



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO E
HISTOPATOLÓGICO**

Trabajo de Titulación para optar el título de Licenciados en Ciencias de la
Salud en Laboratorio Clínico e Histopatológico

Título

Efecto antimicótico del aceite esencial de *Hedyosmum cuatrecazanum*
Occhioni recolectada en el páramo Andino del Ecuador

Autores:

Denyse Salomé Alarcón Cabrera
Anthony Damián Rivera Rodríguez

Tutor:

PhD. María Eugenia Lucena de Ustáriz

Riobamba, Ecuador. 2022

DERECHOS DE AUTORÍA

Nosotros, Denyse Salomé Alarcón Cabrera, con cédula de ciudadanía 0604052514 y Anthony Damián Rivera Rodríguez con cédula de ciudadanía 1850204676, autores del trabajo de investigación titulado: **Efecto antimicótico del aceite esencial de *Hedyosmum cuatrecazanum Occhioni* recolectada en el páramo Andino del Ecuador**, certificamos que la producción, ideas, opiniones, criterios, contenidos y conclusiones expuestas son de nuestra exclusiva responsabilidad.

Asimismo, cedemos a la Universidad Nacional de Chimborazo, en forma no exclusiva, los derechos para su uso, comunicación pública, distribución, divulgación y/o reproducción total o parcial, por medio físico o digital; en esta cesión se entiende que el cesionario no podrá obtener beneficios económicos. La posible reclamación de terceros respecto de los derechos de autor (a) de la obra referida, será de nuestra entera responsabilidad; librando a la Universidad Nacional de Chimborazo de posibles obligaciones.

En Riobamba, 11 de julio del 2022.



Alarcón Cabrera Denyse Salomé

C.I. 0604052514



Rivera Rodríguez Anthony Damián

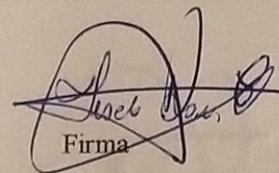
C.I. 1850204676

DICTAMEN FAVORABLE DEL TUTOR Y MIEMBROS DE TRIBUNAL

Quienes suscribimos, catedráticos designados Tutor y Miembros del Tribunal de Grado para la evaluación del trabajo de investigación **Efecto antimicótico del aceite esencial de *Hedyosmum cuatrecazanum Occhioni* recolectada en el páramo Andino del Ecuador** presentado por Denyse Salomé Alarcón Cabrera, con cédula de identidad número 0604052514 y por Anthony Damián Rivera Rodríguez, con cédula de identidad número 1850204676, certificamos que recomendamos la APROBACIÓN de este con fines de titulación. Previamente se ha asesorado durante el desarrollo, revisado y evaluado el trabajo de investigación escrito y escuchada la sustentación por parte de sus autores, no teniendo más nada que observar.

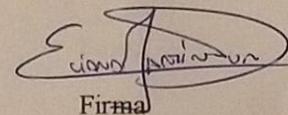
De conformidad a la normativa aplicable firmamos, en Riobamba, 11 de julio de 2022

Mgs. Yisela Ramos Campi
**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL DE
GRADO**



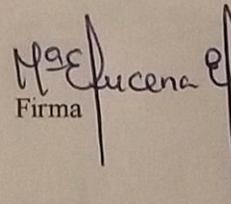
Firma

Mgs. Eliana Martínez Durán
MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE GRADO



Firma

PhD. María Eugenia Lucena de Ustáriz
TUTORA



Firma



Alarcón Cabrera Denyse Salomé
C.I. 0604052514



Rivera Rodríguez Anthony Damián
C.I. 1850204676

CERTIFICADO DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL

Quienes suscribimos, catedráticos designados Miembros del Tribunal de Grado para la evaluación del trabajo de investigación **Efecto antimicótico del aceite esencial de *Hedyosmum cuatrecazanum Occhioni* recolectada en el páramo Andino del Ecuador**, presentado por Denyse Salomé Alarcón Cabrera, con cédula de identidad número 0604052514 y por Anthony Damián Rivera Rodríguez, con cédula de identidad número 1850204676, bajo la tutoría de PhD. María Eugenia Lucena de Ustáriz; certificamos que recomendamos la APROBACIÓN de este con fines de titulación. Previamente se ha evaluado el trabajo de investigación y escuchada la sustentación por parte de sus autores; no teniendo más nada que observar.

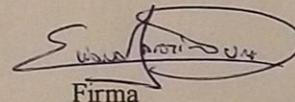
De conformidad a la normativa aplicable firmamos, en Riobamba a 11 de julio de 2022.

Mgs. Yisela Ramos Campi
**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL DE
GRADO**



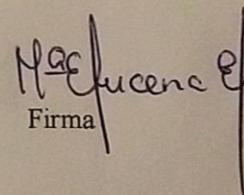
Firma

Mgs. Eliana Martínez Durán
Miembro del Tribunal de Grado



Firma

PhD. María Eugenia Lucena de Ustáriz
TUTORA



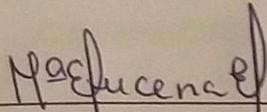
Firma

CERTIFICADO ANTIPLAGIO

CERTIFICACIÓN

Que, **Alarcón Cabrera Denyse Salomé** con cédula de ciudadanía **0604052514** y **Rivera Rodríguez Anthony Damián** con cédula de ciudadanía **1850204676**, estudiantes de la Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico, **NO VIGENTE**, Facultad de Ciencias de la Salud ha trabajado bajo mi tutoría el trabajo de investigación titulado "**Efecto antimicótico del aceite esencial de *Hedyosmum cuatrecazanum* Occhioni recolectada en el páramo Andino del Ecuador**", cumplen con el 7%, de acuerdo al reporte del sistema Anti plagio **URKUND**, porcentaje aceptado de acuerdo a la reglamentación institucional, por consiguiente autorizo continuar con el proceso.

Riobamba, 30 de mayo de 2022



PhD. María Eugenia Lucena de Ustáriz

TUTORA

DEDICATORIA

Este trabajo de titulación se lo dedico a mis padres pues ellos han sido una fuente de inspiración y perseverancia, a mi abuelita quien siempre ha estado pendiente de mí y de mi educación, a mi hermana que ha sido mi compañía en las noches de desvelo, a mi novio pues me ha apoyado en esta última etapa siendo una fortaleza, a mis amigos que gracias a su apoyo hemos logrado acabar esta etapa de nuestra vida y no nos hemos dejado vencer.

Denyse Salomé Alarcón Cabrera

A mis padres, mis hermanos quienes han sido el pilar fundamental durante todo este proceso y quienes me han formado inculcando buenos valores para llegar a ser la persona que en la actualidad soy. A mi ángel en el cielo quien me dio mucha valentía y soporte para no rendirme, a mis tíos y primos que me han acompañado en todo el camino con una sonrisa y palabras de apoyo.

Anthony Damián Rivera Rodríguez

AGRADECIMIENTO

Al culminar esta etapa agradezco a Dios pues es quien me ha mantenido firme en esta fase de mi vida, a mis padres que me han apoyado y guiado para no rendirme y seguir adelante a pesar de las adversidades, a la Universidad Nacional de Chimborazo por enseñarme y a mis profesores quienes han sembrado su conocimiento en mí de quienes he aprendido mucho y gracias a ellos poder desempeñarme en mi trabajo.

Denyse Salomé Alarcón Cabrera

Agradezco a Dios por la vida que me ha dado y la manera en la que ha guiado mi camino, gracias a mi madre y a mi padre que han luchado siempre por darme lo mejor y dejarme el estudio como el más preciado legado, a mi hermana gracias por ser mi complemento y una de las razones más grandes que tengo para salir adelante, también gratitud con mi hermano pequeño quien con su cariño me impulsa siempre. Infinidad de gracias a mi compañera de este trabajo quien es una de mis mejores amigas de la vida.

Y en deuda total con mi tutora, por su comprensión, apoyo y empuje para cumplir con nuestros objetivos.

Anthony Damián Rivera Rodríguez

ÍNDICE GENERAL

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	5
Objetivo General	5
Objetivos Específicos.....	5
CAPITULO II. MARCO TEÓRICO	6
Biodiversidad en el Ecuador	6
Medicina Ancestral en el Ecuador	7
Aceites Esenciales	8
Método de obtención del Aceite Esencial	8
Familia Chloranthaceae.....	9
Género <i>Hedyosmum</i>	9
Infecciones por <i>Candida</i>	10
Epidemiología	11
Tipos de <i>Candida</i>	11
<i>Candida albicans</i>	11
<i>Candida tropicalis</i>	11
<i>Candida krusei</i>	11
<i>Candida parapsilosis</i>	11
Diagnóstico de Laboratorio.....	12
Examen Directo.....	12
Hidróxido de potasio (KOH).....	12
Pruebas Inmunológicas	12
Pruebas Especiales	12
Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).....	12
Tratamiento	13
Resistencia.....	13
Tipos de Resistencia.....	13
CAPITULO III. METODOLOGÍA.....	14
CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
CAPITULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	33
Conclusiones	33
Recomendaciones.....	34
BIBLIOGRAFÍA.....	35

ANEXOS.....	42
-------------	----

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía del género <i>Hedyosmum</i>	11
Tabla 2. Análisis del aceite esencial de <i>Hedyosmum cuatrecazanum</i> <i>Occhioni</i>	24
Tabla 3. Actividad antimicótica del aceite esencial <i>Hedyosmum cuatrecazanum</i> <i>Occhioni</i> en la especie <i>Candida albicans</i>	25
Tabla 4. Actividad antimicótica del aceite esencial <i>Hedyosmum cuatrecazanum</i> <i>Occhioni</i> en la especie <i>Candida tropicalis</i>	27
Tabla 5. Actividad antimicótica del aceite esencial <i>Hedyosmum cuatrecazanum</i> <i>Occhioni</i> en la especie <i>Candida krusei</i>	30
Tabla 6. Actividad antimicótica del aceite esencial <i>Hedyosmum cuatrecazanum</i> <i>Occhioni</i> en la especie <i>Candida parapsilosis</i>	32
Tabla 7. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).....	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Hedyosmum sp</i>	10
Figura 2. Bosque andino ubicado en la parroquia Juan de Velasco, cantón Colta, provincia de Chimborazo, Ecuador donde se localizó la especie vegetal.....	10

RESUMEN

El objetivo del trabajo de investigación fue investigar la actividad antimicótica del aceite esencial de *Hedyosmum cuatrecazanum Occhioni* recolectada en los páramos Andino del Ecuador frente a especies de *Candida* de interés clínico dado que las enfermedades infecciosas producidas por especies de este microorganismo se han convertido en unas de las principales causas de muerte a nivel mundial. Esta investigación se basó en un estudio a nivel descriptivo por medio de revisión de artículos científicos sobre la especie vegetal *Hedyosmum cuatrecazanum Occhioni*, que presenta actividad antimicótica frente a especies de *Candida* y la composición química del aceite donde se destacan los siguientes constituyentes Eucalyptol, Linalool, Citronellol, Geraniol, Eugenol, entre otros. De diseño cuasi experimental, corte transversal tipo retrospectivo con carácter mixto. La población y muestra tanto de los estudios bibliográficos empleados para esta investigación y las cepas de interés clínico fueron seleccionadas por un proceso de inclusión y exclusión de datos como las fechas de publicación de los artículos, relación de estos con el tema, lo que respecta a la revisión bibliográfica; mientras que, las especies de *Candida* como *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. parapsilosis* seleccionadas fueron elegidas por su virulencia y susceptibilidad ante los antimicóticos. Los resultados obtenidos reflejan la actividad antimicótica del aceite esencial de *Hedyosmum cuatrecazanum Occhioni* frente a las 4 cepas de *Candida* obteniéndose halos de inhibición de hasta 20,67 mm de diámetro con concentraciones de 1 g/mL demostrando así el potencial uso de este aceite esencial como herramienta de ayuda terapéutica frente a candidiasis.

Palabras claves: *Hedyosmum cuatrecazanum*, virulencia, susceptibilidad, candidiasis, antimicóticos.

ABSTRACT

The objective of the research was to investigate the antifungal activity of the essential oil of *Hedyosmum cuatrecazanum Occhioni* collected in the Andean paramo of Ecuador against species of *Candida* of clinical interest. The infectious diseases produced by species of this microorganism have become one of the leading causes of death worldwide. This research was based on a descriptive study by reviewing scientific articles on the plant species *Hedyosmum cuatrecazanum Occhioni*, which presents antifungal activity against *Candida* species and the chemical composition of the oil where the following constituents stand out Eucalyptol, Linalool, Citronellol, Geraniol, Eugenol, among others. Of quasi-experimental design, retrospective cross-section with mixed character. The population and sample of both bibliographic studies used for this research and strains of clinical interest were selected by process of inclusion and exclusion of data such as the articles' publication dates, their relationship with the topic, and the bibliographic review. In contrast, *Candida* species such as *C. Albicans*, *C. tropicalis*, *C. Krusei*, and *C. Parasiplosis* were selected for their virulence and antimicrobial susceptibility. The results obtained reflect the antifungal activity of the essential oil of *Hedyosmum cuatrecazanum Occhioni* compared to the four strains of *Candida* obtaining inhibition halos up to 20,67 mm in diameter at concentrations of 1 g/mL, demonstrating the potential use of this essential oil as a therapeutic aid tool against candidiasis.

