

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA FACULTAD DE LA SALUD HUMANA CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

Título:

Concentración Mínima Inhibitoria del extracto acuoso de *Allium sativum* en cepas de Candida albicans y Candida glabrata

Tesis previa a la obtención del título de Licenciado de Laboratorio Clínico

Autor:

Ulises Armando Gaona Paccha

Director:

Dr. Luis Alberto Morocho Yaguana, Mg. Sc.

Loja-Ecuador

2021

ii

Certificado

Dr. Luis Alberto Morocho Yaguana, Mg. Sc.

DIRECTOR DE TESIS

CERTIFICA:

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:

"Concentración Mínima Inhibitoria del extracto acuoso de Allium sativum en cepas de

Candida albicans y Candida glabrata" de autoría del Sr. Ulises Armando Gaona Paccha, previo

a la obtención del título de Licenciado 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 noviembre de 2021

Dr. Luis Alberto Morocho Yaguana, Mg. Sc

Director de Tesis

iii

Autoría

Yo, Ulises Armando Gaona Paccha con Cl. 1150209748, declaro ser autor 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.

Autor: Ulises Armando Gaona Paccha

Firma:

Cédula: 1150209748

Loja, 22 de noviembre de 2021

Carta de autorización

Yo, Ulises Armando Gaona Paccha declaro ser autor de la tesis titulada "Concentración

Mínima Inhibitoria Concentración Mínima Inhibitoria del extracto acuoso de Allium sativum

en cepas de Candida albicans y Candida glabrata.", como requisito para optar al grado de

Licenciado 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 noviembre del

dos mil veinte y uno, firma el autor.

Firma:

Autor: Ulises Armando Gaona Paccha

Cédula: 1150209748

Dirección: Parroquia Vilcabamba

Correo Electrónico: ulises.gaona@unl.edu.ec

Celular: 0980419511

DATOS COMPLEMENTARIOS

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

Tribunal de Grado:

Presidenta: Bioquím. Luisa Ivonne Celi Carrión, Mg. Sc.

Vocal: Bioquím. Daniel Humberto Riascos Jaramillo, Mg. Sc.

Vocal: Lic. Iliana Alicia Delgado, Mg. Sc.

Dedicatoria

Este trabajo se lo dedicado a la memoria de mi hermano Bismark Miguel Paccha Viñamagua, quien partió hacia los brazos de Nuestro Señor. Guárdanos un lugar en la eternidad. Te extrañaremos siempre hermanito.

Agradecimientos

A Dios, por brindarme salud, bienestar, las oportunidades y la suerte para siempre salir adelante.

A mis padres, Emiliano y Magdalena, quienes han sido un pilar fundamental en mi vida, para hoy llegar a ser quien he querido ser, gracias por el apoyo brindado en cada una de mis decisiones y pasos que he tomado.

A mi amigo, Lic. Angelito Pacheco, quien me ha ayudó durante toda mi carrera Universitaria, me ha demostrado que se puede ser un excelente profesional sin perder el sentido humano de ayudar a los demás. Gracias a usted es que he podido conseguido este pequeño éxito

Al Dr. Luis Alberto Morocho Yaguana, Mg. Sc., quien me colaboró y apoyó desde el primer día de iniciado este proyecto, por su paciencia, por su gran sentido de humanismo, consejos de maestro en las aulas de clase, por su inquebrantable ética profesional, le expreso mis más sinceros agradecimientos y gratitud.

A todos los **docentes** de la carrera de Laboratorio Clínico, que han ayudado a la formación ética y profesional de nosotros los estudiantes.

Índice

Carátulai	
Certificaciónii	
Autoríaii	i
Carta de autorizacióniv	V
Dedicatoriav	
Agradecimientov	i
Índicev	ii
1. Título	
2. Resumen	
Summary	
3. Introducción	
4. Revisión literaria	
4.1 Allium sativum8	
4.1.1 Clasificación taxonómica8	
4.1.2Composición general del Allium sativum9	
4.1.3 Composición Química9	
4.1.4 Propiedades antifúngicas1	1
4.2 Candida spp	1
4.2.1 Clasificación taxonómica1	2
4.2.2 Mecanismos de resistencia a los azoles1	2
4.2.3 Estructura morfológica de Candida spp1	3
4.3 Candida glabrata1	3
4.3.1 Patogenicidad y Virulencia1	4
4.3.2 Proteasas	5
4.3.3 Capacidad de adherencia1	5
4.3.4 Resistencia antifúngica de Candida glabrata a los azoles1	6
4.4 Candida albicans1	7
4.4.1 Patogenicidad y Virulencia1	7
4.4.2 Capacidad de adherencia	8
4.4.3 Dimorfismo	9

4.5. Anfotericina B	19
4.5.1 Mecanismo de acción	20
4.5.2 Resistencias	20
4.5.3 Efectos adversos	21
4.6 Pruebas de susceptibilidad	21
4.6.1 Dilución en agar o caldo	21
4.6.2 Concentración Mínima Inhibitoria	22
4.6.3 Difusión de disco agar	22
4.6.4 Difusión en pocillo	23
4.6.5 Estándares de Referencia	23
4.6.6 Medio de cultivo	23
4.6.7 Cultivo de Candida spp	24
4.6.8 Preparación del inóculo	24
4.6.9 Inoculación de las placas	24
4.6.10 Control de medios de cultivo	25
5. Metodología	26
5.1 Tipo de estudio	26
5.2 Área de estudio	26
5.3 Grupo de estudio	26
5.4 Universo	26
5.5 Criterios de inclusión	27
5.6 Criterios de exclusión	27
5.7 Técnica e instrumentos de recolección de datos	27
5.8 Materiales, técnicas, métodos y procedimientos	28
6. Resultados	31
7. Discusión	36
8. Conclusiones	39
9. Recomendaciones	40
10. Bibliografía	41

11. Anexos	49
Anexo 1. Protocolo de Bioseguridad para el ingreso al laboratorio	
de Fito-química	49
Anexo 2. Elaboración de extracto acuoso de Allium sativum (ajo) por	
Maceración	51
Anexo 3. Elaboración de extracto acuoso de Allium sativum (ajo)	
a través de la maceración con PBS	54
Anexo 4. Elaboración de extracto acuoso de Allium sativum (ajo) usando	
extractor	56
Anexo 5. Manejo de equipo Rotavapor	58
Anexo 6. Elaboración de agar Saboroud-Dextrosa	62
Anexo 7. Elaboración de agar Mueller Hinton	64
Anexo 8. Elaboración de caldo Infusión cerebro corazón	67
Anexo 9. Elaboración de caldo Mueller Hinton	69
Anexo 10. Elaboración de agar CHROMagar	72
Anexo 11. Impregnación de discos	74
Anexo 12. Esterilización de filtros de Membrana	77
Anexo 13. Protocolo para realizar CMI y CMF	79
Anexo 14. Cálculos para determinar las concentraciones	82
Anexos 15 Evidencias fotográficas	87
Anexo 16. Oficios emitidos	99
Anexo 17. Factura de compra de Cepa Candida glabrata	101
Anexo 18 Certificado de traducción de idioma	102

Índice de tablas

Tabla 1	Compuestos con efectos benéficos	10
Tabla 2	Compuestos sulfurados	11



2. Resumen

Existe una gran variedad de plantas que presentan propiedades antimicrobianas, entre ellos se encuentra el ajo (Allium sativum), referido, por mucho tiempo, por sus múltiples propiedades, no solo culinarias, sino también medicinales, particularmente las antimicrobianas. Este proyecto tuvo como objetivo evaluar las propiedades antimicóticas según Kirby Bauer y la concentración mínima inhibitoria por la técnica de macrodilución del extracto acuoso de la variedad "criolla" de Allium sativum contra Candida albicans y Candida glabatra. Las especies de Candida son reconocidas como los principales causantes de múltiples infecciones de la piel y sistémicas, especialmente Candida glabrata reportada mayor frecuencia. Para el extracto se tomó 100 gramos de bulbos de ajo, variedad criolla, fueron triturados en un procesador de alimentos con 40 ml de agua destilada estéril; se filtró por papel filtro y, posteriormente, fue centrifugado; con este extracto se impregnaron discos de 6 mm de diámetro de papel filtro Whatman Nº 3 y se realizó los ensayos de sensibilidad por lo técnica de Kirby Bauer. Posteriormente se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) por la técnica de macrodilución. El extracto acuoso de Allium sativum, de la variedad criolla, es activo, por la técnica de disco, contra Candida albicans y Candida glabrata a una concentración de 8 160 µg/disco, al tiempo que la CMI corresponde a una concentración de 3 187 µg/ml, la cual además presenta actividad fungicida.

PALABRAS CLAVES: Extracto acuoso, variedad criolla, macrodilución, CMI.

Sumary

There is a great variety of plants that have antimicrobial properties, among them is garlic (*Allium sativum*), referred for a long time for its multiple properties, not only culinary, but also medicinal, particularly antimicrobial. The objective of this project was to evaluate the antifungal properties according to Kirby Bauer and the minimum inhibitory concentration (MIC) by the macrodilution technique of the aqueous extract of the "creole" variety of *Allium sativum* against *Candida albicans* and *Candida glabatra*. *Candida* species are recognized as the main cause of multiple skin and systemic infections, especially *Candida glabrata* reported with increasing frequency. For the extract, 100 grams of garlic bulbs, Creole variety, were crushed in a food processor with 40 ml of sterile distilled water; it was filtered through filter paper and subsequently centrifuged; 6 mm diameter discs of Whatman No. 3 filter paper were impregnated with this extract and sensitivity tests were carried out using the Kirby Bauer technique. The aqueous extract of *Allium sativum*, of the creole variety, is active, by the disk technique, against *Candida albicans* and *Candida glabrata* at a concentration of 8 160 μg / disk, while the MIC corresponds to a concentration of 3 187 μg / ml and which is also fungicidal.

KEY WORDS: Aqueous extract, creole variety, macrodilution, MIC.

3. Introducción

El uso de plantas medicinales de manera tradicional fueron actividades cruciales a inicios de la humanidad y hasta hoy su uso se mantiene por los beneficios terapéuticos que se les atribuye. Sin ninguna duda la medicina moderna surge a partir de las prácticas de la medicina tradicional y es aquí donde sienta sus bases (Orbegoso, 2016).

Las plantas medicinales tienen su valor medicinal por la presencia, en el tejido vegetal, de diversas sustancias químicas, es decir el principio activo que produce un efecto farmacológico. Muchos de los principios activos son muy complejos poder estudiarlos y hay muchos otros que aún se desconocen su naturaleza, mientras que otros se ha tenido la suerte de poder aislarlos y purificarlos para realizar investigaciones (Lora Cahuas y col., 2010).

Una de las plantas que ha suscitado especial interés es el *Allium sativum* más conocido como "ajo" originario del Asia Central y usado en muchas partes del mundo, *Allium sativum* es una planta que puede crecer en prácticamente todo el mundo y posee diversas propiedades como: antiséptica, antibacteriana y antimicótica de amplio espectro en diversos microorganismos (Lora Cahuas et al., 2010).

De igual manera Panchi (2016), manifiesta que el ajo se utilizaba en aplicaciones culinarias y médicas, también, recalca que era muy utilizado para combatir los parásitos y prevenir epidemias; además, los egipcios lo usaban para dolores de cabeza, problemas del corazón, parásitos y tumoraciones.

Allium sativum tiene una gran variedad de compuestos que le brindan cualidades curativas como lo señala Orbegoso (2016) el compuesto organosulfurado, aliína, es el substrato principal para la enzima aliinasa, que al ser liberada de su compartimiento intracelular lo transforma en el

tiosulfonato alicina, responsable de muchas actividades biológicas y de su olor característico y picante.

(S)-3-(Alilsulfinil)-L-alanina

En *Allium sativum*, están presentes vitaminas, minerales, resaltando elementos traza, germanio y selenio; los aceite volátiles están compuestos por azufre como, disulfuro de dialilo, trisulfuro de dialilo y trisulfato de metilalilo.

En siglo XX se dio un giro total a la vida de los seres humanos puesto que se dio un gran desarrollo en la medicina, como es la aparición de la penicilina, el número de antimicrobianos descubiertos ha aumentado, al igual que el número de muertes por enfermedad infecciosa ha disminuido (C. López, 2015).

Allium sativum tiene propiedades antimicóticas, especialmente contra el género de Candida spp; estos microorganismos se aíslan frecuentemente en el laboratorio de microbiología; estos microorganismos son responsables de diversas patologías e infecciones superficiales de la boca, la vagina o la piel, que producen placas blancas o rojas y prurito, irritación o ambas (Revankar, 2019)

La especie más patógena, según Mason y col., (2012) es *Candida albicans* que se lo cataloga como un patógeno fúngico oportunista; no obstante, es miembro normal de la microbiota

del tracto gastrointestinal de los seres humanos y en las mujeres en el área genital, este microorganismo puede sobrevivir en el tracto gastrointestinal en una fase no patógena durante largos períodos de tiempo, sin provocar ningún tipo de patología, pero de presentarse alguna interrupción del sistema inmunitario del huésped o la microbiota *Candida albicans* puede diseminarse y causar infecciones potencialmente mortales.

Cruz Calle, (2015) menciona que aproximadamente el 85% a 90% de las vulvovaginitis micóticas se deben a *Candida albicans* y la incidencia de especies *no-albicans*, principalmente *Candida glabrata*, está en auge y puede ser la causa de vulvovaginitis micótica recurrente y resistente a diversos antimicóticos, es un patógeno que se encuentra en la mira de los investigadores, puesto que su incidencia y frecuencia ha incrementado en los últimos años.

Desde los años 80's y 90's, se ha venido presentado el problema de las resistencias tanto a los antibióticos como a los antimicóticos, lo cual puso en alerta a los científicos, quienes ya han empezado a buscar nuevos fármacos, tratando de evitar un retroceso en la terapia antiinfecciosa, además de la búsqueda de nuevos fármacos, desde las distintas administraciones nacionales e internacionales como la OMS se han redactado leyes, estrategias y se han propuesto campañas para concienciar a la población y contener las resistencias (C. López, 2015).

Herreras Gómez, (2018) manifiesta que algunas especies de *Candida* como *Candida* tropicalis y *Candida glabrata* presentan una mayor resistencia a los azoles; La resistencia antifúngica continúa creciendo y evolucionando a pesar de la aparición de nuevos fármacos, haciendo más complicado el manejo de los pacientes con infección fúngicas.

Se han desarrollado diversos estudios sobre el efecto que tienen las diversas especies vegetales sobre varios microorganismos, entre ellos, un estudio llevado a cabo por Espinola, (2017) en el que se determinó que precisamente el extracto acuoso de *Allium satuvum* "ajo" tiene

efecto antimicótico sobre cepas de *Candida albicans*, en esta se evidenció que ha mayores concentraciones del extracto de ajo, la actividad antimicótica sobre las cepas de *Candida. albicans* fue mucho mayor.

De igual manera el proyecto llevado a cabo por Moctezuma y col., (2016) en el que se determinó que el extracto concentrado fresco de *Allium sativum* tuvo un buen efecto antifúngico contra una gran variedad de especies de hongos como *Histoplasma capsulatum, Coccidioides immitis, Exophiala dermatitidis, Paracoccidioides brasiliensis, Cryptococcus neoformans, Candida albicans*, así como diferentes especies de *Aspergillus*.

Demostrando así que el ajo tiene efecto antimicóticos, por lo tanto en este proyecto de estudio se recalca que el ajo tiene actividad antimicótica por lo que basado en los objetivos específicos se busca determinar cuál es la Concentración mínina del extracto acuoso que inhibe el crecimiento fúngico de especies de *Candida albicans* y *Candida glabrata*, y por otro lado la obtención del extracto acuoso liofilizado.

Ante lo expuesto es necesario incursionar en la investigación en plantas medicinales como el ajo, el estudio de sus propiedades y compuestos que de cierta manera ayuden a evitar el aumento de resistencias a los antifúngicos.

8

4. Revisión Literaria

4.1 Allium sativum (Ajo)

El ajo es un bulbo que pertenece a la familia Liliaceae y subfamilia Allioideae, su género

se denomina Allium que abarca más de 300 especies de plantas; el tallo verdadero es pequeño, de

unos 3 cm de diámetro aproximadamente y 50 mm de altura, y que poseen una forma de plato y

de él brotan las hojas y las raíces (Ramírez et al., 2016).

