



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

**ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA *In vitro* DEL EXTRACTO  
ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Cymbopogon citratus*  
(DC.) Stapf (HIERBA LUISA) SOBRE *Trichophyton*  
*rubrum* ATCC 1344**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO  
FARMACÉUTICO

**AUTORES**

Bach. CHINCHAY BONILLA, ROCIO CECILIA

<https://orcid.org/0000-0002-8667-1221>

Bach. VILCHEZ BEJARANO, GIANELLA JUDITH

<https://orcid.org/0000-0001-8257-7302>

**ASESOR**

Mg. BRAVO ARAUJO GLORIA

<https://orcid.org/0000-0002-8133-3370>

LIMA – PERÚ

2022

## **DEDICATORIA**

En especial a Dios y a mis excelentes padres que son mi motivo para continuar superándome por darme su amor y su apoyo incondicional que cada día me dan, así mismo son mis guías para no tener miedo y enfrentar los obstáculos, me fortalecen y me dan seguridad para seguir avanzando en cumplir mis metas propuestas.

*Gianella Judith Vilchez Bejarano*

A mi padre celestial que es el forjador de mi camino que siempre me levanta de los continuos tropiezos, se la dedico con orgullo a mi hijo, a mis padres y querido esposo que me acompaña y apoya sinceramente en diferentes maneras, ellos son las personas que más amo también me dan aspiración, ánimo para seguir progresando.

*Rocio Cecilia Chinchay Bonilla*

## **AGRADECIMIENTO**

A nuestro señor omnipotente, por otorgarnos una vida plena con buena salud, además tenemos una inmensa consideración a nuestros familiares y amistades que nos brindaron su tiempo, su capacidad, conocimiento y entre otras cosas, también nos impulsaron a seguir adelante y apoyándonos cuando más lo necesitábamos, gracias de todo corazón por la confianza y acompañarnos en el transcurso del camino.

A los docentes Martin Silva Romero, Mario Olaya Querevalú y Marleny Flor Capcha Siccha por sus esfuerzos, su gran paciencia y dedicación a enseñarnos mediante aportes de sus conocimientos para nuestro aprendizaje, además su cooperación e interés es para ayudarnos a lograr optar el título Químico Farmacéutico y ser buenos profesionales.

*Los autores*

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN .....	7
ABSTRACT .....	8
I. INTRODUCCIÓN .....	9
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
2.1. Enfoque y diseño de la investigación .....	16
2.2. Población, muestra y muestreo .....	16
2.2.1. Población .....	16
2.2.2. Muestra.....	17
2.2.3. Muestreo.....	17
2.3. Variables de investigación.....	17
2.3.1. Variable independiente: .....	17
2.3.2. Variable dependiente:.....	18
2.4. Técnicas e instrumentos para la recolección de datos.....	18
2.5. Plan metodológico para la recolección de datos .....	19
2.5.1. Autorización y aprobación del proyecto para inicio de recolección de muestras y coordinaciones correspondientes.....	19
2.5.2. Ejecución del proyecto y recogida de datos .....	19
2.6. Procesamiento del análisis estadístico.....	22
2.7. Aspectos éticos .....	22
III. RESULTADOS .....	22
3.1. Análisis del extracto etanólico de las hojas de <i>Cymbopogon citratus</i> .	22
3.2. Actividad antifúngica por el método de difusión en pozo.....	23
IV. DISCUSIÓN .....	29
4.1. Discusión de resultados .....	29
4.2. Conclusiones.....	32
4.3. Recomendaciones.....	32
V. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	33

VI.	ANEXOS .....	39
-----	--------------	----

### ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cantidades utilizadas y extracto etanólico obtenido de las hojas de <i>Cymbopogon citratus</i> .....	22
Tabla 2. Dilución y obtención de extractos etanólicos de las hojas de <i>Cymbopogon citratus</i> al 25%, 50% y 75 % .....	23
Tabla 3. Resultados del análisis in vitro del extracto etanólico frente a <i>T. rubrum</i> ATCC1344.....	23
Tabla 4. Determinación de la actividad antifúngica in vitro según la escala de Duraffourd; basado en la medida de los halos de inhibición .....	24
Tabla 5. Prueba de normalidad con el test de Shapiro-Wilk.....	26
Tabla 6. Prueba de homogeneidad de varianzas – Levene .....	26
Tabla 7. Análisis de las varianzas mediante ANOVA .....	27
Tabla 8. Prueba de Tukey para comparaciones múltiples.....	28

## ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. Instrumentos de recolección de datos .....	39
ANEXO 2. Matriz de consistencia .....	40
ANEXO 3. Operacionalización de las variables.....	41
ANEXO 4. Identificación Taxonómica de <i>Cymbopogon citratus</i> (Hierba luisa). 42	
ANEXO 5. Evidencias fotográficas del trabajo de campo.....	43
ANEXO 6. Formación de hidratos, acetales y hemiacetales a partir del citral.. 47	
ANEXO 7. Preparación de medios de cultivo .....	48

## RESUMEN

**Objetivo:** Determinar la actividad antifúngica in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Cymbopogon citratus* frente a *Trichophyton rubrum* ATCC 1344.

**Método:** El tipo de investigación es experimental – cuantitativo, así mismo es prospectivo y transversal debido al trabajo con la muestra al evaluar la actividad antifúngica in vitro del extracto etanólico de *Cymbopogon citratus* en concentraciones del 25%, 50% y 75% que se realiza en un solo periodo. Se utilizó el método de difusión en pozo, para determinar la actividad antifúngica y como control positivo se usaron pocitos en donde se colocó la solución de fluconazol de 2 mg/ml y como control negativo alcohol de 96°.