Keywords: *Hedyosmum cuatrecazanum*, virulence, susceptibility, candidiasis, antifungal.

Reviewed by:



Firmado electrónicamente por:
**EDUARDO SANTIAGO
BARRENO FREIRE**

Lic. Eduardo Barreno Freire

ENGLISH PROFESSOR

C.C 0604936211

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN

En el trabajo de investigación desarrollado se aisló el aceite esencial de *Hedyosmum cuatrecazanum* O cchioni endémica del Ecuador determinando así su actividad antimicótica frente a diferentes especies del género *Candida*. El aceite esencial es un compuesto que resulta del metabolismo de las plantas, en su gran mayoría tienen la característica de ser volátiles y de ser los responsables del aroma de la planta. De acuerdo a la especie, se estima que un aceite esencial contiene de entre 50 a 300 compuestos químicos, que se clasifican según sus particularidades en grupos como hidrocarburos terpénicos, aldehídos, cetonas, éteres, ésteres, compuestos fenólicos y demás ¹.

Los rasgos químicos específicos de los aceites esenciales van acordes en función de la zona de cultivo y de las condiciones ambientales ¹. Entre los usos más frecuentes de estos aceites están considerados como digestivos, expectorantes, diuréticos e inclusive antiinflamatorios. Además, poseen una fuerte demanda en la industria de la perfumería y en la preparación de varios alimentos y bebidas. Se ha destacado también la aplicación de los aceites esenciales en la industria farmacéutica constituyendo en la actualidad una importante fuente de principios activos para desarrollar medicamentos alternativos más eficaces y de costo accesible ².

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2021 la medicina tradicional complementaria (MTC) fue utilizada ampliamente a nivel mundial apreciada por diversos motivos. Las medicinas tradicionales han sido declaradas como procesos de calidad, seguridad y eficacia comprobada, contribuyendo a que el acceso sea posible y seguro permitiendo a las personas a una adecuada atención en salud ³.

Para la mayoría de la población mundial, las infusiones a base de hierbas, los tratamientos tradicionales y prácticas de las medicinas ancestrales representan una fuente primordial de atención sanitaria y en muchas ocasiones la única. Culturalmente este tipo de medicina es aceptada y de confianza para muchísimas personas. El soporte de la OMS a este tipo de procedimientos consiste en fomentarlos con el objetivo de mejorar la calidad de vida ³.

La OMS, sustenta la garantía de la inocuidad y calidad de este tipo procesos ancestrales médicos que podría ser eficaz como tratamiento y prevención de primera línea para afecciones tales como resfriados, diarreas, dolores de estómago provenientes de distintos agentes bacterianos ³.

El empleo milenario de sustancias provenientes de las plantas con propósitos terapéuticos, farmacéuticos y antimicrobianos conllevaron a realizar investigaciones a nuevas derivaciones vegetales consideradas comúnmente como medicinales ³.

En el planeta existe una extensa biodiversidad dentro del reino vegetal, de hecho, Latinoamérica se caracteriza por poseer un gran porcentaje de la población de plantas más

importantes y exóticas del mundo ⁴. Dentro de la gran comunidad de plantas que habitan nuestro entorno, se encuentra la familia Chloranthaceae que conforma el grupo de los arbustos, hierbas y algunos árboles nativos de los trópicos y la zona sur de algunas regiones templadas ⁵.

En esta familia se postula el género *Hedyosmum* que alberga 45 especies, de las cuales, 16 se localizan en el Ecuador propias de Los Andes, que se constituye como centro principal de la diversidad y donde se encuentran la mitad de sus especies. Algunas de las especies de *Hedyosmum* también conocido coloquialmente como Tarqui, históricamente poseen un papel importante en la medicina tradicional del país, con una gran gama de propiedades confirmadas dentro de la biología y la farmacología ⁵.

Como se ha venido mencionando el aceite esencial de esta especie vegetal cuenta con propiedades biológicas/farmacológicas que pueden combatir enfermedades infecciosas causadas por ciertos microorganismos como virus, bacterias, parásitos u hongos ⁵.

La importancia que tiene este estudio es determinar la actividad antifúngica del aceite esencial *Hedyosmums cuatrecazanum* O chioni sobre agentes etiológicos de las infecciones micóticas que afectan la salud y se consideran de importancia clínica. Las infecciones provocadas por especies patógenas de hongos van incrementando y actualmente se encuentran entre las causas de muerte que atacan a la humanidad ⁶.

Las infecciones micóticas pueden presentarse de manera superficial afectando a la piel, las uñas y mucosas orofaríngea y vaginal, también pueden ser infecciones profundas que van a comprometer órganos, la mucosa gastrointestinal o el torrente sanguíneo. El presente estudio aborda principalmente el análisis de las infecciones producidas por *Candida* como candidemia, candidiasis sistémica, infecciones mucocutáneas, vulvovaginitis que se consideran de gran importancia por su elevada morbilidad y mortalidad ⁷.

Distintas de las especies de *Candida*, se caracterizan por ser hongos en forma de levaduras ovoides definidos como comensales, específicamente en el individuo inmunocompetente tienen una repercusión de mal diagnóstico para este tipo de pacientes. Sin embargo, este microorganismo forma parte de la flora normal de la piel y las mucosas en la mayoría de sistemas del organismo humano ⁷.

En pacientes críticos este microorganismo es el responsable de la mayor parte de infecciones que se pueden presentar, sin embargo, para que la infección llegue al torrente sanguíneo el número de levaduras debe elevarse considerablemente conduciendo así a que el pronóstico del paciente se vea comprometido y en riesgo ⁷.

Las enfermedades infecciosas se las define como trastornos que son causados por organismos que pueden ser: bacterias, virus, hongos e incluso parásitos. Varios de estos microorganismos viven dentro o fuera de nuestro organismo, cabe recalcar que la mayoría son inofensivos y útiles, pero bajo ciertas condiciones de aumento o disminución de los mismos pueden llegar

a causar enfermedades en el ser humano ⁸. *Candida* es un hongo en forma de levadura oval dentro de las especies con mayor incidencia se encuentran *Candida albicans*, pero dentro de nuevas especies aisladas se encuentran *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* (*Torulopsis*), *Candida guilliermondii*, *Candida krusei* y *Candida kefyr* ⁹.

La candidiasis invasiva corresponde a un 30% las cuales tienen varios orígenes siendo las más destacadas la puerta de entrada por el tracto gastrointestinal y la piel ⁹. En estudios realizados en hospitalizados de la unidad de pacientes críticos se ha determinado que *Candida* es la causa más común de infecciones fúngica invasivas en un porcentaje del 70 al 90% ¹⁰.

Las causas más comunes de padecer una infección por *Candida* se dan por un estado de inmunosupresión, una hospitalización prolongada, catéter intravascular es decir por infecciones nosocomiales las cuales se definen como aquellas infecciones que los pacientes adquieren en el hospital ¹². Una terapia antibiótica inadecuada o a su vez el mal uso de los antimicóticos hace que las especies de hongos adquieran un nivel de resistencia a Fluconazol en la especie de *Candida albicans* es de un 3% y hasta un 10% cuando los pacientes tienen VIH o candidiasis mucocutánea ¹².

El sistema mundial de vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos (GLASS) por sus siglas en inglés incrementa un estudio ante el aumento de infecciones por hongos resistentes a los antifúngicos especialmente del género *Candida* que llega a causar una candidemia es decir la infección de hongos en el torrente sanguíneo causando muerte en los seres humanos ¹³.

El estudio de las características del genoma de *Candida albicans* tiene como objetivo identificar la manera en la que el hongo aumenta su virulencia y la resistencia ante los fármacos antifúngicos dando como resultado que se la reconoce como la cuarta causa más común de infecciones nosocomiales y es la responsable de más de 400 000 infecciones mortales en el mundo cada año ya que tienen la capacidad de tolerar los mecanismos de defensa del huésped y mantienen una capacidad proliferativa alta, a su vez forman biopelículas y activan los genes relacionados con el crecimiento invasivo ¹⁴.

Jeannete Zurita médica microbióloga miembro del Fondo de Acción Mundial para las infecciones por hongos (GAFFI) mediante su programa para demostrar el número de personas infectadas por hongos a nivel mundial; realizó un estudio en Ecuador en el año 2017 para calcular la carga de enfermedades micóticas en el cual demostró que el 3% de la población ecuatoriana tiene o está afectada por una infección por hongos ¹⁵.

Después de haber descrito la situación del problema de estudio en la presente investigación se planteó la siguiente interrogante: ¿Tiene efecto antimicótico el aceite esencial de *Hedyosmum cuatrecazanum* O cchioni frente a las especies de *Candida*?

Este proyecto de investigación servirá como ayuda para el estudio antimicótico del aceite esencial de *Hedyosmum cuatrecazanum* O cchioni y contribuir a la elaboración de nuevos

fármacos con menor efecto inhibitorio frente a las especies de *Candida* y a las enfermedades que puedan causar este hongo.

OBJETIVOS

Objetivo General

- ❖ Investigar la actividad antimicótica del aceite esencial de *Hedyosmum cuatrecazanum* Occhioni recolectada en el páramo Andino del Ecuador frente a especies de *Candida* de interés clínico.

Objetivos Específicos

- ❖ Elaborar el aceite esencial de la planta de *Hedyosmum cuatrecazanum* Occhioni, endémica del Ecuador, mediante la técnica de hidrodestilación (Trampa de Clevenger) para la determinación de sus características fisicoquímicas.
- ❖ Validar la actividad antimicótica del aceite esencial de *Hedyosmum* frente a las cepas de *Candida* de interés clínico utilizando el método de difusión en agar Kirby Bauer.
- ❖ Examinar la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de *Hedyosmum* en las diferentes cepas de *Candida* por medio de la identificación del efecto inhibitorio en diferentes concentraciones.

CAPITULO II. MARCO TEÓRICO

Biodiversidad en el Ecuador

El Ecuador se ubica en una superficie no mayor al 0,02 % de la superficie mundial, pero se encuentra en la lista de los 17 países mega diversos. Según estudios realizados hasta el 2012, el país consta con al menos con 17.748 especies nativas de plantas que se clasifican según sus características físicas, su composición química, su ubicación regional y su funcionalidad¹⁶.

El paisaje ecuatoriano se caracteriza por tener una heterogeneidad en todos los aspectos, esto gracias a una serie de factores orográficos, climatológicos y fitogeográficos. Ecuador se divide en 4 regiones naturales que son: Sierra, Costa, Amazonía y la región Insular. Cada uno de estos puntos biogeográficos poseen su distintiva biodiversidad que las hacen tan llamativas ante los ojos de propios y extranjeros ¹⁶.

La región de los Andes conformada principalmente por una cadena de volcanes y montañas que definen a esta región poseen una riqueza infinita tanto en diversidad de fauna y flora. También caracterizada por los maravillosos paisajes que brindan las montañas con los páramos y bosques andinos que se alargan de norte a sur por todo el país ¹⁷.

Los páramos forman una eco-región de las alturas del Neotrópico, ubicados entre el límite forestal superior y las imponentes elevaciones nevadas. Distribuidos a través de los Andes húmedos de Perú, Ecuador, Colombia y Venezuela llegando a extenderse inclusive hasta Panamá y Costa Rica. Este territorio simboliza una gran riqueza para las personas representando una multiplicidad de significados y valores para toda una nación ¹⁷.

Se encuentran hábitats que son el hogar de especies endémicas, ecosistemas con la posibilidad de brindar servicios ambientales fundamentales para el desarrollo de la vida como el agua principalmente, además de aportar espacios con una gran relevancia cultural, entre otros ¹⁷.

Siendo así, los páramos espacios de vida y territorios sagrados para los pueblos indígenas que viven dentro a sus alrededores, también siendo una principal razón de subsistencia de varias poblaciones tradicionales y locales asentadas en las zonas altas de las montañas, dando como resultado un eje de cohesión social determinando los modos de vida de estos habitantes de las tierras altas ¹⁷.

Todos los procesos que se llevan a cabo en este territorio proveen un gran conocimiento, que lo convierten en una forma de comprender, preservar y promover cada práctica ancestral que se realiza con los recursos que la población reúne de estas tierras y que les permite realizar distintas herramientas para sobrevivir ¹⁷.

