



UNIVERSIDAD CATÓLICA LOS ÁNGELES
CHIMBOTE

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE ODONTOLOGÍA

COMPARACIÓN IN VITRO DEL EFECTO
ANTIFÚNGICO ENTRE LOS EXTRACTOS
HIDROETANÓLICOS DE *Rosmarinus officinalis*
(ROMERO) Y Propóleo SOBRE CEPAS DE
Candida albicans ATCC 10231, TRUJILLO - 2018

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
CIRUJANO DENTISTA

AUTORA:

MORENO ARÉVALO GINA JULIANA

ASESOR:

MGTR. VÁSQUEZ PLASENCIA CÉSAR ABRAHAM

TRUJILLO - PERÚ

2019

1. Título

COMPARACIÓN IN VITRO DEL EFECTO
ANTIFÚNGICO ENTRE LOS EXTRACTOS
HIDROETANÓLICOS DE *Rosmarinus officinalis*
(ROMERO) Y Propóleo SOBRE CEPAS DE
Candida albicans ATCC 10231, TRUJILLO - 2018

2. Equipo de Trabajo

Investigador Principal

Moreno Arévalo Gina Juliana

Asesor

Mgtr. Vásquez Plasencia César Abraham

3. Firma del jurado y asesor

Dr(a). AGUIRRE SIANCAS ELÍAS ERNESTO
PRESIDENTE

Mgtr. MORÓN CABRERA EDWAR RICHARD
MIEMBRO

Mgtr. PAIRAZAMÁN GARCÍA JUAN LUIS
MIEMBRO

Mgtr. VÁSQUEZ PLASENCIA CÉSAR ABRAHAM
ASESOR

4. Agradecimiento

Agradezco a Dios, por guiarme a hacer lo correcto en cada paso de mi vida, por permitirme progresar y salir adelante honradamente.

A mis padres Ida Arévalo y Santos Moreno, y a mi hermano Jorge Moreno, por el gran apoyo y esfuerzo que me brindaron durante toda mi carrera profesional.

A Elvis Campos, por estar siempre en los momentos más difíciles brindándome su apoyo y palabras de aliento.

A mi centro de estudios ULADECH, y a mis docentes que gracias a sus enseñanzas y motivación me han formado profesional y humanitariamente.

5. Dedicatoria

A Dios por haber permitido lograr culminar mi carrera profesional, por brindarme salud y bondad, logrando cumplir mis metas.

Con mucho amor a mis padres por la paciencia, comprensión y apoyo que siempre me brindaron. Por siempre creer y confiar en mí, impulsándome en los momentos más complicados de mi carrera y siempre estar conmigo.

A mis hermanos por su apoyo y comprensión en cada momento, porque siempre estuvieron conmigo brindándome palabras de aliento.

6. RESUMEN

Los productos naturales se han convertido en una de las mejores alternativas en el manejo de ciertas enfermedades, ya que se ha demostrado que muchas de ellas poseen gran efecto antimicrobiano, produce un menor efecto colateral y es más económico. El objetivo de este estudio fue comparar el efecto antifúngico del *Rosmarinus officinalis* (Romero) y el *Propóleo* sobre cepas de *Candida albicans* ATCC 10231. En el laboratorio de farmacognosia de la Universidad Nacional de Trujillo, se elaboraron los extractos hidroetanólicos de *Rosmarinus officinalis* y *Propóleo*, para lo cual en ausencia de luz se realizó la maceración durante una semana, se eliminó el alcohol en un rotavapor a presión reducida y a temperatura controlada, con el extracto seco se hizo las concentraciones al 75 y 50%, así como el extracto mixto. Se realizó el enfrentamiento microbiano utilizando el procedimiento de disco de difusión de Kirby Bauer, se realizaron 10 repeticiones por cada grupo experimental. El extracto hidroetanólico combinado de *Rosmarinus officinalis* + *Propóleo* al 75% presentó halos de inhibición de 16.80mm, el extracto hidroetanólico de *Rosmarinus officinalis* al 75% presentó halos de inhibición de 14.80mm, el extracto hidroetanólico de *Propóleo* al 75% presentó halos de inhibición de 13.30mm. Se comparó los halos de inhibición de los extractos utilizando el test de Kruskal Wallis encontrando diferencia estadísticamente significativa ($p=0.000$). Concluyendo que el extracto hidroetanólico combinado de *Rosmarinus officinalis* y *propóleo* al 75% presentó mayor efecto antifúngico contra *Candida albicans*.

Palabras clave: *Candida albicans*, cepas, extractos, Propolis, *Rosmarinus officinalis*.

7. ABSTRAC

Natural products have become one of the best alternatives in the management of certain diseases, since it has been shown that many of them have a great antimicrobial effect, produce a lesser collateral effect and are more economical. The objective of this study was to compare the antifungal effect of *Rosmarinus officinalis* (Romero) and Propolis on strains of *Candida albicans* ATCC 10231. In the pharmacognosy laboratory of the National University of Trujillo, the hydroethanolic extracts of *Rosmarinus officinalis* and Propolis were elaborated, for which in the absence of light the maceration was carried out for a week, the alcohol was eliminated in a rotavapor under reduced pressure and at a controlled temperature, with the dry extract the concentrations were made at 75 and 50%, as well as the mixed extract. The microbial challenge was performed using the Kirby Bauer diffusion disk procedure, 10 repetitions were performed for each experimental group. The combined hydroethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* + Propolis at 75% presented halos of inhibition of 16.80mm, the hydroethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* at 75% presented halos of inhibition of 14.80mm, the hydroethanolic extract of Propolis at 75% presented halos of inhibition of 13.30mm. The inhibition zones of the extracts were compared using the Kruskal Wallis test, finding a statistically significant difference ($p = 0.000$). Concluding that the combined hydroethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* and 75% propolis showed a greater antifungal effect against *Candida albicans*.

Key words: *Candida albicans*, strain, extracts, Propolis, *Rosmarinus officinalis*.

8. Contenido

1. Título de la tesis	ii
2. Equipo de Trabajo.....	iii
3. Hoja de firma del jurado y asesor.....	iv
4. Agradecimiento.....	v
5. Dedicatoria.....	vi
6. Resumen.....	vii
7. Abstrac.....	viii
8. Contenido.....	ix
9. Índice de tablas.....	x
10. Índice de gráficos.....	xi
I. Introducción.....	1
II. Revisión de la literatura.....	4
III. Hipótesis.....	21
IV. Metodología.....	22
4.1 Diseño de la investigación.....	22
4.2 Población y muestra.....	23
4.3 Definición y operacionalización de variables e indicadores.....	25
4.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	26
4.5 Plan de análisis.....	33
4.6 Matriz de consistencia.....	34
4.7 Principios éticos.....	35
V. Resultados.....	36
5.1 Resultados.....	36
5.2 Análisis de los resultados.....	38
VI. Conclusiones.....	42
Aspectos Complementarios.....	43
Referencias bibliográficas.....	44
Anexos.....	52

9. Índice de Tablas

Tabla 1. <i>Comparación del efecto antifúngico, in vitro, entre los extractos hidroetanólicos de Rosmarinus officinalis (Romero), y Propóleo sobre cepas de</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>ATCC</i>	
<i>10231</i>			36
Tabla 2. <i>Test de tukey, para la comparación de tratamientos relacionados</i>			37
Tabla 3. <i>Efecto antifúngico del extracto hidroetanólico de Rosmarinus officinalis “Romero” y Propóleo sobre Candida albicans ATCC 10231 determinado mediante el diámetro (mm) de los halos de inhibición del crecimiento</i>			53

10. Índice de Gráficos

Gráfico 1. *Comparación antifúngico, in vitro, entre los extractos hidroetanólicos de Rosmarinus officinalis (Romero) y Propóleo sobre cepas de Candida albicans ATCC 10231.....62*

I. INTRODUCCIÓN

La cavidad oral es una fuente para la colonización de microorganismos oportunistas como *Candida*. Pero no resultan ser patógenos debido a que la flora normal bacteriana y el sistema inmune prohíben que crezcan e impiden a la vez que estas se propaguen, equilibrándolo. Sin embargo, la candidiasis es una micosis primaria o secundaria ocasionada por levaduras endógenas y oportunistas del género *Candida*, especialmente el Complejo *Candida albicans*.¹

En diferentes partes del mundo se emplean las plantas y productos naturales como alternativa medicinal, ya que poseen propiedades tanto nutritivas como terapéuticas⁴. Estas plantas pueden ser utilizadas completa o algunos de sus órganos como raíces, tallos u hojas; procesadas para extraer sus aceites esenciales o extractos, y empleadas en la industria alimentaria, farmacológica, terapéutica entre otras.²

El Perú es muy rico en flora, fauna y recursos naturales entre ellos el *Propóleo* y el *Rosmarinus Officinalis* (romero), siendo estas una gran opción en la investigación para el manejo de algunas enfermedades que afectan a distintas partes del cuerpo, especialmente a nivel de la cavidad bucal. Por ello conforme transcurre el tiempo surgen cada vez nuevos descubrimientos científicos, en base a las propiedades antimicrobianas que posee el *Rosmarinus officinalis* y el *Propoleo*.^{3,4}

Por lo que con el pasar de los años se han elaborado cada vez más investigaciones científicas que brindan amplia información de las aplicaciones del *Rosmarinus officinalis* y el *Propóleo*.^{5,6} Se ha demostrado que el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* presenta propiedades antimicrobianas contra una variedad de agentes patógenos, posiblemente debido al alto contenido de 1,8-cineol.^{7,8} Así mismo, se ha puesto especial atención en el propóleos, producto natural que presenta propiedades medicinales. Propolis es el nombre genérico dado a la sustancia producida por las abejas obtenida a partir de sustancias resinosas de flores, brotes, y exudados de plantas, posee un amplio espectro de actividades biológicas, que están relacionadas con su composición química y más específicamente a los compuestos fenólicos que varían en su estructura y concentración.^{9,10}

Existen estudios que indican que los extractos de *Rosmarinus officinalis* así como de *Propóleo*, poseen actividad antifúngica debido a los componentes bioactivos que se han encontrado en ellos^{9,10}.

La investigación es de importancia pues, debido al aumento de casos afectados por esta enfermedad, es necesario buscar alternativas de tratamiento, entre ellos empleándose también los hechos a base de productos naturales, ya que se ha demostrado que estos productos hechos en extractos poseen un amplio espectro contra este tipo de hongos, y sobre todo como son naturales poseen un menor efecto colateral y a su vez estas son mucho más económicos, por lo estarían al alcance de personas con

recursos económicos escasos.^{9,10}

El estudio se trazó la siguiente pregunta ¿Cuál es el efecto antifúngico entre los extractos hidroetanólicos de *Rosmarinus officinalis* (Romero) y de *Propóleo* sobre cepas de *Candida albicans* ATCC 10231.^{9,10}

Por lo que el propósito de la presente investigación es comparar el efecto antifúngico *in vitro* entre los extractos hidroetanólico del *Rosmarinus officinalis* y *Propóleo* sobre cepas *Candida albicans* ATCC 10231 en acción combinada como por separado. El diseño fue experimental, prospectivo y transversal. Se realizaron 10 repeticiones por cada grupo experimental. La evaluación del efecto de los extractos hidroetanólico de Romero y propóleo se realizó mediante el método Kirby Bauer, de difusión en agar. Los discos fueron colocados sobre las placas de Müeller Hinton, durante 24 horas las placas estuvieron en posición invertida a 37°C. El extracto hidroetanólico combinado de *Rosmarinus officinalis* + *Propóleo* al 75% presentó halos de inhibición de 16.80mm, el extracto hidroetanólico de *Rosmarinus officinalis* al 75% presentó halos de inhibición de 14.80mm, el extracto hidroetanólico de *Propóleo* al 75% presentó halos de inhibición de 13.30mm. Se comparó los halos de inhibición de los extractos utilizando el test de Kruskal Wallis encontrando diferencia estadísticamente significativa (p=0.000). Se concluye que el extracto hidroetanólico combinado de *Rosmarinus officinalis* y *Propóleo* al 75% presentó mayor efecto antifúngico.

