



UNIVERSIDAD CATÓLICA LOS ÁNGELES
CHIMBOTE

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y
BIOQUÍMICA**

**EFECTO ANTIMICÓTICO IN VITRO DE DIFERENTES
CONCENTRACIONES DEL ACEITE ESENCIAL DE LA
FLOR DE *Matricaria chamomilla* (MANZANILLA) EN
CULTIVO DE *Candida albicans* cepa ATCC 10231.**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO**

AUTORA

VÁSQUEZ GAVIDIA, CARMEN ROSA

ASESOR

Mgtr. LEAL VERA, CÉSAR ALFREDO

TRUJILLO - PERÚ

2018

JURADO EVALUADOR DE TESIS

Dr. Jorge Luis Díaz Ortega.

Presidente

Mgtr. Nilda María Arteaga Revilla.

Miembro

Mgtr. Luisa Olivia Amaya Lau.

Miembro

Mgtr. César Alfredo Leal Vera.

Asesor

AGRADECIMIENTO

A Dios por darme la vida, forjador de cada pensamiento y acción, quien me ha dado la fuerza para llevar a feliz término este sueño.

A mi madre y a mi hijo por su apoyo constante e incondicional. A mis amigos que a pesar de la distancia siempre me dieron el impulso de llegar a mi meta final.

A las autoridades y catedráticos de la Universidad católica los Ángeles de Chimbote- ULADECH y al Departamento de Ciencias de la Salud, y a sus docentes, quienes dieron de sí sus valores científicos y experiencias profesionales durante el transcurso de mi carrera.

DEDICATORIA

A mis Madre y a mi hijo, que durante estos años han sabido apoyarme, comprenderme para continuar y nunca renunciar, gracias por su amor incondicional y su apoyo en mi proyecto, éste será el mejor legado, lo reconozco y agradeceré eternamente.

A mis grandes amigos, que hoy son mi familia, por sus consejos que me dieron un aliento para seguir adelante en mi trabajo de titulación.

A todos los profesores de Uladech Católica, al coordinador de escuela, gracias por su tiempo, por su apoyo, así como por la sabiduría que, me transmitieron en el desarrollo de mi formación profesional.

RESUMEN

Una de las principales causas de la micosis (candidiasis) es la mala higiene y el mal estado de salud los cuales pueden facilitar su proliferación y la aparición de *Candida albicans*, el presente estudio de tipo experimental cuantitativo se realizó con el objetivo de determinar el efecto antimicótico in vitro de las diferentes concentraciones de aceite esencial de la flor de *Matricaria Chamomilla* (manzanilla) sobre cepas de *Candida Albicans* cepa ATCC 10231. La obtención del aceite esencial de Manzanilla se realizó con el método por arrastre de vapor, las diluciones se realizaron con DMSO, las cepas de *Candida Albicans*, fueron reactivadas por 24 horas a 37°C en su medio de cultivo agar Saboraud, la siembra se realizó en 12 placas más dos para control positivo y otro negativo, para el control positivo se utilizó fluconazol de 150mg, y el control negativo un disco con agua estéril. Se utilizó 20ul de cada concentración en cada disco, se incubaron las placas a 37°C. La medida de los halos se realizó con regla milimetrada a las 24 y 48 horas, Los datos estadísticos fueron analizados mediante el test estadístico de t-student y ANOVA. Los resultados indicaron que el aceite esencial de la flor de *Matricaria chamomilla* (manzanilla), en sus diferentes concentraciones presenta efecto antimicótico in vitro en el cultivo de *Candida albicans* cepa ATCC 10231, siendo la concentración del 10% que presentó mayor halo de inhibición.

Palabras claves: Efecto, antimicótico, *Candida albicans*, aceite esencial, cultivo.

ABSTRACT

One of the main causes of mycosis (candidiasis) is poor hygiene and poor health which can facilitate its proliferation and the appearance of *Candida albicans*, the present quantitative experimental study was conducted with the objective of determining the effect *In vitro* antifungal of the different concentrations of essential oil of the flower of *Matricaria Chamomilla* (chamomile) on strains of *Candida Albicans* strain ATCC 10231. The obtaining of the essential oil of Chamomile was carried out with the method by steam drag, the dilutions were carried out with DMSO, the strains of *Candida Albicans*, were reactivated for 24 hours at 37 ° C in their culture medium Sabouraud agar, seeding was performed in 12 plates plus two for positive control and another negative, for the positive control was used fluconazole 150mg, and the negative control a disc with sterile water. 20ul of each concentration was used in each disc, plates were incubated at 37 ° C. The measurement of the halos was performed with a millimeter rule at 24 and 48 hours. The statistical data were analyzed by means of the statistical test of t-student and ANOVA. The results indicated that the essential oil of the flower of *Matricaria chamomilla* (chamomile), in its different concentrations has antimycotic effect *in vitro* in the culture of *Candida albicans* strain ATCC 10231, being the concentration of 10% that presented greater halo of inhibition.

Key words: Effect, antifungal, *Candida albicans*, essential oil, culture.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTO.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
CONTENIDO.....	vii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
2.1. Antecedentes.	6
2.2 Bases Teóricas.....	9
III. HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN	22
IV. METODOLOGÍA.....	23
4.1. Diseño de la investigación	23
4.2 Población y muestra.	23
4.3. Definición y operacionalización de variables e indicadores	24
4.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos	25
4.5. Plan de análisis:	28
4.6. Matriz de consistencia.....	29
4.7. Principios éticos	30
V. RESULTADOS	31
5.1. Resultados	31
VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES DE LA INVESTIGACIÓN.....	34
6.1. Conclusiones:	34
6.2. Recomendaciones:	35
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
ANEXOS	42

INDICE DE TABLAS

Tabla 1

Efecto antimicótico invitro del aceite esencial de la flor de *Matricaria chamomilla* (Manzanilla) en cultivo de *Cándida albicans* cepa ATCC 10231..... 31

Tabla 2

Sensibilidad de *cándida albicans* ATCC 10231 de las diferentes exposiciones del aceite esencial de la flor de *Matricaria chamomilla* (Manzanilla) según la escala de Duraffourd a nivel in vitro a las 24 y 48 horas de exposición.....32

I. INTRODUCCIÓN

Los recursos biológicos conocidos como plantas medicinales han sido utilizados desde nuestros antepasados en la prevención y tratamiento de diversas enfermedades, ya que cada una de éstas presenta múltiples efectos terapéuticos debido a su contenido de algunos principios activos. Estas propiedades que se les atribuye están expuestas a diversas variables en su mayoría físicas y/o condiciones ambientales a las que están expuestas, se ha incorporado el tratamiento tradicional el empleo de estos principios activos en la gran mayoría de patologías con la finalidad de prevenir o curar diversas enfermedades ⁽¹⁾. Desde la antigüedad han existido recursos vegetales con propiedades terapéuticas y fueron utilizados como principal recurso curativo debido a que no existía otros recursos ⁽¹⁾.

Si hablamos de plantas medicinales nos estamos refiriendo a la planta completa es decir el uso es en su totalidad lo cual es muy complejo poder determinar cada propiedad según el tipo de planta. Estudiar e interpretar todas las plantas medicinales es un trabajo muy complejo, pues en la actualidad cada día se descubren algo diferente con respecto a sus propiedades terapéuticas dándonos una nueva alternativa para utilizarlas de una manera segura y efectiva. La medicina tradicional a base de material biológico como las plantas se convierte en una alternativa terapéutica para patologías específicas por su bajo costo y fácil accesibilidad a familias con pocos recursos ⁽²⁾.

El uso de productos naturales en el tratamiento de diferentes patologías incluyendo aquellas que son infecciosas, constituyen hoy en día un reto en esta categoría de la medicina y se ofrece como una alternativa, especialmente en aquellos problemas de dolor para los que no existe un remedio adecuado ⁽²⁾.

Si se entiende por “natural “lo que el significado del diccionario de la Real Academia la define como aquello “perteneiente o concerniente a la naturaleza “el termino engloba distintos aspectos ⁽³⁾.

Pero sin perplejidad la naturaleza es la que ofrece una gama de constituyentes muy potentes y útiles aplicables en las diversas patologías humanas, en concreto aquellas producidas por microorganismos. El nacimiento de la quimioterapia data de finales del siglo XIX y principios del siglo XX y se relaciona con dos figuras claves en el desarrollo de la microbiología: Pasteur y Fleming. Sus investigaciones fueron de vital importancia en el entendimiento de las diferentes patologías infecto-contagiosas y su medicación, debido a la utilización de compuestos naturales obtenidos de plantas desde hace muchísimos años atrás ⁽³⁾.

Los medicamentos herbarios durante su elaboración se debe tener presente la eficiencia de sus principios terapéuticos, los cuales deben cumplir criterios de calidad, eficacia, inocuidad, aceptabilidad durante la administración al paciente, por lo tanto, el periodo de validez del producto debe asegurar el cumplimiento de las especificidades técnicas y farmacológicas establecidas, responsabilidad que recae sobre el farmacéutico ⁽¹⁾.

Las plantas medicinales han sido utilizadas durante siglos como un método curativo siendo los países más pobres los que particularmente ha optado por esta alternativa debido a ciertas razones entre las que se destacan su bajo costo y la simplicidad para su elaboración ⁽³⁾.

Actualmente la farmacoterapia se ha convertido en el mejor instrumento para el bienestar de la población. Los recursos herbarios usados son el cimiento para la preparación de productos terapéuticos naturales, para satisfacer las necesidades en las poblaciones alejadas de la ciudad, pues es el único instrumento con el que cuentan en carencia de un hospital o falta de dinero disponible para la obtención de un medicamento moderno ⁽⁴⁾.

Desde la antigüedad los recursos herbarios son considerados un alto poder medicamentoso para tratar diversas enfermedades, tomando en cuenta las necesidades de la población y los problemas de micosis que se originan en la actualidad, es una razón para descubrir nuevos productos más potentes con un alto porcentaje de eficacia y seguridad. Debido a los diferentes estudios se ha comprobado que muchos de estos recursos naturales principalmente de carácter odorífero tienen actividad antibacteriana, antimicótica y antiparasitaria, es que se desarrolla el presente proyecto de investigación a fin de determinar la actividad antimicótica “in vitro” del A.E de flor de *Matricaria chamomilla* “manzanilla” en cultivo de *Candida albicans* ATCC 10231.