En toda el área de los bosques andinos la flora abarca unas 3.400 especies de plantas vasculares y 1.300 especies de plantas no vasculares. Esto debido a que la gran biodiversidad

de estos lugares está ligada a la variedad de condiciones ecológicas vinculadas con la geomorfología glaciaria, que da lugar a un gran número de asociaciones vegetales, cada una con sus especies típicas ¹⁷.

En los bosques andinos ecuatorianos han sido reportados alrededor de 1.524 especies vegetales, una cantidad de flora menor a la de los países vecinos, esto debido a que estos territorios donde se encuentran las plantas se ubican a una altitud de entre los 3000 y 3400 msnm y la población vegetal va disminuyendo conforme se siga aumentando la altitud ¹⁷.

Medicina Ancestral en el Ecuador

Los bosques ecuatorianos poseen una riqueza única en muchas especies y además son muy importantes para la conservación del planeta, con una contundente aportación a la salud alimenticia y salud en los hogares. Los productos secundarios resultantes del metabolismo de las plantas son sintetizados para prevenir enfermedades o utilizados por ellas mismas como mecanismo de defensa frente a depredadores, confiriéndoles así propiedades curativas específicas y garantizando así su supervivencia ¹⁸.

Para los pueblos indígenas esta manera de manejar los recursos naturales tiene una gran influencia significativa sobre la protección de lo que los rodea. Es así que con los grandes conocimientos tradicionales y las prácticas curativas que poseen las comunidades rurales atienden la salud de la población mediante el empleo de la flora silvestre medicinal, que llega a ser en extremadas circunstancias la única herramienta que emplean para sobrevivir en lugares remotos y solitarios ¹⁸.

Nuestros antepasados lograron curar o mitigar las dolencias que padecían por ensayo y errores a través del uso y la aplicación de remedios que surgieron de la manipulación de varias especies de las plantas que tenían a su alrededor. La interacción que existió entre la biología y la cultura da como resultado a lo que actualmente se conoce como sistemas médicos, es decir, el trueque de información sobre la manera de usar las plantas para mejorar una condición es parte del proceso evolutivo de la humanidad como parte de su conservación y supervivencia ¹⁸.

Este conocimiento del empleo de la flora se va transmitiendo de generación en generación estableciéndose como una manera de vida de las comunidades, que permanece en la memoria de la gente, siendo así una información que está en cambio constante dependiendo de factores como el ambiente biocultural de cada grupo humano dentro de la unidad evolutiva hombre-ambiente ¹⁸.

Es deber de la ciencia moderna el introducir y validar estas prácticas y conocimientos ancestrales dentro de la medicina. La farmacología etnobotánica data el mismo tiempo que la existencia de la humanidad. Esta rama de la ciencia busca una mezcla e integración de conocimientos entre la antropología y la botánica basándose en principios ecológicos y bioculturales ¹⁸.

El uso de las plantas medicinales como medida alternativa de procesos terapéuticos en el Ecuador es muchas veces explotado pese a que no se tenga información necesaria para garantizar el bienestar de las personas que hacen uso de estas diferentes formas de medicina. De hecho, mucha de la población ecuatoriana que no posee acceso a una salud de calidad, opta por estos medios de sanación ¹⁸.

Las plantas medicinales suelen proporcionar distintas formas de curación gracias a sus extensas propiedades y características fitoquímicas, su uso en la aromaterapia, la creación de fármacos, ungüentos y demás aplicaciones muestran una salida mucho más raída y accesible para tratar muchas afecciones de las comunidades ¹⁸.

Distintas maneras de usar la vegetación para la comunidad es basarse propiedades antimicrobianas, antifúngicas, analgésicas, antioxidantes, ansiolíticas e inclusive antiparasitarias ¹⁸.

Aceites Esenciales

Sustancias de origen vegetal resultantes del metabolismo de las plantas cuyas mezclas con metabolitos secundarios que son insolubles en agua, les confieren las propiedades dependiendo de las proporciones que alberguen. Los aceites esenciales se originan en los tejidos secretores de las plantas generalmente líquidos a temperatura del ambiente siendo más ligeros que el agua con un olor fuerte y usualmente son amarillos translúcidos o incoloros¹⁹.

La composición química de los aceites esenciales, se encuentran primordialmente terpenos y fenilpropanos, constituyéndose a aldehídos, alcoholes, ésteres y cetonas, entre otros. Compuestos responsables en darles la fragancia y propiedades biológicas respectivas a los aceites esenciales ¹⁹.

Los aceites esenciales tienen propiedades antimicrobianas que se han venido estudiando; sin embargo, no se descarta la eficacia de la actividad que tienen frente a bacterias Gram positivas y Gram Negativas, frente a hongos filamentosos, levaduras y ciertos parásitos ¹⁹.

Método de obtención del Aceite Esencial

Uno de los métodos más comunes para la obtención de aceites esenciales es la destilación por arrastre de vapor de agua, que es un proceso de separación mediante el que, se logran vaporizar los componentes volátiles de la materia vegetal ²⁰.

Para llevar a cabo este método se procede en hacer pasar un flujo de vapor a través de la materia prima, de manera que este vapor lleva consigo los aceites esenciales, para que luego estos vapores se enfríen y se condensen, dando como resultado el destilado líquido, constituidos por dos fases inmiscibles, la acuosa y la orgánica, que en sí es el aceite esencial²⁰.

Familia Chloranthaceae

Perteneciente a las angiospermas esta familia simboliza un antiguo linaje vegetal distribuido en 75 especies, conformando el grupo de los arbustos, hierbas y algunos árboles nativos de los trópicos y la zona sur de algunas regiones templadas son identificadas por sus propiedades analgésicas, antisépticas, antiespasmódicas, antimicóticas además de anticancerígenas ²¹.

Con respecto a los constituyentes químicos de esta familia vegetal, se identifican 124 compuestos que se obtienen de diferentes especies de esta familia Chloranthaceae, de los que se describe a: terpenoides, flavonoides, cumarinas, ácidos orgánicos, amidas y esteroides ²¹.

Género *Hedyosmum*

El género *Hedyosmum* consta de 40 especies que se encuentran distribuidas principalmente en las montañas de México hasta Paraguay. Algunos de estos géneros son empleados como plantas ornamentales, medicinales con propiedades tonificantes, estimulantes, antifúngicas, antidiarreicas, vermífugas y con fines alimenticios: bebidas tonificantes y como saborizante de licores ²².

Este género constituye arbustos aromáticos, dioicos o raramente monoicos, madera blanca y suave. Hojas opuestas, simples, margen dentada, nervación pinnada, bases de los pecíolos expandidas y formando una vaina alrededor del tallo (Figura 1). Ecuador alberga alrededor de 15 especies de las cuales 12 se ubican en los bosques y páramos andinos (Figura 2) ²³.



Figura 1: *Hedyosmum cuatrecazanum*

Fuente: <https://colombia.inaturalist.org/taxa/1046881-Hedyosmum-cuatrecazanum>

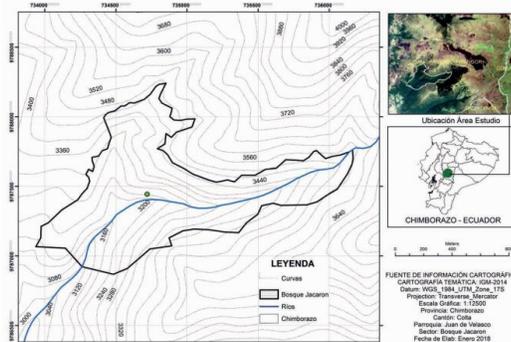


Figura 2: Bosque andino ubicado en la parroquia Juan de Velasco, cantón Colta, provincia de Chimborazo, Ecuador donde se localizó la especie vegetal

Fuente: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rpb/v25n2/a12v25n2.pdf>

Tabla 1. Taxonomía del Género *Hedyosmum*

<i>Hedyosmum</i>	
Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Chloranthales
Familia:	Chloranthaceae
Género:	<i>Hedyosmum</i>
Especie:	<i>Cuatrecazanum</i>

Fuente: <https://es.wikipedia.org/wiki/Hedyosmum>

A lo largo de la historia el uso medicinal de las especies del género *Hedyosmum* se ha caracterizado con unas amplias propiedades biológicas y farmacológicas científicamente comprobadas ²³.

Infecciones por *Candida*

La candidiasis se refiere a infecciones cutáneas causadas por el género *Candida*, estas infecciones se pueden dar dentro de torrente sanguíneo conocido como candidemia, infecciones intraabdominales, osteomielitis e incluso infecciones nosocomiales. Es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad. Existen más de 15 especies diferentes de *Candida* sp. Que son causantes de enfermedades en los seres humanos ²⁴.

Las infecciones invasivas son causadas por 5 patógenos de 100 que causan infecciones invasivas que son: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* y *Candida krusei* ²⁴. Cada una de estos patógenos tienen una variabilidad de acuerdo a su ubicación geográfica es decir *C. albicans* tiene una mayor incidencia en Estados Unidos mientras que *C. glabrata* es más incidente en América Latina y España. *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* son encontradas en los estudios de hemocultivos ²⁵.

En el año del 2019 se descubrió un nuevo género *Candida auris* mediante el hisopado de oído en un paciente japonés. A nivel mundial tiene una alta capacidad de resistencia ante los antifúngicos tiene una virulencia similar a las cepas de *C. albicans*. En estudios realizados reportan en Londres un 18% de pacientes contagiados con esta cepa que desarrollaron una candidemia. Han sido reportados casos con esta cepa en los 4 continentes y en 16 países que son: Corea, Pakistán, Estados Unidos, Inglaterra, España, Noruega, Canadá, Venezuela, Alemania, Colombia, Omán, Kenia, Kuwait, Sudáfrica e Israel ²⁶.

Epidemiología

Estudios a nivel global dan a conocer 750 000 casos y 50 000 muertes a causa de candidemia invasiva dando como una mortalidad del 15% al 40% en adultos. El género de *Candida* sp. Es considerado como un patógeno nosocomial más común. Dentro de los factores de riesgo están ligados a contraer este hongo como son: pacientes en Unidad de Cuidados Intensivos (UCI), antibióticos de amplio espectro, uso de dispositivos médicos intravasculares, trasplantes, quimioterapia ²⁷.

La cepa de *Candida albicans* ha sido la más frecuentes causando enfermedades tanto en adultos como en niños sin embargo se han diagnosticado casos de candida en el flujo sanguíneo causadas por no albicans. En Estados Unidos y en Europa con una incidencia del 64 al 67% ²⁷.

Candida glabrata se encuentra en el segundo lugar, más común en pacientes mayores a 60 años especialmente sometidos a trasplantes de órganos. En América del norte con 21.1% y en América Latina con 7,4%.⁴ *C. krusei* es una especie menos común y se encuentra especialmente en pacientes con neoplasias hematológicas y expuestos a antifúngicos azoles. En Latinoamérica, India y Pakistán se encuentran con más frecuencia las especies de *C. tropicalis* con un 11,7% ^{24,27}.

Tipos de *Candida*

Candida albicans

Es predominante en la cavidad oral, genital y cutánea ²⁸. Puede producir infecciones endógenas y sistémicas dependiendo del estado del sistema inmune del huésped. En condiciones de embarazo, uso de antimicóticos, inmunodeficiencias, trasplantes el hospedero puede sufrir de infecciones ²⁹. Para el diagnóstico directo en el laboratorio se realizan raspados de piel, exudado vaginal, orina, líquido cefalorraquídeo se observan en el microscopio la formación de hifas o pseudohifas. Después de su observación se realizan los cultivos ²⁹.

Candida tropicalis

Es usualmente aislado en pacientes con leucemia, neutropenia y pacientes sometidos a un trasplante de células madre ²⁸.

Candida krusei

Un hongo multidrogo-resistente por su resistencia al Fluconazol ²⁸.

Candida parapsilosis

Es un colonizador de la piel, uñas en pocas ocasiones en las mucosas; se la asocia con infecciones adquiridas en los hospitales, cirugías, catéteres intravenosos y en pacientes con trasplantes de células madre ²⁸.

Diagnóstico de Laboratorio

Examen Directo

Hidróxido de potasio (KOH): Lisa las células lo que permite observar el material fúngico, en la observación microscópica se encuentran las hifas. Se realiza en un portaobjetos; las blastoconideas tienen un tamaño de 5 μm y 60 μm de diámetro. Las hifas son estructuras alargadas que pueden encontrarse ramificadas o no ²⁹.

El efecto clarificador del KOH puede tardar hasta los 10 minutos en unas razones por la cual se utiliza KOH a una concentración de 20 o 30% y de 10% para el resto de muestras. Al KOH se le pueden añadir Dimetilsulfóxido (DMSO) para acelerar la clarificación y evitar calentar la muestra, algún colorante para la mejor identificación de los elementos fúngicos o Glicerol para prevenir la degradación de los elementos fúngicos, formación de cristales y la deshidratación de la muestra ³⁰.

