en condiciones aerobias, sólo los biofilms que contenían *C. albicans* mostraron autofluorescencia roja. Los géneros anaeróbicos facultativos o estrictamente como *Veillonella*, *Prevotella*, *Leptotrichia* y *Fusobacterium*, fueron significativamente más abundantes en biofilms con *C. albicans*. Los biofilms sin *C. albicans* contenían más de los géneros aerobios y facultativos anaeróbicos *Neisseria*, *Rothia* y *Streptococcus*. Este estudio in vitro ilustra que *C. albicans* no debe despreciarse en ecosistemas bucales saludables, ya que tiene el potencial de influenciar significativamente a las bacterias³.

Las infecciones frecuentes de la cavidad oral ocasionadas con *Candida* se manifiestan en los ancianos. Aunque la causa real se desconoce, se sabe que existe una prevalencia aumentada en ciertas ocasiones como ocurre en personas de avanzada edad, en presencia de prótesis mucosoportadas, xerostomía o en patologías relacionadas frecuentemente en los mayores⁴. Asimismo en otros estudios han revelado que la prevalencia de *Candida* entre pacientes diabéticos fue del 70% y entre los no diabéticos el 30%. La prevalencia de *Candida* entre los grupos diabéticos se asoció significativamente con higiene oral ($P = 0,000$), gingivitis ($P = 0,004$) y uso de prótesis ($P = 0,002$). En conjunto, los resultados del presente estudio demostraron claramente que los pacientes diabéticos son más propensos a desarrollar la infección por *Candida* en comparación con los no diabéticos. *Candida* se asoció significativamente con la higiene bucal, la gingivitis y el uso de prótesis⁵.

Además se sabe que la estomatitis de la dentadura puede ocurrir en respuesta a la acumulación de placa en dentaduras postizas. Uno de los principales microorganismos patógenos que causan este tipo de inflamación es *Candida albicans*. Un síntoma común de candidiasis oral es el dolor en la mucosa oral complicado por estomatitis angular⁶.

Como también la candidiasis⁷ de la mucosa oral surge principalmente como resultado de la infección por *Candida albicans* el rango de edad afecta a individuos de 60-79 años (61.0%, p <0.01). Las áreas predominantemente afectadas son la lengua (48,3%, p <0,01) la encía (20,0%, p <0,01), y la ocurrencia en múltiples lesiones fue observada en 43 (9,6%) pacientes. Los hallazgos clínicos típicos de la candidiasis oral fueron lesiones ulcerativas / eritematosas (33,2%, p <0,01) y candidiasis pseudomembranosa (31,6%, p <0,01).

1.2. Formulación del Problema

¿Existe efecto antifúngico *in vitro* del extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis* “Romero” contra *Candida albicans*?

1.3. Delimitación de la Investigación

La ejecución del trabajo de investigación titulado: efecto antifúngico *in vitro* del extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis* “Romero” contra *Candida albicans*, se ejecutó en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Señor de Sipán.

El tiempo que tomará la ejecución del proyecto de investigación desde Abril del 2017 hasta Junio del 2017. (3 meses).

1.4. Justificación e Importancia de la Investigación

El presente trabajo de investigación se justifica en la gran incidencia de infecciones bucales ocasionada por *Cándida albicans* reportados a nivel hospitalario y centros de salud y que pueden ser resistentes a muchos antifúngicos de uso común y vehiculizadas por equipos o procedimientos invasivos.

Además, no existen reportes de trabajos que revelen el efecto antifúngico del extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis* "Romero" contra *Candida albicans*.

Los resultados de este estudio permitirán determinar si el extracto acuoso tiene actividad antifúngica, teniendo con ello la posibilidad de incentivar otros estudios destinados a, demostrar el efecto inhibitorio sobre otros microorganismos tipo parásitos u otros tipos de especies de hongos, la purificación del producto, a su uso en terapia o como desinfectante o como indicador de inhibición del crecimiento microbiano, como también para elaboración de posibles colutorios.

1.5. Limitaciones de la Investigación

Una limitación para la ejecución fue no contar con una cepa estándar de *Candida albicans*, pero se empleó cepas aisladas e identificadas en el Hospital Regional Lambayeque.

1.6. Objetivos de la Investigación

Objetivo general

Determinar el efecto antifúngico *in vitro* del extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis* “Romero” contra *Candida albicans*

Objetivos específicos

Determinar la zona de inhibición del extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis* “Romero” contra *Candida albicans* mediante el método Kirby-Baeur.

Determinar la zona de inhibición del extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis* “Romero” contra *Candida albicans* mediante el método difusión en pozo.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de investigación:

Muhammad *et al*, (2015) realizaron un estudio con el objetivo de determinar la actividad antifúngica de extracto acuoso de *Mimosa pudica* contra aislamientos de hongos de máquinas de afeitar en Sokoto Metropolis, Nigeria. Dos de los ocho hongos aislados de la máquina afeitar mostraron una zona de inhibición significativa. *Trichophyton verrucosum* y *T. soudanense* revelaron el mayor diámetro de la zona de inhibición a 200 mg/mL, 250 mg/mL y 300 mg/mL para extracto acuoso de hojas de *M. pudica*, respectivamente, mientras que *Microsporum canis* reveló el menor diámetro de la zona de inhibición a 150 mg/mL, 200 mg/mL y 250 mg/mL y *T. concentricum* y *M. gypseum* no se presentaron zona de inhibición. La presencia de componentes fitoquímicos podría ser la razón para la inhibición en el crecimiento de algunos de los microorganismos⁸.

Gupta *et al*. (2014) Realizaron un estudio con el objetivo de determinar la actividad antifúngica del extracto acuoso de hojas de *Ocimum sanctum* en especies fungólicas dominantes de monumentos. Cuatro especies comunes de hongos aislados *Aspergillus niger*, *Rizopous*, *Cladpsorium* y *Curvularia lunata* del sitio arqueológico fueron sometidos a experimentos de laboratorio que involucraron el control in

vitro de las especies de hongos usando extractos de plantas. Se determinaron extractos de hojas acuosas al 10%, 20%, 30% y 40% con las concentraciones de control (medio basal) ensayadas en agar de dextrosa de patata (PDA) para la actividad contra el crecimiento de micelio a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ con tres placas replicadas. Los valores de crecimiento fúngico registrados fueron generalmente bajos en comparación con el control (sin placa de petri extracto). El extracto mostró actividad antifúngica a diferentes concentraciones 10%, 20%, 30% y 40% de la solución preparada para el estudio. Se encontró que el extracto de la planta a una concentración del 40% era eficaz para reducir el crecimiento micelial de *A. niger*, *Rizopous*, *Cladpsporium sp.* Mientras que el 30% de extracto vegetal es efectivo para *Curvularia lunata*. Extractos de plantas fácilmente disponibles y asequibles y respetuosos con el medio ambiente en el control de enfermedades fúngicas⁹.

Mahmoud *et al.* (2011) realizaron un estudio para evaluar el efecto de extractos acuosos de las hojas de neem en el crecimiento de algunos patógenos humanos (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Candida albicans* y *Microsporum gypseum*) in vitro. Diferentes concentraciones (5, 10, 15 y 20%) preparadas a partir de estos extractos inhibieron el crecimiento de los patógenos de ensayo y el efecto aumentó gradualmente con la

concentración. El 5% de extracto acuoso de hoja de neem causó una inhibición en el crecimiento de los seis patógenos fúngicos de prueba. El más alto (35,22%) se registró en *A. niger*, mientras que el más bajo (4,00%), fue en *C. albicans*. Una concentración del 10% moderadamente inhibió el crecimiento de todos los hongos de prueba con el valor más alto (49,55%) registrado en *A. niger* y el más bajo (11,53%) en *C. albicans*. Se registró una inhibición del 86,22% en el crecimiento de *A. niger* en comparación con el 38,44% en el crecimiento de *M. gypseum*, cuando el extracto acuoso de hoja de neem se ensayó a una concentración del 15%. Estas relaciones de inhibición saltaron a 100% y 53,66% en el crecimiento de *A. niger* y *M. gypseum* durante el ensayo con la concentración del 20%¹⁰.

Omidpanah *et al.* (2015) realizaron un estudio para evaluar Actividad antifúngica de extractos acuosos de Plantas medicinales contra *Aspergillus flavus*, aflatoxina de pistacho producido por hongos *in vitro*. Se añadieron extractos con diferentes concentraciones (200-800 µg/mL) y polietilenglicol con el mismo potencial osmótico de extractos de plantas al medio de agar de dextrosa de papa para evaluar el crecimiento del hongo después de 7 días usando el método de dilución en agar Benomyl, un fungicida, se utilizó como un estándar positivo. Los ensayos se realizaron por triplicado, y también se calcularon los diámetros medios de crecimiento de hongos. Todas las

concentraciones de los extractos de plantas inhibieron significativamente el crecimiento del hongo en comparación entre sí y los tratamientos de control, mientras que los extractos de tomillo y cártamo manifestaron la prohibición más efectiva comparada con benomil con una concentración inhibitoria mínima de 200 y 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ¹¹.

