



UNIVERSIDAD CATÓLICA LOS ÁNGELES
DE CHIMBOTE

FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y
BIOQUÍMICA

**EFFECTO ANTIMICÓTICO IN VITRO DEL ACEITE
ESENCIAL DE LAS HOJAS DE *Ruta graveolens* (RUDA)
SOBRE *Candida albicans***

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO.

AUTORA:

MARÍA ISABEL CUSQUIPOMA ECHEVERRÍA

ASESOR:

Mgtr. QF. CÉSAR ALFREDO LEAL VERA

TRUJILLO – PERÚ

2018

JURADO EVALUADOR DE TESIS

Dr. Q.F. Jorge Luis Díaz Ortega

Presidente

Mgr. Q.F. Nilda María Arteaga Revilla

Miembro

Mgr. Q.F. Luisa Olivia Amaya Lau

Miembro

Mgr. Q.F. César Alfredo Leal Vera

Docente Tutor de Investigación

AGRADECIMIENTO

A DIOS:

Por darme fe y esperanza. Por darme alegría y las fuerzas de seguir adelante hasta alcanzar mi meta trazada.

A mi familia querida:

Por su apoyo incondicional, su gran amor y afecto, por darme aliento cuando más necesitaba. Por estar conmigo en las buenas y malas. Son la razón de mi empeño y dedicación.

A mis Docentes de ULADECH.

Por darme la oportunidad de prepararme para un futuro competitivo. Por compartir conmigo sus conocimientos y experiencias.

DEDICATORIA

A mi hermosa familia:

A mis hermanos queridos: Fredy, Jorge, Abner, Alex y Yackeline y en especial a mis padres Josué y Jacoba, gracias por su inmenso amor y consideración.

A mi esposo y a mis hijos:

A mi Romántico Tony, gracias por alentarme con tus frases de amor. A mis hijos Nataly, Antony y Marita por su gran cariño, por ser mi fortaleza y la energía que necesito.

A mis Profesores, amigos y compañeros

Que de una u otra forma contribuyeron a la realización del presente trabajo.

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue demostrar el efecto antimicótico in vitro del aceite esencial de las hojas de *Ruta graveolens* sobre *Candida albicans* ATCC 10231. El estudio es de tipo experimental, longitudinal; se evaluó midiendo los halos de inhibición distribuidos en 4 grupos mediante el método de Kirby-Bauer. El aceite esencial se obtuvo de las hojas frescas por el método de hidrodestilación en equipo de Clevenger. Los grupos de trabajo fueron aceite esencial en concentraciones de 1,6% y 3,2%, como control estándar el Fluconazol (25ug/disco) y control negativo Dimetilsulfóxido (DMSO) al 5%. Con los resultados obtenidos se evaluó el efecto antimicótico, las medidas de los halos de inhibición a las 48 h fue para el aceite esencial 1,6% (35,95 mm); al 3,2% (41,25 mm); para el control estándar (28.69 mm), y para el control Negativo (6mm). Se encontró diferencia estadísticamente significativa en cuanto al efecto antimicótico del aceite esencial de *Ruta graveolens* al 1,6% y 3,2%. Por lo tanto se concluye que el aceite esencial de las hojas de *Ruta graveolens* si demostró un excelente efecto antimicótico frente a *Candida albicans*.

Palabras clave: *Ruta graveolens*, aceites esenciales, *Candida albicans*, halo de inhibición, efecto antimicótico.

ABSTRACT

The objective of the present investigation was to demonstrate the in vitro antifungal effect of the essential oil of *Ruta graveolens* leaves on *Candida albicans* ATCC 10231. The study is experimental, longitudinal; it was evaluated by measuring the inhibition zones distributed in 4 groups by the Kirby-Bauer method. The essential oil was obtained from the fresh leaves by the method of hydrodistillation in Clevenger equipment. The working groups were essential oil in concentrations of 1.6% and 3.2%, as standard control Fluconazole (25ug / disc) and negative control Dimethylsulfoxide (DMSO) at 5%. With the obtained results the antifungal effect was evaluated, the measurements of the inhibition halos at 48 h was for the essential oil 1.6% (35.95 mm); at 3.2% (41.25 mm); for the standard control (28.69 mm), and for the Negative control (6mm). A statistically significant difference was found regarding the antifungal effect of *Ruta graveolens* essential oil at 1.6% and 3.2%. Therefore it is concluded that the essential oil of *Ruta graveolens* leaves demonstrated an excellent antifungal effect against *Candida albicans*.

Key words: *Ruta graveolens*, essential oils, *Candida albicans*, inhibition halo, antifungal effect.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTO	iii
DEDICATORIA	iv
RESUMEN.....	v
ABSTRACT.....	vi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN LITERARIA:	7
2.1. ANTECEDENTES:.....	7
2.2. BASES TEÓRICAS.....	9
III. HIPÓTESIS:.....	23
IV. METODOLOGIA:	24
4.1. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN:.....	24
4.2. POBLACIÓN Y MUESTRA	24
4.3. DEFINICIÓN Y OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES	26
4.4. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS	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 RESULTADOS:	37
VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES:.....	42
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
ANEXOS.	51

CONTENIDO DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Esquema del Método de hidrodestilación para la extracción de aceites esenciales. ...	51
Gráfico 2. Equipo de Hidrodestilación (Clevenger) y sus partes	52
Gráfico 3. Proceso de preparación del estándar 0,5 Mcfarland para 100 mL en el estudio de efecto antimicótico in vitro del aceite esencial de las hojas de <i>Ruta graveolens</i> sobre <i>Candida albicans</i>	53
Gráfico 4. Media y Desviación Estándar de los 4 grupos de estudio en el efecto antimicótico in vitro del aceite esencial de las hojas de <i>Ruta graveolens</i> sobre <i>Candida albicans</i>	54

CONTENIDO DE TABLAS

Tabla 1. Evaluación del efecto antimicótico in vitro del aceite esencial de las hojas de <i>Ruta graveolens</i> al 1,6% y 3,2 % sobre <i>Candida albicans</i> , según tiempo.	36
Tabla 2. Comparación del efecto antimicótico del aceite esencial de las hojas de <i>Ruta graveolens</i> al 1,6% y 3,2 % frente al Fluconazol en cultivos de <i>Candida albicans</i> , según tiempo.	36
Tabla 3. Grado de sensibilidad que presenta <i>Candida albicans</i> ante el aceite esencial de <i>Ruta graveolens</i> al 1,6% y 3,2% a las 48 horas, según escala de Duraffourd en comparación con el estándar farmacológico.	37

CONTENIDO DE CUADROS

Cuadro. 1. Taxonomía de <i>Ruta graveolens</i>	57
Cuadro 2. Características Organolépticas del aceite esencial de <i>Ruta graveolens</i>	57
Cuadro 3. Equipos y materiales utilizados en el estudio de efecto antimicótico in vitro del aceite esencial de las hojas de <i>Ruta graveolens</i> sobre <i>Candida albicans</i>	58

I. INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia se ha usado la Medicina Tradicional, dentro del cual está las plantas medicinales que se siguen usando como terapia para mejorar la salud, se calcula que el 80% de los habitantes a nivel mundial se cura con remedios a base de plantas medicinales, esto facilita la gran diversidad que existe, encontrándose un promedio de 35000 especies medicinales que tienen un gran potencial terapéutico. En la actualidad se ha incrementado el uso y la comercialización de plantas medicinales con fines terapéuticos tanto en países desarrollados y subdesarrollados ⁽¹⁾.

La Organización Mundial de Salud (OMS), da a conocer las pautas en la investigación para identificar, dar certeza, validar, determinar la eficiencia y el efecto terapéutico de los preparados vegetales desde el punto de vista científico, teniendo en cuenta requisitos importantes como: nombre común, Identificación taxonómica, parte de la planta a usar, forma y método de preparación, ensayos físico químicos para encontrar los compuestos y cuantificar la sustancia activa. Para determinar la calidad, tiene que demostrar ser pura, legítima, determinar características micro-macroscópicas, así como sus rasgos organolépticos, detallando los ensayos físico-químicos realizados para ver la acción terapéutica ⁽²⁾.

La medicina tradicional siempre se ha preocupado por promover el mantenimiento de la salud no solo previniendo, sino también en el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades. Se realizó estudios e investigaciones sobre terapias tradicionales de la mente, el cuerpo y plantas medicinales siendo usados por la mayoría de personas de países desarrollados ⁽³⁾.

En el Perú se está realizando diversas investigaciones sobre la eficacia de plantas medicinales pero se considera que solo han sido estudiadas el 60% de ellas, encontrándose que 1400 especies se usan en diversas terapias, en su mayoría son de la Amazonia Peruana; quedando todavía por explorar la sierra. A mediados del siglo XX a la flora Peruana se le da un enfoque mágico, conocido por los que curan con hierbas, 152 especies de plantas son compradas por los usuarios en el mercado. En el Norte del Perú se registraron 510 plantas medicinales que son usadas en diversas terapias y con diferentes aplicaciones ⁽⁴⁾.

En la actualidad existe diversas enfermedades que afecta a la población en general dentro de ellas las enfermedades fúngicas debido a que las personas son inmunodeprimidos, posquimioterapia, cirugías por trasplante o el uso de una inmensa gamma de antibacterianos transformándose en “placas de cultivo vivientes” para enfermedades oportunistas. Los Problemas de salud causada por hongos son causa de una alta tasa de morbi-mortalidad. Los Fármacos antimicóticos en la actualidad presentan un cierto porcentaje de toxicidad, y no solo eso sino que interaccionan con otros medicamentos que el paciente usa produciendo resistencia, por lo que es de suma urgencia descubrir nuevos medicamentos anti fúngicos con más potencia, que demuestren mayor efectividad ⁽⁵⁾.

Hoy en día se están realizando muchos estudios para demostrar la eficacia terapéutica en los diversos compuestos derivados de plantas medicinales siendo una alternativa más segura que los antimicrobianos sintéticos lo cual motiva que los principios activos de origen natural sirvan de base para el desarrollo de nuevos fito-fármacos con acción bactericida y antimicótica ⁽⁵⁾.

Los hongos tienen múltiples funciones en nuestra vida, tienen importancia en la ecología por la capacidad de descomposición de materia orgánica. En biotecnología se usa en la elaboración de productos como el vino, pan, antibióticos, enzimas, etc. Sin embargo algunos son patógenos para el hombre, siendo estos causantes de las infecciones micóticas, afectando de manera superficiales a nivel de piel, pelos, uñas o mucosas y profundas o sistémicas. Siendo la más frecuente las dermatofitosis, pitiriasis vesicolor y la candidiasis, llegando a tener altas tasas de morbi-mortalidad ⁽⁶⁾.

El género *Cándida* forma parte de la flora normal, por lo que algunas personas con riesgo o susceptibles pueden infectarse a sí mismos (infección endógena), la candidiasis alcanza hasta el 80% de infecciones invasoras, y una mortalidad de hasta 30%, los avances tecnológicos hacen que tenga más resistencia incrementando los costos en el tratamiento, tornándose en una enfermedad grave, progresiva, con difícil diagnóstico y difícil tratamiento ⁽⁷⁾.

La Candidiasis es una enfermedad causada por diversas levaduras del género *Candida*, que afectan cualquier tejido (boca, vías respiratorias altas, vía digestiva, vagina) evidenciando diversos cuadros clínicos de acuerdo al estado de inmunidad del paciente. La Candidiasis tiene una distribución geográfica universal produciéndose en un 70% por *C. albicans* siendo más frecuente a nivel de piel y mucosas pero también puede afectar de forma sistémica y son más invasivas y severas, se observan el 1% en pacientes con SIDA o en pacientes con predisposición. También el 75% de las mujeres que están en la etapa reproductiva pasan episodios de vulvovaginitis por *Candida*, el 33% es reiterado ⁽⁷⁾.

La planta de ruda tienen múltiples estudios sobre la toxicidad que presenta, pero estos datos faltan aún documentar con más estudios, Hoy en día existe nuevas investigaciones sobre esta planta con otras posibilidades terapéuticas para la elaboración de nuevos fitofármacos, presenta propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas, antimicrobianas, antimicóticas, antiespasmódicas, entre otras. Sus principales constituyentes son los aceites esenciales, alcaloides furoquinólicos, flavonoides y otros que le confieren el uso en diversas terapias ⁽⁸⁾.

La ruda es cultivada en varios países, es considerada autóctona del Sur de Europa y el Norte de África, ha sido usado desde hace mucho tiempo en preparaciones médicas, contienen más de 120 compuestos naturales como alcaloides de acridona, cumarinas, aceites esenciales (90% es metilnonilcetona) , flavonoides y furoquinolonas. En la medicina tradicional es usada como estimulante, emenagogo, diurético, antimicótico, antibacteriano y abortefaciente. Por lo tanto la ruda ocupa un lugar importante en la medicina tradicional para la terapia de diversas enfermedades, afecciones antiinflamatorias y será la base para muchas drogas sintéticas ⁽⁹⁾.