De demostrarse que un producto natural extraído de una planta fuese más efectivo in vitro que uno sintético se convertirá en una excelente alternativa para ser utilizado in vivo estas propiedades se encuentran en equilibrio por la existencia de complementos, que ayudaran a aumentar su efectividad de tal manera que asociados en el organismo sus efectos sean mínimos. Sin embargo, a pesar de que han aumentado los estudios científicos en este fascinante campo, todavía no se conocen los responsables de los efectos terapéuticos de muchas plantas ⁽²⁾.

En el Perú, la gran biodiversidad botánica por un lado y los conocimientos incipientes

en sus propiedades fotoquímicas por otro, marcan una brecha considerable que requiere de mucho ímpetu y coordinación con diferentes ámbitos de la comunidad científica, con fines tanto académicos como prácticos de aprovechar el potencial natural. Además, los productos naturales han sido catalogados desde tiempos antiguos como el inicio del desarrollo de la terapia natural ya que han contribuido enormemente en el descubrimiento de nuevas sustancias con actividad biológica y a la elaboración de fitofármacos, que constituyen la fuente de medicamentos más económica y que está al alcance para la mayoría de comunidades ⁽²⁾.

Las constantes apariciones de cepas resistentes no solamente a las Antifúngicos convencionales, es preocupante y es por ello que se recurre a la búsqueda de nuevas alternativas eficaces y seguras provenientes de recursos naturales, donde sus sustancias activas están equilibradas y sus reacciones adversas son limitados en confrontación con los medicamentos industriales.

¿Es posible que el aceite esencial de flor de *Matricaria chamomilla* (Manzanilla) en sus diferentes concentraciones tenga efecto antimicótico en cultivo de *Candida albicans* ATCC 10231?

El empleo de componentes inherentes en la vigilancia de enfermedades más frecuentes podría alcanzar que se economice en lo posible en lo propuesto para fines terapéuticos del país. El incremento de un producto antimicótico con condiciones de carácter fisicoquímico con manifestaciones apropiadas existentes en nuestro medio y sin un procedimiento demasiado complejo, será una disyuntiva ratificante de un pequeño importe, para combatir las afecciones causadas por hongos que se han establecido como un esparcimiento en el hombre, son estas las razones del incremento

subsiguiente de laceraciones, dilema que impone indagar sobre otras soluciones que proporcione un control de los agentes implicados y causales de estas enfermedades, estamos en disposición para la búsqueda de opciones de reparación a este problema demasiado común.

OBJETIVOS:

Objetivo general:

- Determinar el efecto antimicótico in vitro de las diferentes concentraciones del aceite esencial de la flor de *Matricaria chamomilla* (Manzanilla) en cultivo de *Candida albicans* cepa ATCC 10231.

Objetivos específicos:

- Determinar a qué porcentaje de las diferentes concentraciones del aceite esencial de la flor de *Matricaria chamomilla* (Manzanilla) presenta mayor efecto antimicótico y mayor diferencia significativa.
- Determinar la sensibilidad de *candida albicans* ATCC 10231 de las diferentes concentraciones del aceite esencial de la flor de *Matricaria chamomilla* (Manzanilla).

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Antecedentes.

Tolouue et al en 2010, en un estudio realizado en el Departamento de Micología, Instituto Pasteur de Irán, Teherán 13164, Irán, se evaluó la actividad antifúngica del aceite esencial de la flor *Matricaria chamomilla* L. contra *Aspergillus niger*, los compuestos se obtuvieron mediante microscopía electrónica. Se identificó un total de 21 compuestos, siendo el más destacado el α -bisabolol (56.86%), En el bioensayo, *A. niger* se cultivó en medio de cultivo de patata dextrosa en microplacas de 6 pocillos en presencia de concentraciones dobles en serie de aceite vegetal (15,62 a 1000 $\mu\text{g} / \text{ml}$) durante 96 ha 28 ° C. los resultados obtenidos, el crecimiento de *A. niger* se inhibió de manera dependiente de la dosis con un máximo de 92.50% a la concentración más alta de aceite. Estos hallazgos indican el potencial del aceite esencial de *M. chamomilla* L. para prevenir la contaminación por hongos y el posterior deterioro de los alimentos almacenados y otros materiales susceptibles⁽⁵⁾.

Romero et al en el 2012, en el Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Campus de Cartuja s / n, Granada, España, se realizó un estudio experimental comparativo, contra las larvas Anisakis L3. Se llevó a cabo un estudio de *Matricaria chamomilla* AE y dos de sus componentes principales (chamazulene y α -bisabolol) contra las larvas L3 de Anisakis tipo I. La actividad de *M. chamomilla* AE, chamazulene y α -bisabolol se establecieron mediante experimentos in vitro e in vivo. El AE (125 $\mu\text{g} / \text{ml}$) causó la muerte de todos los nematodos, lo que mostró cambios en la cutícula y ruptura de la pared intestinal. En los ensayos in vivo, solo el 2,2% \pm 1,8 de las ratas infectadas tratadas con *M. chamomilla* AE mostraron lesiones de la pared gástrica en comparación con el 93,3% \pm

3,9 de control. Chamazuleno fue ineficaz, mientras que α -bisabolol mostró una actividad alta a la de las pruebas AE in vitro, pero resultó ser menos activa in vivo. Estos hallazgos sugieren que la actividad larvicida puede ser el resultado de la acción sinérgica de diferentes compuestos de *M. chamomilla* AE. En conclusión, *M. chamomilla* AE es un buen candidato para una mayor investigación como agente biocida contra Anisakis tipo I ⁽⁶⁾.

Cavagnola S et al en el 2015, en su estudio realizado en la Universidad de Chile Facultad de Odontología, describe que el aceite esencial de manzanilla actuó como un potente inhibidor del crecimiento en 10 tipos distintos de hongos de importancia clínica. En este mismo estudio se describe que camazulenos serían los principales componentes de este aceite (61,3%) y se sugiere que la propiedad antifúngica contra los dermatófitos y saprófitos observada puede atribuirse a estos componentes ⁽⁷⁾.

Hajaji S et al en el 2015, realizó una evaluación in vitro de la Actividad leishmanicida de α -bisabolol del aceite esencial de manzanilla tunecino (*Matricaria recutita* L.), en el Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias, Universidad de La Laguna. Los resultados obtenidos fueron que el aceite esencial de manzanilla exhibe una buena actividad en las formas de promastigotes de *L. amazonensis* y *L. infantum* con una baja concentración inhibitoria al 50% (IC50) (10.8 ± 1.4 y 10.4 ± 0.6 $\mu\text{g} / \text{mL}$, respectivamente). El fraccionamiento bioguiado se desarrolló y condujo a la identificación de (-) - α -bisabolol como la molécula más activa con baja CI50 (16.0 ± 1.2 y 9.5 ± 0.1 $\mu\text{g} / \text{mL}$ para *L. amazonensis* y *L. infantum*, respectivamente). Este alcohol sesquiterpénico aislado se estudió por su actividad en formas de amastigotes (IC50 = $5,9 \pm 1,2$ y $4,8 \pm 1,3$ $\mu\text{g} / \text{ml}$, respectivamente) y su citotoxicidad (índices de selectividad (SI) de 5,4 y 6,6, respectivamente). Los

resultados obtenidos mostraron que (-) - α -bisabolol fue capaz de activar un proceso programado de muerte celular en la etapa promastigote del parásito. Provoca la externalización de la fosfatidilserina y el daño a la membrana. Además, disminuye el potencial de membrana mitocondrial y los niveles totales de ATP. Estos resultados resaltan el uso potencial de (-) - α -bisabolol contra *L. amazonensis* y *L. infantum*, y se deben realizar más estudios para establecerlo como un nuevo tratamiento terapéutico leishmanicida ⁽⁸⁾.

2.2 Bases Teóricas

Fitoterapia

Disciplina dedicada al estudio del uso de los recursos vegetales con uso terapéutico, es decir prevenir, disminuir o tratar una patología. Es cierto que la sociedad emplea las plantas para tratar sus dolencias toda su vida, el uso del recurso natural en la medicación ha sido diverso en temporadas en resolución con los adelantos de la ciencia tanto en productos naturales como sobre las demás herramientas terapéuticas ⁽¹⁰⁾.

Planta medicinal

Según la OMS (1979) se denomina así, a una variedad de recursos de origen vegetal que trae consigo constituyentes para ser empleados en la terapia y por su naturaleza podemos emplear en la elaboración de diferentes productos galénicos destinados para al tratamiento de algunas enfermedades.

Estos productos vegetales pueden emplearse en la medicina moderna y demás, por sus propiedades terapéuticas pueden utilizarse como factor en la elaboración de productos sintéticos más completos, la estructura química debería usarse como un prototipo en la fabricación de específicos sintéticos, los cuales deben utilizarse como señaladores taxonómicos en la búsqueda de nuevos medicamentos ⁽¹¹⁾.

Aceite esencial

Los A.E. son una combinación constituidos por varias sustancias orgánicas volátiles, como sustancias alcohólicas, cetónicas, etc. Los cuales se originan en las canaletas de secreción de las plantas. Normalmente están constituidos por fluidos a T°, atmosférica, por su alta volatilidad se usan técnicas especiales de extracción. En absoluto son las

que les atribuyen el aroma a los vegetales ⁽¹²⁾. Los aceites esenciales son productos naturales aplicados en diferentes industrias, como son la farmacéutica, alimenticia, en perfumería, entre otros usos. Actualmente, se constituyen en productos alternativos para la elaboración de biopesticidas o bioherbicidas. La obtención de los aceites esenciales es realizada comúnmente por la tecnología llamada de destilación por arrastre con vapor, en sus diferentes modalidades. La pureza y el rendimiento del aceite esencial dependerán de la técnica que se utilice para el aislamiento ^(13,12).

