1859


**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA**

**FACULTAD DE LA SALUD HUMANA**

**CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO**


**TÍTULO**

# Determinación de la actividad antimicótica del aceite esencial de *Plumbago scandens (Plumbaginaceae)* por la técnica de Kirby Bauer modificada.

Tesis previa a la obtención del título de Licenciada en Laboratorio Clínico


**AUTORA:**

*Anabel Marisol Carrión Lliguin*

**DIRECTOR:**

*Dr. Luis Alberto Morocho Yaguana, Mg. Sc.*


**LOJA - ECUADOR**

**2019**

## Certificación

Dr. Luis Alberto Morocho Yaguana, Mg. Sc.

**DIRECTOR DE TESIS**

**CERTIFICO:**

Que he revisado y orientado en el marco del Reglamento de Régimen Académico de la Universidad Nacional de Loja vigente, todo el proceso de desarrollo del trabajo investigativo titulado: **"Determinación de la actividad antimicótica del aceite esencial de *Plumbango scandens* (*plumbaginaceae)* por la técnica de Kirby Bauer modificada"** de autoría de la Srta. **Anabel Marisol Carrión Lliguin**, previo a la obtención del título de Licenciada en Laboratorio Clínico, ha sido desarrollada, corregida y orientada bajo mi dirección y en el marco del reglamento del régimen académico de la Universidad Nacional de Loja vigente.

Loja, 22 de Mayo del 2019

Atentamente,

**Dr. Luis Alberto Morocho Yaguana , Mg. Sc**

**Director de tesis**

## Autoría

Yo, **Anabel Marisol Carrión Lliguin** con **Cl. 1105952459,** declaro ser autora del presente trabajo de investigación, y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos de posibles reclamos o acciones legales por el contenido de la misma.

Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja la publicación del presente trabajo en el Repositorio Institucional de la Biblioteca Virtual.

**Autora:** Anabel Marisol Carrión Lliguin

**Firma:……..**

**Cédula:** 1105952459

**Fecha**: Loja, 22 de Mayo del 2019

## Carta de autorización

Yo, **Anabel Marisol Carrión Lliguin** declaro ser autora de la tesis titulada **"Determinación de la actividad antimicótica del aceite esencial de *Plumbango scandens* (*plumbaginaceae)* por la técnica de Kirby Bauer modificada",** como requisito para optar al grado de **Licenciada en Laboratorio Clínico;** autorizo al Sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que con fines académicos, muestre al mundo la producción intelectual de la Universidad a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera en el Repositorio Digital Institucional:

Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo en el RDI, en las redes de información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad.

La Universidad Nacional de Loja, no se responsabiliza por el plagio o copia de la tesis que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, a los 22 días del mes de Mayo del dos mil diecinueve, firma la autora.

**Firma**: …….

**Autora**: Anabel Marisol Carrión Lliguin

**Cédula:** 1105952459

**Dirección:** Ciudadela Héroes del Cenepa

**Correo Electrónico:** annycarrion@outlook.com

**Celular:** 0989994499

**DATOS COMPLEMENTARIOS**

**Director de tesis:** Dr. Luis Alberto Morocho Yaguana, Mg. Sc.

**Tribunal de Grado:**

**Presidenta:** Bq. Luisa Ivonne Celi Carrión Mg. Sc.

**Vocal:** Lic. Ivanova del Cisne Zúñiga Román, Mg. Sc.

**Vocal:** Bq. María del Cisne Luzuriaga Moncada, Mg. Sc.

# Dedicatoria

**A papito Dios**

Por su infinita bondad y misericordia, porque sin él, nada es posible.

**A mi querida viejita**

Por su apoyo incondicional, en cada momento, en cada etapa, por su entera preocupación y dedicación

**A mi querido viejito**

Por enseñarme que de la mano de Dios todo se puede

**A mis hermanos**

Carlos, Jorge, Alberto, gracias por su amor.

**A ti**

Mi amor, por tu constancia y preocupación, fuiste mi confort en aquellos momentos difíciles. Gracias por abrazarme hasta acabar la tesis te amo.

**A mi pequeño Emiliano**

Mi gran amor

## Agradecimiento

**“Si Dios no existe…todo está permitido; y si todo está permitido, la vida es imposible”**

**Fiódor Dostoyevski**

A ti creador, por tu inmenso amor, gracia y misericordia; me rodeaste de personas increíbles

A mi director Dr. Luis Alberto Morocho, gracias por su constante dedicación en el proyecto, permitiéndome llevar a cabo la culminación del mismo

A ustedes queridos padres, hermanos y familia, por su gran amor y dedicación, por brindarme su apoyo incondicional en cada momento.

A mis estimad@s María del Cisne, Iliana y Jorge, gracias por su apoyo incondicional

## Abreviaturas

**ABPA:** Aspergilosis Broncopulmonar Alérgica

**HIV:** Virus de Inmunodeficiencia Humana

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**PDA:** Papa Dextrosa Agar

**NPJ:** Neumonía por Pneumocystis Jirovecy

**CMI:** Concentración Mínima Inhibitoria

**MH:** Muller Hinton

**CLSI:** Clinical & Laboratory Standards Institute

**UFC:** Unidades Formadoras de Colonias

**ATCC:** American Type Culture Collection

# Índice

Carátula ..... i
Certificación ..... ii
Autoría ..... iii
Carta de Autorización ..... iv
Dedicatoria ..... v
Agradecimiento ..... vi
Abreviaturas ..... vii
Índice ..... viii
1. Título ..... 1
2. Resumen ..... 2
Summary ..... 3
3. Introducción ..... 4
4. Revisión de la literatura ..... 7
4.1 Importancia de las plantas medicinales ..... 7
4.2 Fitoterapia ..... 7
*4.2.2* Aceite esencial ..... 8
4.3 Plumbago ..... 9
4.3.1Características generales. ..... 9
4.3.2 Clasificación botánica. ..... 9
4.4 Plumbago Scandens ..... 10
4.5 Naftoquinonas. ..... 10
4.6 Plumbagina ..... 11
4.7 Los hongos ..... 12
4.7.1 Morfologia ..... 12
4.7.2 Via de infección. ..... 13
4.7.3 Tipos de micosis. ..... 13
4.8 Candida Albicans ..... 14
4.9 Aspergillus Brasiliensis. ..... 14
4.10 Trichophytum Rubrum. ..... 15
4.11 Cryptococcus neoformans. ..... 15
4.12 Resistencia Antifúngica ..... 16
4.13 Susceptibilidad antifúngica ..... 16
4.14 Pruebas de susceptibilidad ..... 17

4.15 Estándares de Referencia ..... 18
4.16 American Type Culture Collection (Cepas ATCC) ..... 21
4.17 Control de calidad de los análisis micológicos ..... 21
5. Materiales y Métodos ..... 24
5.1 Tipo de estudio ..... 24
5.2 Área de estudio ..... 24
5.3 Grupo de estudio ..... 24
5.4 Muestra ..... 24
5.5 Criterios de inclusión ..... 24
5.6 Criterios de exclusión ..... 25
5.7 Técnica e instrumentos ..... 25
5.8 Técnicas y procedimientos ..... 25
6. Resultados ..... 30
7. Discusión ..... 31
8. Conclusiones ..... 34
9. Recomendaciones ..... 35
10. Bibliografía ..... 36
11. Anexos ..... 40
Anexo 1.- Protocolo de extracción de aceite esencial ..... 40
Anexo 2.- Protocolo para la preparación de medio de cultivo Agar Dextrosa Sabouraud ... 42
Anexo 3.- Protocolo para la preparación de medio Muller Hinton enriquecido con glucosa y azul de metileno ..... 44
Anexo 4.- Protocolo para la preparación del inóculo para levaduras ..... 47
Anexo 5.- Protocolo para la preparación del inóculo para hongos filamentosos ..... 49
Anexo 6.- Protocolo para la preparación e impregnación de los discos de sensibilidad ..... 51
Anexo 7.- Protocolo para evaluar la actividad antimicótica por el método de difusión en discos ..... 53
Anexo 8.- Evidencias fotográficas ..... 56
Anexo 9.- Difusión de resultados ..... 60
Anexo 10.- Certificado de traducción del Resumen ..... 64

## 1. Título

**Determinación de la actividad antimicótica del aceite esencial de *Plumbango scandens* (*Plumbaginaceae)* por la técnica de Kirby Bauer modificada.**

## 2. Resumen

Los hongos son organismos eucariotas, heterótrofos, carentes de clorofila causantes de infecciones en los seres humanos. Las vías de infección pueden darse por vía respiratoria, inoculación, pinchazos accidentales o por contacto físico. La incidencia de las infecciones fúngicas oportunistas está en aumento debido al incremento de la población inmunocomprometida, el turismo, y la falla terapéutica. El presente estudio planteó evaluar la actividad antimicótica del aceite esencial de la *Plumbago scandens*, el cual fue extraído por arrastre de vapor de las partes aéreas (tallos y hojas), y se evaluó mediante la técnica de Kirby Bauer modificada. Se prepararon tres diluciones en acetona, como control positivo se usó Nistatina , y acetona como control negativo. La actividad antimicótica se evaluó midiendo el diámetro en mm de los halos de inhibición alrededor del disco de papel. El aceite esencial presentó actividad antimicótica frente a *Candida albicans* (ATCC 26790), *Cryptococcus neoformans* (ATCC 14116),*Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404) y *Trichophytum rubrum* (ATCC28188) en las concentraciones más altas; a 0,125 µg/disco, la concentración más baja no mostró actividad antimicótica frente a *Candida albicans* . Los resultados obtenidos en la investigación fueron socializados a estudiantes y Docentes de la Carrera de Laboratorio Clínico.

**Palabras clave:** *actividad antimicótica*, aceite esencial, *Plumbago scandens*, Kirby Bauer modificado

## Summary

Fungi are eukaryotic, heterotrophic, lacking chlorophyll organisms that cause infections in humans. The routes of infection can be by respiratory route, inoculation, accidental punctures or by physical contact. The incidence of opportunistic fungal infections is increasing due to the increase in the immunocompromised population, tourism, and therapeutic failure. The present study proposed to evaluate the antifungal activity of the Plumbago scandens essential oil, which was extracted by steam trawling from the aerial parts (stems and leaves), and evaluated using the modified Kirby Bauer technique. Three dilutions were prepared in acetone, as a positive control, Nystatin was used, and acetone as a negative control. The antifungal activity was evaluated by measuring the diameter in mm of the inhibition halos around the paper disk. The essential oil showed antifungal activity against Candida albicans (ATCC 26790), Cryptococcus neoformans (ATCC 14116), Aspergillus brasiliensis (ATCC 16404) and Trichophytum rubrum (ATCC28188) at the highest concentrations; At 0.125 µg / disc, the lowest concentration showed no antifungal activity against Candida albicans. The results obtained in the research were socialized to students and teachers of the Clinical Laboratory Career.