En la actualidad la medicina moderna y las Industrias Farmacéuticas ha alcanzado sus más grandes avances Científico Tecnológicos pero sin embargo al encontrarse frente a diversos microorganismo patógenos resistentes, existe una gran preocupación por el difícil diagnóstico, prolongando tratamiento e incremento de los costos económicos. En los últimos años se evidencia que la gran mayoría de los tratamientos antimicóticos se han visto frustrados, por diversas causas, siendo una de ellas el surgimiento de levaduras resistentes, esto se debe a la aparición de otras especies patógenas extrañas a la automedicación o prescripción irracional. Por ello es importante mejorar las medidas

profilácticas, asegurándose el éxito en los tratamientos, ya que el fallo del tratamiento es la principal causa de resistencia ⁽¹⁰⁾.

Hoy en día las plantas medicinales han recuperado su importancia, siendo una alternativa a nuevas aplicaciones terapéuticas por ejemplo el aceite esencial de *Ruta graveolens* tiene muchos beneficios preventivos y curativos. De allí que surge una alternativa en la medicina natural cuyos componentes fitoquímicos logren el efecto terapéutico esperado. El presente trabajo se justifica por su importancia experimental dando a conocer la existencia de plantas medicinales con propiedades antimicóticas, formando parte de una de las alternativas de prevención y tratamientos frente a enfermedades micóticas; generando así la elaboración de nuevos fitofármacos de origen natural que sean más efectivos, menos nocivos y estén al alcance de la población de bajos recursos.

Los aceites esenciales presentan una diversidad de efectos terapéuticos que aún siguen siendo estudiados por la ciencia médica, razón por la cual es necesarios profundizar dichos estudios para analizar la composición y bioactividad de los aceites de *Ruta graveolens* y motivar su uso como agente antimicótico.

Existen diversas Instituciones y organizaciones de salud que no solo tienen interés en el efecto terapéutico de ciertas plantas, sino que también desean mejorar las condiciones económicas del País con nuevas formas farmacéuticas por lo que pueden ser exportados a otros países, logrando un alto nivel de calidad y llegar a competir en los mejores mercados Nacionales e Internacionales.

La búsqueda de nuevos productos de fuentes naturales no solo permitirá el reemplazo de los productos químicamente sintetizados, sino que también nos ayuda a usar los recursos que están a nuestro alcance y apoyar con la preservación del medio ambiente y disminuir el efecto invernadero.

¿El aceite esencial de las hojas de *Ruta graveolens* (Ruda) demostró su efecto antimicótico sobre *Candida albicans*?

OBJETIVOS GENERAL:

- ✓ Determinar el efecto antimicótico In vitro del aceite esencial de las hojas de *Ruta graveolens* (Ruda) sobre *Candida albicans*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- ✓ Determinar el efecto antimicótico del aceite esencial de *Ruta graveolens* (Ruda) al 1.6% y 3.2% sobre *Candida albicans*.
- ✓ Comparar el efecto antimicótico del aceite esencial de *Ruta graveolens* (Ruda) al 1.6% y 3.2% frente al estándar farmacológico (Fluconazol).
- ✓ Determinar el grado de sensibilidad que presenta *Candida albicans* al aceite esencial de *Ruta graveolens* según escala de Duraffourd en comparación con el estándar farmacológico.

II. REVISIÓN LITERARIA:

2.1. ANTECEDENTES:

- Aouadhi et al, en el 2013 Estados Unidos, evaluó la composición química y las actividades antimicótica y anticándidiales de los extractos de *Ruta chalepensis*, mediante el método difusión en disco y dilución en caldo, estudió también los componentes del aceite esencial por cromatografía de gases encontrándose mentol (49,92%), linalol (31,1%) y 2-hexanal (5,2%). Los resultados obtenidos son que los extractos de Ruda tienen efecto antimicótico contra *Aspergillus niger*, *A. flavus* y *Candida albicans* con halos de 11-17 mm en 3-6 % ⁽¹¹⁾.
- Pino et al, en el 2014 en Habana, determina la composición química mediante cromatografía de gases y la actividad antibacteriana por difusión en agar del aceite esencial de *Ruta Chalepensis* L; cuyos componentes mayoritarios fueron cetonas alifáticas como 2-undecanona (34,88%) y 2-nonanona (25,23%). Tiene un rendimiento de 0.3% (v/p). El aceite esencial inhibió el crecimiento de bacterias fitopatógenas aisladas de caña de azúcar y tomate ⁽¹²⁾.
- Jimenes el al, en el 2014 en Colombia, determina el efecto antimicótico de extractos de hojas de *Ruta graveolens*, sobre *Botrytis cinérea* usando como solventes el hexano, diclorometano y etanol con la técnica de microdilución, cuyo resultado es que el extracto con diclorometano inhibe el crecimiento de los conidios de *B. cinerea* en un 57%. Por lo tanto se concluye que el efecto antimicótico se debe a los metabolitos secundarios como cumarinas, flavonoides y alcaloides ⁽¹³⁾.

- Desam et al, en el 2016 en Arabia Saudita, investigaron sobre los componentes químicos y antimicóticas de los aceites esenciales de *Ruta graveolens*, extrajeron los aceites esenciales por hidrodestilación siendo analizados con cromatografía de gases, encontrándose 13 fitoconstituyentes siendo los componentes más principales 2-undecanona, 2-nonanona, 2-acetoxitetradecanona, etc. El aceite esencial demostró actividad antimicótica frente a *Candida albicans* con una inhibición de 12.57- 27.10 mm ($p < 0.01$) su mayor efecto antifúngico llega a 35.1 mm; por lo tanto se demuestra que los aceites esenciales de esta planta puede usarse en terapias para enfermedades micóticas o bacterianas. ⁽¹⁴⁾.
- Mayta, et al en el 2015 en Iquitos. Realizó estudios para determinar la actividad antibacteriana a partir de extractos etanólicos de hojas de *Ruta graveolens* sobre *S. aureus* y *E. coli*. Se realiza el tamizaje fotoquímico encontrándose alcaloides, taninos, fenoles, flavonoides, saponinas, cumarinas El extracto que inicia el efecto fue de 0,5 mg/mL para *S. aureus* y 0.25 mg/mL para *E. coli*. Por lo tanto se concluye que los extractos etanólicos de *Ruta graveolens* presenta buena actividad antibacteriana ⁽⁸⁾.
- Ruiz et al, en el 2015 en Lima. Se Determina la composición química de aceites esenciales de algunas plantas como es el caso de *Ruta graveolens*, dicho estudio se hace con miras a conocer su potencial ecológico como atrayente o repelentes. Sin embargo en la industria farmacéutica se pueden elaborar fragancias, cosméticos, productos desinfectantes, antimicóticos e incluso pueden ser usados como plaguicidas. Los constituyentes mayoritarios que presentó es 2-undecanona (1,79-84,2 %), 2-decanona (0,1-11,6%), 2-nonanona (5,2-33,6%) y 2-nonanilacetato (2.8-20,9%) a quienes se le atribuye sus efectos terapéuticos, presenta un rendimiento de 0.27% ⁽¹⁵⁾.

2.2. BASES TEÓRICAS

A. DESCRIPCIÓN DE LA PLANTA ESTUDIADA

- **Origen y distribución:**

La planta de ruda denominada como *Ruta graveolens* tiene su origen en la parte Sur de Europa, el Norte de África y el Mediterráneo, crece en suelos pedregosos, hoy en día se cultivan en diversos lugares del mundo. En el Perú la mayormente se siembra en la serranía hasta una altitud de 2500-3000 msnm. Es considerada como una planta ornamental, como remedio casero, condimento culinario, y como protector de “las malas vibras”^(8, 16).

- **Taxonomía**⁽⁸⁾.

La planta de Ruda es parte de la Familia de las Rutáceas, existen 161 géneros y más de 1600 especies. Sus principales fitoconstituyentes son aceites esenciales, alcaloides y glucósidos, taxonómicamente se clasifica en: (ver en cuadro 01)

La ruda también es llamada también arruda, rue, péganeon, ruta, aruga, raute.

- **Descripción botánica:**

Es una planta bien resistente, vive un promedio de 2 años, es un arbusto que mide hasta un metro de altura, tiene raíz leñosa, fasciculada, sus tallos son cilíndricos, están erguidos que van engrosando con el paso del tiempo.

Las hojas se ubicada en forma alternada, presentan un color de verde hasta azulado, bi o tripinadas, tienen unas glándulas del que depende el olor fuerte un tanto desagradable. Las flores son de color amarillo con un tono verdoso, se agrupan en forma de ramilletes. Los pétalos son dentados y cóncavos. El fruto es como una

cápsula redonda, tiene muchas semillas tienen forma ovoide, son negras en forma de riñón ⁽⁸⁾.

- **Cultivo** ⁽⁸⁾.

Se adapta fácilmente en climas donde hay abundante luz solar o semi-sombra, en climas cálidos, templados, fríos. Pero requiere de protección en vientos fuertes.

La ruda es una planta poco exigente por lo tanto se adapta a diversos tipos de suelos, en especial los calizos y silíceos.

Requiere de riego en un rango de 2 veces por semana, sin exceso, intensificando el riego en verano y suspendiendo en invierno.

Se siembra con semillas o por esquejes. Las semillas germinan en 2-3 semanas y luego se trasplantan. Los esquejes se colocan en surcos en una distancia de 70 cm entre surco y 40 cm entre planta.

Se cultiva y se poda después de la floración para estimular su crecimiento firme y renovado. Se fertiliza con estiércol o compost o superfosfato triple de Calcio.

La época de floración es en los meses de mayo-agosto, por lo tanto se cosechan en estado de botón, ya que allí posee mayor cantidad de principios activos. Si se necesitan hojas y tallos se cosecha antes de la floración porque sus p.a. están concentrados en la savia, y se corta a una distancia de 12-15 cm del suelo. Se renueva con bastante rapidez, por lo tanto se cosechan varias veces al año.

Para alistar la muestra a trabajar se selecciona solo las hojas que estén en buen estado, se eliminan las que presenten mohos u mal estado.

- **Principios Activos** ^(8,9).

Existen estudios que han encontrado mayor a 120 fitoconstituyentes naturales

- Aceite esencial (0,1-0,6%): cetónas alifáticas (metilnonilcetona en un 90%); terpenos (pineno, limoneno, metilnonil-carbinol y cienol); ácidos (caprílico, anísico, plagónico y salicílico).
- Cuamarina y furanocumarinas (0,15-0,70%): como psoraleno, bergapteno, dafnoretina, xantoxina, etc.
- Alcaloides furoquinólicos como la arborinina, rutamina, skiamina, graveolina, graveolinina, arborotina, etc.
- Flavonoide: La Rutina (1 a 2% quercetina 3- β rutinósido), también luteolina.
- Otros metabolitos: como la Resina, gomas, taninos, ácidos ascórbico, Palmítico y Málico, compuestos amargos, glucósidos, rutamarina, etc.

- **Usos:** Se usa en terapias antiespasmódicas, antiparasitarias, hipotensoras, sedantes alopáticas, citotóxicas, antisépticas, venotónicas, vasoprotectoras, cefaleas, etc. Por vía tópica se usa en vitiligo, sarna, reumatismo, calambres, golpes, ciática, otalgia, bronquitis. ⁽⁸⁾.

- **Propiedades** ^(8,9).

Actúa como antifúngico siendo demostrado en diversos estudios in vitro inhibe el crecimiento de hongos y sobre *Candida albicans* siendo el constituyente más importante las cetonas y las cumarinas al cual se explica dicha actividad antifúngica. A nivel de sistema nervioso bloquea los canales de potasio por lo que puede tratarse con ello la esclerosis múltiple.

Tiene actividad venotónica, la rutina ejerce acciones vasoprotectoras, actúa sobre la resistencias y la permeabilidad capilar.

Se usa en terapias para inflamación. Espasmo, procesos alérgicos, antibacteriano y neoplasias; contiene ácido linoléico (omega 6) y a. alfa linolénico (omega 3) por lo tanto actúa como antioxidante ejerciendo efecto en enfermedades cardiacas, circulatorias, neurológicas ya que actúa en sangre y sistema nervioso.

En caso de Psoriasis actúan las xantotoxina, furanocumarinas y bergapteno.

Inhibe la movilidad de los espermatozoides en humanos, puede ser por efecto bloqueante de los canales de potasio por presencia de las cumarinas.

Interfiere la reproducción alterando a nivel hormonal y la forma de los ovarios (probado en ratas), debido a los flavonoides, cumarinas, terpenos y fitoxinas que son citotóxicos y anticoagulantes.