II. REVISION DE LA LITERATURA

2.1. Antecedentes

Solano L¹¹. (Ecuador, 2018) Efecto antifúngico del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. “romero” sobre cepas de *Candida albicans* atcc10231 comparado con fluconazol. Teniendo como objetivo realizar un experimento in vitro para evaluar el efecto antifúngico del aceite esencial de la hoja del *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) comparado con fluconazol a la concentración de 25 µg, sobre cepas de *Candida albicans* ATCC 10231. Se realizaron cuatro diluciones del aceite esencial (100%, 75%, 50% y 25%), fluconazol a 25 µg y un control neutro con DMSO; se realizaron 10 repeticiones por cada grupo de estudio. Se obtuvo que el aceite esencial de la hoja de *Rosmarinus officinalis* L. muestra halos de inhibición a partir de la dilución al 75% 12,7 mm, al 100% 14.7 mmm. El análisis estadístico ANOVA indicó que los resultados del estudio fueron altamente significativos (0.000), al igual que la prueba de Tukey demostró que los grupos evaluados eran homogéneos y el grupo de fluconazol tenía mayor efecto antifúngico. Se observa que a mayor concentración del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*, el halo de inhibición aumenta. Se concluye que el aceite esencial de la hoja de *Rosmarinus officinalis* L. tiene efecto antifúngico sobre *Candida albicans* ATCC 10231, pero menor que fluconazol, pudiendo ser utilizado como un medicamento coadyuvante en el tratamiento de *Candida albicans*.

Vallejos Campos E¹². (Perú, 2017) Efecto antifúngico *in vitro* del extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis* “Romero” contra *Cándida albicans*. Teniendo como objetivo determinar el efecto antifúngico del extracto acuoso del *Rosmarinus officinalis* (romero) contra *Candida albicans* realizando un estudio experimental. Se emplearon 12 unidades experimentales, se emplearon 6 concentraciones diferentes del extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis* y dos cepas de la especie de *C. albicans*. Con el método de dilución doble seriada se determinaron las diferentes concentraciones, para el efecto antifúngico se empleó el método de Kirby-Bauer y el método de difusión en pozo. Se emplearon 2g de residuo seco de *Rosmarinus officinalis*, se obtuvieron las siguientes concentraciones 40 mg/mL, 20 mg/mL, 10 mg/mL, 5mg/mL 2,5 mg/mL y 1,25 mg/mL. Presentó efecto antifúngico a 40 mg/mL, 20 mg/mL, 10 mg/mL respectivamente. Se concluye que el extracto acuoso de hojas de *Rosmarinus officinalis* tiene efecto antifúngico contra *Candida albicans*.

Espinoza P¹³ (Quito, 2017) Efecto antifúngico *in vitro* del extracto de Propóleo ecuatoriano comparado con la Nistatina sobre la *Cándida albicans*. Teniendo como objetivo Determinar *in vitro* la actividad antifúngica sobre la *Candida Albicans* del extracto de *Propóleo* ecuatoriano comparado de la nistatina. Se obtuvieron los extractos etanólicos de *Propóleo* por medio de la técnica de dilución en alcohol y filtrado, se realizó la filtración en un papel filtro Whatman N° 1 sobre un

frasco de cristal y se lo almacenó en condiciones oscuras a temperatura ambiente hasta el momento de su utilización. El medio de cultivo que se utilizó fue agar sabouraud dextrosa, se realizó la inoculación con el método de isopado. Posterior se embebió en los discos las concentraciones de los extractos, luego fueron colocados en 15 cajas en filas unos a lado de otros dentro de la cámara de cultivo a una temperatura de 37°C por el lapso de 48 horas. Teniendo como resultado halos de inhibición de 8mm, al 50%, halos de inhibición de 10mm, al 100% y la Nistatina presento halos de inhibición dde 25mm. Concluyendo que el efecto antifúngico sobre la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231 fue mayor para la sustancia de origen químico (Nistatina) y fue en menor medida para el extracto de *Propóleo* ecuatoriano al 30% y al 15% respectivamente.

Ramírez T. y Vilcapaza M¹⁴. (Puno, 2016) Efecto inhibitorio del extracto de propóleo sobre los microorganismos Streptococcus mutans Y Cándida albicans que colonizan la cavidad oral en pacientes adultos de la clínica odontológica, una Puno – 2016. UNAP. Teniendo como objetivo determinar el efecto inhibitorio del extracto de *Propóleo* al 25%, 50%, 75%,100 %, sobre *Streptococcus mutans* y *Candida albicans*. Las muestras se obtuvieron de la cavidad oral de pacientes adultos de la Clínica Odontológica, UNA Puno, analizándose en 40 placas Petri. En el laboratorio Orion se realizó el extracto de *Propóleo*, para el cual se macero durante 15 días con alcohol etílico, se filtró y con el extracto seco

se hizo las diferentes concentraciones.

Se tomaron muestras de los pacientes de saliva colocándolos en frascos rotulados, y muestras de dentina obtenidas con ayuda de una cureta de dentina colocándolos en medio de transporte de biolitos. Se hizo el enfrentamiento utilizando el método de disco de difusión de Kirby Bauer. El extracto de *Propóleo* al 50% presento halos de inhibición de 6,95mm, al 75% presento halos de inhibición de 8.6mm y al 100% presento halos de inhibición de 11.85mm. Concluyendo que a mayor concentración poseen, estos presentan un mayor efecto inhibitorio siendo el extracto al 100% el de mayor efecto contra la *Candida albicans*.

Vásconez G¹⁵. (Ecuador, 2016) Efecto anti fúngico “in vitro” de aceite esencia y extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) sobre *Candida albicans* cepa ATCC 10231. Teniendo como objetivo evaluar el efecto antifúngico del aceite esencial y extracto alcohólico del *Rosmarinus officinalis* en concentraciones de 100%, 75%, 50% sobre cepas de *Candida albicans*, para lo cual se sembró en agar Sabouraud utilizando el método de difusión en pocillos con las soluciones, dando como resultado que el extracto alcohólico del *Rosmarinus officinalis* “Romero” presenta actividad antifúngica sobre cepas de *Candida albicans* siendo este más efectivo que el aceite esencial del *Rosmarinus Officinalis*, pero ambas si tienen poder antifúngico contra este hongo. Los resultados que se obtuvieron fueron halos de inhibición en promedio 9,10 mm en 50% de

extracto alcohólico del *Rosmarinus officinalis*, 12,5 mm en 75% de extracto alcohólico del *Rosmarinus officinalis*, 14,73 mm en 100% de extracto alcohólico del *Rosmarinus officinalis*, el halo de inhibición generado por el aceite esencial fue de 9,2 mm. Se determinó que al 100% tiene sensibilidad media, al 75%,50% y25% sensibilidad limite, al 15% es nula.

De la Cruz M¹⁶. (Perú, 2013) Actividad antimicótica del extracto etanólico de propóleo sobre el crecimiento in vitro de *Candida albicans*. Teniendo como objetico conocer la actividad antimicótica del extracto etanólico de *Propóleo* a 4 concentraciones sobre el crecimiento in vitro de *candida albicans*. Se obtuvieron las muestras de *Propóleo* peruano de la región de Lambayeque, elaboraron las concentraciones al 25, 50, 75 y 100% en el departamento de Microbiología de la facultad de medicina de la UNT, para el cual se maceró durante 7 días, se eliminó el alcohol por medio de una estufa a 50° C, realizando con el extracto las concentraciones. Realizaron el enfrentamiento microbiano por medio del método de difusión Kirby Bauer. Compararon los halos de inhibición utilizando la prueba t de Student. Obtuvieron como resultados que el extracto etanólico de *Propóleo* al 25% presentó halos de inhibición de 7.5mm, al 50% presentó halos de inhibición de 8.4mm, al 75% presentó halos de inhibición de 8.4mm, al 100 % presentó halos de inhibición de 10mm y la Nistatina presento halos de inhibición de 22mm, concluyendo

que el extracto de *Propóleo* al 100% presenta mayor efectividad antimicótica contra *Candida albicans*, sin embargo no supera al poder de la Nistatina que presenta un mayor efecto antimicótico.

Londoño et al¹⁷. (México, 2007) Estudio de la actividad antifúngica de un extracto de propóleo de la abeja *Apis mellifera* proveniente del estado de México. Teniendo como objetivo evaluar la acción inhibitoria de un extracto etanólico al 15% de *Propóleo* de la abeja *Apis mellifera* procedente del apiario de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, sobre el crecimiento de *Candida albicans* (ATCC 14055), realizaron mediante dos pruebas de susceptibilidad: difusión en agar y microdilución. Se obtuvo como resultado que el extracto etanólico al 15% si presento efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las levaduras *Candida albicans* (ATCC 14055, siendo este obtenido mediante las pruebas de susceptibilidad de difusión en agar y microdilución.

2.2. Bases teóricas de la investigación

2.2.1. FITOTERAPIA

Con el pasar del tiempo el uso de las plantas medicinales ha ido en aumento, esta se ha convertido para muchas personas en una de las primeras opciones de tratamiento en ciertas enfermedades, debido a sus altos poderes curativos que presentan.¹⁶

Entonces en eso se basa la fitoterapia, en el uso de estas plantas, las cuales tienen poder medicinales, debido a los ingredientes activos que poseen cada una de ellas llegando aliviar síntomas e incluso poseen efectos curativos.¹⁶

De acuerdo con los principios de la fitoterapia, una planta contiene una serie de compuestos farmacológicamente activos que deben considerarse como una sola unidad. El extracto completo puede ser estandarizado y clínicamente probado para una condición clínica particular. Esta característica diferencia la fitoterapia de la farmacoterapia convencional químicamente hablando, los compuestos naturales pueden conducir a las sustancias activas, no solo permitiendo la planificación y diseño de nuevos fármacos, sino que también pueden conducir al desarrollo de la síntesis biomimética (utilizada como precursores).¹⁷

2.2.2. ROSMARINUS OFFICINALIS (ROMERO)

a) Descripción

El romero (*R. officinalis* L.) es una planta mediterránea cuyo término se deriva del griego “(rhops y myrinos)” que significa “arbusto marino” por su crecimiento cercano a las costas. Corresponde a la familia de plantas Lamiaceae (Labiatae Labiadas), es un arbusto aromático, de hojas perennes, leñosas y muy ramificadas, rico en principios activos. Por lo general como es muy fácil de cultivarse puede crecer en cualquier lugar, el tamaño es muy variante llegando a crecer hasta un metro de altura. Sus flores son pequeñas llegando a tener un color entre azul y violeta claro, las hojas son puntiagudas de color verde y se encuentran de forma cruzada en el tallo.^{11,17}

Especialmente el extracto de *Rosmarinus officinalis* (Romero), fue demostrado ser uno de los productos herbales más populares que se han consumido como agente aromatizante y antioxidante en la conservación de alimentos y cosméticos. En muchos países, el romero se utiliza frecuentemente como planta medicinal en las medicinas tradicionales y modernas para tratar las complicaciones de la diabetes e hipertensión.^{11,17}

b) Cultivo

La mejor forma de reproducir o multiplicar y es por esqueje, siendo este una parte de la planta, en este caso el tallito del romero, el cual será

trasplantado formando raíces. Estos deben ser por lo menos de unos quince centímetros y desarrollados. Puede desarrollarse en cualquier parte, no es necesario un tipo de suelo específico, pero en los suelos fértiles esta se desarrolla con un aroma muy débil a diferencia de estar cultivada en un lugar pedregoso o arenoso, ahí la planta crece aromática.¹⁸

c) Composición

Los polifenoles son compuestos químicos antioxidantes principalmente responsables de la coloración de la fruta, que se clasifican como ácidos fenólicos, flavonoides y no flavonoides. Además de sus propiedades antioxidantes, desempeñan un papel muy importante en las defensas de las plantas contra herbívoro, patógeno y depredadores; por lo tanto, tienen una aplicación en el control de agentes infecciosos en humanos. En *R. officinalis*, los polifenoles más comunes son apigenina, diosmina, luteolina, genkwanina y ácidos fenólicos (> 3%), especialmente ácido rosmarínico, ácido clorogénico y ácido cafeico.^{18,19}