**Key words:** antifungal activity, essential oil, *Plumbago scandens,* modified Kirby Bauer

## 3. Introducción

Los hongos producen, en general, infecciones superficiales y mucocutáneas leves con tendencia a la cronicidad en personas inmunocompetentes. La incidencia de las infecciones fúngicas oportunistas, que en general son agudas y con alta mortalidad, está en aumento debido al incremento de la población inmunocomprometida, y también al turismo, que posibilita la infección por hongos endémicos de otras regiones. Hay más de 100.000 especies de hongos, más de 300 causan infección en humanos y cada año se describen unas 20 especies nuevas. Es por ello que existe un marcado interés en las enfermedades fúngicas, especialmente en aquellas que afectan a los pacientes con su sistema inmunitario deprimido. Algunos hongos pueden colonizar la piel y causar fungemias al realizarse instrumentaciones como cateterismos o nutrición parenteral. Los hongos patógenos primarios producen infección en personas inmunocompetentes y los oportunistas sólo causan enfermedad a las personas inmunocomprometidas (Revankar & Sobel, 2018)

Más de 300 millones de personas de todas las edades sufren de una infección fúngica grave cada año en todo el mundo. De estas, más de 1,66 millones de personas mueren anualmente, en comparación con las muertes causadas por malaria, SIDA y tuberculosis. En Estados Unidos las especies de *Candida* provocan del 8% a 10% de invasiones fúngicas. En América Latina se encontró que de 672 episodios de candidemia, 297 (44,2%) ocurrieron en niños (23,7% menores de 1 año), 36,2% en adultos entre 19 y 60 años y 19,6% en ancianos. La incidencia general fue de 1,18 casos por 1.000 ingresos y variaron de un país a otro, siendo la más alta en Colombia y la más baja en Chile (Zurita, 2017).

En Ecuador se estima que el 11.1% de pacientes con VIH/SIDA está afectado por alguna infección fungica, un 7% de la población por meningitis criptocócica y el 11% por Pneumocystis Jiroveci (NPJ). Al menos 307.593 mujeres ecuatorianas de 15-50 años

están afectadas por candidiasis vulvovaginal y alrededor de 748 personas están afectadas por Aspergilosis Invasiva y Aspergilosis Broncopulmonar Alérgica (ABPA). Estas estimaciones indican que el 3% de la población en Ecuador está afectada por una infección fúngica grave. (Zurita, 2017).

Un hongo es resistente a un antifúngico cuando sigue produciendo la enfermedad en el paciente, a pesar de que la concentración del agente antimicótico sea máxima en el lugar de la infección, esto debido a que en muchos casos el paciente tiene un compromiso grave de la respuesta inmune y aunque se administren fármacos, su sistema inmunitario no va a ser capaz de eliminar el agente patógeno. Los problemas actuales para el uso de antifúngicos son la presencia de un mayor número de infecciones sistémicas, el uso de inmunosupresores, la pandemia de infección por virus del HIV, las infecciones por hongos emergentes, la posible resistencia a azoles y la poca disponibilidad de pruebas de sensibilidad. Es por ello que la industria farmacéutica ha asumido el reto de crear antimicóticos que actúen en sitios específicos de las células eucarióticas de los hongos, para no afectar a las células humanas ampliando y mejorando la eficacia de los ya existentes (Arenas, 2014).Algunos de los factores que contribuyen a la resistencia son aquellos propios de la célula fúngica, factores dependientes de la droga y factores del hospedero. *Candida albicans*, es uno de los agentes etiológicos más importantes que ocasiona infecciones debido a cambios en las condiciones locales o en la inmunidad del hospedero. Los principales mecanismos de resistencia a antifúngicos apuntan a mutaciones y sobreexpresión de genes (Fuentes, 2014)

Las hojas de *Plumbago scandens* son ampliamente utilizadas como medicina tradicional en la India para tratar parásitos intestinales, reumatismo, anemia y sarna. Su uso en estudios farmacológicos ha demostrado que extractos de esta planta tiene propiedades antiplasmoidal, antimicrobiano, antifúngica y antiinflamatoria. Plumbagina,

principio activo de esta planta ha manifestado tener una importante actividad antimicótica frente a especies de hongos que causan infecciones diseminantes en huéspedes inmunocomprometidos (Bhatt, Saxena, & Negi, 2014)

Actualmente, existen plantas medicinales que tienen una actividad antimicrobiana conocida por la población, sin embargo, no existen estudios científicos que determinen cuáles son sus beneficios, pasando muchas veces desapercibidas. Existe gran variedad de plantas medicinales en Ecuador que contienen metabolitos secundarios con actividad biológica, sin embargo a la mayoría de las plantas que crecen en el país, no se les ha realizado un estudio profundo para conocer las grandes propiedades curativas que poseen (Azuero, Jaramillo, San Martín, D'armas, & Haydelba, 2016)

El presente proyecto tuvo como objetivos obtener el aceite escencial de *Plumbango scandens* por la técnica de arrastre de vapor; evaluar la actividad antimicótica frente a cuatro microorganismos por la técnica de Kirby Bauer modificada, y realizar la difusión de los resultados en presencia de los estudiantes y docentes de la Carrera de Laboratorio Clínico

# 4. Revisión de literatura

## 4.1 Importancia de las plantas medicinales

Las plantas desde mucho tiempo atrás ocupan un lugar importante entre las distintas prácticas complementarias utilizadas y difundidas a través de la cultura popular, siendo el principal recurso terapéutico utilizado para tratar la salud de las personas. Sus propiedades están relacionadas con los principios activos que tienen, los cuales pueden tener gran impacto en el curso de una enfermedad (Talavera, 2015). La funcionalidad del producto vegetal, depende de la recolección y conservación, si estos procesos son incorrectos provocaran procesos de degradación en un menor tiempo, caracterizándose por desprendimiento de olor, cambios de color y desecación, los cuales disminuyen la calidad de los efectos terapéuticos (Camacho & Cañaviri, 2014)

En China, la medicina tradicional, incluida la fitoterapia, representa cerca del 40% de toda la atención de salud prestada. En Chile la ha utilizado el 71% de la población, y en Colombia el 40%. En la India el 65% de la población rural la utiliza para ayudar a atender sus necesidades de atención primaria de salud. En los países desarrollados se están popularizando los medicamentos tradicionales, complementarios y alternativos. El porcentaje de la población que ha utilizado dichos medicamentos al menos una vez es del 48% en Australia, el 31% en Bélgica, el 70% en el Canadá, el 42% en los Estados Unidos de América y el 49% en Francia (OMS, 2017)

## 4.2 Fitoterapia

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la fitoterapia como la Ciencia que estudia la utilización de los productos de origen vegetal, con fines terapéuticos, ya sea para prevenir, atenuar o curar un estado patológico. Sin embargo, limita el uso de productos vegetales a la administración por vía oral o tópica y de ninguna manera se autoriza el uso de

éstos por vía parenteral, debiendo ser utilizado solamente en caso de afecciones leves a moderadas y en algunos casos de enfermedades crónicas (Camacho & Cañaviri, 2014).

El uso de las plantas medicinales, sean en forma de productos herbario terminados o en forma de materiales vegetales brutos debe hacerse sobre la base de 3 elementos fundamentales. Estos son:

- Eficacia
- Seguridad.
- Calidad

La utilización de un producto con una indicación médica en el ser humano no debe hacerse sobre la base de un conocimiento empírico ya que, aunque la sustancia sea de origen natural podrá corregirlo o alterarlo provocando un efecto farmacológico que resulte terapéutico o adverso. Deben alcanzar aspectos esenciales tanto para la eficacia como para la seguridad, relacionando ambos aspectos a estudios preclínicos y ensayos clínicos (Hernández A. , 2015).

### 4.2.2 Aceite esencial

Los aceites esenciales son compuestos formados por varias substancias orgánicas volátiles, que pueden ser alcoholes, acetonas, cetonas, éteres, aldehídos, y que se producen y almacenan en los canales secretores de las plantas. Normalmente son líquidos a temperatura ambiente, y por su volatilidad, son extraíbles por destilación en corriente de vapor de agua, aunque existen otros métodos. En general son los responsables del olor de las plantas (Moscoso A. , 2018).

## 4.3 Plumbago

*Plumbago* es un género de 10 a 20 especies de fanerógamas pertenecientes a la familia *Plumbaginaceae*, nativas de regiones templadas cálidas a tropicales del mundo. Su utilidad biológica está dada debido a la presencia de naftoquinonas. Su nombre genérico deriva del vocablo latino plumbum que significa plomo y su epíteto especifico deriva de la voz latina Scando, que significa trepar y alude al hábito trepador de esta planta (Fern, 2018).

### 4.3.1Características generales.

El género Plumbago pertenece a la familia Plumbaginaceae y comprende plantas originarias de las regiones de clima templado y tropical. En el Ecuador se encuentra distribuido por diferentes lugares como: Galápagos, Guayaquil, Tungurahua, Loja, Catacocha, Manabí y Esmeraldas (Croat, Carlsen, & Levin, 2007). Son plantas perennes, de porte arbustivo y trepador, de aspecto variado por su crecimiento muy desordenado, con tallos que llegan a desarrollarse hasta 4,5 m en las plantas espontáneas, pero si se cultiva oportunamente organizada sobre tutores, se pueden tener plantas muy decorativas y más contenidas. Las flores, asociadas en inflorescencias en espiga de 20 a 30 cm de largas, son de color azul o rojo según la especie y la variedad y están constituidas por una parte tubular de unos 4 cm de largo que se abre en una corola formada por 5 pétalos y de unos 2,5 cm de ancho (Elicriso, 2016).

### 4.3.2 Clasificación botánica.

- **Reino:** *Plantae*
- **División**: *Magnoliophyta*
- **Clase**: *Magnoliophyta*
- **Orden**: *Plumbaginales*

- **Familia**: *Plumbaginaceae*
- **Género*:*** *Plumbago*

### 4.4 *Plumbago scandens*

**a) Nombre científico**. *Plumbago scandens L.*

**b) Sinonimia**: *P. zeylanica*.

**c) Sinonimia popular**. Cola de iguana, estreñiría, hierba del alacrán, hierba del pescado, hierba de culebra, malacara

**d) Botánica y ecología.** Es una planta arbustiva de 1 a 2 m de altura. Las hojas son más anchas que largas. Las flores son de color blanquecinas, parecen trompetitas y algunas veces, cuando están secas se ponen rojizas, están agrupadas formando unos ramilletes muy vistosos (Encalada, 2018).

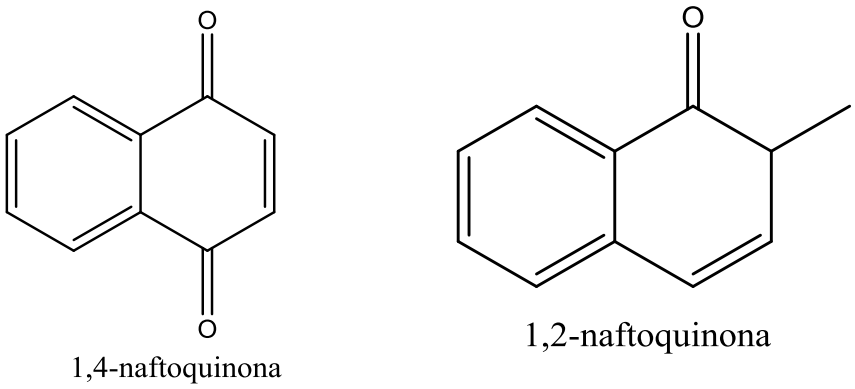
**e) Etnobotánica y antropología**. Se aplica contra las verrugas, pitiriasis alba, el dolor de articulaciones, heridas, picaduras y raspaduras. Sus diferentes partes se pueden utilizar como cremas, pastas, extractos e infusiones para su uso.