La cumarinas ejercen acciones anticoagulantes, inmunomoduladoras, se fijan al ADN alteran la división celular de las células tumorales.

- **Reacciones adversas y recomendaciones** ⁽⁹⁾.

Puede ocasionar dermatitis de contacto, melancolía, vértigos, espasmos, molestias gástricas, sueño, aborto, puede causar vómitos, incluso hematuria.

Evitar la administración oral debido a que existen escasos estudios para determinar la dosis terapéutica y la dosis tóxica.

Prohibido el uso en gestantes o lactantes por ser embriotóxica, no usar también en pacientes que padecen daño renal, gastritis, prostatitis o problemas cardiacos.

B. ACEITES ESENCIALES:

- **Definición e Importancia:**

Los aceites esenciales son productos volátiles, lipófilos, presentan un cierto aroma agradable, es propio de los vegetales superiores, y se localizan en hojas, flores frutos, rizomas, corteza, etc. La síntesis y acumulación de un aceite esencial se asocia con estructuras histológicas especiales y células con esencia, pelos secretores, glándulas secretoras y canales secretores ⁽¹⁸⁾.

Los aceites esenciales son de suma importancia en la polinización de las plantas ya que atraen a los insectos y actúan como defensa frente a depredadores. Son líquidos a temperatura ambiente, tienen una cierta coloración (ligeramente amarillos), su densidad generalmente es inferior al agua excepto el clavo de olor y la canela; tienen elevado índice de refracción y poder rotatorio. Los aceites presentan buena solubilidad en alcohol y disolventes orgánicos apolares, liposolubles. Son extraídos por destilación por arrastre a vapor, por hidrodestilación. ⁽¹⁹⁾.

Los aceites se encuentran principalmente en las coníferas, mirtáceas, rutáceas, labiadas y las umbelíferas; así mismo están presentes en diferentes órganos de la planta como hojas, flores rizoma, leño, corteza, frutos, flores. La composición varía de acuerdo con el lugar de origen, clima (clima cálido mayor cantidad), momento de que es recolectado, el método de extracción, etc. ⁽¹⁹⁾.

Siempre se debe tener en cuenta que dosis elevadas de aceite son tóxicos, en especial en el sistema nervioso central, en el caso de la ruda por sus propiedades abortivas, algunos también puede causar problemas tópicos como alergias o ciertos grados de dermatitis ⁽¹⁹⁾.

Los aceites esenciales se pueden clasificar de acuerdo a diversos criterios: Por número de unidades de isopreno (monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, etc). Por su consistencia (esencias, bálsamos, resinas). Por su origen (naturales, artificiales, sintéticos). Por su naturaleza química (son mezclas complejas de sustancias químicas, el quimiotipo que es diferente por sus metabolitos secundarios ejemplo el tomillo tiene 6 quimiotipos)⁽¹⁹⁾.

Su olor es variable de acuerdo a la propiedad de la planta, su sabor de igual forma son variables, algunos son dulces, suaves, picantes, ácidos, cáusticos o ardientes. Cuando son expuestos a la luz, se deterioran con facilidad cambiando su calidad y fragancia.⁽¹⁹⁾.

Sus características organolépticas del aceite esencial de *Ruta graveolens* se detallan en el (ver cuadro 02).

- **Obtención de Aceites Esenciales:**

Los aceites se pueden obtener por diferentes métodos: Se expresan en el pericarpio ejemplo en los cítricos, extracción por destilación por arrastre a vapor, por disolución en grasa. La droga tiene que presentar buenas características organolépticas, en caso de la ruda se realizó en estado fresco, se extrajo el aceite esencial empleando el método de hidrodestilación por arrastre en corriente de vapor de agua, 400 g de las hojas se sometió al balón de Clevenger, siendo éste el método más adecuado⁽¹⁸⁾.

El Clevenger tiene un matraz redondo que sirve para depositar las hojas de la muestra molida y una cantidad de agua pura. Los aceites esenciales se almacenan en glándulas, conductos, sacos o ciertos reservorios dentro del vegetal, por lo que se recomiendan desmenuzar las hojas para facilitar el acceso a la acción del agua⁽¹⁸⁾.

Posteriormente se calienta hasta ebullición, una vez que el aceite es extraído, es arrastrado con el vapor de agua hasta el condensador, enfría la mezcla, luego se separa; el agua que ya ha sido condensada regresa automáticamente al balón por el rebose que está conectado hacia el balón, una vez obtenido el aceite es desecado con sulfato sódico anhidro (Na_2SO_4 , anhidro), posteriormente guardado en un frasco ámbar a una temperatura de 4°C hasta su posterior estudio ⁽¹⁸⁾.

- **Usos de los Aceites Esenciales**

Su principal uso de la planta de ruda es como antiséptico, antiespasmódico, digestivo, expectorante, carminativo, eupéptico, gota, problemas reumáticos y conservante alimenticio. Siendo de mayor interés en la industria farmacéutica, cosmética y en la perfumería ⁽¹⁹⁾.

Los aceites esenciales se pueden usar en la industria alimentaria en diversos preparados, en la industria farmacéutica se usan como cremas dentales, analgésico, inhalantes, neutralizantes del sabor de medicamentos, etc. Se usan también en la producción de cosméticos, colonias, jabones, perfumes y maquillaje. Pueden ser usados como repelentes o insecticidas ⁽²⁰⁾.

- **Mecanismo de Acción de los Aceites Esenciales:**

A pesar de los múltiples estudios hechos sobre el mecanismo de los aceites esenciales aún sigue siendo complejo y no está del todo entendible, El modo de acción dependerá del tipo de microorganismo, actúa a nivel de estructura sobre la pared celular y la membrana externa de los hongos. En los dermatofitos actúa destruyendo la pared

celular y la membrana citoplasmática, es decir rompe el citoplasma y su coagulación.
(21).

Los Aceites esenciales pueden actuar de forma lipofílica e hidrofílica, los terpenoides son los que afectan la acción de las enzimas catalizadoras de membranas, ciertos componentes pueden desacoplar e interferir la translocación de la membrana e interrumpen la fosforilación del ADP (21).

La estructura de la pared celular de los hongos son de quitina y es allí donde actúan los agentes antimicóticos. Los aceites esenciales tienen terpenos/terpenoides tienen naturaleza lipofílica alta y peso molecular bajo, alteran la membrana celular causando muerte o inhibición de la célula en fase de esporulación y germinación (22).

En *Candida albicans* altera sus propiedades y afecta la función de la membrana; causa también adelgazamiento y distorsiona las paredes de las hifas, lo transforma bifurcándolo en estructuras similares a brotes; altera la permeabilidad y fluidez de la membrana, reduce el ergosterol causando inestabilidad en la osmósis y metabolismo en la célula fúngica impidiendo su reproducción y acción micótica (22).

Los terpenoides pueden causar disminución del contenido mitocondrial, por lo tanto logran alterar la oxigenación y formación de ATP, evitando la absorción de nutrientes, inhibe el H⁺ ATPasa causando una acidificación intracelular por lo tanto la célula muere (22).

C. MICOSIS

- **Generalidades:**

La micosis es una enfermedad producida por hongos, ciertas micosis se transmiten de los animales al ser humano. Las micosis se clasifican desde el punto de vista de su localización anatómica en superficiales y profundas o sistémicas. Las micosis superficiales son las que afectan a las capas dermis y epidermis de la piel, mucosas, semi-mucosas; mientras que las M. profundas afectan a la dermis, tejido celular subcutáneo; pudiendo tornarse sistémicas y llegan a afectar cualquier órgano ejemplo el aparato broncopulmonar, llegándose a complicar de acuerdo al estado de inmunidad del huésped. Las más comunes son las micosis superficiales, son contagiosas pero de fácil diagnóstico, responden bien al tratamiento ⁽²³⁾.

- **Principales Micosis Superficiales**

- Dermatofitosis: Son producidos por un grupo de hongos filamentosos (mohos), llamada también tiña, tienen una cierta incidencia zoonótica. Los llamados “empeines” que hacen que la piel lesionada se descame y se torne lisa, el “pie de atleta” afecta la zona podálica, los tricofides”.
- Los dermatofitos, son capaces de afectar tanto a la piel como a los cabellos y uñas, tenemos a género *microsporum* y *Trichophyton* (afectan piel, pelos y uñas) ⁽²³⁾.
- La Micosis por Candida: Ataca a nivel de piel y mucosas y es capaz de penetrar en los tejidos y diseminarse por vía sistémica produciendo cuadros severos de septicemia y lesiones viscerales profunda. Es de carácter oportunista estando como reservorios endógenos o exógenos; últimamente se ha visto incrementada

debido al uso indiscriminado de antibióticos, corticoides, pacientes inmunodeprimidos con VIH-SIDA. El género *Candida* son levaduras asexuadas, originan colonias blandas y cremosas, formadas por células ovoides de 3-4 micras de diámetro. Se diferencia por sus características bioquímicas destacándose *Candida albicans*, otras especies de interés son *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, etc. *C. albicans* vive de forma normal como parásito obligatorio en el tubo digestivo del hombre y animales, y se prolifera cuando hay factores favorables ⁽²¹⁾.

- Pitiriasis versicolor y otras malasseziosis: Representa un conjunto de afecciones superficiales que afectan la capa córnea. Presenta una imagen de grupos o racimos de levaduras esféricas de 3-8 um de diámetro ⁽²³⁾.
- Su diagnóstico de las micosis superficiales: se realiza mediante examen directo por diferentes técnicas y por cultivo de materiales patológicos, exámenes microscópicos, con ello se diagnostica tanto dermatomicosis como candidiasis y pitiriasis versicolor. Para complementar el estudio se cultiva en agar glucosado de Saboraud (peptona 1%, glucosa 4%, agar 2% y agua destilada) ⁽²³⁾.

- **Micosis Profundas y Sistémicas**

Son procesos patológicos que muchas veces tienen una secuencia, se inician de forma aguda a subaguda donde, tornándose crónica, pudiendo ser también pulmonar o crónica con reactivaciones. Este tipo de enfermedad lastima la piel y puede traspasar el epitelio, se diseminan por vía linfohemática. Este tipo de micosis puede ser por patógenos primarios o por hongos oportunistas (*Candida*). Existe un aumento en las

infecciones causadas por levaduras debido al uso irracional de antibióticos, implante de órganos, niños prematuros, exceso uso de corticoides inmunodeficiencia, se recomienda usar nuevos métodos estandarizados para ver la sensibilidad a los antifúngicos ⁽²⁴⁾.

- **Hongos:**

Son microorganismos eucariotas, su núcleo se encuentra envuelto por una membrana, no poseen clorofila, son saprofitos, simbioses, o parásitos. Poseen un complejo citosol que contiene microvesículas, mitocondrias, ribosomas, aparato de Golgi, La membrana celular contiene todo el ADN celular, también tiene núcleo que contiene ARN ⁽²⁰⁾.

La mayoría de los hongos desarrollan características para adaptarse y proliferarse en ambientes hostiles, por lo tanto llegan a colonizar dermis, epidermis y uñas (metabolizan queratina). Los hongos por su forma básica se dividen en levaduras e hifas, pasando por su fase vegetativa y reproductiva ⁽²⁰⁾.

- **Levaduras:**

Es un germen unicelular nucleario, cuya reproducción es por gemación, algunas por fusión o por gemación. Algunas levaduras son ascomicetos, otras basidiomicetos, otros son imperfectos, razón por la cual “levadura” sigue siendo algo incierto. Se les puede encontrar en algunos procesos patológicos y en otros casos no guarda relación con la enfermedad. Lo bueno que pocas levaduras son realmente patógenas para el hombre ⁽²⁰⁾.

D. DESCRIPCIÓN DE LA CEPA ESTUDIADA *Candida albicans*

- **Descripción Micológica:**

La cepa en estudios es la *Candida albicans*, es un hongo dimórfico, no crece de acuerdo a la temperatura de crecimiento como levadura, crece a 37° C en el huésped y a 25°C en la naturaleza, su división es ascomycota y se reproduce asexualmente por gemación. Como levadura tiene un aspecto ovalado de 3-8 um x 2-7 um de tamaño, forma grupos; mientras que en forma filamentosa, sus células se alargan por lo tanto forman filamentos, o pseudohifas. En forma de levadura es saprofita, es decir convive en simbiosis con el huésped, mientras que es estado filamentoso es un parásito patógeno, lo que conlleva a los diversos síntomas del huésped. En agar sabouraud crece en forma de colonias blancas, cremosas y lisas ⁽²⁵⁾.