Ubulum et al. (2011), analizaron los extractos acuosos y etanólicos de las semillas de *Picralima nitida* para determinar sus actividades antifúngicas utilizando *Aspergillus flavus*, *Candida albicans* y *Microsporum canis* como organismos de ensayo. El análisis fitoquímico reveló la presencia de algunos metabolitos de plantas que se ha informado que tienen efectos antimicrobianos. Los ensayos se realizaron usando concentraciones de extracto de 25, 50, 100 y 200 mg / ml y se empleó la técnica de difusión de pozos de agar. Los resultados obtenidos, revelaron una diferencia significativa ($P < 0,05$) en el diámetro de la zona de inhibición entre *A. flavus* y *C. albicans* y entre *C. albicans* y *M. canis*. Sin embargo, no hubo diferencias significativas ($P > 0,05$) en el diámetro de la zona de inhibición entre *A. flavus* y *M. canis*. Con el extracto acuoso de semilla, se observó una diferencia significativa ($P < 0,05$) en el diámetro de la zona de inhibición entre *A. flavus* y *C. albicans* y entre *A. flavus* y *M. canis* pero no hubo diferencias significativas ($P > 0,05$) en la inhibición Entre *C. albicans* y

M. canis. La actividad inhibidora del extracto etanólico en cada organismo de ensayo se comparó con la del extracto acuoso y en todos los casos la diferencia observada fue significativa ($P < 0,05$). Estos hallazgos indican el potencial de las semillas de *P. nitida* como panacea para algunas infecciones fúngicas¹².

Nasrollahi y Abolhasannezhad (2015). En este estudio, se examinó la propiedad antifúngica de extractos de hoja de olivo contra *Candida albicans* PTCC-5027. Se prepararon extractos de hojas de olivo frescas utilizando agua destilada en un aparato Soxhlet. La actividad antifúngica del extracto se analizó midiendo la concentración inhibitoria mínima (MIC) y la concentración fungicida mínima (MFC), utilizando el ensayo de microdilución y el ensayo de difusión en disco. Los extractos acuosos de hojas de olivo exhibieron efectos antifúngicos contra la levadura con una CIM de 24 mg / ml, MFC de 48 mg / ml y un diámetro de la zona de inhibición de 21 mm. Los resultados indicaron la sensibilidad de *Candida albicans* PTCC-5027 a extractos acuosos de hoja de olivo¹³.

2.2. Estado del arte

El estudio publicado por Mendez y Herrera en el 2001 da un enfoque sobre los antifúngicos empleados¹⁴.

Agentes antifúngicos sistémicos

Polienos

La anfotericina B (1956, E. R. Squibb & Sons, Princeton, NJ), en la presentación liposomal de complejo de anfotericina B y los lípidos son los macrólidos poliénicos, que se utilizan principalmente en el tratamiento de infecciones sistémicas e infecciones fúngicas del tratamiento a largo plazo. La formulación liposomal y el complejo lipídico de anfotericina B se sometieron a una evaluación clínica. Agentes antifúngicos de polieno actúan mediante la unión a la ergosterol de la membrana celular, lo que provoca una inestabilidad osmótica y la pérdida de integridad de la membrana. La toxicidad directa de la membrana es en parte debido al daño oxidativo, a menudo fungicida. El efecto se extiende a células de mamífero en la que el fármaco se une al colesterol, que hace que la alta toxicidad asociada con los medios de polieno-similares¹⁴.

La anfotericina B es producido por *Streptomyces nodosus*; Y se ha utilizado en el tratamiento de enfermedades producidas por hongos durante muchos años, no es estable cuando, suave pH ácido o se expone al calor. Sin embargo, la resistencia a la anfotericina B es raro, pero los cambios en Membran se correlaciona con el desarrollo de resistencia tanto in vitro como in vivo. Las formulaciones liposomales y complejo lipídico de anfotericina B fueron disecados a fin de maximizar

la distribución de la anfotericina B en pacientes con infecciones fúngicas diseminadas como candidiasis hepatoesplénica y aspergilosis pulmonar invasiva, una de las ventajas de este tipo de fármacos que tienen una toxicidad selectiva de las células fúngicas y no para los eritrocitos¹⁴.

Azoles

Los azoles antifúngicos se introdujeron en la década de 1960, pero sólo un grupo de ellos tienen actividad antifúngica sistémica, miconazol, ketoconazol, fluconazol e itraconazol se muestra; Los azoles inhiben la enzima citocromo dependiente de P-450, ocasionan degeneración a la síntesis incompleta de ergosterol y la unión del ergosterol de la membrana celular de hongos¹⁴.

Miconazol, y ketoconazol se establecieron como agentes de amplio espectro para una variedad de patógenos fúngicos, incluyendo levaduras, hongos dimórficos, dermatofitos y patógenos oportunistas¹⁴.

Miconazol (1970, Janssen Pharmaceutica, Piscataway, N, J.) era para ser administrado por vía intravenosa en el tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas, el primero derivado de azol, se ha desarrollado¹⁴.

A pesar de su relativamente alta toxicidad limita su uso para ciertos casos de Pseudallescheriosis, meningitis criptocócica y meningitis coccidial infantil y la vía de administración es intraventricularmente

además del ketoconazol oral¹⁴.

Ketoconazol (1977, Janssen Pharmaceutica) es un agente antifúngico que se absorbe por vía oral, para su absorción y su penetración en el líquido cefalorraquídeo requiere un pH normal intragástrico, esto se considera una alternativa eficaz de Amphotericina B para el tratamiento de individuos inmuno-competentes con localizada establecido o histoplasmosis, blastomicosis, candidiasis mucocutánea y Paracoccidioidomicosis diseminada¹⁴.

En los últimos años, itraconazol y fluconazol fueron admitidos como agentes sistémicos orales activos con un menor potencial de toxicidad que imidazoles debido a su mayor unión específica a los citocromos de la célula micótica que de los citocromos de la célula de mamífero¹⁴.

El fluconazol (Phizer Pharmaceuticals, New York, NY) es una pequeña molécula relativamente, y soluble parcialmente en agua, se absorbe fácilmente y con una vida media prolongada (hasta 25 horas en los seres humanos), se excreta como sustancia activa en la orina y penetra en el líquido cefalorraquídeo¹⁴.

Itraconazol (Janssen Pharmaceutica) es un componente lipófilo, que se distingue por una buena absorción oral, una amplia distribución tisular y una larga vida media en el suero. El itraconazol es muy insoluble en líquidos acuosos y tiene un alto contenido de proteína (más del 90%).

Este fármaco se une fuertemente a las proteínas plasmáticas y penetra fácilmente en el líquido cefalorraquídeo y la orina, pero se siente bien en la piel y los tejidos¹⁴.

Los inhibidores de la síntesis de pirimidina

5-Fluorodocina (5-FU) (Hoffmann-La Roche Inc., NJ) es un compuesto estable soluble en agua, para la administración oral en el tratamiento de infecciones sistémicas causadas por patógenos oportunistas y otras levaduras u hongos¹⁴.

Su modo de acción es un antimetabolito competitivo para uracilo en la síntesis de ARN de levadura, y también interfiere con la timidilato sintetasa. Existen 5 enzimas que están implicadas en el mecanismo de acción de la 5-FU. Al menos 2 sitios metabólicos son responsables de la resistencia a 5-FU, uno con la permeasa enzima citosina y la otra la enzima citosina desaminasa, la primera es con la detección de 5-FU en la célula fúngica y la segunda con la conversión del fármaco a la forma metabólicamente activa¹⁴.

Sensibilidad a los antifúngicos

En las pruebas de sensibilidad in vitro son de construcción similar a las pruebas con agentes antibacterianos. En las pruebas de sensibilidad in vitro idealmente:

- A) Presentan una actividad relativa de dos o más agentes antifúngicos.
- B) Es necesario correlacionar la actividad in vivo y predecir lo que puede esperarse en terapia.
- C) Permiten el seguimiento del desarrollo de resistencia entre las poblaciones de organismos susceptibles normales
- D) Existe una predicción del potencial terapéutico de los agentes del reciente descubrimiento.

Desafortunadamente, hay poca evidencia para apoyar los correlatos clínicos de la sensibilidad antifúngico con resultados de la prueba in vivo. Los métodos para realizar pruebas de susceptibilidad antifúngicas incluyen diluyentes caldos (macro- y micro-dilución), método de dilución en agar y, ensayo de difusión en disco¹⁴. En la actualidad, se evaluaron dos pruebas de susceptibilidad antifúngica comercial; es desarrollado por Alamar Biosciences, Inc. prueba de microdilución colorimétrica y la prueba E-test de difusión en agar antifúngico desarrollado que el de AB Biodisk (Soina, Suecia) conocido¹⁴.

El Comité Nacional de Normas de Laboratorio Clínico (NCCLS) ha propuesto como un método de referencia, el método de caldo de dilución para las pruebas de susceptibilidad de levaduras¹⁴.

La anfotericina B presenta pocos casos de resistencia a este fármaco,

especialmente para los aislados de *Candida spp.*, Zigomicetes y *Pseudallescheria boydii* no probados a menudo para la susceptibilidad¹⁴.

Los otros hongos son sensibles a este fármaco. Las pruebas de susceptibilidad a los Azoles presentan algún valor en los aislados de levadura, como la susceptibilidad de levadura a estos fármacos es variable. Sin embargo, estas pruebas no están garantizadas para los hongos dimórficos porque estas cepas son susceptibles a ella en general. En las pruebas de sensibilidad *in vitro* con 5-FC son clínicamente importante que la prueba utilizando polieno o compuestos de azol, desde que se detectó la resistencia al 5-FC como la aparición de cepas de levaduras y otros hongos resistentes después de la exposición terapéutica a este fármaco¹⁴.

La mayoría de los hongos, incluyendo hongos dimórficos son resistentes a 5-FC. Sin embargo, los resultados de estas pruebas deben ser interpretados con precaución debido a que los resultados no siempre son predictivos de las reacciones clínicas¹⁴.

La prueba de susceptibilidad antifúngica está influenciada por un número de variables técnicas, incluyendo el inóculo y la preparación, la formulación y el pH del medio, la duración y la temperatura de incubación, así como los criterios para determinar el punto final.