Sus hojas están desarrolladas por una vaina y un limbo aplanado, estrecho, largo y fistuloso,

con un nervio central bien desarrollado y puntiagudo al final, de igual manera las vainas presentan

de una forma cilíndrica y llegan a constituir el falso tallo o pseudotallo corto y erecto, característico

de la planta, las hojas alcanzan un tamaño de 20 a 50 cm de longitud y de 1 a 3 cm de ancho

(Ramírez et al., 2016).

Los bulbos del ajo se han usado en muchas partes del mundo desde la antigüedad según

Panchi (2016) manifiesta que el ajo ha sido utilizado desde tiempos muy remotos en aplicaciones

gastronómicas y galenas, también que el ajo tenía usos para contrarrestar infecciones por parásitos

y para evitar epidemias en la población, de igual manera que los antiguos egipcios lo utilizaban

para los dolores de cabeza, complicaciones del corazón y tumoraciones, el ajo era muy apreciado

puesto que ellos daban a sus cautivos una ración diaria de ajo para que persistan fuertes y sanos.

4.1.1 Clasificación taxonómica

Según Hernández (2018) pone en manifiesto la siguiente clasificación taxonómica del

ajo:

Reino: Plantae.

División: Magnoliophyta.

Clase: *Liliopsida*.

9

Orden: Asparagales.

Familia: Amaryllidaceae.

Subfamilia: Allioideae.

Tribu: Allieae.

Género: Allium.

Especie: sativum.

4.1.2 Composición general del Allium sativum

El ajo tiene una gran demanda por su gran diversidad en sus compuestos y sus propiedades

nutritivas y su contenido de aminoácidos, minerales, vitaminas, ácido fólico, ácido pantoténico y

niacina, el ajo es enriquecido por algunos componentes azufrados como alicina, aliina, alil metano,

tiosulfinato, dialil disulfuro, adenosina entre otros (Carbajal, 2018).

4.1.3 Composición química

Allium sativum presenta distintas propiedades sin importar su condición, ya sea que se

encuentre crudo o cocido, si se parte o machaca, se liberará la aliína, que se transforma por efectos

de la enzima aliinasa en alicina, este último compuesto se transforma posteriormente en otros

diversos compuesto que poseen distintas propiedades biológicas, tal es el caso del ajoeno, la

vinilditina y el diallildisulfuro y dialliltrisulfuro; La fórmula química de la ailicina es:

C₉H₁₄S₃O (Martínez & Chavez, 2017).

Al ajo se le atribuyen diversas sustancias y componentes que se le atribuyen efectos

biológicos que benefician al ser humano, entre estos componentes tenemos:

Tabla 1Compuestos con efectos benéficos

Compuesto	Actividad Biológica	
Compuestos fenólicos (Allixina)	Antioxidantes, antiinflamatorios, antivirales y antibacteriano.	
Adenosina	Vasodilatador, hipotensor, miorelajante y estimula la síntesis de hormonas esteroídicas.	
Polisacáridos	Cardioprotectores, antioxidante y estimula el sistema inmunológico.	
Quercitina	Efectos benéficos contra el asma y algunas alergias.	
Saponinas	Hipotensores y antibacteriano.	

(Corrales & Reyes, 2014)

No obstante, los compuestos del ajo que se denominan clave para el beneficio de la salud son los componentes sulfurados o azufrados (Corrales & Reyes, 2014).

Tabla 2Compuestos sulfurados y su actividad biológica

Características	Compuesto	Actividades biológicas
Solubles en agua	S-alil-cisteína S-alil-mercaptocisteína S-metilcisteína Y-glutamil-cistéina	Hipocolesterolemiantes, antioxidantes, quimioprotectores frente al cáncer. Favorecen la acción desintoxicante del hígado frente a sustnacias químicas
Solubles en aceite	Sulfuro dialílico Disulfuro dialilico (dialil disulfuro) Alicina (oxido de disulfuro dialílico) Trisulfuro dialílico Trisulfuro alimetílico Aliína Ditiínas Viniloditiínas Ajoeno	Antibiótico, antifúngico, antiviral Desintoxicante Anticancerígeno, previene daños químicos del ADN Hipocolesterolemiantes, previene la arterosclerosis, antitumoral. Hipotensora, Hipoglucemiante Antiinflamatorio, vasolidalatador, hipotensor, antibiótico

(Corrales & Reyes, 2014)

4.1.4 Propiedades antifúngicas

El ajo presenta efectos fungicidas contra una amplia gama agentes micóticos que muchos se los consideran como patógenos para el ser humano, se incluye los géneros de *Candida spp*, *Torulopsis*, *Trichophyton verrucosum*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *Botrytis cinérea*, *Cryptococcus*, *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Rhizopus stolonifera*, *Microsporum gypseum*, *M. audouinii*, *Alternaria alternate*, *Neofabraea alba y Penicillium expansum*, *Trichosporon y Rhodotorula*, también se ha descubierto que el extracto de ajo inhibe el crecimiento del microorganismo *Meyerozyma guilliermondii* (Beshbishy et al., 2020).

El extracto de ajo actúa al afectar la pared celular de los hongos y provocar modificaciones estructurales irreversibles en las células de los agentes micóticos, esto provoca que se pierda la integridad estructural y afecta su capacidad de germinación, a la vez estos cambios en el citoplasma induce daños en el núcleo y los orgánulos celulares que provocan la muerte celular (Beshbishy et al., 2020).

4.2 Candida spp

Dentro del género *Candida* se incluyen las levaduras que constituyen parte de la microbiota normal humana del tracto digestivo, la piel y también en el caso de mujeres en la vagina, y del cual emergen varias especies como patógenos oportunistas que se ven implicados en infecciones superficiales y sistémicas, que comprenden candidiasis orofaríngea, ocular, cutánea, genital, esofágica, gastrointestinal, mucocutánea crónica y diseminada, principalmente en aquellas personas con inmunosupresión asociada a trasplante de órganos, quimioterapia, VIH, diabetes, personas de avanzada edad o aquellos pacientes que se encuentran con tratamiento antimicrobianos, de igual manera las infecciones por *Candida spp* pueden ser causantes de una enorme mortalidad y morbilidad, se estima que el 95 % de todas las infecciones candidósicas son

12

producidas por cuatro especies: Candida albicans, Candida glabrata, Candida parapsilosis y

Candida tropicalis, esto se presenta cuando la relación simbiótica entre el huésped y el

microorganismo se ve afectada dando lugar a infecciones (Muñoz, 2015; Suárez Álvarez et al.,

2016).

4.2.1 Clasificación taxonómica

La taxonomía de *Candida spp* según Vallejo Salazar, (2018) es la siguiente:

División: Deuteromycota

Clase: *Blastomycetes*

Familia: *Cryptococcaceae*

Género: Candida

Especie: albicans, glabrata, krusei, etc.

4.2.2 Mecanismos de resistencia a los azoles

El uso muy generalizado y frecuente de los azoles, en especial de fluconazol, el cual es el

medicamento de elección como tratamiento y profilaxis de las micosis, ha producido la aparición

de casos de resistencia a este conjunto de antimicóticos. La resistencia a los azoles del género

Candida se debe a los siguientes mecanismos según Tapia & Chacha, (2015):

Alteración de la cantidad o la estructura de las enzimas diana.

Reducción del acceso del fármaco a su diana o alguna combinación de ambos mecanismos.

También se presentan mutaciones en los genes que codifican la enzima diana (ERG11),

lanosterol 14-αdesmetilasa, generan una diana modificada con una menor afinidad por los azoles.

La sobreexpresión de ERG11 origina grandiosas cantidades de la enzima diana, por lo que

su inactivación demanda la presencia de más moléculas del fármaco en el interior de la célula. Estos diversos mecanismos pueden actuar de forma independiente, secuencial y simultánea y originar cepas de *Candida* con niveles muchos mayores de resistencia a los azoles (Tapia & Chacha, 2015).

4.2.3 Estructura morfológica de Candida spp

El género *Candida spp* posee una pared celular compuesta básicamente por polisacáridos, proteínas y lípidos, y tiene la función primordial de proteger al microorganismo principalmente de la pérdida osmótica, a la vez le permite relacionar con el medio externo, ayuda al crecimiento celular, permite la adhesión al hospedero, produce rigidez, y lo más importante ayuda a este microorganismo a la formación de biofilms (Cárdenas Parra & Perez Cárdenas, 2020).

Se describe a continuación los componentes principales tales como la pared y de la membrana celular de los hongos, puesto que estos son calificados como dianas farmacológicas:

Pared celular: el glucano es el principal polisacárido constitutivo de la pared y es el responsable de la rigidez de dicha estructura. Compuesto también por polisacáridos como es la manosa, la cual determina la porosidad de la pared y reconoce receptores en las células del hospedero y es fundamental en el proceso de adhesión

Membrana celular: el ergosterol es el principal esterol de la bicapa lipídica de la membrana, esencial para brindarle integridad y funcionalidad (Cárdenas Parra & Perez Cárdenas, 2020).

4.3 Candida glabrata

Es un ascomiceto haploide que pertenece al género *Candida*, sus células son mucho más pequeñas con relación a las células de *Candida albicans*; *Candida glabrata* integra la microbiota comensal, razón principal para no considerarla como patógena, sin embargo, la frecuencia de

infecciones superficiales y profundas provocadas por este microorganismo ha ido aumentado significativamente en los últimos años, por lo que actualmente se lo considera un patógeno oportunista emergente (Alcalá et al., 2015).

A esta especie de *Candida* se la considera como responsable de infecciones en las mucosas y e infecciones sistémicas, principalmente en pacientes inmunodeprimidos, hospitalizados en UCI y postquirúrgica (Alcalá et al., 2015).

Candida glabrata es la segunda especie más frecuente aislada después de Candida albicans y representa un porcentaje de frecuencia relevante en las candidemias. Esta incidencia se asocia en parte, a la alta resistencia innata a los fármacos antifúngicos actualmente disponibles (Alcalá et al., 2015)

Según Espinosa, (2017) aduce que las tasas de mortalidad son mucho más elevadas en infecciones ocasionadas por *Candida glabrata* que en infecciones provocadas por *Candida albicans*, puesto que se sabe puede establecerse en diversos nichos del hospedero.

4.3.1 Patogenicidad y Virulencia

Según C. Tapia, (2008) manifiesta que *Candida glabrata* produce proteinasas y presenta hidrofobicidad en su superficie celular, similar a *Candida albicans*, lo que facilita su adherencia a las células del hospedero, su alta mortalidad asociada a infecciones por esta levadura y su prevalencia afirman la idea que este microorganismo fúngico si es patógeno.

Un aspecto importante que se relaciona con la virulencia de este hongo es la ausencia de pseudohifas, esto siembra la duda que *Candida glabrata* es menos virulenta que otras especies de *Candida spp*; no obstante, diversos estudios manifiestan una alta capacidad de diseminarse, capacidad de producir biopelículas, su adaptación al medio ácido de los fagolisosomas y supervivencia fagolisomal, este microorganismo adquiere cambios morfológicos en sus colonias, regulación y expresión de las familias de las adhesinas asociadas a la pared celular las GPI aspartil

proteasas ancladas, de igual manera, la producción de pigmentos derivados del indol y su inherente resistencia azoles, por lo tanto, las infecciones causadas por *Candida glabrata* son difíciles de erradicar y se asocian con una mortalidad significativa (Cárdenas Parra & Perez Cárdenas, 2020; Espinosa, 2017; Muñoz, 2015).

La virulencia de este microorganismo sólo se expresa bajo ciertas condiciones, por ejemplo en pacientes diabéticos, debido a los altos contenidos de glucosa benefician la colonización del tracto genital, vale recalcar que las especies que interactúan regularmente con el huésped, como comensales, se estima que la selección actúa para disminuir la virulencia en condiciones estándar, puesto que la estabilidad del hospedero está vinculada a la supervivencia del comensal (Gabaldón & Carreté, 2016; Miró et al., 2017).

4.3.2 Proteasas

Las proteasas tienen un rol fundamental en la degradación de los componentes de la mucosa como por ejemplo el colágeno, queratina, muscina, así como de componentes inmunes como las citoquinas, anticuerpos, facilitando la invasión de los tejidos del huésped. La adherencia a las células del hospedero es estimada como un factor dominante en la virulencia de muchos microorganismos micóticos (Muñoz, 2015).

4.3.3 Capacidad de adherencia

En un estudio realizado por Pelaez, (2018), describió varias familias de proteínas de pared celular entre ellas tenemos la familia Epa "epitelial adhesins" que codifican proteínas de pared celular tipo lectinas puesto que reconocen ligandos que contienen residuos de galactosa gracias a su dominio PA14 en el extremo N-terminal, pues esta familia ha sido bien estudiada y se ha visto que Epa1, Epa6 y Epa7 median la adherencia *in vitro* a células epiteliales y endoteliales, lo cual es muy importante debido a que facilita el comienzo de la infección de este patógeno.

4.3.4 Resistencia antifúngica de Candida glabrata a los azoles

El desarrollo de resistencias antifúngicas es un proceso complicado, que involucra al huésped, a los antimicóticos y a los factores microbianos, dando así un resultado fallido en el tratamiento, entre las causas más comunes para el desarrollo de resistencias es una administración muy prolongada del fármaco y su respectivo uso como profilaxis, no obstante para *Candida glabrata* se ha explicado que en periodos cortos de tiempo o luego de haber iniciado el tratamiento es suficiente para que se dé la aparición de resistencia en pacientes hospitalizados (Bordallo Cardona, 2019).

El uso excesivo y generalizado de los azoles entre ellos el fluconazol, ya sea en profilaxis como en tratamiento, ha inducido un incremento de la resistencia a estos antimicóticos, de cierta manera, esto resulta alarmante, puesto que el fluconazol es un medicamento económico y nuestro organismo lo tolera de manera positiva y se lo administra mediante vía oral (Bordallo Cardona, 2019).

Diversos estudios llevados a cabo por autores estadounidenses han demostrado que la resistencia a fluconazol en *Candida glabrata* en los últimos años ha incrementado puesto que entre los años 2001 a 2010 se ha notado una resistencia del 18% al 30%, de igual manera, se ha manifestado que en ciertos países como Estados Unidos de América y Bélgica la resistencia a los azoles en *Candida glabrata* teniendo en cuenta tanto aislados de sangre como de otros sitios anatómicos, fue del 7% al 10% (Bordallo Cardona, 2019; Castanheira et al., 2017). Se han definido cuatro mecanismos diferentes relacionados con la resistencia a medicamentos azólicos en *Candida spp.*, en la que se incluye *Candida glabrata* estos según Orta, (2014) se clasifican en: sobreproducción de bombas que expulsan el fármaco, mutaciones en ERG11 que disminuyen su inhibición por fluconazol, sobreexpresión de ERG11, generación de vías alternas que compensen la ausencia de ERG11134 y la sustitución del ergosterol por el colesterol del hospedero.

En *Candida glabrata* el mecanismo primario y más observado en la clínica es la inducción de transportadores que expulsan al fluconazol de la célula. La sobreexpresión de genes que codifican para los transportadores que tienen un sitio de unión a ATP (ABC), como CDR1, CDR2 (PDH1) y SNQ2. Los transportadores ABC se han asociado con la resistencia de *Candida glabrata* al fluconazol, tanto en cepas de laboratorio como en aislados clínicos (Orta, 2014).

4.4 Candida albicans

Candida albicans se lo define como un hongo oportunista en el entorno de cualquier organismo vivo, es un modulador de pH en el biofilms y uno de sus hábitats es la cavidad oral de los seres humanos (Abanto & Valverde, 2018).

Candida albicans coloniza de modo asintomático numerosas partes del cuerpo humano, pero en individuos inmunocomprometidos puede ser considerado como un patógeno oportunista, este microorganismo es capaz de causar infecciones superficiales y sistémicas. Es un agente fúngico aerobio que se reproduce asexualmente por gemación; la transición de levadura a hifa es importante para desarrollar su patogenicidad, las hifas se reproducen al invadir los tejidos, existen numerosos estímulos ambientales que desencadenan o bloquean su conversión; por ejemplo, en un pH bajo ácido de 6 este microorganismo crece en forma de levadura, mientras que en un pH alto superior a 7 crece en forma de pseudohifa (Abanto & Valverde, 2018).

4.4.1 Patogenicidad y Virulencia

Según Calcina, (2017) afirma que *Candida albicans* muestra factores de patogenicidad que admiten y facilitan la colonización y la infección del hospedador con más periodicidad de lo que ocurre con otras especies de *Candida*, se ha determinado que las especies del género *Candida* conforman el grupo más significativo de agentes micóticos patógenos oportunistas, por lo tanto la frecuencia de infección por *Candida* se ha acrecentado a un ritmo constante en hospitales y en todos los grupos de edades.