- **Composición Química**

C. albicans representa del 20-30% de proteínas, 30-50% de polisacáridos, pero varía en los lípidos dependiendo de la cepa o del ambiente donde vive. Los polisacáridos llamados manán (15,2-22,9 %), glucán (47-60 %), y quitina (0,6-9%) son los que componen la pared celular, aunque también depende de las condiciones de crecimiento. Algunos estudios detallan que la pared celular de *C. albicans* se compone de (adentro hacia afuera) de monoproteínas, B-glucán-quitina, B-glucán, manoproteínas y una capa de fibrillas ⁽²⁰⁾.

- **Ecología.**

Se asocia a seres vivos de sangre caliente y crece a una temperatura de 37°C, su hábitat favorito es la mucosa vaginal, tracto digestivo y respiratorio y son causa de candidiasis endógena. Sobrevive en zonas húmedas, siendo un tanto susceptible a zonas secas ⁽²⁰⁾.

- **Patología**

Existen factores que predisponen la proliferación de *C. albicans*, ejemplo: ⁽²⁰⁾.

- Adhesinas: Los materiales plásticos usados en medicina permiten la unión de la célula fúngica a los receptores del hospedador.
- Proteinasas y fosfolipasas: Enzimas que ayudan a diseminarse por los tejidos del hospedador.
- Trigmotropismo: encuentra espacios discontinuos y logra ingresar en los tejidos.
- Toxinas y sustancias inmunosupresoras: primero que su pared le sirve de protección por su rigidez. Presenta buena adherencia porque existe una lesión epitelial por los carbohidratos y por la disminución de la flora saprofita. Presenta genes de la hexosaminidasa, genes de proteínas aspárticas, gen que produce tubos germinales y aumenta adhesión.

- **Medio de cultivo**

El medio de cultivo adecuado para levaduras es el Agar Sabouraud Dextrosa, su componente de Glucosa y su pH bajo de éste medio logran un buen crecimiento y desarrollo de las levaduras ⁽²⁵⁾.

- **Poder patógeno**

La levadura *Candida albicans* es considerada como no patógena puesto que la flora bacteriana y el sistema inmunológico evitan su proliferación, estando en equilibrio para no producir enfermedades; pero al alterarse se produce las denominadas Candidiasis que ocasiona desde leves infecciones en piel o mucosas hasta micosis graves, profundas y sistémicas.⁽²⁵⁾.

- **Tipos de Candida**⁽²⁰⁾.

- C. mucocutánea: afecta a la cavidad bucal y mucosa vaginal, aparece en forma de placas blancas que pueden unirse en forma de membrana, se diagnostica observando las pseudohifas y blastoconidios teñidas en Gram de frotis del exudado, afecta al 100% de pacientes con SIDA.
- C. cutánea: están presentes en las zonas húmedas ejemplo entre los dedos de manos y pies, bajo las mamas, en axilas, en ingle. Afecta también en uñas denominándose onicomycosis.
- C. sistémica: afecta a pacientes terminales con cáncer o VIH, en trasplantes.
- C. del Aparato Urinario: causa cistitis, debido al cambio de pH intercambiando los iones Na^{++} e H^+ .
- Meningitis por Candida: suele complicarse en neurocirugía.

III. HIPÓTESIS:

H0: El aceite esencial de las hojas de *Ruta graveolens* no tiene efecto antimicótico sobre las Cepas *Candida albicans*

H1: El aceite esencial de las hojas de *Ruta graveolens* tiene efecto antimicótico sobre las Cepas *Candida albicans*

IV. METODOLOGIA:

4.1. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN:

La Presente Investigación es de tipo experimental, longitudinal.

Se llevó a cabo mediante el método de Kirby-Bauer (Agar Difusión) cuyo fundamento se basa en la inhibición del crecimiento del hongo *Candida albicans*, mediante la difusión de sustancias activas en un medio sólido la que se evidencia con la formación de halos de inhibición ⁽²⁶⁾.

La extracción del aceite esencial se realizó mediante el método de hidrodestilación que consiste en llevar a ebullición un componente soluble de un material vegetal aromático, de modo que los vapores se condensan y como el aceite es inmisible en agua, se separan de acuerdo a su densidad, logrando recolectarse el aceite esencial ⁽¹⁹⁾.

4.2. POBLACIÓN Y MUESTRA

A. POBLACIÓN VEGETAL:

Se realizó la recolección de la planta completa en el mismo lugar de procedencia *Ruta graveolens* (Ruda) de Otuzco, distrito de Usquil ubicado a 3,018 m.s.n.m, con la ayuda de un familiar con experiencia en esta planta.

- Muestra vegetal:

La muestra estuvo constituida por las hojas frescas de *Ruta graveolens* (Ruda)

- Criterios de Inclusión:

Las hojas de ruda en buen estado, libre de bacterias, sin hongos,

El transporte se realizó en bolsas de papel de Kraft en condiciones higiénicas para evitar la contaminación y asegurar la ventilación, evitando la putrefacción.

Luego se transportó desde el lugar de recolección, hacia la ciudad de Trujillo para su respectiva identificación en el Herbario de la Universidad Nacional de Trujillo en donde fue codificada y registrada como *Ruta graveolens* 59052.

- **Criterios de exclusión:**

Las hojas con bacterias y hongos.

B. POBLACIÓN MICROBIOLÓGICA:

La población microbiológica fue *Candida albicans* Cepa ATCC (American Type Culture Collection) 10231. La Cepa se obtuvo en el laboratorio microbiológico de la Universidad Nacional de Trujillo.

- **Criterios de Inclusión:**

Se empleó levaduras jóvenes, se extrajo con hisopo estéril y se sembró en agar Sabouraud medicado con Cloranfenicol, donde crecen nuevas levaduras.

- **Criterios de exclusión:**

Se excluyó cepas que sobrepasen de 30 horas de haberse cultivado.

4.3. DEFINICIÓN Y OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Variables	Definición conceptual	Definición operacional	Indicadores de medición.	Escala de medición
Dependiente Efecto antimicótico sobre <i>Candida albicans</i> .	Levadura <i>Candida albicans</i> causante de diversas micosis, forma halos de inhibición alrededor de los discos al ser expuesto a agente antimicótico.	Se determinó al medir los diámetros de los halos de inhibición.	Diámetro de halos de inhibición en mm	Variable cuantitativa de Razón
Independiente Aceite esencial de <i>Ruta graveolens</i>	Capacidad del aceite esencial para inhibir el crecimiento de la cepa.	Concentración del aceite esencial de <i>Ruta graveolens</i>	Aceite esencial al 1,6% Aceite esencial al 3,2%	Variable cualitativa Nominal

4.4. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS

Los equipos materiales utilizados se detallan en (cuadro 03)

A. OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL:

Extracción de los aceites esenciales:

Se realizó en la facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad los Ángeles de Chimbote.

Primero se armó el equipo de destilación Clevenger, luego se colocó 400 g de las hojas frescas de ruda en el balón aforado a 1L, se sometió a ebullición para que el aceite

esencial con el agua se evaporen continuamente; el condensador que va acoplado al balón, permite acumular el aceite en la parte superior de la mezcla condensada. Después de agotar completamente la planta se procedió a retirar con mucho cuidado el aceite esencial, una vez separado se colocó en frasco de vidrio de color ámbar y luego es refrigerado para conservar sus características y propiedades terapéuticas.

Método de extracción de los aceites esenciales por hidrodestilación (Ver Gráfico 01).

Equipo de hidrodestilación y partes (Ver Gráfico 02)

Características organolépticas:

Se detallan en (cuadro 02).

Determinación de la Densidad:

d= densidad (g/ml)

M= picnómetro (g)

m= masa (g)

M1= picnómetro con agua (g)

v= volumen (mL)

M2= picnómetro con aceite (g)

$$d = m/v$$

$$d = \frac{M2 - M}{M1 - M}$$

$$d = \frac{18.38 - 10.1280}{20.14 - 10.1250}$$

$$d = \frac{8.252 \text{ g}}{10.015 \text{ mL}}$$

$$d = 0.8239 \frac{\text{g}}{\text{mL}}$$

$$d = 823.9 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$$

Rendimiento del Aceite Esencial (RAE):

Se determinó a partir de las hojas frescas de *Ruta graveolens* 400 g de hojas en cada extracción haciendo un total de 4000 g de muestra obteniendo un total de 10 mL.

Establecido en la siguiente formula:

% RAE= Porcentaje de rendimiento del aceite esencial

Vol. A.E.= Volumen del aceite esencial obtenido

W muestra = Peso de la muestra a destilar

$$\%RAE = \frac{\text{Vol. A. E (mL)} \times 100}{\text{W muestra (g)}}$$

$$\%RAE = \frac{10 \text{ mL} \times 100}{4\ 000 \text{ g}}$$

$$\%RAE = 0.25 \% \text{ (p/v)}$$

Medición del Índice de Refracción:

Nos sirvió para calcular la diferencia entre el ángulo de incidencia y el de refracción del haz. Se colocó 2-3 gotas de aceite esencial en el centro de la superficie del prisma.

El índice de Refracción n_D^{20} es de 1.4250 (T-20).

Significa que se ha usado la línea de emisión de sodio a 589 nm a una temperatura de 20°C lo que indica la presencia de compuestos oxigenado aromáticos.

B. PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR 0,5 MCFARLAND PARA EL INÓCULO:

McFarland es una escala que consiste en una serie de tubos estandarizados que contienen una suspensión de un precipitado fino, semejante a suspensiones bacterianas en opacidad. El fundamento de éste método es establecer una relación entre un precipitado químico y una suspensión bacteriana. El patrón 0,5 McFarland tiene una amplia aplicación en la preparación de inóculos, para la realización de las pruebas de sensibilidad antimicóticas, se utiliza para la preparación de inóculos en disolución de agar.

Procedimiento ⁽²⁷⁾

- La preparación del estándar 0,5 McFarland en 10 mL se hizo mezclando 0,05 mL de sulfato de Bario al 1% y 9,95 mL de ácido sulfúrico al 1%.
- Se mezcló y con ayuda de un espectrofotómetro (longitud de onda a 530 nm), se ajustó a una densidad óptica hasta alcanzar la turbidez del tubo N 0,5 de escala de McFarland con una absorbancia de 0,08-0,10 nm. equivalente a una concentración aproximada de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL UFC= Unidad Formadora de Colonias.
- Sellar y guardar hasta el momento de uso para comparación de inóculo.
- Para poder usar el patrón de turbidez se agitó vigorosamente, tiene que haber luz adecuada, se comparó la turbidez micótica con la turbidez del patrón, sosteniendo los tubos en un fondo blanco.

Ver Gráfico 03. Proceso de preparación de McFarland.

C. PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO.

Es un medio adecuado para cultivo de hongos patógenos y no patógenos, en este caso se usó el Agar Dextrosa Sabouraud medicado con Cloranfenicol como medio para evitar crecimiento bacteriano y evitar interferencias en el cultivo. El Procedimiento que se hizo es el siguiente: ⁽²⁶⁾.

- Pesar 65 g de Agar Dextrosa Sabouraud medicado, se disuelve en 1 Lt de agua destilada.
- Calentar y agitar constantemente hasta disolver bien, hervir por espacio de un minuto.
- Esterilizar a 121°C por 15 minutos.
- Posteriormente enfriar hasta 45- 50°C, vaciar 17-20 ml del medio en cada placa previamente esterilizadas.
- Dejar gelificar, invertir las placas, para evitar que se deposite gotas de vapor en la superficie del medio, identificar con plumón indeleble y almacenar.

D. RECONSTITUCIÓN DE LA CEPA *Candida albicans*

La Cepa *Candida albicans* ATCC 10231 fue reactivada o rejuvenecida en caldo de dextrosa Sabouraud medicado, se preparó una solución estéril de 5 ml, se hizo un hisopado de *Cándida* madre en la solución, se comparó con la escala del tubo N° 0,5 de McFarland, hasta llegar a una concentración de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml; posteriormente en una placa se hizo hisopados en 4 direcciones, se dejó incubar por espacio de 24 horas a 37° C, a partir del cual se realizó el sembrado.

E. ESTANDARIZACIÓN INOCULACIÓN DE LA CEPA EN PLACAS PETRI.

Una vez que la *Candida* hija estuvo rejuvenecida pasado las 24 horas, entonces nuevamente se preparó una solución estéril con colonias jóvenes, se comparó con el patrón del tubo N° 0,5 de la escala de McFarland, estandarizadas a una concentración de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml, entonces se sacó un hisopado con la suspensión del inóculo pasando en 4 direcciones en cada placa, con cada hisopado se logró sembrar 5 placas, haciendo un total de 20 placas.

F. PRUEBA PILOTO

Para poder determinar las concentraciones que presenten halos de inhibición medibles se lleva a cabo dos pruebas pilotos ya que no se cuenta antecedentes que establezcan concentraciones específicas de los aceites esenciales de *Ruta graveolens* sobre *Candida albicans*.