**Resultado:** El presente trabajo se tuvo como resultado que los extractos etanólicos de *Cymbopogon citratus* a las diferentes concentraciones del 25%, 50% y 75% al ser introducidos 20 µl en pocitos, al cultivo de *Trichophyton rubrum*, mostraron halos de inhibición de 8,9mm; 9,2mm y 9,9mm respectivamente, el fluconazol obtuvo un promedio de 30,15 mm y el etanol 96° fue 6,5mm.

**Conclusión:** El extracto etanólico de las hojas de *Cymbopogon citratus* en concentraciones del 25%, 50% y 75% presenta una leve actividad antifúngica frente al cultivo in vitro de *Trichophyton rubrum*.

**Palabras claves:** *Cymbopogon citratus*, Actividad antifúngica, *Trichophyton rubrum*

## ABSTRACT

**Objective:** To determine the in vitro antifungal activity of the ethanolic extract of *Cymbopogon citratus* leaves against *Trichophyton rubrum* ATCC 1344.

**Method:** The type of research is experimental - quantitative, likewise it is prospective and transversal due to the work with the sample when evaluating the in vitro antifungal effect of the ethanolic extract of *Cymbopogon citratus* in concentrations of 25%, 50% and 75% that is carried out in a single period. The Kirby-Bauer modified well method was changed to determine the antifungal activity and wells were used as a positive control where the fluconazole solution with a concentration of 2 mg/ml was placed, and 96° alcohol as a negative control.

**Result:** In the present work, it was found that the ethanolic extracts of *Cymbopogon citratus* at different concentrations of 25%, 50% and 75%, when 20 µL were introduced into wells, to the culture of *Trichophyton rubrum*, showed inhibition halos. 8.9mm; 9.2mm and 9.9mm respectively, the positive control (fluconazole) obtained an average measurement of 30.15mm and the negative control (ethanol) was 6.5mm.

**Conclusion:** The ethanolic extract of the leaves of *Cymbopogon citratus* in concentrations of 25%, 50% and 75% has a mild antifungal effect against the in vitro culture of *Trichophyton rubrum*.

**Key words:** *Cymbopogon citratus*, Antifungal effect, *Trichophyton rubrum*.



## I. INTRODUCCIÓN

Los dermatofitos son un amplio grupo de hongos, que se encuentran relacionados íntimamente entre sí, una de las características es que poseen queratinasa (enzimas proteolíticas) y debido a ello son capaces de infectar tejidos humanos y animales en zonas queratinizadas como son la piel, cabello y uñas; a este tipo de enfermedades se les conoce como dermatofitosis (1). Esta infección puede afectar a mujeres y varones de cualquier edad, niños, adolescente, jóvenes, adultos y adultos mayores incluso a pacientes más sensibles como diabéticos, inmunodeprimidos como las personas con VIH. Existen algunos estudios indicando que el contagio puede aumentar de acuerdo a ciertas características del hospedero como humedad, calor, edad, disposición genética, sebo, sudor y entre otras cosas (2,3). Este tipo de infecciones fúngicas se ha elevado considerablemente durante los últimos años, siendo los agentes más populares en esta larga lista la *Candida albicans* y el *Trichophyton rubrum* y *mentagrophytes* entre otros. Los dermatofitos adoptan un patrón de infección diferente en todo el mundo, lo que refleja una distribución geográfica variable de esta enfermedad (4). La investigación de estos hongos es muy importante en el diagnóstico, tratamiento y diferenciación de otras enfermedades clínicas de la piel. *Trichophyton rubrum* es el aislado predominante de seres humanos seguido de *T. mentagrophytes*. Esto es evidente en Europa cuando se registró una alta incidencia de infección por *T. rubrum*, mientras que *T. mentagrophytes* tuvo una incidencia más alta en Asia (5).

Las micosis provocadas por *Trichophyton rubrum* son por lo general de tipo superficial, es decir de la epidermis expuesta, podría decirse que no tienen una implicancia de mortalidad, pero sí de bienestar general entre la población; la mayoría de estas infecciones se dan en los pies, lo cual tiene una prevalencia mundial de aproximadamente 70% en países en vías desarrollo, mientras que, en países desarrollados, donde las condiciones de vida son mejores es del 10% (6). Si bien es cierto este tipo de enfermedades no representa una amenaza a la vida del paciente, si es capaz de reducir la calidad de vida de la persona que lo padece desde diferentes aspectos: físico, social, emocional e inclusive en el trabajo (7). Existen diferentes estudios que explican en detalle y en diseños

comparativos los pacientes con micosis y un grupo de control y se ha demostrado que, si existe una relación estadística significativa con respecto al dolor, salud mental, las implicancias sociales, la aceptación física y las limitaciones relacionadas al desarrollo de la infección, especialmente cuando el paciente debe de encontrarse de pie durante un tiempo prolongado o debe de caminar distancias relativamente grandes (8,9).

Existen pocos estudios en el Perú relacionados a las implicancias de la dermatofitosis causada por *Trichophyton rubrum* se puede indicar que este tipo de infecciones representan uno de los principales motivos de consulta al podólogo o dermatólogo además nuestro país hay lugares que no tienen la posibilidad económica o la accesibilidad de obtener medicamentos y esto causa que se considere como una de las patologías infecciosas de elevada morbilidad (10). Durante mucho tiempo se han investigado las plantas medicinales para combatir este tipo de infecciones fúngicas; se ha demostrado que las especies vegetales contienen en su interior una serie de metabolitos secundarios que pueden ser biológicamente activos en el control de diversos tipos de enfermedades e inclusive las provocadas por hongos dermatofitos. Las ventajas de trabajar con especies vegetales consiste en que sus efectos adversos son mínimos comparados con los medicamentos convencionales, e inclusive la resistencia ya sea antibacteriana y antimicótica es muy reducida; otra de las ventajas consiste en que los costos del tratamiento con productos naturales son mínimos lo que ha elevado de una manera muy positiva las investigaciones que se vienen realizando para encontrar principios activos derivados de vegetales que controlan enfermedades y carentes reacciones adversas (11,12). La especie vegetal *Cymbopogon citratus*, es llamada según el país que habite como hierba luisa, hierba limón, limoncillo, malojillo, etc y es ampliamente beneficiosa que se aprobado con actividad antifúngica, bactericida, antibacteriano, ansiolítico, sedante y antiepiléptico, se ha propuesto que su mecanismo de acción se encuentra relacionado con la neurotransmisión GABAérgica (13,14). Debido a su fácil accesibilidad esta especie vegetal es la ideal para el estudio a realizar.