El mecanismo de acción de este microorganismo se da por tres mecanismos principales:

Invasión y proliferación en los tejidos, con la producción de una respuesta inmune específica frente a los antígenos fúngicos.

Liberación de toxinas.

Sensibilización con desarrollo de una respuesta alérgica (Calcina, 2017).

En Candida albicans existen genes estimulados por la galactosa que se denominan genes GAL quienes pueden estar relacionados en un incremento de la virulencia de este agente micótico, puesto que niveles bajos de galactosa son una señal para Candida albicans para que pueda desencadenar una respuesta general que envuelve tanto el metabolismo de la galactosa como la inducción de propiedades de virulencia, por otra parte, también podemos mencionar que βglucano es un polisacárido y componente primordial en la estructura de la pared celular de los hogos, la pared celular es fundamental para la conversión de levadura a pseudohifa y le permite a Candida albicans invadir los tejidos humanos y evadir el sistema inmune (Cruz et al., 2017). Algo similar manifiesta Turcot et al., (2016) que aduce que dentro de los factores de virulencia está la formación de pseudomicelios, el reconocimiento de moléculas de superficie, la capacidad de adhesión, coagregación y la secreción de enzimas líticas.

4.4.2 Capacidad de adherencia

Posee diversas manoproteínas de las células micóticas, la quitina y adhesinas tipo fimbrias, unos instauran uniones de carácter físico químico que aproximan el agente patógeno a la superficie del hospedero, por ejemplo, la hidrofobisidad, esto se manifiesta por la presencia de la proteína Csh1p y otro que involucra la presencia de adhesinas y receptores en el sustrato beneficiando la formación de biopelículas (Abanto & Valverde, 2018).

4.4.3 Dimorfismo

Candida albicans posee la característica principal de cambiar de forma de acuerdo a la temperatura en que se encuentre, por lo que puede exhibir forma de levadura o forma filamentosa como pseudohifas, por lo tanto, esto significa que este cambio es el factor de virulencia más importante de esta levadura puesto que su forma de levadura se muestra para colonizar a los sujetos y su forma de pseudohifa se presenta para invadir tejidos (Rosales, 2019). Mencionado anteriormente el dimorfismo es el transcurso por la cual las levaduras experimentan un cambio de estructuras que afecta la célula convirtiéndolo en filamento miceliar, la formación de este psuedomicelio se relaciona con la virulencia debido a tres observaciones:

La filamentación se induce a 37°C en presencia de suero y pH neutro.

Se ha demostrado que los filamentos son más adherentes a las células de mamíferos que las levaduras.

Las levaduras fagocitadas por filamentos producen la lisis de dichos macrófagos (Abanto & Valverde, 2018).

4.5 Anfotericina b

La anfotericina B un antibiótico y antifúngico, determinado como un macrólido es producido por el microorganismo *Streptomyces nodosus*, este antimicrobiano puede tener acción fungostática o fungicida, dependiendo de la sensibilidad del hongo y de la concentración que el fármaco alcance en el lugar de la infección (Fernández, 2016).

Presenta buena actividad in vitro contra gran variedades de hongos filamentosos, Candida spp y Aspergillus spp, en la actualidad se ha desarrollado anfotericinas asociadas a lípidos que tienen el mismo espectro in vitro que la anfotericina B (Gerencia Operativa de Evaluación y Planificación de Medicamentos et al., 2016).

4.5.1 Mecanismo de acción

La anfotericina B presenta su mecanismo de acción por medio de su unión al ergosterol parte fundamental de los microorganismos fúngicos (Rivera-Toledo, E; Jiménez-Delgadillo, AU; Manzano-Gayosso, 2020). Según Fernández, (2016) manifiesta que esta unión produce una alteración de la estructura de membrana, despolarizándola y modificando la permeabilidad de iones Na⁺, K⁺ y H⁺, además de la pérdida de glúcidos y proteínas, con acción letal sobre la célula. De igual manera manifiestan Rivera-Toledo, E; Jiménez-Delgadillo, AU; Manzano-Gayosso, (2020) que el ergosterol posee un papel fundamental para la membrana fúngica, puesto que esta regulariza diversas actividades fisiológicas, como la fusión homotípica de vacuolas, la endocitosis y la señalización mediada por receptores de membrana. No obstante, la anfotericina B también puede producir daños en células humanas, al compartir mecanismos comunes con las células fúngicas; por ejemplo, es sabido que dicho fármaco es nefrotóxico. La anfotericina B produce una acción estimulante de células del sistema inmune

Esto se produce si hay aumento de H₂O₂, formando radicales libres o aumento de la permeabilidad de la membrana, contribuyendo a sus propiedades antifúngicas. Es el fármaco de elección en la mayoría de las infecciones sistémicas por hongos y tiene el mayor espectro de acción antifúngica conocido (Fernández, 2016).

4.5.2 Resistencias

La resistencia frente a este antimicrobiano no se ha reportado con gran frecuencia como ocurre con el fluconazol, pero se ha detectado este evento en algunos aislados de infecciones por *Pseudallescheria boydii, Aspergillus terreus, Candida lusitaniae, Candida guilliermondii, Fusarium spp. y Trichosporon spp* (Rivera-Toledo, E; Jiménez-Delgadillo, AU; Manzano-Gayosso, 2020).

4.5.3 Efectos adversos

Se ha reportado efectos adversos que se relacionan principalmente con la nefrotoxicidad que es el efecto más adverso puesto que se relaciona con una mayor morbimortalidad, puesto que puede requerir hemodiálisis, también puede presentar otros síntomas como escalofríos, fiebre, náuseas, vómitos, flebitis, dolores generalizados, convulsiones y cefaleas. (Gerencia Operativa de Evaluación y Planificación de Medicamentos et al., 2016).

La definición de nefrotoxicidad asociada al uso de anfotericina B, difiere entre distintos autores e incluye: un aumento de la creatininemia de 0,4 mg/dl, un incremento de la creatinina al doble de su valor basal, un incremento al doble del valor basal y que supera los 1,2 mg/dl y un aumento de más del 20 % de la depuración de creatinina (Gerencia Operativa de Evaluación y Planificación de Medicamentos et al., 2016; Rivera-Toledo, E; Jiménez-Delgadillo, AU; Manzano-Gayosso, 2020).

4.6 Pruebas de susceptibilidad

El estudio de la sensibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos se lo efectúa por medio de pruebas de sensibilidad o antibiograma, en la que se busca determinar la respuesta de un microorganismo a uno o varios antimicrobianos; las pruebas que se utiliza para poder determinar resistencia o sensibilidad se clasifican en cuantitativas que son aquellas pruebas que se puede determinar la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima letal, y cualitativas, aquellas que se las puede determinar a través de difusión de disco (Estevez Posadas, 2017).

4.6.1 Dilución en agar o caldo

Este proceso se puede realizar en macroescala, utilizando tubos, o en microescala, usando microplacas de 96 pocillos. La determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

permite medir la actividad antimicótica siendo esta la primordial ventaja de los métodos de dilución puesto que estos valores cuantitativos se pueden usar junto con la farmacocinética del antimicrobiano, para calcular índices terapéuticos (Carrión, 2019).

4.6.2 Concentración Mínima Inhibitoria

La CMI es la concentración mínima o más baja de un antibiótico o antimicótico que inhibe el crecimiento de los microorganismos después de su incubación el cual se recomienda una etapa de 24 horas a 37°C. La CIM se la considera como el examen "gold Standard" frente a diversas técnicas que ayudan a evaluar la susceptibilidad antimicrobiana, la CMI es trascendental en diagnósticos de laboratorio para reafirmar la resistencia de microorganismos ante un antimicrobiano y conjuntamente para monitorizar la acción de los nuevos agentes antimicrobianos. La CIM sigue directrices de centros de referencia tales como el CLSI (Clinical Laboratory Institute Standards), BSAC (British Society for Antimicrobial Chemotherapy) o EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) (M. López, 2016). La determinación de la CMI puede servir para puede ser útil para concretar el tipo de antimicrobianos a utilizar, a la vez que reduce la oportunidad de resistencia microbiana a agentes antimicrobianos específicos (M. López, 2016).

4.6.3 Difusión de disco en agar

Este método presenta la ventaja primordial que se puede dar a un bajo costo junto con la simplicidad de la técnica que incluye la ejecución, la lectura de resultados y en ciertas ocasiones su interpretación (Carrión, 2019).

Este método se fundamenta en establecer de forma cualitativa el efecto que produce una sustancia o un conjunto de sustancias sobre una cepa microbiana, es decir, se basa en la relación entre la concentración de una sustancia que es impregnada sobre papel filtro de 6mm para inhibir

una cepa microbiológica obteniendo como resultado halos de inhibición en la superficie de una placa de agar con un medio de cultivo como agar Mueller-Hinton con un sembrado homogéneo del microorganismo a estudiar, pasadas 18 a 24 horas de incubación se puede realizar la lectura de resultados (Revankar, 2019).

4.6.4 Difusión en pocillo

Se realiza una escala Mc Farland al 0,5 del microorganismo a estudiar, luego se inocula en un agar Mueller-Hinton estriándose el hisopo en forma paralela y perpendicular, rotando la caja 60° en más de dos ocasiones, luego se deja reposar unos 5 minutos antes de realizar los pozos con la cuchareta sacabocados de 6 mm, se vierte en cada pocillo una cierta cantidad de la sustancia a ensayar dejando en reposo por un tiempo de 30 minutos, para luego dejar incubar a 37°C por 24 horas, posterior a esto se realiza la lectura (Vayas, 2017).

4.6.5 Estándares de Referencia

El Instituto de Estándares Clínicos de Laboratorio, Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), elaboró "Estándares de Referencia" que detallan los parámetros experimentales para la adecuada ejecución de ambos métodos para conseguir una mayor exactitud, precisión y reproducibilidad de los resultados (Vayas, 2017).

4.6.6 Medio de cultivo

La prueba principal para un diagnóstico definitivo, en la mayoría de los casos es el cultivo, pues permite establecer género y especie de los microorganismos, entre los más usados se destaca el agar glucosado Sabouraud que permite el crecimiento fúngico general de levaduras y hongos filamentosos, de igual manera se recomienda para las micosis sistémicas el agar infusión cerebrocorazón, también se destaca el uso del medio CHROMagarCandid que se lo utiliza para la identificación del hongo basado principalmente en el color sus colonias, por ejemplo, permite

visualizar de forma rápida las colonias pertenecientes a *Candida albicans* y a otras especies de levaduras como *Candida. tropicalis*, *Candida lusitaniae* y *Candida guilliermondii*, *Candida glabrata*, *Candida dubliniensis*, *Candida krussei*, *etc*, (Morales & Cardona-Castro, 2018).

4.6.7 Cultivo de Candida spp

El cultivo de especies de *Candida spp* por lo general según Iza Chiluisa, (2017) las colonias desarrolla una forma principalmente redondas, colonias lisas, suaves, húmedas, brillantes, de aspecto cremoso y consistencia blanda con un color característico blanco o levemente beige, estas colonias surgen como pequeñas dentro de las 24 y 36 horas en agar Saboroud Dextrosa. En los medios diferenciales de CHROMagar la especie de *Candida albicans* según Churata, (2016) sus colonias son de tamaño mediano, húmedas, cremosas que tienen un olor dulzón que adopta una espectro verdeesmeralda. Entre tanto según Iza Chiluisa, (2017) las colonias de *Candida glabrata* crecen como colonias redondas, lisas, brillantes, abultadas con bordes regulares y poseen un color malva obscuro.

4.7.8 Preparación del inóculo

Se realiza a partir de un cultivo de 24 horas, en Agar Sabouraud dextrosa a 35 (± 2° C). Se toma de este cultivo, dos o cuatro colonias y se suspenden en 5 ml de solución salina estéril. Se realiza una homogenización durante 15 segundos, para obtener una suspensión de 0,5 de la escala McFarland lo que equivalen a 5 x 106 UFC (Carrión, 2019).

4.6.9 Inoculación de las placas

Según manifiesta Carrión, (2019) 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 por 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 60°, de forma que se segure la distribución uniforme del inóculo (Carrión, 2019).

4.6.10 Control de medios de cultivo.

El control de calidad que se realiza a los medios de cultivo, garantiza que los medios no estén afectados o contaminados y que estos permitan el correcto desarrollo de microorganismos deseados. A los medios de cultivo que se dispone en el laboratorio, se debe realizar una valoración a cada lote antes de su uso diario, se debe considerar ciertas características tales como la apariencia, aspecto, dureza, profundidad del agar, pH, la selectividad y su vida útil (G. Morales et al., 2017). Según G. Morales et al., (2017) se debe evaluar la esterilidad del medio de cultivo tomando un 5% de los medios preparados, estos se escogen al azar y se incuban a 35 °C de 24 a 48 horas, en caso que haya contaminación se debe rechazar todo el lote, a la vez, estos deben etiquetarse con el número de lote, fecha de caducidad, método de esterilización utilizado y la cantidad de medio realizado en este lote.

5. Metodología

5.1 Tipo de estudio:

El presente trabajo de investigación es de tipo experimental, en el que se determinó el efecto antimicótico del extracto acuoso de *Allium sativum* y su CMI en cepas ATCC de *Candida albicans* (26790) y *Candida glabrata* (66032).

5.2 Área de estudio:

El estudio se llevó a cabo en la ciudad de Loja, en los Laboratorios de Fito-química de la Universidad Nacional de Loja, que se encuentra ubicado en el Barrio La Argelia, Parroquia Punzara que se encuentra al Sur de la Ciudad de Loja- Ecuador, en el periodo comprendido entre Abril a Septiembre de 2021.

5.3 Grupo de estudio:

Solución de extracto acuoso de Allium sativum.

5.4 Universo:

Extracto acuoso de Allium sativum.

5.5 Criterios de inclusión

Soluciones translúcidas de extracto de *Allium sativum*.

Cultivos puros de cepas ATCC de Candida albicans (26790) y Candida glabrata (66032).

5.6 Criterios de exclusión

Cultivo contaminados.

Extracto contaminado.

Extractos sin refrigeración y largo periodo en desuso.

5.7 Técnica e instrumentos de recolección de datos

Cámara fotográfica

Cuaderno de registro

5.8 Materiales y Métodos:

Para llevar a cabo este proyecto de investigación se utilizó equipos y materiales tales como: centrífuga, cámara de bioseguridad, incubadora, equipo liofilizador, extractor, refrigeradora, densitómetro, balanza, pipetas, puntas de 100 μl y 1000 μl, probetas, gasas, papel filtro, tubos de vidrio, tubos Falcon, matraces, gradillas, cajas Petri, hisopos, pinzas, embudo de cristal, discos de papel Whatman N°3 con diámetro de 6 mm, rejillas de plástico, mechero, encendedor.

Se utilizó agar Saboroud-Dextrosa para mantener las cepas viables, agar CHROMOagar para su identificación fenotípica, caldo infusión cerebro corazón (BHI) para la reactivación de cepas y caldo Mueller Hinton para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria de la marca BD. Se hizo la adquisición de la cepa ATCC de *Candida glabrata* 66032 y se reactivó la cepa ATCC de *Candida albicans* 26790.

Fase preanalítica

Materia prima

Los bulbos de ajo se los obtuvo por compra en el mercado de abasto Centro Comercial, ubicado zona céntrica de la ciudad de Loja. El ajo (*Allium sativum*) que se adquirió se lo denomina "ajo criollo" o "morado autóctono".

Preparación y desinfección de la materia prima (droga)

La droga fresca fue pelada y descubierta de sus dos capas, se procedió a lavarla y desinfectarla con solución de hipoclorito de sodio al 0,02 % y agua destilada, seguidamente se dejó secar a temperatura ambiente para ser procesada inmediatamente.

Fase analítica

Preparación de Extracto de Allium sativum.

Al iniciar este proyecto se consideró realizar una maceración, concentración y liofilización, al no observar actividad antimicótica se optó por cambiar de metodología realizando una maceración con buffer fosfato salino (PBS). De igual manera no se comprobó la actividad antimicótica del ajo, los protocolos y evidencias se verifican en anexos (2), (3) y (15). En otra variante de procedimiento se utilizó 100 gramos de bulbos desinfectados, se trituraron en un procesador de alimentos aséptico, lo obtenido fue recolectado en un matraz y se le añadió 40 ml de agua destilada, se homogenizó por dos minutos, luego se trasvasó a tubos Falcon estériles para su centrifugación a 3000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante fue filtrado con papel filtro y trasvasado a un recipiente de vidrio, posteriormente fue liofilizado a -80 °C por 6 horas y se

obtuvo 3.07 gramos a partir de 15 mililitros de sobrenadante. El liofilizado fue conservado en refrigeración.