Otros compuestos importantes comunes en el *Rosmarinus officinalis* (romero) son los terpenos, generalmente presentes en aceites esenciales y resinas, que incluyen más de 10,000 compuestos divididos en mono, di, tri y sesquiterpenos, dependiendo del número de átomos de carbono y grupos de isopreno (C_5H_8). Es posible encontrar terpenos de romero como epirosmanol, carnosol, ácido carnósico (diterpenos tricíclicos: ácido ursólico y ácido oleanólico (triterpenos).^{18,19}

Sin embargo, el ácido carnósico, que se convierte en carnosol por oxidación, tiene propiedades fisicoquímicas, térmicas y fotolábiles, que pueden evitarse mediante una extracción con fluido supercrítico (operación a baja temperatura).^{18,19}

d) Actividad Anti infecciosa

La mayoría de las plantas producen metabolitos secundarios antimicrobianos, ya sea a partir de su curso normal de crecimiento y desarrollo, o en respuesta al estrés o al ataque de patógenos. El uso de aceites esenciales representa una nueva forma de reducir la proliferación de microorganismos. *Rosmarinus officinalis L.* se usa ampliamente en la actualidad como conservante de alimentos y es conocido por su potente actividad antibacteriana.¹⁹

El uso creciente de antibióticos en la medicina, la agricultura y el ganado ha contribuido en gran medida al aumento de múltiples microorganismos resistentes a los fármacos. La resistencia a los antimicrobianos es un problema de salud pública mundial, y los investigadores han estado participando cada vez más en esta área en la demanda de nuevos bioactivos antimicrobianos eficaces.¹⁹

Además de las propiedades antibacterianas, los aceites esenciales también tienen actividades insecticidas, antiparasitarias y antifúngicas, que son importantes para el control de enfermedades humanas de origen microbiano.¹⁹

2.2.3. **PROPÓLEO**

a) Definición

El *Propóleo* es un complejo resinoso producido por las abejas *Apis mellifera* L. cuya variedad de propiedades farmacológicas se debe a la complejidad de su composición. En odontología, el *propóleo* se utiliza en la prevención de enfermedades orales como la caries dental y la gingivitis.²⁰ El *propóleo* es preparado por las abejas para sellar las grietas, paredes lisas y mantener la humedad y temperatura estable en la colmena. El *propóleo* es una sustancia natural pegajosa que es recogida por las abejas de la resina de Flores, hojas de árboles y plantas y se obtiene después de mezclar con su saliva.^{20,21}

b) Composición

Los componentes principales del *propóleo* son:

- **Resina:** La resina es una savia de árboles que a menudo deja las ramas y troncos de árboles en la primavera. Las abejas recogen las resinas de la planta en la colmena.^{20,21}
- **Cera:** La cera es un material amarillento, suave y altamente absorbible, que generalmente es producido por la abeja. Las ceras contienen ésteres, ácidos, alcoholes altos en grasa y en ocasiones hidrocarburos libres.^{20,21}
- **Polen de flores:** El polen de las flores tiene un tremendo valor

alimenticio y contiene más de 96 nutrientes diferentes. La composición exacta del polen recolectado por la abeja depende de la flor de la que se recogido. El polen de las flores es rico en aminoácidos esenciales, vitaminas, sales minerales y hormonas.^{20,21}

- **Fenoles:** Los fenoles se utilizan como antisépticos en medicina. La alta acidez de ellos está entre las propiedades únicas.^{20,21}

Compuestos fenólicos de hierbas contienen flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, estilbenos, curcuminoides, cumarinas y quininas. Estos compuestos son responsable de antioxidantes, anticancerígenos, anti mutagénicos y propiedades antiinflamatorias del propóleo.^{20,21}

Los flavonoides se encuentran entre los principales polifenoles en los propóleos. Los flavonoides son considerados como criterio para evaluar la calidad de propóleos. Según la estructura química, los flavonoides son clasificados en flavonas, flavonoles, flavononas, flavononoles, chalcones, dihidrocalconas, isoflavonas, isodihidroflavonas, flavanos, isoflavanos, neoflavonoides y glucósidos flavonoides (muy compuestos raros).^{20,22}

- **Terpenos:** Todas las plantas producen metabolitos primarios y secundarios que disponemos de una amplia gama de funciones. Metabolitos primarios contienen aminoácidos, azúcares simples, ácidos nucleicos y lípidos, los cuales todos son esenciales para el

proceso celular.^{23,24}

Los metabolitos secundarios contienen compuestos que se producen en respuesta para acentuar e incluir terpenos, alcaloides y compuestos fenólicos. Entre estos, los terpenos tienen el mayor número y puede actuar como mensajero secundario que afecta a la expresión de los genes implicados en los mecanismos de defensa de la planta. Los terpenos también tienen antimicrobianos y antimicóticos (*Candida albicans*).^{23,24}

- **Hidrocarburos:** Los hidrocarburos son los componentes principales de los propóleos. En reciente años, alcanos, alquenos, alcadinas, monosasters, diésteres, los ésteres aromáticos, ácidos grasos y esteroides han sido identificados en propóleos de diferentes regiones geográficas.²⁴
- **Minerales:** Investigaciones han demostrado que los elementos raros (como el calcio, magnesio, aluminio, carbono, hierro, manganeso, níquel y zinc), así como elementos tóxicos (mercurio, carburo y plomo). Se han encontrado por emisión atómica / espectroscopia de absorción en propóleos recogidos de diferentes regiones.²⁴
- **Carbohidratos:** El origen de los carbohidratos en el propóleo aún no ha sido conocido. El néctar y la miel son fuentes de glucosa, fructosa. y sacarosa. Adicionalmente, las resinas contienen muchos azúcares,

azúcares, alcoholes y ácidos que se consideran fuentes potenciales de Azúcar en propóleo.^{20,21}

- **Vitaminas:** Según los estudios, las vitaminas E, C, B1, B2, B6 han sido identificados en propóleos. Vitaminas B1 (Tiamina) y B2 (La riboflavina) encontrada en los propóleos es detectable con alto rendimiento. Cromatografía líquida (HPLC). La fuente de estas dos vitaminas son el polen de las flores.²⁴

c) **Propiedades físico-químicas**

El *Propóleo* posee una consistencia no específica en función a la temperatura, si está expuesta al calor posee una consistencia pegajosa, y si por el contrario está expuesto al frío se torna dura. En cuanto al color se puede decir que es cambiante, porque se observa que hay desde amarillo bajito a un color casi negro. Su olor es regularmente delicioso y dulce. No se disuelve en agua y poco soluble en alcohol, cloroformo o éter.²⁵

d) **Acción antifúngica del *Propóleo***

Los antimicóticos se utilizan para el tratamiento y prevención de infecciones fúngicas. Comúnmente, estos medicamentos antimicóticos se prescriben para la infección micótica de la piel, el cabello, las uñas y la candidiasis oral. Además, se utilizan como terapia de apoyo para pacientes que sufren de estomatitis de la prótesis y se agregan a los acondicionadores del tejido de la prótesis.²⁵

2.2.4. CANDIDIASIS

La candidiasis es una infección micótica común causada con mayor frecuencia por *Candida albicans* y puede ocurrir como candidiasis vulvovaginal o candidiasis bucal, o una candidiasis mucocutánea. La candidiasis ocurre con frecuencia en los recién nacidos, en personas inmunodeficientes como los pacientes con SIDA y en personas que reciben tratamiento con antibióticos de amplio espectro. Se debe principalmente a *C. albicans*, mientras que otras especies como *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. krusei* están cada vez más aisladas.²⁶

2.2.5. CANDIDA ALBICANS

Candida albicans es el principal patógeno fúngico oportunista que causa infecciones en los seres humanos, desde lesiones superficiales de la mucosa hasta la candidiasis diseminada o en el torrente sanguíneo. La candidiasis superficial no siempre presenta un riesgo para la vida del huésped infectado, sin embargo, reduce significativamente la calidad de vida. Las infecciones superficiales por *Candida* son difíciles de tratar y su frecuencia de aparición está aumentando actualmente.^{26,27}

a) Infecciones por *Candida albicans*

El estado natural de *Candida albicans* es colonizar la mucosa digestiva y

vaginal. Una de las características de *C. albicans*, en contraste a los de bacterias en el tracto digestivo, es que está adaptado para colonizar todos los segmentos desde la cavidad bucal hasta el ano. Según su estado, 20 a 80% de los sujetos están colonizados en un momento dado con variaciones en el tiempo para el mismo.^{26,27} La candidiasis ocurre en el 90% de los pacientes infectados por el VIH con SIDA. Estas cifras indican la frecuencia del transporte de *C. albicans* en la mucosa humana.^{26,27}

b) Características

Es un hongo dimorfo que puede ser sea comensal o un patógeno oportunista con la facultad de causar distintas infecciones logrando poner en riesgo la vida. Existen factores de riesgo que incitan a tener una infección por *Cándida albicans* teniendo principalmente a pacientes que se encuentren recibiendo terapias inmunosupresoras, antibioticoterapia, VIH, etc. La *C. albicans* penetra partes del cuerpo tales como piel, uñas, boca, mucosa y vagina, a su vez también en materiales como prótesis, implantes, etc.^{26,27}

c) Reservorio

El lugar donde se aloja este hongo es en Humano ya sea en la piel, cavidad oral, sistema genitourinario, tracto gastrointestinal, en las heces o las deyecciones del hombre.²⁹

d) Mecanismo de propagación y transmisión

Transmisión endógena por contacto a través de la piel y las mucosas y por inoculación accidental o mordedura. Es responsable de casos de enfermedad nosocomial.^{26,27}

2.2.6. CANDIDA ALBICANS ATCC 10231

a) Morfología

En agar YEPD después de 2 días a 25 ° C, las colonias son de color crema, brillantes y lisas. Las colonias más viejas muestran una estructura tipo filamentos en el margen y pueden tener crestas o carpetas. Las células son ovoides (3.0-6.0 x 4.0-8.0 µm), en gemación, principalmente aisladas y raramente agrupadas en cultivos jóvenes. Las células se alargarán y formarán pseudohifas ramificadas similares a cadenas en cultivos más antiguos.²⁸

b) Condiciones de crecimiento

- **Temperatura:** 24 ° C a 26 ° C
- **Ambiente:** típico aeróbico²⁸

2.2.7. NISTATINA

La nistatina es un agente antimicrobiano con propiedades fungicidas y fungistáticos, que desde su descubrimiento en 1951, ha sido utilizada en formulaciones tópicas para el tratamiento de la candidiasis oral. La droga se obtiene por fermentación utilizando cultivos de *Streptomyces noursei*. Dado que es un polieno, se une al ergosterol, un componente de la membrana citoplásmica fúngica, y causa cambios en la permeabilidad celular.²⁹

a) Mecanismo de acción

La nistatina es un medicamento perteneciente al grupo de los macrólidos poliénicos, el cual irrumpe la permeabilidad de la membrana del hongo al formar canales en la misma, impidiendo su crecimiento. Presenta un amplio espectro antifúngico, incluyendo dermatofitos y levaduras, aunque su acción sobre dermatofitos es sólo moderada.²⁹

III. HIPÓTESIS

El extracto hidroetanólico de *Rosmarinus Officinalis* (Romero), posee mayor efecto antifúngico que el extracto hidroetanólico de *Propóleo* sobre cepas de *Candida albicans* ATCC 10231.