### 4.5 Naftoquinonas

Son sustancias orgánicas que forman parte de un grupo de metabolitos secundarios, los cuales, son frecuentemente utilizados como pigmentos naturales. De éstos compuestos se han evidenciado propiedades citotóxicas basadas en su habilidad para generar especies reactivas de oxígeno e interferir con los procesos de respiración celular. Las naftoquinonas tienen como característica estructural dos grupos carbonilo en las posiciones 1,4 y con menor frecuencia en 1,2 o 1,3 en el anillo del naftaleno; en la naturaleza se presentan con grupos hidroxilo y/o metilo como sustituyentes. La estructura química de las naftoquinonas está formada por un

sistema bicíclico del esqueleto naftaleno sustituido en la posición C1 y C4 o en la posición C1 y C2 conocidos como, 1,4-naftoquinona y 1,2- naftoquinona respectivamente (Rosales, 2016).

**Figura 1**

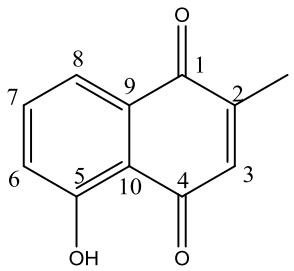



**Estructura de naftoquinonas**

### 4.6 *Plumbagina*

Plumbagina es una naftoquinona de origen natural que se puede obtener a partir de hojas, corteza y raíces de las plantas de la familia *Pumbaginaceae, Droseraceae, Ebenacea, Ancestrocladaceae y Dioncophyllaceae.* Se ha utilizado durante siglos en la medicina india y china, en el tratamiento del acné, tiña, hongos, enfermedades inflamatorias, infecciones bacterianas, parasitarias y virales (Chavez, Rodriguez, Loayza, Huari, & Laguna, 2017). Además de sus propiedades anticancerígenas, se ha informado que plumbagina presenta varias actividades biológicas como, antimicrobiano, antibacteriano, antiaterosclerótico, radiosensibilizante, inhibidor de la topoisomerasa II, antinflamatorio e inmunosupresor (Ahuga, 2016)

**Figura 2**




Plumbagina

**Plumbagina**

Estructura química de plumbagina (Ahuga, 2016)

## 4.7 Los Hongos

Los hongos son organismos eucariotas, heterótrofos y carentes de clorofila, con paredes celulares definidas, en las fases vegetativas y reproductivas; poseen esporas y su forma de crecimiento puede ser pluricelular, filamentosa o alargada. Viven en todos los ambientes, acuáticos, terrestres y aéreos, además de ser saprófitos, simbióticos o parásitos. Al igual que los animales son heterótrofos y contienen glucógeno como sustancia de reserva. Existen aproximadamente 100.000 especies de hongos, algunos de ellos son mutualistas, otros descomponedores y otros parásitos. Viven en todos los ambientes y hábitats, pueden ser acuáticos, terrestres, epífitos y aéreos. Se los reconoce como saprófitos, simbiontes, parásitos o hiperparásitos (Sobrado, Cabral, & Romero, 2013)

### 4.7.1 Morfología.

Los hongos se dividen en levaduras u hongos unicelulares, hongos filamentosos o mohos, y hongos dimórficos. Los mohos, a su vez, pueden dividirse en hongos con hifas no tabicadas (cigomicetos), con hifas con pigmento negro (dematiáceos), o con hifas transparentes o hialinas (dermatofitos, *Aspergillus* spp,). Los hongos dimórficos crecen como moho a

temperatura ambiente en la naturaleza y como levadura a 37 °C, siendo ésta su forma invasiva (Maguiña, 2018).

### 4.7.2 Vía de Infección.

El ser humano se infecta por vía respiratoria, por inoculación por pinchazos accidentales, o por contacto con tierra o animales infectados. *Candida albicans* se encuentra colonizando las mucosas humanas, y éstas pueden ser el origen endógeno de la infección. Otras levaduras pueden colonizar la piel y causar fungemias al realizarse instrumentaciones como cateterismos o nutrición parenteral. Los hongos patógenos primarios producen infección en personas inmunocompetentes; los oportunistas sólo causan enfermedad a las personas inmunocomprometidas (Revankar & Sobel, 2018)

### 4.7.3 Tipos de Micosis.

Se pueden clasificar en:

- *Superficiales:* aquellas que afectan a la capa córnea de la epidermis o la porción suprafolicular del pelo sin producir reacción inflamatoria. Por ejemplo, la pitiriasis o tiña versicolor
- *Mucocutáneas*: son aquellas que afectan a la epidermis, uñas, pelos y mucosas, produciendo una reacción inflamatoria importante. Las dermatofitosis o tiñas son producidas por dermatófitos que pertenecen a los géneros *Epidermophyton, Microsporum y Trichophyton.*
- *Subcutáneas*: son infecciones que afectan al tejido cutáneo y subcutáneo tras una implantación exógena traumática (astillas, espinas). Algunas permanecen localizadas, otras se diseminan a los tejidos contiguos y por vía linfática. La esporotricosis, causada por *Sporothrix schenkii,* es una infección de la piel y el tejido subcutáneo en

la que se forman nódulos en la cadena linfática de drenaje, que pueden fistulizar y llegar a afectar al tejido óseo.

- *Invasivas*: aquellas producidas por patógenos primarios endémicos que son hongos que afectan primariamente al pulmón y que pueden diseminarse por vía hematógena dando lugar a una infección sistémica con lesiones cutáneas o subcutánea; o por hongos oportunistas cuya infección está ligada a la alteración de las barreras mucocutáneas, a la enfermedad subyacente (diabetes, sida), a los procedimientos quirúrgicos y a los tratamientos (Quindós, 2015).

### 4.8 *Candida albicans*

Candida albicans es un hongo dimórfico que se desarrolla de forma distinta en función de la temperatura de crecimiento. Como levadura a 37ºC en el huésped, y como hongo de aspecto filamentoso, a 25ºC en la naturaleza. Pertenece al filo Ascomycota y se reproduce de forma asexual por gemación. En forma de levadura presenta un aspecto de células redondas u ovaladas, de 3-8 x 2-7 µ, mientras que, en forma de hongo filamentoso, las células se alargan y se diversifican tomando la apariencia de filamentos, pseudo-hifas o pseudo-micelio. En el cultivo presenta colonias blanquecinas, lisas (en ocasiones rugosas), húmedas, limitadas, opacas y en algún momento se observan seudomicelio y micelio dentro del agar (Bonifaz,2015).

### 4.9 *Aspergillus brasiliensis.*

Las colonias se desarrollan con rapidez a 28°C en los medios de cultivo ordinarios como Sabouraud y papa dextrosa agar (PDA). Microscópicamente se observan hifas tabicadas de 2-4 µm de diámetro; las hifas reproductivas son más anchas, de 4-8 µ; éstas terminan con las clásicas “cabezas aspergilares” que miden en total de 80-200 µ de diámetro; están compuestas

por conidióforos cenocíticos largos (100-200 µ), vesículas redondas (25-100 µ de diámetro), de donde nacen dos series de fiálides. Macroscópicamente se observan colonias que se desarrollan con rapidez, transformándose en colonias planas, granulosas, negras e ilimitadas; al reverso no resentan pigmento (Bonifaz,2015)

**4.10 *Trichophytun rubrum***

Hongo filamentoso con microconidios piriformes, sésiles sobre las hifas formando racimos con, macroconidios muy escasos, con varios tabiques, de formas irregulares, de pared fina y lisa, al final de la hifa. Abundan las clamidosporas intercalares, presencia de hifas en raqueta y ausencia de filamentos espirales. La colonia se desarrolla en un tiempo promedio de 15 días, en medio de Sabouraud agar a 25-28 °C. Microscópicamente tiene abundantes hifas delgadas, tabicadas, de aproximados 2 µ de diámetro. Presenta muchos microconidios o microaleurioconidios, sobre todo en la variedad granulosa; éstos nacen de las hifas, es decir, de formación artrogénica, con aspecto piriforme o como “gotas”; miden entre 2-4 µ de largo y por lo regular se disponen de manera alterna. Macroscópicamente presentan dos tipos de cepas: vellosas y granulosas(Bonifaz,2015).

**4.11 *Cryptococcus neoformans***

Es un hongo levaduriforme perteneciente al filo Basidiomycota y se encuentra en forma de levadura, tanto en el medio ambiente como en el huésped durante la infección. El desarrollo se obtiene de 2 a 3 días a temperatura ambiente o a 37°C. Los medios de cultivo más útiles son Sabouraud, extracto de levadura; nunca debe sembrarse en Sabouraud con antibióticos, porque la cicloheximida inhibe a *C. neoformans y C. gattii*. Microscópicamente se observan levaduras de aproximados 5 a 10 µ de diámetro con blastoconidios de la mitad de su tamaño; ambas, con todo y la cápsula, llegan a medir hasta 20 µ de diámetro. Macroscópicamente se

observan colonias limitadas, mucoides, convexas, de color blanco amarillento y dan un aspecto de “leche condensada”; raras veces toman un color rosa pálido(Bonifaz, 2015)

### 4.12 Resistencia Antifúngica

De acuerdo al concepto clínico, un hongo es resistente a un antifúngico cuando sigue produciendo la enfermedad en el paciente, a pesar de que la concentración del agente antimicótico sea máxima en el lugar de la infección debido a que en muchos casos el paciente tiene un compromiso grave de la respuesta inmune y aunque se administren fármacos, su sistema inmunitario no va a ser capaz de eliminar el agente patógeno. La resistencia clínica depende de lo siguiente:

- Respuesta inmune del hospedero
- Penetración de las drogas
- Presencia de un foco de infección persistente o protegido (catéteres y abscesos)
- Correlación in vitro e in vivo no siempre se da, apareciendo fracaso terapéutico,

Algunos de los factores que contribuyen a la resistencia son aquellos propios de la célula fúngica, factores dependientes de la droga y factores del hospedero (Tapia, 2015). *Candida albicans*, es uno de los agentes etiológicos más importantes que ocasiona infecciones debido a cambios en las condiciones locales o en la inmunidad del hospedero. Los principales mecanismos de resistencia a antifúngicos apuntan a mutaciones y sobreexpresión de los genes (Fuentes, 2014)

### 4.13 Susceptibilidad antifúngica

Los problemas actuales para el uso de antifúngicos son la presencia de un mayor número de infecciones sistémicas, el uso de inmunosupresores, la pandemia de infección por virus del HIV, las infecciones por hongos emergentes, la posible resistencia a azoles y la poca disponibilidad de pruebas de sensibilidad. La industria farmacéutica ha asumido el reto de

crear antimicóticos que actúen en sitios específicos de las células eucarióticas de los hongos, para no afectar a las células humanas ampliando y mejorando la eficacia de los ya existentes (Arenas, 2014).

**4.14 Pruebas de susceptibilidad**

Existen dos procedimientos generales para determinar la sensibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos, estos son:

- **Dilución en agar o caldo**

Esta metodología puede realizarse en macroescala, utilizando tubos, o en microescala, usando microplacas de 96 pocillos. La determinación de la CIM permite cuantificar la actividad antifungica siendo la principal ventaja de los métodos de dilución ya que estos valores cuantitativos se pueden utilizar, junto con la farmacocinética del antimicrobiano, para calcular índices terapéuticos (Estevez, 2017).

- **Difusión en agar**

Tiene como ventaja principal el bajo costo unido a la simplicidad de la técnica que incluye la realización, lectura y en la mayoría de las ocasiones, la interpretación.