El *Cymbopogon citratus* conocida en el Perú con el nombre de hierba luisa, pertenece a la familia *Poaceae*, es reconocida como hierba perenne con hojas alargadas aromáticas que llegan hasta una altura de 1 a 2 metros, es natural de

la Asia, pero puede crecer en regiones tropicales y subtropicales en presencia de luz como en nuestro país. Es una hierba medicinal, siendo la infusión de sus hojas popularmente utilizada como antiespasmódico, antiinflamatorio y analgésico (15). La actividad antifúngica del *Cymbopogon citratus* en los análisis en distintos trabajos realizados en donde evaluaron el efecto del aceite de esta especie vegetal frente a *Candida albicans* en los cuales obtuvieron resultados bastante alentadores. Las especies vegetales usadas en medicina tradicional son un repositorio muy grande de metabolitos secundarios con acciones farmacológicas bastante evidentes como para realizar estudios, estas sustancias tienen actividades antifúngicas comprobadas, entre las cuales tenemos: fenoles, flavonoides, saponinas, glicósidos, terpenos y etc. (16).

Los hongos patógenos dermatofitos, son microorganismos que necesitan de queratina para sobrevivir y pueden infectar por contacto de sus esporas de persona a persona, animal a persona o con objetos infectados; según su forma de cómo se desarrollan se pueden clasificar en micosis superficiales y cutáneas. Las primeras son aquellas en las que la infección se da en la capa córnea de la piel y los folículos pilosos. Las segundas son las que infectan las capas más profundas de la piel; existen hongos bastante propagados como los del género *Microsporum*, *Epidermophyton*, *Trichophyton* y *Cándidas* (10). Las dermatomicosis se encuentran entre las infecciones de mayor prevalencia en todo el mundo con predominio en las zonas tropicales de climas cálidos y húmedos (17). Se ha calculado una frecuencia global de micosis superficial de 20% a 25% de la población y 5% a 10% causados por dermatofitos (18). El tratamiento de este tipo de micosis puede ser de dos tipos; vía tópica y sistémica, dependiendo de la extensión de la infección; los fármacos que se aplican pueden ser de distinta naturaleza como: anfotericina B, fluconazol, isavacunazol, itraconazol, terbinafina, etc. Uno de los grandes inconvenientes de uso son sus reacciones adversas que se pueden expresar en hepatotoxicidad, vómitos, diarrea, enterocolitis y anorexia (19). Por estos motivos es que el presente trabajo de investigación pretende evaluar tratamiento diferente con los extractos etanólicos de la especie *Cymbopogon citratus* como una alternativa natural y libre de reacciones adversas.

En los antecedentes internacionales mencionamos estudios realizados por Córdoba S, et al. (2019), evaluaron la actividad antifúngica *in vitro* de los aceites esenciales obtenidos de las plantas aromáticas *Laurus nobilis*, *Thymus vulgaris*, *Mentha piperita*, *Cymbopogon citratus* y *Lippia junelliana* frente a diversas especies de *Candida spp aisladas* de muestras clínicas. La concentración inhibitoria mínima (MIC) se determinó de acuerdo a protocolo de EUCAST. La anfotericina B y el fluconazol fueron los fármacos antimicóticos utilizados como control de la inhibición. Este estudio *in vitro* tiene como resultado óptimo logrando tener actividad antifúngica de estos seis aceites esenciales ensayados que podrían ser una ayuda para tener nuevas moléculas útiles para controlar las infecciones fúngicas causadas por algunas especies de *Candida*, incluidas las resistentes a los fármacos antifúngicos (20).

Erhabor J, et al (2019) evaluaron las propiedades antibacterianas, fitoquímicas y citogenotxicológicas *in vitro* del extracto acuoso de hoja de *Cymbopogon citratus* se utilizó la técnica de difusión y microdilución en pozos de agar con concentraciones de 12,5 mg/ml, 25 mg/ml y 50 mg/ml sobre *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus saprophyticus* y *Klebsiella pneumoniae* que finalmente todas eran sensibles al extracto acuoso excepto *P. aeruginosa*, también se observó que el diámetro de inhibición promedio más alto de  $21,33 \pm 1,20$  mm contra *Staphylococcus saprophyticus* y en el resultado fitoquímicos dan a conocer en evidencia por poseer efecto antibacteriano por la presencia de saponinas, flavonoides, glucósidos, esteroides, terpenoides y alcaloides (21).

También un grupo de investigadores encabezados por Dias N, et al. (2017), trabajaron los aceites esenciales (AE) extraídos de *Lavandula luisieri* y *Cymbopogon citratus*, los probaron para determinar su actividad antifúngica frente a diez aislados clínicos de dermatofitos aislados de casos de *Tinea pedis*. Se observó una fuerte actividad antifúngica para la mayoría de las cepas clínicas de referencia de la ATCC de *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*. Los aceites esenciales se caracterizaron por una alta cantidad de monoterpenos oxigenados en su composición y se demostró actividad fungicida. Se notó una interacción positiva entre *L. luisieri* combinada con terbinafina contra la cepa resistente a la terbinafina (Tr ATCC MYA-4438). Este

estudio demostró tener actividad antifúngica de los AE de *L. luisieri* y *C. citratus* contra dermatofitos, lo que sería útil para elaborar nuevos productos para tratamientos tópicos (22).

