

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
CARRERA DE ODONTOLOGIA



Actividad anti-fúngica “in vitro” del extracto alcohólico y aceite esencial del *Rosmarinus officinalis* “romero” potencializado con ozono sobre la *Candida albicans* cepa ATCC 10231.

*Proyecto de investigación para optar el título de odontólogo*

Autor: Br. Christian Fernando Figueroa Sánchez.

Tutor: Dr. Luis Emilio Carranza Quispe. Ms.C

Riobamba – Ecuador

2016

## Página de revisión del tribunal

Los miembros del tribunal de graduación del proyecto de investigación de título: Actividad anti-fúngica “in vitro” del extracto alcohólico y aceite esencial del *Rosmarinus officinalis* “romero” potencializado con ozono sobre la *Candida albicans* cepa ATCC 10231, presentado por Christian Fernando Figueroa Sánchez, y dirigida por el Dr. Luis Emilio Carranza Quispe. MSc, una vez escuchada la defensa oral y revisado el informe final del proyecto de investigación con fines de graduación escrito en el cual se ha constatado el cumplimiento de las observaciones realizadas, remite la presente para uso y custodia en la biblioteca de la Facultad de Ciencias de la Salud de la UNACH. Para constancia de lo expuesto firman:

A las 16:00 del 16 del mes de noviembre del año 2016.

Dra. Maria Mercedes Calderin  
.....  
Presidente del Tribunal (nombre)

  
.....  
Firma

Dr. Emilio Carranza  
.....  
Miembro del Tribunal (nombre)

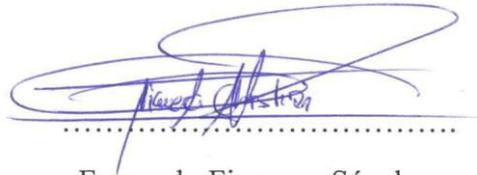
  
.....  
Firma

Dra. Sandra Cruz  
.....  
Miembro del Tribunal (nombre)

  
.....  
Firma

## **DERECHO DE AUTORÍA:**

Yo, **Christian Fernando Figueroa Sánchez**, soy responsable de todo el contenido de este trabajo de investigación, los derechos de autoría pertenecen a la Universidad Nacional de Chimborazo.



Fernando Figueroa Sánchez  
1804356234  
Autor

## **AGRADECIMIENTO**

Mis agradecimientos eternos son para la Ingeniera María Fernanda Rojas por su asesoramiento en el laboratorio de Ingeniería Agro-Industrial, así como también en la extracción del extracto alcohólico de romero , aceite esencial de romero y antibiograma.

El Ingeniero Félix Falconí por su ayuda en el laboratorio de Biología molecular – genética e investigación.

## DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación va dedicado primero a Dios por permitirme seguir cada día con mis metas, a mi madre **Flor María Sánchez** por ser el pilar fundamental en mi vida sin ella nada de esto sería posible , a **Marcelo Mayorga** que a sido la referencia principal de responsabilidad y perseverancia en mi vida y la imagen paterna aquí en la tierra, a mi hermana **Karen Figueroa** por estar presente en mi vida cada día y darme la dicha de ser su hermano mayor y con su cariño poder guiar su vida, a mi padre **Fernando Figueroa A.** Por darme el impulso anímico desde el cielo todos los días. y a mis amigos que han sido mi mayor fortaleza para superar cada obstáculo que se a presentado.

## 1. CONTENIDO

<b>ABSTRACT:</b> .....	<b>8</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>9</b>
<b>Objetivo General</b> .....	<b>12</b>
<b>Objetivos Específicos</b> .....	<b>12</b>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>13</b>
2.1 Tipo de investigación .....	13
2.2 Tipo de muestreo .....	13
2.3 Recursos.....	13
2.4 Materiales y equipos para extraer el extracto alcohólico .....	14
2.5 Materiales y equipos para extraer aceite esencial.....	14
2.7 Materiales para la activación de la <i>Candida Albicans</i> (cepa ATCC 10231) .....	15
2.8 Materiales para el cultivo y antibiograma.....	15
2.9 Materiales para obtención de flavonoides:.....	16
2.10 Materiales para medir el potencial de hidrógeno en el extracto esencial ozonizado:.....	16
2.11 Materiales para obtención de ozono .....	16
2.12 PROCEDIMIENTO Y TÉCNICAS.....	17
2.12.1 Procedimiento para extraer el extracto alcohólico.....	17
2.12.2 Procedimiento para la obtención del aceite esencial del romero.....	17
2.12.3 Procedimiento para obtener los flavonoides .....	24
2.12.4 Procedimiento para la medición del PH en el extracto esencial ozonizado.....	24
<b>3 RESULTADOS</b> .....	<b>25</b>
<b>4 DISCUSION:</b> .....	<b>29</b>
<b>5 CONCLUSIONES:</b> .....	<b>30</b>
<b>6 RECOMENDACIONES:</b> .....	<b>31</b>
<b>7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:</b> .....	<b>32</b>
<b>8 ANEXOS:</b> .....	<b>34</b>

## RESUMEN

En la siguiente investigación se realizó una evaluación “in vitro” de la actividad anti-fúngica del extracto alcohólico y aceite esencial del “Romero” potencializado con ozono sobre la *Candida albicans* cepa ATCC 10231. Para tal fin se preparó el extracto alcohólico por medio del proceso de maceración, posterior a eso se realizaron diluciones desde 100%, 75%, 50%, 25%, 20%, 15%, 10% para ozonizarlo. Después sembramos el hongo en agar saboroud utilizando el método de difusión, posteriormente fueron evaluados mediante la técnica de sensibilidad anti-fúngica. Los resultados que se obtuvieron en el extracto alcohólico ozonizado fueron halos de inhibición de 15 mm. Al 100% ,13 mm. Al 75 y 50% ,12mm al 25% ,10mm al 20% ,8mm al 15% y 6mm al 10%. Acerca del aceite de romero que se obtuvo mediante un destilador a vapor para después ozonizarlo, el halo de inhibición fue de 11mm, comprobándose que tanto el extracto alcohólico de romero ozonizado y aceite esencial de romero ozonizado tienen actividad anti-fúngica positiva sobre la *Candida albicans* cepa ATCC 10231. Los resultados acerca de los flavonoides en el extracto alcohólico de romero ozonizado mantuvieron la cantidad de flavonoides uniformemente en todas sus diluciones. Se realizó la medición del potencial de hidrogeno (pH) en el extracto alcohólico ozonizado, podemos afirmar que mientras se realice más diluciones el pH disminuye su acidez.

**Palabras clave:** Actividad anti-fúngica, extracto alcohólico, ozono, halos de inhibición, flavonoides.

## Abstract

In the following investigation an in vitro evaluation was performed about the anti-fungi activity of alcoholic extract and essential rosemary oil boosted with ozone over the *Candida Albicans* ATCC strain 10231. On this score, an alcoholic extract was prepared based upon the maceration process, then, dissolutions were performed from 100%, 75%, 50%, 25%, 20%, 15%, 10% in order to be ozonized. After that, we implanted the fungus into agar saboroud by the application of the diffusion method that were evaluated through a technique of anti-fungal sensitivity. The obtained results from the ozonized alcoholic extract were inhibition halos of 15 mm, 100% 13 mm, 75% and 50%, 25% 12mm, 10 mm 20%, 15% and 8 m, 6 mm 10%. About the rosemary oil that was obtained by a steam distiller to be ozonized, the inhibition halo was 11 mm which proved that the alcoholic extract of rosemary ozonized and the essential oil of rosemary ozonized contain a positive anti-fungal activity over the *Candida Albicans* strain ATCC 10231. The results about the flavonoids in the alcoholic extract of Rosemary ozonized maintained a uniform amount of flavonoids in all of their dissolutions. A measurement about the potential hydrogen (pH) in the alcoholic extract ozonized was performed so we can state that the more dissolutions the pH decreases its acidity.



Reviewed by: Barriga, Luis  
Language Center Teacher

## 1. INTRODUCCIÓN:

La Candidiasis o Candidosis es la infección micótica bucal más frecuente.