Coloración Gram: Se observan blastoconideas y pseudomicelios del género *Candida* que son gran positivas decir se dará un color azul morado.

Cultivos

Agar Saboraud Dextrosa: Es un medio que se utiliza para el aislamiento de hongos patógenos y no a su vez el aislamiento de levaduras. Este agar contiene peptona, tripteína y glucosa que son necesarios para el desarrollo de los microorganismos especialmente la alta cantidad de glucosa y un pH ácido inhiben el crecimiento de bacterias y ayudan al crecimiento de los hongos y levaduras. El uso de cloranfenicol que tiene un amplio espectro de acción evita el crecimiento de las bacterias ³¹.

Pruebas Inmunológicas

Detección de Anticuerpos: Mediante las pruebas de ELISA del inglés (Enzyme Immuno Sorbent Assay) *Candida* Ab detecta anticuerpos circulantes de *Candida* sp. Como ayuda para la detección de candidemia y candidiasis invasiva ²⁹.

Pruebas Especiales

Auxonograma: Se le aplica por separado diferentes nutrientes hidrocarbonados, nitrogenados sobre un medio para la posterior observación del crecimiento selectivo de una levadura con los nutrientes anteriormente dosificados ³².

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Se define como la concentración más baja en $\mu\text{g/ml}$ de un antibiótico que inhibe el crecimiento de un determinado microorganismo después de un tiempo determinado de incubación. La técnica que más se utiliza para la prueba de sensibilidad es la difusión en agar (Método de Kirby-Bauer) ³³.

El método de Kirby Bauer el microorganismo va a ser inoculado en la superficie de la placa con el agar Mueller Hinton sobre el cual se colocarán discos impregnados con la concentración conocida del antibiótico. Estas placas se van a incubar a 37°C durante 24 o 48H³⁴. Al momento de la incubación el antibiótico se va a esparcir radialmente a medida que se aleja del disco su concentración va disminuyendo hasta que el antibiótico no tiene la capacidad de inhibir el crecimiento del microorganismo. El diámetro del área de la inhibición será medido en milímetros y se lo clasificará en Sensible (S), Resistente (R), intermedio (I). Estos diámetros se los revisara en el Comité Nacional de Estándar de Laboratorios Clínicos de los Estados Unidos de Norteamérica ³⁴.

Tratamiento

El tratamiento que se utiliza frente a una candidemia son los azoles como: Voriconazol, Fluconazol, Posaconazol, Equinocandinas, Anfotericina B. La medicación deberá ser elegida para cada paciente dependiendo de su estado clínico, colonización de *Candida*, Sensibilidad de cada especie de *Candida* y la toxicidad del fármaco ³⁵.

La Resistencia hacia algunos fármacos hacen que se utilicen otras opciones antifúngicas con espectro amplio en los cuales se tiene como opción la Anfotericina B, Anidulafungina es más eficaz frente a Fluconazol especialmente frente a especies de *C. albicans* y *C. tropicalis*. Se incluye la combinación de fármacos Anfotericina B, Deoxicolato y Fluconazol ³⁵.

Resistencia: Se define como el crecimiento del microorganismo infectante es inhibido por una concentración del agente antimicrobiano más alta que el rango observado³⁶. Existen mecanismos de resistencia primarios y secundarios los cuales dependerán de las características propias y adquiridas de los hongos y levaduras ³⁶.

Tipos de Resistencia

Intrínseca: Todas las cepas de una especie son resistentes a un antifúngico específico.

Primaria: Se define como la aparición de cepas resistentes en especies que son sensibles sin haber tenido contacto con el antifúngico previamente.

Secundaria: Esta resistencia de hace presente luego de haber estado expuesto ante un antifúngico debida a las alteraciones genotípicas y fenotípicas.

La resistencia hacia los antifúngicos se debe por las mutaciones de los genes que codifican para el ergosterol de la membrana plasmática o con la sobreexpresión de los genes para las bombas de expulsión de fármacos fuera del organismo.

Las especies de *Candida* adquieren resistencia hacia los azoles por medio de dos mecanismos: el primero por la mutación molecular de la enzima diana del medicamento; el segundo formando barreras de permeabilidad del antifúngico fuera de la célula alterando las bombas de expulsión: ATP-binding cassette (ABC) y facilitadores mayores (MF) ³⁷.

CAPITULO III. METODOLOGÍA

La metodología de la investigación es de carácter mixto puesto que se realizó un estudio bibliográfico retrospectivo siendo la parte cualitativa de la investigación dado que se analizó investigaciones realizadas acerca de la especie vegetal, mediante el estudio de artículos, revistas científicas y libros que contribuyeron a la adquisición de la información de forma subjetiva con un nivel exploratorio, inductivo y descriptivo. En el estudio también se añadió una parte experimental de carácter cuantitativo dado que son procedimientos objetivos y controlados que orientaron a la obtención de resultados con datos sólidos y verificables. Se trabajó con cepas del género *Candida* especialmente en las especies de *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* y *Candida parapsilosis*.

- **Nivel Descriptivo:** Se buscó información en artículos científicos sobre el uso de la especie vegetal *Hedyosmum cuatrecazanum* O cchioni a su vez las propiedades antimicóticas y sus características fitoquímicas obteniendo resultados y discutiendo en el proyecto de investigación los diferentes parlamentos expuestos por distintos profesionales en escritos científicos.
- **Diseño Cuasi Experimental:** Se procedió a la comprobación de la variable independiente pues se utilizó experimentos microbiológicos con el aceite esencial de *Hedyosmum cuatrecazanum* O cchioni en diferentes concentraciones evaluando la actividad antimicótica en las distintas especies de *Candida*.
- **Cohorte:** El proyecto de investigación es de carácter transversal pues se da en un solo tiempo y lugar; de tipo retrospectivo ya que el estudio es posterior a los hechos ya analizados. El proyecto se lo ejecutó en un determinado tiempo en el periodo académico noviembre 2021 – marzo 2022.
- **Carácter Mixto:** Se estudió datos cuantitativos y cualitativos obtenidos de las concentraciones del aceite esencial y los halos de inhibición evidenciando la actividad antimicótica de la especie vegetal frente a las especies del género *Candida*.

Técnicas y procedimientos de recolección de Datos

Dentro de la parte descriptiva de la investigación fueron aplicadas estas técnicas y procedimientos con la finalidad de extraer información de alta importancia para la resolución de la problemática que se estudió donde se se aplicaron criterios de inclusión y exclusión a las distintas fuentes de revisión bibliográfica con único objetivo de obtener información concisa y fidedigna que contribuya de manera significativa al desarrollo del estudio. Formando parte de los criterios de inclusión empleados para el análisis de estudios científicos fue su fecha de publicación que no debía ser mayor a 5 años en caso de artículos científicos y 10 años como máximo en libros, además de estar relacionados estrictamente a la problemática de estudio, el objetivo de la investigación. Por otra parte, los criterios de exclusión ayudaron a evitar el uso de páginas de poca relevancia científica, excluyendo artículos y libros científicos que no estén ligados a la línea de investigación de microbiología,

así también se evitó citar en la investigación aquellas revisiones sin aprobaciones y publicaciones que se encuentren fuera del rango de tiempo definido entre 2018 – 2022.

Población: La población de estudio fueron las distintas cepas de interés clínico del género *Cándida* cuya actividad infecciosa es de relevancia clínica y de gran utilidad para el diagnóstico clínico a través de pruebas de laboratorio.

Muestra: Para la ejecución de la investigación se tomó como muestra únicamente 4 especies del género *Candida* que son *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* y *Candida parapsilosis*, consideradas de mayor susceptibilidad a los componentes de aceite esencial de la especie vegetal *Hedyosmum cuatrecazanum* O cchioni.

Técnicas: Se empleó la búsqueda, observación y recopilación como principales puntos de extracción de información.

Instrumentos: Guía de observación, cámara fotográfica.

Variables de estudio

- **Variable Independiente:** Concentraciones distintas del Aceite Esencial de *Hedyosmum cuatrecazanum* O cchioni.
- **Variable Dependiente:** Actividad antimicótica del aceite esencial en cepas de interés clínico.

Métodos de estudio. Método Teórico: será un estudio inductivo que parte de lo particular a lo general, es decir, parte de la observación para proyectar una teoría.

DIAGRAMA DE FLUJO PARA BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICO

Las infecciones micóticas pueden presentarse de manera superficial afectando la piel, uñas y mucosas orofaríngea y vaginal, también pueden ser infecciones profundas que van a comprometer órganos, la mucosa gastrointestinal o la sangre.

Búsqueda de fuentes de información

Base de datos científicas: Libros, PubMed, Scielo, Medigraphic, Google Académico, Redalyc, NCBI, Science direct, Elsevier y Sitios web

Cumple con los criterios de inclusión

Libros, artículos científicos en línea, valorados desde el 2018 hasta la actualidad, su enfoque en el tema: actividad antimicótica de los aceites esenciales en especial de la especie *Hedyosmum cuatrecasum* O cchioni frente a especies de *Candida*.

Los artículos por su año fueron: libros 2, artículos científicos de Scielo 11, Medigraphic 1, Google Académico 10, Redalyc 15, Pubmed 3, Elsevier 1, NCBI 3, Science direct 2, Sitio web 5.

Análisis, parafraseo de la información y cita con normas Vancouver.

Investigar la actividad antimicótica del aceite esencial de *Hedyosmum cuatrecasum* O cchioni recolectada en los páramos Andino del Ecuador frente a especies de *Candida* de interés clínico.

Palabras claves para búsqueda: aceite esencial, actividad antimicótica, infecciones micóticas, Candidiasis, características fitoquímicas.

Elección de idioma: inglés y español.

En cada base se revisó:

Libros 2
Scielo 11
Medigraphic 1
Google Académico 10
Redalyc 15
Pubmed 3
Elsevier 1
NCBI 3
Science direct 2, Sitio web 5

Aplicar criterios de inclusión y exclusión para la selección de artículos

No cumple con los criterios de inclusión

Documentos, páginas de internet de poca relevancia, las revistas científicas, libros, manuales, folletos, ensayos entre otras fuentes de información que no correspondían al año establecido del 2018-2022.

Los artículos excluidos por el año de publicación fueron 20, los artículos que no correspondían con el tema central de investigación fueron 15.

Descartar artículos

Materiales y Métodos

- Matraz de Erlenmeyer de 500 y 1000 mL
- Probetas de 500 mL
- Vasos de Precipitación de 500 mL
- Cajas monopetri de plástico estériles desechables
- Pinzas
- Asas de platino
- Puntas azules y amarillas
- Tubos eppendorf
- Discos en blanco
- Discos de antibiótico (Fluconazol 25 ug)
- Guantes
- Tubos de ensayo
- Hisopos
- Papel aluminio
- Rotulador (Anexo 1)

Equipos

- Cámara de Flujo Laminar (marca HFsafe900),
- Autoclave (marca Tuttnauer),
- Refrigeradora (marca Mabe),
- Incubadora (marca Memmert),
- Balanza analítica (marca Adam Equipment),
- Vortex,
- Plancha de calentamiento
- Mechero (Anexo 2)

Solventes:

- Agua destilada,
- Suero fisiológico estéril,
- Dimetilsulfóxido (DMSO) (Anexo 3)

Medios de Cultivo

- Agar Sabouraud (ASb),
- Agar Mueller Hilton (AMH) (Anexo 4)

Otras sustancias utilizadas:

- Glucosa en polvo
- Azul de metileno (Anexo 5)

Muestras Biológicas: Muestras de cuatro especies de *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*) facilitadas por la Universidad Católica de Cuenca de la Carrera de Bioquímica y Farmacia. (Anexo 6)

Procedimientos

Extracción del Aceite Esencial de *Hedyosmum cuatrecazanum* O cchioni

La extracción se realizará de las partes aéreas de la planta como el tallo, las hojas, y flores frescas que después de ser pesadas se someterán a la extracción por el método de hidrodestilación mediante la utilización de la trampa de Clevenger. El aceite que se obtendrá debe ser guardado en refrigeración hasta su análisis.

Método de Hidrodestilación

El proceso de hidrodestilación es un método de extracción de aceites esenciales, caracterizado por el contacto directo del material del que se desea obtener el aceite esencial y el agua que debe estar en punto de ebullición.

Extracción y Aislamiento del Aceite Esencial de *Hedyosmum cuatrecazanum* O cchioni

- La planta fue recolectada en el bosque natural Jacarón del Cantón Colta en la Provincia de Chimborazo.
- Se pesó 2000g de ciertas partes de la planta.
- Se procedió a la extracción por el método de hidrodestilación mediante la utilización de la trampa de Clevenger, durante 4 - 5 horas a una temperatura entre 50 - 60 °C.
- El aceite que se obtuvo se guardó en refrigeración a 4 °C en tubos Eppendorf estériles.