Destilación por arrastre a vapor:

La destilación por arrastre con vapores una técnica usada para separar sustancias orgánicas insolubles en agua y ligeramente volátiles, de otras no volátiles que se encuentran en la mezcla, como resinas o sales inorgánicas, u otros compuestos orgánicos no arrastrables ^(12,13).

Antifúngicos y antimicóticos:

Agente antifúngica o antimicótico engloba cualquier sustancia capaz de producir una alteración tal de las estructuras de una célula fúngica que consiga inhibir su desarrollo, alterando su viabilidad o capacidad de supervivencia, directa o indirectamente, lo que facilita el funcionamiento de los sistemas de defensa del huésped ⁽¹⁴⁾.

Medio de cultivo

El medio de cultivo es una sustancia o solución que permite el desarrollo de microorganismos, mientras que el cultivo es el producto del crecimiento de un organismo. Los medios utilizados en micología deben contener los nutrientes suficientes para asegurar el desarrollo y reproducción de los hongos (carbono,

nitrógeno, vitaminas, oligoelementos, etc.) y un pH ligeramente ácido (6 – 6.3) para facilitar su crecimiento e inhibir al mismo tiempo el desarrollo de otros microorganismos ⁽¹⁵⁾. Los medios pueden ser sólidos o líquidos. Para conseguir un medio sólido se debe agregar una sustancia solidificante como el agar (gelatina vegetal) o el agar agar (polisacáridos provenientes de algas), el cual no tiene valor nutritivo, sino que sirve simplemente para mantener la humedad por un tiempo más o menos prolongado ⁽¹⁴⁾.

La humedad es fundamental para el desarrollo de los hongos, porque cuando ésta comienza a disminuir, la formación de micelio también disminuye y el hongo tiene que asegurar su perpetuidad formando estructuras propagativas (esporas, conidias) y de conservación (clamidosporas). El agar empieza a derretirse a partir de 80 °C y soporta temperaturas altas sin descomponerse, solidificándose entre los 35 y 50 °C ⁽¹⁴⁾.

Los medios de cultivo se vierten en placas Petri o en tubos inclinados. Los primeros ofrecen la ventaja de tener mayor superficie para el desarrollo del hongo y se utilizan para trabajos rutinarios de aislamientos, aspecto del cultivo, velocidad de crecimiento, etc. sin embargo, son más fáciles de contaminarse. Los tubos, a pesar de tener una superficie mucho más reducida, ofrecen seguridad en su manipulación y buena resistencia a la deshidratación y a la contaminación. Se utilizan para conservar cultivos por tiempo más o menos prolongado. Los medios se seleccionan en base al tipo de muestra que queremos reproducir. El pH recomendado para el cultivo de hongos en el laboratorio es de alrededor de 7, un pH neutro o ligeramente ácido (6.8) ⁽¹⁵⁾.

Agar Sabouraud

Es un medio de cultivo muy utilizado para aislar hongos de animales. Sirve para el aislamiento y mantenimiento de hongos en tubo inclinado. Debido a su composición, los hongos crecen exuberantemente y esporulan bien. Es el medio estándar para observar la morfología típica de los hongos, pero no es el medio ideal de crecimiento o para estudiar la esporulación ⁽¹⁵⁾.

Lavado

Durante los trabajos con microorganismos, específicamente hongos, es necesario y fundamental trabajar con mucha asepsia, debido a que es indispensable el mantenimiento de los cultivos puros. Por lo tanto, es conveniente que luego de lavar todo el material de vidrio, éste sea enjuagado dos veces con agua destilada, para eliminar todo residuo de detergente antes de ser esterilizado ⁽¹⁵⁾.

Esterilización

La esterilización de los materiales de vidrio y medios de cultivo nos asegura un estado de asepsia que permite trabajar sin dificultades cuando se ejecuta en forma eficiente. La forma más común de esterilización es por medio del calor seco o húmedo ⁽¹⁵⁾.

La esterilización por calor seco se consigue con el uso de un horno o estufa y es útil en el caso de esterilizar placas petri y otros materiales de vidrio. La temperatura a la que se somete el material durante 90 a 120 minutos debe fluctuar entre 160 y 180 °C. Es eficaz, siempre y cuando se deje espacio libre para que el aire caliente circule alrededor de los materiales ⁽¹⁵⁾.

La esterilización por calor húmedo o a presión de vapor de agua se consigue con el uso de una autoclave. Se encuentran de varios modelos y tamaños, pero todas tienen el mismo principio de funcionamiento. A mayor presión, mayor es la temperatura de ebullición del agua; cuando la presión aumenta a 15 libras (dos atmósferas), la temperatura llega a 121.6 °C ⁽¹⁵⁾.

No existe microorganismo que tolere esta temperatura durante 15 minutos. El tiempo es el factor que permite que el calor penetre en la masa de esterilización y se absorba. Cuando se esterilizan medios de cultivo en frascos de vidrio, se debe asegurar que éstos ocupen no más de las tres cuartas partes del frasco para permitir una ligera ebullición sin derramarse, por lo mismo, las tapas deben colocarse ligeramente sueltas. Los frascos Erlenmeyer se deben taponar con algodón para permitir la circulación del vapor. Los tubos de ensayo conteniendo medio, se deben colocar en una gradilla o rejilla ⁽¹⁵⁾.

Matricaria chamomilla

Taxonomía.

Familia: *Asteraceae*.

Género: *Matricaria*

Nombre Científico: *Matricaria chamomilla*.

Nombre Comunes: Manzanilla, Matricaria, chamomila.

Descripción

De una raíz corta surge el tallo que alcanza de 20 a 50cm de largo, y sobre la cual se encuentran hojas sèsiles Las cabezas se encuentran en los límites más del vegetal. Están conformadas por un nimbo blanquecino y 400- 500 flósculos de apariencia amarilla ubicados en la parte céntrica, posee frutos muy diminutos. Unas 20.000 unidades pesan aproximadamente 1g ^(9, 16).

El día de la cosecha debe seleccionar una mañana fresca, la recolección se realizará cuando los rayos solares estén altos, preferentemente a mitad de mañana hasta el crepúsculo. Se guardará las cabezuelas con un mínimo de pedúnculo ^(9, 16).

Las cabezuelas así recluidas se esparcen en periódico o pajuelas, el lugar debe mantener buena ventilación además no debe llegar el sol. Las cabezuelas deben conservarse intactas una vez desecadas. Con ellas se llenan saquitos de tela, y se guardan en cajas bien tapadas y en lugar fresco. La *Matricaria Chamomilla* es de cultivo muy fácil, pero poco remuneradora. Incluso colectando la planta que crece sin cultivo, da poco de si, por lo cual, en los países donde se dedican a esta tarea suelen

emplear trabajadores con baja remuneración, especialmente la de niños y mujeres durante sus horas libres ^(9, 16).

Características:

Existen tres especies diferentes de plantas herbáceas denominadas genéricamente como manzanilla, todas ellas pertenecientes a la familia de las asteráceas y con similares virtudes:

1. *Matricaria chamomilla* o *Matricaria recutita* también llamada manzanilla alemana, manzanilla dulce o cimarrona o manzanilla común, pertenece a la familia de las Asteraceae (Compositae); una planta anual, nativa de las regiones templadas de Europa ⁽¹⁶⁾.

2. *Anthemis nobilis* o *Matricaria nobilis* o *Chamaemelum nobile* también

llamada manzanilla romana, manzanilla amarga, manzanilla inglesa pertenece a la familia de las Asteraceae (Compositae), una planta perenne, nativa de las regiones meridionales de Europa ⁽¹⁶⁾.

3. La manzanilla o camomila de campo o bastarda (*Anthemis arvensis*),

una planta anual que crece de forma silvestre y tiene un sabor más amargo que las anteriores ⁽¹⁶⁾.

Composición Química:

α -bisabolol, colina, Ac. galacturónico, glucosa, Ac. 2,4-dihidroxibenzoico, Ac. 2,5-dihidroxibenzoico, ácido 3,4-dihidroxicinámico, 3-careno, ácido 3-hidroxi-2-metilideno-butirico-angelato, ácido 4-hidroxi-3-metoxi-benzoico, ácido 4-metoxibenzoico, 6-3-dimetoxiquercetina, 6,7-dimetoxiquercetina, 6-hidroxi-

luteolina-7-glucósido, 6-metoxikempferol, α -bisabololóxido a, α - bisabololóxido b, α -bisabololóxido c, α -bisaboloneóxido-a, α -muuroleno, apigenina glucósidos, ácido ascórbico, axillarina, azuleno, betacariofileno, β -damascenona, bisabolena, borneol, bornil acetato, ácido cafeico, calameno, ácido cáprico, ácido caprílico, taninos, camazuleno, ésteres de camomila, camomilol, ácido clorogénico, crisoeriol, crisoeriol-7-glucósido, crisosplenol, crisosplentin, cis-cariofileno⁽¹⁷⁾.

otros como: cis-en-in-dicicloéter, épsilon-1-(2,6-dimetilfenil)- 2-buten-1-ona, etil-benzoato, etil-decanoato, etil-palmitato, etil-fenil acetato, eupaletin, farneseno, farnesol, furfural, galactosa, ácido gálico, ácido gentísico, geraniol, herniarina, hiperósido, ácido isoferulico, isorhamnetina, isorhamnetina- 7-glucósido, jaceidina, kemferol, ácido linoleico, luteolina, luteolina glucósidos, matricarina, matricina, niacina, ácido O-coumarico, ácido P-coumarico, ácido palmitico, patuletina, ácido péctico, perilil-alcohol, poliacetileno, quercetagetina 3,5, 6,7, 3',4'-hexametiléter, quercetagetina-3,6,7,3',4'-pentametiléter, quercetagetina, tetrametiléter, quercetin, quercetin-3-galactósido, quercetin- 7-glucósido, quercetrin, quercimeritrina, ácido salicílico, tiamina, trans-en-indicicloéter, triacontano, xantoxilina, xilosa⁽¹⁷⁾.

propiedades medicinales:

Es conservadora y restaurador del tejido a nivel gástrico lo cual es muy apropiado en todas esas afecciones donde se encuentra afectado el aparato digestivo. se cree que beneficia la asimilación de alimentos y además tiene un efecto anti flatulento⁽¹⁷⁾. De igual forma se han determinado la participación de *Matricaria Chamomilla* como espasmolítico por lo cual se utiliza en dolores estomacales⁽¹⁷⁾. El A.E. de la manzanilla tiene propiedades antiinflamatorias, espasmolíticas, carminativo,

emenagogo y ligeramente sedante, debido a las cumarinas y flavonoides. El alfabisabolol reduce la actividad proteolítica de pepsina y protege de la acción irritante de la aspirina. Los mucílagos son demulcentes y, en conjunto con el camazuleno y bisabolol, tienen un efecto reepiteli-zante. Las lactonas sesquiterpénicas son responsables de su actividad aperitiva, digestiva y colerético ⁽¹⁷⁾.