De un modo general, la Candidiasis puede ser definida como la enfermedad del paciente enfermo, ya que siempre va a precisar de uno o varios factores facilitadores para provocar patología en la boca.(1). *Candida albicans* es la especie que más se asocia a las lesiones orales, pero también se encuentran otras menos patógenas como *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* y más recientemente *C. Dubliniensis*.(2,3). La presencia de Cándida en cavidad bucal es frecuente y oscila entre un 20% a un 70% según diversos estudios.(4,5,6). La Candidiasis se considera una infección superficial oportunista con factores locales y sistémicos que facilitan el desarrollo de la enfermedad.(7) La patogénesis de la Candidiasis bucal es compleja e implica a diferentes factores y mecanismos de los hongos y del hospedero. La posibilidad de que Cándida colonice las superficies bucales depende tanto de la efectividad de los mecanismos defensivos del hospedero, como de la capacidad de adhesión del hongo y de su poder de crecimiento.(8,9)

Una serie de condiciones ambientales pueden modificar el microambiente existente en la cavidad bucal favoreciendo la colonización y la infección por Cándida tales como uso de prótesis dentales removibles, uso de antibióticos, de corticoides tópicos, hábito de fumar.(9.1) Recientemente, se propuso una nueva clasificación, donde se propone que la Candidiasis bucal se divide en dos amplias categorías: primaria y secundaria.(9,10)

La Candidiasis primaria es aquella confinada a los tejidos orales y peri orales. Esta se subdivide en: *C. pseudomembranosa* (aguda y crónica), *C. eritematosa* (aguda y crónica), *C. hiperplásica* (leucoplásica). Asociadas: Estomatitis protésica, Queilitis angular, Glositis rómbica. La Candidiasis secundaria donde la Candidiasis bucal es una manifestación de una infección sistémica o generalizada.

*C. Mucocutánea* (crónica). También llamada Síndrome Crónico de Candidiasis Mucocutánea, y se incluyen: CMC familiar, CMC difusa, CMC por endocrinopatía.

Cuando dos o más de éstas formas clínicas aparecen juntas se le denomina Candidiasis multifocal. Cándida también puede estar implicado en el eritema gingival lineal, la periodontitis necrótica y la queilitis exfoliativa, procesos descritos en la enfermedad por VIH, aunque su exacto papel aún no está claramente definido(9).

El diagnóstico de cualquiera de las formas de Candidiasis bucal es fundamentalmente clínico y se basa en el reconocimiento de las lesiones clínicas que debe ser confirmado por la observación microscópica de *Cándida* en las muestras bucales y/o por su aislamiento en cultivo.(11). El tratamiento de la Candidiasis bucal se basa en cuatro pilares: Realización de un diagnóstico precoz y certero de la infección, corrección de los factores facilitadores o de las enfermedades subyacentes, determinación del tipo de infección candidiásica, Empleo de fármacos antimicóticos apropiados.(12,13)

La composición química del romero y efecto anti-fúngico del extracto y aceite esencial. En la planta se han reportado diversos compuestos químicos los cuales han sido agrupados de manera general por diversos autores en ácidos fenólicos, flavonoides, aceite esencial, ácidos triterpénicos y alcoholes triterpénicos. El aceite esencial de romero es el componente más estudiado cualitativamente, algunas de las principales estructuras químicas activas(14). De manera general, la composición química del aceite esencial de romero ha sido descrita en trabajos que indican el tipo de moléculas activas presentes. Se ha identificado la presencia de pineno, pineno, canfeno, ésteres terpénicos como el 1,8-cineol, alcanfor, linalol, verbinol, terpineol, carnosol, rosmanol, isorosmanol, 3-octanona, isobanilacetato y carioleno; los ácidos vanílico, caféico, clorogénico, rosmarínico, carnósico, ursólico, oleanólico, butilínico, betulínico, betulina, amirina, amirina, borneol, y acetato de bornilo(15). En el caso de las hojas del romero prevalece un alto contenido de ácido rosmarínico y su derivado rosmaricina, también está presente el ácido carnósico que se caracteriza por ser inestable, su degradación se da por incremento de la temperatura y exposición a la luz; en presencia de oxígeno puede oxidarse para formar carnosol, rosmanol, epirosmanol y 7 metil-epirosmanol(16). Una característica del extracto de romero es que su actividad antioxidante se incrementa conforme el pH disminuye, posiblemente debido a que tanto el ácido carnósico como el carnosol son más estables y su efecto protector puede durar más tiempo durante la oxidación(17). El extracto de hoja de *R. officinalis* afecta a la membrana celular de las bacterias, la actividad citotóxica afecta directamente a la fase mitótica de las bacterias Gram positivas y Gram negativas. Por destacar, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. y *S. aureus*, estos microorganismos son susceptibles a los componentes del extracto de romero, en cuyo extracto prevalecen el ácido caféico, ácido rosmarínico, carnosol, ácido carnósico y avonoides.(17).

Producción científica sobre la aplicaciones terapéuticas del ozono. Uno de los descubrimientos más notables durante los últimos años en el campo de la medicina alternativa es el empleo del ozono como agente terapéutico. La ozonoterapia es una terapia natural consistente en la aplicación de una mezcla de Oxígeno ( $O_2$ ) y de Ozono ( $O_3$ ), con alto grado de eficacia, bajo costo y muy práctica, si se considera la infraestructura necesaria para su administración.(18). El descubrimiento de las propiedades bactericidas y cicatrizantes del ozono permitió a los investigadores profundizar en el conocimiento de sus efectos beneficiosos, hasta entonces desconocidos, y en el uso del ozono como terapia curativa en los distintos campos de la medicina. *Kleinmann*, en Alemania, realizó el primer estudio bacteriológico en el que describió el efecto del ozono sobre organismos los patógenos. La primera constancia bibliográfica de su uso en medicina, data de la primera guerra mundial, cuando el doctor *A. Wolff* comenzó en Alemania a realizar curas con ozono para la limpieza y desinfección de heridas sépticas de guerra. *Payr* en 1935, y *Aubourg* en 1936, utilizaron, por primera vez, mezclas de ozono-oxígeno insuflado por vía rectal para tratar fístulas y colitis ulcerativas. El ozono actúa como un excelente agente antimicrobiano debido a su elevado poder oxidante, especialmente al nivel sistémico, es capaz de inhibir y destruir microorganismos patógenos como bacterias anaerobias, virus, algas, hongos y protozoos. Todas las enfermedades causadas por estos microorganismos son potencialmente curables con la ozonoterapia. Se ha comprobado que su acción viricida, que se establece a nivel del ciclo reproductivo del virus, motivo por el cual se investiga actualmente su posible utilización como tratamiento alternativo del SIDA. Estas propiedades bactericidas, fungicidas y viricidas también han permitido la utilización del ozono en la potabilización de aguas, sin que se produzcan residuos tóxicos para la salud humana.(19). En Cuba, se utilizó por primera vez el ozono en 1981, cuando fue probada la efectividad de este agente como bactericida en la desinfección de agua potable contaminada. En 1986, se creó la primera sala experimental de ozonoterapia en Cuba, donde se desarrollaron tratamientos para varias enfermedades de importancia social con un enfoque clínico-investigativo vinculado muy estrechamente con los trabajos experimentales de laboratorio. En la década de los años 90, surgió el Centro de Investigaciones del Ozono, como parte del Centro Nacional de Investigaciones Científicas, y se desarrolló una Red Nacional de Ozonoterapia que agrupa actualmente a más de 40 instituciones nacionales de Salud.(20).

### **Objetivo General:**

- Demostrar la Actividad anti-fúngica in vitro del extracto y aceite esencial del *Rosmarinus officinalis* “romero” potencializado con ozono sobre la *Candida albicans* cepa ATCC 10231.

### **Objetivos Específicos:**

- Determinar la actividad anti-fúngica del aceite esencial de romero potencializado con ozono sobre la *Candida albicans* cepa ATCC 10231.
- Demostrar el efecto anti-fúngico del extracto alcohólico de romero potencializado con ozono sobre la *Candida albicans* cepa ATCC 10231 .
- Determinar la cantidad de flavonoides que existen en el extracto alcohólico de romero potencializado con ozono.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Tipo de investigación

**Experimental.** Porque se va a valorar el efecto de un hongo, donde el Investigador manipula las condiciones de la investigación.