Aceite Esencial Puro y Diluciones.

Se pesó 1 g de aceite esencial puro en un tubo de ensayo estéril siendo así esta la solución concentrada inicial a partir de la cual se realizó seis diluciones seriadas con 500 µl de Dimetilsulfóxido (DMSO) homogenizando en cada tubo Eppendorf estéril etiquetado respectivamente, donde las concentraciones son de 0,5; 0,25; 0,125; 0,062; 0,031; 0,015 g/mL (Anexo 7).

Preparación de 200 mL del Agar Saboraud

- Se pesa en la balanza analítica 13 gr del agar.
- En una probeta aforar 200 mL de agua destilada
- Homogenizar manualmente
- Colocar en plancha de calentamiento hasta el punto de ebullición
- Esterilizar en autoclave
- Trasvasar el agar estéril en las cajas mono Petri.

Preparación de Pre-inóculo

- Limpiar el ambiente de trabajo y los materiales con alcohol
- Desinfectar el asa con alcohol.
- Dentro de la cámara de flujo laminar encender el mechero y flamear el asa hasta que se vea el rojo vivo para asegurar la esterilización.
- De las cepas anteriormente mencionadas se recoge una colonia de cada una de las especies de *Candida* para trabajar
- Sembrar por rastro o agotamiento las colonias de las cuatro especies de *Candida* en Agar Sabouraud contenido en una placa mono Petri rotulada correctamente
- Incubar a 37°C durante un periodo de 24 a 48 horas (Anexo 8).

Preparación del Agar Mueller Hinton Suplementado

- Se pesa 19 g de Agar Mueller Hinton y se coloca en un matraz Erlenmeyer con un agitador, se adiciona 500 mL de agua destilada (preparación para medio litro, si se requiere en menor o mayor cantidad se realiza los calculas correspondientes).
- Esta preparación se ubica en la plancha de calentamiento y esperar de 10 – 15 minutos hasta que llegue a su punto de ebullición
- Reposar la preparación con el objetivo de disminuir la temperatura
- Agregar 10g de glucosa y 0.5mL de azul de metileno y homogenizar.
- Esterilizar el medio preparado en la autoclave.
- Colocar 25 mL de la preparación en cada caja mono Petri esterilizada (Anexo 9).

Preparación del Inóculo

- Limpiar el ambiente de trabajo y los materiales con alcohol
- Desinfectar el asa con alcohol.
- Dentro de la cámara de flujo laminar encender el mechero y flamear el asa hasta que se vea el rojo vivo para asegurar la esterilización.
- Con el asa estéril recoger un porcentaje del cultivo del pre – inóculo transcurridas 24 H de incubación de cada una de las diferentes especies de *Candida*.
- Colocar en un tubo que contiene solución salina estéril al 0,89 % el cultivo recogido.

- Ajustar cada una de las diluciones de los cultivos de las distintas especies de *Candida* en la solución salina con el patrón de McFarland en una escala de 1 que corresponde $3,5 \times 10^8$ UFC/MI (Anexo10).

Siembra e Impregnación de Discos con las Concentraciones del Aceite por método de difusión del disco (Kirby Bauer)

- Dentro de la cámara de flujo laminar insertar los hisopos estériles en el inóculo de cada especie de *Candida*.
- Sembrar en las placas de Mueller Hinton debidamente rotuladas de extremo a extremo evitando dejar espacios sin el inóculo asegurando así el crecimiento de la especie micótica con la finalidad de una buena observación del halo.
- Colocar con ayuda de una pinza debidamente esterilizada los discos en blanco distribuidos adecuadamente para evitar la unión de los halos
- Impregnar el aceite esencial puro y sus diluciones en cada uno de los discos (Anexo 11).

Pre incubación, Incubación y Lectura de Resultados

- Pre incubar en refrigeración a 4°C durante 30 minutos y luego incubar a 37°C durante 24 horas.
- Transcurridas las 24 H se realiza la primera lectura de los halos con la ayuda de una regla para verificar si existió actividad antimicótica.
- Determinar las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) por medio de la evaluación de la menor concentración en la cual el aceite presentó actividad antimicótica, frente a cada una de las especies de *Candida*.
- Los resultados de estas mediciones fueron tabulados a través de un programa informático denominado Excel.

CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 2. Análisis de la composición química del aceite esencial de *Hedyosmum cuatrecazanum* O cchioni

N°	tr (min)	Molécula identificada	Valor	Unidades
1	15.177	Cyclohexene, 4-methylene-1-(1-methylethyl)-	0.97	% relativo
2	15.711	Bicyclo[3.1.0]hex-2-ene, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-	0.75	
3	16.182	o-Cymene	0.95	
4	16.431	Eucalyptol	1.63	
5	17.609	Linalool	1.87	
6	18.596	1,6-Octadiene, 3,7-dimethyl-	0.92	
7	19.220	(+)-2-Bornanone	1.05	
8	19.260	Terpinen-4-ol	2.47	
9	19.398	3,4-Pentadienal, 2,2-dimethyl-	0.72	
10	19.529	Terpineol	2.59	
11	19.650	benzene 2-methoxy-4-methyl-1-(1-methylethyl)-	4.02	
12	19.754	Citronellol	11.60	
13	19.880	Benzeneethanol, .alpha.-phenyl	1.14	
14	20.203	Geraniol	0.570	
15	21.208	1,6-Octadiene, 3,7-dimethyl-	1.14	
16	21.237	3-Methyl-4-isopropylphenol	1.83	
17	21.279	6-Octen-1-ol, 3,7-dimethyl-, acetate	3.57	
18	21.721	2,6-Octadien-1-ol, 3,7-dimethyl-,acetate	1.22	
19	22.095	2-Acetylcyclopentanone	3.23	
20	22.267	Eugenol	12.82	
21	22.437	3,4-Pentadienal, 2,2-dimethyl-	0.97	
22	22.782	3H-3a,7-Methanoazulene, 2,4,5,6,7,8-hexahydro-1,4,9,9-tetramethyl-, [2aR-	2.88	
23	23.113	Caryophyllene	2.56	
24	23.423	3-Cyclohexen-1-ol, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-, (R)-	1.58	
25	23.709	Humulene	0.92	
26	23.789	Aromandendrene	7.14	
27	24.343	Cyclohexene, 3-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-6-methylene-, [S-(R*,S*)]-	5.23	
28	24.740	Naphthalene, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-4a,8-dimethyl-2-(1-methylethenyl)-, [2R-(2.alpha.,4a.alpha.,8a.beta.)]-	1.57	
29	24.976	Phenol, 2-methoxy-4-(2-propenyl)-,acetate	2.36	
30	26.737	1H-Cycloprop[e]azulen-7-ol, decahydro-1,1,7-trimethyl-4-methylene-, [1aR-(1a.alpha.,4a.alpha.,7.beta.,7a.beta.,7b.alpha.)]-	10.1	
31	26.959	Azulene, 1,2,3,3a,4,5,6,7-octahydro-1,4-dimethyl-7-(1-methylethenyl)-, [1R-(1.alpha.,3a.beta.,4.alpha.,7.beta.)]-	1.08	
32	27.201	3-Undecen-5-yne, (Z)-	2.46	
33	27.728	Pregn-5-en-20-one, 3,21-bis(acetyloxy)-, (3.beta.)-	1.27	
34	29.457	Pregnane-3,20-dione	1.5	
35	29.856	Cedran-diol, (8S,14)-	1.81	
36	30.677	Cyclopropane carboxamide, 2-cyclopropyl-2-methyl-N-(1-cyclopropylethyl)-	1.54	

Resultados:

El aceite esencial de *Hedyosmum cutrecazanum* O cchioni mediante el estudio realizado en la Universidad Central del Ecuador mediante el método de cromatografía de gases con espectrometría de masas obtuvo resultados de elementos terpenos en mayor porcentaje se encuentra el Eugenol (12,82%) que confiere el color amarillo al aceite esencial y dándole un olor aromatizante al mismo, es utilizado con mayor frecuencia en procedimientos odontológicos. El segundo con mayor porcentaje encontrado es el Citronellol (11,60%) brindándole al aceite propiedades aromáticas y el agradable olor que desprende el mismo.

Tabla 3. Actividad antimicótica del aceite esencial de *Hedyosmums cuatecazanum* O cchioni en la especie de *Candida albicans*

Método Difusión del disco (Kirby-Bauer)					
<i>Candida albicans</i>					
Aceite Esencial <i>Hedyosmum cutrecazanum</i> Occhioni					
Halos de inhibición en (mm)					
Concentraciones g/mL	1	2	3	MEDIA	DS
Aceite puro	27,00	20,00	25,00	24,00	3,61
1	23,00	17,00	22,00	20,67	3,21
0,5	13,00	13,00	14,00	13,33	0,57
0,25	7,00	12,00	13,00	10,67	3,21
0,125	0	0	0	0	0
0,062	0	0	0	0	0
0,031	0	0	0	0	0
0,015	0	0	0	0	0
Control Positivo Fluconazol 25 ug	40,00	39,00	38,00	39,50	
Control Negativo DMSO	0	0	0	0	

Resultados

En la Tabla 3 se observan las concentraciones (g/mL) del aceite esencial de la especie vegetal *Hedyosmum cutrecazanum Occhioni* conjuntamente con las diferentes medidas de los halos de inhibición: 24,00; 20,67; 13,33 y 10,67 mm. En los tres ensayos de actividad antifúngica realizados con el aceite esencial puro sobre *Candida albicans* se determinaron halos de inhibición con una media de 24,00 mm. Resultados que ponen de manifiesto la actividad antimicótica del aceite puro de *Hedyosmum cutrecazanum Occhioni* sobre *Candida albicans*. Así mismo se determinó que a medida que las concentraciones del aceite esencial disminuyen también disminuye su actividad antimicótica sobre la cepa de *Candida albicans*. La concentración más baja a la que se determinó actividad antimicótica de 0,25 g/mL con halos de inhibición de 10,67 mm.

Como control positivo se utiliza Fluconazol ya que se prescribe medicamento para combatir infecciones causadas por esta levadura. A concentraciones de 25 µg de Fluconazol mostró halos de inhibición de una media de 39,50 mm. Como control negativo se utiliza dimetilsulfóxido (DMSO) dando como resultado un halo de inhibición de 0 mm ratificando que no tiene actividad antimicótica frente a la especie de *C. albicans*.

Discusión

Unos de los principales productores de enfermedades fúngicas son las especies del género *Candida*, las cuales pueden afectar la piel, mucosas e incluso convertirse en enfermedades sistémicas. Talapko J, *et. al*³⁸ manifiesta que *Candida albicans* la más prevalente y el agente causal de infecciones en las mucosas y enfermedades sistémicas en todo el mundo teniendo una tasa de mortalidad del 40% especialmente en pacientes hospitalizados.

López, *et. al*³⁹ menciona que la resistencia de *C. albicans* se debe al crecimiento normal de la levadura a dosis normales del antifúngico que puede inhibirse si aumenta la cantidad del fármaco pero que puede afectar la salud del paciente. El estudio de la vigilancia antifúngica Artemis DISK habla sobre el aumento de la resistencia al Fluconazol de *C. albicans* en un 0,8 a 1.5%. Esta resistencia se debe a que la levadura tiene una gran capacidad de adhesión gracias a la formación de biopelículas que le confiere adherirse y causar la enfermedad mediante mecanismos de resistencia ante los azoles como la mutación molecular de la enzima diana del antifúngico, alteración de las enzimas en la síntesis del ergosterol y la alteración de las bombas de expulsión ATP-binding cassette.

Debido al aumento de la resistencia se buscan nuevas opciones para crear antifúngicos que contribuyan a combatir infecciones por el género *Candida* pues tiene alta tasa de mortalidad y morbilidad. Cargua⁴⁰ estudió la actividad antifúngica del aceite esencial de *Plantago major* frente a *C. albicans* observando un resultado favorable ya que inhibe su crecimiento en una

concentración de 75 y 100%. Paucar, *et al.*⁴¹ en su estudio antifúngico del aceite esencial de *Minthostachys mollis*, pero no presentan actividad frente a esta cepa. Menezes A. *et al.*⁴². Su estudio del aceite esencial de la flor de *Bauhinia rufa* tiene actividad inhibitoria en concentraciones de 2,4,6,8%. Lucena, *et al.*⁴³. En su estudio de la misma planta de *Hedyosmum* sp. Presentó un halo de inhibición de 11 mm. Latorre K⁴⁴ muestra resultados a una concentración del aceite de 1 y 0,5% de concentración con 11 y 9 mm de halos de inhibición respectivamente. Sin embargo, en el estudio presentado muestra halos de inhibición mucho más amplios. Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio y en los resultados de la actividad antimicótica en estudios previos con aceites esenciales de diferentes fuentes botánicas e incluso con el mismo género se puede inferir que el aceite de *Hedyosmum cuatrecazanum Occhioni* muestra ser una alternativa antimicótica contra *Candida albicans*.