Además, la prueba de susceptibilidad antifúngica se complica por problemas de los mismos hongos, una tasa de crecimiento lento, como una levadura unicelular para crecer (en comparación con la bacteria) y la capacidad de ciertos hongos dimórficos que producen blastoconidios, hifas o formas de los filamentos de los hongos producido que producen esporas asexuales, en función de pH, temperatura y composición del medio¹⁴.

Por último, las propiedades básicas de agentes antifúngicos tales como la solubilidad, estabilidad química, modos de acción y la tendencia es a causar una inhibición parcial del crecimiento en un amplio rango de concentración a considerar¹⁴.

La determinación de la concentración inhibitoria mínima es un paso crítico en la prueba de susceptibilidad antifúngica, en particular con azoles. Lo observado con 5-FC inhibición parcial y azoles hace que sea difícil determinar un buen punto final, y crea una gran cantidad de variabilidad¹⁴.

Tradicionalmente, la concentración inhibitoria mínima se consideró como la concentración más baja de un agente antifúngico que inhibe completamente el crecimiento de un hongo¹⁴.

La determinación de la concentración inhibitoria mínima o del punto final con un criterio menos estricto (baja turbidez cerca del punto final

se ignora), la reproducibilidad entre diferentes laboratorios ha aumentado y un cambio en la distribución de CMI a bajas concentraciones de medicamentos para *Candida albicans* y *Candida tropicales* especialmente cuando se utilizan azoles¹⁴.

2.3. Base teórica científicas

Rosmarinus officinalis “**ROMERO**”

Descripción y hábitat

Este arbusto aromático pertenece a la familia Labiatae. Puede tener una altura de 50 a 150 cm y es perenne, frondoso y muy ramificado¹⁵.

Los principios activos se concentran en las hojas y a veces en el pico de la floración. Los primeros son opuestos, coriáceas y estrecho lineal. Puede medir hasta 3 cm de largo y 4 mm de ancho, y sus márgenes globales que se enrollan hacia abajo, se ven casi cilíndrica. La cara superior de las hojas jóvenes son peludas e intensos verdes hojas adultas carecen de pelos o tricomas. Esta cara es áspera y surcada por el nervio mediano, que está dividido. Las proyecciones nerviosas claras de la parte inferior que está cubierta por un denso tomento blanco¹⁵.

La floración dura casi todo el año y las flores labiadas se agrupan en inflorescencias densas, que se encuentran en las axilas de las hojas. La corola es azul, rosa o blanco, con manchas de color púrpura en el interior y tienen dos estambres dobladas que están unidos a la corola y

tienen un pequeño diente. Estas flores tienen dos labios bien marcados, la superior con dos lóbulos y la parte inferior con tres, de las cuales la etapa intermedia es cóncava y alargada. El fruto es una tetraquenio parduzco¹⁵.

Toda la planta desprende un olor fuerte, aromático, similar al alcanfor. Su sabor característico también es aromático, áspero y ligeramente picante ¹⁵.

Este arbusto, típico de las zonas áridas y secas, se origina en el mediterráneo, donde se cultiva.

De hecho, sus principales países productores de España, Marruecos y Túnez. La recolección se lleva a cabo entre abril y julio y será entregado en cajas de cartón o bolsas de papel.

Composición química

Las hojas de Romero contienen de 1,0 a 2,5% de aceite esencial que se compone de monoterpenos tales como 1,8-cineol, alfa-pineno, alcanfor, alfa-terpineol, canfeno, borneol, acetato de bornilo, limoneno, linalool, mirceno, verbenona. También presentan sesquiterpenos como el beta-cariofileno. Sin embargo, la composición de aceite esencial de romero en función de diversos factores, varían considerablemente la parte de la planta, el grado de desarrollo de la planta en el momento de la encuesta o el origen geográfico. En el Mediterráneo se distinguen dos tipos de esencias de romero: los tipos Marruecos, Túnez, que

tienen un alto contenido de 1,8-cineol y el tipo español que tiene un menor contenido de 1,8-cineol¹⁵.

Las hojas de romero presentan principios amargos, que consta de diterpenos (Picrosalvin, carnosol, isorosmanol, Rosmadial, rosmaridifenol, Rosmarichinon) y triterpenos (oleanolische y ursolische ácidos y sus 3-acetil). Los Flavonoides (Cirsimarina, diosmina, hesperidina, Homoplantiginina, Fegopolina, nepetina y Neptina) y polifenoles (ácido rosmarínico, ácido clorogénico, ácido cafeico, y ácidos fenólicos de ácido cinámico)¹⁵.

Actividad farmacológica

El romero es carminativo, digestivo y antiespasmódico y tiene capacidades coleréticos, colágeno y las propiedades hepatoprotector.

El efecto favorable que tiene sobre la digestión se produce en el acto en varios niveles. En primer lugar, estimula la producción de jugos digestivos.

También relaja los músculos lisos gastrointestinales, elimina posibles calambres y promueve secreciones. Al relajar el cardias, que tiene un efecto carminativo y colagogo, gracias a la relajación del esfínter de Oddi.

La planta también ejerce una actividad diurética, anti-inflamatorio, antiulcerosa y efectos antioxidantes. Si bien no se han descrito estudios clínicos sobre estas propiedades farmacológicas en la literatura científica, que se hayan detectado *in vivo* y en pruebas *in*

vitro. Su actividad colagoga, colerética y hepatoprotección, así como su efecto diurético en ratas y conejillos de indias. Algunas pruebas farmacológicas también han demostrado que el aceite esencial, algunos extractos y algunos de sus componentes aislados relajan los músculos lisos traqueales, intestinales y vasculares de varios animales. Y aunque el mecanismo de acción no está del todo claro, algunos autores creen que es debido a un efecto antagonista del calcio, especialmente en los efectos relajantes de aceite esencial en el músculo liso traqueal.

En cuanto al efecto anti-inflamatorio de sustancias activas del romero, se halló en los animales de experimentación que el ácido rosmarínico aumenta la producción de prostaglandina E2 y disminuye la producción de leucotrieno B4 en leucocitos polimorfonucleares humanos. También se observó que este ácido fenólico inhibe el sistema del complemento.

Por esta razón, su uso en el tratamiento o la prevención de diversas condiciones inflamatorias podría ser útil. También se ha demostrado en ratas que el extracto hidroalcohólico de la planta presenta una actividad antiulcerosa, algunos investigadores afirman que el efecto se debería a los componentes antioxidantes contenidos en el mismo¹⁵.

Los estudios sobre la actividad farmacológica de los componentes de romero actualmente en curso están dirigidos principalmente a

diterpenos (especialmente rosmanol), despertó el gran interés debido a sus propiedades antioxidantes¹⁵.

De hecho, cuando los diterpenos contenidas en el romero se biosintetizan en las plantas en respuesta al estrés oxidativo, que ejerce un efecto protector sobre las membranas celulares de las plantas, no es de extrañar que tienen un fuerte efecto antioxidante y captadores de radicales. Sin embargo, se encontró que estos dos componentes aislados y extractos de la droga tienen esta actividad¹⁵.

Por otra parte, se ha demostrado que inhiben la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y el envejecimiento causado por fenómenos de oxidación de la piel.

Algunos estudios recientes muestran que el carnosol promueve la síntesis de un factor de crecimiento neuronal, que es esencial para el crecimiento y mantenimiento del tejido nervioso.

Finalmente, la naturaleza de la planta tiene antibacteriano, antiséptico, fungicida y propiedades balsámicas. Es debido a este efecto balsámico para lo que se utiliza comúnmente para combatir las enfermedades respiratorias. A cambio, tiene actividad rubefaciente y cicatrizante¹⁵.

CANDIDIASIS O CANDIDIOSIS

Definición: Es una infección primaria o secundaria causada por levaduras del género *Candida*, con manifestaciones clínicas muy variables de aguda, subaguda, evolución crónica o episódica, en la que

las lesiones de la piel por hongos, mucosa de la piel, causan profunda o se pueden propagar¹⁶.

Agentes etiológicos: El principal agente es *Candida albicans*, pero pueden estar implicadas otras especies de *Candida*, como, *Candida dubliniensis*, *Candida glabrata*, *Candida famata*, *Candida krusei*; *C. lusitaniae*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, etc. Levaduras de otros géneros distintos de *Candida* como *Saccharomyces*, *Pichia*, *Rhodotorula* pueden dar cuadros clínicos similares a la Candidiasis¹⁶.

Clasificación taxonómica:

Teniendo en cuenta la reproducción sexuada de las levaduras se las incluye en las subdivisiones *Ascomycotina*, *Basidiomycotina* y *Deuteromycotina* (cuando no se conoce la reproducción sexuada)¹⁵.

Dominio: Eucarya

Reino: Fungi

División: Eumycota

Subdivisión: Deuteromycotina

Clase: Blastomycetes

Familia: Cryptococaceae

Género: *Candida*

Especies: *C. albicans*; *C. glabrata*; *C. krusei*; *C. parapsilosis*; *C. tropicalis*, etc.