Azulenos (26-46%)

principalmente camazulenos (6- 15%) y en menor medida guajazuleno, se trata de un aceite volátil que le brinda el color azulado a la esencia y que aparece por aumento de temperatura durante el curso de extracción. Por ello están ausentes en las infusiones tradicionales. El camazuleno no está preformado en la planta, sino que deriva (por saponificación, deshidratación y descarboxilación) de un proazuleno incoloro e hidrosoluble denominado matricina, el cual es una lactosa sesquiterpénica del grupo de los guayanólidos⁽¹⁶⁾. **Sisquiterpenos** α – bisabolol (10-25%) y derivados bisaboloxido A, B Y C, también se identificó el antecotúlido (trazas) ⁽¹⁷⁾.

Lactonas sesquiterpénicas Matricina, matricarina y esacetilmatricarina. La matricarina sería también precursora del camazuleno⁽¹⁷⁾.

Flavonoides (1 - 3%): constituyen junto a los mucílagos un grupo hidrofílico de las más numerosas flavonas y flavonoles metoxilados, entre ellos epigenina (mayoritaria) y quercitina, con sus correspondientes glucosidos (7- glucosil epigenina y 7-glucosil quercetina). Otros luteolina, patuletina, lisorhamnetol, apiina, rutina, etc. **Cumarinas:** dioxicumarina, umbiliferona y herniarina. ⁽¹⁷⁾.

Farmacología:

Está comprobado de forma experimental que la solución acuosa de las zonas altas, la inflorescencia así como el AE. de la flor, ejercen actividad antibiótica. Los microorganismos susceptibles son *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus mesenteroides*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. mutans*, *S. salivarius*, *Trichomonas vaginalis*, y el hongo *C. albicans*. Así mismo los extractos butanólico, de acetato de etilo, etanólico y acuoso de la totalidad de este producto vegetal tiene efecto contra algunos virus como. El virus del Herpes tipo I y Polivirus II ⁽¹⁷⁾.

Parte utilizada

Las partes de *Matricaria Chamomilla* que se utilizan son principalmente las flores que deben ser recolectadas pasando la etapa de floración. Elegir un día seco en presencia después de la salida del sol. Secar en un lugar donde no alcance los rayos solares y guardar donde esté libre de humedad y ventilado, protegido de la luz ^(5, 14).

Efectos adversos:

El manejo de sus flores causa problemas en la piel al contacto y reacciones alérgicas el uso excesivo de la infusión puede ser abortivo por ser un estimulante uterino, no debe utilizarse en embarazadas ^(4, 14).

Candida albicans

Candida albicans es considerada un hongo patógeno oportunista en mamíferos, entre ellos el hombre, que puede causar diversos tipos de candidiasis, desde infecciones superficiales en mucosas hasta enfermedades sistémicas que comprometen la vida, predominantemente, en individuos con el sistema inmune debilitado. *C. albicans* es idéntico a otros patógenos tiene la disposición adherirse y conformar biopelículas en aparatos implantados, especialmente catéteres intravasculares lo que les confiere un alto vigor a antifúngicos ⁽¹⁷⁾.

Taxonomía:

Reino : Fungi
Phylum : Ascomycota
Subphylum : Ascomycotina
Clase : Ascomycetes
Orden : Saccharomycetales
Familia : Saccharomycetaceae
Género : *Candida* ⁽¹⁷⁾.

Epidemiología:

Es una infección cosmopolita. Se considera una de las infecciones oportunistas más frecuente en seres humanos. Su incidencia ha aumentado considerablemente en los últimos 20 años. Las levaduras son causantes del 7,45% de las micosis, el 25% de las micosis superficiales y el 88% de las infecciones fúngicas nosocomiales. Afecta a individuos de cualquier edad, sexo o grupo étnico Patogenicidad ⁽¹⁷⁾.

La candidiasis es una afección muy conocida producida por diferentes especies del género *Candida*. Aunque *C. albicans* ha sido la especie más significativa en las últimas décadas, las especies *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis*, y *C. lusitanae* entre otras, se aíslan de forma frecuente como agentes causales de infecciones. Otras especies aisladas frecuentemente son: *Issatchenkia orientalis*, *Pichia guillermondii* y *Debariom y ceshanseii*, anteriormente incluidas dentro del género *Candida* ^{(15),(16)}.

C. albicans es capaz de sobrevivir como comensales distintas localizaciones, y por ello está sometido a distintas presiones medioambientales. Esta habilidad amplía la gama de enfermedades causadas por *C. albicans* y otras especies de *Cándida*, siendo su incidencia de un alto porcentaje que la de otros microorganismos comensales ⁽¹⁷⁾.

Clasificación:

Las candidiasis están distribuidas generalmente en superficiales y profundas las candidiasis superficiales afectan principalmente a la dermis y a las mucosas a nivel orofaríngeo y genital. La candidiasis oral se puede presentar en varias formas clínicas, siendo la más común la pseudomembranosa o muguet, que afecta a la boca y faringe, y suele producirse en neonatos y en ancianos o inmunodeprimidos. La candidiasis genital ocurre principalmente en las mujeres y se confiere candidiasis vulvovaginal representa alrededor del 20% de incidentes de vaginitis, y si no se trata adecuadamente puede ser recurrente las candidiasis profundas producen lesiones leves y complejas que pueden afectar a uno o más órganos, y generalmente terminan en una septicemia, designándose de esta manera candidiasis a nivel de sistemas o diseminadas ⁽¹⁸⁾.

Diagnóstico:

A la hora de diagnosticar una candidiasis hay que distinguir entre colonización e infección, ya que muchas especies del género *Candida* suelen estar presentes como comensales inoocuos en el hombre, por ello deben evaluarse los datos de laboratorio, así como el cuadro clínico. El diagnóstico de las candidiasis superficiales se realiza mediante criterios clínicos, adjuntos con la observación al microscopio de muestras de lesiones o cultivos selectivos. Se debe tener presente que una muestra positiva puede ser una evidencia de la presencia de *Candida* pero no la infección. En las candidiasis sistémicas resulta más complicado llegar a un diagnóstico seguro ⁽¹⁸⁾.

Tratamiento:

Sabiendo que la candidiasis es una infección oportunista debemos identificarla y eliminarla, no sin antes de esto debemos prevenirla y esto se lograra si se recomienda a los pacientes que tengan una adecuada higiene y un estilo de vida saludable. El tratamiento recomendado es la utilización de antimicóticos polienos entre estos tenemos a la nistatina y el miconazol que son fungicidas y tienen un espectro muy amplio, se los puede administrar tópicamente, por vía oral en suspensiones, pastilla o intravenosa, otro tipo de antimicóticos son los azoles que son fungistáticos estos son fluconazol e itraconazol⁽¹⁴⁾.

III. HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN

Hi. El aceite esencial de flor la de *Matricaria chamomilla* (manzanilla) presenta actividad antifúngica in vitro en tratamiento de micosis ocasionado por *Cándida albicans* cepa ATCC 10231.

H₀. El aceite esencial de la flor de *Matricaria chamomilla* (manzanilla) no presenta actividad antifúngica in vitro en tratamiento de micosis ocasionado por *Cándida albicans* ATCC 10231.

IV. METODOLOGÍA

4.1. Diseño de la investigación

El presente estudio fue de tipo experimental, observacional y longitudinal.

4.2 Población y muestra.

- **Población vegetal.**

La población estuvo conformada por la planta completa de *Matricaria chamomilla* (Manzanilla), Planta originaria de la ciudad de Otuzco, Distrito de Usquil ubicada a 3.018 m.s.n.m, la cual posee una gran cantidad de flores agrupadas en capítulos pequeños de color blanco con amarillo de las cuales se obtuvo el principio activo de estudio.

- **Muestra vegetal:**

La muestra estuvo conformada por las flores frescas de *Matricaria chamomilla* (manzanilla).

Criterios de inclusión:

Las flores de *Matricaria chamomilla* frescas libre de bacterias y hongos.

Criterios de exclusión:

Se excluyó las flores secas, sin pétalos.

- **Población microbiológica:**

La población estuvo conformada por *Candida albicans*, Cepa ATCC 10231.

- **Muestra microbiológica.**

Estuvo conformada por levaduras de *Candida albicans*, Cepa ATCC 10231 concentrados al 0.5×10^6 /ml en la escala de Macfarland.

Criterios de inclusión:

Se empleó levaduras de *Candida albicans* ATCC 10231 puras sin contaminantes ni medicamentos.

Criterios de exclusión:

Se excluyó levaduras con más de 28 horas de haberse cultivado, así como otras levaduras no pertenecientes a *Cándida albicans* ATCC 10231.

4.3. Definición y operacionalización de variables e indicadores:

VARIABLE INDEPENDIENTE	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADORES	ESCALA	CATEGORÍA
		Porcentajes		10%
Concentración del aceite esencial de flor de <i>Matricaria chamomilla</i> (manzanilla).	Porcentaje del aceite esencial de flor de <i>Matricaria Chamomilla</i> (manzanilla).	de disolución del aceite esencial de flor <i>Matricaria chamomilla</i> (manzanilla).	Cuantitativa	5% 2.5%
			Nominal.	1.25%

Fuente: Elaborado por la Autora.