Microorganismos

Los liofilizados de *Candida albicans ATCC* 26790 y *Candida glabrata* ATCC (66032) fueron viabilizados en caldo Infusión Cerebro Corazón e incubamos durante 24 horas a 37°C, posteriormente se inocularon cajas Petri con agar Saboroud Dextrosa e incubadas por 24 horas a 37°C. Para la identificación fenotípica se realizó una tinción de Gram y siembra en CHROMOagar.

Determinación de sensibilidad según la técnica de Kirby Bauer

Según ensayos piloto, se decidió realizar la validación de la actividad solamente con extracto acuoso recién elaborado y, para establecer la concentración del extracto preparado, una muestra fue liofilizada estableciéndose que 1 ml de extracto contiene 0,204 g de extracto seco. La validación de la actividad de los extractos se realizó según la técnica de Kirby Bauer. Para ello se esterilizó el extracto fresco por filtración con filtros de jeringuilla de 0,22 μm x 30 mm de diámetro. Con 40 μL del filtrado se impregnaron discos de papel filtro Whatman N° 3 de 6 mm de diámetro, se dejó reposar por 10 minutos y luego fueron colocados en placas de agar Mueller Hinton previamente inoculadas con una suspensión *Candida albican* y *Candida glabrata* en solución salina y conforme al patrón 0,5 de MacFarland. En cada placa se colocaron también disco de control positivo con anfotericina B de 10 μg/disco y controles negativos con disco de papel Whatman N° 3 impregnados con agua destilada estéril. La placas fueron incubadas a 37 °C por 24 horas. Se consideró como halo de inhibición las zonas sin crecimiento evidente alrededor de los disco de sensibilidad y la medición se realizó con un calibrador (pie de Rey)

Concentración Mínima Inhibitoria

La determinación de la CMI se realizó por la técnica de macrodilución; para lo cual se preparó un banco de diluciones de 6 tubos con 2,9 ml de caldo Mueller Hinton, se agregó 1ml del extracto acuoso y 100 μl de suspensión de microorganismos. La concentración de extracto en el tubo 1 fue de 51 mg/ml con un factor de dilución de ¼, los tubos se incubaron por 24 horas a 37°C y se realizó la lectura de resultados.

Se consideró como inhibición la ausencia de turbiedad en los tubos.

Concentración Mínima Fungicida

Con una muestra de todos los tubos se inocularon por duplicado cajas de Muller Hinton, se incubaron por 24 horas a 37 °C y se realizó la lectura de resultados.

Fase post-analítica

Interpretación de resultados.

6. Resultados

Determinación de efecto antimicótico del extracto acuoso de *Allium sativum* en cepas de Candida albicans y Candida glabrata por la técnica de Kirby Bauer

Tabla 3Halos de inhibición (mm) de actividad del extracto acuoso de *Allium sativum* contra *Candida glabrata*

Prueba	Ensayo N°1	Ensayo N°2	Ensayo N°3
Extracto	23	24	25
CP	20	20	20
CN	-	-	-

Clave:

CP: Control positivo CN: control Positivo

Interpretación: Al realizar tres ensayos se verifica concordancia en los resultados, determinando que el extracto acuoso de *Allium sativum* presenta actividad antimicótica contra *Candida glabrata*.

Tabla 4Halos de inhibición (mm) de actividad del extracto acuoso de *Allium sativum* contra *Candida albicans*

Prueba	Ensayo N°1	Ensayo N°2	Ensayo N°3
Extracto	25	23	25
CP	20	20	20
CN	-	-	-

Clave:

CP: Control positivo CN: control Positivo

Interpretación: Al realizar tres ensayos se verifica concordancia en los resultados, determinando que el extracto acuoso de *Allium sativum* presenta actividad antimicótica contra *Candida albicans*.

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto acuoso de *A. sativum* contra las cepas de *Candida albicans y Candida glabrata* por la técnica de Macrodilución

Tabla 5Determinación de CMI del extracto acuoso de *A. sativum* con una concentración inicial de 204 000 µg/ml contra los microorganismo de *Candida albicans y Candida glabrata*

Prueba			Ens	ayo 1		
Concentración de extracto µg/ml	49	199	796	3187	12 750	51000
Candida glabrata	Pt	Pt	Pt	St	St	St
Candida albicans	Pt	Pt	Pt	St	St	St

Clave:

Pt: Presencia de turbidez

St: Sin turbidez

Tabla 6Determinación de CMI del extracto acuoso de *A. sativum* con una concentración inicial de 204 000 µg/ml contra los microorganismo de *Candida albicans y Candida glabrata*

Prueba			Ens	ayo 2		
Concentración de extracto μg/ml	49	199	796	3187	12 750	51000
Candida glabrata	Pt	Pt	Pt	St	St	St
Candida albicans	Pt	Pt	Pt	St	St	St

Clave:

Pt: Presencia de turbidez

St: Sin turbidez

Tabla 7

Determinación de CMI del extracto acuoso de *Allium sativum* con una concentración inicial de 204 000 μg/ml contra los microorganismo de *Candida albicans y Candida glabrata*

Prueba			Ens	ayo 3		
Concentración de extracto µg/ml	49	199	796	3187	12 750	51000
Candida glabrata	Pt	Pt	Pt	St	St	St
Candida albicans	Pt	Pt	Pt	St	St	St

Clave:

Pt: Presencia de turbidez

St: Sin turbidez

Interpretación: Al verificar concordancia en los resultados de los tres ensayos experimentales se establece que la CMI del extracto acuoso de *Allium sativum* es de 3 187 μg/ml para ambos microorganismos.

Nota: Se evidencia sedimentos en la profundidad de los tubos, pero se debe a una interacción desconocida entre el medio y el extracto, por consiguiente se resolvió sembrar alícoutas de cada tubo para así determinar si existe crecimiento fúngico.

Concentración Mínima Inhibitoria del control positivo (Anfotericina B) y Control negativo

(Agua destilada) contra las cepas de Candida albicans y Candida glabrata

Tabla 8Determinación de CMI del control positivo (Anfotericina B) contra los microorganismo de *Candida albicans y Candida glabrata*

Prueba			Ens	sayo		
Concentración de extracto µg/ml	0,001	0,007	0,052	0,36	2,55	17,85
Candida glabrata	Pt	Pt	St	St	St	St
Candida albicans	Pt	Pt	St	St	St	St

Clave:

PT: Presencia de turbidez

ST: Sin turbidez

Interpretación: Se evidencia en la presente tabla que la CMI de nuestro control Positivo (Anfotericina B) es de 0,052 μg/ml para ambos micoorganismos.

Tabla 9Determinación de CMI del control negativo (Agua destilada) contra los microorganismo de *Candida albicans y Candida glabrata*

Prueba			Ens	sayo		
Concentración de extracto μg/ml	-	-	-	-	-	-
Candida glabrata	Pt	Pt	Pt	Pt	Pt	Pt
Candida albicans	Pt	Pt	Pt	Pt	Pt	Pt

Clave:

PT: Presencia de turbidez

ST: Sin turbidez

Interpretación: En la presente tabla se evidencia el crecimiento de los microorganismos en todos los tubos, por lo tanto no presenta actividad antimicrobiana.

Concentración Mínima Fungicída (CMF) del extracto acuoso de *Allium sativum* frente a Candida albicans y Candida glabrata

Tabla 10CMF del extracto acuoso de *Allium sativum*, realizando sembrado de alícuotas de los tubos usados en la CMI

Prueba			Ens	ayo 1			
Concentración de extracto µg/ml	49	199	796	3187	12 750	51000	
Candida glabrata	Pc	Pc	Pc	Sc	Sc	Sc	
Candida albicans	Pc	Pc	Pc	Sc	Sc	Sc	

Clave:

Pc: Presencia de crecimiento

Sc: Sin crecimiento

Tabla 11CMF del extracto acuoso de *Allium sativum*, realizando sembrado de alícuotas de los tubos usados en la CMI

Prueba			Ens	ayo 2		
Concentración de extracto µg/ml	49	199	796	3187	12 750	51000
Candida glabrata	Pc	Pc	Pc	Sc	Sc	Sc
Candida albicans	Pc	Pc	Pc	Sc	Sc	Sc

Clave:

Pc: Presencia de crecimiento

Sc: Sin crecimiento

Interpretación: Se verifica que los resultados obtenidos concuerdan entre sí, determinando que la acción fungicida se presenta a 3 187 μg/ml de igual manera para *Candida albicans* y *Candida glabrata*.

7. Discusión

Allium sativum (ajo) es una hortaliza usado principalmente en la rama de la gastronomía, pero en los últimos años ha sido objeto de estudio por la comunidad médica por su gran variedad de componentes, en el presente estudio se trabajó con el extracto acuoso en base a los bulbos de ajo, puesto que de estos bulbos se origina su principio activo según Vallejos Carrión & Idrogo, (2019) manifiesta que el compuesto denominado "alicina", se obtiene a través de una interacción enzimática entre la enzima aliinasa y el compuesto organosulfurado aliina a través del triturado de los ajos, y se ha demostrado que el ajo presenta actividad antimicótica frente a Candida albicans, y otro tipo de agentes fúngicos.

Según el presente estudio los componentes con actividad antimicótica (alicina) pierden esta propiedad a medida que pasa el tiempo y las manipulaciones a pesar de haber seguido los procedimientos descritos en varios informes consultados como son los estudios realizados por (Lora Cahuas et al., 2010); (Castillo Rojas, 2013) y (Juárez-Segovia et al., 2019) habiéndose requerido probar y desarrollar varias técnicas para la obtención del extracto, prestando especial atención a la protección del calor y la luz, el tiempo entre la obtención del extracto y los ensayos de sensibilidad y de la luz.

Se resolvió trabajar con *Candida albicans* puesto que éste es el agente fúngico más frecuente aislado y con *Candida glabrata* que en los últimos años se lo ha catalogado como un agente oportunista y mortal.

Inicialmente se aplicó la técnica descrita por Castillo Rojas, (2013) y Lora Cahuas et al., (2010), este último determinó que el ajo liofilizado presentó actividad antimicótica frente a *Candida. albicans* a una concentración de 5000 μg/ml; cabe recalcar que el producto liofilizado que se usó en dicho proyecto les fue donado por una empresa liofilizadora por lo que no se explica la metodología para su obtención.

En el presente estudio se decidió realizar una maceración por 24 horas, concentración a 45 °C y liofilización por 1 día. Este extenso tiempo y exposición y temperaturas parecería ser la causa de la pérdida de actividad del extracto.

Juárez-Segovia et al., (2019) menciona que realizó una maceración con una solución de buffer fosfato salino (PBS), y fue ensayada *in vitro* contra de *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus niger* en la que se obtuvo inhibición de estos microorganismos. Al replicar este procedimiento tampoco se demostró actividad del extracto.

Al no obtener resultados esperados, se decidió experimentar usando un extractor y posteriormente añadiendo agua destilada, esta técnica nos permitió demostrar la actividad antifúngica del *Allium sativum* en ambos microorganismos *Candida albicans y Candida glabrata*. Realizando esta metodología se pudo determinar que a una concentración de 8160 μg/disco estos microorganismos son sensibles.

Nuestros resultados difieren del estudio realizado por Orbegoso, (2016) en el que manifiesta haber alcanzado sensibilidad de *Candida albicans* con su extracto acuoso de *Allium sativum* experimentando con concentraciones de 22 mg/ml y 44 mg/ml obtuvo halos de inhibición de 32.4 mm y 37.82 mm de diámetro respectivamente; de igual manera, otro proyecto realizado por Guillén et al., (2016) alega que para que *Candida albicans* se necesita una concentración de 0,5 g hasta 1g para demostrar inhibición de su crecimiento, en ambos casos se utilizan cantidades muy elevadas para inhibir el crecimiento de *Candida albicans*, esto discrepa con nuestro análisis en el que verificó su inhibición con cantidades menores.

Se ha realizado poca o nula investigación sobre la sensibilidad que puede presentar *Candida glabrata* frente a *Allium sativum* o sobre las cantidades reales que inhiben el crecimiento de estos microorganismos (CMI), sin embargo se pudo constatar que un estudio realizado por (Mendoza Juache et al., 2017) con asilados de *Candida* de placas dentales y aceite de *Allium*

sativum, estableciendo que la CMI de *Candida albicans* es de 236,2 μg/ml y para *Candida glabrata*, de 321 μg/ml, pero que esta sensibilidad se ve disminuida cuando se aíslan de Biofilms, obteniendo resultados de 603,1 μg/ml para *Candida albicans* y 640 μg/ml para *Candida glabrata*

Estos resultados contrastan con nuestros análisis realizados, en el cual se determinó que la Concentración mínima inhibitoria del extracto acuoso es de 3 187 μg/ml, esta cantidad inhibe el crecimiento de ambos microorganismos y a la vez presenta acción fungicida, cabe recalcar que es una cantidad elevada de antimicrobiano, pero se debe considerar que en la inoculación del antifúngico no se aplica únicamente la alicina, sino que, se agregan todos los componentes y derivados del ajo, puesto que el aislamiento y conservación de la alicina es un proceso demasiado complejo. Nuestro estudio cumplió con sus objetivos previstos al obtener un extracto eficaz que inhibe el crecimiento de ambas cepas fúngicas y también se pudo determinar las concentraciones que demuestran acción fungicida para *Candida albicans* y *Candida glabrata*.

8. Conclusiones

De acuerdo a nuestros objetivos planteados y resultados obtenidos llegamos a las siguientes conclusiones:

- Se demostró la eficacia del extracto acuoso de A. sativum de acuerdo al protocolo elaborado, al comprobar que los microorganismos de Candida albicans y Candida glabrata son sensibles ante una concentración de 8160 μg/ml, mediante la técnica de Kirby Bauer.
- La Concentración Mínima Inhibitoria del extracto acuoso de Allium sativum es de 3 187μg/ml, esta concentración inhibe el crecimiento de ambos microorganismos Candida albicans y Candida glabrata.
- La Concentración Mínima Fungicida del extracto acuoso de *Allium sativum* es de 3 187 μg/ml para ambos microorganismos.
- ➤ Para obtener una inhibición y acción fungicida de *Candida albicans* como de *Candida glabrata*, se debe usar concentraciones elevadas del extracto acuoso de *Allium sativum*.
- La sensibilidad presentada por los microorganismos de *Candida albicans* y *Candida glabrata* frente al extracto acuoso de *Allium sativum*, depende prioritariamente de su uso inmediato y nula exposición a elevadas temperaturas.

9. Recomendaciones

De acuerdo a nuestro estudio realizado podemos recomendar lo siguiente:

- ➤ Realizar estudios de obtención, purificación, almacenamiento y conservación del tiosulfonato alicina, siendo este según varias fuentes bibliográficas quien presenta actividad antimicrobiana.
- ➤ Realizar análisis usando extractos de ajo frente a diversos microorganismos micóticos o bacterianos, dado que su componente alicina puede presentar actividad contra una gran variedad de microorganismos.
- ➤ Recomendamos no realizar macerados, destilaciones, o liofilizados, puesto que en el presente estudio estas metodologías no pudieron corroborar su actividad antimicótica, por los largos tiempos de preparado y exposición a elevadas temperaturas.
- ➤ Para realizar estudios con extracto de ajo recomendamos usar materiales (materiales de vidrio, agua destilada) en refrigeración, para mantener una cadena de frío.