A algunas de estas especies se les conoce su teleomorfo (forma sexual):

C. famata: *Debaryomyces hansenii*;

C. krusei: *Issatchenkia orientalis*;

C. lusitanae: *Clavispora lusitanae*

Epidemiología

Es una infección cosmopolita. Es una de las infecciones oportunistas más comunes en los seres humanos. La incidencia ha aumentado significativamente en los últimos 20 años. Las levaduras son responsables de 7,45% de las infecciones por hongos, el 25% de las micosis superficiales y entre el 75 y el 88% de las infecciones fúngicas nosocomiales. No hay personas de todas las edades, género o etnia sin infección por levaduras del género *Candida*, que se encuentran en la naturaleza, en el suelo y el agua fresca, verduras, frutas, exudado árbol, granos y en general cualquier sustancia rica en hidratos de carbono simples. Además, son residentes habituales de los sistemas digestivo, respiratorio y áreas muco-cutáneas de las personas y de otros hospederos¹⁴. El sistema gastrointestinal humano tiene un pequeño pero constante población de *C. albicans*. En los adultos, existen dos factores que regulan el número de levaduras en el intestino:

(1) otros miembros de la flora intestinal, la densidad de población de levaduras (principalmente bacterias lactobacilos y anaerobios) por

factores antimicrobianos, inhibidores de la adherencia, de oxidación-reducción competencia potencial y control por los nutrientes disponibles y (2) dieta, ya que el consumo excesivo de frutas frescas, dulces u otros materiales fermentables en un aumento considerable en el número de levaduras intestinales, especialmente *C. albicans*. Además de *C. albicans* otras especies que pueden colonizar la mucosa oral y del tracto gastrointestinal humano como *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*, *C. krusei*. La piel normal también puede presentar flora de levaduras residentes, que incluye *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*. Otras especies como *C. albicans* y *C. tropicalis* no se encuentran con regularidad en la piel normal, salvo en la región ano-genital y alrededor de la boca. En la mucosa vaginal normal se puede aislar *C. albicans* y, con menor frecuencia, *C. glabrata*, *C. tropicalis* *C. parapsilosis* y *C. krusei*

Las rutas de infección mencionadas son las infecciones de origen endógeno desde depósitos mucocutáneas o cutánea, se puede evidenciar también en los hospitales donde las levaduras pueda transmitirse a lactantes de biberones contaminados, pacientes con trasplantes o pacientes inmunocomprometidos a partir de instrumentos quirúrgicos, instrumentos utilizados en diálisis o endoscopios contaminados o por la existencia de infecciones por hongos en las uñas de las manos o los empleados que trabajan en unidades de

cuidados intensivos, transmitidos, sin la protección adecuada.

Patogenia: El equilibrio entre dichas comensal (levadura) y el anfitrión podría ser invadido y dar al parasitismo o el desarrollo de infecciones oportunistas¹⁶. El desarrollo de la enfermedad de Candida depende de la interacción de determinados factores:

- Factores predisponentes para la infección.
- Patogenicidad intrínseca del microorganismo.
- Mecanismos de defensa del huésped.

Factores predisponentes

Los factores que desencadenan la enfermedad son comunes las modificaciones en los mecanismos de defensa del huésped, los cuales, inducen transformaciones en el comportamiento del hongo¹⁶. Las manifestaciones clínicas y la severidad de la infección están en relación con la naturaleza y el grado de compromiso de las defensas normales del huésped. Las causas predisponentes se pueden agrupar en:

- **Locales:** maceración, contacto con agua, mala higiene.
- **Fisiológicas:** recién nacidos, vejez (edades extremas), embarazo.
- **Endocrinas:** diabetes, hipotiroidismo.
- **Alteración de la flora normal:** por uso de antibióticos (ATB).
- **Enfermedades hematológicas:** linfomas, leucemias, anemia aplásica, agranulocitosis, neutropenia, hipo y agamaglobulinemia.

- **Factores iatrogénicos:** uso prolongado de corticoides, quimioterápicos, inmunosupresores, agentes citotóxicos, alimentación parenteral, trasplantes, cirugía abdominal, utilización de sondas y catéteres, radioterapia, prótesis, hemodiálisis, cateterismo.
- **Enfermedades debilitantes:** infección por virus de inmunodeficiencia humana (VIH), neoplasias, inanición, quemaduras graves y extensas, drogadicción, tuberculosis y otras enfermedades infecciosas. En general, la candidiasis cutáneo mucosa es frecuente en pacientes con deficiencias en las células T, tal como ocurre en los pacientes con SIDA, en pacientes diabéticos y con otras endocrinopatías. La infección más seria, la candidiasis invasiva (CI), que compromete la vida del paciente, se desarrolla en individuos severamente inmunocomprometidos, y, en la mayoría de los casos de CI confluyen dos o más de estos factores predisponentes. La neutropenia es una de las principales causas de CI; aunque los pacientes sometidos a trasplantes de órganos, con tumores sólidos o con enfermedades malignas de la sangre, también tienen alto riesgo de sufrir CI.

Factores de patogenicidad

El potencial patogénico de las levaduras varía considerablemente. Éstas no son un componente pasivo del proceso infeccioso, sino que

poseen una serie de factores de virulencia. No existe un único factor que pueda ser considerado por sí solo como responsable de la patogenicidad, sino que se ha propuesto una combinación de diferentes factores que contribuyen a una o más etapas de la infección. Los principales factores de virulencia, que han sido estudiados en profundidad para *C. albicans* (aunque algunos de ellos han encontrados en otras especies)¹⁶ son:

- 1. Capacidad de adherencia de las levaduras a diferentes superficies:** es una interacción fuerte entre una adhesina de la levadura y un receptor de la célula del hospedero.
- 2. Producción de enzimas extracelulares:** son proteinasas y fosfolipasas específicas de cada cepa. Se han detectado en *C. albicans* una familia de 10 isoenzimas con actividad proteínasa conocidas como Sap (secreted aspartic proteinase), de las cuales Sap 1-3 son cruciales para la infección superficial y Sap 4-6 serían importantes en la candidiasis invasiva.
- 3. Producción de hifas y pseudohifas:** Aumenta de la capacidad invasiva de la levadura, la capacidad de adherencia, aumenta la resistencia a la fagocitosis, aumenta el poder agresivo sobre las células del hospedero
- 4. “Switching” o variabilidad fenotípica y antigénica:** Es un cambio espontáneo, frecuente y reversible entre diferentes fenotipos distinguibles por la morfología de la colonia o por la

morfología celular.

Mecanismos de defensa del huésped¹⁶

a. No inmunes:

1. La interacción con otros miembros de la flora microbiana.
2. La integridad funcional del estrato córneo.
3. El proceso de descamación debido a la proliferación epidérmica inducida por la inflamación.

b. Inmunes:

1. Inmunidad mediada por células.
2. Inmunidad humoral.

Una alta contaminación fúngica, (colonización) como resultado de la administración de antibióticos de amplio espectro o la ocurrencia de una lesión o alteración del epitelio intestinal puede conducir a cambios en la expresión del fenotipo (switching) y en las levaduras se adhieren. Las levaduras pueden emitir un tubo de germen que penetra en el epitelio y la membrana basal, facilitado por la producción de proteinasas y fosfolipasas. En un pacientes inmunocompetentes esta invasión está limitada por los macrófagos y / o células polimorfonucleares. Los pacientes neutropénicos cuando la respuesta celular innata falla (disfunción inmune), la levadura pueden ingresar al torrente sanguíneo y propagarse. Otra forma de propagarse por vía de entrada directa de la levadura en el torrente sanguíneo, con la inserción

a través de un catéter, que puede estar contaminada o que puede llevar la levadura en la piel del paciente o el personal médico o paramédico.

2.4. Definición de la terminología

Antifúngico: Sustancias que destruyen hongos al suprimir su capacidad para crecer o reproducirse¹⁷.

Inmune: Complejo formado por la unión de moléculas de antígeno y anticuerpo. La deposición de grandes complejos antígeno-anticuerpo produce daño tisular y genera enfermedades de inmunocomplejos¹⁷.

Extracto de vegetales: Concentrados de plantas obtenidas mediante la eliminación de componentes activos con un disolvente adecuado, que se evapora a distancia, y ajustando el residuo a una norma prescrita¹⁷.

Levadura: Término general para hongos redondos unicelulares que se reproducen por brotes¹⁷.

Micosis: Enfermedades causadas por hongos¹⁷.

Antígeno: Sustancias que son reconocidas por el sistema inmune y que inducen una reacción inmune¹⁷.

Fenotipo: Apariencia externa del individuo. Es producto de las interacciones entre genes y entre el genotipo y el ambiente¹⁷.

Huésped: Relación entre un invertebrado y otro organismo (el huésped), uno de los cuales vive a expensas del otro. Tradicionalmente

se excluye de la definición de parásitos a las bacterias, hongos, virus y plantas patógenos, aunque puedan vivir de forma parasitaria¹⁷.

CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO

3.1. Tipo y Diseño de Investigación

3.1.1. Tipo de Investigación

Esta investigación se basa en el paradigma cuantitativo¹⁸.

3.1.2. Diseño de Investigación¹⁸

Según la intervención del investigador es experimental.

Según la planificación de la medición de la variable de estudio es prospectivo

Según el número de mediciones de la variable de estudio es longitudinal

Según el número de variables de interés es analítico

El presente trabajo es un estudio experimental de estímulo creciente y grupo control¹⁶, el cual se representa de la siguiente manera.

GC	...	OC (grupo control)
G1	1X	O1 (grupo experimental)
G2	2X	O2 (grupo experimental)
G3	3X	O3 (grupo experimental)
G4	4X	O4 (grupo experimental)

G5	5X	O5 (grupo experimental)
G6	6X	O6 (grupo experimental)

En el grupo control (GC) y experimental (G1 – G5) va estar presente la variable dependiente representado por la cepa de *Candida albicans* y la variable independiente (X) las diferentes concentraciones del extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis* “Romero” (O1 – O5) será la observación de la inhibición del crecimiento a través de la presencia de zona o halo de inhibición de *Candida albicans*.

3.2. Población y Muestra

Para el presente proyecto de investigación la población será equivalente a la muestra, determinada por la interacción entre 6 diluciones del extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis* “Romero” contra dos cepas de *Candida albicans*, considerando tres repeticiones, se totalizan 36 unidades experimentales u observaciones.