VARIABLE DEPENDIENTE	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADORES	ESCALA	CATEGORÍA
Efecto antimicótico de aceite esencial de flor de <i>Matricaria chamomilla</i> (manzanilla).	Es la inhibición en el crecimiento de <i>Cándida albicans</i> debido a la presencia del aceite esencial de flor de <i>Matricaria chamomilla</i> (manzanilla).	Tamaño del halo de inhibición formado alrededor del disco embebido con el aceite esencial de flor de <i>Matricaria chamomilla</i> (manzanilla).		>10mm
			Cuantitativa	alta.6-10mm
			Razón	limite. 9-10mm media.
				<6mm
				Nula.

Fuente: Elaborado por la Autora

4.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

TÉCNICAS: De observación.

Obtención del aceite esencial:

Esta técnica resulta ser una de las más simples y económicas para obtener aceites esenciales. Son muchas las ventajas de este método entre ellas su simplicidad y su bajo costo además podemos manipular grandes cantidades o volúmenes ⁽¹³⁾. El fundamento de este método es que los aceites esenciales son arrastrados por la corriente de vapor de agua que se genera en la fuente de vapor, luego esta mezcla (vapor de agua y aceite)

es condensada mediante su paso por un refrigerante de vidrio, seguidamente se separará el aceite del agua por la densidad de cada uno ^(13,18).

Se recolectaron 10 kg de flores frescas de *Matricaria chamomilla* (manzanilla). Los cuáles fueron conservados a temperatura ambiente sin desecar, ni exponer al sol o lavarlos hasta el momento de la extracción del aceite esencial.

Se procedió a colocar 5kg de flores con 2 litros de agua, y esta mezcla depositada en un balón de fondo plano, para luego ser sometidas al proceso de hidrodestilación por arrastre en vapor de agua, durante 4 horas. Obteniéndose aproximadamente 1ml del aceite esencial por cada destilación aproximadamente. **Ver anexo (1).**

Obtención del microorganismo en estudio:

El hongo de *Candida albicans* CEPA ATCC 10231 se obtuvo de la Universidad Nacional de Trujillo, la cual se encontraba en refrigeración reactivación de la muestra se realizó utilizando agar Sabouraud como medio de cultivo para su crecimiento, a continuación, se plaqueo el agar, se dejó secar al ambiente para que solidifique para posteriormente inocular el hongo con un hisopo, el cual estaba en congelación a 80°C, una vez inoculado el hongo en las placas petri fueron sometidas a incubación se dejó incubar a una temperatura de 37°C, por 24 horas, pasado aquel tiempo se observó el crecimiento de *Candida albicans* para luego proceder a su uso respectivo. **Ver anexo (2).**

Medio de cultivo:

Se utilizó el agar sabouraud el cual se manejó 32.5gr en 500ml de agua destilada, fue colocado en la cocina hasta obtener una mezcla uniforme, para posteriormente ser

llevado a un estabilizador, transcurrido este tiempo fue colocado en cada una de las 14 placas la cantidad de 25ml en cada una.

Preparación de la solución de turbidez: Se realizó mediante la escala de Macfarland al 0.5×10^6 /ml. Esta preparación sirvió para determinar la muestra. **Ver anexo (3).**

Siembra:

Para la siembra se utilizó la técnica de barrido que consiste en el uso de un hisopo estéril, girando las placas para asegurar una siembra uniforme.

Incubación:

La incubación se realizó colocando las placas en forma inversa en la incubadora a 37°C, después el control se realizó en 24 y 48 horas, para luego proceder a la lectura de cada placa y evaluar el crecimiento, si este fue positivo o negativo.

Obtención del aceite esencial de *Matricaria chamomilla* (Manzanilla) a Las concentraciones de 10%, 5%, 2.5% y 1.25%.

Se colocaron 4 tubos de ensayo distintos la cantidad de 0.025ml, 0.05ml, 0.013ml y 0.25ml aceite esencial de *Matricaria chamomilla* (manzanilla). Luego se añadió a cada frasco la cantidad faltante en mililitros de Dimetilsulfoxido (DMSO) para obtener la cantidad de 1ml respectivamente. De esta manera se obtendrán las concentraciones al 10%, 5%, 2.5% y 1.25% respectivamente.

Método y cultivo de Kirby-Bauer (difusión en discos):

Se inocula “siembra” uniformemente toda la superficie de una placa de Petri, que contiene un medio con agar, con una cantidad normalizada del microorganismo a ensayar. Se embebieron los discos 20ul de aceite esencial de flor de *Matricaria*

chamomilla en disolución con DMSO (Dimetilsulfoxido) en sus diferentes concentraciones (10%, 5%, 2.5% y 1.25%). Estos discos impregnados en diferentes concentraciones fueron colocados en las placas Petri con ayuda de una pinza estéril, presionando sobre la superficie para asegurar el contacto con la superficie del agar. Se preparó los discos impregnado con Fluconazol de 150 mg el mismo que nos ayudara para el control positivo de la experimentación.

Agar Sabouraud + *Candida albicans* + disco con Fluconazol 150mg. También se preparó un disco impregnado con agua destilada para comprobar si hubo contaminación del medio.

Incubación:

Se colocó las placas en posición inversa a 37°C dentro de los 15 minutos posteriores a la aplicación de los discos. El control se realizó en 24 y 48 horas de incubación se examinó cada placa Petri, y se midió los diámetros de los halos de inhibición alrededor de cada disco.

Lectura de las placas e interpretación de resultados:

Se midió los diámetros de los halos de inhibición, usando una regla milimetrada.

4.5 Plan de análisis:

- En el presente trabajo se emplearon cuadros y gráficos utilizando el programa t-students y ANOVA.

4.6 Matriz de consistencia

Título de la investigación	Formulación del problema	Objetivos	Hipótesis	Tipo de investigación-diseño	Variables	Definición operacional	Indicadores y escala de medición	Plan de análisis
Efecto antimicótico o in vitro del aceite esencial de la flor de <i>matricaria chamomilla</i> (manzanilla) en cultivo de <i>candida albicans</i> cepa atcc 10231.	¿Es posible que el aceite esencial de flor de <i>Matricaria chamomilla</i> (Manzanilla) en sus diferentes concentraciones tenga efecto antimicótico en cultivo de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231?	<p>Objetivo general: *Determinar el efecto antimicótico in vitro de las diferentes concentraciones del aceite esencial de la flor de <i>Matricaria chamomilla</i> en cultivo de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.</p> <p>Objetivos específicos:</p> <p>*Determinar a qué porcentaje de las diferentes concentraciones del aceite esencial de la flor de <i>Matricaria chamomilla</i> presenta mayor efecto antimicótico y mayor diferencia significativa.</p> <p>*Determinar la sensibilidad de <i>candida albicans</i> ATCC 10231 de las diferentes concentraciones del aceite esencial de la flor de <i>Matricaria chamomilla</i>.</p>	<p>Hi. El aceite esencial de flor de <i>Matricaria chamomilla</i> presenta actividad terapéutica antifúngica in vitro en tratamiento de micosis ocasionado por <i>Cándida albicans</i> ATCC 10231.</p> <p>H₀. El aceite esencial de flor de <i>Matricaria chamomilla</i> no presenta actividad terapéutica antifúngica in vitro en tratamiento de micosis ocasionado por <i>Cándida albicans</i> ATCC 10231.</p>	*experimental, observacional y longitudinal.	<p>INDEPENDIENTE: Concentración del aceite esencial de flor de <i>Matricaria chamomilla</i>.</p> <p>DEPENDIENTE: Efecto antimicótico aceite esencial de flor de <i>Matricaria chamomilla</i>.</p>	<p>Porcentaje del aceite esencial de flor de <i>Matricaria Chamomilla</i> (manzanilla).</p> <p>Es la inhibición en el crecimiento de <i>Cándida albicans</i> ATCC 10231.</p>	<p>1.25%</p> <p>2.5%</p> <p>5%</p> <p>10%</p> <p>Cuantitativa</p> <p>Nominal</p> <p>>10mm alta</p> <p>6-10mm Limite.</p> <p>9-10mm Media</p> <p><6mm nula</p> <p>Cuantitativa</p> <p>Razón</p>	t-students y ANOVA.

4.7 Principios éticos:

El presente trabajo de investigación, se realizó de tipo experimental, in vitro, en la cual se trabajó con medios de cultivo (hongos), por tal motivo se tuvo en cuenta el manual de bioseguridad de laboratorio al momento de manipular los desechos y muestras microbiológicas sobretodo porque se trabajó con microorganismos como *Candida albicans* ATCC 10231, basándose en los principios que rigen la actividad investigadora, éstos adoptan precauciones, donde se establece que en toda investigación debe realizarse una evaluación rigurosa sobre los riesgos y beneficios probables, tanto para el medio ambiente como para las personas involucradas en el desarrollo del trabajo.

V. RESULTADOS

5.1 Resultados

Tabla 1. Efecto antimicótico in vitro de las diferentes concentraciones del aceite esencial de la flor de *Matricaria chamomilla* (Manzanilla) en cultivo de *Candida albicans* cepa ATCC 10231.

HORAS	CONCENTRACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL.	HALO DE INHIBICION(mm)		SIG.
		MEDIA	±DS	
24 H	ESTANDAR	27.1mm	±3.88	>0.05
	1.25%	17.6mm	±1.52	
	2.5%	20.6mm	±2.3	
	5%	19.6mm	±2.08	
	10%	23.5mm	±1.8	
48H	ESTANDAR	30.05mm	±1.72	<0.05
	1.25%	19mm	±0	
	2.5%	17.6mm	±0	
	5%	20mm	±0	
	10%	20.33mm	±1.15	

P < (0.05).

ESTANDAR: Fluconazol 150mg.

Tabla 2. Sensibilidad de *candida albicans* ATCC 10231 en diferentes concentraciones del aceite esencial de la flor de *Matricaria chamomilla* (Manzanilla) según la escala de Duraffourd a nivel in vitro a las 24 y 48 horas de exposición.