- Método de disco

  Consiste en depositar en la superficie de una placa de agar MH previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel de filtro impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado en antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde por el agar, formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18 a 24 horas de incubación, los discos pueden o no aparecer rodeados por una zona de inhibición de crecimiento microbiano (Estevez, 2017)

- Difusión en pocillo

  Se fundamenta en la difusión del antibiótico desde un cilindro vertical (o desde una perforación circular en el agar) a través de una capa de agar solidificada en una placa de Petri hasta inhibir totalmente el crecimiento del microorganismo añadido en el medio de cultivo, en un área circular o zona de inhibición entorno al cilindro que contiene una solución del antibiótico. Las distintas respuestas obtenidas (diámetros de los halos de inhibición) son proporcionales a las dosis de antibiótico utilizadas (Cabrera, 2015).

## 4.15 Estándares de Referencia

El Instituto de Estándares Clínicos de Laboratorio, Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), desarrolló "Estándares de Referencia" que describen detalladamente los parámetros experimentales para la correcta realización de ambos métodos para lograr, de esta forma, una mayor exactitud y reproducibilidad de los resultados.

### 4.15.1 Método de referencia para determinar la sensibilidad de las levaduras a los antifúngicos a través del método de dilución en caldo. Documento M27-A3

Este método sirve para evaluar levaduras que causan infecciones invasoras, en este caso *C. albicans y C. neoformans.* Se utilizan placas de microdilución estériles de 96 pocillos y se dispensan 100 µl de los antifúngicos en las columnas de la 1 a la 10. La columna 1 contiene la concentración más alta del antifúngico (64 o 16 µg/ml) y la fila 10 la más baja (0,12 o 0,03 µg/ml). Debe incubarse, sin agitación, a 35ºC durante 24-48 horas y *Cryptococcus neoformans*, en las mismas condiciones durante 70-74 horas y se lee los resultados (Cantón, Martín, & Espinel, 2012).

### 4.15.2 Método de difusión en medio sólido

Describe el método de difusión en agar para levaduras del género *Candida*. Las pruebas en medio sólido y en especial las de difusión son simples de realizar y los resultados se obtienen de forma rápida, siendo, fáciles de interpretar (Cantón, Martín, & Espinel, 2012) .

- **Medio de cultivo**

La composición del medio de cultivo influye en el tamaño de la zona de inhibición, actividad del antimicrobiano, velocidad de difusión del antimicrobiano y en la velocidad de crecimiento del microorganismo. Para los antifúngicos, se recomienda el uso de Agar Mueller-Hinton con 2% glucosa y 0,5 µg/ml Azul de Metileno. Las placas de Petri deben de tener una profundidad de 4 mm (±1). Es necesario secar la superficie antes de utilizarlas, colocando las placas durante media hora, en la estufa de 37ºC boca abajo y con las tapas ligeramente abiertas para permitir que la humedad se evapore (Cantón, Martín, & Espinel, 2012) .

- **Preparación del inóculo**

Se parte de un cultivo de 24 horas, en Agar Sabouraud dextrosa a 35 (± 2º C). De este cultivo, se tocan cinco colonias y se suspenden en 5 ml de solución salina estéril. El resultado de la suspensión se homogeneiza durante 15 segundos, y su turbidez se ajusta a 0,5 de la escala McFarland (equivalente a 5 x $10^6$ UFC) (Cantón, Martín, & Espinel, 2012) .

- **Inoculación de las placas**

Las placas se deben de inocular de forma que se produzca un crecimiento confluente o semiconfluente. La utilización de inóculos grandes que producen una zona limítrofe engrosada o inóculos pequeños que producen colonias separadas no es adecuada ya que la

zona de inhibición resultante no refleja la sensibilidad o resistencia real del aislado. La siembra de las placas puede realizarse de dos formas:

- *Siembra por dispersión con hisopo*

Se sumerge un hisopo de algodón estéril en el inóculo. El exceso de líquido es eliminado girando el hisopo varias veces contra las paredes interiores del tubo. El inóculo se extiende por toda la superficie de la placa 3 veces seguidas. En cada repetición, se gira la placa 60º, de forma que se asegure la distribución uniforme del inóculo (Cantón, Martín, & Espinel, 2012) .

- *Siembra por inundación*

Se realiza una dilución 1/10, una vez preparado el inoculo, se extraen entre 2-4 ml del mismo y se vuelcan en la placa de Petri distribuyéndose homogéneamente por la superficie. El exceso de líquido se retira con una pipeta Pasteur estéril y se deja secar la superficie durante 15 minutos a temperatura ambiente (Cantón, Martín, & Espinel, 2012) .

- **Preparación de los discos de papel de filtro**

De acuerdo a las recomendaciones de la "United States Food and Drug Administration Standards", el papel filtro debe pesar 30 ± 4 mg/cm2 y debe tener la suficiente capacidad para absorber 2-3 veces su propio peso en agua. Los discos deben tener un diámetro de 6,35 mm (Cantón, Martín, & Espinel, 2012) .

- **Colocación de los discos de antimicrobiano**

Se deben colocar no más de 15 minutos tras la inoculación de las placas, de esa forma la difusión y el crecimiento ocurren en simultáneo. Para asegurar un completo contacto debe presionarse el disco contra la superficie del agar y colocarlos a una distancia de 15 mm del borde de la placa y separados entre sí por una distancia de 24 mm reduciendo la posibilidad

de superposición de zonas de inhibición, que dificulta la lectura e interpretación (Cantón, Martín, & Espinel, 2012) .

- **Incubación de las placas y lectura de las zonas de inhibición**

Las placas inoculadas deben ser incubadas a 35 ± 2 ºC durante 20-24 y hasta 48 horas en una posición invertida.

El diámetro de cada zona de inhibición se mide con una regla, calibre, plantilla o instrumental electrónico y se expresa en mm (Cantón, Martín, & Espinel, 2012) .

- **Interpretación de resultados**

Se tomará en cuenta aquellos halos de inhibición mayores a 6 mm

### 4.16 American Type Culture Collection (Cepas ATCC)

Es un material biológico de referencia certificado. La colección certifica que se suministra una determinada cepa, que es un cultivo puro, y que se han observado las convenientes pruebas morfológicas, bioquímicas y moleculares correspondientes. La obtención es directa a partir de una colección nacional e internacional reconocida, con su respectivo Registro y Certificado (Ángel & Gonzales, 2016). Se clasifican en:

- Cepas de Referencia
- Cepas de Reserva
- Cepas de Trabajo

### 4.17 Control de calidad de los análisis micológicos

El aseguramiento de la calidad tiene como fin identificar, monitorear y evaluar las metodologías para garantizar un resultado confiable. La culminación de estos objetivos se logra valorando la calidad de las muestras clínicas recibidas, controlando la realización de los

procedimientos diagnósticos, los reactivos, medios e instrumentos utilizados, así como la formación y conocimientos del personal del laboratorio (Morales, Castro, Mendoza, Rubiano, & Pacheco, 2017).

### 4.17.1 Control del equipamiento e instrumentación del laboratorio.

Deben realizarse con la frecuencia que sea necesaria para garantizar el correcto funcionamiento del instrumental, siguiendo las indicaciones del fabricante. El material de vidrio reutilizable debe ser limpiado y esterilizado, almacenándose cubierto con papel de aluminio etiquetado con la fecha de esterilización. Debe ser utilizado antes de tres semanas y se deben conservar todos los documentos e informes relativos a un equipo durante toda la vida útil del mismo (Morales, Castro, Mendoza, Rubiano, & Pacheco, 2017).

### 4.17.2 Control de medios de cultivo.

- **Medios elaborados en el propio laboratorio**

Como control de esterilidad, se debe probar un 5% (escogidos al azar) de cada tanda de medios preparados. Se incuba la mitad del 5% a 35 °C y la otra mitad a 25 °C durante 72 h, inspeccionándolos diariamente. Sólo es aceptable el lote elaborado si el porcentaje encontrado de contaminaciones entre los medios incubados es inferior al 5%. Los lotes de medios se deben etiquetar con el número de lote, fecha de caducidad, método de esterilización utilizado y la cantidad de medio realizado en este lote (Morales, Castro, Mendoza, Rubiano, & Pacheco, 2017).

- **Medios comerciales**

Deben ser observados para comprobar el color, grado de sequedad y presencia de contaminaciones, procediendo a realizar controles de esterilidad. Estos medios comerciales están exentos de comprobar su capacidad de proporcionar los resultados esperados, siempre

que los fabricantes hagan constar en la etiqueta que cumplen las normas de calidad (Morales, Castro, Mendoza, Rubiano, & Pacheco, 2017).

#### 4.17.3 Tinciones y reactivos.

a) Todas las soluciones de tinción y los diferentes reactivos deberán estar etiquetadas con su nombre, número de lote, fecha de caducidad y las condiciones de almacenamiento.
b) Los productos comerciales deberán constar con la fecha de recepción y la de apertura para su uso.
c) Las soluciones preparadas en el laboratorio deberán tener una etiqueta con la fecha de preparación y el nombre de la persona que ha elaborado el colorante.
d) Los procedimientos de preparación de los colorantes y realización de las tinciones deberán estar escritos y disponibles mientras esté abierto el laboratorio.
e) La adquisición de reactivos se deberá limitar a un suministro de seis meses (Morales, Castro, Mendoza, Rubiano, & Pacheco, 2017).

#### 4.17.4 Control de calidad de la prueba de sensibilidad.

a) Debe monitorearse la precisión y exactitud del procedimiento de la prueba de susceptibilidad, el comportamiento de los reactivos utilizados en la prueba y el desempeño de las personas que llevan a cabo las pruebas y sus resultados.
b) Al hacer el control de calidad de discos, tiras de E-test o métodos de sensibilidad para sistemas automatizados o semiautomatizados, es recomendable utilizar cepas ATCC. Cada nuevo lote de estos insumos debe evaluarse antes de su uso rutinario y luego una vez al mes, si no existe cambio de lote en ese periodo (Morales, Castro, Mendoza, Rubiano, & Pacheco, 2017).

# 5. Materiales y Métodos

## 5.1 Tipo de estudio

La presente investigación se enmarca dentro delas características de un estudio experimental prospectivo

## 5.2 Área de estudio

El proyecto se lo realizó en el Laboratorio de Fitoquímica perteneciente a la Dirección de Investigación de la Universidad Nacional de Loja, ubicado en el sector La Argelia, en la ciudad de Loja – Ecuador.

## 5.3 Grupo de estudio

Diluciones del Aceite esencial de *Plumbago scandens*

## 5.4 Muestra

Discos de papel Whatman N°1 impregnados con 10µl de las diluciones con concentraciones de 0,5µg; 0,25 µg y 0,125 µg respectivamente

## 5.5 Criterios de inclusión

<u>Soluciones</u>

- Homogéneas y transparentes
- De color amarillo

<u>Medios de cultivo</u>

- Cultivos puros de hongos ATCC

<u>Ensayo</u>

- Cultivos ensayados sin contaminación

## 5.6 Criterios de exclusión

- Soluciones no transparentes, ni amarillas
- Cultivos contaminados o sin crecimiento

## 5.7 Técnica e instrumentos

- Cámara fotográfica
- Hojas de registro de resultados

## 5.8 Técnicas y procedimientos

### Material vegetal y recolección

La recolección de *Plumbago scandens,* se realizó en el cantón Palanda, ubicado en la provincia de Zamora Chinchipe(Ecuador), a 115Km de la ciudad de Loja. Fueron llevadas para su procesamiento al Laboratorio de Fitoquimica de la Universidad Nacional de Loja. Para el procesamiento de la planta se recolectaron las partes aéreas de la planta: tallos,flores y hojas; se preservó una muestra para su identificación taxonómica la cual se la realizó en el Herbario Reinaldo Espinoza de la Universidad Nacional de Loja por el taxónomo Bolívar Merino, quien por las características pudo certificar que el material colectado se trataba de *Plumbago scandens*. La planta se encuentra registrada en el herbario de la universidad con el código EC14-069. El material fresco fue desinfectado con solución de hipoclorito de sodio al 0,5 %, se escurrió el exceso de agua, se dejó secar y se conservó a 8 ºC hasta su procesamiento.