10. Bibliografía

- Abanto, J., & Valverde, F. (2018). Diferenciación De Candida Albicans De Candida Dubliniensis

 En Agar Tabaco, Preparado Con El Tabaco De Tres Marcas De Cigarros. *Universidad*Privada Norbert Wiener, 147. http://repositorio.uwiener.edu.pe/handle/123456789/2417
- Alcalá, L., Muñoz, P., Peláez, T., & Bouza, E. (2015). Aspergillus y aspergilosis. *Seimc*, *12*(2), 77–78. http://www.adiveter.com/ftp_public/articulo782.pdf
- Beshbishy, A., Wasef, L., Elewa, Y., Al-Sagan, A., Abd El-Hack, M., Taha, A., & Abd-Elhakim, Y. (2020). Chemical Constituents and Pharmacological Activities of Garlic (Allium sativum L.): A Review. *Nutrients*, *12*(3), 872. http://search.proquest.com/docview/2420177570/
- Bordallo Cardona, M. (2019). *Aproximación fenotípica y molecular a la inducción y detección de resistencia a equinocandinas en Candida glabrata*. https://eprints.ucm.es/56812/1/T41368.pdf
- Britania. (2011a). Mueller hinton agar (7101). *World Health*, *June*, 7–9. https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5e42a06a6fcd3.pdf
- Britania. (2011b). *Sabouraud Glucosado Agar Sin Antibióticos*. 1–2. https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5af08a08a7afe.pdf
- Britania. (2021). *Mueller Hinton Caldo*. 10–11. https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_607075ed1d1bd.pdf
- Calcina, R. (2017). Universidad Nacional Del Altiplano Puno Facultad De Ciencias Biológicas Escuela Profesional De Biología. http://repositorio.unap.edu.pe/handle/UNAP/3527
- Carbajal, N. (2018). TERMOTERAPIA Y CULTIVO IN VITRO DE AJO (ALLIUM SATIVUM L.) PARA LA ELIMINACIÓN DEL VIRUS DEL ENANISMO AMARILLO DE LA CEBOLLA. *Director*, 15(29). https://www.uam.es/gruposinv/meva/publicaciones

- jesus/capitulos_espanyol_jesus/2005_motivacion para el aprendizaje Perspectiva alumnos.pdf%0Ahttps://www.researchgate.net/profile/Juan_Aparicio7/publication/2535713 79_Los_estudios_sobre_el_cambio_conceptual_
- Cárdenas Parra, L. Y., & Perez Cárdenas, J. E. (2020). Mecanismos de resistencia a fluconazol expresados por Candida glabrata: una situación para considerar en la terapéutica.

 Investigación en Enfermería: Imagen y Desarrollo, 22.

 https://doi.org/10.11144/javeriana.ie22.mrfe
- Carrión, A. (2019). Determinación de la actividad antimicótica del aceite esencial de Plumbago scandens (Plumbaginaceae) por la técnica de Kirby Bauer modificada.
- Castanheira, M., Deshpande, L. M., Davis, A. P., Rhomberg, P. R., & Pfaller, M. A. (2017).

 Monitoring antifungal resistance in a global collection of invasive yeasts and molds:

 Application of CLSI epidemiological cutoff values and whole-genome sequencing analysis for detection of azole resistance in Candida albicans. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. https://doi.org/10.1128/AAC.00906-17
- Castillo Rojas, J. (2013). Evaluación de la actividad antimicrobiana y antimicótica de tres extractos de la raíz de Hippobroma longiflora (L.) G. Don (Cholo valiente), por el método de difusión en agar. *Universidad Nacional De Loja*, 1, 100. https://dspace.unl.edu.ec//handle/123456789/14070
- CHROMOagarTM. (2019). *CHROMagar Cándida*. *33*(0). www.chromagar.com/fichiers/1578481405NT_EXT_001_V9.0.pdf?PHPSESSID=80d80ed 57cf923e07477a581d7086762
- Churata-Oroya, D. E. (2016). Efecto antifúngico del Citrus paradisi "toronja" sobre cepas de Candida albicans aisladas de pacientes con estomatitis subprotésica. *Revista Estomatológica*

- Herediana, 26(2), 78. https://doi.org/10.20453/reh.v26i2.2869
- CLSI. (2012). MIC Testing. *Manual of antimicrobial susceptibility testing*, *32*(2), 53–62. https://www.oie.int/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/acceso-en-linea-al-manual-terrestre/
- Condalab. (2019). *Caldo Infusión Cerebro Corazón* (*BHI*). 1–2. https://www.condalab.com/int/es/index.php?controller=attachment&id_attachment=11148
- Corrales, I., & Reyes, J. (2014). Actividad antimicrobiana y antifúngica de Allium Sativum en Estomatología. 53(254), 59–68.
- Cruz Calle, D. S. (2015). "CANDIDIASIS VAGINAL EN EMBARAZADAS, IDENTIFICACIÓN Y

 SENSIBILIDAD AL FLUCONAZOL E ITRACONAZOL. HOSPITAL BÁSICO DE

 YANTZAZA. 7(2), 1–16.

 https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8

 &ved=2ahUKEwiDz9LLoantAhXDzVkKHUczBJUQFjACegQIAhAC&url=http%3A%2F
 - CRUZ%2520CALLE.pdf&usg=AOvVaw1IhhR1JP3wAwS5Iex1z
- Cruz, S., Díaz, P., Mazón, G., Arias, D., Calderón, M., & Herrera., A. (2017). Genoma de Candida albicans y resistencia a las drogas. *Barranquilla (Col.)*, *33*(3), 26.

%2Frepositorio.ug.edu.ec%2Fbitstream%2Fredug%2F46621%2F1%2FCD-39-

- Espinola, F. (2017). Facultad De Ciencias Médicas Escuela Profesional De Medicina. *Universidad César Vallejo*, 0–2. http://repositorio.ucv.edu.pe/handle/20.500.12692/16939
- Espinosa, J. (2017). EVALUACIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA Y SUSCEPTIBILIDAD

 ANTIFÚNGICA DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS DEL COMPLEJO CANDIDA GLABRATA

 POR. 1–9. http://eprints.uanl.mx/14482/
- Estevez Posadas, B. (2017). Biosíntesis y caracterización de NPs de Ag con Eysenhardtia

- polystachya (palo azul) y su inhibición sobre el crecimiento de Clostridium sp. 78. http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/67800/Tesis Blanca Estevez.pdf?sequence=1
- Fernández, R. (2016). Mejoras farmacotécnicas en formulaciones de antifúngicos.
- Gabaldón, T., & Carreté, L. (2016). The birth of a deadly yeast: Tracing the evolutionary emergence of virulence traits in Candida glabrata. *FEMS Yeast Research*, 16(2), 1–9. https://doi.org/10.1093/femsyr/fov110
- Gerencia Operativa de Evaluación y Planificación de Medicamentos, I. y P., Dirección General Coordinación, T. y F. en S., & GCBA, M. de S. de. (2016). *Utilidad De Anfotericina B Y Caspofungina en Micosis Invasivas*. 21, 28.
- Guillén, M., Vielka, H., & Jarquín, Y. (2016). Estudio de la actividad antibacteriana y toxica del Kuiship. *La Granja: Revista de Ciencias de la Vida*, 19(1), 12–20.
- Herreras Gómez, L. R. (2018). Resistencia a antifúngicos de elección de especies de Candida aisladas de pacientes con candidiasis vaginal, Ayacucho 2017. 1–82.
- Iza Chiluisa, G. P. (2017). "Identificación De Candida Albicans Y Candida Glabrata Mediante El Medio Diferencial Chromagar Candida Para Diagnosticar Vaginosis En Mujeres Que Acuden Al Área De Ginecología Del Hospital Provincial General De Latacunga". *Universidad Técnica De Ambato*, 115. http://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/8480
- Juárez-Segovia, K. ., Díaz-Darcía, E. ., Méndez-López, M. ., Pina-Canseco, M. ., Pérez-Santiago,
 A. ., & Sánchez-Medina, M. . (2019). EFECTO DE EXTRACTOS CRUDOS DE AJO
 (Allium sativum) SOBRE EL DESARROLLO in vitro DE Aspergillus parasiticus Y
 Aspergillus niger. *Polibotánica*, 0(46), 99–111. https://doi.org/10.18387/polibotanica.47.8
- López, C. (2015). DESARROLLO DE ANTIBIÓTICOS A LO LARGO DEL SIGLO XX:

- RESISTENCIAS Y ESTRATEGIAS. *Emerging Microbes and Infections*, 4(1). https://doi.org/10.1038/emi.2015.4
- López, M. (2016). "DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA MEDIANTE EL MÉTODO AUTOMATIZADO Y SU RELACIÓN CON EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO EN MUESTRAS DE UROCULTIVO EN EL HOSPITAL REGIONAL DOCENTE AMBATO EN EL PERÍODO OCTUBRE 2015 FEBRERO 2016". http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/22436/2/LOPEZ ESTRELLA%2C MARIA TERESA.pdf
- Lora Cahuas, C., Luján Velásquez, M., Robles Castillo, H., Saravia Cueva, V., & Cabezas, J. (2010). Efecto in vitro de diferentes concentraciones de Allium sativum "ajo" frente a dermatofitos y Candida albicans. *Ucv Scientia*, 2(2), 23–33.
- Martínez, J., & Chavez, O. (2017). Efecto sinérgico antibacteriano in vitro del extracto acuoso del ajo (Allium sativum L.) y del extracto etanólico de las hojas de carqueja (Baccharis trimera L.) en cepas Escherichia coli 0104:H4. 1–99. http://repositorio.uigv.edu.pe/bitstream/handle/20.500.11818/1920/TESIS_GUERRERO GUTIERREZ%2C MELISSA JAQUELINE.pdf?sequence=2&isAllowed=y
- Mason, K. L., Downward, J. R. E., Mason, K. D., Falkowski, N. R., Eaton, K. A., Kao, J. Y., Young, V. B., & Huffnaglea, G. B. (2012). Candida albicans and bacterial microbiota interactions in the cecum during recolonization following broad-spectrum antibiotic therapy. *Infection and Immunity*, 80(10), 3371–3380. https://doi.org/10.1128/IAI.00449-12
- Mendoza Juache, A., Aranda Romo, S., Bermeo Escalona, J. R., Gómez Hernández, A., Pozos Guillén, A., & Sánchez Vargas, L. O. (2017). The essential oil of Allium sativum as an alternative agent against Candida isolated from dental prostheses. *Revista Iberoamericana de*

- Micologia, 34(3), 158–164. https://doi.org/10.1016/j.riam.2016.11.008
- Miró, M. S., Rodríguez, E., Vigezzi, C., Icely, P. A., Gonzaga de Freitas Araújo, M., Riera, F. O., Vargas, L., Abiega, C., Caeiro, J. P., & Sotomayor, C. E. (2017). Candidiasis vulvovaginal: una antigua enfermedad con nuevos desafíos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 34(2), 65–71. https://doi.org/10.1016/j.riam.2016.11.006
- Moctezuma, M. de G., Pedraza, M., Càrdenas, J., Martìnez, V., & Acosta, J. (2016). Efecto del Ajo (Allium sativum) Sobre el Crecimiento de Algunas Especies de Hongos. *Tlatemoani*, 22, 1–9.
- Morales, N., & Cardona-Castro, N. (2018). Métodos de diagnóstico en micología Diagnostic methods in mycology. *Revista CES Medicina*, *33*(1), 41–52. https://www.mendeley.com/catalogue/d82e8cc1-5849-34b2-a21a-1fcbb2196de6/?utm_source=desktop&utm_medium=1.19.4&utm_campaign=open_catalog &userDocumentId=%7Bedece2ff-dedd-43ec-940a-a5bf430d0411%7D
- Muñoz, G. (2015). Candida glabrata: an emerging pathogen. *Biociencias*, *10*(1), 89–102. https://doi.org/https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5460373
- Orbegoso, K. (2016). Escuela Profesional De Farmacia Y. *Tesis*, 1–105. http://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/10/915645/uso-terapeutico-de-menta-piperita-menta-en-pobladores-del-asent_eRypfJU.pdf
- Organización Mundial de Sanidad Animal. (2019). *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres 2019. 148*, 148–162. https://www.oie.int/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/acceso-en-linea-al-manual-terrestre/
- Orta, E. (2014). El silenciamiento local controla la respuesta al estrés oxidante y la resistencia multifarmacológica de Candida glabrata.

- Panchi, L. (2016). Efecto antimicrobiano de los extractos de las hojas de tomillo (Thymus vulgaris) y de las pepas de ajo (Allium sativum) sobre las cepas de Enterococcus faecalis. Estudio In Vitro. 77. http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/5682/1/T-UCE-0015-240.pdf
- Pelaez, O. (2018). Caracterización molecular del complejo Sir en aislados clínicos hiperadherentes de Candida glabrata.
- Ramírez, H., Castro, L., & Martínez, E. (2016). Efectos Terapéuticos del Ajo (Allium Sativum). Salud y administración, 3(8), 39–47. https://doi.org/10.1007 / s00590-016-1762-2
- Revankar, S. (2019). Candidiasis Infecciones Manual MSD versión para público general. https://www.msdmanuals.com/es/hogar/infecciones/infecciones-por-hongos-infecciones-fúngicas-micosis/candidiasis
- Rivera-Toledo, E; Jiménez-Delgadillo, AU; Manzano-Gayosso, P. (2020). Mecanismo de acción y Aplicaciones. *Facultad de medicina UNAM*, 63(2), 7–17.
- Rosales, C. (2019). ESTANDARIZACIÓN DE UNA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA MULTIPLEX PARA LA IDENTIFICACIÓN DE SIETE ESPECIES DE IMPORTANCIA CLÍNICA DE Candida.
- Suárez Álvarez, P., Llanos González, I., Montoya Ojeda, R., Puello Hoyos, M., Young Castro, G.,
 & Reyes Ramos, N. (2016). Colonización por Candida spp. en sujetos diabéticos y no diabéticos. Revista Cubana de Endocrinología, 27(1), 59–68.
- Tapia, C. (2008). Candida glabrata. *Revista Chilena de Infectologia*, 25(4), 293. https://doi.org/10.4067/S0716-10182008000400009
- Tapia, M., & Chacha, M. (2015). "DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA Y SENSIBILIDAD DE CÁNDIDA AL FLUCONAZOL EN MUESTRAS DE SECRECIÓN FARÍNGEA EN PACIENTES CON VIH/SIDA EN EL HOSPITAL 'CARLOS ANDRADE MARÍN' DURANTE

- EL PERÍODO DE ENERO A JUNIO DEL 2015". 3(2), 54–67. https://core.ac.uk/download/pdf/211008171.pdf
- Turcot, L., Vilotta, S., Palacios, N., Bernat, M., Somaglia, L., Rosmino, M., Dominguez, S., Bozzano, P., & Molgatini, S. (2016). *ADHESIÓN DE Candida albicans A SUPERFICIES BIOCOMPATIBLES DE ZIRCONIO*. 25(Samic), 3–4.

Vallejo Salazar, M. (2018). "Actividad Antimicrobiana del extracto hidroalcohólico de la planta

Cassia reticulata sobre Cándida Albicans. Estudio In Vitro". *Journal of Business Ethics*. https://www-jstor-org.libproxy.boisestate.edu/stable/25176555?Search=yes&resultItemClick=true&searchText=t=%28Choosing&searchText=the&searchText=best&searchText=research&searchText=des

ign&searchText=for&searchText=each&searchText=question.%29&searchText=AND

- Vallejos Carrión, J. M., & Idrogo, L. (2019). EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ALICINA PRESENTE EN Allium sativum "AJO" PARA LA FORMULACIÓN Y ELABORACIÓN DE UNA CREMA ANTIMICÓTICA. http://repositorio.upagu.edu.pe/bitstream/handle/UPAGU/1067/FYB-027-2019.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Vayas, B. (2017). "EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE SENSIBILIDAD EN LA EFECTIVIDAD

 ANTIMICROBIANA DE LA MIEL DE ABEJA SOBRE CEPA CERTIFICADA DE

 (Staphylococcus aureus)" "Documento. 1–9.

11. Anexos

Anexo 1. Protocolo de Bioseguridad para el ingreso al laboratorio de Fito-química

	UNIVERSIDAD	Protocolo de Pieseguridad	Código: LBC-PC001	
1859	NACIONAL DE LOJA	Protocolo de Bioseguridad para el ingreso al laboratorio de Fito-química	Revisión: 20 de septiembre de 2021	Edición: V.1
Laboratorio	de Fitoquímica		Fecha: 10 de abril de	2021

- 1. **OBJETIVO:** Establecer un protocolo que garantice el cuidado y el bienestar del estudiante al ingresar al laboratorio.
- 2. ALCANCE: Personal encargado, técnico, estudiantes y docentes de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Facultad de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja.
- 3. FUNDAMENTO: El usar implementos médicos de protección personal y Bioseguridad, garantiza y brinda al estudiante seguridad al momento de manejar reactivo o microorganismos.

4. MATERIALES:

Uniforme interno

Mangas plásticas

Guantes

Mascarilla

Gorro quirúrgico

Mandil

Bata u overol

5. PROCEDIMIENTO:

- 1. Colocarse el uniforme interno, bata u overol para ingresar al laboratorio.
- 2. Realizarse el lavado de manos.
- 3. Colocarse guantes, gorro, mascarilla y mangas protectoras
- 4. Durante la elaboración del extracto cambiarse frecuentemente los guantes y lavárselas manos con alcohol para evitar contaminaciones a nuestro producto.
- 5. Luego de culminar la jornada eliminar los materiales desechables como guantes y gorro.