La primera prueba piloto se trabajó con concentraciones de aceite esencial al 20%, 10% y 5% en la cual presenta una inhibición total, visualizándose las placas sin crecimiento fúngico, solamente hubo crecimiento fúngico en el control negativo con Dimetilsulfóxido (6 mm).

La segunda prueba piloto se trabajó con concentraciones del aceite esencial menores al 5%, como 3%, 2% y 1% obteniendo como resultado halos de inhibición medibles en 3% (33mm), 2% (15 mm) y 1 % (10 mm), se comparó con un control estándar Fluconazol (27mm) y control negativo (6 mm).

Basado en estos datos de las dos pruebas piloto, se distribuye los grupos de trabajo en la presente investigación.

G. DISTRIBUCIÓN DE LOS GRUPOS DE TRABAJO

Se distribuyeron en 4 grupos (5 placas por grupo), en cada placa 4 discos distribuidos equitativamente, haciendo un total de 20 lecturas por cada grupo.

a. EXPERIMENTO 01:

Se preparó una concentración de aceite esencial de *Ruta graveolens* al 1.6 % diluido en Dimetilsulfóxido al 5%. Se agrega en cada disco a razón de 0,01 mL (10 microlitros) con la ayuda de una micropipeta graduada.

b. EXPERIMENTO 02:

Se preparó una concentración de aceite esencial de *Ruta graveolens* al 3.2 % diluido en Dimetilsulfóxido al 5%. Se agrega en cada disco a razón de 0,01 mL (10 microlitros) con la ayuda de una micropipeta graduada.

c. CONTROL ESTÁNDAR :

Con el fin de observar si las levaduras inhiben su crecimiento frente al Fluconazol que es un fármaco de eficacia comprobada. Se preparó una concentración de Fluconazol (25ug/disco) diluido en agua destilada. Se agrega a cada disco a razón de 25 ul de principio activo.

d. CONTROL NEGATIVO:

Con el fin de observar si el Dimetilsulfóxido (DMSO) no posee actividad antimicótica. Se utilizó al DMSO al 5%.

H. APLICACIÓN DE LOS DISCOS EN LAS PLACAS INOCULADAS.

Una vez que se distribuyó los grupos de trabajo se usó los discos de 6 mm de diámetro de papel Wathman N° 42, previamente esterilizados (los discos de sensibilidad sin antibiótico), se embebieron con las concentraciones de aceite esencial, así como con

los controles estándar y negativo; con pinzas estériles se ubicaron equitativamente en las placas a razón de 4 discos por placa, se presionó suavemente para ejercer un mejor contacto con el medio se dejó reposar 30 minutos a temperatura ambiente para lograr una mayor difusión de las muestras luego es llevado a incubación.

I. INCUBACIÓN

Las placas fueron incubadas a una temperatura de 37° C por 24 horas y 48 h para ver los halos de inhibición.

J. LECTURA DE DATOS.

Pasado las 24 h se realizó la primera lectura midiendo los halos de inhibición de crecimiento con regla graduada en milímetros. Los halos de inhibición fueron medidos basado en el crecimiento micótico alrededor del disco. El diámetro de la zona de inhibición fue directamente proporcional al efecto antimicótico del aceite esencial de las hojas de *Ruta graveolens* sobre la Cepa *Candida albicans*. Se realizó la misma lectura a las 48 horas.

4.5. PLAN DE ANÁLISIS:

Se recopilan todos los datos de las diferentes placas para posteriormente realizar las tablas y gráficos correspondientes. Para el análisis estadístico se utilizó Media y Desviación Estándar de los grupos de estudio en concentraciones de 1.6% y 3.2% del aceite esencial, según el tiempo. La significancia se determinó mediante la prueba de ANOVA, establecidos en los resultados, Se determinó el grado de sensibilidad de la Cepa *Candida albicans* según la escala de Duraffourd en comparación con el estándar farmacológico.

4.6. MATRIZ DE CONSISTENCIA:

TITULO DE LA INVESTIGACIÓN	FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	TIPO DE INVESTIGACIÓN /DISEÑO	VARIABLES	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADOS POR ESCALA DE MEDICIÓN	PLAN DE ANALISIS
EFFECTO ANTIMICÓTI- CO IN VITRO DEL ACEITE ESENCIAL DE LAS HOJAS DE Ruta graveolens (RUDA) SOBRE Candida albicans	¿El aceite esencial de las hojas de <i>Ruta graveolens</i> (Ruda) demostró su efecto antimicótico sobre <i>Candida albicans</i> ?	Determinar el efecto antimicótico In vitro del aceite esencial de las hojas de <i>Ruta graveolens</i> (Ruda) sobre <i>Candida albicans</i> .	H0: El aceite esencial de las hojas de <i>Ruta graveolens</i> no tiene efecto antimicótico sobre las Cepa <i>Candida albicans</i> H1: El aceite esencial de las hojas de <i>Ruta graveolens</i> tiene efecto antimicótico sobre las Cepa <i>Candida albicans</i>	La Presente Investigación es de tipo experimental longitudinal.	Dependiente Efecto antimicótico sobre <i>Candida albicans</i> . Independiente Aceite esencial de <i>Ruta graveolens</i>	Se determinó al medir los diámetros de los halos de inhibición en mm. Concentración del aceite esencial de <i>Ruta graveolens</i> al 1,6% y 3,2%.	Variable cuantitativa de Razón Variable cualitativa Nominal	Se determinó la significancia mediante la prueba ANOVA y grado de sensibilidad según escala Duraffourd.

4.7. PRINCIPIOS ÉTICOS:

En el presente trabajo se trató de cumplir con los principios éticos de un verdadero trabajo de investigación in vitro. De acuerdo a Código de ética y Protocolo de Bioseguridad establecido para los trabajos de Investigación ULADECH, se tuvo siempre presente la preservación de especies vegetales con el uso racional y las Normas de Bioseguridad en el Laboratorio, ejerciendo buenas prácticas en los diferentes procedimientos hechos, se garantizan la manipulación de las especies biológicas desde la recepción hasta la culminación de la Investigación. Aunque cabe recalcar que para todo trabajo de Investigación siempre se debe evaluar los riesgos y/o beneficios probables para conservar las especies vegetales, preservar el medio ambiente y para el Investigador ⁽²⁸⁾.

V. RESULTADOS:

5.1. RESULTADOS:

Tabla 1. Evaluación del efecto antimicótico in vitro del aceite esencial de las hojas de *Ruta graveolens* al 1,6% y 3,2 % sobre *Candida albicans*, según tiempo.

Grupos (n=20)	Diámetros del Halo de inhibición promedio (mm)	
	24 h	48 h
Aceite esencial de <i>Ruta graveolens</i> al 1,6 %	20.05±1.90	35.95±1.96
Aceite esencial de <i>Ruta graveolens</i> al 3,2 %	27.6±7.34	41.25±1.68

Tabla 2. Comparación del efecto antimicótico del aceite esencial de las hojas de *Ruta graveolens* al 1,6% y 3,2 % frente al Fluconazol en cultivos de *Candida albicans*, según tiempo.

Grupos (n=20)	Diámetro del halo de inhibición (mm)			
	24 h	Significancia (p)	48 h	Significancia (p)
Control Negativo (DMSD) ^a	06.00 ± 0.00		06.00 ± 0.00	
Control estándar (fluconazol)	27.00 ± 2.64	P=0.8	28.69 ± 4.37	P= 0.00**
Aceite Esencial 1.6%	20.05 ± 1.90		35.95 ± 1.96	
Aceite Esencial 3.2%	27.60 ± 7.34		41.25 ± 1.68	

** P<0.01, altamente significativo, según prueba ANOVA

^a DMSO: Dimetilsulfóxido

Tabla 3. Grado de sensibilidad que presenta *Candida albicans* ante el aceite esencial de *Ruta graveolens* al 1,6% y 3,2% a las 48 horas, según escala de Duraffourd en comparación con el estándar farmacológico.

Grupos de estudio	Sensibilidad
Control Negativo (DMSD)	Nula
Control estándar (fluconazol)	Sumamente sensible
Aceite Esencial 1.6%	Sumamente sensible
Aceite Esencial 3.2%	Sumamente sensible

5.2. ANALISIS DE RESULTADOS:

La importancia del estudio de la *Ruta graveolens* tiene relevancia en el uso popular, especialmente en la sierra de La Libertad se usa para el mal de aire, para el susto, para ahuyentar la envidia y las malas vibras, como antiespasmódico en cólicos menstruales y regulador de la menstruación, por ser considerada tóxica se prohíbe en gestantes. También es usado como antiinflamatorio, antiséptico, entre otros usos.

En la tabla 1, se evidenció el efecto antimicótico in vitro del aceite esencial de *Ruta graveolens* al 1.6% y 3.2% sobre *Candida albicans*, en tiempo de 24 y 48 horas, el diámetro del halo de inhibición por el aceite esencial de *Ruta graveolens* al 1.6%, fue de 20.05 ± 1.90 y 20.05 ± 1.96 mm respectivamente.

Sin embargo, para la concentración de *Ruta graveolens* al 3.2% sobre *Candida albicans*, en el tiempo de 24 y 48 horas, el diámetro del halo de inhibición por el aceite esencial de *Ruta graveolens* fue de 27.6 ± 7.34 y 41.25 ± 1.68 respectivamente, observándose un

mayor efecto en la concentración del aceite esencial al 3.2 %, esto debido a que existe una mayor concentración del aceite y mejor difusión en el medio. Los aceites esenciales presentan una parte lipofílica e hidrofílica, siendo los terpenoides agentes liposolubles, que afectan a las enzimas catalizadoras de membrana, ciertos componentes pueden desacoplar e interferir la traslocación de la membrana e interrumpen en la fosforilación del ATP ⁽²¹⁾.

Según Mayta et al, en el 2015 menciona que *Ruta graveolens* presenta aceites esenciales cuyos componentes son cetónas alifáticas, terpenos y algunos ácidos que le confieren actividad antimicrobiana; y Nazzaro en el 2017 confirma que los terpenos y terpenoides tienen naturaleza lipofílica alta y peso molecular bajo, alteran la membrana celular causando muerte o inhibición de la célula en fase de esporulación y germinación ^(8, 22).

En la tabla 2, se observa el efecto antimicótico in vitro del aceite esencial de *Ruta graveolens* al 1.6% y 3.2% sobre *Candida albicans*, en comparación al fluconazol, presenta mayor efecto debido al halo de inhibición que produce. El aceite esencial de *Ruta graveolens* al 1.6%, tiene aproximadamente un 25% más de efecto antimicótico que el fluconazol y el de 3.2% mucho más, esto es debido a que el antifúngico ejerce su acción en la pared celular fúngica, la quitina es indispensable para la pared celular, pero es aquí donde actúan los aceites esenciales, alterando sus propiedades de la membrana, afectan su función, producen adelgazamiento y distorsión de la pared de la hifa, alteran la permeabilidad y la fluidez de la membrana en *Candida albicans*, reducen el ergosterol causando inestabilidad en la osmósis y metabolismo en la célula fúngica impidiendo su reproducción y acción micótica. ⁽²²⁾.

Según la tabla 2, nos indican que el aceite esencial de *Ruta graveolens* a las 48 horas muestran una diferencia estadísticamente significativa en comparación con el estándar por lo tanto se puede afirmar que a las 48h rechaza la H_0 y se acepta la H_1 , presenta un valor $p < 0.05$ lo que comprueba el grado de efectividad antimicótica de los aceite esenciales de *Ruta graveolens* sobre *Candida albicans*.

Según Zamora et al, en el 2016, existe diferentes estudios en miras a buscar compuestos que inhiban el crecimiento de los hongos, menciona de manera general sobre los aceites esenciales, presentan componentes que tienen la capacidad de pasar la membrana celular, rompen polisacáridos, ácidos grasos y lípidos, permeabilizan la membrana de la célula, ocasionando la pérdida de Iones, colapso de la bomba de protones y disminución de ATP lo que conduce a la muerte celular ⁽²⁹⁾.

En la comparación del efecto del aceite esencial de *Ruta graveolens* frente al fluconazol, debido a que éste fármaco presenta similitud en el mecanismo de acción de los aceites esenciales y es aprobado por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) para ser usado como control farmacológico; el fluconazol ejerce efecto alterando la membrana celular de los hongos, inhibe la síntesis del ergosterol (componente esencial de la membrana fúngica) por lo tanto aumenta la permeabilidad celular produciendo fuga del contenido celular. Puede también deteriorar los triglicéridos y biosíntesis de fosfolípidos de la membrana. Por lo tanto la efectividad de los aceites esenciales de *Ruta graveolens* debe ejercer el mismo mecanismo mencionado por eso presentó halos de inhibición superiores al estándar farmacológico ^(30,31).