**Comparativo.** Porque permite contrastar los resultados del experimento.

**In vitro.** Porque la técnica para realizar el experimento se realiza en un ambiente controlado fuera de un organismo vivo.

### 2.2 Tipo de muestreo

*Candida Albicans* (cepa ATCC 10231)

### 2.3 Recursos

#### Recursos Ambientales:

- Apoyo en la preparación del extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* por el Laboratorio de Ingeniería Agro Industrial de la UNACH
- Apoyo en la obtención de aceites esenciales de *Rosmarinus officinalis* por el Laboratorio de Ingeniería Agro Industrial de la UNACH

#### Recursos Humanos:

- Químico farmacéutico
- Ingeniero bioquímico.
- Odontólogos.
- Digitador.

## **2.4 Materiales y equipos para extraer el extracto alcohólico**

Hojas, flores y talluelos de (romero)

Balanza

Botellas ámbar

Refrigeradora

Vaso de precipitado

Alcohol de 70°

Papel filtro

## **2.5 Materiales y equipos para extraer aceite esencial**

Destilador

Botellas ámbar

Papel filtro

Vaso de precipitado

## **2.6 Materiales y equipos para la preparación de medios de cultivo**

Medios de cultivo enriquecidos Agar TSA

Balanza

Agua destilada

Probetas

Matraz de Erlenmeyer

Placas Petri

Pipetas

Esterilizador de calor seco (horno)

Autoclave

Mecheros

Estufa (incubadora)

Microscopio

Refrigeradora

Tubos de prueba

Guantes

Hisopo

## **2.7 Materiales para la activación de la *Candida Albicans* (cepa ATCC 10231)**

Placas Petri estériles

Agar caso

Caldo de cultivo

*Candida albicans* (cepa ATCC 10231)

Asa

Tubos de ensayo estériles

Tubos eppendorf

Centrífuga

Hisopos

Vaso de precipitación estéril

Glicerol

## **2.8 Materiales para el cultivo y antibiograma**

Cajas Petri estériles

Extracto esencial del romero

Aceite esencial del romero

Discos blank

Discos de fluconazole

Vasos de precipitación

Equipo de ozono (O3)

Cámara de flujo laminar

Hisopos

Matraz

Agar saboruod

Incubadora

Pipeta

Tubos de ensayo

Dmso (dimetilsulfoxido)

### **2.9 Materiales para obtención de flavonoides:**

Etanol

Carbón activado

Centrífuga

Tubos de ensayo

Nitrato de sodio ( $\text{NaNO}_2$ )

Cloruro de aluminio ( $\text{AlCl}_3$ )

Hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ )

Espectrofotómetro SHIMADZU UV-1603

### **2.10 Materiales para medir el potencial de hidrógeno en el extracto esencial ozonizado:**

Analizador de ph marca HACH modelo sensION3.

### **2.11 Materiales para obtención de ozono:**

Equipo emisor de ozono (Puri ozono ) de 200 miligramos de capacidad

Manguera

Disipador de ozono

## **2.12 PROCEDIMIENTO Y TÉCNICAS**

### **2.12.1 Procedimiento para extraer el extracto alcohólico**

Este fue el primer paso, para obtener el extracto alcohólico se llevo la planta al laboratorio se desgrano las hojas de romero separando los tallos en una bandeja de aluminio, sumergimos el romero con cloro para eliminar cualquier impureza o bacteria que pueda afectar el proceso, una vez las hojas de romero limpias en una bandeja de aluminio introducimos en un secador por 5 horas aproximadamente ya completamente seco se saco la bandeja y por medio de un molino manual obtuvimos el romero listo para macerar.

La maceración se llevo a cabo durante 8 días proceso en el cual ocupamos un frasco ambar con capacidad para 1 litro, en el frasco introducimos 2 libras de romero molido y 1 litro de alcohol al 70% dejamos reposar en el frasco 8 días aproximadamente, libre del sol y mecer el frasco al menos 2 veces por día.

Una vez que ya se cumplieron los 8 días de maceración pasamos al proceso de filtración en este proceso vertimos poco a poco del frasco ambar el romero macerado con alcohol en el vaso de precipitación sirniendo en el papel filtro con ayuda de la bomba al vacío para obtener mayor pureza y efectividad en el filtrado.

Se obtuvo 44ml de extracto alcohólico puro de Romero que se conservo en refrigeración en un frasco ambar pequeño. Posterior a este proceso se realizo 4 diluciones:

100%, 75%, 50% y 25% cada dilución separa en un vaso de precipitación lista para ser potencializada con ozono.

### **2.12.2 Procedimiento para la obtención del aceite esencial del romero.**

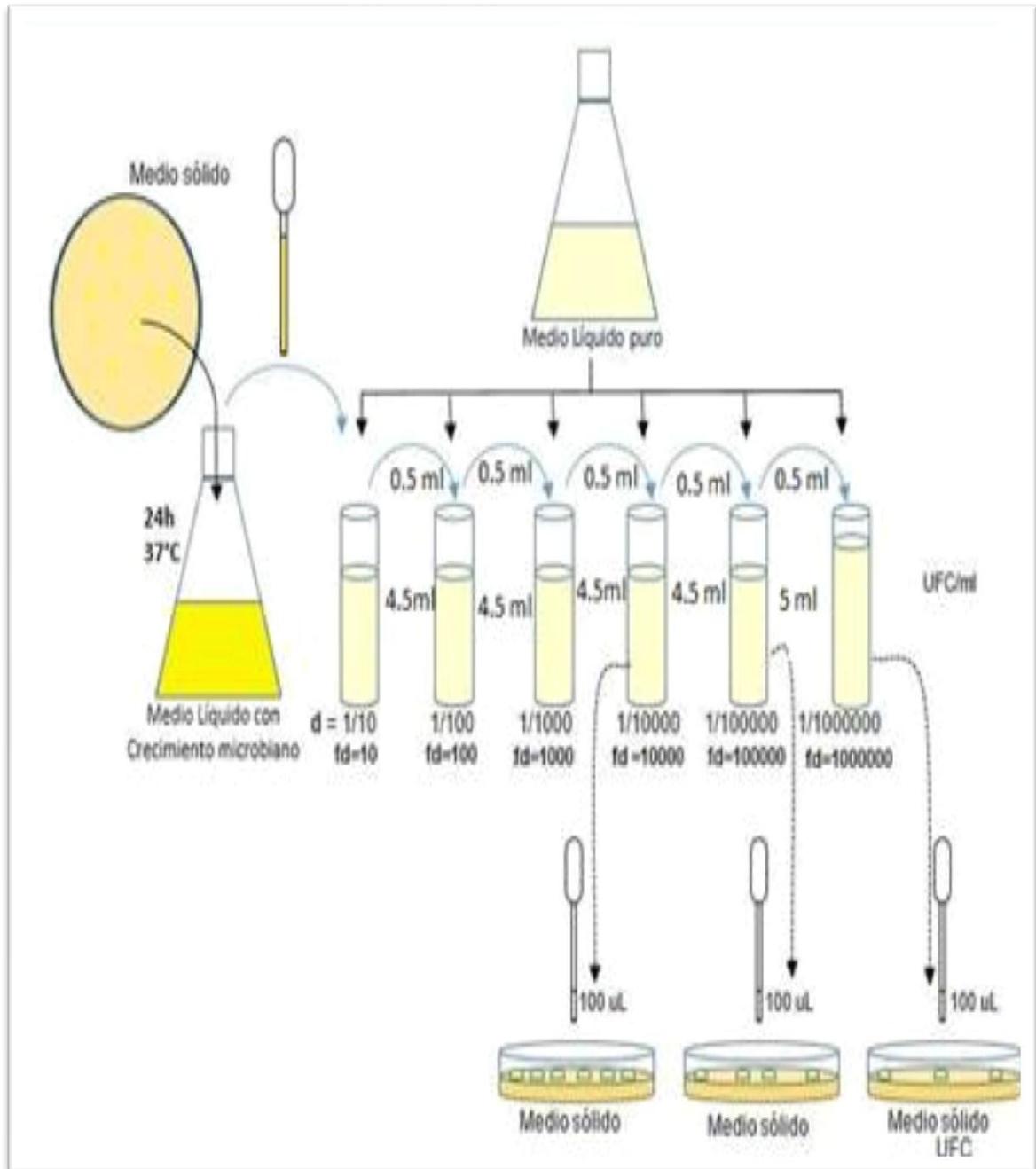
En este proceso se obtuvo en el laboratorio de ingeniería agroindustrial por medio del destilador por arrastre de vapor, en una balanza pesamos 4 libras de la planta romero se ingreso al destilador durante de 4 horas aproximadamente, se obtuvo 2ml de aceite esencial vertimos el un vaso de precipitación y sellamos con papel encerado para evitar contaminación e impurezas , se conservo en refrigeración.