### Extracción del Aceite Esencial

El aceite esencial se obtuvo por arrastre de vapor en un equipo de destilación, donde se usó tallos,hojas y flores. La extracción inicia armando el equipo de destilación que consta de un balón con agua calentado con una estufa calefactora, un refrigerante unido al balón de tres

bocas que contiene el material vegetal, que al igual que el primer balón es calentado con una estufa calefactora, por último, con otro refrigerante se conecta el matraz colector. Los destilados de color amarillo intenso y olor penetrante fueron colectados en un balón en baño de hielo. Posteriormente fueron lavados varias veces con hexano en un embudo de separación hasta que el solvente no presentó color amarillo. Ver anexo 1

Para evaluar la pureza del aceite esencial se realizó una Cromatografía en capa fina usando como eluyente una mezcla de hexano: acetato de etilo 80/20 ml y en la cual se evidenció la presencia de varias franjas visibles con luz ultravioleta de 254 nm, indicando la presencia de varias sustancias. Una cromatografía final en capa fina indicó la presencia de un solo componente que presenta un color amarillo. El producto obtenido se conservó en un matraz de vidrio, en refrigeración y al amparo de la luz.

De 8,7 Kg de la planta (tallos, hojas y flores) se obtuvieron 830 mg de aceite esencial puro en forma de cristales que contienen principio activo utilizado para el ensayo de actividad antimicótica.

Para el ensayo de actividad antimicótica se prepararon soluciones en acetona de 50µg/ml, 25µg/ml y 12,5µg/ml.

**Pruebas piloto:**

Para validar los protocolos se realizó un preensayo de la prueba a desarrollar, realizando lo siguiente:

- Validación de técnicas y métodos

  Se realizaron pruebas para la comprobación del método, utilizando el extracto del aceite esencial de *Plumbago scandens.*

  Se definieron tiempos de incubación, esterilización del material y temperatura de la incubadora.

- Preparación de los medios de cultivo Agar Dextrosa Sabourad y Agar Muller Hinton enriquecido con glucosa y azul de metileno.
- Se sembraron los microorganismos en Agar Dextrosa Sabourad mediante la tenica de estría por agotamiento. Se incubaron a 28ºC. El crecimiento de las colonias de *C.albicans y C. neoformans* se obtuvieron a las 24horas. Los cultivos de *T. rubrun* y *A. brasilienses* se obtuvieron 8 días después de su siembra.
- Para la preparación del inoculo se utilizó la cepa *C. neoformans*. Se lo ajustó con ayuda del densitómetro, el cual se encontró dentro del valor de 0,5 del patrón MacFarland.
- Preparación de las diluciones: se prepararon tres diluciones de 50µg/ml; 25µg/ml; 12,5 µg/ml. Se disolvió el aceite esencial con acetona.
- Preparación de los discos de sensibilidad

  Se prepararon los discos utilizando papel Whatman Nro. 1, con diámetro de 6mm y 0,6mm de espesor y se les agregó 10µl de cada dilución con una concentración de 50µg/ml; 25µg/ml; 12,5 µg/ml equivalente a 0,5µg; 0,25µg y 0,125µg por disco respectivamente.
- Se utilizó Fluconazol como control positivo, pero luego fue reemplazado por Nistatina de 100 µg. Para el control negativo se utilizó acetona, el mismo con el que se disolvió el aceite esencial.
- Se realizaron tres repeticiones por cada dilución

**Fase preanalítica**

1) **Preparación de los medios de cultivo:**

Agar Dextrosa Sabourad y Agar Muller Hinton enriquecido con glucosa y azul de metileno al 1%. Ver anexo 2 y 3.

**2) Siembra de las cepas**

La cepas conservadas en refrigeración se siembran mediante la técnica de estriado por agotamiento en medio de cultivo Agar Sabouroud Dextrosa y se incuban a 28°C .

**3) Preparación del inóculo**

Se prepara por suspensión de las colonias en solución salina estéril para obtener la escala 0,5 de MacFarland. Ver anexo 4 y 5

**4) Preparación de los discos de sensibilidad**

Se preparan los discos utilizando papel Whatman Nro. 1, con diámetro de 6mm y 0,6mm de espesor. Ver anexo 6

**5) Disposición de material para realizar la lectura**

Se realizará utilizando una regla, los halos de inhibición serán medidos en mm

**Fase analítica**

Para el desarrollo del ensayo se realizaron las pruebas por triplicado para cada microorganismo. Ver anexo 7

**1) Preparación de la solución de trabajo**

Se preparan tres diluciones de trabajo en las concentraciones antes mencionadas

**2) Impregnación de los discos de papel**

De las diluciones preparadas se toma 10µl de cada una y se deposita en los discos. Cada disco contiente 0,5µg; 0,25µg y 0,125µg respectivamente.

**3) Rotulación de cajas**

Cada caja se rotuló con el nombre del microorganismo, numero de repetición, concentración y fecha de prueba y la base se rotuló control negativo (CN), control positivo (CP) y prueba(P).

**4) Estriado**

Se sumerge un hisopo estéril en el inoculo, se quita el exceso de líquido girando varias veces contra las paredes interiores del tubo y se siembra por dispersión**.** En cada repetición se giró tres veces la placa a 60º y se pasó el hisopo por el borde de la placa varias veces para asegurar la distribución uniforme del inóculo.

**5) Colocación de los discos**

Se colocaron los discos CP, CN y Prueba antes de los 15 minutos tras la inoculación de las placas para que la difusión y el crecimiento ocurra de manera simultánea.

6) **Incubación**

Se incubaron las placas a 35 ºC por 24 horas para *C. albicans, C. neoformans y A. brasiliensis y* por 72 horas para *T. rubrum.*

**Fase Post- Analítica**

**Medición de los halos de inhibición**

Halo de inhibición se considera una zona sin crecimiento alrededor de los discos y su diámetro se expresa en mm.

# 6. Resultados

Tabla 1

***Promedios de los diámetros de halos de inhibición de las concentraciones del aceite esencial de P. scandens (mm)***

| Microorganismo | C 1 0,5ug/disco | | | C2 0,25ug/disco | | | C3 0,125ug/disco | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **CP** | **CN** | **Ensayo** | **CP** | **CN** | **Ensayo** | **CP** | **CN** | **Ensayo** |
| *C. albicans* | 29 | - | 13 | 29 | - | 12 | 30 | - | - |
| *A. brasiliensis* | 27 | - | 29 | 27 | - | 20 | 27 | - | 10 |
| *T. rubrum* | 21 | - | 36 | 20 | - | 32 | 20 | - | 18 |
| *C. neoformans* | 20 | - | 32 | 20 | - | 28 | 22 | - | 12 |

**Leyenda:** CP, Control Positivo; CN, Control Negativo; C, Concentración
**Fuente*:*** registro de resultados de la actividad antimicótica
**Autor:** Anabel Marisol Carrión Lliguin

**INTERPRETACIÓN:**

Los resultados expuestos en la tabla 1 demuestran que las concentraciones utilizadas presentaron actividad antimicótica frente a los 4 microorganismos ensayados mostrando halos de inhibición; excepto en la dilución más baja de 0,125ug/disco la cual no mostró actividad antimicótica frente a *C. albicans* en ninguna de las tres repeticiones.

## 7. Discusión

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Análisis Químico, perteneciente a la Dirección de Investigación de la Universidad Nacional de Loja, ubicado en el sector la Argelia, con la finalidad de evaluar la actividad antimicótica del aceite esencial de *Plumbago scandens* por el método de difusión en agar modificado frente a cuatro cepas puras (ATCC) de hongos*: Candida albicans*(ATCC 26790), *Cryptococcus neoformans* ( ATCC 14116), *Aspergillus brasiliensis*( ATCC 16404) y *Trichophytum rubrum*(ATCC 28188). Mediante el método empleado se comprobó que el aceite esencial de la planta utilizada tuvo actividad antimicótica.

No se reflejan artículos científicos en los cuales utilicen aceite esencial de *P. scandens* como parte de su investigación sino únicamente artículos que usan extractos de la misma planta empleando métodos diferentes.

V. Uniyal y otros (2014) evaluaron la actividad antimicótica del extracto metanólico de *P. zeylenica* mediante el método de difusión en pocillo frente a hongos levaduriformes como *Trichosporon asahhi* y *Trichosporon inkin,* colocando 100 µL en los pocillos, con una concentración de 1000 µg/pocillo. Los halos de inhibición obtenidos fueron de 16 mm para *T. asahhi* y 23mm para *T. inkin*. En tanto que, en la presente investigación también se evidencia actividad antimicótica de *Plumbago* frente a levaduras como *C. albicans* y *C. neoformans* con halos de 32 mm y 28 mm. La aplicación de diferentes métodos y concentraciones en ambos estudios reflejan que la cantidad de extracto utilizado en la investigación de Uniyal, es mayor, debido a que la concentración molecular de éste es menor porque solo se extraen aquellos compuestos que son solubles en el solvente utilizado a diferencia del aceite esencial empleado en el presente estudio el cual se produce mediante destilación por arrastre de vapor obteniendo una sustancia pura y concentrada con diversas actividades debido a su múltiple

composición molecular lo que explica la variación en el empleo de las concentraciones en ambos estudios.

En otro estudio realizado por S. Sonia (2012) se demostró actividad antimicótica del extracto etanólico de *P. zeylanica* frente a *C. albicans* utilizando una solución con una concentración de 100ug/ml, de ella tomaron 10 µl para impregnar en los discos de papel, con una concentración de 1ug/disco, obteniendo halos de 13 mm. Aunque el método empleado es el mismo en los dos estudios, la concentración de extracto utilizada es mayor, debido a la diferencia de propiedades y composición molecular que presenta el aceite esencial.

R. Selma y otros colaboradores determinaron la actividad antimicótica del extracto metanólico de *P. scandens* contra *Candida albicans* midiendo la Concentración Mínima Inhibitoria(CMI) utilizando intervalos de concentración de 0,098 µg/ml a 50 µg/ml. Se evidenció actividad antimicótica ya que el crecimiento de *C. albicans* fue completamente inhibido. En cambio, en la presente investigación no se consideró determinar qué cantidad de aceite fue necesaria para inhibir el crecimiento de *C. albicans*, sino únicamente comprobar la presencia de halos de inhibición empleando una concentración de 50 µg/ml.

*P. scandens* contiene el principio activo plumbagina, una naftoquinona que actúa a nivel de la membrana del hongo e inhibe las enzimas oxidativas bloqueando la conversión de lanosterol en ergosterol, lo que produce una alteración en la permeabilidad de la membrana. Asi mismo, promueven la acumulación de peróxido de hidrógeno capaz de lesionar la estructura de los organelos intracelulares del hongo. En el presente estudio se evidenció una falta de actividad antimicótica frente a *C. albicans* a una concentración de 0,125 µg/disco, lo cuál puede estar relacionado con la incapacidad de alcanzar concentraciones adecuadas del antifúngico en el sitio de acción por la presencia de barreras de permeabilidad.

Los resultados obtenidos en la presente investigación son de gran importancia, pues empleando otros métodos complementarios se podrá dar continuidad a la investigación de *Plumbago scandens*, aportando a la ciencia para que puedan realizarse nuevos fitofármacos que ayuden que ayuden a sanar aquellas infecciones causadas por hongos en los seres humanos.