IV. METODOLOGÍA

4.1 Diseño de la investigación

- **Experimental:** Porque se va a valorar el efecto de un hongo, donde el investigador manipula las condiciones de la investigación.³⁰ El estudio manipula las concentraciones de *Rosmarinus officinalis* (romero) y *Propóleo* observando el efecto antifúngico sobre el crecimiento de *Candida albicans*.
- **Transversal:** Porque realiza observaciones en un momento único en el tiempo dentro del estudio.³⁰ Se realizó las mediciones en un solo tiempo a las 24 horas.
- **Prospectivo:** Porque mide la variable dependiente cuando se inicie el estudio³⁰. Porque se midió el efecto antifúngico sobre *Candida albicans*, cuando se inició el estudio.
- **Analítico:** Porque consiste en la desmembración de un todo, descomponiéndolo en sus partes o elementos para observar las causas, la naturaleza y los efectos.³⁰ Porque en el estudio se relacionó el extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) y *Propóleo* y el efecto antifúngico sobre *Candida albicans*.

4.2 Población y muestra

- **Población:** La población estuvo conformada por el conjunto de placas Müeller Hinton sembradas con 100 ul de suspensión bacteriana de *Candida albicans* ATCC 10231.

- **Criterio de Selección:**

Criterios de Inclusión: Placas petri inoculadas con cepas de *Candida albicans*.

Criterios de exclusión: Placas petri con Halos de inhibición no claro.

Placas petri de *Candida albicans* con signos de contaminación.

Placas petri de *Candida albicans* obsoletas de reestablecerse en el medio de cultivo.

- **Muestra:**

Tamaño de Muestra

Para determinar el tamaño de la muestra, por ser experimental se empleó la siguiente formula

$$n = 2 \left(Z_{\frac{\alpha}{2}} + Z_{\beta} \right)^2 (DE)^2 / d^2$$

Dónde:

n : Tamaño de muestra para el grupo de estudio.

α : Probabilidad de cometer error tipo I.

β : Probabilidad de cometer error tipo II.

Z : Valor estándar de la distribución normal asociada a un tipo de error.

DE: Desviación estándar.

d : Diferencia entre promedios para rechazar igualdad de medias.

Requerimientos:

De una confianza al 99% ($\alpha=0.01$, $Z=2.57$), y una potencia en la prueba del 80% ($\beta=0.20$, $Z=0.84$), para ($DE/d=0.65$).

$$n = 2(2.57 + 0.84)^2(0.65)^2$$

$$n = 10$$

4.3 Definición y operacionalización de variables e indicadores

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADORES	VALOR FINAL	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICIÓN
VARIABLE INDEPENDIENTE Extracto hidroetanólico	Un extracto es una sustancia obtenida por extracción de una parte de una materia prima, a menudo usando un solvente como etanol o agua.	Sustancia antifúngica en base a <i>Rosmarinus officinalis</i> y <i>Propóleo</i> a diferentes concentraciones.	Concentraciones de Extracto hidroetanólico de <i>Rosmarinus officinalis</i> .	Extracto hidroetanólico de <i>Rosmarinus officinalis</i> al 50 y 75%.	Cualitativo	Ordinal
			Concentraciones de Extracto hidroetanólico de <i>Propóleo</i>	Extracto hidroetanólico de <i>Propóleo</i> al 50 y 75%.		
			Concentraciones de Extracto hidroetanólico de <i>R. Officinalis</i> más <i>Propóleo</i> .	Extracto hidroetanólico de <i>R. Officinalis</i> más <i>Propóleo</i> al 50 y 75%		
VARIABLE DEPENDIENTE Efecto antifúngico sobre el crecimiento de <i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i> es un hongo diploide asexual. Habitualmente se encuentra en la cavidad oral, en el tracto gastrointestinal y en la vagina. Tiene una función relevante en la digestión de los azúcares, mediante un proceso de fermentación.	Sensibilidad del patógeno oral usando el método de disco de difusión de Kirby Bauer.	Halos de inhibición	Mm	Cuantitativo	De Razón

4.4 Técnicas e Instrumentos de recolección de datos

4.4.1. Técnica:

- Observación microbiológica.

4.4.2. Instrumentos:

- Ficha de recolección de datos: Para la evaluación antifúngica del extracto hidroetanólico de *Rosmarinus officinalis* y *Propóleo* sobre cepas de *Candida albicans* ATCC 10231. (Anexo 2)
- Regla Mitutoyo digital vernier serie 500 (calibre digital absoluto): Para medir el efecto antifúngico se utilizó una regla calibrador vernier digital marca Mitutoyo con ISO de calidad (17025). (Anexo 3)

4.4.3. Procedimiento:

a) Recolección de la muestra de *Propóleo* y *Rosmarinus officinalis* (romero)

El *Propóleo* se obtuvo de la localidad de Huangamarca distrito de Otuzco, provincia de Otuzco, región La Libertad, se recolectó el 1 de enero del año 2018 (Verano) y el Romero se recolectó del distrito de Trujillo provincia de Trujillo, región La Libertad, el 3 de enero del año 2018 (Verano).

b) Taxonomía

La recolección del *propóleo* se realizó mediante el método de entrampado¹⁵, ya que nos ofrece mejor calidad y menos contaminación de

la muestra. Luego el *propóleo* se colocó en frasco de vidrio estéril.

Una rama incluyendo la flor de la planta de *Rosmarinus officinalis* (romero) se transportó al Herbarium Truxillense de la Universidad Nacional de Trujillo para su identificación taxonómica.

c) Transporte

El transporte del *propóleo* se realizó en un cooler. Luego las muestras vegetales (*Propóleo* y *Rosmarinus officinalis*) se llevaron a la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNT en el laboratorio de farmacognosia.

d) Elaboración del extracto Hidroetanólico de *Propóleo*

Previo al preparado del extracto etanólico de *propóleo*, se eliminó todas las basuritas contenidas en este como fue virutitas de madera, partes de abejas, restos de vegetales. Posteriormente el *propóleo* fue fraccionado en trozos de 2 cm aproximadamente y fueron colocados en refrigeración a 0 °C por 24 horas para solidificarlas.

Posteriormente se realizó la pulverización con un mortero de porcelana hasta obtener polvo. Después el polvo se tamizó empleando el tamiz N° 0.75 (Prufsieb) uniformizando las partículas. Posteriormente se colocó en un frasco de color ámbar.

Se pesó 150g de polvo de *propóleo* y se colocó en un frasco de vidrio ámbar de boca ancha esterilizado. Posteriormente se colocó etanol al 70% 2cm sobre la muestra. Se realizó la mezcla considerando que este no debe

invadir más de las $\frac{3}{4}$ partes del frasco. Se realizó la maceración por una semana sin luz, agitándose diez min dos veces por día. Pasado los 7 días de maceración se procedió a realizar la filtración del líquido al vacío, con papel de filtro Whatman N°1, colocado en el embudo de Buchner. Luego se colocó en el frasco de vidrio ámbar el extracto obtenido. Se realizó la evaporación del extracto en un rotavapor (Heidolph WB 2000) a una temperatura no mayor a 50°C a presión limitada.

Por último, el extracto llevó a secar a la estufa a 40 °C colocados en capsulas de porcelana, denominando al producto resultante como extracto seco. Con este extracto se preparó las concentraciones de 75% y 50% disueltas en etanol al 70%. Finalmente, los extractos etanólicos se guardaron en recipientes de vidrio de color ámbar y en refrigeración (4-8°C) hasta su uso.^{1,2}

e) Preparación de la muestra vegetal de *Rosmarinus officinalis*

Selección: Una vez recolectadas las hojas de *Rosmarinus officinalis*, se escogieron las hojas que se encuentren en buenas condiciones, que no tengan o hayan tenido hongos, ni estén marchitas.

Lavado y desinfección: Se lavó las hojas de romero con agua destilada, se procedió a desinfectar estas hojitas con hipoclorito de sodio al 0.5 %. Posteriormente se enjuagó con abundante agua destilada sacando el hipoclorito contenido en las hojitas de *Rosmarinus officinalis* (Romero).

Secado: Las hojas de *Rosmarinus officinalis* fueron colocadas en papeles Kraft, luego se llevó a secar a una estufa de circulación de aire por convección forzada (40 °C) por 48 horas.

Pulverización y tamización: Con ayuda de un molino se realizó la pulverización del *Rosmarinus officinalis* hasta obtener polvo. Posteriormente se procedió a tamizarlo, empleando el tamiz N° 0.75 (Prufsieb).

Almacenamiento: El polvo quedante se colocó en un recipiente de vidrio de boca ancha de color ámbar.

f) Preparación del extracto Hidroetanólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis*

En un recipiente esterilizado de color ámbar de boca ancha de 4 litros de capacidad de vidrio, se colocaron 200gr de polvo de hojas. Posteriormente se colocó etanol al 70% 2cm sobre la muestra. Se realizó la mezcla considerando que este no debe invadir más de las $\frac{3}{4}$ partes del frasco. Se realizó la maceración por 7 días sin luz, agitándose diez minutos dos veces por día.

Pasado los 7 días de maceración se realizó la filtración del líquido al vacío, con papel de filtro Whatman N°1, colocado en el embudo de Buchner. Luego se colocó en el frasco de vidrio ambar el extracto obtenido.

Se hizo la evaporación en un rotavapor (Heidolph WB 2000) a una temperatura no mayor a 50°C y a presión limitada. Por último, el extracto llevó a secar a la estufa a 40 °C colocados en capsulas de porcelana, denominando al producto resultante como extracto seco.

Con este extracto se preparó las concentraciones de 50% y 75% disueltas en etanol al 70%. Finalmente, los extractos etanólicos se guardaron en recipientes de vidrio de color ámbar y en refrigeración (4-8°C) hasta su uso.^{1,2}

g) Preparación de la mezcla de los extractos Hidroetanólicos de *Propóleo* y *Rosmarinus officinalis* (Romero).

Los extractos etanólicos de *propóleo* y romero, se mezclaron en proporciones de 1:1.

h) Preparación de las concentraciones del extracto Hidroetanólico de *Rosmarinus officinalis* (Romero) y *Propóleo*

A partir del extracto etanólico *Rosmarinus officinalis* y *Propóleo* obtenido se procedió a preparar la concentración que fueron empleados en la investigación, como sigue:

Extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* de 75% y 50% v/v.

Extracto hidroetanólico de *Propóleo* de 75% y 50% v/v.

1. Protocolos Microbiológicos

a) Reactivación de la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231.

Para este estudio se utilizó cultivo liofilizado de la cepa de *Candida albicans* 10231.

La reactivación se realizó el sembrando el cultivo liofilizado en tubo con 5 mL de Caldo Sabouraud, luego se incubó a 37°C por 24 – 48 horas.

Para evaluar pureza se sembró por estría en Agar Sabouraud e incubo a 37°C por 24 – 48 horas. Posteriormente se realizó coloración gram.

La cepa se mantuvo en caldo BHI y en Agar Sabouraud, hasta su posterior utilización.

b) Estandarización del inóculo de *Candida albicans* ATCC 10231.

Las cepas de *C. albicans* ATCC 10231 mantenidos en Caldo BHI y Agar Sabouraud se sembraron en Agar Sabouraud, e incubó a 37°C durante 24 horas, con el fin de obtener colonias jóvenes.

Luego, de 24 horas cada colonia de *C. albicans* ATCC 10231 se colocó en caldo BHI y se hizo suspensiones con una turbidez semejante al tubo número 0.5 del Nefelómetro de Mac Farland (1.5×10^8 bact./mL).

c) Inoculación

Dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de la turbidez del inóculo (1×10^8 ufc/ml), se tomó una alícuota de 100µl y se colocó en cada una de

las placas con Agar Müeller Hinton suplementado con 2 % de glucosa (AMHG), con un hisopo estéril sumergido en la suspensión se distribuyó la suspensión bacteriana en tres direcciones asegurando la distribución del inóculo en la placa.