Calculándose de la siguiente manera:

$$U.E = D \times E \times C \times R$$

$$U.E = 6 \times 1 \times 2 \times 3 = 36 \text{ unidades experimentales u observaciones.}$$

3.3. Hipótesis

El extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis* “Romero” tiene efecto antifúngico *in vitro* contra *Candida albicans*

3.4. Variables

Independiente: Extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis* “Romero”

Dependiente: Efecto antigúngico contra *Cándida albicans*

3.5. Operacionalización:

Variable Independiente	Dimensión	Indicadores	Indices	Técnica e instrumento de recolección de datos
Extracto acuoso de <i>Rosmarinus officinalis</i> "Romero"	Concentraciones	Concentración 1 Concentración 2 Concentración 3 Concentración 4 Concentración 5 Concentración 6	($\mu\text{g/mL}$)	Dilución doble seriada

Variable dependiente	Dimensión	Indicadores	Indices	Técnica e instrumento de recolección de datos
Actividad antigúngica frente a <i>Candida albicans</i>	Concentración mínima inhibitoria	Crecimiento de la levadura	Zona de inhibición (mm)	Siembra en superficie Agar sabouraud

3.6. Métodos, técnicas e instrumentos de recolección de datos

3.6.1. Método experimental¹⁸

Es un tipo de método de investigación en el que el investigador controla deliberadamente las variables para delimitar relaciones entre ellas, está basado en la metodología científica. En este método se recopilan datos para comparar las mediciones de comportamiento de

un grupo control, con las mediciones de un grupo experimental. Las variables que se utilizan pueden ser variables dependientes (las que queremos medir o el objeto de estudio del investigador) y las variables independientes (las que el investigador manipula para ver la relación con la dependiente). Además debemos controlar todas las demás variables que puedan influir en el estudio (variables extrañas).

3.6.2. Método Kirby-Bauer¹⁹

Método de difusión en agar es empleado para determinar la sensibilidad de un agente microbiano frente a un antibiótico o quimioterápico. Este método comprende lo que se denomina un antibiograma o prueba de susceptibilidad bacteriana frente a drogas específicas.

3.6.3. Método de difusión en pozo²⁰

Método de difusión en agar es empleado para determinar la sensibilidad de un agente microbiano frente a un antibiótico o quimioterápico. Con un variante al método anterior, para este método se emplea un sacabocado para realizar pozos en el agar

3.7. Procedimiento para la recolección de datos

3.7.1. Colección de la muestra.

Las hojas secas de *Romarinus officinalis* “Romero”, fueron compradas en el Mercado Modelo sección Herbolarios tipo granel 1 Kg.

3.7.2. Preparación del extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis*

“Romero”²¹

- Se llevó a licuar 1kg de las hojas de *Rosmarinus officinalis* “Romero”.
- El material en polvo se mantuvo en botella de vidrio hermética. Este material en polvo se utilizó para extracción adicional.
- Se pesaron 21 g de polvo *Rosmarinus officinalis* “Romero” y se agregaron 500 mL de agua destilada y se hirvió por 15 minutos.
- El producto fue filtrado con papel filtro Whatmann N° 40, se obtuvo un extracto purificado libre residuos.
- El extracto resultante fue distribuido en placas petri y fue secado en estufa a una temperatura de 50°C hasta sequedad.
- El residuo seco obtenido, posteriormente fue guardado en refrigeración a 2°C en frasco de vidrio color ámbar, hasta su reactivación en agua destilada estéril para su posterior uso.

3.7.3. Preparación del agente antifúngico

Siguiendo las recomendaciones del CLSI²², para evaluar la potencia puede expresarse como porcentaje o en unidades de mg/mL, µg/mL µg/mg (p/p).

- El residuo seco se disolvió en 50 mL de agua destilada estéril, obteniéndose una solución madre.
- Se realizó diluciones doble seriadas a partir de la solución madre, obteniéndose diferentes concentraciones.

3.7.4. Preparación de la suspensión inóculo de *Cándida albicans*.

Siguiendo las recomendaciones del CLSI²³, para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos.

- Se tomaron 5 colonias ≥ 1 mm de diámetro procedente de cultivo de 24 h de *Candida albicans* cultivado en agar dextrosa Sabouraud (ADS).
- Se suspendieron en 5 mL de solución salina fisiológica (NaCl 0,85%) estéril.
- Con ayuda del espectrofotómetro (longitud de onda: 600 nm), se ajustó a una densidad óptica de 0,12 equivalente a la turbidez del tubo N° 0,5 de la escala de Mc Farland equivalente a una concentración aproximadamente de $1-5 \times 10^8$ UFC/mL.
- Posteriormente se realizó una dilución 1:1000 con (caldo Sabouraud glucosado) (concentración de $1 \times 10^3 - 5 \times 10^3$).

Esta última dilución es la que se utilizó para inocular las placas de antifúngico. La concentración final de levaduras en las placas será de $0,5 \times 10^3 - 2,5 \times 10^3$.

3.7.4. Actividad Antifúngica

Método de la difusión del disco (Kirby Bauer)¹⁹.

- En un lapso de tiempo óptimo de 15 minutos después de ajustar

la turbidez de la suspensión del inóculo, una torunda de algodón se sumerge en ella. La torunda debe ser rotada varias veces y presionada firmemente contra la pared interna del tubo sobre el nivel de líquido. Esto remueve el exceso de inóculo.

- Se inocula la superficie de una placa de agar Mueller -Hinton por rayado con la torunda sobre toda la superficie. Este procedimiento es repetido rayando dos o más veces, rotando la placa aproximadamente 60° cada vez para asegurar una distribución constante del inóculo. Como paso final se pasa sobre los bordes del agar.
- La tapas de la placa pueden quedar entreabiertas por 3 a 5 minutos, pero no más de 15 minutos para permitir que un exceso de humedad de la superficie se absorba antes de aplicar el disco con el extracto acuoso impregnado.
- Se debe evitar excesos en la densidad del inóculo. Nunca usar caldos de cultivo de la noche anterior sin diluir u otro inóculo no estandarizado.

Método de difusión en pozos

Sobre las placas sembradas:

- Se realizaron 6 perforaciones de 6 mm de diámetro, con un sacabocado.
- Se colocaron 50 µL en cada pozo, con ayuda de una

micropipeta, el extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis* “Romero” a diferentes concentraciones.

- Cada pozo fue marcado con su respectiva identificación, se selló con parafilm y se incubó las placas a 37 °C, por un periodo de 24h.

Lectura e interpretación de resultados

- Después de 16 a 18 horas de incubación, cada placa es examinada. Las zonas de inhibición resultantes deben ser uniformemente circulares en una capa homogénea de crecimiento.
- El margen de las zonas debe ser tomado como el área donde no se observa crecimiento visible. Un crecimiento pobre de pequeñas colonias, las que se detectan con lente de aumento al borde de la zona de crecimiento inhibido, son ignoradas
- Los tamaños de las zonas de inhibición fueron medidos con un Vernier en milímetros fueron interpretados según orientaciones del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)²³.

3.8. Análisis Estadístico e Interpretación de los datos

Para determinar la relación del efecto antifúngico del extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis* “Romero” en el crecimiento de *Cándida albicans*, se realizó un análisis de varianza de dos factores con una

sola muestra por grupo para el factorial 1 x 2 x 6 x 3 (1 Extracto acuoso 2 cepas, 6 concentraciones, 3 repeticiones) para determinar si el extracto y sus concentraciones influyen o no en el crecimiento de *Candida albicans*.

3.9. Principios éticos

Para la ejecución de la presente investigación, no se consideran los principios de la Declaración de Helsinki, puesto que, es un estudio in vitro.

3.10. Criterios de rigor científico

Se cumplió con la presentación de datos fiables y válidos que fueron codificados y protegidos. La credibilidad y estabilidad de los datos fueron presentadas al utilizar instrumentos que fueron válidos y confiables. Los resultados fueron aplicados por otros estudios cumpliendo así los criterios de transferibilidad.

CAPÍTULO IV: ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

4.1. Resultados:

Concentración del extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis*

Se obtuvo 2g de residuo seco, a partir de este residuo se obtuvo una concentración de 40 mg/mL, y a través de las diluciones doble seriadas a partir de la solución madre, se obtuvieron concentraciones de 20 mg/mL, 10 mg/mL, 5 mg/mL, 2,5 mg/mL y 1,25 mg/mL (Figura 4. Anexo 4).

Actividad antifúngica in vitro del extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis*

Método Kirby-Bauer

A través de esta metodología no se evidenciaron zonas o halos de inhibición del crecimiento de *C. albicans* (Figura 10. Anexo 4).

Método difusión en pozo

Mediante la difusión en pozo se evidenciaron zonas de inhibición de crecimiento y las medidas de los halos variaron dependiendo de la cepa de *C. albicans* (Figuras 2 y 3) como también de las concentraciones que fueron empleadas tal como se muestra en la tabla N° 1.

La cepa N° 1 de *C. albicans* ofreció mayor sensibilidad frente a el extracto acuoso de hojas de *R. officinalis* en comparación a la cepa N° 2.