Refiriendo a los antecedentes nacionales tenemos que Bernilla Y, Herna A, (2018) donde evaluó el efecto inhibitorio sobre *Trichophyton rubrum* de terbinafina y fluconazol, mediante la metodología del CLSI - Protocolo M38-A2 (Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008), observando como resultado concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de fluconazol frente a *T. rubrum* fueron CMI50, 283.0 ug/mL y CIM90, 3582.9 ug/mL. (23)

Salinas M,(2019), realizó la evaluación del efecto de la concentración del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (Hierba luisa) recolectados en centro poblado Osoyoq departamento La Libertad sobre el desarrollo de *Trichophyton rubrum* y *Microsporum canis*; para ello preparó diluciones del aceite esencial y su grupo de control 100% luego se realizó hacer frente a cultivos de estos hongos, se procedió a incubarlos y se observó el efecto que el aceite esencial de hierba luisa a las concentraciones de 0.1, 0.5, 1, 1.5 y 2 µl/ml inhibieron de forma completa el desarrollo del cultivo de los hongos *in vitro* (24).

Huamán H, (2019) investigo sobre la actividad antibacteriana del extractos de *Cymbopogon citratus* acuoso y etanólico recolectada en doce distritos de la provincia de Bongará, región Amazonas en concentraciones de 25%,50%,75,%100% con un macerado de 48 horas, el extracto etanólico presentó un mayor espectro de acción antimicrobiana sobre E. coli y un efecto leve sobre S. aureus y el extracto acuoso no logró tener efecto antimicrobiano sobre la cepa E. coli, pero si sobre S. aureus cuando las muestras proceden de una altitud baja y alta, finalmente concluyeron que el extracto etanol 96% es mejor solvente que el agua puesto que logra extraer un mayor contenido de metabolitos secundarios que repercute en su porcentaje de inhibición, también comentaron que las altitudes de otro lado demuestran que la actividad antibacteriana varía según la procedencia de la muestra (25).

Tantaleán L. en año 2019 , realizó un trabajo la cual tuvo como objetivo evaluar y conocer el actividad antifúngica del *Cymbopogon citratus* (Hierba Luisa) y

uncaria tomentosa (uña de gato) frente a *Candida albicans*, para lo cual se extrajo el aceite esencial y se prepararon diluciones al 25%, 50%, 75% y 100% y fueron comparadas con nistatina y el fluconazol como controles positivos, controles negativos con DMSO (dimetilsulfoxido) y extracto alcohólico se enfrentaron a los cultivos del hongo en estudio y se observó que las diluciones a partir del 50% tienen un efecto inhibitorio sobre *Candida albicans* que finalmente concluyeron que la hierba luisa tiene mayor eficacia antimicótica que el extracto alcohólico de cortezas de uña de gato. Así mismos la planta de *C. citratus* tiene una medida semejante y hasta mayor que la Nistatina cuando se aumenta la concentración mientras que el Fluconazol no tuvo efecto sobre la cepa (26).

Por otro lado, Cardenas A. y Farfán P. (2021) estudiaron el efecto antibacteriano in vitro de diferentes concentraciones del extracto hidroetanólico de *Cymbopogon Citratus* (hierba luisa) y un control positivo clorhexidina 0,12% y control negativo (Dimetilsulfóxido DMSO 1%) sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175, se hizo por el método de maceración por 3 días obteniendo un efecto antibacteriano de todas las concentraciones del extracto fue superior al del control positivo ( $14,48 \pm 0,413$  mm) la concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$  presento halos de inhibición entre  $16,37 \pm 0,485$  mm y  $25,47 \pm 0,362$  mm (100  $\mu\text{g/mL}$ ). La CMI y la CMB fue 10  $\mu\text{g/ml}$ . Se concluye que extracto hidroetanólico de *C. Citratus* presenta efecto antibacteriano in vitro sobre *S. mutans* ATCC 25175 de tipo bactericida (27).

Del mismo modo, Pérez P, Cabrera Y (2021) en su investigación sobre la actividad antimicótica de *Origanum vulgare* L. (Orégano) frente a *Candida albicans* ATCC 10231 y *Trichophyton rubrum* ATCC 28188, empleando como grupo control positivo al fluconazol, mediante un diseño experimental puro enfrentaron por medio de la técnica de Kirby Bauer, dando un resultado que el aceite *Origanum vulgare* L. al 25%,50% y 100% frente a *Candida albicans* ATCC 10231 tuvo halos de inhibición 8.86, 10.24 y 15.82 mm y para el fluconazol halo de 28.30 mm, pero con la cepa *T. rubrum* ATCC 28188 el orégano con las misma concentraciones genero halos de inhibición de 9.64,10.91 y 17.93 y el fluconazol tuvo un halo de 21.79 (28).

En el Perú, gracias a su extensa variedad en flora y fauna podemos investigar detalladamente plantas curativas, optando investigar sobre la actividad antifúngica de la hierba luisa para beneficiar a la sociedad ya sea nivel nacional o internacional, como bien se sabe que hay lugares que no tienen la posibilidad económica o la accesibilidad de obtener medicamentos por lo cual acuden empíricamente a tratamientos alternativos con las plantas medicinales.

En esta investigación con la planta *Cymbopogon citratus*, estudiada por sus maravillosas propiedades teniendo impacto en varios países, por ser excelente en combatir infecciones por hongos, bacteria y también tiene efecto antiinflamatorio, antioxidante, antiespasmódico entre otros, con este estudio puede ayudar a tratar a las personas que sufren enfermedades de las tiñas que ataca a la piel, cabello y pies incluyendo la más frecuentes es el pie de atleta por *Trichophyton rubrum*, logrando tener un tratamiento antifúngico alternativo dando seguridad a su utilidad.