Por unos tres a cinco minutos se secó la placa a temperatura ambiente.

d) Enfrentamiento microbiológico

La evaluación del efecto de los extractos etanólico de *Rosmarinus Officinalis* y *Propóleo* se hizo mediante el método de difusión en agar Kirby Bauer.²⁶ Realizándose de la siguiente manera:

Se acondicionaron los discos de papel filtro whatman número 3 estériles, los cuales con una micropipeta fueron embebidos con 30 ul de cada una de las concentraciones de, 75% y 50% v/v del extracto hidroetanólico de *Rosmarinus Officinalis* y 75% y 50%v/v del extracto hidroetanólico de *Propóleo*. Luego, con una pinza estéril, se colocan los discos sobre las placas de Müeller Hinton (AMHG) inoculadas con la cepa de *C. albicans* ATCC 10231.

e) Incubación

Después de haber colocados las sustancias a evaluar dentro de los 15 min posteriores, se incubo las placas en posición invertida a 37°C durante 24 horas.

f) Lectura de los resultados

Pasado el tiempo de incubación se evaluó cada placa y se realizó la medición de diámetros de los halos de inhibición alrededor de cada disco.

Se realizó 10 repeticiones.

4.5 Plan de análisis

Los datos experimentales fueron ingresados en bases de datos en IBM SPSS Statistics versión 23, trabajándose con la prueba estadística Kruskal wallis. Se realizó esta prueba debido a que los valores obtenidos para nuestro estudio (*Rosmarinus officinalis* (Romero), *Propóleo*, *Rosmarinus officinalis* (Romero) más *Propóleo* y Nistatina) no sigue una distribución normal es decir, debe utilizar una prueba no paramétrica. Los datos fueron organizados y presentados en tablas y gráficos estadísticos para su análisis e interpretación, considerando un nivel de significancia estadística ($p < 0.05$)

4.6 Matriz de consistencia

PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	METODOLOGÍA	POBLACIÓN
<p>¿Cuál es el efecto antifúngico entre los extractos hidroetanólicos de <i>ROSMARINUS OFFICINALIS</i> (Romero) y <i>PROPÓLEO</i> sobre cepas de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231</p>	<p>Objetivo General Comparar el efecto antifúngico, <i>in vitro</i>, entre los extractos hidroetanólicos de <i>ROSMARINUS OFFICINALIS</i> (Romero) y <i>PROPÓLEO</i> sobre cepas de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231</p> <p>Objetivos Específicos:</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Evaluar el efecto antifúngico, <i>in vitro</i>, del extracto hidroetanólico de <i>Rosmarinus officinalis</i> (Romero) sobre <i>Candida albicans</i> ATCC10231 ➤ Evaluar el efecto antifúngico, <i>in vitro</i>, del extracto hidroetanólico de <i>Propóleo</i> sobre <i>Candida albicans</i> ATCC10231 ➤ Evaluar el efecto antifúngico, <i>in vitro</i>, del extracto hidroetanólico mixto de <i>Rosmarinus officinalis</i> (Romero) y <i>Propóleo</i> sobre <i>Candida albicans</i> ATCC10231 ➤ Comparar el efecto antifúngico, <i>in vitro</i>, de los extractos hidroetanólicos de <i>Rosmarinus officinalis</i> (Romero) y <i>Propóleo</i> vs. Nistatina. 	<p>El extracto hidroetanólico de <i>Rosmarinus officinalis</i> (Romero), posee mayor efecto antifúngico que el extracto hidroetanólico de <i>Propóleo</i> sobre cepas de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.</p>	<p>Tipo de investigación Conforme a las características y a los resultados, se determinó que es un estudio de tipo cuantitativo.</p> <p>Nivel de investigación Es una investigación de nivel explicativo.</p> <p>Diseño de la investigación Experimental, analítico, transversal y prospectivo.</p>	<p>Población La población estuvo conformada por el conjunto de placas Müeller Hinton sembradas con 10 ul de suspensión bacteriana de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.</p> <p>Muestra La muestra estuvo conformada por n = 10 repeticiones para cada tratamiento.</p>

4.7 Principios éticos

El presente estudio de investigación es un estudio, *in vitro*, que se realizó en placas Petri, los cultivo micóticos utilizados en la investigación fueron tratados en autoclave (método físico de eliminación de microorganismos), siendo expuestas a 121°C y 1 Bar de presión, antes de ser eliminados como residuos biocontaminados.

La investigación respeta los principios detallados en el código de ética considerados por la Universidad Católica los Ángeles Chimbote

V. RESULTADOS

5.1 Resultados

Tabla 1: Comparación del efecto antifúngico, *in vitro*, entre los extractos hidroetanólicos de *Rosmarinus officinalis* (Romero), y Propóleo sobre cepas de *Cándida albicans* ATCC 10231.

CONCENTRACIÓN	N	HALO \bar{X}	Desviación típica	Intervalo de confianza para la media al 95%		p*	
				Límite inferior	Límite superior		
Rosmarinus officinalis (Romero)	50%	10	9.30	0.48	8.95	9.65	0.000
	75%	10	14.80	0.92	14.14	15.46	
Propóleo de apis mellifera	50%	10	2.80	4.52	-0.43	6.03	
	75%	10	13.30	0.82	12.71	13.89	
Romero + Propóleo	50%	10	11.90	1.85	10.57	13.23	
	75%	10	16.80	0.79	16.24	17.36	
Nistatina	10	27.70	0.67	27.22	28.18		

p*: prueba de Kruskal Wallis

Nivel de significancia estadística ($p < 0.05$)

Fuente: Datos proporcionados por el investigador.

Se aplicó la prueba no paramétrica, debido a que los valores obtenidos no siguen una distribución normal. (Anexo 1).

Se comparó el efecto antifúngico entre los extractos hidroetanólicos de *Rosmarinus officinalis* (romero) (50% y75%), *Propóleo* (50% y75%) y *Romero-Propóleo* (50% y75%) frente a cepas de *Candida albicans* ATCC 10231; en *Rosmarinus officinalis* (romero) al 50% se obtuvo una media 9.30mm y al 75% se obtuvo una media 14.80mm; en *Propóleo* al 50% se obtuvo una media 2.80mm y al 75% se obtuvo una media 13.30mm; (*Romero + Propóleo*) al 50% se obtuvo una media 11.90mm y al 75% se obtuvo una media 16.80mm; la nistatina obtuvo una media de 27.70mm. Se utilizó la prueba KRUSKAL WALLIS y se obtuvo $p=0.000$, lo cual indica que existe diferencia estadística significativa entre los tipos de concentración.

Tabla 2: Test de tukey, para la comparación de tratamientos relacionados.

HSD de Tukey		Subconjunto para alfa = 0.05					
Grupos	N	1	2	3	4	5	6
P-50%	10	2,80					
R-50%	10		9,30				
RP-50%	10		11,90	11,90			
P-75%	10			13,30	13,30		
R-75%	10				14,80	14,80	
RP-75%	10					16,80	
Nistatina	10						27,70
Sig.		1,000	0,059	0,680	0,607	0,264	1,000

*Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.
Fuente: Datos proporcionados por el investigador.*

Podemos indicar que en test de Tukey, se obtuvo 6 columnas en donde están los subconjuntos y en la filas están los extractos romero al 50% 75%, *propóleo* al 50% y 75%, Mezcla de *Rosmarinus officinalis* y *Propóleo* al 50%, Mezcla de *Rosmarinus officinalis* y *Propóleo* al 75%; por último la Nistatina.

Donde podemos indicar que la medias que se encuentran en una sola columna como son: En la columna 1, el *Propóleo* 50%,

En la columna 6, la nistatina; de los anteriores indicar que las medias presentan una diferencia significativa.

Por otro lado:

En la columna 2, el romero 50% con la mezcla romero y *propóleo* al 50%.

En la columna 3, la mezcla romero y *propóleo* al 50% con el *propóleo* al 75%, en la columna 4, el *propóleo* al 75% con el romero 75%, en la columna 5 el romero 75% con la mezcla romero y *propóleo* al 75%, de los anteriores indicar que las medias no presentan una diferencia significativa.

5.2 Análisis de los resultados

El presente estudio de investigación, se realizó con el propósito de comparar el efecto antifúngico, “*in vitro*”, entre los extractos hidroetanólicos de *Rosmarinus officinalis* “Romero” y *Propóleo* sobre cepas de *Candida albicans*, el cual se realizó sembrando el cultivo liofilizado en caldo de Sabouraud.

Los resultados indicaron que existió diferencia significativa entre los extractos, siendo mejor el efecto antifúngico del extracto hidroetanólico combinado de *Propóleo* más *Rosmarinus officinalis* (Romero) en mayor concentración. Esto podría deberse a que ambos poseen como principio activo a los flavonoides²⁰, el cual constituye un amplio grupo de compuestos fenólicos procedentes del metabolismo secundario de los vegetales, estas sustancias están encargadas de proteger y aumentar las defensas del cuerpo.

Existen varios estudios publicados, donde se demuestra que el extracto de *Rosmarinus officinalis* (Romero) y *Propóleo* presentan efecto antifúngico.

Con el presente estudio se determinó la efectividad antifúngica del extracto hidroetanólico de *Rosmarinus officinalis* (Romero), en el cual los resultados que se obtuvieron fueron que el extracto en concentración al 50% obtuvo halos de inhibición de 9.30mm y al 75% presentó halos de inhibición de 14.80mm, coincidiendo con el estudio que realizó **Vasconéz¹¹ (2016)**, ya que el obtuvo halos de inhibición de 9,10 mm en

concentración de 50% y 12,5 en concentración de 75%, teniendo una diferencia insignificativa. Estos resultados pueden deberse al nivel de concentración empleado, a mayor concentración mayor será el efecto antifúngico que el extracto presente.

Vallejos E¹² (2017) determinó el efecto antifúngico in vitro del extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis* contra *C. albicans*, para el cual empleo dos métodos antifúngicos, siendo el método de Kirby Bauer y el método de difusión en pozo. Obteniendo como resultado que por el método de difusión en pozo se obtienen resultados inhibitorios, a diferencia del método de Kirby Bauer en el cual evidenciaron que las cepas de *C. albicans* no fueron sensibles ante ninguna de las concentraciones ensayados en la prueba. Dichos resultados defiere del presente trabajo de investigación debido a que el método q se empleó fue el de Kirby Bauer obteniendo como resultado halos de inhibición contra la *C. albicans*. Se puede suponer que el extracto acuoso de las plantas empleando el papel filtro whatman N°41 no permite la difusión de los principios activos, sin alcanzar a cumplir el efecto, a diferencia del presente estudio que se realizó un extracto hidroetanólico en el cual se activaron los principios activos presentando efecto antifúngico contra la *Candida albicans*.

A su vez se ha demostrado que los aceites esenciales de *Rosmarinus officinalis* (romero) poseen gran efecto antifúngico, al igual que los extractos frente a este hongo, coincidiendo con el estudio realizado por

Solano L¹³ (2018), este estudio demuestra que a mayor concentración mayor efectividad, esto puede ser debido a que elaboró el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* (romero) empleando el método de destilación mediante vapor de agua, mientras que en el extracto alcohólico de *R. officinalis* se empleó el método de difusión en agar, este extracto etanólico se obtiene macerando el romero en etanol, por lo que se extrae los compuestos solubles en este alcohol. El extracto no tiene las mismas moléculas que en el aceite esencial, pero si poseen la misma capacidad inhibitoria, y por ende los aceites esenciales poseen también una gran actividad antimicrobiana debido a su variada composición molecular.