## Procedimiento para la preparación del hongo (cándida albicans)

Para este procedimiento utilizamos el laboratorio de biología celular y molecular – investigación de la carrera de laboratorio clínico del la Unach. En este laboratorio obtuvimos la cepa de la cándida albicans ATCC 10231.

Primero preparamos el agar caso para obtener el medio líquido para crecimiento fúngico, después en 3 cajas Petri plaqueamos el agar caso, una vez plaqueado el agar en las cajas Petri inoculamos el hongo con un hisopo ,el hongo se mantenía en congelación -80 grados centígrados después de inocular las cajas Petri ingresan a la incubadora a 37 grados centígrados de 18 a 24 horas aproximadamente para promover el crecimiento fúngico. Al pasar las 18 horas en la incubadora de las 3 caja Petri seleccionamos y aislamos una UFC (unidad formadora de colonias) con la ayuda del asa e inoculamos en el caldo de cultivo previamente preparado 100ml, una vez inoculado la UFC en el caldo se lleva a la incubadora de 18 a 24 horas a 37 grados centígrados. Al culminar el tiempo establecido en la incubadora obtuvimos un caldo de cultivo turbio que nos indicaba que existe crecimiento del hongo, este va a ser el medio líquido con crecimiento fúngico (matraz madre), En 8 tubos de ensayo vertimos 4.5 mililitros de caldo de cultivo nuevamente preparado en cada tubo de ensayo el cual va a ser nuestro medio líquido puro, en el primer tubo de ensayo con medio líquido puro, con la pipeta llevamos 0.5mililitros el caldo de cultivo del medio líquido con crecimiento fúngico y mezclamos del tubo uno con la pipeta llevamos esta mezcla al tubo dos y mezclamos y este proceso se repite en todos los tubos en orden y así sucesivamente hasta llegar al tubo 8, con lo que nos queda 7 tubos de ensayo con 4,5 mililitros y el último tubo de ensayo (8) con 5 mililitros. De estos 8 tubos de ensayo ocupamos solo los tres últimos 6,7,8.

De estos 3 tubos finales con una pipeta sacamos 0.1mililitros en un tubo de ensayo, preparamos agar caso en 3 cajas Petri y con un hisopo inoculamos el 0.1 mililitro obtenido e introducimos las 3 cajas en la incubadora de 18 a 24 horas. En la imagen a continuación nos indica el procedimiento descrito de forma didáctica.



Posterior a esto retiramos las 3 cajas Petri con previamente inoculadas aislamos la cantidad contable de UFC en este caso fue la caja numero 2 que corresponde a la inoculación del tubo 7 y con ayuda del microscopio observamos la caja seleccionada y realizamos el conteo de 380 UFC.

Del tubo de ensayo 7 se inoculo en la caja 2 seleccionamos la UFC contable que son 380 UFC.

Con lo que representamos en la siguiente formula:

Tubo 7: Tenemos 380UFC en cada 100 microlitos.

$$380 \times 10 = 3800 \text{ml} \times 1 \times 10^7 = 3,8 \times 10^{10}$$

$3,8 \times 10^{10}$  UFC esto tenemos en cada 100 mililitros en el medio líquido con crecimiento fúngico.

Se concentro el hongo que teníamos en 100mililitros a 50 mililitros x lo que toda la concentración se duplica entonces ahora por cada mililitro del medio liquido con crecimiento fúngico tendrá :

$$1 \text{ml} = 7,6 \times 10^{10} \text{ UFC}$$

la fórmula estándar a la que tenemos que llegar es la siguiente:

$$2,5 \times 10^8 \text{ UFCx/ml.}$$

Para llegar a esta fórmula estándar debemos hacer diluciones aplicando la siguiente fórmula:

C1= contenido 1 (lo que tenemos)

C2= contenido 2 (lo que queremos tener)

V2= volumen (cantidad que tenemos y vamos a diluir)

V1= volumen 1 X (lo que necesitamos calcular para diluir)

C1=  $7,6 \times 10^{10}$  UFC/ml.

C2=  $2,5 \times 10^8$  UFC/ml.

V2= 5000 ul (microlitros)

V1= ?

$$V1 = \frac{V2 = 5000 \text{ ul} \times C2 = 2,5 \times 10^8 \frac{\text{UFC}}{\text{ml}}}{7,6 \times 10^{10} \text{ UFC/ml}}$$

V1= 16,4 ul (microlitros).

Una vez que calculamos el volumen 1 ya sabemos cuanto vamos a diluir, del matraz madre que contiene el medio líquido con crecimiento fúngico, todo el contenido dividimos en tubos de ensayo en partes iguales lo que nos dio 8 tubos de ensayo.

Estos 8 tubos de ensayo los tapamos e ingresamos a los tubos en la centrífuga.

Después de esperar el tiempo de centrifugado tomamos los tubos y eliminamos el líquido para mantener las UFC puras, concentramos las UFC que quedaron y nos quedaron 4 tubos de ensayo con UFC puras.

Vertimos en un vaso de precipitación estéril las UFC puras de los tubos de ensayo previamente centrifugados, preparamos nuevamente caldo de cultivo y vertimos en el mismo vaso de precipitación estéril y aumentamos glicerol la cantidad que calculamos en la ecuación previa para diluir que eran 16ul (V1).

ya obtuvimos la cantidad exacta de la preparación de bacteria que necesitábamos, en 50 mililitros.

Dividimos en 50 tubos eppendorf los 50 mililitros , 1 mililitro en cada tubo eppendorf, para así tener por cada 1 mililitro la formula estándar de hongo que necesitábamos llegar de la siguiente manera:

1 tubo eppendorf contiene 1ml =  $2,5 \times 10^8$  (cantidad de *Candida albicans* por mililitro).

### **2.12.3 Procedimiento para el cultivo y antibiograma:**

En este proceso primero preparamos agar saboroud, este agar es un medio específico para crecimiento de hongos por eso utilizamos este agar para el cultivo y antibiograma, separamos un tubo eppendorf que se mantenían en congelación a  $-80$  grados centígrados y que contenía 1 mililitro de concentración, separamos el agar saboroud en 6 cajas Petri y de 1 mililitro del hongo con la pipeta con la pipeta separamos 0,1ml a un tubo de ensayo, por medio de un hisopo inoculamos el hongo en el agar y así sucesivamente en las 6 cajas.

El extracto esencial los separamos en las diluciones previamente realizadas (100%, 75%, 50%, 25%) en vasos de precipitación estériles para aplicar ozono durante 5 minutos en cada vaso de precipitación y después sellar con papel encerado hasta el momento de ocuparlos.

De la misma forma el aceite se separo en un vaso de precipitación estéril y se aplico ozono durante 5 minutos y después sellarlo con papel encerado.

Una vez listo el extracto esencial y aceite esencial potencializado con ozono se sumergieron los discos blank en cada uno de los vasos de precipitación, estos discos blank tienen una capacidad de absorción de 4 microlitros x unidad.

Los discos de fluconazole para la prueba control tenían una dosis de 25 microgramos.