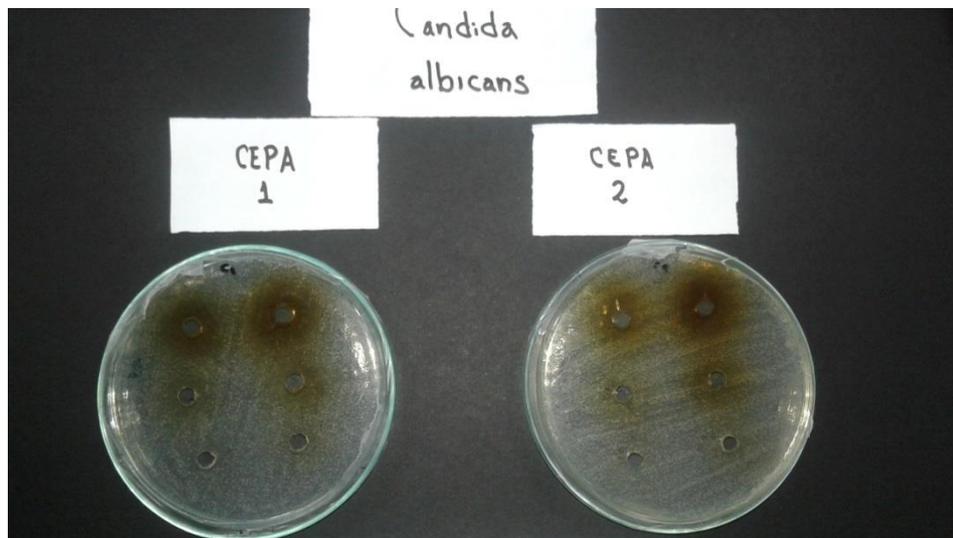


Fig. 1. Efecto antifúngico in vitro del extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis* "Romero" contra dos cepas de *Candida albicans*,

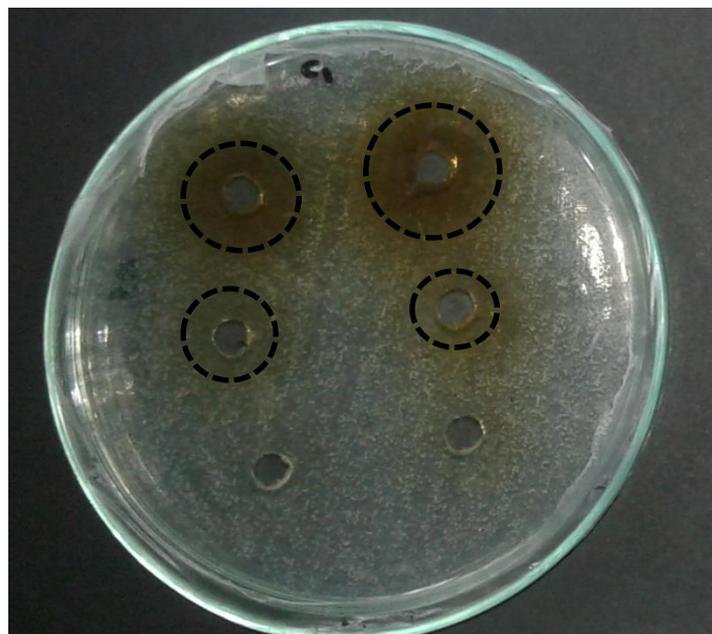


Fig. 2. Zona de inhibición del extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis* "Romero" contra la cepa 1 de *Candida albicans*,

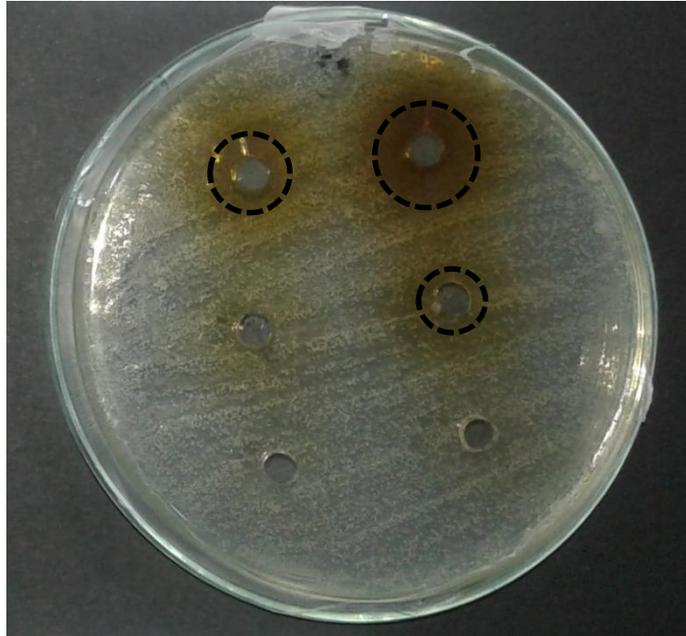
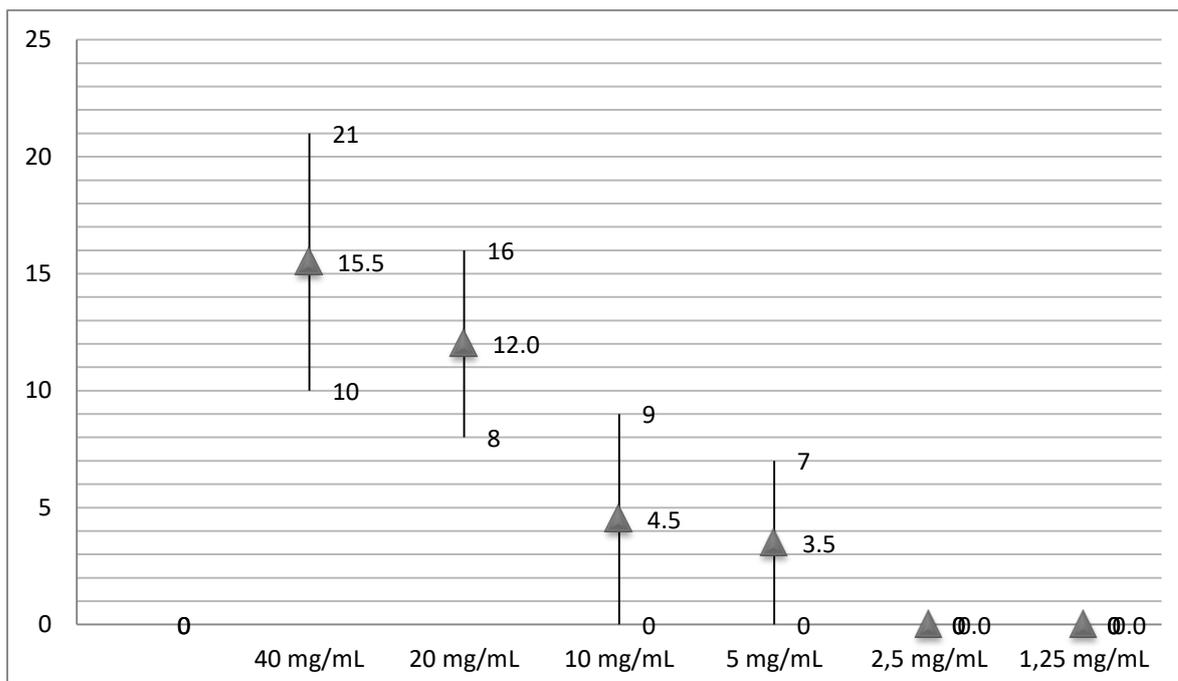


Fig. 3. Zona de inhibición del extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis* “Romero” contra la cepa 2 de *Candida albicans*,

Tabla 1. Zona de inhibición en milímetros del extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis* “Romero” contra las cepas de *Candida albicans*,

Concentración	Zona de inhibición (mm)	
	Cepa N° 1	Cepa N° 2
40 mg/mL	21	10
20 mg/mL	16	8
10 mg/mL	9	0
5 mg/mL	7	0
2,5 mg/mL	0	0
1,25 mg/mL	0	0



Gráfica. 1. Tamaño de la zona de inhibición (mm) del extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis* "Romero"

Se realizó un análisis de varianza de dos factores con una muestra por grupo a un nivel de significancia de 0,05 (Tabla N° 2). Para las concentraciones se obtuvo un valor de P menor al nivel de significancia como para las especies enfrentadas al extracto acuoso de *R. officinalis*.

Tabla 2. Análisis de varianza de dos factores con una sola muestra del extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis* "Romero"

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Concentraciones	413.4166	5	82.6833333	7.4601	0.022
Especie	102.0833	1	102.083333	9.2105	0.028
Error	55.4166	5	11.0833333		
Total	570.9166	11			

Nivel de significancia: 0,05 Si el valor de P es menor que el nivel de

significancia ($P < 0,05$) se acepta la hipótesis investigación, entonces el extracto acuoso de hojas de *Rosmarinus officinalis* “Romero” si tiene efecto antifúngico frente a *Candida albicans*

4.2. Discusión de resultados.

El extracto acuoso de las hojas de *Rosmarinus officinalis* mostraron efecto antifúngico contra *C. albicans*, comprobado por el método de difusión en pozo aplicados en este estudio. Por el contrario, al realizar el método de Kirby-Bauer se evidenció que las cepas de *C. albicans* no fueron sensibles ante ninguno de las concentraciones ensayados en la prueba. Se puede suponer que el extracto acuoso de las plantas empleando el papel filtro Whatman N° 41 no permite la difusión de los principios bioactivos, sin alcanzar a cumplir el efecto, este hallazgo no es coincidente por otros estudios in vitro que demuestran la actividad antifúngica con diferentes especies de hongos a través del método de difusión en disco o Kirby Bauer⁹⁻¹¹.

Buscando corroborar el efecto del extracto sobre *C. albicans*, se efectuó las mediciones de los halos de inhibición de la solución madre a una concentración de 40 mg/mL presentó una zona de inhibición mayor para la cepa N° 1 con 21 mm y para la cepa N° 2 de 10 mm. Las medias de los diámetros de los halos de inhibición que se presentaron al evaluar las diferentes concentraciones de los extractos se compararon, para determinar la relación actividad concentración (Tabla 1). Con ello se logró evidenciar una relación directamente proporcional

entre la concentración del extracto y el diámetro de la zona de inhibición. Con esto se demuestra la presencia principios bioactivos en el extracto acuoso, esta evidencia es coincidente con estudios de otros extractos vegetales como extracto acuoso de *Mimosa púdica* y *Azadirachta indica*⁹⁻¹⁰.