Elaborado por:	Revisado por:
Ulises Armando Gaona Paccha	Dr. Luis Morocho Yaguana Mg. Sc

Anexo 2. Elaboración de extracto acuoso de Allium sativum (ajo) por Maceración.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

Laboratorio de Fitoquímica

Protocolo para la elaboración del extracto acuoso de *Allium* sativum por maceración.

Código: LBC-PC002

2da revisión: 20 de

Edición: V.1

septiembre de 2021

Fecha: 15 de abril de 2021

- 1. **OBJETIVO:** Establecer el procedimiento para la obtención de extracto de *Allium sativum*.
- 2. ALCANCE: Personal encargado, técnico, estudiantes y docentes de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Facultad de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja.
- **3. FUNDAMENTO:** El extracto acuoso de ajo es una sustancia concentrada que se la obtiene a partir de los bulbos o dientes de ajo, que se lo utiliza con la finalidad de comprobar su efecto antimicrobiano.

4. MATERIALES Y REACTIVOS:

Droga (bulbos de ajo)

Agua destilada

Hipoclorito de sodio (0,02%)

Mortero de porcelana

Gasa

Matraz

Probeta

Equipos:

Balanza analítica

5. PROCEDIMIENTO

1- Encender un mechero con alcohol al 90%.

- 2- Pelar la cubierta externa de los ajos.
- 3- Desprender la segunda cubierta de los ajos, escogiendo los ajos de un tamaño similar y aquellos que no presenten fisuras, golpes, magulladuras o en estado de descomposición.
- 4- Pesar los ajos en la balanza analítica.
- 5- Lavar los ajos con NaClO al 0,02% para eliminar las impurezas.
- 6- Lavar nuevamente los ajos con agua destilada para eliminar los residuos del reactivo usado previamente.
- 7- En un mortero colocamos gasa estéril y sobre esta los ajos, los envolvemos para luego proceder con un mazo a triturar el ajo.
- 8- Colocar el ajo triturado en un matraz Erlenmeyer esterilizado y colocar agua destilada para la homogenización y luego tapamos con papel aluminio.
- 9- Cubrir el matraz Erlenmeyer asegurándonos que esté protegido de la luz.
- 10- Colocamos el matraz en el agitador magnético en un periodo de 24 horas a 6 mil rpm.
- 11- Procedemos a filtrar el extracto con un embudo de cristal esterilizado, colocando papel filtro y gasa.
- 12- Lo obtenido se guarda en un frasco hermético en refrigeración.
- 13- Colocamos la misma cantidad de agua destilada y dejamos reposar 24 horas más a 6 mil rpm.
- 14- Realizamos nuevamente la filtración y guardado en refrigeración.

Bibliografía

Castillo Rojas, J. (2013). Evaluación de la actividad antimicrobiana y antimicótica de tres extractos de la raíz de Hippobroma longiflora (L.) G. Don (Cholo valiente), por el método de difusión

en agar. Universidad Nacional De Loja, 1, 100.

https://dspace.unl.edu.ec//handle/123456789/14070

Anexo 3. Elaboración de extracto acuoso de *Allium sativum* (ajo) a través de la maceración con PBS

1859	UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
------	------------------------------------

Laboratorio de Fitoquímica

Elaboración de extracto acuoso de *Allium sativum* (ajo) a través de la maceración con PBS Código: LBC-PC003

Revisión: 20 de septiembre de Edición: V.1

2021

Fecha: 25 de junio de 2021

- 1. **OBJETIVO:** Establecer el procedimiento para la obtención de extracto de *Allium sativum*.
- 2. ALCANCE: Personal encargado, técnico, estudiantes y docentes de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Facultad de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja.
- **3. FUNDAMENTO:** El extracto acuoso de ajo es una sustancia concentrada que se la obtiene a partir de los bulbos o dientes de ajo, que se lo utiliza con la finalidad de comprobar su efecto antimicrobiano.

4. MATERIALES Y REACTIVOS:

Droga (bulbos de ajo "criollo" o "morado autóctono")

Solución amortiguadora de fosfatos.

Hipoclorito de sodio (0,02%)

Gasa

Papel filtro

Matraz

Embudo de cristal

Equipos:

Balanza analítica

Centrífuga

PROCEDIMIENTO

- 1. Encender un mechero con alcohol al 90%.
- 2. Pelar la cubierta externa de los ajos.
- 3. Desprender la segunda cubierta de los ajos, escogiendo los ajos de un tamaño similar y aquellos que no presenten fisuras, golpes, magulladuras o en estado de descomposición.
- 4. Pesar 100 gramos de ajo en la balanza analítica.
- 5. Lavar los ajos con NaClO al 0,02% para eliminar las impurezas.
- 6. Lavar nuevamente los ajos con agua destilada para eliminar los residuos del reactivo usado previamente y dejarlos secar.
- 7. Los ajos se deben colocar en un mortero y se los debe triturar o "machacar" con una solución amortiguadora de fosfatos (PBS), usando un volumen de 100 ml.
- 8. Lo obtenido debe centrifugarse a 10 minutos en 3000 rpm.

Bibliografía

Juárez-Segovia, K. ., Díaz-Darcía, E. ., Méndez-López, M. ., Pina-Canseco, M. ., Pérez-Santiago, A. ., & Sánchez-Medina, M. . (2019). EFECTO DE EXTRACTOS CRUDOS DE AJO (A. sativum) SOBRE EL DESARROLLO in vitro DE Aspergillus parasiticus Y Aspergillus niger. *Polibotánica*, 0(46), 99–111. https://doi.org/10.18387/polibotanica.47.8

Anexo 4. Elaboración de extracto acuoso de Allium sativum (ajo) usando extractor

	UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
1950	

Laboratorio de Fitoquímica

Protocolo para la elaboración del extracto acuoso de *Allium sativum* usando extractor

Código: LBC-PC	004	
Revisión: 20 de septiembre de 2021	Edición: V.1	
Fecha: 14 de julio de 2021		

- **5. OBJETIVO:** Establecer el procedimiento para la obtención de extracto de *Allium sativum*.
- **6. ALCANCE:** Personal encargado, técnico, estudiantes y docentes de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Facultad de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja.
- **7. FUNDAMENTO:** El extracto acuoso de ajo es una sustancia concentrada que se la obtiene a partir de los bulbos o dientes de ajo, que se lo utiliza con la finalidad de comprobar su efecto antimicrobiano.

8. MATERIALES Y REACTIVOS:

Droga (bulbos de ajo "criollo" o "morado autóctono")

Agua destilada

Hipoclorito de sodio (0,02%)

Gasa

Papel filtro

Matraz

Probeta

Embudo de cristal

Tubos Falcon

Equipos:

Equipo extractor

Balanza analítica

Centrífuga

9. PROCEDIMIENTO

- 1. Encender un mechero con alcohol al 90%.
- 2. Pelar la cubierta externa de los ajos.
- Desprender la segunda cubierta de los ajos, escogiendo los ajos de un tamaño similar y aquellos que no presenten fisuras, golpes, magulladuras o en estado de descomposición.
- 4. Pesar 100 gramos de ajo en la balanza analítica.
- 5. Lavar los ajos con NaClO al 0,02% para eliminar las impurezas.
- 6. Lavar nuevamente los ajos con agua destilada para eliminar los residuos del reactivo usado previamente y dejarlos secar.
- 7. Colocar los ajos en el extractor aséptico y lo que se obtiene colocarlo en un matraz
- 8. Añadir al matraz 40 ml de agua destilada y homogenizar durante 2 minutos.
- 9. Colocar en tubos Falcon para su centrifugación durante 10 minutos a 3000 rpm.
- 10. Filtrar utilizando un embudo de cristal colocando una gasa y papel filtro.
- 11. Lo obtenido usarlo inmediatamente y refrigerarlo.

Elaborado por:	Revisado por:
Ulises Armando Gaona Paccha	Dr. Luis Morocho Yaguana Mg. Sc

Anexo 5. Manejo de equipo Rotavapor

	UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
1859	

Laboratorio de Fito-química

Manejo de equipo Rotavapor Código: LBC-PC005

2da Revisión: 20 de septiembre de 2021

Edición: V.1

Fecha: 15 de abril de 2021

 OBJETIVOS: Avalar el buen funcionamiento y uso del rotavapor en el Laboratorio de Fitoquímica.

2. ALCANCE: Personal encargado, técnico, estudiantes y docentes de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Facultad de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja

Marca: YAMATO

Modelo: RE200

Serie:

Capacidad máxima: 1000 ml

Capacidad mínima:

Ubicación: Laboratorio de Fitoquímica

Última Revisión de Mantenimiento:

Componentes del equipo: Rotavapor, baño María de agua, mangueras de ingreso/salida de agua al refrigerante y manguera de conexión de vacío.

3. PROCEDIMIENTO

a) Retirar la cubierta protectora del equipo y verificar que se encuentra en condiciones de operatividad según las instrucciones del fabricante. Comprobar que se encuentren conectadas las mangueras de ingreso y salida de agua (refrigerante), la conexión al sistema

de vacío, agua suficiente en el baño maría, lubricación de las uniones del balón concentrador y colector.

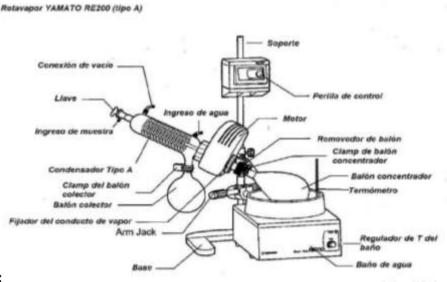
- **b**) Conectar el rota vapor y el baño maría a la fuente de poder (toma-corriente), verificando que el voltaje de la red sea de 110 V.
- c) Encender primeramente el baño maría, para lo cual presionar la tecla de poder ubicada al costado derecho del equipo. A cabo de unos 10 minutos encender el rota vapor, presionando el botón de encendido ubicado en la parte superior derecha del panel de mandos.
- **d**) Colocar el balón de concentración al conducto de vapor y coloque la pinza de fijación (clamp).
- e) Colocar el balón colector asegurándolo con la pinza de fijación (clamp).
- **f**) Verificar que la tapa del condensador se encuentre cerrada al ingreso de aire y líquido a concentrar (posición horizontal).
- g) Encender la bomba de vacío y extraer el aíre del sistema.
- h) Introduzca la manguera de alimentación en el recipiente que contiene el líquido a concentrar. Con precaución haga rota la llave (tapa) del condensador (orificio de la tapa dirigido hacia abajo) de tal manera que empiece a subir el líquido (muestra) por la manguera de alimentación y pase al balón concentrador. Cuando el balón concentrador contenga aproximadamente ½ de su capacidad suspender la alimentación rotando la tapa del condensador (orificio de la tapa en posición horizontal).

NOTA: El ingreso del líquido debe hacerse lentamente para evitar la ebullición violenta y el contenido pase por el conducto de vapor.

- i) Con la mano izquierda sostenga el motor del rotavapor mientras con la derecha afloje el tornillo de fijación al soporte (pedestal); con precaución descienda el rotavapor hasta que el balón concentrador quede sumergido en el baño maría hasta una profundidad aproximada de 1/2 y de tal forma que no cause el derrame del agua del baño o roce con el borde del mismo.
- j) Iniciar la rotación del balón concentrador, para lo cual gire la perilla de velocidad en dirección de las manecillas del reloj hasta una velocidad aproximada de 120 rpm.
- **k**) Abra la llave de ingreso de agua (refrigerante), asegurándose que tenga un flujo adecuado.
- Para mantener una buena velocidad de evaporación, de vez en cuando active el sistema de vacío (bomba de vacío).
- **m**) Una vez alcanzada un buen grado de concentración del extracto, parar la rotación del balón, sacarlo del baño maría, mantener la refrigeración por unos 2-3 minutos más y cortar el suministro de refrigerante; apague el baño maría si no se va utilizar nuevamente el equipo.
- n) Retire el balón concentrador; para lo cual extraiga la pinza de sujeción y rote en sentido contrario a las manecillas del reloj el removedor del balón ubicado en el conducto de vapor.

NOTA: Mientras realiza esta actividad, con la mano derecho sostenga firmemente el balón concentrador. Las temperaturas van a variar de acuerdo al solvente en el baño maría, con Hexano 20° C, Etanol 40° C y con Agua es de 45° C conforme a la técnica utilizada.

- o) Deposite en contenido del balón concentrador en un cristalizador o recipiente adecuado para proceder al secado final o liofilización.
- **p**) Retire el balón colector, extrayendo previamente la pinza de sujeción (clamp) y con la otra sostenga firmemente el balón, deposite el solvente destilado en un recipiente para el reciclado de solventes o reinicie el proceso de extracción, de acuerdo a la metodología aplicada para la obtención de extractos.
- **q)** Lave cuidadosamente el balón concentrador y colector con una porción nueva del solvente utilizado para la obtención del extracto; con la misma solución lave el condensador para lo cual retire la tapa y con la ayuda de una pizeta lave el serpentín y las paredes del condensador, colectando el líquido para posteriormente ser reciclado.
- r) Apague el baño maría y el rotavapor, desconéctelo de la red de alimentación eléctrica.



Bibliografía:

Castillo Rojas, J. (2013). Evaluación de la actividad antimicrobiana y antimicótica de tres extractos de la raíz de Hippobroma longiflora (L.) G. Don (Cholo valiente), por el método de difusión en agar. *Universidad Nacional De Loja*, 1, 100. https://dspace.unl.edu.ec//handle/123456789/14070

Anexo 6. Elaboración de agar Saboroud-Dextrosa

	UNIVERSIDAD NACIONAL DE	Elaboración de agar Saboroud- Dextrosa	Código: LBC-l	PC006
Laboratorio	LOJA		Revisión: 20 de septiembre de 2021	Edición: V.1
Laboratorio de Fito-química			Fecha: 14 de ju	ınio de 2021

- 1. **OBJETIVO:** Garantizar el crecimiento de agentes fúngicos
- 2. ALCANCE: Personal encargado, técnico, estudiantes y docentes de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Facultad de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja.
- **3. FUNDAMENTO:** Es un medio de cultivo recomendado para el aislamiento y desarrollo de hongos. El alto contenido de glucosa, la presencia de cloranfenicol y el pH ácido, inhiben el desarrollo bacteriano y favorecen el crecimiento de hongos y levaduras.

4. MATERIALES Y REACTIVOS:

Cajas Petri
Matraz
Agua destilada
Agar Saboroud
Probeta
Mechero
Tapón de algodón y gasa.
Papel aluminio
Equipos:
Cocineta

Balanza analítica

Autoclave

1. PROCEDIMIENTOS:

- 1. Pesar la cantidad requerida del medio en una balanza analítica.
- 2. Con una probeta medir la cantidad de agua destilada.
- Homogenizarlo en un matraz, luego lo cubrimos al matraz con un tapón de algodón y gasa.
- 4. Hervir el medio aproximadamente 1 minuto, hasta que se observe el medio traslúcido, es decir, cuando ya no se observe masas o aglutinaciones en el matraz.
- 5. Colocar el medio preparado en el autoclave a 121 ° C durante 15 minutos para esterilizarlo.
- Finalizada la esterilización, colocamos el medio en una superficie plana, donde se realizará el dispensado en las cajas Petri usando un mechero encendido durante el dispensado.
- 7. Envolver las cajas Petri en papel aluminio rotulando el nombre del medio y la fecha que fue elaborado.
- 8. Tomar el 5% de los medios e incubar a 37°C durante 48 horas para verificar contaminaciones, en el caso que exista crecimiento de algún microorganismo se debe retirar todo el lote.
- 9. Almacenar en refrigeración los medios realizados.

Bibliografía: Britania, (2011b). *Sabouraud Glucosado Agar Sin Antibióticos*. 1–2. https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5af08a08a7afe.pdf

Anexo 7. Elaboración de agar Mueller Hinton

	UNIVERSIDAD NACIONAL DE	Elaboración de agar Mueller	Código: LBC-	PC007
	LOJA	Hinton	Revisión: 20	Edición: V.1
1859	Loui	Timeon	de septiembre	
Laboratorio	de Fito-química		de 2021	
Lucoratorio	de i no quimeu		Fecha: 14 juni	o de 2021

- OBJETIVO: Garantizar y elaborar un medio que nos permita realizar la técnicas de Kirby Bauer.
- 2. ALCANCE: Personal encargado, técnico, estudiantes y docentes de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Facultad de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja.
- **3. FUNDAMENTO**: Es un medio de cultivo nutritivo no selectivo que promueve el desarrollo microbiano. Gracias a sus propiedades puede ser utilizado en forma rutinaria en la realización del antibiograma en medio sólido.