Una vez listo todo empezamos a poner los discos de blank ya sumergidos en cada sustancia correspondiente y aplicamos en cada caja Petri.

A las cajas Petri previamente inoculadas se les añadía :

- 1 disco blank de extracto esencial ozonizado al 100%
- 1 disco blank de extracto esencial ozonizado al 75%
- 1 disco blank de extracto esencial ozonizado al 50%
- 1 disco blank de extracto esencial ozonizado al 25%
- 1 disco blank con aceite esencial ozonizado
- 1 disco con fluconazole (prueba control)

una vez que cada caja Petri estaba completa se las introducimos en la incubadora por 18 horas .

Debido al efecto encontrado en los resultados de las primeras cajas se decidió hacer 3 diluciones mas del extracto esencial ozonizado en concentraciones del 20%, 15%,10%. Con la finalidad de demostrar hasta q porcentaje de pureza se podía encontrar efecto anti-fúngico, volviendo a repetir el mismo proceso de las cajas anteriores.

Fluconazole (prueba control)

El disco de la prueba control del fluconazole tiene una concentración de 24 microgramos. El halo de inhibición en el disco de fluconazole fue de 0.5 mm.

### **2.12.3 Procedimiento para obtener los flavonoides:**

En este procedimiento utilizamos un protocolo a seguir para determinación de flavonoides :

- Preparamos la muestra relación 1:1 etanol y extracto.
- Añadimos 0.5 gramos de carbón activado y homogenizamos la muestra.
- Centrifugamos la muestra preparada por 15 minutos a 4000 rpm.
- Trasvasar la muestra a un tubo de ensayo solo el líquido transparente
- Preparar los reactivos  $\text{NaNO}_2$  al 5%,  $\text{AlCl}_3$  al 10%,  $\text{NaOH}$  1N.
- Añadir 1 ml de  $\text{NaNO}_2$  y dejar reaccionar por 5 minutos. Añadir 1ml de  $\text{AlCl}_3$  y dejar reaccionar por un minuto , agregar 6 ml. De  $\text{NaOH}$  dando una coloración naranja y posterior se realiza lectura en el espectrofotómetro.
- Lectura en el espectrofotómetro UV visible a 320nm.

Una vez acabado el protocolo revisamos los resultados en el espectrofotómetro.

### **2.12.4 Procedimiento para la medición del PH en el extracto esencial ozonizado.**

En este procedimiento se utilizo las diluciones de extracto esencial de romero ozonizado al 100%,75%,50%,25%. En los vasos de precipitación, con ayuda del analizador de ph o monitor de ph. El analizador de ph se introducía cada vaso de precipitación con cada una de las diluciones establecidas dando los siguientes resultados.

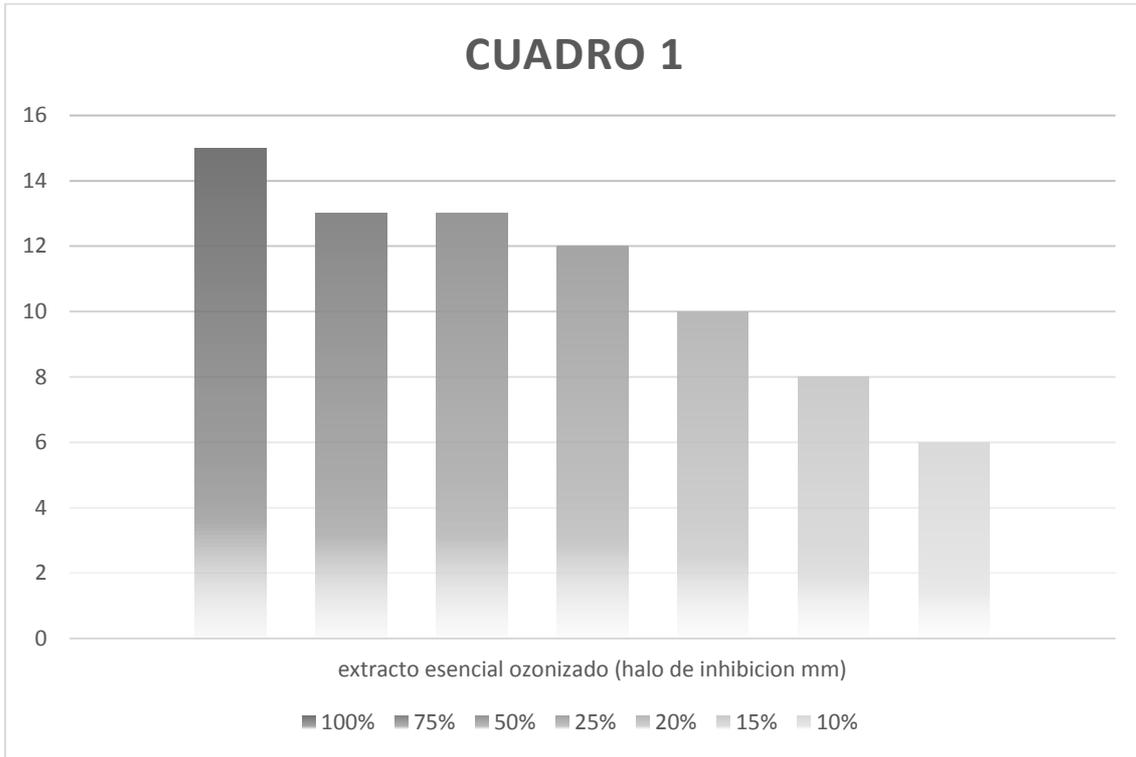
### 3 RESULTADOS

#### Resultados del antibiograma del extracto alcohólico de romero potencializado con ozono.

Diluciones	Promedio halo de inhibición en milímetros.
100%	15 mm.
75%	13 mm.
50%	13 mm.
25%	12 mm.
20%	10 mm.
15%	8 mm.
10%	6 mm.

Los Resultados del extracto esencial ozonizado nos determinan que la dilución pura al 100% fue la que presento un halo de inhibición mas grande de 15 mm, la dilución al 75% tubo un halo de inhibición de 13mm, al igual que la dilución al 50% tubo un halo de inhibición de 13 mm, al 25% con un halo de inhibición de 12mm estas dos diluciones al 75% y al 50% tuvieron aproximadamente el mismo tamaño de halo de inhibición, a partir de 20% se nota un efecto disminuido de halo de inhibición al ser de 10 mm, las dos ultimas diluciones al 15% y al 10% nos dan un halo de inhibición de 8mm y 6mm respectivamente, lo que nos comprueba que no son efectivas ya que un halo de inhibición al ser menor de 8mm, pierde la efectividad en la actividad anti-fúngica.

El extracto esencial ozonizado si tiene actividad anti-fúngica en las diluciones al 100%,75%,50%,25% y 20%. Las dos ultimas diluciones al 15% y al 10% están por debajo del rango de 8mm de halo de inhibición lo que nos indica que a partir de la dilución al 15% y al 10% pierde la actividad anti-fúngica sobre la *Candida albicans*.