# 8. Conclusiones

- Se obtuvo el aceite esencial de *P. scandens* mediante arrastre de vapor y se evaluó su pureza mediante cromatografía en capa fina.

- El aceite esencial de *P. scandens* presenta actividad antimicótica contra *Candida albicans*(ATCC 26790); *Cryptococcus neoformans* ( ATCC 14116);*Aspergillus brasiliensis*( ATCC 16404) y *Trichophytum rubrum*(ATCC 28188) en las concentraciones de 0,5; 0,25 y 0,125 µg/disco. No demostró actividad antificótica frente a *C. albicans* a la contración de 0,125 µg/disco.

- Los resultados fueron difundidos a los docentes y estudiantes de la Carrera de Laboratorio Clínico.

# 9. Recomendaciones

- Se debe realizar pruebas piloto para estandarizar los procedimientos y poder validar el método a emplearse.
- Realizar el control de calidad de los materiales y medios de cultivo a utilizar.
- Validar los protocolos para la preparación de los medios de cultivo, discos de sensibilidad y del inoculo a utilizar.
- Promover la investigación por parte de las autoridades de la Universidad Nacional de Loja, incluyendo como parte de los proyectos a estudiantes de la Carrera de Laboratorio Clínico.

## 10. Bibliografía

Ahuga, A. (Enero de 2016). Sintesis de derivados de Plumbagina y evaluacion de su actividad antiproliferativa. Obtenido de https://cdigital.uv.mx/bitstream/handle/123456789/46863/AhujaCasarinAna.pdf;jsessionid=7F15181AEFDC6052FF8DE42240B55B43?sequence=2

Arenas, R. (2014). Micología Médica Ilustrada. En R. Arenas, Micología Médica Ilustrada (pág. 398). Mexico: McGraw-Hill.

Azuero, A., Jaramillo, C., San Martín, D., D'armas, & Haydelba. (2016). Análisis del efecto antimicrobiano de doce plantas medicinales de uso ancestral en Ecuador. Revista Ciencia UNEMI, 9(20), 11-12. Obtenido de http://ojs.unemi.edu.ec/index.php/cienciaunemi/article/view/342

Barquero, A. (2007). Plantas sanadoras:Pasado,Presente y Futuro. QuimicaViva, 55-59.

Bhatt, R., Saxena, S., & Negi. (Septiembre de 2014). Tamizaje fitoquímico y anti trischosporon actividad de plumbagina. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences , 6, 107-108.

Bonifaz, A. (2015). Micología Básica Médica (Quinta ed.). Mexico: Mcgraw-Hill, 392

Bonifaz, A. (2015). Micologia Médica Básica (Quinta ed.). Mexico: Mcgraw-Hill, 125-126.

Bonifaz, A. (2015). Micología Médica Básica (Quinta ed.). Mexico: Mcgraw-Hill, 356

Cabrera, C. (2015). Validación del método microbiológico cilindro en placa para determinación de la potencia de neomicina en producto farmacéutico triconjugado. Obtenido de Universidad Catolica de Manizales:

http://repositorio.ucm.edu.co:8080/jspui/bitstream/handle/10839/1244/Carolina%20Cabrera%20Pazmino.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Camacho, V., & Cañaviri, A. (Marzo de 2014). Fitoterapia. Revista de Actualización Clínica , 42, 184-187. Obtenido de http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S2304-37682014000300001&script=sci_arttext

Cantón, E., Martín, E., & Espinel, A. (2012). Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A. Revista Iberoamerica de Micología. Obtenido de http://www.guia.reviberoammicol.com/Capitulo18.pdf

Croat, T., Carlsen, M., & Levin, D. (15 de Octubre de 2007). Colecciones Biológicas: INABIO. Obtenido de INABIO: http://biodiversidad.gob.ec:222/ufl/collections/list.php?db=9&type=1&reset=1&tax a=Plumbaginaceae

Elicriso. (Octubre de 2016). Plumbago: como cultivar plumbago. Obtenido de Plumbago: http://biodiversidad.gob.ec:222/ufl/collections/list.php?db=9&type=1&reset=1&tax a=Plumbaginaceae

Estevez, B. (Octubre de 2017). Biosíntesis y caracterización de NPs de Ag con Eysenhardtia polystachya (palo azul) y su inhibición sobre el crecimiento de Clostridium sp. Obtenido de https://core.ac.uk/download/pdf/154795446.pdf

Fuentes, M. (2014). Estudio de susceptibilidad y mecanismos de resistencia a antifúngicos en Candida albicans de aislados clínicos chilenos. Obtenido de Universidad de Chile: http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/138500?show=full

Hernández, A. (9 de Agosto de 2015). Fitoterapia. Bases científicas y legales para su aplicación. Obtenido de Fitoterapia: https://www.redalyc.org/html/856/85640404/

Maguiña, E. (2018). Morfología de los hongos. Obtenido de Universidad Nacional Federico Villareal: https://www.studocu.com/es/document/universidad-nacional-federico-villarreal/anatomia-humana/apuntes/morfologia-de-hongos-biologia/2294013/view

Morales, G., Castro, A., Mendoza, J., Rubiano, L., & Pacheco, J. (2017). Una mirada rápida al control de calidad interno en el quehacer diario del laboratorio de microbiología. Medicina & laboratorio, 466-474. Obtenido de http://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/05/883832/control-de-calidad-lab-microbiologia.pdf

Morón, R. (2017). Evaluacion de la suceptibilidad antifúngica de tres especies de hongos causantes de queratitis. Obtenido de Universidad Peruana Cayetano Heredia: http://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/upch/1373/Evaluacion_MoronTeves_Rubith.pdf?sequence=1&isAllowed=y

OMS. (2017). Nuevas directrices de la OMS para fomentar el uso adecuado de las medicinas tradicionales. Obtenido de http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr44/es/

Patiño, L., Saavedra, A., & Martínez, J. (2014). Extracción por arrastre de vapor de aceite esencial del romero: Universidad Mayor Real y Pontificia de San Francisco Xavier de Chuquisaca. Obtenido de http://www.usfx.bo/nueva/Dicyt/Handbooks/Ciencias%20Tecnol%F3gicas%20y%20Agrarias_2/Ciencias%20Tecnol%F3gicas%20y%20Agrarias_Handbook_Vol%20II/PAPERS_25/art15.pdf

Quindós, G. (1 de Junio de 2015). Los hongos invisibles y la enfermedad que provocan. Scientific American. Obtenido de INVESTIGACIÓN Y CIENCIA: https://www.investigacionyciencia.es/blogs/medicina-y-biologia/74/posts/micosis-los-hongos-invisibles-y-las-enfermedades-que-provocan-13225

Revankar, S., & Sobel, J. (2018). Introducción a las infecciones por hongos: MANUAL MSD. Obtenido de https://www.msdmanuals.com/es-ec/hogar/infecciones/infecciones-por-hongos-infecciones-f%C3%BAngicas,-micosis/introducci%C3%B3n-a-las-infecciones-por-hongos

Talavera, J. (10 de Agosto de 2015). Efecto antibacteriano sobre Streptococcus mutans y perfil de compuestos fenólicosde la manzanilla. Revista investigativa Altoandina, 17(2), 73-74.

Zapata, F., & Cardona, N. (2012). Lo que debemos saber sobre los métodos de sensibilidad antifúngicos. Revista CES Medicina, 26(1), 71-83. Obtenido de http://www.scielo.org.co/pdf/cesm/v26n1/v26n1a07.pdf

Zurita, J. (2017). Infecciones micóticas: esas enfermedades relegadas de la salud pública. Bionatura, 2(3), 8-9. doi: 10.21931/RB/2017.02.03.2

# 11. Anexos

## Anexo 1.- Protocolo de extracción de aceite esencial

| | | | |
|---|---|---|---|
| **UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA**<br>**Laboratorio de Fitoquímica** | **Protocolo para la extracción de aceite esencial** | **Código** LFQ-AF | |
| | | **Revisión:** 01 | **Edición:**01 |
| | | **Fecha:** 15-04-2019 | |

1. **OBJETIVO**

   Obtener el aceite esencial por arrastre de vapor.

2. **ALCANCE**

   Personal encargado, técnico, estudiantes y docentes

3. **FUNDAMENTO**

   Técnica mediante la cual se obtienen sustancias volátiles de plantas usando una corriente de vapor de agua en un equipo de destilación. El producto es recogido en un recipiente en baño de hielo

4. **MATERIALES**

   - Un balón de cuello redondo
   - Un tubo para liberar presión
   - Un balón de 3 cuellos
   - Un refrigerante
   - Un matraz colector en baño de hielo
   - Dos mantas calefactoras o mecheros

5. **PROCEDIMIENTO**

   a) Introducir el material vegetal en el balón de tres cuellos

   b) Armar el equipo de destilación como indica el gráfico a continuación

c) Introducir en el primer balón de agua y encender la estufa calefactora.

d) Encender la estufa que se encuentra debajo del balón de tres cuellos.

e) Encender el equipo de refrigeración que está conectado en el segundo refrigerante.

f) Recoger el destilado en un matraz de baño de hielo

g) Dejar decantar y separar las fases. Puede utilizarse un solvente orgánico para lograr una mejor recuperscion del AE y proceder a concentrar el aceite en rotavapor

## 6. REFERENCIAS

Patiño, L., Saavedra, A., & Martínez, J. (2014). Extracción por arrastre de vapor de aceite esencial del romero: Universidad Mayor Real y Pontificia de San Francisco Xavier de Chuquisaca. Obtenido de http://www.usfx.bo/nueva/Dicyt/Handbooks/Ciencias%20Tecnol%F3gicas%20y%20Agrarias_2/Ciencias%20Tecnol%F3gicas%20y%20Agrarias_Handbook_Vol%20II/PAPERS_25/art15.pdf

| ELABORADO POR | REVISADO Y APROBADO: |
|---|---|
| Anabel Marisol Carrión Lliguin | Dr. Luis Alberto Morocho Yaguana |

**Anexo 2.- Protocolo para la preparación de medio de cultivo Agar Dextrosa Sabouraud**

| | | | |
|---|---|---|---|
| **UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA**<br>**Laboratorio de Fitoquímica** | **Protocolo para la preparación de medio de cultivo Agar Dextrosa Sabouraud** | **Código:** LFQ-P-SD | |
| | | **Revisión**: 01 | **Edición:**01 |
| | | **Fecha:** 15-04-2019 | |

## 1. OBJETIVO

Prepara 1 Litro de medio de cultivo Agar Dextrosa Sabouraud.

## 2. ALCANCE

Docentes y estudiantes de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Facultad de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja.

## 3. FUNDAMENTO

Se trata de un medio de cultivo enriquecido que contiene caseína y tejido animal digeridos suplementados con glucosa; se han desarrollado diversas fórmulas, aunque la mayor parte de los micólogos utilizan la que tiene baja concentración de glucosa y un pH neutro. Al reducir el pH y añadir antibióticos para inhibir las bacterias, este medio de cultivo puede ser selectivo para hongos.