Por otra parte **Ramírez y Vilcapaza¹⁴ (2016)**, en el 2016 determinan el efecto inhibitorio del extracto de *Propóleo* sobre *Candida albicans* que colonizan en la cavidad oral, en el cual las muestras fueron obtenidas de pacientes que acudieron a la clínica odontológica UNA, obteniendo como resultado que el extracto de *Propóleo* al 50% presento halos de inhibición de 6,95mm, al 75% presento halos de inhibición de 8.6mm y al 100% presento halos de inhibición de 11.85mm, estos resultados pueden deberse al nivel de concentración empleado, coincidiendo con el autor quien nos indica que a mayor concentración poseen mayor será el efecto antifúngico que estos presenten.

De la Cruz¹⁵ (2013), determinó la actividad antimicótica del extracto etanólico de *Propóleo* sobre el crecimiento de *Candida albicans*,

coincidiendo con este estudio en lo que se refiere a procedimiento, debido a que se emplearon los mismo método de difusión, el mismo cultivo, mismo tiempo de maceración, etc, indicando que el *Propóleo* en mayor concentración presenta mayor efecto antifúngico contra la *Candida albicans*. Sin embargo existen estudios en el cual nos demuestran que a pesar de tener bajas concentraciones en los extractos se obtiene como resultados una respuesta inhibitoria media, como así nos indica **Espinoza P¹⁶ (2017)** y **Londoño et al¹⁷ (2007)**, determinaron el efecto antifúngico del extracto de *Propóleo* sobre *Candida albicans*, abarcando concentraciones de 15% y 30%, obteniendo halos de inhibición de entre 8mm y 10mm respectivamente, su actividad antifúngica puede ser de origen geográfico. Espinoza también evaluó el efecto antifúngico de la Nistatina contra cepas de *Candida albicans*. Con respecto al efecto inhibitorio de la Nistatina el presente estudio coincide con el de este autor, ya que el obtuvo halos de inhibición de 25mm y el presente estudio presentó halos de inhibición de a 27,70mm, demostrando así que la *Candida albicans* son sumamente sensibles frente a este antibiótico.

Concluyendo que la Nistatina presentó halos de inhibición de mayor diámetro a diferencia de los otros dos grupos, concluyendo que este medicamento presenta mayor efecto antifúngico, pero a la vez produce efectos colaterales al consumo a nivel gastrointestinal a diferencia de los antifúngicos naturales.

VI. CONCLUSIONES

- Al comparar los extractos hidroetanólicos de *Rosmarinus officinalis* (Romero) y *Propóleo*, se concluyó que el extracto hidroetanólico de *Rosmarinus officinalis* presenta efecto antifúngico mayor que el extracto hidroetanólico de *Propóleo*.
- En la combinación de los extractos hidroetanólicos de *Rosmarinus officinalis* (Romero) y *Propóleo* (al 50 y 75%), se concluyó que el extracto hidroetanólico de *Propóleo* + *Rosmarinus officinalis* (Romero) al 75% presenta halos de inhibición mayor que el extracto hidroetanólico de *Propóleo* + *Rosmarinus officinalis* al 50%.
- Al comparar los extractos hidroetanólicos de *Rosmarinus officinalis* (Romero) y *Propóleo* vs. la Nistatina, el que presentó una mayor efectividad antifúngico, in vitro, sobre cepas de *Candida albicans* ATCC 10231 fue la Nistatina.

ASPECTOS COMPLEMENTARIOS

- Se recomienda realizar estudios de citotoxicidad de la planta de *Rosmarinus officinalis* y el *Propóleo* sobre bacterias orales.
- Realizar estudios, que determinen el efecto antifúngico contra *Candida albicans*, mediante colutorios dentales elaborados a base *Rosmarinus officinalis* (Romero) y *Propóleo*, así mismo también se puede investigar la acción preventiva que podría poseer estos colutorios frente a enfermedades bucales comunes tales como caries dental, gingivitis, etc.
- Ejecutar estudios que comparen el efecto antifúngico de extractos de *Rosmarinus officinalis* (Romero) y *Propóleo*, en las diferentes estaciones del año.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Domingo D y López M. Plantas con acción antimicrobiana. Rev Española de Quimioterapia. 2003; 16(4): 385-393. Disponible en: <http://www.seq.es/seq/0214-3429/16/4/385.pdf>
2. Avellaneda S, Rojas N, Cuellar R y Fonseca R. Actividad antibacteriana de *Diphysa minutifolia* Rose. Rev Cubana Plant Med. 2005; 10 (2): 1-10. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S102847962005000200004
3. Tovalino M, Sacsquispe S, Ceccarelli J y Alani J. Propóleo Peruano: Una nueva alternativa terapéutica antimicrobiana en Estomatología. Rev Estomatológica Herediana. 2012; 22(1): 50-5. Disponible en: <http://www.upch.edu.pe/vrinve/dugic/revistas/index.php/REH/article/view/159>
4. Koo H, Rosalen P, Cury J, Park Y, Ikegaki M y Sattler A. Effect of *Apis mellifera* propolis from two brazilian regions on caries development in desalivated rats. Caries Res. 1999; 33(5): 393- 400. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10460964>
5. Bonifaz, A. Micología Médica Básica. 3era Ed. Cap. 21. Parte 5. Pp. 279-302. Editorial McGraw Hill. 2010.

6. Mahmoud L. Actividad biológica del propóleo de abeja en la salud y la enfermedad. *Asian Pac J Cancer Prev.*2006; 7:22-31.
7. Guilarte C, Pardi G, De Stéfano A, Pacheco A y Dinatale E. CASUÍSTICA DE LAS MICOSIS DE LA CAVIDAD BUCAL, REPORTADAS EN EL LABORATORIO DE LA CÁTEDRA DE MICROBIOLOGÍA, FACULTAD DE ODONTOLOGÍA, U.C.V. (1997-2001). *Rev Odontol Venezolana* [serie en internet]. 2003 [citada 30 abril 2017]; 43(1). Disponible en: https://www.actaodontologica.com/ediciones/2005/1/casuistica_micosis_cavidad_bucal.asp
8. Estrada S. Determinación de la actividad antibacteriana in vitro de los extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*) y tomillo (*Tymus vulgaris*). Tesis para optar el título de Bioquímico Farmacéutico. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.2010. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/699/1/56T00229.pdf>
9. Teixeira L. Avaliação do uso do extrato de alecrim de jardim (*Rosmarinus officinalis* Linn) no controle do biofilme dental. Tesis para optar el título de Cirujano Dentista. Universidad Federal de Paraná.2012. Disponible en [:http://www.odontologia.ufpr.br/bancotcc/CD_14/Lucimari%20Teixeira.pdf](http://www.odontologia.ufpr.br/bancotcc/CD_14/Lucimari%20Teixeira.pdf)

10. Farré R, Frasset I, Sánchez A. El propolis y la salud. *Ars Pharmaceutica*. 2004; 45(1):21- 43. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/3759/375939022006.pdf>
11. Solano L. EFECTO ANTIFÚNGICO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Rosmarinus officinalis* L. “ROMERO” SOBRE CEPAS DE *Cándida albicans* ATCC10231 COMPARADO CON FLUCONAZOL. Tesis para obtener el título profesional de Médico cirujano. Universidad César Vallejo; 2018. Disponible en: http://repositorio.ucv.edu.pe/bitstream/handle/UCV/25513/solano_rl.pdf?sequence=1&isAllowed=y
12. Vallejo Elmer. EFECTO ANTIFÚNGICO *in vitro* DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Rosmarinus officinalis* “Romero” CONTRA *candida albicans*. Tesis para optar el título profesional de cirujano dentista. Universidad Señor de Sipán; 2017. Disponible en: <http://repositorio.uss.edu.pe/bitstream/handle/uss/4086/Vallejos%20Campos.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
13. Espinoza P. “EFECTO ANTIFÚNGICO IN VITRO DEL EXTRACTO DE PROPÓLEO ECUATORIANO COMPARADO CON LA NISTATINA SOBRE LA CÁNDIDA ALBICANS”. Proyecto de investigación presentado como requisito previo a la obtención del título de Odontólogo. Universidad Central de Ecuador; 2017. Disponible en:

<http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/15182>

14. Ramírez T y Vilcapaza M. EFECTO INHIBITORIO DEL EXTRACTO DE PROPÓLEO SOBRE LOS MICROORGANISMOS *Streptococcus mutans* Y *Cándida albicans* QUE COLONIZAN LA CAVIDAD ORAL EN PACIENTES ADULTOS DE LA CLINICA ODONTOLOGICA, UNA PUNO – 2016. UNAP. 2016. Disponible en: <http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/2987/ARTICULO.pdf?sequence=2&i%20sAllowed=y>
15. Vásquez G. Efecto anti fúngico “in vitro” de aceite esencia y extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) sobre *Candida albicans* cepa ATCC 10231. Tesis para obtener el título de cirujano dentista. Universidad Nacional de Chimborazo; 2016. Disponible en: <http://dspace.unach.edu.ec/bitstream/51000/3200/1/UNACH-EC-FCS-ODT-2016-0003.pdf>
16. De la Cruz M. “ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA DEL EXTRACTO ETANOLICO DE PROPOLEO SOBRE EL CRECIMIENTO IN VITRO DE *Candida albicans*”, Tesis para para el grado de Bachiller en Estomatología. Universidad Nacional de Trujillo; 2016. Disponible en: <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/587>
17. Londoño O, Penieres J, García C, Carrillo L, Quintero M, García S, Mendoza M y Cruz S. Estudio de la actividad antifúngica de un extracto de propóleo de la abeja *Apis mellifera* proveniente del estado

- de México. Tecnología en Marcha. 2008; 21(1): 49-55. Disponible en:
[file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/DialnetEstudioDeLaActividadAntifungicaDeUnExtractoDePropo-4835689%20\(7\).pdf](file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/DialnetEstudioDeLaActividadAntifungicaDeUnExtractoDePropo-4835689%20(7).pdf)
18. Bankova V, Popova M, Bogdanov S y Sabatini A. Chemical composition of European propolis: Expected and unexpected results. Z Naturforsch. 2002; 57(5-6):530-3. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12132697>
19. Musa, O y Chalchat J. Chemical composition and antifungal activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) oil from Turkey. Rev Internacional de Ciencias de la Alimentación. 2008; 59 (7):691-698.
Disponible en:
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09637480701777944>
20. Purca T. Efectividad antibacteriana «in vitro» del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) sobre la flora salival. Tesis para optar el título de Cirujano Dentista. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.2013. Disponible en:
http://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/03/880127/efectividadantibacteriana-in-vitro-del-extracto-etanolico-de-r_mnp4pV.pdf
21. Garcia y Ballester L. Eliminación de *Candida albicans* con extracto etanólico de propóleo comercial de *Apis mellifera* del estado Mérida, en bases de prótesis parciales Removibles. Rev Odontol de Los

- Andes.2014]; 9(2), 4-14. Disponible en:
<http://www.saber.ula.ve/bitstream/handle/123456789/39992/articulo1pdf;jsessionid=A13D5B89FB966BF062328D90E7A08680?sequence=1>
22. Martin M y Pileggi R. A quantitative analysis of Propolis: a promising new storage media following avulsion. Dent Traumatol [serie en internet]. 2004 [citada 30 abril 2017]; 20: 85- 9.disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15025690>
23. Cadena K. EFECTO ANTIMICÓTICO DEL EXTRACTO DE UNCARIA TOMENTOSA (UÑA DE GATO) CONTRA CÁNDIDA ALBICANS. ESTUDIO IN VITRO. Tesis para optar el grado de bachiller. Ecuador: UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR: 2017. Disponible en:
<http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/9436/1/T-UCE-0015-555.pdf>
24. Pardi G y Cardozo E. Algunas consideraciones sobre Candida albicans como agente etiológico de candidiasis bucal. Acta Odontol Venez. 2002; 40(1):9-17. Disponible en:
https://www.actaodontologica.com/ediciones/2002/1/algunas_consideraciones_candida_albicans.asp
25. Raissouni T. Estudio comparativo de la eficacia de varios tratamientos tópicos de la estomatitis aftosa recurrente. Tesis Doctoral: España; Universidad de Granada.2005. disponible en:

<http://digibug.ugr.es/bitstream/handle/10481/1663/16910114.pdf;jsessionid=6B2C14979C8B3E6E789EE3ABA180E923?sequence=1>

26. Clinical Laboratory Standard Institute. 2013. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty third Information Supplement. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2015; 33 (1) M100-S23. Disponible en: file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/CLSI_2015.pdf
27. Rodriguez J, Miranda J, Morejón H y Santana J. Candidiasis de la mucosa bucal. Rev Cubana Estomatol [Serie en internet].2002 [Citado 25 Octubre 2017]; 39(2). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003475072002000200007
28. ATCC Candida albicans (Robin) Berkhout (ATCC ® 10231™) The essentials of life science research [Serie en internet]. [Citado 25 Octubre 2017]. Disponible en: https://www.atcc.org/en/Standards/Quality_Control_Strains/Pharmaceutical_and_Personal_Care/10231.aspx#generalinformation
29. Lescano G, Pettigrosso R y Liabot J. Determinación de propiedades fisicoquímicas de Nistatina comercial empleando técnicas de caracterización de materiales. Rev. mex. cienc. Farm. [serie en internet]. 2014 [citada 30 abril 2017]; 45(2) disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-

01952014000200004

30. Hernández R, Fernández C y Baptista P. Metodología de la investigación McGraw-Hill, 2014.

ANEXOS

Anexo 1

Tabla 3: Efecto antifúngico del extracto hidroetanólico de *Rosmarinus officinalis* “Romero” y Propóleo sobre *Candida albicans* ATCC 10231 determinado mediante el diámetro (mm) de los halos de inhibición del crecimiento.

CONCENTRACIÓN	ROMERO		PROPOLEO		ROMERO + PROPOLEO		C+
	50%	75%	50%	75%	50%	75%	
REPETICIONES							
1.	9	16	0	14	9	17	28
2.	10	15	0	13	12	16	28
3.	9	14	0	14	12	16	26
4.	9	15	9	12	11	16	28
5.	9	13	10	14	10	17	28
6.	10	15	0	13	12	18	27
7.	9	15	0	13	12	17	28
8.	9	16	0	14	16	17	28
9.	10	15	9	14	12	18	28
10.	9	14	0	12	13	16	28
Shapiro-Wilk (Significancia)	0,000 No Normal	0,149 Normal	0,000 No Normal	0,008 No Normal	0,134 Normal	0,025 No Normal	0,00 No Normal

Prueba de Normalidad

Al tener menos de 50 datos por cada extracto y control, es recomendable usar la prueba de normalidad del Shapiro- Wilk, para evaluar la normalidad de los mismos, donde se observa una tendencia de los datos los cuales no sigue una distribución normal en su mayoría.

Anexo 2

Ficha de Recolección de Datos

ENSAYOS	EFECTO ANTIFÚNGICO (mm)						
	ROMERO		PROPOLEO		ROMERO + PROPOLEO		NISTATINA
	50%	75%	50%	75%	50%	75%	
1.							
2.							
3.							
4.							
5.							
6.							
7.							
8.							
9.							
10.							

Anexo 3

Regla Mitutoyo digital vernier: Para medir el efecto antifúngico se utilizó una regla vernier digital marca Mitutoyo caliper 0-150mm/0.01mm métrico/pulgada, 500-196-3 con ISO de calidad (170+25).



Anexo 4

Factura de compra: *Candida albicans* ATCC 10231



GenLab
del Perú SAC
Tecnologías para la Vida

RAZON SOCIAL: GEN LAB DEL PERU S.A.C.

Jr. Cápac Yupanqui N° 2434 Lince, Lima, Lima - PERU (Alt. Cdra. 8 Av. 2 de Mayo San Isidro)
Av. Las Flores de Primavera N° 849 Urb. Las Flores San Juan de Lunganchu, Lima, Lima
Central Telef. 203-7500 Telefax: (51-1) 203-7501
e-mail: ventas@genlabperu.com web: www.genlabperu.com

R.U.C. 20501262260

FACTURA

0003- N° 0003654

Fecha	Vencimiento	Condiciones de Pago	A.C.
23/05/2017	23/05/2017	CONTADO	56

Sr(es): **UNIVERSIDAD CATOLICA LOS ANGELES DE CHIMBOTE**

Dirección: **JR. TUMBES NRO. 247 CENTRO COMERCIAL Y FINANCIERO - CHIMBOTE SANTA ANCA**

R.U.C. **20319956043**

N° de O.C.: _____ N° de Guía de Remisión _____ N° Pedido **016738**

Att.: _____

COD.	DESCRIPCION	CANT.	P. UNIT.	IMPORTE
H03918-A	KWIK-STIK™ <i>Candida albicans</i> derived from ATCC® 10231™*	1	312.94000	312.94

Anexo 5

Factura de compra: Sabouraud Dextrose Agar 500 g



GenLab
del Perú SAC
Tecnología para la Vida

RAZON SOCIAL: GEN LAB DEL PERU S.A.C.

Av. Ciro Trujillo N° 204 Lima, Lima - PERU | Av. Ciro 8 Av. 2 de Mayo San Isidro
Av. Las Flores de Primavera N° 840 Urb. Las Flores San Juan de Lurigancho, Lima, Lima
Centro Tel: 203-7500 Telefax (51-1) 203-7501
e-mail: ventas@genlabperu.com web: www.genlabperu.com

R.U.C. 20501262260

FACTURA

0003- N° 0003664

Fecha	Vencimiento	Condiciones de Pago	A.C.
29/05/2017	29/05/2017	CONTADO	56

Sr(es): UNIVERSIDAD CATOLICA LOS ANGELES DE CHIMBOTE

Dirección: JR. TUMBES NRO. 247 CENTRO COMERCIAL Y FINANCIERO - CHIMBOTE SANTA ANCA

R.U.C. 20319956043 N° de Guía de Remisión Ped N°: 016785

N° de O.C.: Alt.: N° Pedido

COD.	DESCRIPCION	CANT.	P. UNIT.	IMPORTE
021071-A	Sabouraud Dextrose Agar 500 g Medium for yeasts and moulds isolation, E.P.	1	138.94000	138.94

SON: CIENTO SESENTA Y TRES CON 95/100 SOLES S.E.U.O.

CANCELADO / CANJEADO	SUB TOTAL	S/. 138.94
Lima, 29 de 05 de 17	1.619%	S/. 25.01
CANCELADO	TOTAL	S/. 163.95

p. GEN LAB DEL PERU S.A.C.

Por _____
DNI: _____

ADQUIRENTE O USUARIO

NOTA: DESPUÉS DE VENCIDO EL PLAZO DE CANCELACIÓN, SE RECARGARÁ EL INTERÉS LEGAL POR EL TIEMPO QUE TRASCURRA PARA LA CANCELACIÓN DE ESTA FACTURA. LOS CHEQUES DEBERÁN SER GIRADOS ÚNICA Y EXCLUSIVAMENTE GEN LAB DEL PERU S.A.C.

REPUBLICAS S.A. R.U.C. 20272514200 SERIE 0803 DEL 2001 al 4000 SUMAT. N° 12064087023 F.I. 30-12-2015

Anexo 6

EL DIRECTOR DEL INSTITUTO DE LA PAPA Y CULTIVOS ANDINOS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO

Hace constar que:

Las plantas de *Rosmarinus officinalis* (L.) “Romero”, que crecen dentro del área de investigación del Instituto, sito en el Campus de la Ciudad Universitaria, Universidad Nacional de Trujillo, son cultivadas de manera natural sin el uso de fertilizantes químicos, ni plaguicidas, catalogándose como un cultivo orgánico.

Trujillo, 10 de noviembre del 2017.

 
Dr. Eloy López Medina
DIRECTOR IPACA-UNT.

Anexo 7



Herbarium Truxillense (HUT)

Universidad Nacional de Trujillo
Facultad de Ciencias Biológicas
Jr. San Martín 392, Trujillo - Perú



Constancia N° 90 – 2017- HUT

EL DIRECTOR DEL HERBARIUM TRUXILLENSE (HUT) DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO.

Da Constancia de la determinación taxonómica de un (01) espécimen vegetal:

Clase: Equisetopsida
Subclase: Magnoliidae
Super Orden: Astéranas
Orden: Lamiales
Familia: Lamiaceae
Género: *Rosmarinus*
Especie: *R. officinalis* L.
Nombre vulgar: "romero"

Muestra alcanzada a este despacho por GINA JULIANA MORENO AREVALO, identificado con DNI N°70260995, con domicilio legal en Hipólito Unanue # 519, Los Granados - Trujillo; estudiante de la Facultad de Odontología de la Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote, cuya determinación taxonómica servirá para la realización del Proyecto de Tesis para optar Título de Cirujano Dentista: "COMPARACIÓN *in vitro*", DEL EFECTO ANTIFÚNGICO ENTRE LOS EXTRACTOS HIDROETANÓLICOS DE *Rosmarinus officinalis* "romero" Y *propóleo* SOBRE CEPAS DE *Candida albicans* ATCC 10231".

Se expide la presente Constancia a solicitud de la parte interesada para los fines que hubiera lugar.

Trujillo, 20 de Octubre del 2017



Dr. JOSÉ MOSTACERO LEÓN
Director del Herbario HUT

cc. Herbario HUT

Anexo 8

CONSTANCIA DE COLABORACIÓN

El que suscribe Marilú Roxana Soto Vásquez; docente investigador, doctora en Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo.

Hace constar, en la ejecución de la prueba piloto del estudio titulado "COMPARACIÓN *in vitro*", DEL EFECTO ANTIFÚNGICO ENTRE LOS EXTRACTOS HIDROETANÓLICOS DE *Rosmarinus officinalis* "Romero" Y *Propóleo* SOBRE CEPAS DE *Cándida albicans* ATCC 10231". Se colaboró en la elaboración de extractos hidroetanólicos.

Se expide la presente constancia a solicitud del interesado.

Trujillo, 13 de Diciembre de 2017




Dra. Marilú Roxana Soto Vásquez

DOCENTE INVESTIGADOR -UNT

Anexo 9

CONSTANCIA

Yo, Manuela Natividad Luján Velásquez, Biólogo – Microbiólogo docente de la Escuela de Microbiología y Parasitología, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo, con registro del CBP N° 2132.

Mediante la presente dejo constancia de estar asesorando a la alumna MORENO ARÉVALO GINA, en la parte microbiológica planteada en el proyecto de investigación titulado "COMPARACION DEL EFECTO ANTIFÚNGICO "IN VITRO" DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Rosmarinus officinalis* "Romero" Y PROPÓLEOS SOBRE *Candida albicans* ATCC 10231



Manuela Natividad Luján Velásquez

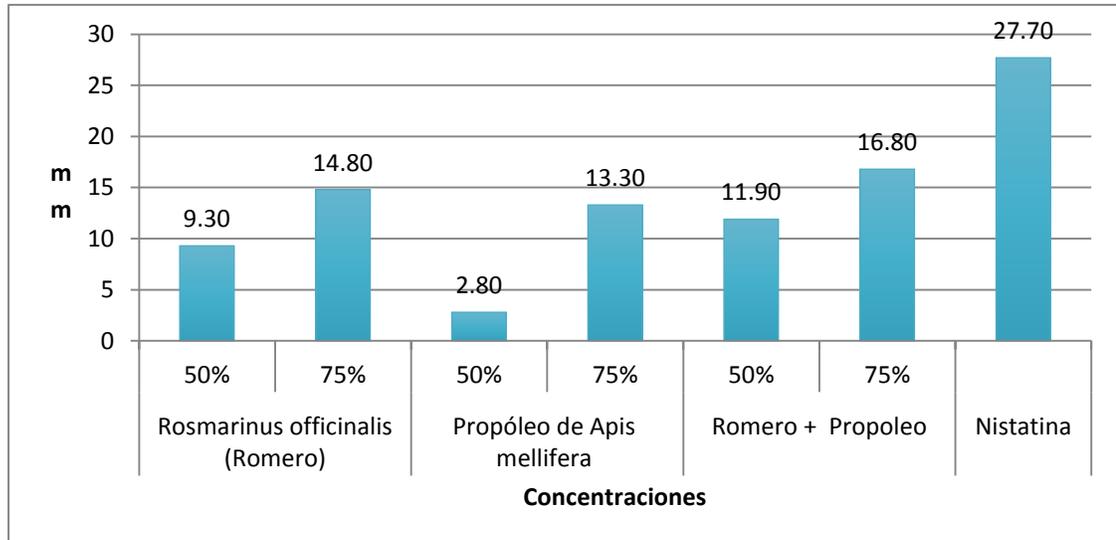
Docente de la Escuela de Microbiología y Parasitología
Universidad Nacional de Trujillo.