Además, este estudio brinda información acerca de su efecto, sus materiales y los métodos estudiada, en un futuro más adelante se puede seguir investigando la actividad en las diferentes partes de la planta y en otros microorganismos, también se puede elaborar productos farmacéuticos y cosméticos obteniendo un máximo uso adecuado de la hierba luisa.

El objetivo general fue determinar la actividad antifúngica *in vitro* del extracto etanólico de las hojas de *Cymbopogon citratus* frente a *Trichophyton rubrum* ATCC 1344.

*Hipótesis* General declara que el extracto etanólico de las hojas de *Cymbopogon citratus* tiene actividad antifúngica sobre el cultivo *in vitro* de *Trichophyton rubrum* ATCC 1344.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Enfoque y diseño de la investigación

El tipo de investigación es experimental – cuantitativo, debido al trabajo con la muestra al evaluar la actividad antifúngica *in vitro* del extracto etanólico de *Cymbopogon citratus* en concentraciones del 25%, 50% y 75%; así mismo se midieron los halos de inhibición para comparar su actividad frente al hongo *Trichophyton rubrum* con el medicamento fluconazol y *Cymbopogon citratus*.

El estudio es de tipo prospectivo debido a que se registraron las pruebas a realizar desde la primera hacia adelante hasta culminar el trabajo.

También es de estudio transversal porque se ejecutó en un solo periodo de tiempo donde se observaron y recolectaron los datos de la efectividad antimicótica de las muestras.

### 2.2. Población, muestra y muestreo

#### 2.2.1. Población

- La población: se recolectó 3 kilogramos de la muestra que está constituida por la especie vegetal *Cymbopogon citratus* (Hierba luisa) recolectada en la provincia de Ferreñafe, departamento de Lambayeque, la cual será caracterizada por un botánico de la Universidad Nacional de San Marcos.
- Cepas fúngicas de *Trichophyton rubrum* ATCC 1344 proporcionada de la universidad Nacional de Trujillo

#### Criterios de inclusión:

- Identificar la especie de *Cymbopogon citratus* (Hierba luisa)
- Las hojas de la hierba luisa estén frescas y verdes
- Las hojas de *Cymbopogon citratus* se extrajo en la parte central del terreno para evitar contaminaciones cerca del camino.



### **Criterios de exclusión:**

- Las hojas en mal estado y secas
- Las hojas contaminadas
- No se extrajo las especies vegetal cerca del camino.

### **2.2.2. Muestra**

- La muestra se utilizó 1 kilogramos de *Cymbopogon citratus* recolectados en la provincia de Ferreñafe, para realizar el extracto etanólico.
- Cepas fúngicas de *Trichophyton rubrum* ATCC 1344 proporcionadas por el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo.

### **2.2.3. Muestreo**

- Se aplicó el muestreo no probabilístico por conveniencia por que las muestras se obtuvieron debido a la disponibilidad del lugar, facilidad y no se seleccionó al azar, también se utilizó el método de observación en la recolección de las muestras convenientes para el investigador.

## **2.3. Variables de investigación**

### **2.3.1. Variable independiente:**

concentración del extracto etanólico obtenido de las hojas de *Cymbopogon citratus* (Hierba Luisa).

*Definición conceptual:* Es la solución que se encuentra saturada de componentes de la especie vegetal en estudio que se obtiene al someterlo al proceso de maceración durante un tiempo prolongado (29).

Definición operacional: Se consigue el extracto etanólico colocando los 1 kg de la especie vegetal en un recipiente de vidrio, colocando una cantidad 2 litros de etanol de 96° y dejándolo macerar por el espacio de 7 días; el líquido obtenido se conoce como extracto etanólico (30).

### **2.3.2. Variable dependiente:**

Actividad antifúngica *in vitro* de las cepas *Trichophyton rubrum* ATCC 1344.

Definición conceptual: Es la capacidad de una sustancia para inhibir el crecimiento o eliminar ciertos tipos de hongos (11).

Definición operacional: Se inocularon placas petri con las cepas fúngicas *Trichophyton rubrum* ATCC 1344 y se expondrán diversas concentraciones etanólicas (23).

## **2.4. Técnicas e instrumentos para la recolección de datos**

La técnica utilizada en el presente trabajo de investigación es la observación, como todo trabajo experimental; además la técnica para la obtención del extracto fue la maceración y el método para la determinación de la actividad antifungica fue la de Kirby – Bauer modificado en pozo (31).

Se usó el formulario de una ficha de observación diseñada para el registro detallado de los resultados obtenidos al enfrentar a las soluciones etanólicas de *Cymbopogon citratus* y los cultivos *in vitro* de *Trichophyton rubrum*, así mismo, para realizar la medida de los halos de inhibición se empleó como instrumento de medida el Vernier (32).

## **2.5. Plan metodológico para la recolección de datos**

### **2.5.1. Autorización y aprobación del proyecto para inicio de recolección de muestras y coordinaciones correspondientes**

Se solicitó de forma escrita una carta a la Universidad María Auxiliadora para obtener los permisos del trabajo de investigación, así como la aprobación del presente proyecto.

### **2.5.2. Ejecución del proyecto y recogida de datos**

#### **➤ Recolección y caracterización de la especie vegetal**

La muestra vegetal a utilizar se recogió en las zonas aledañas de la provincia de Ferreñafe del departamento de Lambayeque al norte del Perú. Esta especie vegetal se recolectó de las diversas huertas existentes en la zona a horas de la mañana, asegurándose que el día anterior no hubiera llovido. La muestra recolectada se seleccionó y limpió adecuadamente para luego ser almacenada en un recipiente, con papel apropiado para este proceso se usó el papel toalla (33).