## 4. MATERIALES Y REACTIVOS

- Equipo de protección personal
- 65 g de Agar Dextrosa Sabouraud
- 1000 ml de agua destilada
- Cabina de seguridad biológica
- Incubadora
- Balanza analítica

- 2 Probetas de 100 mL estériles
- Matraz de 1000 ml estéril
- Cajas Petri de 90 mm
- Mechero

**5. PROCEDIMIENTO**

a) Adecuar el lugar de trabajo para la preparación del medio de cultivo:

b) En una luna de reloj pesar 65 g de agar, luego introducir el polvo en el matraz Elenmeyer de 1000 ml

c) Añadir en el matraz 200 ml de agua destilada con la ayuda de una probeta y colocar un tapón de gasa

d) Calentar hasta la disolución total del agar. Puede ser necesaria la ebullición

e) Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121° C

f) Dejar enfriar hasta aproximadamente 50 ° C y distribuir en las cajas Petri dentro de la cámara de flujo laminar a razón de 20 ml con ayuda de una probeta.

g) Dejar solidificar las cajas sobre una superficie horizontal

h) Invertir las cajas y almacenar en refrigeración a 8 ° C

i) Realizar un control de calidad colocando el 5% de las cajas elaboradas en la incubadora a 35° C durante 48 horas. Si aparecen contaminantes en el medio se deber realizar un nuevo lote.

| ELABORADO POR: | REVISADO Y APROBADO : |
|---|---|
| Anabel Marisol Carrión Lliguin | Dr. Luis Morocho Yaguana |

**Anexo 3.- Protocolo para la preparación de medio Muller Hinton enriquecido con glucosa y azul de metileno**

| | | | |
|---|---|---|---|
| **UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA**<br>**Laboratorio de Fitoquímica** | **Protocolo para la preparación de medio Muller Hinton enriquecido con glucosa y azul de metileno** | **Código:** LFQ-P-SD | |
| | | **Revisión:** 01 | **Edición:**01 |
| | | **Fecha:** 15-04-2019 | |

1. **OBJETIVO**

Preparar 1 litro de agar Muller Hinton enriquecido con glucosa y azul de metileno

2. **ALCANCE**

Docentes y estudiantes de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Facultad de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja.

3. **FUNDAMENTO**

El AMH es un medio de cultivo nutritivo no selectivo que promueve el desarrollo microbiano. Por su composición, ha sido recomendado por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) para ser utilizado en forma rutinaria en la realización del antibiograma en medio sólido, debido a que presenta buena reproducibilidad lote a lote en las pruebas de sensibilidad, la mayoría de los patógenos microbianos crece satisfactoriamente. La adición de glucosa proporciona un mejor crecimiento de las levaduras y el azul de metileno aumenta la definición de los halos de inhibición.

4. **MATERIALES Y REACTIVOS**

- Equipo de protección personal
- 37 g de Agar Muller Hinton
- 50 µl de azul de metileno al 1%
- 12 g de Glucosa

- 1000 ml de Agua destilada
- Cabina de seguridad biológica
- Incubadora
- Balanza analítica
- Luna de reloj
- Pipeta de 50 µl
- 2 Probetas de 100 ml estériles
- Matraz de 1000 ml estéril
- Cajas Petri de 90 mm
- Mechero

**5. PROCEDIMIENTO**

a) Adecuar el lugar de trabajo para la preparación del medio de cultivo:

b) En una luna de reloj pesar 37 g de agar Muller Hinton, 12 g de glucosa e introducir el polvo en el matraz Elenmeyer de 1000 ml

c) Añadir en el matraz 400 ml de agua destilada con la ayuda de una probeta y colocar un tapón de gasa

d) Calentar hasta la disolución total del agar. Puede ser necesaria la ebullición

e) Añadir 50 µl de azul de metileno

f) Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121° C

g) Dejar enfriar hasta aproximadamente 50 ° C y distribuir en las cajas Petri dentro de la cámara de bioseguridad a razón de 20 ml con ayuda de una probeta.

h) Dejar solidificar las cajas sobre una superficie horizontal

i) Invertir las cajas y almacenar en refrigeración a 8 ° C

j) Realizar un control de calidad colocando el 5% de las cajas elaboradas en la incubadora a 35° C durante 48 horas. Si aparecen contaminantes en el medio se deber realizar un nuevo lote.

## 6. REFERENCIAS

Cantón, E., Martín, E., & Espinel, A. (2012). Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A. Revista Iberoamerica de Micología. Obtenido de http://www.guia.reviberoammicol.com/Capitulo18.pdf

| ELABORADO POR: | REVISADO Y APROBADO : |
|---|---|
| Anabel Marisol Carrión Lliguin | Dr. Luis Morocho Yaguana |

**Anexo 4.- Protocolo para la preparación del inóculo para levaduras**

| | | | |
|---|---|---|---|
| **UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA**<br>**Laboratorio de Fitoquímica** | **Protocolo para la preparación del inóculo para levaduras** | **Código:** LFQ-P-SD | |
| | | **Revisión:** 01 | **Edición:**01 |
| | | **Fecha:** 15-04-2019 | |

1. **OBJETIVO**

Preparar el inóculo para levaduras

2. **ALCANCE**

Docentes y estudiantes de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Facultad de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja.

3. **FUNDAMENTO**

Es la cantidad o número de microorganismos infectantes que son introducidos accidental o voluntariamente en los tejidos vivos o en medios de cultivos especiales

4. **MATERIALES Y REACTIVOS**

- Solución salina estéril
- Tubos de ensayo de 10ml
- Hisopos estériles
- Cultivos de levaduras de 24 horas

**7.** Mechero

**8.** Densitómetro McFarland

5. **PROCEDIMIENTO**

a) Adecuar el lugar de trabajo para la preparación del inóculo

- Preparar los materiales y los reactivos.

b) **Suspensión de la cepa en la solución salina**

- Seleccionar 4 ó 5 colonias bien aisladas de igual morfología de la placa de cultivo.
- Colocar de 3 a 5 ml (de acuerdo a la necesidad) de solución salina
- Utilizando un aplicador estéril, tomar de cuatro a cinco colonias de la cepa seleccionada, de forma suave y tocando solamente la punta del aplicador y suspenderlas en el tubo con solución salina.

**c) Lectura de la suspensión en el densitómetro**

Ajuste la turbidez del inóculo con solución salina hasta alcanzar la turbidez de 0,5 McFarland

## 6. REFERENCIAS

Morón, R. (2017). Evaluacion de la suceptibilidad antifúngica de tres especies de hongos causantes de queratitis. Obtenido de Universidad Peruana Cayetano Heredia: http://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/upch/1373/Evaluacion_MoronTeves_Rubith.pdf?sequence=1&isAllowed=y

| ELABORADO POR: | REVISADO Y APROBADO : |
|---|---|
| Anabel Marisol Carrión Lliguin | Dr. Luis Morocho Yaguana |

**Anexo 5.- Protocolo para la preparación del inóculo para hongos filamentosos**

| | | | |
|---|---|---|---|
| **UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA**<br>**Laboratorio de Fitoquímica** | **Protocolo para la preparación del inóculo para hongos filamentosos** | **Código:** LFQ-P-SD | |
| | | **Revisión:** 01 | **Edición:**01 |
| | | **Fecha:** 15-04-2019 | |

1. **OBJETIVO**

Preparar el inóculo para hongos filamentosos

2. **ALCANCE**

Docentes y estudiantes de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Facultad de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja.

3. **FUNDAMENTO**

Es la cantidad o número de microorganismos infectantes que son introducidos accidental o voluntariamente en los tejidos vivos o en medios de cultivos especiales

4. **MATERIALES Y REACTIVOS**

- Solución salina estéril
- Tubos de ensayo de 10 ml con tapa
- Hisopos estériles
- Cultivis frescos de hongos filamentosos de 48 horas
- Mechero
- Densitómetro McFarland
- Vórtex

## 5. PROCEDIMIENTO

a) Adecuar el lugar de trabajo para la preparación del inóculo

b) El inóculo se prepara tocando las conidias de la superficie del cultivo de 7 días de edad con un asa de siembra y se suspende en 4 ml de solución salina estéril en un tubo de vidrio estéril con tapa.

c) Se agita la suspensión resultante durante 30 segundos en un vórtex y se deja sedimentar durante 4 minutos.

d) Transferir el sobrenadante a otro tubo de vidrio estéril y agitar por 15 segundos.

e) Se procede a leer y ajustar la densidad de la suspensión de conidias y esporangiósporas a una densidad de 0,5 MacFarland

## 6. REFERENCIAS

Morón, R. (2017). Evaluacion de la suceptibilidad antifúngica de tres especies de hongos causantes de queratitis. Obtenido de Universidad Peruana Cayetano Heredia: http://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/upch/1373/Evaluacion_MoronTeves_Rubith.pdf?sequence=1&isAllowed=y

| ELABORADO POR: | REVISADO Y APROBADO : |
|---|---|
| Anabel Marisol Carrión Lliguin | Dr. Luis Morocho Yaguana |

**Anexo 6.- Protocolo para la preparación e impregnación de los discos de sensibilidad**

| | | | |
|---|---|---|---|
| **UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA**<br>**Laboratorio de Fitoquímica** | **Protocolo para la preparación e impregnación de los discos de sensibilidad** | **Código**: LFQ-P-SD | |
| | | **Revisión:** 01 | **Edición:**01 |
| | | **Fecha:** 15-04-2019 | |

1. **OBJETIVO**

Preparar e impregnar adecuadamente los discos de sensibilidad

2. **ALCANCE**

Docentes y estudiantes de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Facultad de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja.

3. **FUNDAMENTO**

Se trata de pequeños discos de papel Whatman Nº1 los cuales son impregnados con una solución de prueba o trabajo. La impregnación se realiza por absorción directa de la solución en el disco papel en condiciones acepticas.

4. **MATERIALES Y REACTIVOS**

- Solvente
- Cajas Petri de 50 mm
- Sacabocados de 6 mm
- Papel Wathman Nº 1 de 90 mm
- Solución de trabajo (solución de ensayo)
- Pipeta de 10 µl

## 5. PROCEDIMIENTO

a) Adecuar el lugar de trabajo para la preparación e impregnación de los discos

b) Con el sacabocados se cortan discos de papel Whatman Nº1 de 6 mm de diámetro

c) Se coloca los discos en las cajas Petri y se esterilizan en autoclave por 15 minutos a 121ºC. Una vez esterilizados se los lleva a la cámara de bioseguridad y se los deja por el lapso de dos horas con la lámpara ultravioleta encendida.

d) Se procede a impregnar los discos, colocando 10 µl del disolvente para el control negativo y 10 µl de la solución de trabajo para la prueba

e) Se los deja secar por el lapso de 15 minutos en la cámara de bioseguridad

f) Pueden ser refrigerados 8ºC

| ELABORADO POR: | REVISADO Y APROBADO : |
|---|---|
| Anabel Marisol Carrión Lliguin | Dr. Luis Morocho Yaguana |

**Anexo 7.- Protocolo para evaluar la actividad antimicótica por el método de difusión en discos.**

| | | | |
|---|---|---|---|
| **UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA**<br>**Laboratorio de Fitoquímica** | **Protocolo para evaluar la actividad antimicótica por el método de difusión en discos** | **Código:** LFQ-P-SD | |
| | | **Revisión:** 01 | **Edición:**01 |
| | | **Fecha:** 15-04-2019 | |

1. **OBJETIVO**

   Evaluar la actividad antimicótica de la solución de trabajo

2. **ALCANCE**

   Docentes y estudiantes de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Facultad de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja.