Según la tabla 3, se observa que *Candida albicans* es sumamente sensible al aceite esencial de las hojas de *Ruta graveolens* según escala de Duraffourd, lo cual podría constituir en el futuro su utilidad en la prevención y/o tratamiento frente a candidiasis u otras enfermedades micóticas.

Según Cantón E, en la Guía de Métodos estandarizados para estudios de sensibilidad a los antifúngicos establece al fluconazol como un control farmacológico de acción conocida para medir diámetros de inhibición de las cepas control de calidad, determinó que para *Candida albicans* presenta una inhibición de 28-39mm⁽³¹⁾.

Flores K, en el 2017 en Ecuador trabajó con aceites esenciales sobre *Candida albicans*, para determinar la actividad de sus aceites esenciales usó la escala de Duraffourd y Lapapraz 1983, lo que garantiza los resultados encontrados en la presente investigación, demostró que *Candida albicans* es sumamente sensible al ambas concentraciones del aceite esencial de *Ruta graveolens*, presento halos de inhibición mayores a 20 mm (alcanzó hasta 35.95-41.25mm)⁽³²⁾.

En la presente investigación demostró que *Candida albicans* fue sumamente sensible a las dos concentraciones de aceite (1,6% y 3,2%) similar efecto encontró Haddouch et al, en el 2013 en África, determinó la actividad antibacteriana y antifúngica de 4 aceites esenciales de *Ruta angustifolia*, *Ruta chalepensis*, *Ruta graveolens* y *Ruta tuberculata* sobre cepas de bacterias y hongos, dando como resultado una gran actividad antifúngica siendo el constituyente más importante las cetonas al cual se explica su actividad antimicótica; que así demostró también en el presente estudio de investigación⁽³³⁾.

En las tablas 1, 2 y 3, se demostró el efecto antimicótico de los aceites esenciales de *Ruta graveolens* sobre *Candida albicans* se debe a que tiene componentes orgánicos como cetónas alifáticas, ésteres, metilnonil, monoterpenos, alcoholes, furanocumarinas y cumarinas, que han demostrado ser eficaces como antisépticos, antibacterianos y antimicóticos, porque tienen la capacidad de romper la pared de la célula micóticas e inhibir su actividad enzimática, por lo tanto destruye la pared celular así como su membrana citoplasmática ⁽³⁴⁾.

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES:

6.1. CONCLUSIONES

En el presente trabajo experimental se concluye que:

- El aceite esencial de las hojas de *Ruta graveolens* al 1,6% y 3.2%, si demostró un excelente efecto antimicótico in vitro sobre *Candida albicans* alcanzó un halo de inhibición de 35,95 mm (al 1.6%) y 41,25 mm (al 3.2%) a las 48 h.
- Las concentraciones 1.6% y 3.2% del aceite esencial presentó mayor efecto antimicótico a comparación del estándar farmacológico Fluconazol.
- Según la escala de Duraffourd se logró determinar que la Cepa *Candida albicans* ATCC 10231 es sumamente sensible al aceite esencial de *Ruta graveolens* al 1.6% y 3.2% así como al Fluconazol.

6.2. RECOMENDACIONES:

- Se debe tener en cuenta el excelente efecto antimicótico del aceite esencial de *Ruta graveolens* así como para otras especies de hongos o bacterias.
- Realizar pruebas in vivo para corroborar la efectividad o determinar el grado de toxicidad de los constituyentes del aceite esencial de *Ruta graveolens*.
- Elaborar formas farmacéuticas tópicas para realizar ensayos clínicos en pacientes con dermatosis, pero en dosis mínimas por sus antecedentes de toxicidad.
- Para hacer un mejor estudio de investigación, se recomienda hacer estudios fisicoquímicos de los aceites esenciales y/o extractos fluidos y poder cuantificar en porcentajes los constituyentes o principios activos de la planta.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. García J, Ramírez B, Robles G, Zañudo J, Salcedo A y García E. Conocimiento y uso de las plantas medicinales en la zona metropolitana de Guadalajara. México mayo. /ago. 2012. N° 39. [Acceso 04 de octubre del 2017]. Disponible en : <http://desacatos.ciesas.edu.mx/index.php/Desacatos/article/view/238>
2. OMS. Estrategias de la Organización Mundial de la Salud sobre la Medicina Tradicional 2014-2023. [Acceso 01 de Julio del 2018]. Disponible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s21201es/s21201es.pdf>
3. Rupani R, Chavez A. Medicinal plants with traditional use: Ethnobotany in the Indian subcontinent. Clin Dermatol. May - Jun 2018; 36(3) 306-309. [Acceso 01 de Julio del 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29908572>
4. Bussmann R, Douglas S. Plantas Medicinales de los Andes y de la Amazonía del Norte del Perú, November 2015 with 18,895 Reads [Acceso 01 de Julio del 2018]. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Rainer_Bussmann/publication/283355334/PLANTAS-MEDICINALES-DE-LOS-ANDES-Y-LA-AMAZONIA-La-Flora-magica-y-medicinal-del-Norte-del-Peru.pdf
5. Marca M. Actividad Antimicótica “in vitro” del aceite esencial *Cinnamomum zeylanicum breyn* “canela” frente a *Candida albicans* ATCC 6538, [Tesis] TACNA, 2012. [Acceso 01 de Julio del 2018]. Disponible en: http://200.37.105.196:8080/bitstream/handle/unjbg/202/87_2013_Marca_Cuello_MR_FACS_Farmacia_y_Bioquimica_2013.pdf?sequence=1

6. Folch J. Los Hongos y la Biotecnología. Centro de Investigación en Biotecnología Edit. Academia Española. 07 de octubre de 2015. [Acceso 01 de Julio del 2018]. Disponible en: <file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/HongosyBiotecnologiaPreview.pdf>
7. Castañón L. Candidiasis. Unidad de Micología. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. 2015. [Acceso 03 de Julio del 2018]. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/candidosis.html>
8. Mayta J, Guerra J. Actividad Antibacteriana In vitro del Extracto Etanólico de las hojas de *Ruta graveolens* (Ruda), frente a *S.aureus* y *E. coli*. [Tesis] Universidad Nacional de la Amazonía Peruana. Iquitos-Perú 2015. [Acceso 03 de Julio del 2018]. Disponible en: http://repositorio.unapiquitos.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/3643/Jessica_Tesis_Titulo_2015.pdf?sequence=1
9. Ahmad S, Udin J, Ahmad G, Jahan N, Sofi G, Iqbal M, American Journal of PharmTech Research. *Ruta graveolens*: from Traditional System of Medicine to Modern Pharmacology: an Overview, 2012; 2 (2) ISSN: 2249-338. [Acceso 03 de Julio del 2018]. Disponible en: https://www.doc-developpement-durable.org/file/Plantes-Medicinales-Aromatiques/FICHES_PLANTES/rue-f%C3%A9tideofficinale/ruta%20graveolens_ResearchGate.pdf

10. Gutierrez M, Santibañez J, Hernandez M, Chávez J, Rodriguez O, Bonifas A. Estudio in vitro de antimicóticos contra cepas de *Candida* aisladas de pacientes del Hospital General de México OD. *Dermatol Rev Mex* 2012; 56(2):93-101. [Acceso 04 de Julio del 2018]. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/derrevmex/rmd-2012/rmd122b.pdf>
11. Aouadhi Ch, Ghazghazi H, Hamrouni S, Hasnaoui B, Maaroufi A. In vitro antifungal activity of the essential oil and the methanolic extract of *Ruta chalepensis*. Université El Manar. *Arch Inst Pasteur Tunis*. 2013; 90(1-4):39-46. [Acceso 04 de Julio del 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26012209>
12. Pino O, Sánchez Y, Rojas M, Abreu Y, Correa T, Martínez D, Montes de Oca R. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Ruta chalepensis* L. *Revista de Protección Vegetal*. vol.29 no.3 La Habana sep.-dic. 2014. [consultado el 05 de julio de 2018]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522014000300011
13. Jiménez E, Mosquera O. Actividad antifúngica In vitro de tres extractos de plantas frente a *Botrytis cinérea*. Universidad Tecnológica de Pereira (Colombia). *Salud Soc Uptc*. 2014; 1(2):16-21. [Consultado el 05 de julio de 2018]. Disponible en: https://revistas.uptc.edu.co/index.php/salud_sociedad/article/view/3495

14. Desam R, Abdul J, Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of *Ruta graveolens* L. volatile oils. Published online 31 August 2016. [consultado el 05 de julio de 2018]. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/23312009.2016.1220055>
15. Ruiz C, Díaz C, Rojas R. Composición Química de Aceites Esenciales de 10 plantas aromáticas Peruanas. Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima-Perú. Rev Soc Quím Perú. 81(2) 2015. [Acceso 06 de Julio del 2018]. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rsqp/v81n2/a02v81n2.pdf>.
16. Reyes O. Proyecto de Investigación Plantas medicinales en el Centro Experimental la Playita Universidad Técnica de Cotopaxi. Junio del 2017. [Acceso 06 de Julio del 2018].Disponible en: <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/4114/1/UTC-PI-M-000086.pdf>
17. Parray S, Bhat J , Ahmad G, Jahan N, Iqbal S . *Ruta graveolens*: from Traditional System of Medicine to Modern Pharmacology: an Overview. Available from: Am. J. PharmTech Res. 2012; 2(2) ISSN: 2249-3387. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/256090732_Ruta_graveolens_from_Traditional_System_of_Medicine_to_Modern_Pharmacology_an_Overview [accessed Jul 08 2018].
18. Tarek F. Estudio de la Actividad sobre el Sistema Nervioso Central de Especies Vegetales procedentes de la flora Egipcia. Madrid, 2013. Disponible en: <http://eprints.ucm.es/21219/1/T34422.pdf>

19. Barotto J. Guía de Estudio de Aceites esenciales. Método de hidrodestilación 2017. [Acceso 01 de Julio del 2018]. Disponible en: http://aulavirtual.agro.unlp.edu.ar/pluginfile.php/35978/mod_resource/content/1/Aceites%20esenciales%20Jose%20Barotto.pdf
20. Marca M. Actividad antimicótica “In vitro” del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn “canela” frente a *Candida albicans* ATCC 6538, [Tesis] Tacna, 2013. [Acceso 02 de Julio del 2018]. Disponible en: http://200.37.105.196:8080/bitstream/handle/unjbg/202/87_2013_Marca_Cuello_MR_FACS_Farmacologia_y_Bioquimica_2013.pdf?sequence=1.
21. Cano C, Bonilla P, Roque M, Ruiz J. Actividad antimicótica in vitro del aceite esencial de *Mintostaychys mollis* “muña”. Rev Peru Med Exp Salud Pública Lima Perú. 2008 y 2011; 25(3). [Acceso 01 de Julio del 2018]. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v25n3/a08v25n3>
22. Nazzaro F, Fratianni F, Coppola R, De Feo V. Essential Oils and Antifungal Activity. Institute of Food Science-National Research Council (CNR-ISA), Italy; Department of Pharmacy, University of Salerno Italy; Received: 13 October 2017; Accepted: 30 October 2017; Published: 2 November 2017. [Acceso 15 de Julio del 2018]. Disponible en: [file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/pharmaceuticals-10-00086-v2%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/pharmaceuticals-10-00086-v2%20(1).pdf)

23. Crespo V. Las micosis cutáneas y su tratamiento. Micosis superficiales, micosis cutáneas y micosis superficiales. ISDIN 2017. [Acceso 13 de Julio del 2018]. Disponible en: <https://www.isdin.com/pdf/ISDIN%202017.%20Las%20micosis%20superficiales%20y%20su%20tratamiento.%20Itraconazole%20low%20dose,%20una%20nueva%20herramienta%20terap%C3%A9utica.pdf>
24. Peman J. Papel del microbiólogo clínico en las Candidiasis sistémica. Servicio de Microbiología. Hosp. Univ. Valencia. [Acceso 13 de Junio del 2018]. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/micologia/candida.pdf>
25. Maraví J. “EFECTO ANTIBACTERIANO Y ANTIFÚNGICO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Menta piperita*, *Origanum vulgare* y *Cymbopogon citratus* sobre *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus* y *Candida albicans*” [Tesis] UNIVERSIDAD PRIVADA NORBERT WIENER. FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD. Lima- Perú 2012. [Acceso 06 de Julio del 2018]. Disponible en: <http://www.cop.org.pe/bib/tesis/GISELLA%20GIOVANNA%20MARAVI%20ING>.
26. DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN. MANUAL DE PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO. Procedimiento Agar Dextrosa Sabouraud en placa. Código: PR-SIB-13. Jun 15. Rev. 02. Pág. 7. [Acceso 13 de Julio del 2018]. Disponible en: <http://iso9001.inr.gob.mx/Descargas/iso/doc/PR-SIB-13.pdf>