#### **➤ Extracción y obtención del extracto etanólico**

Las hojas limpias y seleccionadas se cortaron en trozos medianos hasta lograr un mejor contacto con el solvente de extracción; se colocaron en un recipiente de vidrio ámbar, al cual se le adiciona una cantidad 2 litros de etanol. Se selló y procedió a guardar el recipiente en un lugar fresco, seco y lejos de la luz solar por 7 días. Luego se filtró mediante gravedad usando un papel filtro N° 40; por medio del proceso de evaporación del solvente a temperatura ambiente, se logró obtener un extracto concentrado (34) (35).

El porcentaje de rendimiento del extracto obtenido se calculó mediante la fórmula:

$$\% \text{ Rend} = \frac{\text{Volumen Extracto etanólico obtenido}}{\text{Volumen inicial del macerado}} \times 100$$

➤ **Determinación de actividad antifúngica mediante el método de Difusión en pozo.**

El desarrollo de esta actividad se realizó en los laboratorios de microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo; usando el método modificado de difusión en pozo, a través de esta metodología se pudo observar la actividad antifúngica de los extractos estudiados frente a cepas de *Trichophyton rubrum* ATCC 1344.

- Preparación de los extractos al 25%, 50% y 75% v/v  
Del extracto obtenido previamente de la maceración y posterior filtración se colocaron en fioles de 100 ml; 25 ml, 50 ml y 75 ml del extracto etanólico y se procedió a llevar al aforo hasta la línea de los 100 ml; obteniendo de esa manera mediante dilución simple los extractos de 25%, 50% y 75% v/v (36).
- *Activación de la cepa de Trichophyton rubrum ATCC 1344*  
La cepa *T. rubrum* proporcionada por el laboratorio de microbiología de la universidad Nacional Trujillo; la reactivación de la cepa se hizo con el agar sabouraud, luego se llevó a incubar por 10 días a 37°C.
- *Preparación de los medios de cultivo a utilizar (Ver anexo 7)*  
El desarrollo del medio de cultivo se utilizó el agar Muller Hinton, se realizó según las indicaciones del fabricante (Ver Anexo 7). Se colocó esta solución en una autoclave y se dejó enfriar hasta (45°C – 50°C). Luego de esterilizarlo y solidificar se cuantificó el pH, debiendo estar entre 7.2 a 7.4 a temperatura ambiente. Dosificamos el medio en placas Petri de 150 mm en el cual utilizaremos 70 ml del agar (35).
- *Preparación del inóculo*

Pasando el tiempo se obtuvieron colonias, de las cuales se seleccionaron las colonias bien aisladas del mismo tipo morfológico. Posteriormente se tocó cada colonia con un asa de forma de anillo y se transfirió a un tubo que contiene 5 ml de solución salina hasta que exceda la turbidez del estándar 0.5 de la escala de Mc Farland. Se ajustó la turbidez con solución salina. (37)

➤ *Inoculación de las placas Petri*

Esta parte se realizó después del ajuste de la turbidez del inóculo. Se sumergió un hisopo estéril en la solución del inóculo, luego se frotó el hisopo ejerciendo presión sobre la pared interior del tubo, posteriormente se inoculó en la superficie de la placa que tiene el medio de agar Mueller Hilton de forma uniforme y en un solo sentido. Se dejó secar 20 minutos para que cualquier exceso de humedad superficial sea absorbido (37).

➤ *Pruebas de sensibilidad*

Se colocaron en los pocitos de las placas Petri 20 µL de cada concentración del extracto de *Cymbopogon citratus*, medicamento fluconazol 2mg/ml y etanol 96° luego se dejaron las placas a 37 °C en la estufa dejando 7 días de incubación, finalmente se observó cada placa y se midió los diámetros de los halos de inhibición alrededor de cada pocito (33).

➤ *Interpretación de los resultados*

La lectura de los halos de inhibición se realizó con un vernier, el cual se empleó para medir los diámetros de los halos de inhibición que se formaron en cada tratamiento, en el medio de cultivo, se realizaron 10 repeticiones por cada grupo y luego de los resultados obtenidos se obtuvo el promedio aritmético por grupo (29).

## **2.6. Procesamiento del análisis estadístico**

Los datos obtenidos se procesaron mediante el programa estadístico SPSS versión 25. Se usó la estadística inferencial y descriptiva para la determinación de la hipótesis y los elementos de tendencia central y de dispersión. Para trabajar estadísticamente los halos formados se usó la prueba ANOVA y la prueba de Tukey para múltiples comparaciones

## **2.7. Aspectos éticos**

Para la ejecución del trabajo se tomó en consideración todas las normas y métodos sobre el proceso de tratamiento de las muestras vegetales, además la descontaminación y normas de bioseguridad para el trabajo en el laboratorio microbiológico, así mismo se respetarán los protocolos de bioseguridad Covid-19.

# **III. RESULTADOS**

## **3.1. Análisis del extracto etanólico de las hojas de *Cymbopogon citratus***

**Tabla 1. Cantidades utilizadas y extracto etanólico obtenido de las hojas de *Cymbopogon citratus***

<b>CANTIDADES UTILIZADAS</b>	
<i>Hojas de Cymbopogon citratus</i>	<i>Alcohol de 96°</i>
<b>1.00 kg</b>	<b>2.00 L</b>
<b>EXTRACTO OBTENIDO</b>	
<b>1.85 L</b>	

En esta tabla 1 se observa que la cantidad obtenida de extracto etanólico es de 1.85 litros, lo que equivaldría a un porcentaje de rendimiento del 92.5%, correspondiente a la solución madre.