4. MATERIALES Y REACTIVOS:

Cajas Petri
Matraz
Agua destilada
Agar Mueller Hinton
Probeta
Mechero
Tapón de algodón y gasa.

Equipos:

Papel aluminio

Cocineta

Balanza analítica

Autoclave

5. PROCEDIMIENTO:

- 1. Pesar en una balanza analítica la cantidad del medio que se requiere.
- 2. Con una probeta medir la cantidad de agua destilada.
- Homogenizarlo en un matraz, luego lo cubrimos al matraz con un tapón de algodón y gasa.
- 4. Hervir el medio, hasta que se observe un medio color amarillo y transparente, es decir, cuando ya no se observe masas o aglutinaciones en el matraz.
- 5. Llevar el matraz a esterilizar en el autoclave a 121 ° C durante 15 minutos.
- Finalizado el autoclavado, colocamos el medio en una superficie plana, donde se realizará el dispensado en las cajas Petri, con un mechero encendido durante el dispensado.
- 7. Antes de realizar el vaciado del medio, se debe señalar en las cajas Petri una superficie de 4 mm.
- 8. Con una jeringuilla y aguja calibre 16 se realiza el llenado de las cajas hasta lo señalado anteriormente, dándonos un aproximado de 24 ml por caja Petri.
- 9. Envolver las cajas Petri en papel aluminio rotulando el nombre del medio y la fecha que fue elaborado.
- 10. Tomar el 5% de los medios e incubar a 37°C durante 48 horas para verificar contaminaciones, en el caso que exista crecimiento de algún microorganismo se debe retirar todo el lote.
- 11. Almacenar en refrigeración los medios realizados.

Bibliografía:

Britania, (2011). Mueller hinton agar (7101). *World Health*, *June*, 7–9. https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5e42a06a6fcd3.pdf

Anexo 8. Elaboración de caldo Infusión cerebro corazón.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE	Elaboración de caldo Infusión	Código: LBC-	PC008
LOJA Laboratorio de Fito-química	cerebro corazón	Revisión : 20 de septiembre de 2021	Edición: V.1
Laboratorio de l'ito quillica		Fecha: 14 de j	unio de 2021

- 1. OBJETIVO: Elaboración de medio que facilite el crecimiento de levaduras.
- 2. ALCANCE: Personal encargado, técnico, estudiantes y docentes de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Facultad de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja
- 3. FUNDAMENTO: Es un medio líquido rico en nutrientes, adecuado para el cultivo de una amplia variedad de microorganismos, entre ellos hongos y levaduras. El caldo BHI se recomienda para métodos estándar de susceptibilidad antimicrobiana.

4. OS:

MATERIALES Y REACTIVO
Tubos de vidrio
Matraz
Agua destilada
Caldo Infusión cerebro corazón
Probeta
Mechero
Tapones de goma.
Papel aluminio
Equipos:

Cocineta

Balanza analítica

Autoclave

5. PROCEDIMIENTO:

- 1. Pesar una cantidad requerida del medio.
- 2. Con una probeta medir la cantidad de agua destilada.
- Homogenizarlo en un matraz, luego lo cubrimos al matraz con un tapón de algodón y gasa.
- 4. Hervir el medio, hasta que se observe un medio color anaranjado y transparente, es decir, cuando ya no se observe masas o aglutinaciones en el matraz.
- 5. Llevar el matraz a esterilizar al autoclave a 121 ° C durante 15 minutos.
- 6. Finalizado el autoclavado, colocar el medio en una superficie plana, donde se realizará el dispensado en los tubos de vidrio una cantidad de 3 ml, con un mechero encendido durante el dispensado.
- 7. Con una jeringuilla y aguja calibre 16 se realiza el llenado de los tubos.
- 8. Taponar los tubos con tapas de goma.
- 9. Tomar el 5% de los medios e incubar a 37°C durante 48 horas para verificar contaminaciones, en el caso que exista crecimiento de algún microorganismo se debe retirar todo el lote.
- 10. Almacenar en refrigeración los medios realizados.

Bibliografía:

Condalab, (2019). *Caldo Infusión Cerebro Corazón* (*BHI*). 1–2. https://www.condalab.com/int/es/index.php?controller=attachment&id_attachment=11148

Anexo 9. Elaboración de caldo Mueller Hinton

UNIVERSIDAD NACIONAL DE	Elaboración de caldo Mueller	Código: LBC-PC009		
LOJA Laboratorio de Fito-química	Hinton	Revisión: 20 de septiembre de 2021	Edición: V.1	
Laboratorio de l'ito quinneu		Fecha: 13 de a	gosto de 2021	

- OBJETIVO: Elaboración de medio que permita la realización de la Concentración Mínima Inhibitoria.
- 2. ALCANCE: Personal encargado, técnico, estudiantes y docentes de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Facultad de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja
- 3. FUNDAMENTO: Es un medio nutritivo que favorece el crecimiento de diversos microorganismos. Frecuentemente se lo usa para determinar la concentración mínima inhibitoria. Presenta buena reproducibilidad de los resultados lote a lote y tiene un bajo contenido de inhibidores especialmente para sulfamidas, trimetoprima y tetraciclinas. Puede ser suplementado para permitir el desarrollo de bacterias exigentes en sus requerimientos nutricionales.

4. MATERIALES Y REACTIVOS:

Tubos de vidrio

Matraz

Agua destilada

Caldo Mueller Hinton

Probeta

Mechero

Tapones de goma.

Papel aluminio

Equipos:

Cocineta

Balanza analítica

Autoclave

5. PROCEDIMIENTO:

- 1. Pesar una cantidad requerida del medio.
- 2. Con una probeta medir la cantidad de agua destilada.
- Homogenizarlo en un matraz, luego lo cubrimos al matraz con un tapón de algodón y gasa.
- 4. Hervir el medio, hasta que se observe un medio color anaranjado y transparente, es decir, cuando ya no se observe masas o aglutinaciones en el matraz.
- 5. Llevar el matraz a esterilizar al autoclave a 121 ° C durante 15 minutos.
- 6. Finalizado el autoclavado, colocar el medio en una superficie plana, donde se realizará el dispensado en los tubos de vidrio una cantidad de 2,9 ml, con un mechero encendido durante el dispensado.
- 7. Con una pipeta calibrada se realiza el llenado de los tubos.
- 8. Taponar los tubos con tapas de goma.
- 9. Tomar el 5% de los medios e incubar a 37°C durante 48 horas para verificar contaminaciones, en el caso que exista crecimiento de algún microorganismo se debe retirar todo el lote.
- 10. Almacenar en refrigeración los medios realizados.

Bibliografía:

Britania, (2021). *Mueller Hinton Caldo*. 10–11.

 $https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_607075ed1d1bd.pdf$

Anexo 10. Elaboración de agar CHROMagar

	UNIVERSIDAD NACIONAL DE	Elaboración de agar	Código: LBC-	PC010
Laboratorio	LOJA de Fito-química	CHROMagar	Revisión : 20 de septiembre de 2021	Edición: V.1
Laboratorio	de i ito quimeu		Fecha: 08 de ju	unio de 2021

- 1. **OBJETIVO:** Elaboración de medio que permita la diferenciación de especies de *Candida*.
- 2. **ALCANCE:** Personal encargado, técnico, estudiantes y docentes de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Facultad de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja.

3. FUNDAMENTO:

Los agares de CHROMagar son medios diferenciales que permiten el reconocimiento de especies del género de *Candida spp* por medio de reacciones enzimáticas permitiendo la observación de colonias de diversos colores.

4. MATERIALES Y REACTIVOS:

Cajas Petri
Matraz
Agua destilada
Agar CHROMagar
Probeta
Mechero
Tapón de algodón y gasa.
Papel aluminio
Equipos:

Cocineta

Balanza analítica

5. PROCEDIMIENTOS:

- 1. Pesar una cantidad requerida del medio.
- 2. Con una probeta medir la cantidad de agua destilada.
- Homogenizarlo en un matraz, luego lo cubrimos al matraz con un tapón de algodón, gasa y papel aluminio.
- 4. Calentar el medio hasta que hierva durante un minuto, hasta que se observe que el medio es transparente y no se observe masas o aglutinaciones en el matraz.
- Colocar el medio en una superficie plana, donde se realizará el dispensado en las cajas
 Petri, con un mechero encendido durante el dispensado.
- 6. Envolver las cajas Petri en papel aluminio rotulando el nombre del medio y la fecha que fue elaborado.
- 7. Tomar el 5% de los medios e incubar a 37°C durante 48 horas para verificar contaminaciones, en el caso que exista crecimiento de algún microorganismo se debe retirar todo el lote.
- 8. Almacenar en refrigeración

Bibliografía:

CHROMOagarTM,(2019). CHROMagarCándida.33(0).

www.chromagar.com/fichiers/1578481405NT_EXT_001_V9.0.pdf?PHPSESSID=80d80ed 57cf923e07477a581d7086762

Anexo 11. Impregnación de discos

UNIVERSIDAD		Código: LBC-PC	011
NACIONAL DE	Impregnación de discos	21 D ::/	T 1
LOJA		2da Revisión:	Edición: V.1
1859		20 de	
Laboratorio de Fito-química		septiembre de	
		2021	
		Fecha: 14 de juni	o de 2021

- 1. **OBJETIVO:** Elaboración de protocolo para impregnar discos con solución de estudio.
- 2. **ALCANCE:** Personal encargado, técnico, estudiantes y docentes de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Facultad de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja.
- FUNDAMENTO: En la técnica de Kirby Bauer se impregna discos con la sustancia a ensayar, estas se colocan en el medio para verificar la existencia de sensibilidad o resistencia.

4. MATERIALES Y REACTIVOS:

Agar Mueller Hinton

Discos de 6mm estériles

Pinzas

Mechero

Hisopos

Pipetas

Puntas

Densitómetro

Tubos

Solución Salina o Suero fisiológico

Extracto acuoso

Material Biológico:

Cepa ATCC Candida albicans

Cepa ATCC Candida glabrata

5. PROCEDIMIENTO

- Se debe realizar limpieza de la cámara de Bioseguridad y aplicar luz ultravioleta sobre todos los materiales a usar con excepción de las cepas microbiógicas y el extracto acuoso.
- 2. Colocar los discos de 6mm sobre una rejilla.
- Colocar el extracto a la concentración deseada, previamente preparada sobre cada uno de los discos y dejarlos secar por cinco minutos.
- Con un hisopo tomamos una o dos colonias bien definidas e inmediatamente colocamos en la solución salina o suero fisiológico hasta alcanzar una escala de 0.5 Mc Farland.
- Procedemos a realizar el plateado en la caja de Mueller Hinton realizando giros de 45° cada vez que inoculemos la placa.
- Luego se procede con una pinza estéril a impregnar los discos en las cajas de Mueller Hinton.
- 7. Se los deja reposar al menos unos 10 minutos y se los colocan en la incubadora a 37°C entre un periodo de 18 a 24 horas.
- 8. Se hace lectura e interpretación, midiendo los halos de inhibición.

Bibliografía:

- CLSI, (2012) MIC Testing. *Manual of antimicrobial susceptibility testing*, *32*(2), 53–62. https://www.oie.int/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/acceso-en-linea- al-manual-terrestre/
- Carrión, A. (2019). Determinación de la actividad antimicótica del aceite esencial de Plumbago scandens (Plumbaginaceae) por la técnica de Kirby Bauer modificada .

V.1

Anexo 12. Esterilización de filtros de Membrana

	UNIVERSIDAD NACIONAL DE	Esterilización de filtros de	Código: LBC-	PC012
I aboratorio	LOJA de Fito-química	membrana	Revisión : 20 de septiembre de 2021	Edición: V.1
Laboratorio	de i no-quimea		Fecha: 5 de ag	osto de 2021

- 1. OBJETIVO: Garantizar el uso de filtros de membrana estériles para evitar contaminaciones
- 2. ALCANCE: Personal encargado, técnico, estudiantes y docentes de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Facultad de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja.
- 3. FUNDAMENTO: Los filtros de membrana se utilizan para esterilizar los extractos y de esta manera evitar contaminaciones o crecimientos de agentes microbianos que alteren los resultados.

4. MATERIALES Y REACTIVOS:

Filtros de membrana de 22 μm

Formaldehído

Fundas ziploc

Algodón

Papel aluminio

5. PROCEDIMIENTO:

1. Se debe envolver de manera total los filtros de membrana con papel aluminio.

- 2. Para realizar este procedimiento se debe en primera instancia encender los ventiladores, y luego colocar 2 o 3 ml en un algodón.
- 3. En la funda ziplooc se debe colocar el algodón impregnado con el reactivo y sobre este los filtros envueltos.
- 4. Se deja reposar por unos 10 minutos y se deja reposar 24 horas antes de su uso.

Elaborado por:	Revisado por:
Ulises Armando Gaona Paccha	Dr. Luis Morocho Yaguana Mg. Sc

Anexo 13. Protocolo para realizar CMI y CMF

UNIVERSIDAD NACIONAL DE	protocolo para realizar CMI y	Código: LBC-	PC013
LOJA Laboratorio de Fito-química	CMF	Revisión: 20 de septiembre de 2021	Edición: V.1
Laboratorio de Fito quinica		Fecha: 13 de a	gosto 2021

- 1. **OBJETIVO:** Elaboración de protocolo para Realizar CMI y CMF.
- 2. ALCANCE: Personal encargado, técnico, estudiantes y docentes de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Facultad de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja.
- **3. FUNDAMENTO:** La técnica de CMI y CMF se realiza para poder determinar cuál es la cantidad mínima exacta que inhibe el crecimiento o la cantidad mínima que las destruye.

4. MATERIALES Y REACTIVOS:

Mechero

Rotulador

Filtros de membrana

Jeringuillas

6 Tubos con 3 ml de caldo Mueller Hinton

Pipetas de 1000 µl y 100 µl

Extracto acuoso de Allium sativum

Hisopos

Tubos

Material Biológico

Cepa de Candida glabrata

Cepa de Candida albicans

Equipos:

Densitómetro

5. PROCEDIMIENTO:

- 1. Se limpia el mezón con solución de Hipoclorito.
- 2. Se realiza una escala 0,5 McFarland para ambos microorganismos.
- 3. Se toma una serie de 6 tubos con 3 ml de caldo Mueller Hinton y se los rotula a cada uno.
- 4. Con una jeringuilla tomamos una cierta cantidad de extracto acuoso, luego a esta jeringuilla colocamos el filtro de membrana.
- 5. Hacemos pasar por el filtro 1 ml del extracto acuoso
- 6. Luego se procede a pasar la misma cantidad (1 ml) al segundo tubo, luego la misma cantidad (1 ml) al tercer tubo, así sucesivamente hasta el sexto tubo, al finalizar este procedimiento se desecha 1 ml sobrante del último tubo.
- 7. Finalmente se debe colocar 100 µl de la escala McFarland realizada previamente.
- 8. Incubamos 24 horas a 48 horas.
- Luego de este tiempo se debe tomar una alícuota de cada tubo e inocularla sobre agar
 Mueller Hinton.
- 10. Incubamos 24 a 48 horas para verificar o no crecimiento antimicrobiano.

Bibliografía:

Organización Mundial de Sanidad Animal, (2019). Organización Mundial de Sanidad Animal. (2019). Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales

- *Terrestres* 2019. 148, 148–162. https://www.oie.int/es/quehacemos/normas/codigos-y-manuales/acceso-en-linea-al-manual-terrestre/
- CLSI, (2012) MIC Testing. *Manual of antimicrobial susceptibility testing*, *32*(2), 53–62. https://www.oie.int/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/acceso-en-linea-al-manual-terrestre/

Anexo 14. Cálculos para determinar las concentraciones.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE	Cálculos para determinar las	Código: LBC-	PC014
LOJA Laboratorio de Fito-química	concentraciones.	Revisión: 20 de septiembre de 2021	Edición: V.1
Zasoratono de Fito quinneu		Fecha: 13 de a	gosto 2021

- 1. OBJETIVO: Explicar cómo se estableció las diversas diluciones y concentraciones
- 2. ALCANCE: Personal encargado, técnico, estudiantes y docentes de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Facultad de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja.
- 3. FUNDAMENTO: Para determinar las concentraciones de un antimicrobiano a través del método de dilución en caldo se debe emplear diversas fórmulas para obtener resultados concretos y evitar errores.