27. MDM. Medios de Diagnóstico Microbiológico. Inserto Patrón Mc Farland. S.A.S. Medellín.2017. [Acceso 13 de Julio Del 2018]. Disponible en: <http://mdmcientifica.com/wp-content/uploads/2017/07/Patr%C3%B3n-McFarland-05072017-O-P.PD-311-INSERTO-05072017-MDM-cient%C3%ADfica.pdf>
28. PROTOCOLO DE SEGURIDAD DE LABORATORIOS Y TALLERES DE LA UNIVERSIDAD CATÓLICA LOS ÁNGELES DE CHIMBOTE VERSIÓN 003. Aprobado por Consejo Universitario con Resolución N°0190- 2018-CU-ULADECH Católica, de fecha 28 de febrero del 2018 CHIMBOTE – PERÚ. [Acceso 13 de Julio del 2018]. Disponible en: https://www.uladech.edu.pe/images/stories/universidad/documentos/2018/protocolo_seguridad_laboratorios_talleres_uladech_catolica_v003.pdf
29. Zamora C, Dickson M, “EFECTO INHIBIDOR DEL ACEITE ESENCIAL DE *Origanum vulgare* (ORÉGANO) y *Mentha piperita* (MENTA) FRENTE A CEPAS DE *Candida albicans*. ESTUDIO IN VITRO”. LIMA 2016. [Tesis]. [Acceso 23 de Julio Del 2018]. Disponible en: repositorio.uwiener.edu.pe/bitstream/handle/123456789/580/TITULO%20-%20COLPA%20ZAMORA%20MAX%20DICKSON.pdf?sequence=1&isAllowed=y
30. VADEMÉCUM FARMACOLÓGICO. Mecanismo de acción del Fluconazol. [Acceso 23 de Julio Del 2018]. Disponible en: <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/f025.htm>

31. Cantón E, Martín E, Espinel A. Métodos estandarizados por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) para el estudio de Sensibilidad a los antifúngicos. Revista Iberoamericana de Micología - ISBN: 978-84-611-8776-8 Pág.15A-12 y 15A-13. [Acceso 13 de Julio Del 2018]. Disponible en: [http://www.guia.reviberoammicol.com /Capitulo15.pdf](http://www.guia.reviberoammicol.com/Capitulo15.pdf)
32. Flores K, ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA IN VITRO DE ACEITE ESENCIAL Y EXTRACTO ALCOHÓLICO DE *Mentha piperita* SOBRE *Candida albicans*. Universidad Nacional de Chimborazo. [Tesis]. [Acceso 23 de Julio Del 2018]. Disponible en: <http://dspace.unach.edu.ec/bitstream/51000/4482/1/UNACH-EC-FC S -ODT-2017-0036.pdf>
33. Haddouchia F, Mohammed T, Chaouchea, Zaoualib Y, Ksouric R, Benmansoura A Attoua A. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from four *Ruta* species growing in Algeria (Africa). Volume 141, Issue 1, 1 November 2013, Pages 253–258. [Acceso 13 de Julio Del 2018]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814613003087>
34. Asquino N, García M, Mayol A, Bueno R, Aceites Esenciales. Una opción quimioterapéutica en Periodoncia. Universidad de la República. Uruguay. Versión impresa ISSN 0797-0374 versión On-line ISSN 1688-9339. vol.18 no.28 Montevideo nov. 2016. [Acceso 14 de Julio Del 2018]. Disponible en: http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S168893392016000200002.

ANEXOS.

ANEXO 01: GRÁFICOS

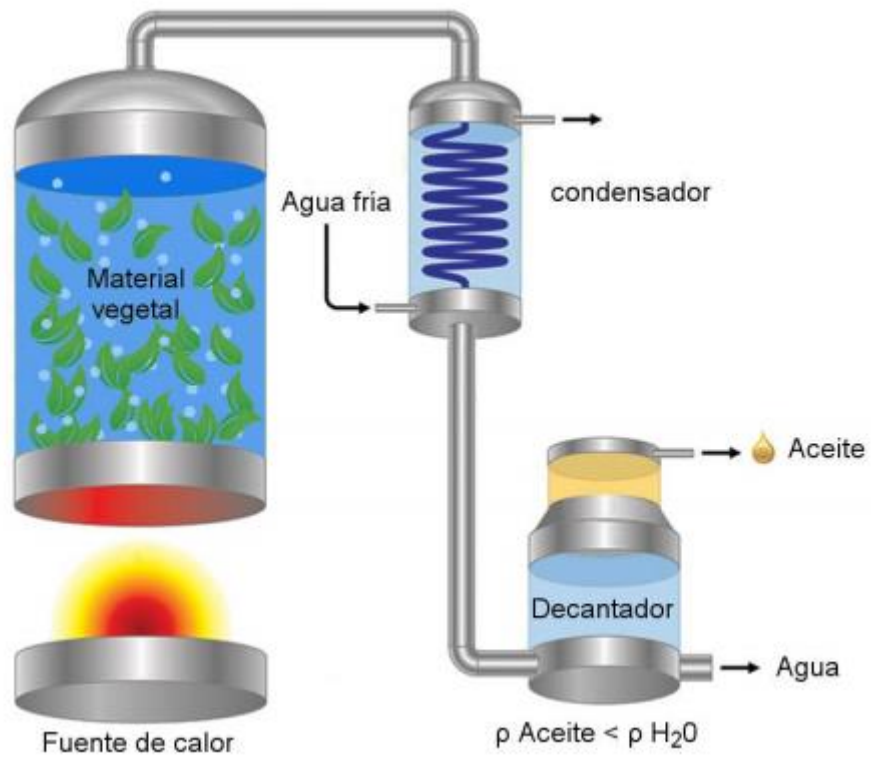


Gráfico 1. Esquema del Método de hidrodestilación para la extracción de aceites esenciales.

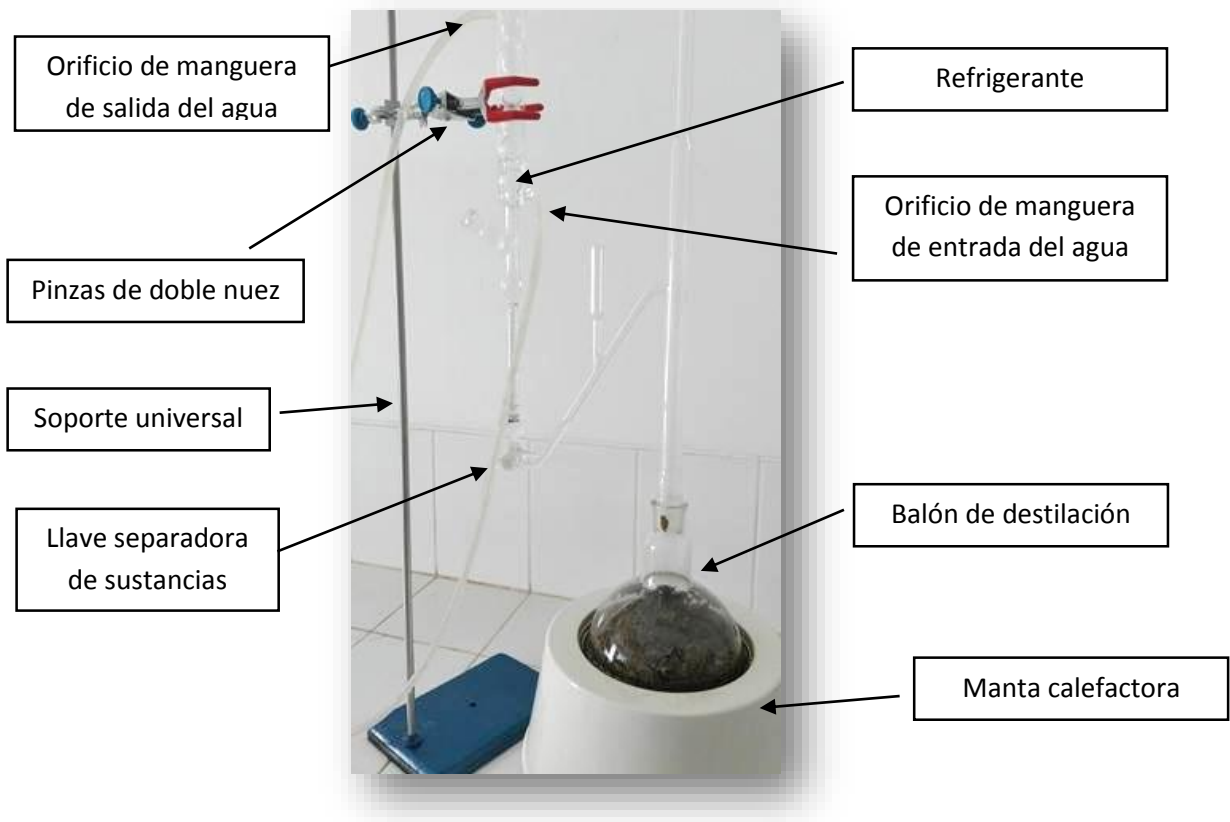
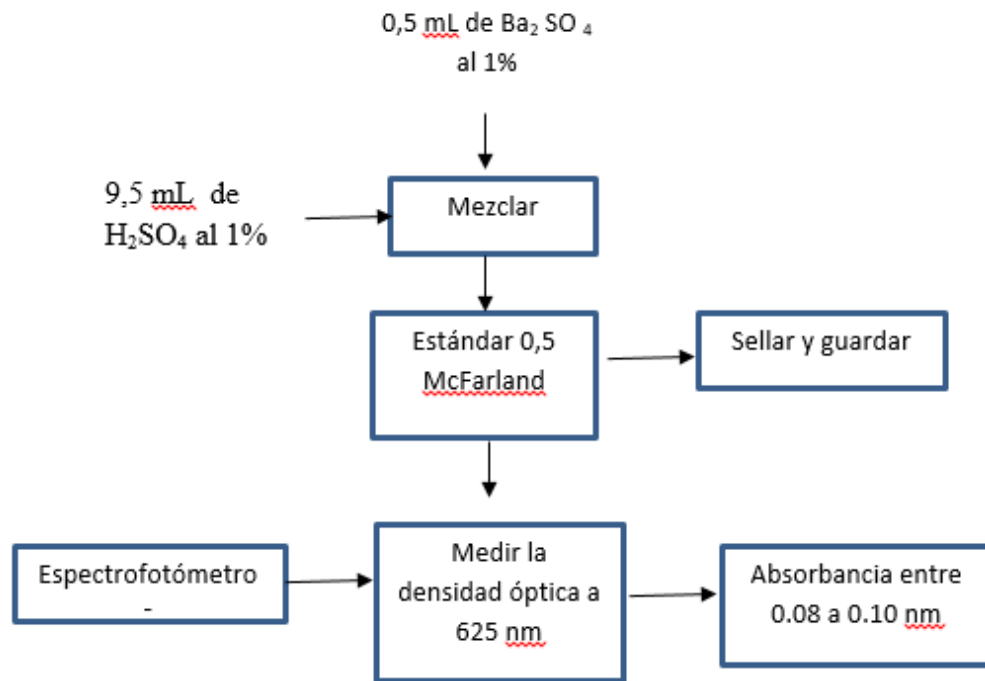


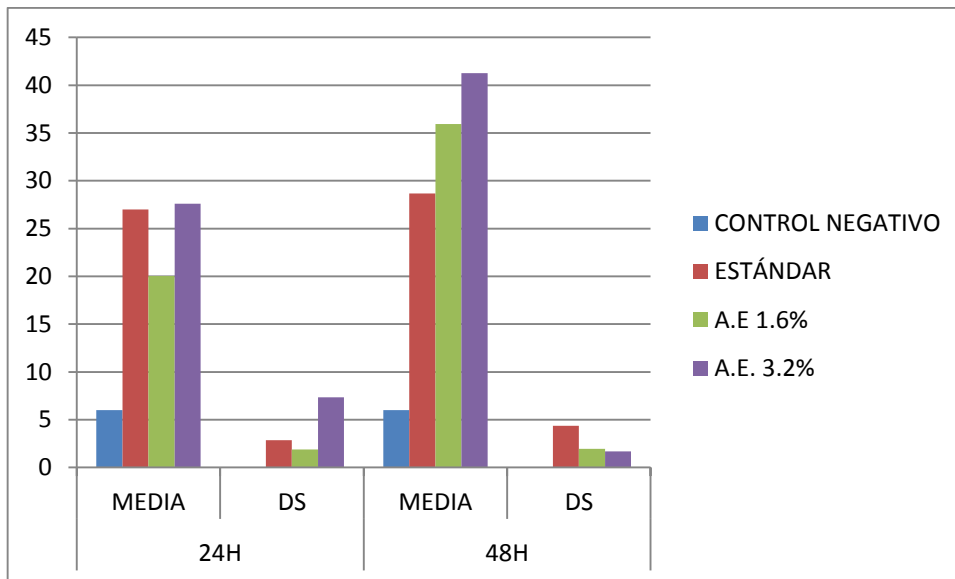
Foto: Equipo ULADECH 2017

Gráfico 2. Equipo de Hidrodestilación (Clevenger) y sus partes



Fuente: Patrón de turbidez BBL preparado McFarland Turbidity Standard N° 0,5 - 2005.