### Resultados antibiograma del aceite esencial de romero potencializado con ozono

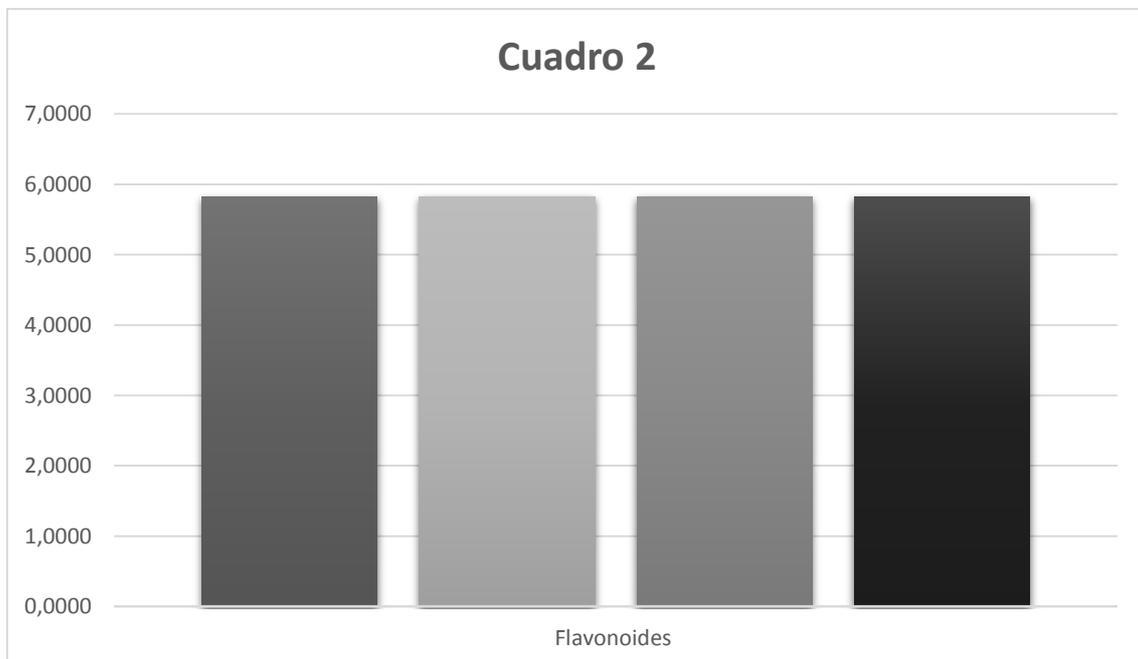
ARO3 (promedio)	11 mm diámetro
-----------------	----------------

Los resultados del aceite ozonizado puro (100%) nos indica un halo de inhibición de 11mm, que da como resultado que el aceite ozonizado si tiene actividad anti-fúngica sobre la *Candida albicans*. Además que el aceite de romero es un vehículo adecuado para el ozono en la actividad anti-fúngica ya que el ozono en aceite permanece mas tiempo en actividad.

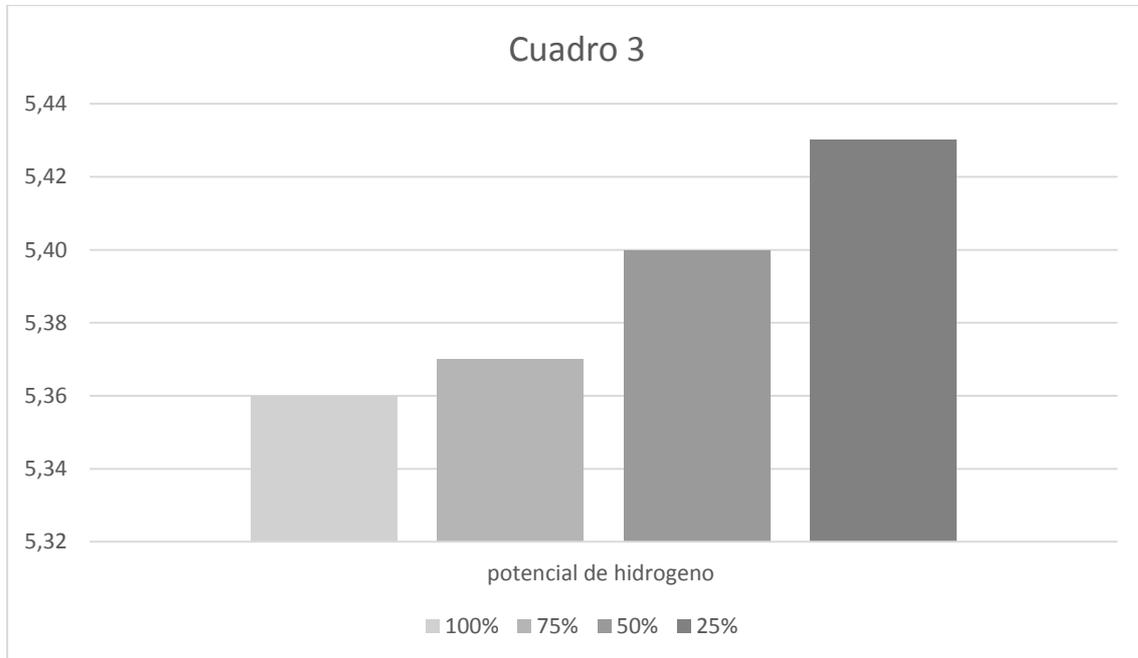
### Resultados sobre la determinación de flavonoides en el espectrofotómetro:

Muestra No.	Absorbancia (ABS)	Concentración (%)
1= 100%	3.9999	5.8287
2= 75%	3.9999	5.8287
3= 50%	3.9999	5.8287
4= 25%	3.9999	5.8287

En los resultados sobre los flavonoides determinamos que el extracto esencial de romero al ser potencializado con ozono mantiene la misma cantidad de flavonoides en todas las diluciones lo que nos indica que tiene una actividad anti-fúngico y positiva.



**Resultados de la medición de potencial de hidrogeno en el extracto alcohólico de romero ozonizado.**



En cuanto al análisis de potencial de hidrogeno (ph) en las todas las diluciones nos indica que mientras más puro sea el extracto esencial ozonizado se puede observar que tiene un ph más ácido conforme se van aumentando las diluciones el potencial de hidrogeno tiende a ser mas básico.

#### 4 DISCUSION:

En los últimos años ha habido un aumento de la resistencia a los hongos a los antibióticos convencionales utilizados. Hay varias razones para ello, con una cuestión de importancia fundamental es la selección de microorganismos resistentes que se produce cuando el proceso terapéutico falla. En general, los factores relacionados con la ineficacia del tratamiento se pueden resumir como el tratamiento prolongado y su alto costo para la mayoría de la población ambas sancionadas en la insuficiencia del paciente para cumplir a la terapia. Paralelamente, se ha producido un aumento en el número de casos de varias otras especies que antes eran inofensivos para los humanos. Frente a esto, más se debe prestar atención al tratamiento tópico de las infecciones por hongo.(21)

LV Guerrer en 2012 demostró que el tamaño medio de zonas de inhibición utilizando aceite ozonizado era más pequeño que los obtenidos con otros agentes anti-fúngicos. Sin embargo, es imposible decir que este aceite es menos eficaz que los agentes de control ya que no indica la concentración mínima inhibitoria requerida para las cepas sensibles o resistentes a establecerse de datos. Se observó una amplia actividad anti-fúngica como se inhibieron todas las especies; no había pruebas de resistencia.(22). Estoy de acuerdo con este estudio ya que no se puede dar una concentración mínima inhibitoria en las cepas sensibles o resistentes, al igual en nuestra investigación el aceite esencial de romero ozonizado tubo un halo de inhibición de 11mm sobre la *Candida albicans* cepa atcc 10231. que nos da una actividad anti-fúngica positiva al contrario de nuestra prueba control, ya que el fluconazole no tubo actividad anti-fúngica.

Menéndez S. y Falcon L. En 2012, hicieron Un ensayo controlado aleatorizado de fase III usando el aceite ozonizado en pacientes que sufren de la onicomycosis, demostró que este tratamiento es eficaz e incluso mejor que la de ketoconazol y no se observaron efectos secundarios. (23). Estoy de acuerdo con este artículo ya que el aceite esencial de romero ozonizado es una terapéutica natural y la familia del fluconazole en nuestro caso nuestra prueba control, presenta efectos secundarios a largo plazo y toxicidad.

Según Maqueira Y en 2013 nos dice q los extractos y aceites esenciales de plantas en el tratamiento sobre hongos, tienen una buena acción antimicótica conocida y buena tolerancia de la piel. (23) .Estoy de acuerdo con este artículo ya que nos da una alternativa terapéutica tópica bastante efectiva, en nuestra investigación tanto el aceite esencial y extracto alcohólico de romero ozonizado son una novedosa y prometedora terapia alternativa contra los agentes fúngicos que merece estudios adicionales utilizando una metodología clínica y de laboratorio-cuantitativos para establecer mejor los límites de la sensibilidad y protocolos apropiados para el tratamiento.