CONCENTRACIONES	ACEITE ESENCIAL
	<i>Matricaria chamomilla</i> (Manzanilla)
10%	+++
5%	++
2,5%	+
1.25%	-

LEYENDA

EXPO: número de exposiciones de acuerdo a la concentración.

Nula (-) diámetro inferior a 6mm.

Limite (+) diámetro entre 6-9mm.

Media (++) diámetro de 9-10mm.

Alta (+++) diámetro mayor a 10mm.

5.2 ANÁLISIS DE RESULTADOS

De los datos obtenidos en el presente estudio de tipo experimental, y los análisis estadísticos realizados a través de t-student y Anova. t-student para determinar la media de una población y la diferencia de varianzas muestrales entre dos poblaciones y Anova que sirve para comparar varios grupos en una variable cuantitativa, evaluar la diferencia significativa entre grupos de medias y constatar la hipótesis nula, estos datos demuestran que el aceite esencial de *Matricaria chamomilla* (Manzanilla), tiene

actividad antimicótica in vitro contra *candida albicans*, debido a que en su composición tiene componentes que le atribuyen estas propiedades dentro de ellos el α -bisabolol que se le atribuye esta propiedad, tal como lo demostró Tolouue en el 2010 donde se comprobó la actividad antifúngica del aceite esencial en *Aspergillus ningers* la inhibición fue en un 92.5% dependiente de la dosis es decir a mayor concentración mayor inhibición.

En la tabla 1, de los resultados obtenidos podemos observar la diferencia entre las concentraciones a las 24 y 48 horas, es decir a las 24 horas $p > 0.05$ por lo tanto se acepta la Hipotesis Nula (es decir los datos presentan homogeneidad de las varianzas) en el caso de los datos a 48 horas el $p < 0.05$ por lo tanto se rechaza la hipótesis nula (es decir hay diferencia en la homogeneidad de las varianzas para este grupo), se observa también la diferencia de la inhibición dependiente de la concentración del aceite en la concentración al 10% a las 24 horas, presenta mayor inhibición que en el demás concentraciones, con una desviación estándar de ± 1.8 , resultados muy parecidos a los del estudio realizado por Romero en 2012 en España, estudio comparativo in vivo donde el porcentaje fue de solo 2,2% con una desviación estándar de ± 1.8 donde se demostró que a ese porcentaje la inhibición es casi nula lo cual demuestra que en concentraciones bajas no hay efecto significativo⁽⁶⁾.

En la tabla 2, podemos observar el grado de sensibilidad de *Candida albicans* según concentración del aceite esencial de *matricaria chamomilla* donde queda demostrado que a mayor concentración mayor halo de inhibición.

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES DE LA INVESTIGACIÓN

6.1. Conclusiones:

Tomando en cuenta los resultados que se obtuvieron durante la investigación podemos concluir que:

- El aceite esencial de flor de *Matricaria Chamomilla* (Manzanilla) tiene efecto antimicótico en cultivo de *Candida albicans* cepa ATCC 10231 en sus diferentes concentraciones.
- La susceptibilidad antimicótica in vitro del aceite esencial de flor de *Matricaria Chamomilla* (Manzanilla) tiene una variación de acuerdo a sus concentraciones 10%,5%,2.5% y 1.25% sobre el cultivo de *Candida albicans* cepa ATCC 10231, donde la mayor concentración 10% tiene mayor efecto antimicótico en confrontación con las demás que son del 5%, 2.5%, 1.25%.
- Se comprobó que *Candida albicans* ATCC 10231 presenta mayor sensibilidad al aceite esencial en una concentración del 10%.

6.2. Recomendaciones:

- Se debe realizar estudios de investigación utilizando el aceite esencial de flor de *Matricaria Chamomilla* (Manzanilla), en concentraciones mayores del 10% para evaluar el efecto antimicótico en cultivo de *Candida albicans* cepa ATCC 10231.
- Se debe realizar estudios de investigación para determinar la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de manzanilla que produzca efecto antimicótico.
- Se sugiere realizar este tipo de estudios en animales y posterior mente en personas, con la finalidad de probar la eficacia y seguridad de uso en seres humanos.
- Se sugiere continuar realizando este tipo de investigaciones con la finalidad de obtener nuevas alternativas de tratamiento y sobre todo de origen vegetal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Giannetti, A, Ricardo L., Tratado de Dermatología, PICCIN, Italia, 2012. Vol. 1:572-573. [Acceso 5 diciembre 2016] Disponible en: <http://books.google.com>.sv/books?id=EsvN7RHREsC&pg=PA572&dq=queratinofilia&hl=es&sa=&ei=fYsxT9rMAcmCgAeExKGuBQ&ved=0CDAQ6AEwAA#v=onepage&q=queratinofilia&f=false.
2. Cruz P. “Elaboración y control de calidad del gel antimicótico de manzanilla (*Matricaria chamomilla*), *Matico* (*aristiguetia glutinosa*) y *Marco* (*ambrosia arborescens*) para Neo- Fármaco”-Escuela de Politécnica de Chimborazo- Facultad de Ciencias- Escuela de Bioquímica y Farmacia. Riobamba- Ecuador.2009- Tesis de grado- pág. 39, 42, 43,44. Revisado (12-06-2017) Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu>. Ec/bitstream/123456789/218/1/56 T00192.pdf.
3. Linares Zavaleta J. “Efecto In Vitro” del Aceite esencial de Manzanilla (*Matricaria Chamomilla*) sobre el crecimiento de *Enterococcus Faecalis Atcc 29212*” - Tesis para optar el Grado de Bachiller en Estomatología – Unt- Trujillo- 2012. Internet (revisado 12 -06- 17). Disponible en: http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle//UNITRU/573/LinaresZavaleta_J.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
4. Hilda M, Farinango A, efecto inhibidor del Aceite Esencial de *Matricaria Chamomilla* “Manzanilla” en comparación al Paramonoclorofenol

Alcanforado Y Gluconato de Clorhexidina Al 2% sobre Cepas de *Enterococcus Faecalis*. Estudio In Vitro -Trabajo de Investigación previo a la obtención del Título de Odontóloga -Facultad de Odontología-Universidad Central Del Ecuador- 2013. Revisado (03-07-17) Disponible En: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/2803/3/T-UCE-0015-67.pdf>.

5. Tolouue M, Alinezhad S, Saberi R, Eslamifar A, Sad S, Jaimand K, Efecto del aceite esencial de flor de *Matricaria chamomilla* L. sobre el crecimiento y la ultraestructura de *Aspergillus niger* van Tieghem, Departamento de Micología, Instituto Pasteur de Irán, Teherán 13164, Irán, mayo 2010, (revisado 27-06-2018). Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160510001753#!>.
6. Romero M, Valero A, Sanchez J, Navarro M, actividad del aceite esencial de *Matricaria chamomilla* contra la Anisakiasis, Universidad de Granada, Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Campus de Cartuja s / n, Granada, España, abril 2012-(revisado 27-06-18). Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S094471131200044X#!>.
7. Cavagnola S, Morales I, Orellana B, Ortega A, “Efecto de un sustituto salival casero en base a manzanilla (*Matricaria chamomilla*) y semillas de linaza (*Linum usitatissimum*) en el estatus de portación y variedad de especies de levaduras del género *Candida* en pacientes con xerostomía de diverso origen”. Universidad de Chile Facultad de Odontología Instituto de Investigación en Cs.Odontológicas Área de Bioquímica. Santiago –Chile -2015 (TESIS).

Internet (revisado 13 -06- 17). Disponible en: [http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/131805/Efecto-de-un-sustituto-salival-casero-en-base-a-manzanilla-\(*Matricaria-chamomilla*\)-semillas-de-linaz-\(*Linum-usitatissimum*\).pdf?sequence=1](http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/131805/Efecto-de-un-sustituto-salival-casero-en-base-a-manzanilla-(Matricaria-chamomilla)-semillas-de-linaz-(Linum-usitatissimum).pdf?sequence=1).

8. Hajaji s, sifaoui Lopez A, Reyes B, Jimenez IA, evaluación in vitro de la Actividad leishmanicida de α -bisabolol del aceite esencial de manzanilla tunecino (*Matricaria recutita* L.), en el Instituto Universitario de enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias, Universidad de La Laguna, 2015. Revisado (17-07-2018). Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29955971>.
9. Sergio L. Castro T, Evaluación el efecto desinflamatorio Y cicatrizante de 3 diferentes concentraciones de una infusión de Manzanilla (*Matricaria Chamomilla* L.) Vía Tópica, en Orquiectomía de Lechones- Universidad de San Carlos de Guatemala Facultad de Medicina Veterinaria Y Zootecnia Escuela de Medicina Veterinaria - Guatemala, mayo de 2015. Internet (Revisado 12- 07 -17). Disponible en: <http://www.repositorio.usac.edu.gt/633/1/tesis%20castro.pdf>.
10. CAÑIGUERAL S, Dellacassa E, Bandoni A, Plantas Medicinales y Fitoterapia- Unitat de Farmacología i Farmacognosia, Facultad de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal, 643. E-08028 Barcelona, Spain- Lat. Am. J. Pharm.22(3):265-78. Internet (rev. 03-07-17).Disponible en:http://www.latamjpharm.org/trabajos/22/3/LAJOP_22_3_6_1_S966JS54J.pdf

11. David C, Vanessa N, PLANTAS MEDICINALES- medicina tradicional y moderna – seminario. Internet (revisado 22-05-17). Disponible en: http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/ifig/Plantas_medicinales_Seminario_Final_Silva_Nataly.pdf.
12. Peredo L, Palau E, Lopez A, Métodos de extracción de aceites esenciales, Departamento de Ingeniería Química y alimentos, Universidad de las Americas Puebla, San Andres Cholula, Pue, Mexico, 2009. Internet (revisado 06-07-17). Disponible en: [http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3\(1\)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf](http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3(1)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf)
13. Echeverria A, Actividad Anti Fúngica “In Vitro” de Aceite Esencial Y extracto alcoholico de Eucalipto “Eucalyptus Globulus” sobre *Candida Albicans* Cepa Atcc 1023, Universidad Nacional de Chimborazo Facultad Ciencias de la Salud Carrera de Odontología, Riobamba -Ecuador- 2017 (citado julio 2018). Disponible en: <http://dspace.unach.edu.ec/bitstream/51000/4454/1/UNACH-EC-FCS-ODT-2017-0034.pdf>.
14. Cañedo v, Ames T, Manual de Laboratorio para el manejo de Hongos Entomopatógenos. Lima, Perú; Centro Internacional de la papa (CIP), Lima, Perú, 62 p.2004. (citado 2018 julio 03). Disponible en: <http://cipotato.org/wp-content/uploads/2014/09/AN65216.pdf>
15. Petrocchi P, las plantas aromáticas, *Matricaria chamomilla* o *Matricaria recutita*, Revista de la natura y ambiente, 2009.Revisado (02-07-2018),212-215. Disponible en: http://www.elicriso.it/es/plantas_aromaticas/manzanilla

_comun/#classificazione.