Gráfico 3. Proceso de preparación del estándar 0,5 Mcfarland para 100 mL en el estudio de efecto antimicótico in vitro del aceite esencial de las hojas de *Ruta graveolens* sobre *Candida albicans*.



FUENTE: Ficha de recolección de datos de investigación. Año 2017.

Gráfico 4. Media y Desviación Estándar de los 4 grupos de estudio en el efecto antimicótico in vitro del aceite esencial de las hojas de *Ruta graveolens* sobre *Candida albicans*.

ANEXO 02: TABLAS

Halos de inhibición en mm del control negativo a las 24 y 48 horas en el estudio de efecto antimicótico in vitro del aceite esencial de las hojas de *Ruta graveolens* sobre *Candida albicans*.

SSF	MEDIA 24 H	MEDIA 48H
PS 01	6	6
PS 02	6	6
PS 03	6	6
PS 04	6	6
PS 05	6	6

(*) DIMETILSULFÓXIDO AL 5%

Halos de inhibición en mm del control estándar a las 24 y 48 horas en el estudio de efecto antimicótico in vitro del aceite esencial de las hojas de *Ruta graveolens* sobre *Candida albicans*.

Fluconazol	MEDIA 24H	MEDIA 48H
PS 01	26.5 ± 4.1	28.5 ± 6.6
PS 02	30.0 ± 4.9	33.6 ± 5.8
PS 03	25.0 ± 1.2	28.0 ± 2.4
PS 04	26.0 ± 0.0	28.4 ± 3.5
PS 05	27.5 ± 3.0	24.9 ± 3.5
	27.0 ± 2.6	28.7 ± 4.4

(*)Fluconazol 25 ug/Disco

Datos validos según criterio de Normalidad en el estudio de efecto antimicótico in vitro del aceite esencial de las hojas de *Ruta graveolens* sobre *Candida albicans*.

MUESTRAS	Casos Válidos N	Casos Válidos %	Casos Perdidos N	Casos Perdidos %
H24	20	100.0%	0	0.0%
H48	20	100.0%	0	0.0%

FUENTE: Paquete estadístico (SPSS) 22.0 Año 2017.

Prueba de ANOVA Unifactorial para encontrar la significancia de los dos grupos de estudio y determinar el efecto antimicótico in vitro del aceite esencial de las hojas de *Ruta graveolens* sobre *Candida albicans*.

Tiempo de lectura	Grupos	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F calculado	Sig. F tabular
H24	Inter-grupos	1513.2	2	756.6		
	Intra-grupos	270.2	12	22.5	33.6	0.0
	Total	1783.4	14			
H48	Inter-grupos	3191.7	2	1595.8		
	Intra-grupos	80.5	12	6.7	237.6	0.0
	Total	3272.3	14			

FUENTE: Paquete estadístico SPSS 22.0 sobre los datos obtenidos en la investigación

ANEXO 03: CUADROS

Cuadro 1. Taxonomía de *Ruta graveolens*

Reino	<i>Platae</i>
Filo	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Subclase	<i>Rosidae</i>
Orden	<i>Sapindales</i>
Familia	<i>Rutáceae</i>
Subfamilia	<i>Rutoideae</i>
Género	<i>Ruta</i>

Fuente: Missouri Botanical Garden, 2009 ⁽⁸⁾.

Cuadro 2. Características Organolépticas del aceite esencial de *Ruta graveolens*

Características	<i>Ruta graveolens</i>
Color	Amarillo claro
Sabor	Picante
Olor	Aromático característico de la planta
Aspecto	Líquido oleoso

Fuente: Características observables.

Cuadro 3. Equipos y materiales utilizados en el estudio de efecto antimicótico in vitro del aceite esencial de las hojas de *Ruta graveolens* sobre *Candida albicans*

Equipos	Materiales de vidrio	Medios de cultivo y reactivos	Otros
Autoclave	Tubos de ensayo	Agar Saboraud medicado con CAF	Gradilla
Estufa	Placas Petri	Dimetil sulfóxido	Espátula
Incubadora	Matraces de 100, 250 y 500 mL	Alcohol de 70°	Pinza, marcadores, papel Kraff.
Balanza analítica	Pipetas de 1, 5 y 19 mL	Alcohol de 90°	Algodón. Discos
Equipo de destilación	Vasos de precipitación de 100, 200 y 500 mL.	Ron de quemar	Pabilo, regla milimetrada, calculadora
Papel filtro	Frascos de vidrio color ámbar.		Uniforme completo de laboratorio
Nefelómetro de Mc Farlnad	Probeta de 100 mL.		Mortero de porcelana

ANEXO 05: FIGURAS:

Figura 01: Recolección y transporte de ruda



Figura 02: Identificación en el herbario de la Universidad Nacional de Trujillo como *Ruta graveolens*, siendo codificada con el N° 59052.

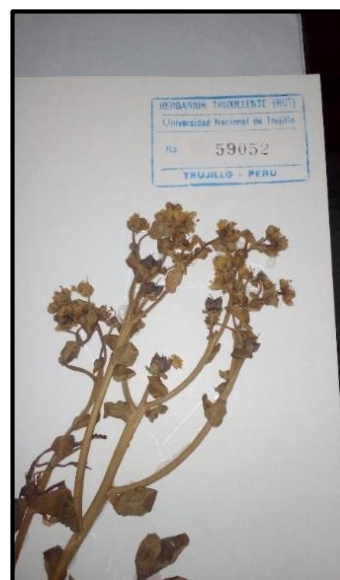


Figura 03: Selección de las mejores hojas de *Ruta graveolens*



Figuran 04. Obtención de aceites esenciales en la Universidad Católica los Ángeles de Chimbote.



Figura 05: Comparar con el patrón 0,5 Mcfarland



Figura 06. Rejuvenecimiento de la Cepa *Candida albicans* en Agar Sabouraud medicado.

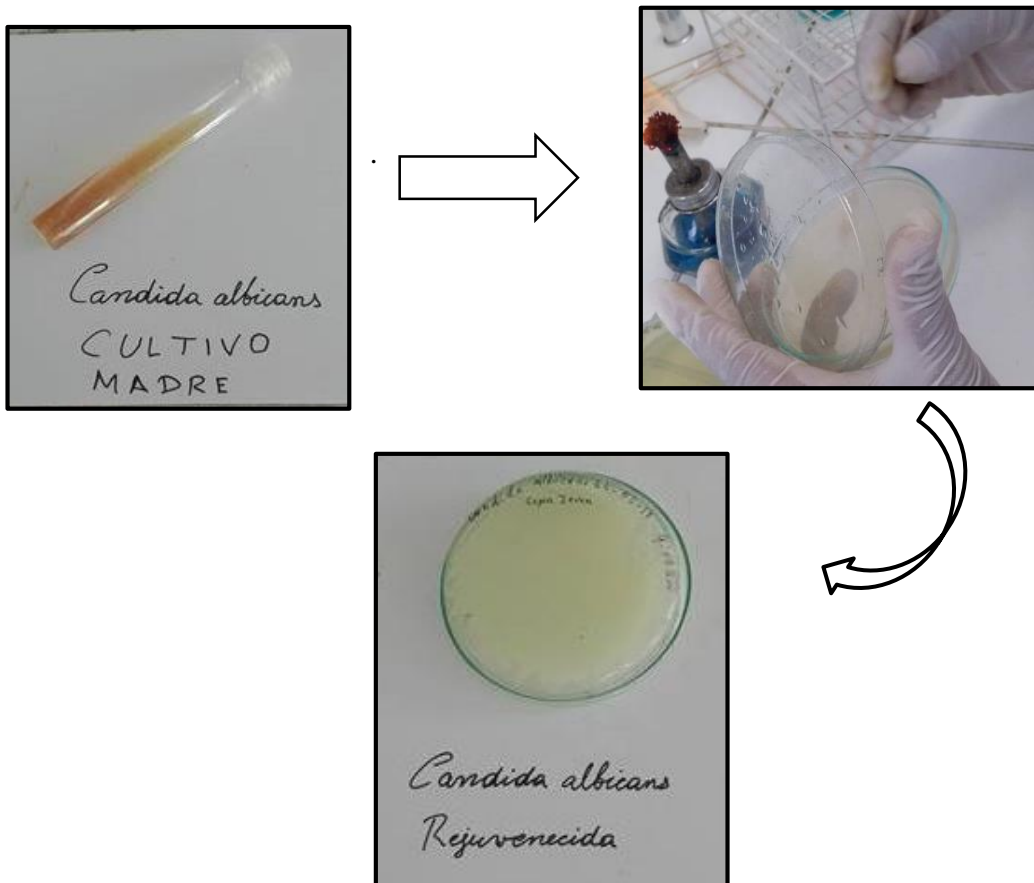


Figura 07: cultivo de *Candida albicans* en las placas petri.

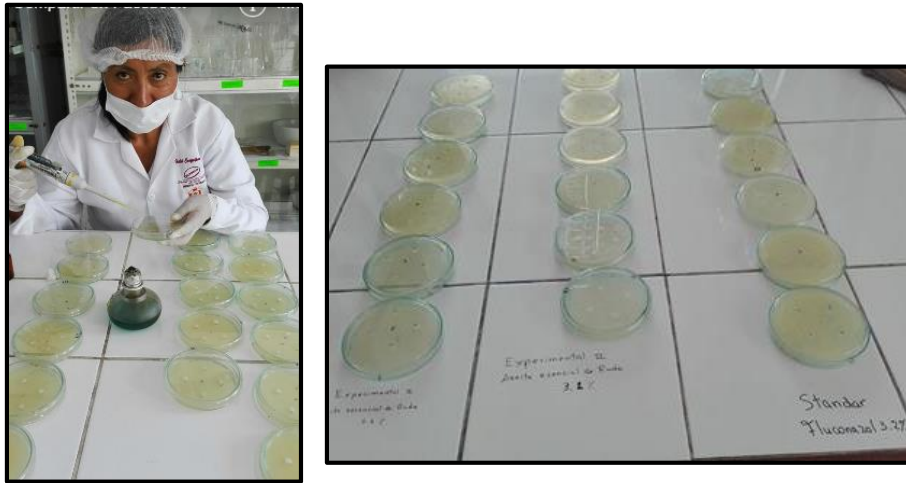
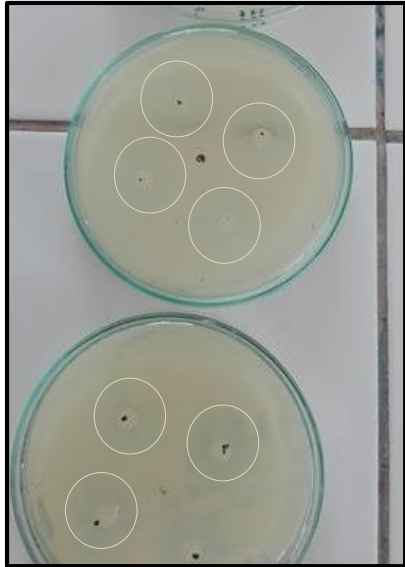


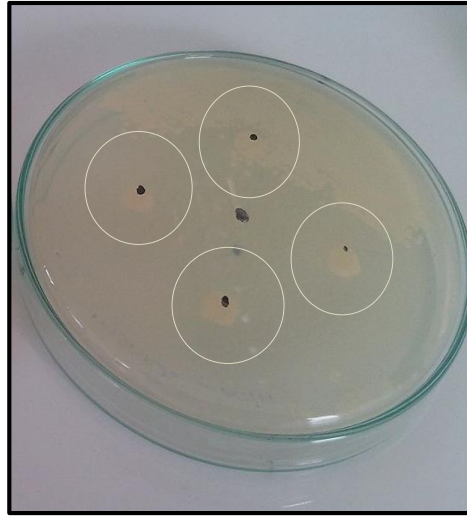
Figura 08. Cultivo de control negativo (DMSO).



Figura 09: halos de inhibición a las 24 h.



Halos de inhibición del aceite esencial al 1,6 %



Halos de inhibición de aceite esencial al 3,2 %



Halos de inhibición de estándar Fluconazol



Placas Petri con el control negativo DMSO al 5%

Figura 10. Halos de inhibición a las 48h



Halos de inhibición del aceite esencial al 1,6 %



Halos de inhibición de aceite esencial al 3,2 %



Halos de inhibición de aceite esencial al 3,2 % a las 60h.