3. **FUNDAMENTO**

   El estudio de la sensibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos se desarrolla mediante las pruebas de sensibilidad o antibiograma, cuyo principal objetivo es evaluar en el laboratorio la respuesta de un microorganismo a uno o varios antimicrobianos, traduciendo, en una primera aproximación, su resultado como factor predictivo de la eficacia clínica. Para esta metodología se utilizarán pequeños discos de papel Whatman los cuales contienen una cantidad específica de la solución de trabajo (con posibles principios activos antimicrobianos). Se aplica los discos en una superficie del agar que ha sido recientemente inoculada con un microorganismo. El antimicrobiano difunde en el medio a partir de los discos produciendo o no una zona de inhibición a su alrededor.

4. **MATERIALES Y REACTIVOS**

- Medio de cultivo Muller Hinton suplementado

- Inóculos del microorganismo de prueba
- Hisopos estériles
- Discos impregnados con la solución de trabajo (discos prueba)
- Discos impregnados con el control negativo
- Discos comerciales para el control positivo (Nistatina de 100 µg)
- Mechero
- Pinza de disección

**5. PROCEDIMIENTO**

a) Adecuar el lugar de trabajo

b) Retirar los medios de cultivo de la refrigeradora, mantenerlos a temperatura ambiente y rotularlos.

c) Inocular el microorganismo en los medios de agar Muller Hinton enrriquecido dentro de los 15 minutos después de haber ajustado la turbidez del inoculo. Estriar toda la superficie del agar y repetir el proceso dos veces más, rotando la caja aproximadamente 60º cada vez para asegurar una distribución homogénea del inóculo. Como paso final se debe estriar el hisopo por el borde del agar.

d) Para eliminar el exceso de líquido del hisopo se lo debe rotar varias veces y presionar antes de estriar firmemente por las paredes internas del tubo, por encima del nivel del líquido.

e) Dejar la tapa entreabierta durante tres a cinco minutos, pero no más de 15 minutos, para permitir que el exceso de humedad de la superficie se elimine antes de aplicar los discos impregnados con la solución de trabajo.

f) Depositar los discos impregnados, el control positivo y el control negativo sobre la superficie inoculada del agar de manera equidistante. Cada disco debe presionarse para asegurar un contacto completo con la superficie del agar.

g) Realizar el proceso de los pasos a,b,c,d,e y f por triplicado en cajas diferentes

h) Invertir las placas e incubar a 35ºC ± 2ºC antes de que transcurran 15 minutos de haberse colocado los discos. No se debe apilar muchas cajas porque la distribución del oxígeno no sería igual.

i) Realizar la lectura de resultados después de 48 a 72 horas de incubación utsando una regla transparente y dividida en milímetros, para medir el diámetro del halo de inhibición.

j) Interpretación de los resultados. Halos de inhibición > 6mm de diámetro indicaran que el disco prueba funciona

## 6. REFERENCIAS

Agreda, S., Cueva, L., León, T., Montalvo, K., & Montaño, D. (2010). Protocolo para evaluar la actividad antimicrobiana por el método de difusión en discos. Loja.

| ELABORADO POR: | REVISADO Y APROBADO : |
|---|---|
| Anabel Marisol Carrión Lliguin | Dr. Luis Morocho Yaguana |

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA**

**FACULTAD DE LA SALUD HUMANA**

**CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO**

**Anexo 8.- Evidencias fotográficas**

**Ensayo de actividad antimicótica**

***Trichophytum rubrum***

**Descripción**

**Nº Repetición:** 1

**CP**: Nistatina (100µg)

**CN**: Acetona

**Prueba:** actividad antimicótica a 0,5 µg/disco

**Descripción:**

**Nº Repetición:** 1

**CP**: Nistatina (100µg)

**CN**: Acetona

**Prueba:** actividad antimicótica a 0,25 µg/disco

**Descripción:**

**Nº Repetición:** 1

**CP**: Nistatina (100µg)

**CN**: Acetona

**Prueba:** actividad antimicótica a 0,125 µg/disco

## *Cryptococcus neoformans*

**Descripción:**

**Nº Repetición:** 1

**CP**: Nistatina (100µg)

**CN**: Acetona

**Prueba:** actividad antimicótica a 0,5 µg/disco

**Descripción:**

**Nº Repetición:** 2

**CP**: Nistatina (100µg)

**CN**: Acetona

**Prueba:** actividad antimicótica a 0,125 µg/disco

**Descripción:**

**Nº Repetición:** 3

**CP**: Nistatina (100µg)

**CN**: Acetona

**Prueba:** actividad antimicótica a 0,25 µg/disco

## *Candida albicans*

**Descripción:**

**Nº Repetición:** 2

**CP**: Nistatina (100µg)

**CN**: Acetona

**Prueba:** actividad antimicótica a 0,5 µg/disco

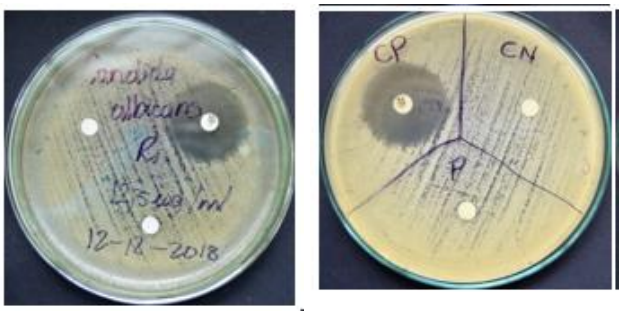
**Descripción:**

**Nº Repetición:** 2

**CP**: Nistatina (100µg)

**CN**: Acetona

**Prueba:** actividad antimicótica a 0,25 µg/disco




**Descripción:**

**Nº Repetición:** 1

**CP**: Nistatina (100µg)

**CN**: Acetona

**Prueba:** sin actividad antimicótica a 0,125µg/disco

***Aspergillus brasiliensis***

**Descripción:**

**Nº Repetición:** 1

**CP**: Nistatina (100µg)

**CN**: Acetona

**Prueba:** actividad antimicótica a 0,5 µg/disco

**Descripción:**

**Nº Repetición:** 1

**CP**: Nistatina (100µg)

**CN**: Acetona

**Prueba:** actividad antimicótica a 0,25 µg/disco

**Descripción:**

**Nº Repetición:** 3

**CP**: Nistatina (100µg)

**CN**: Acetona

**Prueba:** actividad antimicótica a 0,125 µg/disco

**Anexo 9.- Difusión de resultados**

La difusión de resultados del proyecto se realizó en el aula magna Dr. Edmundo Granda de la Facultad de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja, contando con la presencia de estudiantes y docentes de la carrera de Laboratorio Clínico.

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA**

**FACULTAD DE LA SALUD HUMANA**

**CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO**

**TEMA:** Difusión de resultados del tema: "Determinación de la actividad antimicótica del aceite esencial de *Plumbago scandens (Plumbaginaceae)* por la técnica de Kirby Bauer modificada."

**FECHA:** 24 de Abril del 2019

**REGISTRO DE ASISTENCIA: DOCENTES**

| NOMBRES Y APELLIDOS | CICLO | CÉDULA | FIRMA |
|---|---|---|---|
| Diana Montaño | Docente | 1102062054 | |
| Glenda Rodríguez | Docente | 1102055405 | |
| Ivanova Zúñiga | Docente | 1900482637 | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA**

**FACULTAD DE LA SALUD HUMANA**

**CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO**

**TEMA:** Difusión de resultados del tema: "Determinación de la actividad antimicótica del aceite esencial de *Plumbago scandens (Plumbaginaceae)* por la técnica de Kirby Bauer modificada."

**FECHA:** 24 de Abril del 2019

**REGISTRO DE ASISTENCIA: ESTUDIANTES**

| NOMBRES Y APELLIDOS | CICLO | CÉDULA | FIRMA |
|---|---|---|---|
| Miller Gabriela Ludeña Ordoñez | IV Ciclo "A" | 1150496071 | |
| Johanna Michelle Guamán Gaona | IV "A" | 1104540958 | |
| Geovel Yeral Ludeña Merino | IV "A" | 1150010906 | |
| Ana Daniela Castillo Vélez | IV "A" | 1105204489 | |
| Doris Thalía Quilova Córdova | IV "A" | 1150021507 | |
| Amy Gisellia Guamán Quizhpe | IV "A" | 1105851198 | |
| Damarys Marley Quichimbo A. | IV "A" | 1900635838 | |
| Priscila Yamile García Curipoma | IV "A" | 0705653400 | |
| Marilyn Cristina Cárdenas C. | IV "A" | 0705855583 | |
| Karla Tisseth Capa Quizhpe | IV "A" | 1150201091 | |
| Jordan Alexander Sánchez Pineda | IV "A" | 1105833238 | |
| Yulady Lizbeth Conde Comacho | IV "A" | 1150017661 | |
| Jennifer Narcisa Pérez Quezada | IV "A" | 1950003499 | |
| Kerly Sigmara Poma Saca | IV "A" | 1900886076 | |
| Joselyn Ximena Ortiz Ríofrío | IV "A" | 1106067372 | |
| Jessica María Hidalgo Simancas | IV "A" | 0706967494 | |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Thalia Lozano Minga | IV Ciclo "A" | 1900709591 | |
| Naylea Merino | IV Ciclo "A" | 1150761045 | |
| Kerly Jiménez | IV Ciclo "A" | 1900844174 | |
| Maleni Armijos | IV ciclo "A" | 1900873609 | |
| Oscar Lopez | IV " " | 1130231024 | |
| Valeria Jaramillo | II Ciclo "A" | 1104927031 | |
| Lorena Alejandra | II Ciclo | 1104677894 | |
| Victoria Cocotillo | II Ciclo | 1104722906 | |
| Claudia Alvarez | II ciclo | 1150647358 | |
| Juan Loaiza | II ciclo | 1103006389 | |
| Josselyn Yaguache | II ciclo | 1150233078 | |
| Ariana Ordóñez | II ciclo | 1150146940 | |
| Karen Sánchez | II ciclo | 1104204100 | |
| Nathaly Amay | II ciclo | 1104114911 | |
| Maholy Lalangui | II ciclo | 1150425484 | |
| Lia Palacio | II ciclo | 1106041807 | |
| Ariana Hurtado | II ciclo | 1150706842 | |
| Jahatnan Quispe | II ciclo | 1105582447 | |
| Aracely Guaman | II ciclo | 1150040360 | |
| Diana Novillo | II ciclo | 1105947301 | |
| Adriana Chonado | II ciclo | 1105912719 | |
| Javelly Eras | II ciclo | 0705607455 | |
| Sholissa Medina | II ciclo | 1106062951 | |
| Rebeca Montero | II ciclo | | |
| | | | |

## Anexo 10.- Certificado de traducción del Resumen

Lic. Yosselyn Lisbeth Carchi Viñan

1105604910

**DOCENTE DE LA UNIDAD EDUCATIVA FISCOMISIONAL "LA INMACULADA"**

**CERTIFICA:**

Que he realizado la traducción de español a ingles del articulo científico y resumen derivado de la tesis **"DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA DEL ACEITE ESENCIAL DE *PLUMBAGO SCANDENS (PLUMBAGINACEAE)* POR LA TÉCNICA DE KIRBY BAUER MODIFICADA".**

De la autoría de la Sra. Anabel Marisol Carrión Lliguin, portador de la cédula de identidad número 1105952459, egresado de la carrera de Laboratorio Clínico de la Facultad de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja, la misma que se encuentra bajo la dirección del Dr. Luis Alberto Morocho Yaguana Mg. Sc.

Es todo cuanto puedo certificar en honora la verdad facultando al interesado hacer uso del presente en lo que estime conveniente.

Loja, 16 de Mayo del 2019.

**ATENTAMENTE:**

Lic. Yosselyn Lisbeth Carchi Viñan