16. Loja J, Elaboración de un Gel Antimicótico a base de Manzanilla (*Matricaria Chamomilla*) y Matico (*Piper Angustifolium*), En La Provincia de el oro- Universidad Técnica de Machala- Unidad Académica de Ciencias Químicas Y le La Salud carrera de Bioquímica y Farmacia- trabajo de titulación- 2014. Revisado (12-03-2018) Disponible en: <http://repositorio.utmachala.edu//repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/1331/7/CD00253-TESIS.pdf>.
17. Ríos Y, Astrid C, Muñoz D, Echeverry M, Robledo S, Yepes M, Actividad citotóxica y leishmanicida in vitro del aceite esencial de manzanilla (*Matricaria chamomilla*), articActividad citotóxica y leishmanicida in vitro del aceite esencial de manzanilla (*Matricaria chamomilla*) artículo de investigación - Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm. Vol. 37 (2), 200-211, 2008. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rccqf/v37n2/v37n2a08.pdf>.
18. Gómez M, Reyes SH, Paredes L, La manzanilla y sus propiedades medicinales. Rev. Inv. Inf. Salud [Articulo en la Internet]. 2015 [Citado 2017 Mayo 31] 10 (23): 54-58. Disponible en: http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?scriptt=sci_arttext&pid=S2075-61942015000100008&lng=es.
19. Ganzera M, Schneider P, Stuppner H. Efectos inhibidores del aceite esencial de manzanilla (*Matricaria recutita L.*) y sus componentes principales en las enzimas humanas del citocromo P450, Instituto de Farmacia, Departamento de Farmacognosia, Universidad de Innsbruck, Innrain 52, 6020 Innsbruck,

Austria. Markus-2010.Revisado (08-08-2018) disponible en:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16137701>.

ANEXOS

ç

ANEXO 1

Características organolépticas del aceite esencial de flor de *Matricaria chamomilla* (manzanilla) en el estudio del efecto antimicótico in vitro del aceite esencial de la flor de *Matricaria chamomilla* (manzanilla) en cultivo de *Candida albicans* cepa ATCC 10231.

ACEITE ESENCIAL	CARACTERISTICAS
<i>Matricaria chamomilla</i> “manzanilla”.	<ul style="list-style-type: none">• Olor agradable y penetrante.• Es menos denso que el agua.• Tiene un color azulado.

Fuente: Resultados obtenidos en laboratorio de farmacia y bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo.

ANEXO 2

Características macroscópicas de *Candida albicans* ATCC 10231 en su medio de cultivo), en el estudio del efecto antimicótico in vitro del aceite esencial de la flor de *Matricaria chamomilla* (manzanilla) en cultivo de *Candida albicans* cepa ATCC 10231.

MICROORGANISMO DE PRUEBA	CARACTERÍSTICAS EN SU MEDIO DE CULTIVO	RESULTADO DE LA OBSERVACIÓN
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Agar sabouraud: Colonias blandas Circulares de color crema y con olor característico a levadura. Con el tiempo se vuelven amarillentas.	Prueba (+) confirmación de <i>Candida albicans</i> cepa ATCC 10231.

Fuente: Resultados obtenidos en laboratorio de microbiología Universidad los Ángeles de Chimbote – Trujillo.

ANEXO 3

Preparación de la solución de Mac Farland, en el estudio del efecto antimicótico in vitro del aceite esencial de la flor de *Matricaria chamomilla* (manzanilla) en cultivo de *Cándida albicans* cepa ATCC 10231.

1G BaCl₂ 1% (p/v) ----- 100ml de agua destilada. **(Solución 1)**

H₂SO₄ 1% (p/v) ----- --0.96 gr **(solución 2)**

H₂O ----- -- 9.04 ml.

Solución 1	Solución 2	Mac farland
9.9ml	0.1ml	10 ⁶ /ml
9.8ml	0.2ml	10 ⁶ /ml
9.7ml	0.3ml	10 ⁶ /ml
9.6ml	0.4ml	10 ⁶ /ml
9.5ml	0.5ml	10 ⁶ /ml
9.4ml	0.6ml	10 ⁶ /ml
9.3ml	0.7ml	10 ⁶ /ml
9.2ml	0.8ml	10 ⁶ /ml
9.1ml	0.9ml	10 ⁶ /ml
9ml	1ml	10 ⁶ /ml

Fuente: Resultados obtenidos en laboratorio de microbiología Universidad los Ángeles de Chimbote – Trujillo.

ANEXO 4

Prueba de Shapiro – Wilks para determinar la normalidad de los grupos de estudio.

Pruebas de normalidad (b,c,d)

GRUPO		Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	Gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
H24	ESTANDAR	.269	3	.	.949	3	.567
	EXP01	.276	3	.	.942	3	.537
	EXP02	.292	3	.	.923	3	.463
	EXP03	.385	3	.	.750	3	.000
	EXP04	.253	3	.	.964	3	.637
H48	ESTANDAR	.357	3	.	.816	3	.153
	EXP01	.385	3	.	.750	3	.090
	EXP02	.385	3	.	.750	3	.060
	EXP03	.385	3	.	.750	3	.080

FUENTE: SPSS 22.0 sobre los datos obtenidos en la investigación.

Prueba de homogeneidad de varianzas

	Estadístico			Sig.
	de Levene	gl1	gl2	
H24	2.369	5	12	.103
H48	11.572	5	12	.000

FUENTE: SPSS 22.0 sobre los datos obtenidos en la investigación.

Determinación de la significancia utilizando prueba t – student de muestras independientes entre los grupos estandar y exp 01 a las 24 y 48 horas.

Estadísticos de grupo

	GRUPO	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
H24	ESTANDAR	3	27.1667	2.56580	1.48137
	EXP01	3	23.5000	1.80278	1.04083
H48	ESTANDAR	3	30.0500	3.12770	1.80578
	EXP01	3	40.3333	.57735	.33333

FUENTE: SPSS 22.0 sobre los datos obtenidos en la investigación.

Prueba de muestras independientes

Prueba T para la igualdad de medias

		T	Gl	Sig. (bilateral)
		Inferior	Superior	Inferior
H24	Se han asumido varianzas iguales	2.025	4	.113
	No se han asumido varianzas iguales	2.025	3.588	.121
	Se han asumido varianzas iguales	-5.600	4	.005
H48	No se han asumido varianzas iguales	-5.600	2.136	.026

FUENTE: SPSS 22.0 sobre los datos obtenidos en la investigación.

Prueba Anova unifactorial para encontrar la significancia de los tres grupos de estudio.

ANOVA

		Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
H24	Inter- grupos	782.611	5	156.522	43.014	.000
	Intra- grupos	43.667	12	3.639	-	-
	Total	826.278	17			
H48	Inter- grupos	2833.784	5	566.757	315.376	.000
	Intra- grupos	21.565	12	1.797	-	-
	Total	2855.349	17		-	-

FUENTE: SPSS 22.0 sobre los datos obtenidos en la investigación.

ANEXO 5

Recolección del material biológico para el estudio del efecto antimicótico in vitro del aceite esencial de la flor de *Matricaria chamomilla* (manzanilla) en cultivo de *Candida albicans* cepa ATCC 10231.

Fig. N° 1: recolección de la planta



Fuente: datos obtenidos por la autora.

Fig. N|°2: representa las cabezuelas de *matricaria chamomilla*.



Fuente: Datos obtenidos por la autora.

ANEXO 6

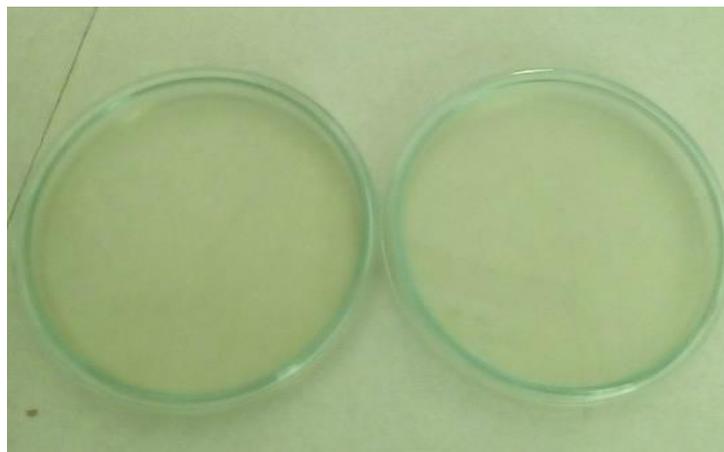
Incubación y medio de cultivo del microorganismo en el estudio del efecto antimicótico in vitro del aceite esencial de la flor de *Matricaria chamomilla* (manzanilla) en cultivo de *Candida albicans* cepa ATCC 10231.

Fig. N° 3: *Cándida albicans* ATCC 10231



Fuente: Resultados obtenidos en laboratorio de microbiología Universidad los Ángeles de Chimbote – Trujillo

Fig. N° 4: Medio de cultivo Agar Saboraud.



Fuente: Resultados obtenidos en laboratorio de microbiología Universidad los Ángeles de Chimbote – Trujillo.