Tabla 4. Actividad antimicótica del aceite esencial de *Hedyosmum cuatrecazanum Occhioni* frente a *Candida tropicalis*

Método Difusión del disco Kirby-Bauer					
<i>Candida tropicalis</i>					
Aceite Esencial <i>Hedyosmum cutrecazanum Occhioni</i>					
Halos de inhibición en (mm)					
Concentraciones g/mL	1	2	3	MEDIA	DS
aceite puro	18,00	20,00	18,00	18,66	1,15
1,00	13,00	15,00	12,00	13,33	1,52
0,50	9,00	12,00	11,00	10,66	1,52
0,25	7,00	9,00	10,00	8,66	1,52
0,125	0	0	0	0	0
0,062	0	0	0	0	0
0,031	0	0	0	0	0
0,015	0	0	0	0	0
Control Positivo Fluconazol 25 ug	35,00	39,00			37,00
Control Negativo DMSO	0	0			0

Resultados:

Como se puede observar en la Tabla 4 la actividad antifúngica del aceite esencial de la especie vegetal *Hedyosmum cuatrecazanum Occhioni*, frente a *Candida tropicalis* se evidencia en los halos de inhibición que presenta este hongo ante una el aceite, ya que permitió obtener halos de inhibición de 18,66 mm media. Resultados que ponen de manifiesto la actividad antimicótica del aceite puro de *Hedyosmum cuatrecazanum Occhioni* frente a *Candida tropicalis*. Por otra parte, a medida que las concentraciones del aceite disminuyen también disminuye su actividad antimicótica sobre la cepa de *Candida tropicalis* determinándose que la concentración mínima inhibitoria fue de 0,25 g/mL generando halos de inhibición de 8, 66 mm de media.

Los resultados de control positivo (Fluconazol de 25 ug) revelaron halos de inhibición de 37 mm indicando la susceptibilidad de *Candida tropicalis* a este antifúngico, mientras que, el control negativo (dimetilsulfóxido) como era de esperar no mostró actividad antimicótica.

Discusión:

Según Arastehfar *et. al* ⁴⁵ Consideran que esta especie del género *Candida* llega a posicionarse dentro de las primeras causas de candidemias en países en vías de desarrollo de Asia y América Latina, cuya principal medida terapéutica es el uso del Fluconazol, dado que el costo de fármacos más desarrollados y efectivos son muy elevados. Sin embargo, se evidencian a través de estudios realizados que *Candida tropicalis* cada vez genera más resistencia a ciertos componentes como a los azoles, Pan- azole, Pan- azol y Anfotericina B (AB). Estas resistencias limitarán aún más las vías de tratamientos que los médicos puedan seguir poniendo en peligro la vida de los pacientes.

Se conoce que individuos infectados por esta especie de candidiasis pasan un tiempo de hospitalización más prolongado y experimentan una tasa de mortalidad más elevada que pacientes infectados por *Candida albicans*. Las principales causas de la resistencia de *Candida tropicalis* son genes alterados que codifican lanosterol 14- α -desmetilasa (ERG11), bombas de expulsión (CDR1 y MDR1) y el regulador de expresión ERG11 (UPC2) ⁴⁵.

Contribuyendo al postulado anterior estudios realizados por Yu- Chen *et. al* ⁴⁶. afirman que *Candida tropicalis* es la principal causa de candidemia no producida por otra especie del género *Candida*, que afecta de sobre manera a países del Sur de Asia y a países en vías de desarrollo en América Latina, este microorganismo es una levadura diploide ascomicetas, que se encuentra estrechamente relacionada dentro de las *Candidas* con patogenicidad alta y que pertenecen a un solo clado de *Candida* distinguido por la traducción única de los codones CUG como serina en lugar de leucina.

Sin embargo, estas investigaciones exponen que el uso generalizado de los azoles en los últimos veinte años es una de las principales causas del mecanismo de resistencia de este

hongo a los fármacos constituidos por estos elementos. Así mismo, esta resistencia de ciertos patógenos fúngicos humanos pudo haberse desarrollado por una exposición a fungicidas azoles en el medio ambiente, siendo así que estos estudios evidenciaron una estrecha relación de cepas de *Candida tropicalis* resistentes a antifúngicos con cepas genéticamente iguales a las que se encuentran en el medio ambiente y en hospitales ⁴⁶.

Además, según Jafri y Ahmad ⁴⁷, la existencia de una variante en la creación de biopelículas en condiciones *in vitro* es evidente entre las especies de *Candida*. Sin embargo, la habilidad de producir biofilms en condiciones *in vivo* no puede estar directamente relacionada con la condición anteriormente mencionada, es decir, que es de conocimiento que ambas condiciones propician diferentes maneras de producir o no biopelículas que son importantes para observar así el crecimiento celular de estas especies fúngicas.

Todos las investigaciones, postulados, doctrinas y escritos anteriormente mencionados llevan de la mano una relación en lo que refiere a la resistencia de esta especie del género *Candida* a varios componentes que se pueden encontrar en fármacos e incluso en los aceites esenciales, por tal motivo es que concuerdan en que el uso excesivo de medicamentos generará una resistencia, así mismo como la exposición a compuestos que se encuentran en el medio ambiente.

Tabla 5. Actividad antimicótica del aceite esencial *Hedyosmum cuatrecazanum Occhioni* frente a *Candida krusei*

Método Difusión del disco (Kirby-Bauer)					
<i>Candida krusei</i>					
Aceite Esencial <i>Hedyosmum cuatrecazanum Occhioni</i>					
Halos de inhibición en (mm)					
Concentraciones g/mL	1	2	3	MEDIA	DS
aceite puro	21,00	25,00	18,00	21,30	1,50
1,00	19,00	20,00	15,00	18,00	1,65
0,50	8,00	10,00	7,00	8,30	0,53
0,25	0	0	0	0,0	0,0
0,125	0	0	0	0,0	0,0
0,062	0	0	0	0,0	0,0
0,031	0	0	0	0,0	0,0
0,016	0	0	0	0,0	0,0
	0	0		0	

Control Positivo Fluconazol 25 ug					
Control Negativo DMSO	0	0		0	

Resultados:

La tabla 5 muestra los resultados de la actividad antimicótica del aceite esencial *Hedyosmum custrecazanum Occhioni* frente a la especie *Candida krusei* del género *Candida*. Los ensayos realizados a partir del aceite esencial puro permitieron determinar halos de inhibición de 21,30 mm de media lo que refleja la actividad antimicótica del aceite puro de *Hedyosmum custrecazanum Occhioni* frente a la especie *Candida krusei*. Así mismo, se pudo observar que la actividad antimicótica del aceite disminuye a medida que disminuye su concentración en las diluciones ensayadas frente a *Candida krusei*, determinándose que la menor concentración o actividad antimicótica fue de 0,5 g/mL con halos de inhibición de 8,30 mm de media. Su relación es directamente proporcional pues mientras su concentración baja los halos de inhibición también presentan medidas más pequeñas.

Para el control positivo de *Candida krusei* se utilizó Fluconazol de 25 µg, pero no produjo ningún halo de inhibición pues *Candida krusei* es resistente al Fluconazol ya que es una levadura multidrogo; utilizar fluconazol en las *Candidas* es una manera de identificación pues *C. krusei* será quien no presente sensibilidad a fluconazol a diferencia del resto de *Candidas*. Como control negativo se utiliza DMSO el cual no presenta actividad antimicótica lo que refleja por la ausencia de halos de inhibición frente a *C. krusei*

Discusión

Candida krusei tienen una tasa de mortalidad de 40-58% y a su vez una baja respuesta a terapias antimicóticas como lo menciona Gómez y Mora ⁴⁸.

Albertyn, *et al* ⁴⁹ menciona que el factor de virulencia de *C. krusei* es similar a los de *C. albicans* pues ambos producen hifas que son las que proporcionan la invasión al tejido del huésped, pero las hifas de *C. krusei* son menos eficaces. La resistencia microbiológica se puede clasificar en dos: primaria que ocurre cuando un hongo crea resistencia a un antifúngico sin haber tenido exposición anterior con él y la secundaria cuando cepas son previamente sensibles y después de varias veces de utilizarlo crea una resistencia debido a las alteraciones que va desarrollando, cabe recalcar que esto depende de las condiciones del paciente y su función inmunológica ⁴⁹.

Para combatir las infecciones por *Candida* se utiliza compuestos de la familia de polienos, azoles, quinocandinas, alilaminas; siendo el Fluconazol uno de los más utilizados para combatir estas infecciones. *C. krusei* es intrínsecamente resistente al fluconazol en un 95% no se conoce los mecanismos que produzcan este fenómeno, pero la actividad de la bomba de flujo de la proteína Abc1 del casete de unión al ATP y la resistencia al fluconazol debido a Erg11 se asocian con esta respuesta. Como alternativas farmacológicas se administra Voriconazol, Itraconazol, Posaconazol pues la cepa es sensible a estos antifúngicos ⁴⁹.

Estudios previos de actividad antimicótica realizados a partir del aceite esencial de *Hedyosmum* sp., frente a *C. krusei* describieron inhibición con halos de 11 mm; así como, también se observó una tendencia de aumento en la actividad antimicótica a medida que disminuye la concentración del aceite alcanzando halos de inhibición de 20 mm a una concentración de 0,25 g/mL. Tendencia contraria a la obtenida en este estudio como se refleja en le Tabla 5.

Por otra parte, García y Rojas ⁵⁰ describieron que el aceite esencial puro de *Eugenia uniflora* presentó actividad antimicótica con halos de inhibición de 13 mm sobre *C. krusei*. Mientras que, el aceite esencial de las flores de *Bauhinia* en concentraciones de 6 y 8 % son favorables para el efecto inhibitorio del crecimiento de *C. krusei*.

García y Rojas ⁵⁰ utilizaron como control positivo Voriconazol por la resistencia intrínseca al Fluconazol, describiendo halos de inhibición de 19 mm poniendo de manifiesto la sensibilidad de *C. krusei* ante este antifúngico. Por tanto, los resultados obtenidos en el presente estudio resultan de especial interés ya que el aceite de *Hedyosmum cuatrecazanum Occhioni.*, muestra un claro efecto antimicótico sobre *C. Krusei.*, (21,30 mm) inhibición superior a la descrita cuando se ensayó el Voriconazol como control positivo frente a *C. krusei* ⁵⁰

Tabla 6. Actividad antimicótica del aceite esencial *Hedyosmum cuatrecazanum Occhioni* frente a *Candida parapsilosis*

Método Difusión del disco (Kirby-Bauer)					
<i>Candida parapsilosis</i>					
Aceite Esencial <i>Hedyosmum cuatrecazanum Occhioni</i>					
Halos de Inhibición en (mm)					
Concentraciones g/mL	1	2	3	MEDIA	DS
aceite puro	14,00	15,00	19,00	16,00	2,65
2,00	12,00	11,00	17,00	13,30	3,21
1,50	10,00	9,00	9,00	9,30	0,57

1,00	0	0	0	0,0	0,0
0,50	0	0	0	0,0	0,0
0,25	0	0	0	0,0	0,0
0,125	0	0	0	0,0	0,0
0,062	0	0	0	0,0	0,0
Control Positivo Fluconazol 25 ug	32,00			32,00	
Control Negativo DMSO	0			0	

Resultados:

El estudio evidencia que *Candida parapsilosis* presenta susceptibilidad frente a los componentes del aceite esencial puro de *Hedyosmum cuatrecazanum Occhioni*, lo que se refleja en los halos de inhibición de 16 mm de media. Además, se observó la misma tendencia determinada con las otras especies de *Candida* estudiadas, caracterizada por disminución de la actividad antimicótica a medida que disminuye la concentración del aceite, alcanzando halos de inhibición de 9,30 mm a una concentración de 1, 5 g/mL (Tabla 6).

Para el estudio de la actividad antimicótica de *Candida parapsilosis* se utilizó Fluconazol, el cual mostró marcada actividad antimicótica mostrando halos de inhibición de 32 mm de media; mientras que como control negativo se utilizó DMSO el cual no produjo ningún tipo de inhibición sobre la cepa en estudio.

Discusión:

Según lo descrito por Oihane M ⁵¹, la candidiasis se va a desarrollar en los pacientes dependiendo de factores de virulencia del complejo de las especies, así como también la clínica del paciente. El complejo de especies de *Candida parapsilosis* es un patógeno oportunista muy relevante con una capacidad de emplear un amplio espectro de infecciones que pueden ir de leves a graves. Esta patogenia de la especie se debe factores de virulencia como el dimorfismo, la capacidad de adhesión a la superficie celular del hospedador, la formación de biopelículas y la secreción de enzimas hidrolíticas celulares.