4. PROCEDIMIENTO:

- Se determinó en primer lugar la concentración impregnada en un disco con capacidad de absorción de 40 μl.
- 1. Al conocer la concentración del extracto acuoso de *Allium sativum* (3,07 g) se procede a realizar una "regla de tres" en la que consiste en lo siguiente:

3,07g

$$X$$
 1 ml

$$\frac{3,07g \times 1ml}{15 \ ml} = 0,204 \ g$$

Es decir que en 1ml hay 0,204 g o 204mg/ml seguidamente se procede a realizar el mismo método para calcular cuánto se ha impregnado en los discos con capacidad de 40µl. El cálculo sería de la siguiente manera:

204 mg
$$X = 1000 \mu l$$

$$\frac{204 mg \times 40 \mu l}{1000 \mu l} = 8,16 mg/ml$$

Es decir que se impregnó 8,16 mg en un disco o 8 160 μg/disco

• A continuación se calculó las concentraciones en la CMI, se realizó lo siguiente:

Volumen en los tubos de Mueller Hinton: 3 ml

Volumen a trasvasarse: 1ml

Número de tubos para CMI: 6 tubos

Concentración inicial de extracto acuoso de *Allium sativum*:

 $3,07g/15 \text{ ml} = 204 \text{ mg/ml} \text{ o } 204 \text{ } 000 \mu\text{g/ml}$

 Para determinar la concentración deseada primero se establece el factor de dilución usando la siguiente fórmula.

$$f_d = V_d/V_c$$

Dónde:

 f_d = factor dilución

 V_d = Volumen de la solución diluida (Volumen final)

 $V_{\mathcal{C}}=$ Volumen de la solución concentrada (Volumen a trasvasarse)

Reemplazamos valores:

$$f_d = 4/1$$

$$f_{d} = 4$$

2. Al obtener nuestro factor de dilución (4), se busca establecer nuestro factor total de dilución (f_t) , usando ésta fórmula:

$$f_t = f_d x f_d x f_d \dots$$

Se reemplaza valores:

$$f_t = 4x4x4x4x4x4$$

Nota: Se obtuvo 6 factores de dilución puesto que se realizó 6 diluciones en la CMI.

3. Al establecerse el factor total de dilución, se procede a calcular la concentración de la solución diluida, usando la siguiente fórmula:

$$C_d = C_c/f_t$$

Dónde:

 C_d = Concentración de la solución diluida

 f_t = factor total de dilución

 $\mathcal{C}_c =$ Concentración de la solución concentrada

Reemplazamos valores y determinamos la dilución del extracto en cada tubo

Tubo #6

$$C_d = C_c/f_t$$

$$C_d = 204\,000\,\mu g/ml/4$$

$$C_d = 51\,000\,\mu g/ml$$

Tubo #5

$$C_d = C_c/f_t$$

$$C_d = 204\,000\,\mu g/ml\,/16$$

$$C_d = 12.75 \,\mu g/ml$$

Tubo #4

$$C_d = C_c/f_t$$

$$C_d = 204\ 000\ \mu g/ml\ /64$$

$$C_d = 3,187 \, \mu g/ml$$

Tubo #3

$$C_d = C_c/f_t$$

$$C_d = 204\,000\,\mu g/ml/256$$

$$C_d = 796 \,\mu g/ml$$

Tubo #2

$$C_d = C_c/f_t$$

$$C_d = 204\,000\,\mu g/ml\,/1024$$

$$C_d = 199 \, \mu g/ml$$

Tubo #1

$$C_d = C_c/f_t$$

$$C_d = 204\,000\,\mu g/ml\,/4096$$

$$C_d = 49 \, \mu g/ml$$

Elaborado por:	Revisado por:
Ulises Armando Gaona Paccha	Dr. Luis Morocho Yaguana Mg. Sc



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA FACULTAD DE LA SALUD HUMANA CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

Anexos 15.- Evidencias fotográficas



Descripción: Planta de *Allium sativum*



Descripción: esterilización de extractor



Descripción: Se visualiza a *Candida glabrata* en agar CHROMOagar con su color malva característico



Descripción: Se visualiza a *Candida albicans* con su color característico en CHROMOagar.



Descripción.- Ajo triturado.



Descripción.- El ajo triturado con agua destilada sobre el agitador magnético.



Descripción.- 350 ml de extracto filtrado a las 24 horas



Descripción.- Extractos obtenidos luego la rotaevaporación.



Descripción.- Equipo liofilizador Labconco FreeZone



Descripción.- Extracto de ajo liofilizado



Descripción.- Elaboración de Agares.

Actividad antimicótica usando extracto de Allium sativum macerado, destilado, liofilizado



Descripción: Se evidencia que para *Candida glabrata* no hubo inhibición usando el extracto liofilizado



Descripción: Se verifica que *Candida albicans* no presenta sensibilidad usando el extracto liofilizado.

Actividad Antimicótica usando solución amortiguadora de fosfato (PBS)



Descripción: Se evidencia la nula actividad antimicótica de ésta técnica con *Candida albicans*



Descripción: Realizando el extracto acuoso usando un extractor



Descripción: Se observa 15 ml del extracto filtrado, listo para su uso.



Descripción: Realizando la CMF

Actividad antimicótica usando extractor aséptico: Técnica Kirby Bauer: Candida glabrata



Descripción:

CN: Agua destilada

CP: Anfotericina B (10µg/ disco)

Ensayo N°1: 8160 μg/ disco



Descripción:

CN: Agua destilada

CP: Anfotericina B (10µg/ disco)

Ensayo N°2: 8160 μg/ disco



Descripción:

CN: Agua destilada

CP: Anfotericina B (10µg/ disco)

Ensayo N°3: 8160 μ g/ disco

Actividad antimicótica; Técnica Kirby Bauer: Candida albicans



Descripción:

CN: Agua destilada

CP: Anfotericina B (10 µg/ disco)

Ensayo N°1: 8160 μg/ disco



Descripción:

CN: Agua destilada

CP: Anfotericina B (10 µg/ disco)

Ensayo N°2: 8160 μg/ disco



Descripción:

CN: Agua destilada

CP: Anfotericina B (10 µg/ disco)

Ensayo N°3: 8160 10 μg/ disco

Concentración Mínima Inhibitoria y Fungicida; Candida glabrata

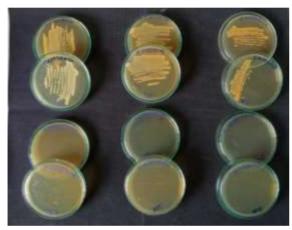


Descripción:

Ensayo N°1

Inhibición: 4to tubo

Concentración: 3 187 µg/ml



Descripción:

Ensayo $N^{\circ}1$

Crecimiento: Caja 1, 2 y 3

Sin crecimiento: Caja 4, 5 y 6

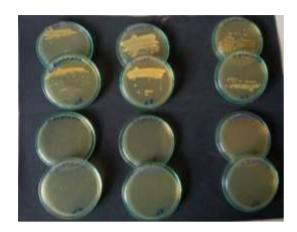


Descripción:

Ensayo N°2

Inhibición: 4to tubo

Concentración: 3 187 µg/ml



Descripción:

Ensayo N°2

Crecimiento: Caja 1, 2 y 3

Sin crecimiento: Caja 4, 5 y 6



Descripción:

Ensayo N°3

Inhibición: 4to tubo

Concentración: 3 187 μ g/ml



Descripción:

Ensayo N°3

Crecimiento: Caja 1, 2 y 3

Sin crecimiento: Caja 4, 5 y 6

Concentración Minima Inhibtoria y Fungicida; Candida albicans



Descripción:

Ensayo N°1

Inhibición: 4to tubo

Concentración: 3 187 µg/ml

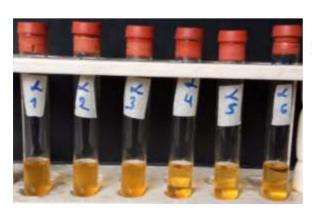


Descripción:

Ensayo N°1

Crecimiento: Caja 1, 2 y 3

Sin crecimiento: Caja 4, 5 y 6



Descripción:

Ensayo N°2

Inhibición: 4to tubo

Concentración: 3 187 µg/ml



Descripción:

Ensayo N°2

Crecimiento: Caja 1, 2 y 3

Sin crecimiento: Caja 4, 5 y 6



Descripción:

Ensayo N°3

Inhibición: 4to tubo

Concentración: 3 187 µg/ml

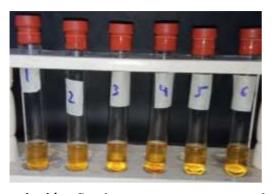


Descripción:

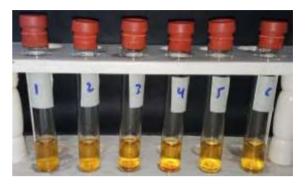
Ensayo N°3

Crecimiento: Caja 1,2 y 3

Sin crecimiento: Caja 4,5 y 6



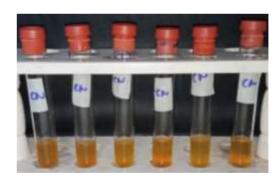
Descripción: Se observa en nuestro control Positivo la inhibición de *Candida albicans*, concentración de 0,09 μg/500μl



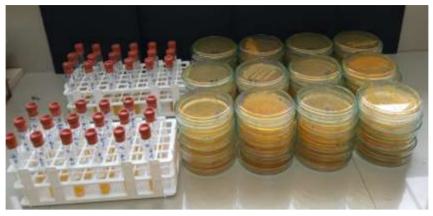
Descripción: Se observa en nuestro control Positivo la inhición del crecimiento a *Candida glabrata* a una concentración de 0,09µg/500µl



Descripción: Se observa nuestro control negativo en *Candida albicans*, se nota la nula inhibición



Descripción: Se observa nuestro control negativo en *Candida glabrata*, se nota la nula inhibición



Descripción: Se verifica las 72 cajas sembradas con los extractos CMF y los 36 tubos usados en la CMI.



Descripción: Se verifica las 72 cajas sembradas con los extractos CMF y los 36 tubos usados en la CMI.

Anexo 16. Oficios emitidos



Facultad de la Salud **Humana**

Loja, 16 de marzo de 2021

Ing.

María José Valarezo PhD

RESPONSABLE DEL LABORATORIO DE QUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

Ciudad. -

De mi consideración:

Yo, Ulises Armando Gaona Paccha portador de la cédula de identidad número 1150209748, estudiante de octavo ciclo de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Universidad Nacional de Loja, por medio del presente me dirijo a usted, para que se me autorice el ingreso al laboratorio de Fito-química que se encuentra ubicado en las instalaciones de la Universidad Nacional de Loja del barrio La Argelia y se me permita hacer uso de los equipos: centrífuga, incubadora, equipo liofilizador, horno de calor seco, refrigeradora, balanza, cabina de bioseguridad, desintómetro, probetas, mechero, cocineta, autoclave, pipetas, morteros, gradilla, matraces, dichos instrumentos son indispensables para mi investigación de Tesis, cuyo título es "Concentración mínima inhibitoria del extracto acuoso de Allium sativum en cepas de Candida albicans y Candida glabrata", con la dirección del docente Doctor Luis Morocho Yaguana. El mencionado proyecto se plantea realizarlo en el tiempo estimado desde el día 19 de marzo al 30 de abril del presente año, los días lunes, miércoles y viernes, con el horario matutino de 08:30 hasta las 13:00 horas.

Por la acogida favorable que tenga mi petición, le anticipo mis sinceros agradecimientos.

Atentamente.

Ulises Armando Gaona Paccha

C.I. 1150209748Correo institucional: ulises.gaona@unl.edu.ec

CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

Facultad de la Salud **Humana**

Of. Nro. 369- CCLC. ASH-UNL Loja, 27 de mayo del 2021

Sr. Doctor
Vladimir Morocho,
DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD
TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA UTPL.
Ciudad.

De mi especial consideración:

Dra. Sandra Elizabeth Freire Cuesta, GESTORA ACADÉMICA DE LA CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA, a Usted de la manera más comedida me dirijo para expresarle un cordial saludo y desearle éxitos en sus funciones educativas, aprovecho esta oportunidad para solicitarle de la manera más comedida, apoyo de la prestigiosa Institución Educativa a la que pertenece, para:

Se digne colaborarnos con asistencia técnica y equipo, para realizar la Liofilización del extracto de ajo de un volumen de 60 ml, distribuido en cinco tubos Falcon, con el propósito de contribuir al desarrollo del proyecto de tesis que se titula CONCETRACIÓN MINIMA INHIBITORIA DEL EXTRACTO ACUOSO DE ALLIUM SATIVUM EN ESPECIES DE C. ALBICANS Y C. GLABRATA que investiga el señor Ulises Armando Gaona Paccha, portador de cédula 1150209748 y egresado de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Universidad Nacional de Loja.

Por el trato favorable que se digne dar a mi petición, le expreso mis sentimientos de consideración y estima.

Del Señor Director del Departamento de Química de la UTPL.

Muy Atentamente.



Dra. Sandra Elizabeth Freire C.
GESTORA ACADÉMICA DE LA CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO DE LA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

c.c. /Archivo

Anexo 17. Factura de compra de Cepa de Candida glabrata

MEDIBAC-INC S.A. Dirección: Av. Victor Emilio Estrada 917 e Tianes (Urdesa) Teléfono: (04) 288 1424 - (04) 460 2999 Email: medibacipredibac.com Obiligado a llever contabilidad SI Agente de Retención Según Resolución NAC-DNCRASC20-00000001				R.U.C.: 0992401494001 FACTURA 001-002-000012879 NÚMERO DE AUTORIZACIÓN 1301202101099240149400120010020000128790000593110 FECHA Y HORA DE AUTORIZACIÓN 13/01/2021 09:46:01 a. m. AMBJENTE PRODUCCIÓN EMISIÓN NORMAL CLAVE DE ACCESO				
Identif: 1 Direct B	150209748 ARRIO LA BA lises.gaona@i	125000	DO Fecha Emisión: 13/ rmando23@gmail.com	/01/2021	Cludad: Guía de Remisión: Orden de Compra:			
Codigo	Contided		Descripcion				Decto	Precio Total
0985P	1	NOMBRE COMER NOMBRE GENER LOTE	CIAL: Candida glabrata ATC ICO: ELABORACIO		AD CANTIDAD	Unitario 204.00	0.00	204.0
SISTEMA F		ON DEL 22 RIA NO	slor Plazo 8.48 0 Tipo de Pago:	Tiempo dias	SUBTOTAL 12% 204.00 SUBTOTAL 0% 0.00 SUBTOTAL SIN IMPUESTOS 204.00 TOTAL Descuento 0.00 IVA 12% 24.48 VALOR TOTAL 228.48			
CONTAD				0	Observaciones:			
P		o Pichincha Ct			BAC-INC S.A. o depos Pacifco Cta Ahorros: Recibí Conforme:			8
Informacion Adicional: Orden de Compra: Hota de Entrada:					Nombre:			
Remisión: Apropi				Cédula:				

Av. Victor Emilio Estrada 916 e llanes (Urdesa) (04) 238 8597 PORTOVIEJO:

38 8597 PORTOVIEJO: Av. Universitaria y Honorio Villavicencio

Anexo 18. Certificado de traducción de Idioma



UNIDAD EDUCATIVA FISCOMISIONAL "PADRE JORGE ABIATAR QUEVEDO FIGUEROA"



Dominicas de Enseñanza de la Inmaculada Concepción Resolución 001 – 15 del 28 de julio del 2015

Lic. Patricio Javier Santin Bejarano

DOCENTE DE LENGUA EXTRANJERA UEF. P. JORGE ABIATAR QUEVEDO FIGUEROA.

CERTIFICA

Haber revisado la traducción al inglés del resumen de la Tesis, titulada "Concentración Mínima Inhibitoria del extracto acuoso de *Allium sativum* en cepas de *Candida albicans* y *Candida glabrata*", el cual es correcto y hace referencia al contenido del citado trabajo.

De la autoría del Sr. **Ulises Armando Gaona Paccha**, portador de cédula de identidad número **1150209748**, egresado de la carrera de Laboratorio Clínico de la Facultad de Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja.

Loja, 18 de noviembre de 2021

Lic. Patricio Javier Santin Bejarano

DOCENTE DE LENGUA EXTRANJERA

N° de Registro 1008-2016-1695857

Dirección: Calle 24 de mayo entre Simón Bolívar y Guillermo Bravo **Teléfono:** 072 664 117 **E-mail:** 1100937uef.pjorgeabiatar@gmail.com

GONZANAMÁ - LOJA - ECUADOR