## 5 CONCLUSIONES:

- A través de este proyecto de investigación se a podido determinar que la actividad anti-fúngica del extracto alcohólico de romero ozonizado a sido efectiva sobre la *Candida albicans* cepa ATCC 10231.
- Mediante el desarrollo de esta investigación se logro demostrar que el aceite esencial de romero ozonizado tiene actividad anti-fúngica positiva sobre la *Candida albicans* cepa ATCC 10231.
- En base a los resultados sobre los flavonoides se ha determinado que el extracto esencial de romero al ser potencializado con ozono mantiene la cantidad de flavonoides a pesar de haber echo diluciones.

## **6 RECOMENDACIONES:**

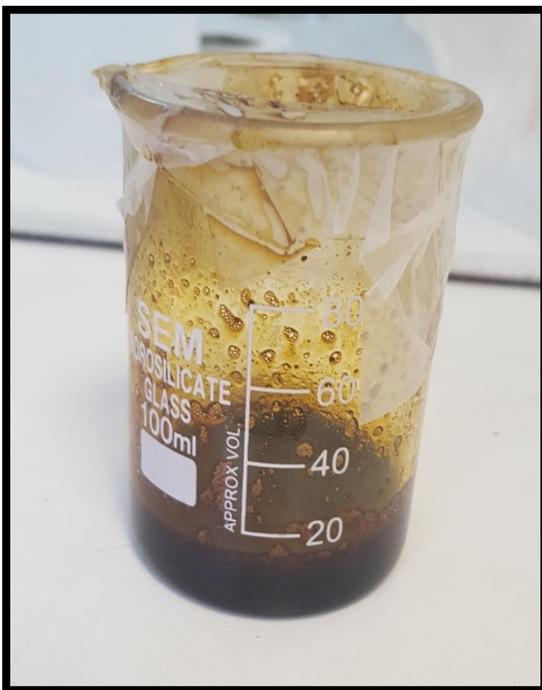
- Se recomienda incentivar a los estudiantes de la facultad de ciencias de la salud de la “Unach” a los proyectos de investigación ya que es una importante área para el desarrollo de nuevos métodos y técnicas.
- Implementar equipos de alta tecnología en los laboratorios de investigación de la universidad nacional de Chimborazo con el objetivo de profundizar los análisis científicos.
- Mejorar la investigación en los primeros ciclos de la carrera de odontología mediante conferencias, cursos de actualización, foros y debates, formando un pensamiento autocrítico en los futuros profesionales.

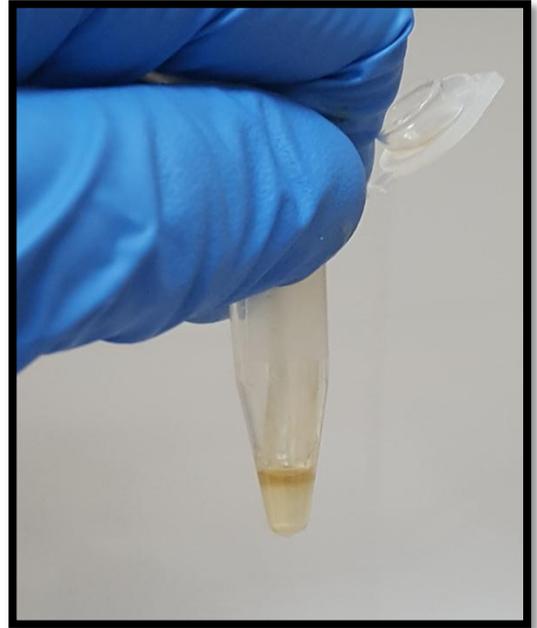
## 7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

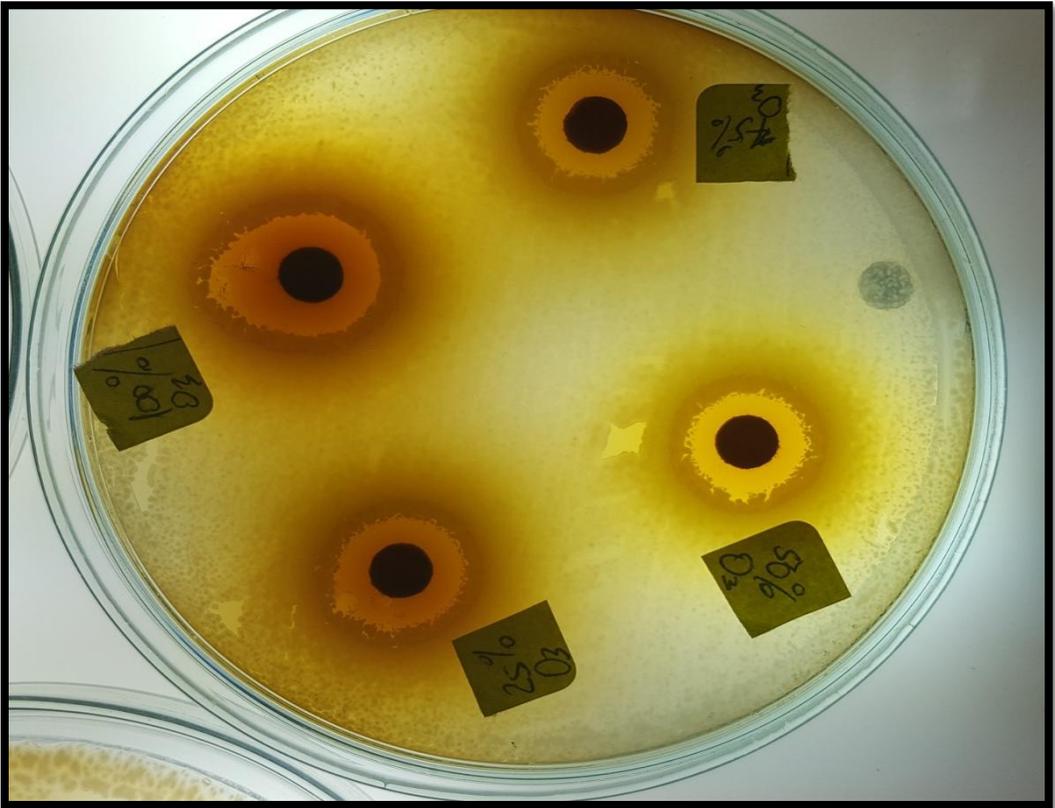
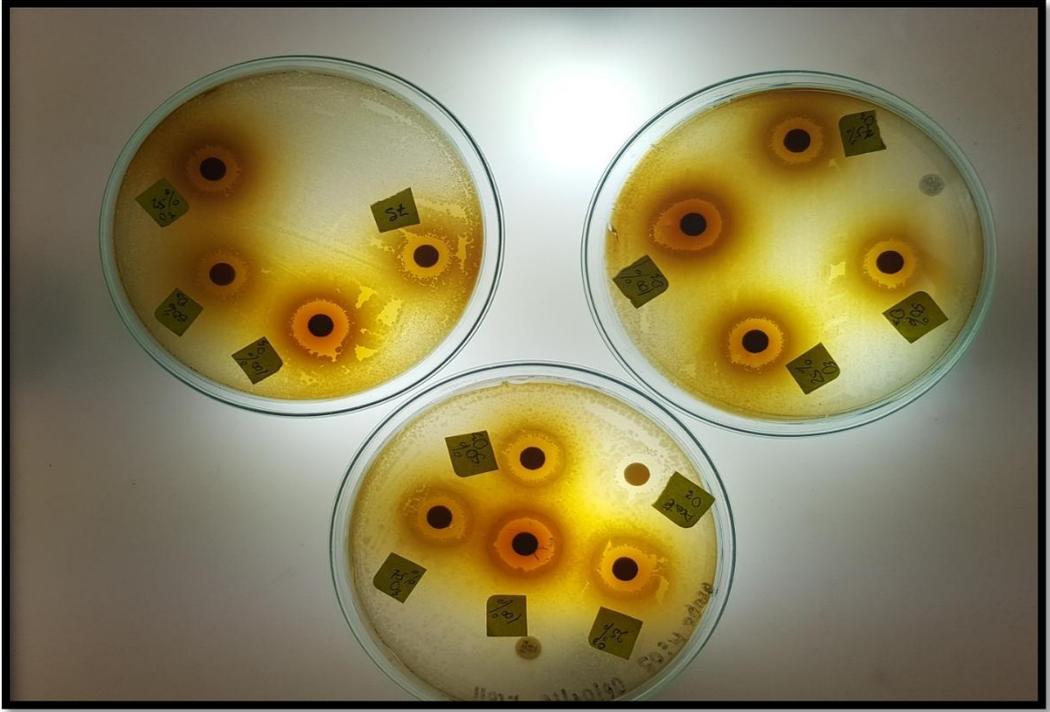
1. Aguirre JM. Candidiasis orales. Rev Iberoam Micol 2002, 19:17-21.
2. Samaranayake LP. Nuevas perspectivas en la epidemiología y etiopatogénesis de la Candidiasis Oral. Gac Med bilbao 2001, 98:E15-16.
3. Almeida OP, Scully C. Fungal infections of the mouth. Braz J Oral Sci 2002, 1(1):19-26
4. Lazarde J, Pacheco A. Identificación de especies de Candida en un grupo de pacientes con Candidiasis atrófica crónica. Act Odont Vzlana 2001, 39(1):13-18.
5. Poirier AC, Chimenos KE, Ferrer BM, López LJ, Caballero HR. Importancia de los factores predisponentes en la Candidiasis bucal. Med Oral 1997, 2:21-9
6. Ceballos SA, Guitan LA, Ruesga MT, Ceballos L y Guindós G. Prevalencia de lesiones orales por Candida en una población con sida sometida a terapia antirretroviral altamente activa. Rev Iberoam Micol 1998, 15:141-45.  
ref
7. Scully C, El-Kabir M, Samaranayake LP. Candida and oral candidosis. Crit Rev Oral Biol Med 1994, 5:124.158.
8. Samaranayake LP, MacFarlane TW. Oral candidiasis. London, Butterwort &Co, 1990.
9. Aguirre JM, Bagán JV, Ceballos A. Infecciones micóticas orales. En: Liébana J, Bagán JV(Edis). Terapéutica antimicrobiana en Odontoestomatología. Madrid, Beecham, 1996:311-331.
10. Ellepola AN, Samaranayake LP. Inhalational and topical steroids and oral candidiasis: a review. Oral dis 2001, 7:11-17.
11. Axell T, Samaranayake LP, Reichart PA, et al. A proposal for reclassification of oral candidiasis. Oral surg Oral Med Oral Pathol Oral radiol Endod. 1997,84:111-12.
12. Quindós G, Ribacoba L, Contreras I, Aguirre JM. Tratamiento de las candidiasis orofaríngeas. Rev Iberoam Micol 1996,13(supl 1): S11-15.
13. Quindós G. Nuevas perspectivas en la terapia antifúngica. Gac Med Bilbao 2001,98:E20-23.