**Tabla 2. Dilución y obtención de extractos etanólicos de las hojas de *Cymbopogon citratus* al 25%, 50% y 75 %**

<b>EXTRACTOS ETANÓLICOS DE <i>CYMBOPOGON CITRATUS</i></b>			
<b>PORCENTAJE</b>	<b>S.E 25%</b>	<b>S.E 50%</b>	<b>S.E 75%</b>
<b>Extracto inicial mL</b>	25	50	75
<b>Agua destilada mL</b>	c.s.p	c.s.p	c.s.p
<b>TOTAL</b>	100 ml	100 ml	100 ml

*Nota: La preparación de las diluciones realizarlas en fiola aforada de 100 ml.*

En la tabla N° 2 se representa la forma de cómo se diluyeron los extractos etanólicos en sus correspondientes porcentajes para enfrentarlos a cultivos *in vitro* de *Trichophyton rubrum*.

### **3.2. Actividad antifúngica por el método de difusión en pozo**

**Tabla 3. Resultados del análisis in vitro del extracto etanólico frente a *T. rubrum* ATCC1344**

TABLA DE RECOLECCIÓN DE DATOS DEL ENSAYO MICROBIOLÓGICO					
INVESTIGADORES	1. CHINCHAY BONILLA, ROCIO CECILIA				
	2. VILCHEZ BEJARANO, GIANELLA JUDITH				
FECHA:	1 - 18 DE MARZO DE 2022				
MUESTRA	Extracto etanólico de <i>Cymbopogon citratus</i>				
CULTIVO	<i>Trichophyton rubrum</i>				
Cultivo	Alcohol etílico 96°	fluconazol 2mg/ml	Extracto etanólico al 25%	Extracto etanólico al 50%	Extracto etanólico al 75%
1	6,3	31,1	9,0	9,4	10,4
2	6,6	29,3	8,8	8,9	10,0
3	6,5	29,4	9,3	9,1	9,9
4	6,4	30,2	9,2	8,8	9,8
5	6,6	30,4	8,9	9,4	9,9
6	6,5	30,5	8,6	9,2	9,7
7	6,9	29,8	8,9	9,0	10,0
8	6,1	29,7	9,0	9,0	9,8
9	6,9	31,0	8,7	9,4	10,1
10	6,2	29,8	8,6	9,4	9,7
<b>PROMEDIO</b>	<b>6,5</b>	<b>30,1</b>	<b>8,9</b>	<b>9,2</b>	<b>9,9</b>

En la tabla 3 se observa que el extracto etanólico de *Cymbopogon citratus* en concentraciones de 25%, 50% y 75% presentan ligeros halos de inhibición de 8.9, 9.2 y 9.9 mm frente a la cepa *in vitro* de *Trichophyton rubrum* ATCC 1344; en contraste con el fármaco antifúngico fluconazol cuyo promedio de halo de inhibición es de 30.1 mm.

**Tabla 4. Determinación de la actividad antifúngica in vitro según la escala de Duraffourd; basado en la medida de los halos de inhibición**

Concentración del extracto etanólico de <i>Cymbopogon citratus</i>	Grupo control
--	---------------



<b>Niveles de sensibilidad</b>	<b>25%</b>	<b>50%</b>	<b>75%</b>	<b>Fluconazol (+)</b>	<b>Alcohol etílico (-)</b>
<b>Nula &lt; 8 mm</b>					6.5
<b>Sensible 8 - 14 mm</b>	8,9	9,2	9,9		
<b>Muy sensible 14 - 20 mm</b>					
<b>Sumamente sensible &gt; 20 mm</b>				30.1	

En la tabla 4 se observa que el crecimiento de *Trichophyton rubrum* es inhibido levemente por los extractos etanólicos de *Cymbopogon citratus* en todas sus concentraciones; siendo según la escala de Duraffourd que el hongo es sensible a los extractos; por otro lado, se aprecia que el fluconazol afecta notablemente el desarrollo del hongo en estudio.

Asimismo, para lograr determinar el estadístico necesario y llegar al objetivo planteado es indispensable que se determine si los datos obtenidos presentan una distribución normal, para ello se determinará con la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, por tratarse de muestras menores de 30 datos.

**Tabla 5. Prueba de normalidad con el test de Shapiro-Wilk**

<b>Pruebas de normalidad</b>			
<b>Shapiro-Wilk</b>			
	<b>Estadístico</b>	<b>Gl</b>	<b>Sig.</b>
<b>ETANOL 96°</b>	0,872	10	0,578
<b>ACTIVIDAD 25%</b>	0.946	10	0.625
<b>ACTIVIDAD 50%</b>	0.866	10	0.091
<b>ACTIVIDAD 75%</b>	0.900	10	0.217
<b>FLUCONAZOL</b>	0.937	10	0.520

La tabla 5 nos muestra según el análisis estadístico de normalidad de Shapiro-Wilk que los valores de significancia en todos los grupos son mayores de 0.05, lo que nos permite inferir que, si existe una distribución normal de los datos del ensayo microbiológico.

Una vez que hemos determinado la normalidad de los datos tenemos que comprobar la homogeneidad de los datos mediante la prueba estadística de LEVENE, lo que nos permitirá comprobar si aceptamos o no la hipótesis del investigador.

**Tabla 6. Prueba de homogeneidad de varianzas – Levene**

<b>Prueba de homogeneidad de varianzas</b>			
<b>HALO DE INHIBICIÓN</b>			
<b>Estadístico de Levene</b>	<b>gl1</b>	<b>gl2</b>	<b>Sig.</b>
8.484	4	36	0.375

En la tabla 6 el presente trabajo de investigación se compara los grupos de tratamientos a las concentraciones etanólicas de 25%, 50% y 75% y también los grupos control negativo (etanol 96°) y control positivo

(Fluconazol); por tal razón, debemos de establecer la homogeneidad de las varianzas que significa que debemos de asegurarnos que la variabilidad de las medias de los grupos sea igual o por lo menos similar.