Todos estos factores colocan a *Candida parapsilosis* como la segunda causa de candidemia y como principal microorganismo aislado en unidades de cuidados intensivos neonatales con una elevada tasa de mortalidad asociada ⁵¹.

La susceptibilidad contra fúngicos dentro del conjunto de *C. parapsilosis* difiere de acuerdo a sus subespecies. Un vistazo general demuestra que las especies del complejo *Candida* como *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. famata*, *C. kefyr*, *C. parapsilosis* entre otras son susceptibles a la mayoría de los agentes antimicóticos caracterizándose por presentar concentraciones mínimas inhibitorias (CIMs) más elevadas antes las equinocandinas, comparándose con las otras especies de *Candida* ⁵¹.

Cuando existe una menor susceptibilidad antes este tipo de antifúngicos viene acompañado por factores de resistencia intrínsecas y extrínsecas donde se destaca alteraciones genéticas donde se ve afectado el gen *FKSI* asociado a una actividad de resistencia elevada dado a sus recurrentes mutaciones ⁵¹.

Moreno *et. al* ⁵². concuerdan al postular que la especie *Candida parapsilosis* ciertamente es la segunda especie del género *Candida* que produce infecciones que suelen llegar a graves sin un protocolo terapéutico adecuado, además infieren que este microorganismo se encuentra frecuentemente en el personal de salud y entre los pacientes hospitalizados, aislándola un número de veces repetitivo considerable.

Además, su estudio revela que la capacidad de esta especie para la formación de biopelículas llega a constituir una manera primordial de crecimiento microbiano y fundamentalmente para el desarrollo de una extensa variedad de infecciones clínicas. Llegando a estimar que al menos un 65% de estas patologías microbianas son consecuencia de la formación de estas biopelículas ⁵².

Según los análisis realizados por estos investigadores se encontró que la mayor parte de las cepas de *Candida parapsilosis* estudiadas formaron biopelículas dado a la cuantificación de la biomasa concediéndoles así una capacidad de resistencia considerable frente a los antimicóticos. Siendo así que al momento de evaluar la susceptibilidad de esta especie ante los antifúngicos fue excelente para los compuestos de la Capsfungina (CS) como los de la Anfotericina B (AB) pero se observa que existe una resistencia a los elementos del Voriconazol (VO) y los del Fluconazol (FL), que suele ser empleado como medida de profilaxis y de tratamiento empírico alternativo de candidiasis sistémicas ⁵².

Se revela que las propiedades fenotípicas radicalmente opuestas de sus contrapartes sésiles, son aquellas que confieren la resistencia a los antifúngicos de esta especie del género *Candida*, además dentro de las distintas infecciones causadas por este microorganismo, las asociadas a catéteres se relacionan con una formación de biopelículas intraluminales que llegan a ser de difícil tratamiento dado a que sus CMI son elevadas ⁵².

El estudio realizado por Fekkar *et. al* ⁵³. demuestra también que *Candida parapsilosis* llega a ser una de las más comunes causas de candidemias representando hasta una 30 % de las infecciones totales, evidenciando que ocasionalmente existe una resistencia a fármacos antimicóticos compuestos por azoles principalmente en unidades de cuidados intensivos elevando las tasas de mortalidad en pacientes inmunocomprometidos.

Sin embargo, se visualiza una sensibilidad a medicamentos azólicos como el fluconazol y el voriconazol que eran empleados como tratamientos empíricos y de primer uso. Pero dado a que esta especie de *Candida* padece de alteraciones genéticas también concluyen que la generación de la resistencia a estos antimicóticos se va desarrollando conforme al constate consumo y de igual manera a la exposición de la población frente a estos componentes que se encuentran en el medio ambiente.

Así mismo, se muestra que la diversidad genética que posee *Candida parapsilosis* tienden a crear una propagación en un modo clonal de las cepas de este hongo y con una resistencia considerable frente a antimicóticos ⁵³. Con base a lo antes mencionado la actividad antimicótica manifiesta del aceite esencial de *Hedyosmum cuatrecazanum* O cchioni., frente a *C. parasilopsis*., resulta de interés como alternativa natural contra las infecciones producidas por este agente etiológico.

Tabla 7. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

<i>Candidas</i>	Aceite esencial
	CMI
<i>Candida albicans</i>	0,25 g/mL
<i>Candida tropicalis</i>	0,25 g/mL
<i>Candida krusei</i>	0,50 g/mL
<i>Candida parasilopsis</i>	0,50 g/mL

Resultados

En la Tabla 7, se muestran las CMI alcanzadas con el aceite esencial de *Hedyosmum cuatrecazanum* O cchioni., frente a las diferentes especies de *Candida* en estudio. Siendo *Candida albicans* y *Candida tropicalis* las especies más susceptibles con CMI de 0,25 g/mL, seguidas de *Candida krusei* y *Candida parasilopsis* con CMI de 0,50 g/mL.

Discusión

Debido al alto aumento de la resistencia de las levaduras de las diferentes especies de *Candida* ante los medicamentos antimicóticos, se buscan alternativas para erradicar las infecciones causadas por hongos y evitar el aumento de morbilidad y mortalidad de los pacientes inmunocomprometidos, especialmente en pacientes hospitalizados en el área de cuidados intensivos.

Latorre K ⁴⁴. En su estudio de la actividad antimicótica del aceite esencial de *Heyosmum sp.*, frente a cuatro especies de *Candida* determinó concentraciones mínimas inhibitorias de 0,5 g/mL para *C. albicans* y de 0,25 g/mL para *C. krusei*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*

respectivamente. Concentraciones que difieren ligeramente de las obtenidas en este trabajo para las mismas especies de *Candida* mientras que, el estudio realizado por García y Rojas⁵⁰ en el aceite esencial de *Eugenia uniflora* mostró CMI para *C. albicans* de 150 ug/mL (0,15 g/ mL) para *C. krusei* de 40 ug/mL (0,04 g/mL) y para *C. tropicalis* y *C. parpsilosis* de 100 ug/mL (0,1 g/ml) respectivamente. Valores que están muy por debajo de la CMI obtenidas en este estudio para las mismas especies de *Candida*.

CAPITULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

- La extracción del aceite esencial de las partes aéreas de la planta *Hedyosmum cuatrecazanum Occhioni*, endémica del Ecuador, permitió la determinación de su composición química cuyos componentes se vinculan directamente con las propiedades atribuidas por la medicina ancestral y la actividad antimicótica detectada.
- Mediante el método de difusión de disco (Kirby Bauer) se pudo determinar la actividad antimicótica del aceite esencial puro de *Hedyosmum cuatrecazanum Occhioni*, frente a las cuatro especies de *Candida* estudiadas, con diferentes grados de susceptibilidad dependiendo de la especie; siendo *C. albicans* y *C. krusei* las más susceptibles al aceite esencial seguidas de *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*.
- Las concentraciones mínimas inhibitorias del aceite esencial de *Hedyosmum cuatrecazanum Occhioni*, realizadas mediante diluciones frente a las diferentes cepas de *Candida* estudiadas (*C. albicans* y *C. tropicalis*., CMI 0,25 g/mL) y (*C. krusei* y *C. parapsilosis*., CMI 0,5 g/mL) demuestran la actividad antimicótica del aceite esencial diluido frente todas las cepas de *Candida* de importancia clínica estudiadas en el presente trabajo.

Recomendaciones

- ✓ Ampliar los estudios los beneficios potenciales de los aceites esenciales de las diferentes plantas utilizadas en la medicina ancestral ya que como se plasma en esta investigación *Hedyosmum cuatrecazanum Occhioni.*, mostró propiedades antimicóticas contra especies del género *Candida* pudiendo ser empleado como medicina alternativa o en la síntesis de nuevos principios activos.
- ✓ Debido a la alta resistencia de los hongos a los medicamentos con función antimicótica las personas deben evitar el consumo de fármacos sin prescripción médica pues es un factor predisponente para desarrollar multiresistencia.
- ✓ Involucrar a los estudiantes en el desarrollo y participación activa de investigaciones científicas que contribuyan a la solución de problemas de salud.

BIBLIOGRAFÍA

- 1: Ruiz C, Díaz C, Rojas R. Composición Química de aceites esenciales. Scielo. 2015 Junio; 81(2). Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2015000200002#:~:text=Dependiendo%20de%20la%20especie%2C%20se, fen%C3%B3licos%2C%20fenilpropanoides%2C%20entre%20otros.
- 2: Labrada Y, et al. Caracterización física y química del aceite esencial. Revista Cubana de Química. 2018 Diciembre; 30(3). Disponible en: <https://repositorio.umsa.bo/xmlui/bitstream/handle/123456789/9640/PG-1200-Torrez%20Mamani%2c%20Juan%20Jos%c3%a9.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- 3: Organización Mundial de la Salud (OMS). [Online].; 2014-2023 [cited 2022 Enero 26]. Disponible en: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/95008/9789243506098_spa.pdf.
- 4: Klier G, Folguera G. Conservación de la biodiversidad y extractivismo en América Latina. Scielo. 2017 Septiembre; I(22). Disponible en: http://scielo.senescyt.gob.ec/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1390-66312017000200182
- 5: Lucena M, et.al. Actividad antifúngica del aceite volátil de *Hedyosmum* sp., frente a especies del género *Candida*. Kasma. 2020 Diciembre; 48(2). Disponible en: <https://produccioncientificaluz.org/index.php/kasma/article/view/31678/pdf>
- 6: Fuentes E. Diagnóstico micológico por técnicas no convencionales en el siglo XXI. Scielo. 2020 Diciembre; 72(3). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602020000300011&lang=es
- 7: Lazo V. Hernández G. Méndez R. Candidiasis sistémica en pacientes críticos, factores predictores de riesgo. Scielo. 2018 Marzo; 18(1). Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-558X2018000100011&lang=es
- 8: Mayo Clinic Family Health Book (Libro de Salud Familiar de Mayo Clinic) 5.ª edición. Disponible en: <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/infectious-diseases/symptoms-causes/syc->

[20351173#:~:text=Las%20enfermedades%20infecciosas%20son%20trastornos,algunos%20organismos%20pueden%20causar%20enfermedades.](#)

9: Lazo V, Hernández G, Méndez R. Candidiasis sistémica en pacientes críticos, factores predictores de riesgo. Horiz. Med. 2018 Febrero; 18(1). Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-558X2018000100011

10: Cornistein W, Mora A, Orellana N, et al. *Candida*: Epidemiología y factores de riesgo para especies no albicans. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2013 Febrero; 31(6). Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-candida-epidemiologia-factores-riesgo-especies-S0213005X12003229>

11: Lobaina T, Zhurbenko R, Rodríguez C, et al. Identificación de especies de *Candida* de importancia clínica con un método auxonograma modificado. Revista Cubana Med Trop. 2010 Febrero; 62(1): 66-81. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602010000100008#:~:text=Las%20especies%20del%20g%C3%A9nero%20Candida,Candida%20kefyr%2C%20con%20marcada%20importancia.

12: Gómez C. Resistencia de levaduras de género *Candida* al Fluconazol. Infectio. 2010 Febrero; 14(52). Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v14s2/v14s2a09.pdf>

13: World Health Organization. Protocolo de implementación temprana para la inclusión de *Cándida* spp. 2019 Febrero. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/326927/WHO-WSI-AMR-2019.4-spa.pdf?ua=1>

14: Quintana S, Díaz P, Mazón G, et al. Genima de *Candida albicans*. Salud Uninorte. 2017 Febrero; 33(3). Disponible en: <https://www.redalyc.org/journal/817/81753881018/html/>

15: Zurita J. Estiman que el 3% de la población ecuatoriana podría tener enfermedades micóticas. Redmedic. 2017; 1(3).