Se observó que las cepas de *C. albicans* utilizados en esta investigación exhibían diversos grados de susceptibilidad a los extractos. Así, los valores obtenidos para las zonas de inhibición difieren, para cada organismo de prueba (Figura 2 y 3). Estos resultados corroboran los hallazgos de Mahmoud *et al*¹⁰ y Ubulom *et al*¹².

Los resultados de este estudio también coinciden con lo reportado en el trabajo de Nasrollahi y Abolhasannezhad¹³. La diferencia de susceptibilidad observada en este estudio podría atribuirse al factor de resistencia inherente de los organismos de prueba entre otros factores^{12,13}.

La diferencia significativa ($P < 0,05$) observada entre la actividad inhibitoria del extracto acuoso coincide con los resultados de la investigación de Ubulom *et al*¹²..

Este estudio ha revelado que los extractos de acuoso de hojas de *R. officinalis* poseen un potencial antifúngico, que puede ser explorado en el tratamiento y control de algunas infecciones fúngicas.

CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. Conclusiones

Se concluye:

- El extracto acuoso de hojas *Rosmarinus officinalis* tiene efecto antifúngico contra *Candida albicans*.
- El método difusión en pozo presentó efecto antifúngico in vitro a concentraciones 40 µg/mL, 20 µg/mL, 10 µg/mL.
- El método Kirby-Bauer no presentó evidencia de efecto antifúnco in vitro contra cepas de *Candida albicans*.

6.2. Recomendaciones

Se recomienda:

- Realizar estudios de efecto antifúngico in vitro con cepas ATCC.
- Realizar una caracterización fitoquímica del extracto acuoso de hojas de *Rosmarinus officinalis*.
- Realizar ensayos in vitro con líneas celulares para descartar citotoxicidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis Postgrad Med J 2002; 78:455 – 459.
2. Lalla RV, Patton LL, Dongari-Bagtzoglou A. Oral candidiasis: pathogenesis, clinical presentation, diagnosis and treatment strategies. Journal of the California Dental Association. 2013; 41(4):263-8.
3. Janus MM, Crielaard W, Volgenant CMC, Van der Veen MH, Brandta BW, Krom BP. *Candida albicans* alters the bacterial microbiome of early in vitro oral biofilms. Journal of Oral Microbiology. 2017; 9(1): 1-10
4. Otero E, Peñamaría M, Rodríguez M, Martín B, Blanco A. Candidiasis oral en el paciente mayor. Av. Odontoestomatol. 2015; 31(3): 135-148.
5. Alzarea BK, Sghaireen MG, Taher I, Mohager M. Prevalence of Oral Candidiasis in Diabetic Patients at Northern of Kingdom of Saudi Arabia. Research Journal of Biological Sciences. 2015; 10(3): 10-14.
6. Hoshi N, Mori H, Taguchi H, Taniguchi M, Aoki H, Sawada T, Kawabata M, Kuwabara A, Oono A, Tanaka K, Hori N, Toyoda M, Kimoto K. Management of oral candidiasis in denture wearers. Journal of Prosthodontic Research. 2011; 55: 48–52

7. Kuyama K, Sun Y, Taguchi C, Endo H, Wakami M, Fukumoto M, Ito T, Yamamoto H, A clinico-pathological and cytological study of oral candidiasis Open Journal of Stomatology. 2011; 1: 212-217
8. Muhammad MT, Abdullahi K, Shehu K, Shinkafi SA. Antifungal activity of *Mimosa pudica* leaves extracts against fungal isolates from razor bumps in Sokoto Metropolis, Nigeria. Annals of Biological Sciences. 2015: 3(1):16-19
9. Gupta SP, Rana KS, Sharma K, Chhabra BS. Antifungal activity of aqueous leaf extract of *ocimum sanctum* on dominant fungal species of monuments Eur. Chem. Bull. 2014; 2(6): 609-611
10. Mahmoud DA, Hassanein NM, Youssef KA, Abou Zeid MA. Antifungal activity of different neem leaf extracts and the nimonol against some important human pathogens. Brazilian Journal of Microbiology. 2011; 42: 1007-1016
11. Omidpanah S, Sadeghi H, Sarcheshmeh MM, Azadeh Manayi A. Evaluation of antifungal activity of aqueous extracts of some medicinal plants against *Aspergillus flavus*, pistachio aflatoxin producing fungus *in vitro*. Drug Development and Therapeutics. 2015; 6(2): 66 – 69.
12. Ubulom P, Akpabio E, Udobi CE, Mbon R. Antifungal activity of aqueous and ethanolic extracts of *Picralima nitida* seeds on *Aspergillus flavus*, *Candida albicans* and *Microsporum canis*. Res. Pharm. Biotech. 2011 ; 3(5) : 57 -60

13. Nasrollahi Z, Abolhasannezhad M. Evaluation of the antifungal activity of olive leaf aqueous extracts against *Candida albicans* PTCC-5027 Curr Med Mycol, 2015; 1(4): 37-39
14. Méndez J, Herrera ML. Métodos de susceptibilidad antifúngica. Revisión metodológica Rev. méd. Hosp. Nac. Niños (Costa Rica). 2001; 36: 1 -2
15. López MT. El romero Planta aromática con efectos antioxidantes of farm. 2008; 27 (7): 60 - 63
16. Biasoli M. Candidiasis [On line] [Consultado 10 de mayo del 2017]
Disponible en:
www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/file.php/118/...2013/.../CANDIDIASIS_2013-1.pdf
17. Portal Regional de la Biblioteca Virtual de Salud. Información y Conocimiento para la Salud
Disponible en: <http://pesquisa.bvsalud.org/portal/decs-locator/?output=site&lang=es&from=0&sort=&format=summary&count=20&fb=&page=1&q=&index=tw>
18. Hernández R, Fernández C, Baptista P. Metodología de la Investigación. 6ta Edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. México 2013. 689p.
19. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing Yeasts. Approved Estándar - tercera edición 2008 (28)14: 1 - 25. M27-A3

20. Álvarez M, Izasa M, Echeverry H. Efecto antibacteriano in vitro de *Austrocupatorium inulaefolium* HBK (salvia amarga) y *Ludwigia polygonoides* HBK (clavo de laguana). Biosalud. 2005; 14:46-55.
21. Zárate MA. Efecto in vitro antibacteriano del extracto acuoso de *Caesalpinia spinosa* "Tara" sobre cepas de *Streptococcus pyogenes* y *Escherichia coli* aisladas de pacientes del Hospital Regional Docente de Trujillo en el año 2014. Pueblo. Cont. 2015; 26(1): 15 -23
22. Clinical and Laboratory Standards Institute. Métodos de dilución para determinar la sensibilidad a los antimicrobianos de bacterias que crecen en condiciones aeróbicas. Norma aprobada—octava edición 2009; (26)2: 1 -100. M07-A8
23. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing Yeasts. Approved Estándar - tercera edición 2008 (28)14: 1 - 25. M27-A3

ANEXOS

Anexo N° 1



Fig 4. Triturado de hojas de *Rosmarinus officinalis* "Romero"



Fig 5. Pesado de triturado de hojas de *Rosmarinus officinalis* "Romero"

Anexo N° 2

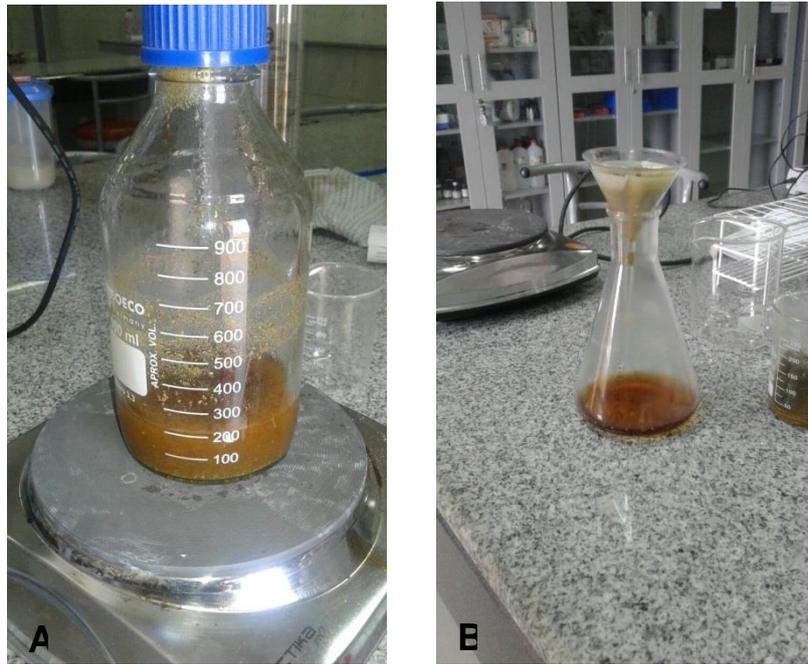


Fig 6. Hervido y filtrado de triturado de hojas de *Rosmarinus officinalis* "Romero"