ANEXO 7

Extracción del aceite esencial para el estudio del efecto antimicótico in vitro del aceite esencial de la flor de *matricaria chamomilla* (manzanilla) en cultivo de *candida albicans* cepa ATCC 10231.

Fig. 5 Y 6: Proceso de lavado y acondicionamiento de la muestra *matricaria chamomilla* (Manzanilla) en el equipo de extracción.

Fig:5



Fig:6



Fuente: Resultados obtenidos en laboratorio de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo.

ANEXO 8

Obtención e identificación del aceite esencial para en el estudio del efecto antimicótico in vitro del aceite esencial de la flor de *Matricaria chamomilla* (manzanilla) en cultivo de *Candida albicans* cepa ATCC 10231.

Fig. 7: Pera de decantación conteniendo el aceite esencial *matricaria chamomilla*.

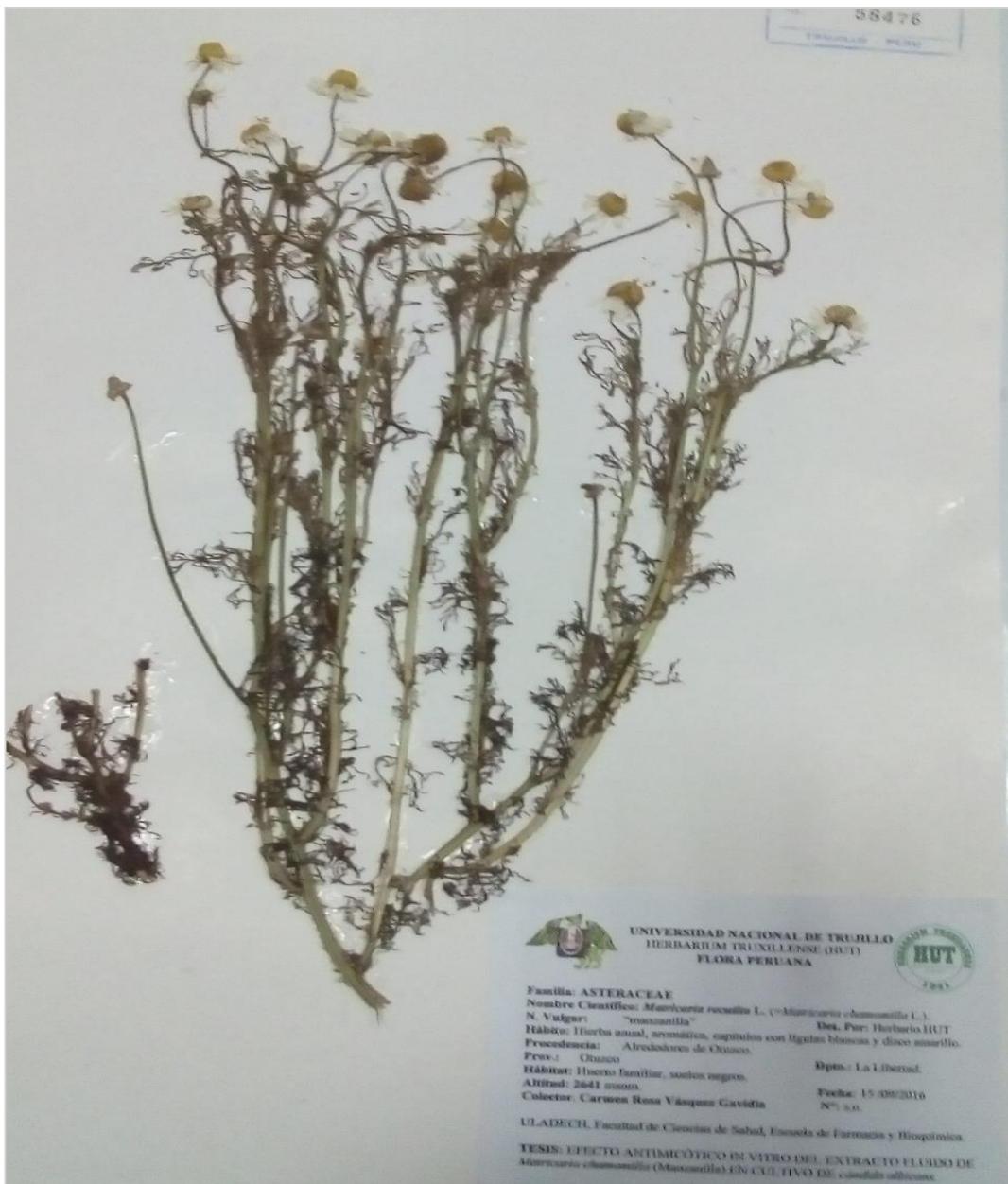


Fuente: Resultados obtenidos en laboratorio de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo.

ANEXO 9

Identificación taxonómica de la planta en el estudio del efecto antimicótico in vitro del aceite esencial de la flor de *Matricaria chamomilla* (manzanilla) en cultivo de *Candida albicans* cepa ATCC 10231.

Fig. 8: Muestra la Certificación de especie de *matricaria chamomilla* (Manzanilla).



FUENTE: HUT de La Universidad Nacional De Trujillo.

ANEXO 10

Siembra de *Cándida albicans* ATCC 10231, y aplicación de aceite esencial en el estudio del efecto antimicótico in vitro del aceite esencial de la flor de *Matricaria chamomilla* (manzanilla) en cultivo de *Candida albicans* cepa ATCC 10231.

Fig. 9: siembra de *Candida albicans* ATCC 10231 en su medio de cultivo (agar sabouraud).



Fuente: Resultados obtenidos en laboratorio de microbiología Universidad los Ángeles de Chimbote – Trujillo.

Fig. 10 y 11: Aplicación del aceite esencial de flor de *Matricaria chamomilla* (Manzanilla) en cepas de *Cándida albicans* ATCC 10231.

Fig:10



Fig:11



Fuente: Resultados obtenidos en laboratorio de microbiología Universidad los Ángeles de Chimbote – Trujillo.

ANEXO 11

Incubación y medición de halos de inhibición en el estudio del efecto antimicótico in vitro del aceite esencial de la flor de *Matricaria chamomilla* (manzanilla) en cultivo de *Candida albicans* cepa ATCC 10231.

Fig. 12 y 13: Placas que corresponde a las concentraciones 5 % Y 10% de aceite esencial de flor de *Matricaria chamomilla* (Manzanilla)

Fig: 12 (10%)

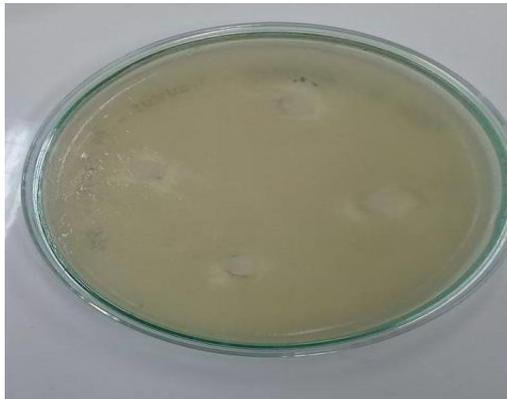
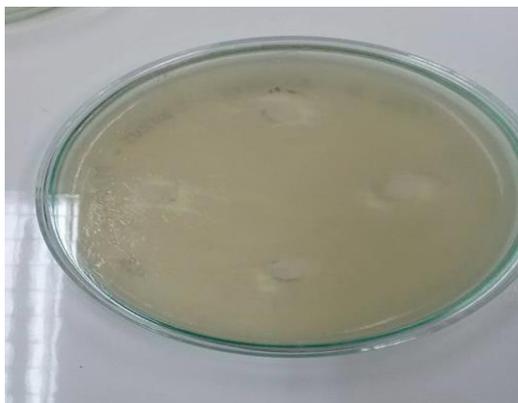


Fig: 13 (5%)



Fuente: Resultados obtenidos en laboratorio de microbiología Universidad los Ángeles de Chimbote – Trujillo.

Fig. 14 y 15: Placas que corresponde a las concentraciones de aceite esencial de flor de *Matricaria chamomilla* (Manzanilla) 2.5% Y 1.25%.

Fig: 14 (2.5%)

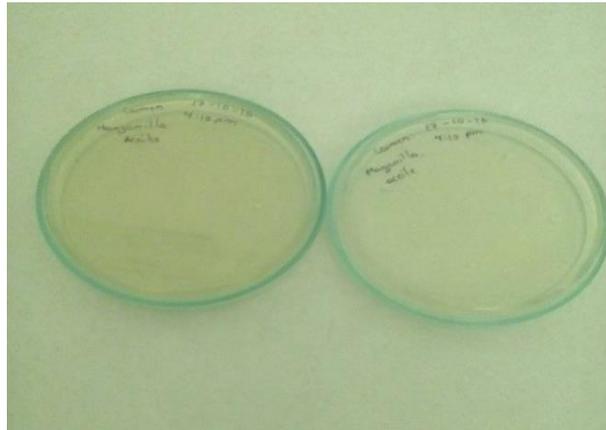
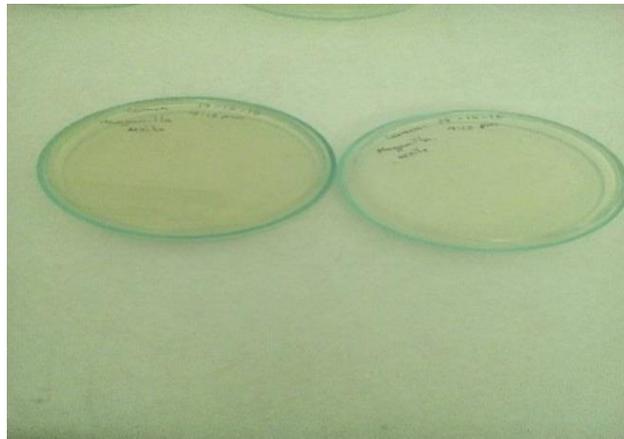


Fig: 15 (1.25%)



Fuente: Resultados obtenidos en laboratorio de microbiología Universidad los Ángeles de Chimbote – Trujillo.