16: Guerra A. Diversidad y distribución de los endemismos de Asteraceae (Compositae) en la Flora del Ecuador. Collectanea Botanica. 2020 Marzo; 39(1). Disponible en:

<https://collectaneabotanica.revistas.csic.es/index.php/collectaneabotanica/article/view/283/401>

17: Hofstede R, et al. Los Páramos Andinos ¿Qué sabemos? Estado de conocimiento sobre el impacto del cambio climático en el ecosistema páramo. Primera ed. Quito: UICN; 2014. Disponible en: <https://portals.iucn.org/library/sites/library/files/documents/2014-025.pdf>

18: Guerra A. Uso tradicional de especies de plantas en trece provincias de Ecuador. Segunda ed. Puyo: Collectanea Botanica; 2021. Disponible en: <https://collectaneabotanica.revistas.csic.es/index.php/collectaneabotanica/article/view/304/456>

19: Andrade S, et al. Aceites esenciales y sus componentes como una alternativa en el control de mosquitos vectores de enfermedades. Scielo. 2017 Septiembre; 37(2). Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572017000600224

20: Casado I. Optimización de la extracción de aceites esenciales por destilación en corriente de vapor. Tesis. Madrid: Universidad Politécnica de Madrid, Facultad de Ingeniería; 2018. Disponible en: https://oa.upm.es/49669/1/TFG_IRENE_CASADO_VILLAVERDE.pdf

21: Valarezo S. Actividad antimicrobiana de extractos de tallos y flores del *Hedyosmum* sp. Tesis. Riobamba: Universidad Nacional de Chimborazo, Facultad de Ciencias de la Salud; 2019. Disponible en: <http://dspace.unach.edu.ec/bitstream/51000/5555/1/UNACH-EC-FCS-LAB-CLIN-2019-0005.pdf>

22: Zamora A. Composición química del aceite esencial de hojas de *Hedyosmum translucidum* Cuatrec., Chloranthaceae. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 2016 Mayo; 15(3). Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/162596292.pdf>

23: Latorre K. Actividad antimicótica del aceite esencial de *Hedyosmum* sp., frente a cepas de interés clínico. Tesis. Riobamba: Universidad Nacional de Chimborazo, Facultad de Ciencias de la salud; 2019. Disponible en: <http://dspace.unach.edu.ec/bitstream/51000/6113/1/Actividad%20antimic%C3%B3tica%2>

[Odel%20aceite%20esencial%20de%20Hedyosmum%20sp.%2C%20frente%20a%20cepas%20de%20inter%2C%A9s%20cl%2C%ADnico.pdf](#)

24: Pappas P, Lionakis M, Arendrup M, et al. Invasive candidiasis. Nature Reviews Disease Primers. 2018 Febrero; 4 (18026). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29749387/>

25: García D, Abreu R, Mesa L, et al. Situación actual de la candidiasis sistémica en pacientes hospitalizados. Acta Médica del Centro. 2020 Febrero; 14(2). Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/medicadelcentro/mec-2020/mec202e.pdf>

26: Colombo A, Júnior J, Guinea J. Emerging multidrug-resistant *Candida* species. Current Opinion in Infectious Diseases. PubMed. 2017; 30(6). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29095200/>

27: González M, Ostrosky L. Invasive Candidiasis. Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine. PubMed. 2020; 41(01): 003–012. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32000280/>

28: Barberán J, Mensa J, Fariñas C, et al. Recomendaciones de tratamiento antifúngico en pacientes con bajo grado de inmunodepresión. Revista Española Quimioter .2008 [Consultado 20 de febrero]; 21(2): 127-142. Disponible en: <https://seq.es/seq/0214-3429/21/2/consenso barbera.pdf>

29: Tangarife V, Flores S, Mesa A. Diagnóstico micológico de los métodos convencionales a los moleculares. Medicina & Laboratorio. 2015; 21(5). Disponible en: <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/05/884119/diagnostico-micologico.pdf>

30: Llovo J, Pontón J. Diagnóstico microscópico de las micosis. Revista Iberoamericana de la Micología. 2007. Capítulo 14 Disponible en: <http://www.guia.reviberoammicol.com/Capitulo14.pdf>

31: Laboratorios Britania. Saboraud Glucosado Agar [Internet]. Britania. [Consultado 20 de febrero de 2022] 2010 Disponible en: https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5af08a08a7afe.pdf

- 32: Lobaina T, Zhubenko R, Rodríguez C, et al. Identificación de especies de *Candida* de importancia clínica con un método auxonograma modificado. Revista Cubana Med TROP. 2010; 62(1): 48-57. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/mtr/v62n1/mtr08110.pdf>
- 33: IDEXX Laboratorios. Guía microbiológica para interpretar la concentración mínima inhibitoria (CIM). [Internet] 2018 [Consultado 20 de febrero de 2022]. Disponible en: <https://www.idexx.es/files/mic-gui%CC%81a-microbiolo%CC%81gica-es.pdf>
- 34: Picazo J. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. SEIC [Internet] 2018 [Consultado 20 de febrero de 2022]. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia11.pdf>
- 35: Barberán J, Mensa J, Fariñas C, et al. Recomendaciones de tratamiento antifúngico en pacientes con bajo grado de inmunodepresión. Revista Española Quimioter. 2008; 21(2): 127-142. Disponible en: <https://seq.es/seq/0214-3429/21/2/consensobarbera.pdf>
- 36: Tapia C. Antifúngicos y Resistencia. Revista Chilena Infectol. 2012; 29(3): 357. Disponible en: [https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182012000300020#:~:text=Resistencia%20antif%C3%BAngica%20\(definiciones\)%3A%20Resistencia,rango%20observado%20para%20cepas%20silvestres.](https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182012000300020#:~:text=Resistencia%20antif%C3%BAngica%20(definiciones)%3A%20Resistencia,rango%20observado%20para%20cepas%20silvestres.)
- 37: López K, Dzul K, Lugo C, et al. Mecanismos de resistencia antifúngica de los azoles en *Candida albicans*. Revista biomédica. 2016; 3(27). Disponible en: <https://www.revistabiomedica.mx/index.php/revbiomed/article/view/541/554>
- 38: Talapko J, Juzbasic M, Matijevic T, et al. *Candida albicans*- The Virulence factors and clinical manifestations of infection. Journal of Funji. 2021; 7(2):79. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/jof7020079>
- 39: López K, Dzul K, Lugo C, et al. Mecanismos de resistencia antifúngica de azoles en *Candida albicans*. Revista Biomédica. 2016;27(3). Disponible en: <https://www.revistabiomedica.mx/index.php/revbiomed/article/view/541/560>

- 40: Cargua R. Actividad Antifúngica del extracto alcohólico y aceite esencial de *Plantago major* (Llantén) frente a *Candida albicans*. [Tesis Master] Ambato: Universidad regional autónoma de los Andes. 2018
- 41: Paucar E, Peltroche N, Cayo C. Actividad antibacteriana y antifúngica del aceite esencial de *Minthostachys mollis* frente a microorganismos de la cavidad oral. Revista cubana de investigaciones Biomédicas. 2021; 40(5)1450. Disponible en: <http://www.revibiomedica.sld.cu/index.php/ibi/article/viewFile/1450/972>
- 42: Pereira A, Rangel D, Souza C. Perfil químico y actividad antifúngica del aceite esencial de la flor de *Bauhinia rufa* (Bong). Steud. Revista cubana de farmacia. 2020; 53(2). Disponible en: <http://www.revfarmacia.sld.cu/index.php/far/article/view/400/345>
- 43: Lucena M, Latorre K, Ustáriz F, et al. Actividad antifúngica del aceite volátil de *Hedyosmum* sp., frente a especies del género *Candida*. Kasma. 2020. Disponible en: https://produccioncientificaluz.org/index.php/kasma/article/view/31678/XML#content/figure_reference_2
- 44: Latorre Katty. Actividad antimicótica del aceite esencial de *Hedyosmum* sp. Frente a cepas de interés clínico. [Tesis de pregrado]. Riobamba: Universidad Nacional de Chimborazo. 2019
- 45: Arastehfar A, et. al. Susceptibilidad antifúngica, genotipado, mecanismo de resistencia y perfil clínico de aislados de sangre de *Candida tropicalis*. [Internet] 2019 [Consultado 30 de abril de 2022]. Disponible en: <https://academic.oup.com/mmy/article/58/6/766/5673580?login=false>
- 46: Yu – Chen, et. al. Clonalidad de *Candida tropicalis* no sensible al fluconazol en infecciones del torrente sanguíneo, Taiwán, 2011–2017. NCBI. 2019; 25 (9): 1668–1675.. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6711239/>
- 47: Jafri H, Ahmad I. El aceite esencial de *Thymus vulgaris* y el timol inhiben las biopelículas e interactúan sinérgicamente con los fármacos antimicóticos contra las cepas de *Candida albicans* y *Candida tropicalis* resistentes a los fármacos. ELSEIVER. 2020;

30(1). Disponible en:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1156523318303007>

48: Gómez M, Mora H. Aspectos Actuales en la biología, patogenia y tratamiento de *Candida krusei*, un fúngico patógeno desatendido. Infección y resistencia a los medicamentos. NCBI. 2020; 13:1673-1689. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7293913/>

49: Jamiu A, Albertyn J, Sebolai O, Pohl C. Update on *Candida krusei*, a potential multidrug-resistan pathogen. Medical Mycology. 2020; 1:1-17. Disponible en:
[doi:10.1093/mmy/myaa031](https://doi.org/10.1093/mmy/myaa031)

50: García M, Rojas K. Determinación de los componentes volátiles y actividad antifúngica del aceite esencial de *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) frente a diferentes especies de *Candida*. [Tesis de pregrado]. Mérida: Universidad de los Andes. 2018

51: Oihane M. Complejo de especies de *Candida parapsilosis*: revisión de su epidemiología, patogénesis, identificación, tipado y sensibilidad antifúngica. [Internet] 2017 [Consultado 30 de abril de 2022]. Disponible en: <https://addi.ehu.es/handle/10810/30972>

52: Moreno X, et. al. Formación de biopelículas por *Candida parapsilosis* sensu stricto y su perfil de susceptibilidad en Venezuela. Kasma. 2020; 48(1). Disponible en:
<https://www.redalyc.org/journal/3730/373064123006/373064123006.pdf>

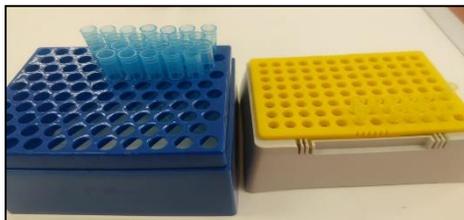
53: Fekkar A, et. al. Brote hospitalario de *Candida parapsilosis* resistente al fluconazol: Argumentos a favor de la transmisión clonal y la persistencia a largo plazo. [Internet] 2021 [Consultado 30 de abril de 2022] Disponible en:
<https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/AAC.02036-20>

ANEXOS

Anexo 1: Materiales



A: Pipeta 10 µL



B: Puntas azules y amarillas



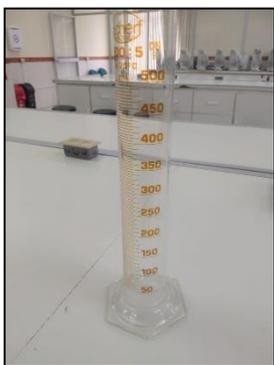
D: Hisopos estériles



E: Caja mono Petri estéril



F: Asa, pinza



G: Probeta 500 ml



H: Matraz Erlenmeyer, vaso de precipitación

Anexo 2: Equipos



A: Incubadora



B: Autoclave

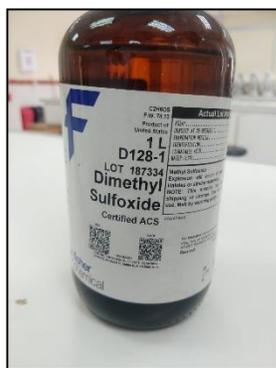


C: Cámara de flujo laminar



D: Refrigeradora

Anexo 3: Solventes

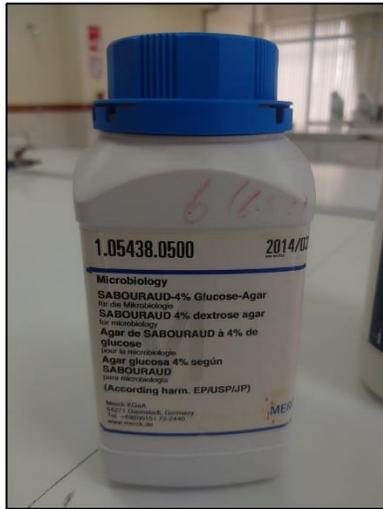


A: DMSO



B: Agua destilada

Anexo 4: Medios de Cultivo



A: Agar Saboraud



B: Agar Mueller Hinton

Anexo 5: Otras sustancias utilizadas



A: Azul de metileno



B: Glucosa

Anexo 6: Muestras de *Candidas*



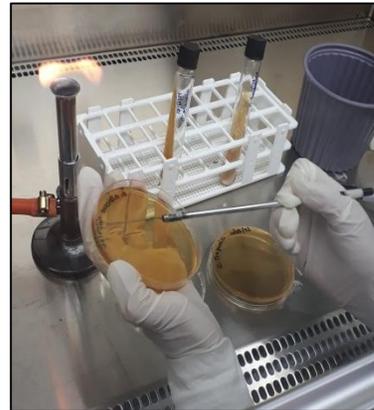
Cultivos de *C. albicans* y *C. tropicalis*

Anexo 7: Aceite puro y diluciones



Aceite y diluciones en tubos Eppendorf

Anexo 8: Pre inóculo



Preparación y siembra del pre inóculo

Anexo 9: Agar Mueller Hinton Suplementado



Preparación de Agar Mueller Hinton para 100 mL

Anexo 10: Patrones de McFarland



Patrón de McFarland 1 de las diferentes especies de *Candidas*

Anexo 12: Discos en blanco y discos de antibióticos



Discos en blanco y discos con Fluconazol de 25 μ g