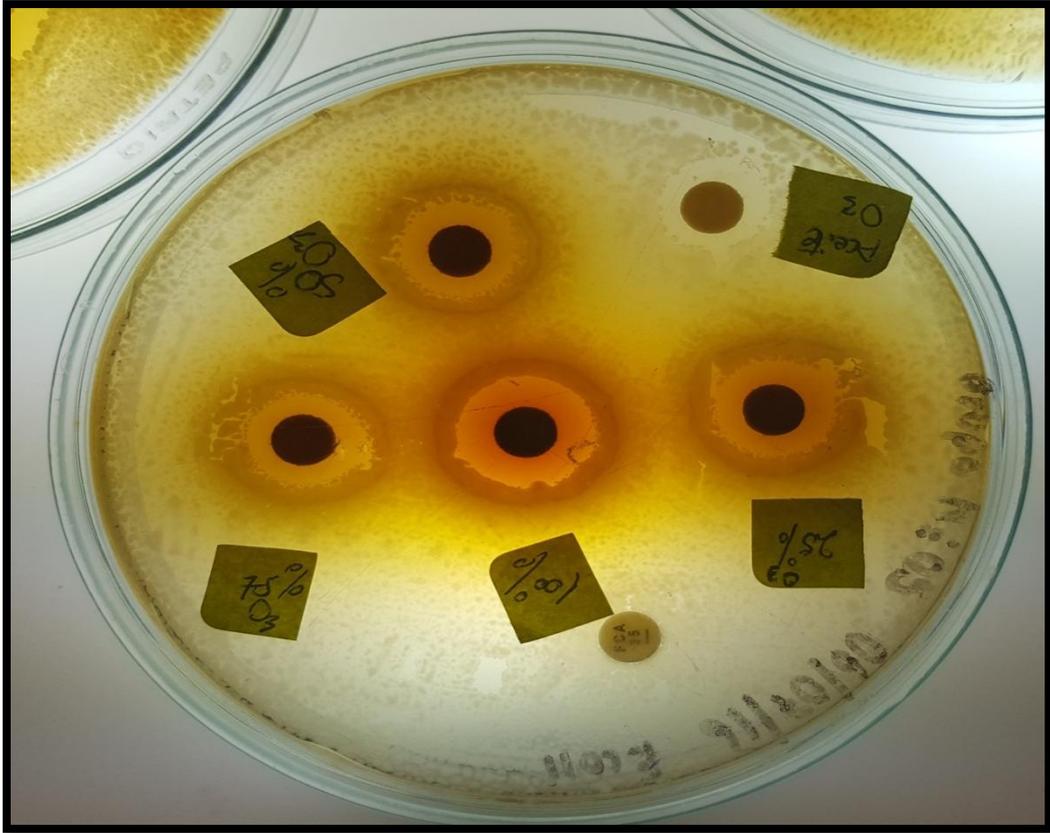
- 14 Sotelo, J.I., D. Martinez-Fong & P. Marriel. 2002. Evaluation of the effectiveness of *Rosmarinus of cinalis* (Lamiaceae) in the alleviation of carbon tetrachlonda- induced acute hepatocity in the rat. *Journal of Ethopharmacology*, 81(3): 145-154.
- 15 Ruiz, O.M. 2000. *Tratado de Botánica*, 3a. ed., Porrúa, México D.F., 1256 pp.
- 16 Arévalo, Y., S. Robledo & L. Muñoz. 2009. Evaluación *in vitro* de la actividad de aceites esenciales de plantas colombianas sobre *Leishmania braziliensis*. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*, 38(2): 131-141.
- 17 Mierlici, I.D. 2009. Phytochemical study of some active principles with antioxidant action from the *Rosmarinus of cinalis* and *Salvia of cinalis* species. *Analele Stiintice ale Universitatii AlexandruIoan Cuza. Génova Italia*.
- 18 Abril Martin JC. La Ozonoterapia [en línea] Disponible en: [http://home.worldonline.es/juancabr/Pagina\\_n.htm](http://home.worldonline.es/juancabr/Pagina_n.htm) [Consultado: 29 de noviembre del 2005].
19. Centro de Investigaciones del Ozono. Compendio de estudios y aplicaciones del Ozono en Cuba (1980-2004) [CD-ROM]. La Habana , SOFTCAL-CENIC, 2005.
20. Perancho I. El Timo de la Ozonoterapia. *El Mundo (Suplemento)*, 4 de diciembre de 2004, No. 597.
21. SAP Sampaio, Rivitti EA *Dermatologia*. Sao Paulo: Artes Médicas; 2012.
22. Menéndez S., L. Falcón, Maqueira Y. terapéutica efficacy de OLEOZON tópica en pacientes que sufren de la onicomycosis micosis. 2012; 17 de mayo
23. Menéndez S., L. Falcón, Simon DR, Landa N. eficacia del aceite de girasol ozonizado en el tratamiento de la tinea pedis. *Micosis*. 2013; 20 (45):. 329-332

## 8 ANEXOS:









Quantificación 274.0nm 3.4362A

Muest N°	A B S	Conc.( % )
1 - 1	3.9999	5.8287
1 - 2	3.9999	5.8287
1 - 3	3.9999	5.8287
1 - m	3.9999	5.8287
2 - 1		

Muest N° ArchDato VisDatos Ecuación