Dra. Manuela Natividad Luján Velásquez
CATEDRA DE INMUNOLOGÍA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO

Anexo 10

Grafico 1: Comparación antifúngico, *in vitro*, entre los extractos hidroetanólicos de *Rosmarinus officinalis* (Romero) y Propóleo sobre cepas de *Cándida albicans* ATCC 10231.

Fuente: Datos proporcionados por el investiga



Fuente: Datos obtenidos de la tabla 1.

Anexo 11

RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA DE *PROPÓLEO*



Quitando la rejilla
trampa de *Propóleo*



Recolectando el
Propóleo

PREPARACIÓN DEL EXTRACTO HIDROETANÓLICO DE *PROPÓLEO*



Desinfección de la mesa y los instrumentos de trabajo con alcohol al 96°.



Fraccionando el *propóleo* en trozos de 2cm aproximadamente.



Muestra de *propóleo* en refrigeración a 0°C por 24 horas para que se solidifiquen.



Se pesó 150 gr de *propóleo*.



Colocación en un frasco de vidrio ambar de boca ancha.



Midiendo en una probeta el grado de alcohol con ayuda de un alcoholímetro, obteniendo como resultado alcohol al 70%.



Añadiendo el etanol al 70% cantidad suficiente hasta cubrir la muestra, mezclándose bien.



Se tapó el recipiente y se maceró en ausencia de luz por 7 días



Residuos del *Propóleo*



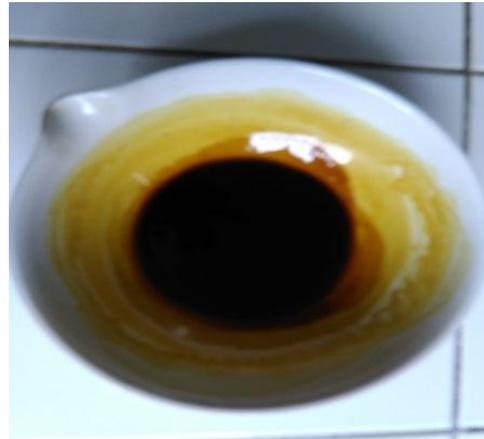
Extracto hidroetanólico de *Propóleo*.



Luego se coloca en el frasco de vidrio ambar el extracto obtenido.



Evaporando el extracto etanólico en el rotavapor



Extracto blando de *propóleo* después de sacar del rotavapor



Extracto seco de *propóleo* después de sacar de la estufa



Preparación de las concentraciones de *propóleo*



Obtención de las muestras obtenidas de *propóleo* al 50% y 75%, colocadas en frasquitos de vidrio de color ambar.

RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA DE *ROSMARINUS OFFICINALIS*



Recolectando el romero de la Universidad Nacional de Trujillo - Biohuerto de la Facultad de Educación.



Seleccionando las hojas que se encuentran en buenas condiciones.



Lavado de las hojas de *Rosmarinus Officinalis*.



Desinfección de las hojas utilizando Hipoclorito de Sodio al 0.5%.



Colocación de las hojas en papel Kraft.



Retirando los tallitos de las hojas para poder pulverizarlas.



Pulverización con ayuda de un molino.



Posteriormente se procedió a tamizarlo, empleando el tamiz N° 0.75 (Prufsieb).



Polvo obtenido de la Tamización de las hojas de *Rosmarinus officinalis*.



Se procedió a pesar 200 gr del polvo de las hojas de *Rosmarinus officinalis*.



Posteriormente el polvo obtenido y pesado, se guardó en un frasco de vidrio de boca ancha.

PREPARACION DEL EXTRACTO



Se añadió etanol al 70%. Cantidad suficiente hasta cubrir la muestra con ayuda de una probeta. Se realizó una buena mezcla.



Se tapó el recipiente y se maceró en ausencia de luz por 7 días.





Filtración del líquido al vacío, con papel de filtro Whatman N°1, colocado en el embudo de Buchner.



Residuo de Romero



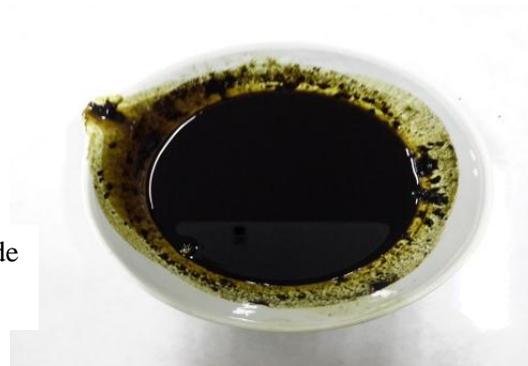
Luego se coloca en el frasco de vidrio ambar el extracto obtenido.

Extracto Hidroetanólico de las hojas de *Rosmarinus Officinalis*.

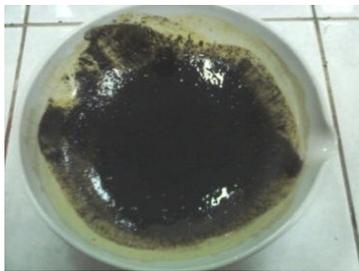




Evaporando el extracto etanólico en el rotavapor



Extracto blando de romero después de sacar del rotavapor



Extracto seco de romero después de sacar de la estufa



Preparación de las concentraciones de romero



Obtención de las muestras obtenidas de Romero al 50% y 75%.

Obtención de las muestras obtenidas de la mezcla de Romero más Propóleo al 50% y 75%.

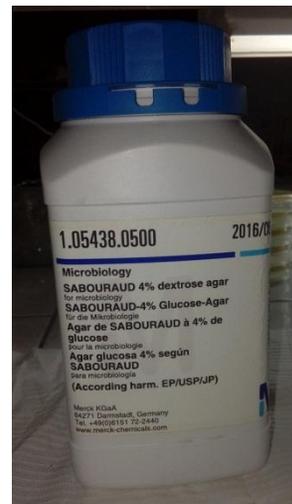


EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL EXTRACTO HIDROETANÓLICO DE *ROSMARINUS OFFICINALIS* Y *PROPÓLEO* SOBRE CEPAS DE *CANDIDA ALBICANS* ATCC 10231

REACTIVACIÓN DE LA CEPA DE *CANDIDA ALBICANS* 10231



Se utilizó cultivo liofilizado de la cepa de *Candida albicans* 10231.



Se realizó la reactivación



MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR

Colocación en caldo BHI





Suspensión de la levadura Obtenida

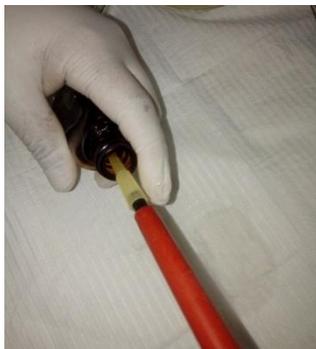


INOCULACIÓN

PREPARACIÓN DE LOS DISCOS CON EL EXTRACTO HIDROETANÓLICO DE *ROSMARINUS OFFICINALIS* Y *PROPÓLEO* DE *APIS MELLIFERA*

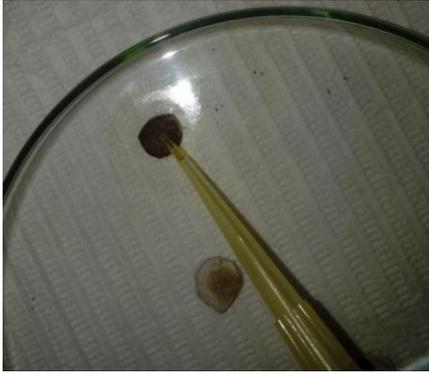


Se preparó discos de papel filtro whatman número 3 estériles



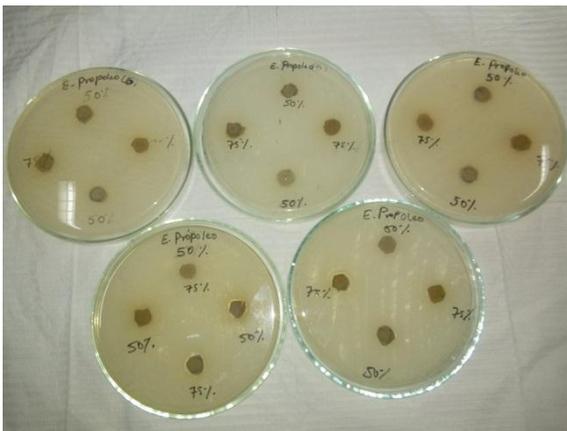
Se embebió con 30 ul de cada una de las concentraciones.



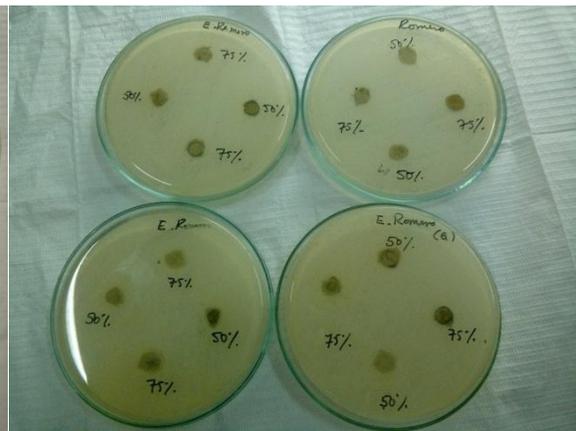


Placas de Mueller Hinton inoculadas con la cepa de *C. albicans* ATCC 10231. Posteriormente se realizó la incubación a 37°C durante 24 horas.

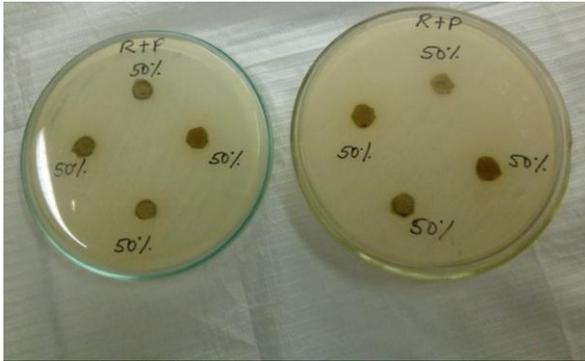
OBTENCIÓN DE LAS PLACAS INCUBADAS



Obtención de placas del extracto de Propóleo al 50% y 75%, después de su incubación.



Obtención de placas del extracto de Romero al 50% y 75%, después de su incubación.



Obtención de placas de los extractos de Romero más Propóleo al 50%, después de su incubación.

Obtención de placas de los extractos de Romero más Propóleo al 75%, después de su incubación.



Obtención de placas del control Positivo (Nistatina) y control Negativo (Agua Destilada), después de su incubación.