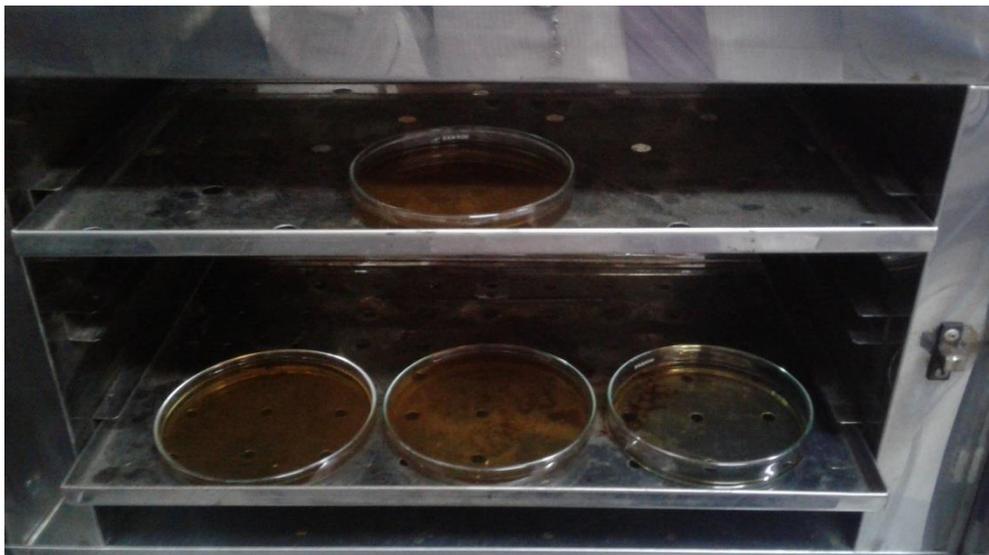


Fig 7. Secado del extracto de hojas de *Rosmarinus officinalis* "Romero"

Anexo N° 3

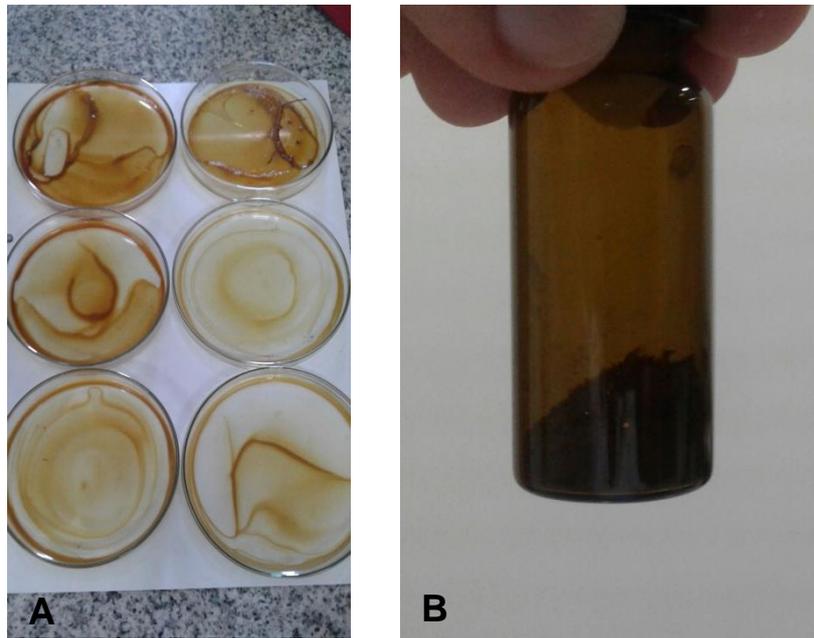


Fig 8. Residuo seco del extracto de hojas de *Rosmarinus officinalis* "Romero"

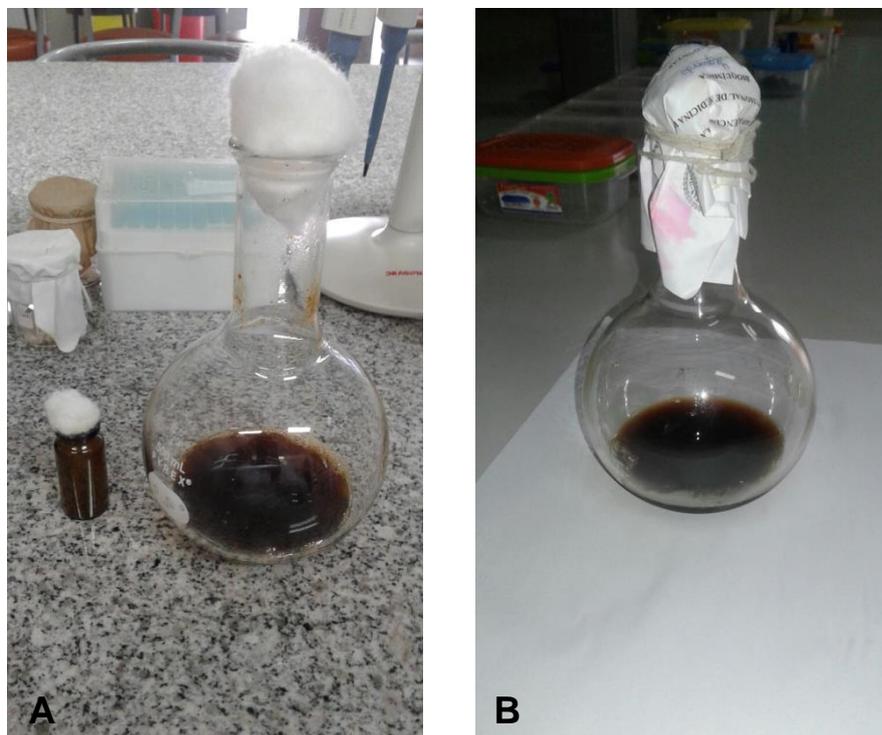


Fig 9. Preparación del extracto acuoso de hojas de *Rosmarinus officinalis* "Romero"

Anexo N° 4

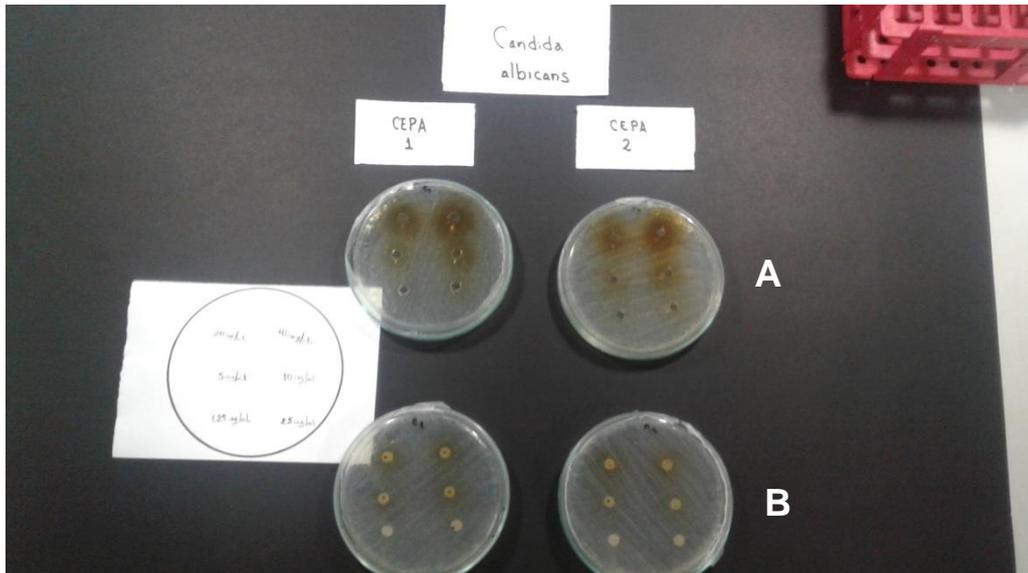


Fig 10. Actividad antifúngica del extracto acuoso de hojas de *Rosmarinus officinalis* "Romero", A. Método de difusión en pozo. B. Método Kirby - Bauer

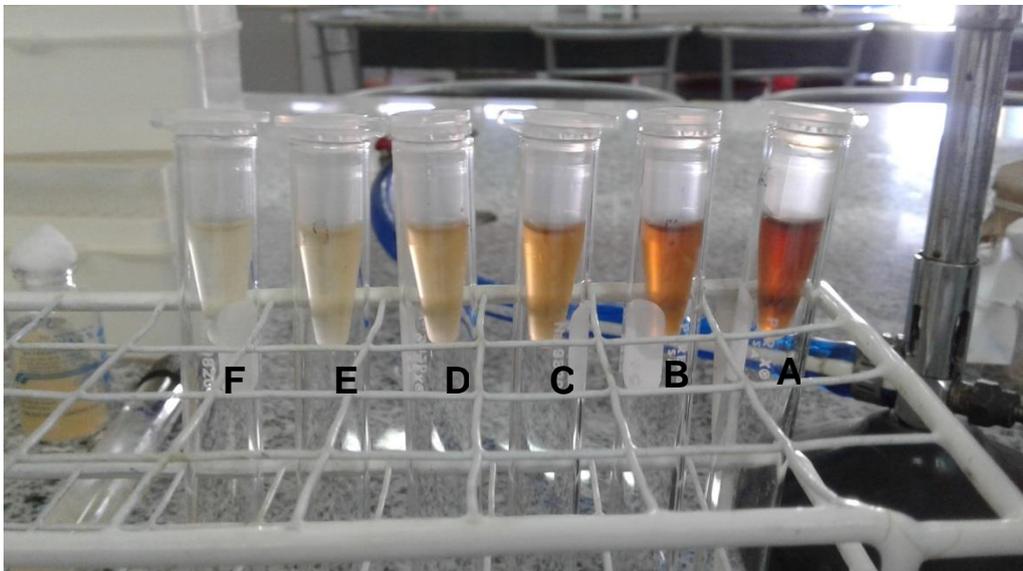


Fig 11. Extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis* "Romero" y sus diluciones. A: 40 mg/mL, B: 20 mg/mL, C: 10 mg/mL, D: 5 mg/mL, E: 2,5 mg/mL y 1,25 mg/mL.