En los resultados del análisis estadístico se observa que el nivel de significancia es mayor de 0.05, por lo tanto, rechazamos la hipótesis alterna y aceptamos la hipótesis nula, que confirma que los grupos analizados presentan varianzas homogéneas.

**Tabla 7. Análisis de las varianzas mediante ANOVA**

ANOVA de un factor					
HALO DE INHIBICIÓN					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
<b>Inter-grupos</b>	5591.319	4	1863.773	13634.592	0.000
<b>Intra-grupos</b>	4.921	36	0.137		
<b>Total</b>	5596.240	39			

En la tabla 7 según el resultado del análisis estadístico, el valor p o de significancia de la prueba estadística de ANOVA es 0,00, en otras palabras, menor de  $\alpha = 0.05$ ; por lo que se opta por rechazar la hipótesis nula y aceptar la hipótesis alternativa o del investigador, que confirma que existe diferencia estadísticamente significativa en los valores promedio de los grupos analizados. Al rechazar la hipótesis nula el paso siguiente es evaluar los datos obtenidos en el análisis microbiológico entre sí; para lograrlo debemos de utilizar la prueba estadística de Tukey.

**Tabla 8. Prueba de Tukey para comparaciones múltiples**

HALO DE INHIBICIÓN					
HSD de Tukey					
CONCENTRACIÓN	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
Etanol 96°	10	6,5			
25 %	10		8,9		
50 %	10		9,2		
75 %	10			9,9	
Fluconazol	10				30.120
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

En la tabla 8 que expresa los datos de la prueba de Tukey mediante comparaciones múltiples, se observa que existen diferencias significativas entre casi todos los grupos ( $p < 0.05$ ), con la excepción del grupo comparativo entre concentraciones de 25% y 50%, en la tabla los grupos experimentales se ordenaron de forma automática en subconjuntos según el grado de similitud correspondiendo a una misma columna la misma actividad antifúngica, en tal sentido se demuestra con un nivel de confianza al 95% que los extractos presenta actividad antifúngica, los extractos a la concentración del 25% y 50% presentan la misma actividad, la concentración al 75% es superior a los extractos anteriores y el grupo control de fluconazol presenta mayor actividad antifúngica sobre *Trichophyton rubrum* que todos los demás grupos.

## IV. DISCUSIÓN

### 4.1. Discusión de resultados

En nuestra época las infecciones causadas por hongos dermatofitos son frecuentes en distintos sectores de la población, el *Trichophyton rubrum*, es considerado como uno de los agentes más comunes en enfermedades de la piel como en el “pie de atleta” y “la tiña”. Existen muchos tratamientos farmacológicos para controlar esta infección fúngica, uno de los medicamentos más usado es el fluconazol, sin embargo, no existe todavía un tratamiento eficaz (37).

Por otro lado, en la medicina tradicional de nuestro país, se utiliza un sin número de especies vegetales con distintas actividades terapéuticas entre ellas las antifúngicas, como lo han demostrado diversos estudios a partir de los extractos acuosos, etanólicos, hidroalcolicos, metanólicos y en aceites esenciales de las diversas especies vegetales que son consideradas medicinales; por este motivo, se ejecutó el presente estudio de investigación que permitió evaluar la actividad antifúngica *in vitro* del *Cymbopogon citratus* sobre *Trichophyton rubrum*.

Con respecto al extracto etanólico de *Cymbopogon citratus* que tuvo mayor actividad antifúngica *in vitro* sobre *Trichophyton rubrum* ATCC 1344, se determinó que corresponde a la concentración del 75% con halo de inhibición de 9,9 mm; seguida por la concentración del 50% con 9,2 mm y finalmente la concentración al 25% con halo de 8,9 mm, si bien es cierto no se observa un efecto antifungico marcado mediante el análisis de Tukey se puede determinar que existe diferencia estadísticamente significativa con el control negativo, por lo tanto, se considera que existe un efecto leve, así mismo, se demuestra al valorar los resultados mediante la escala de Duraffourd.

Diversos autores en sus investigaciones corroboran las conclusiones de nuestro estudio como Dias N. (2017) quien determino inhibición en cultivos de *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes* al enfrentarlo al aceite esencial de la especie *Cymbopogon citratus*, debido por su alta

cantidad de monoterpenos oxigenados en su composición este presentaría un efecto inhibitorio contra ciertos hongos, por otro lado Salinas M. (2019) determino del mismo modo, inhibición en cultivos de *Trichophyton rubrum* frente al aceite esencial de la especie *Cymbopogon citratus*, cabe de mencionar que estos aceites esenciales tienen una elevada concentración de 3,7-dimetil-2,6-octadienal el cual es un aldehído con marcadas propiedades antifúngicas(23) (24) (25). La poca actividad antifúngica del extracto etanólico de *Cymbopogon citratus* obtenida en el estudio, se debe tal vez a la característica química del citral el cual es un aldehído  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturado que al estar en contacto por mucho tiempo con el etanol, ocasiona una reacción química para la formación de hemiacetales y acetales (los cuales pueden encontrarse en equilibrio constante) y también reaccionar con el agua presente en el sistema para la formación de hidratos; lo que conlleva a una disminución o anulación de la actividad antifúngica original del citral, además de considerar el hecho de que dicho componente pudo ser extraído en pequeñas cantidades con el etanol ya que no es un solvente apropiado para la obtención de aceites(38) (Ver Anexo 6).

Por otro lado, las investigaciones realizadas con respecto al extracto etanólico de la misma especie como la realizada por Huamán H (2019) sobre la actividad antibacteriana del extractos de *C. citratus* acuoso y etanólico recolectada en doce distritos de la provincia de Bongará, región Amazonas en concentraciones de 25%,50%,75,%100% con un macerado de 48 horas, observó que el extracto etanólico presenta un mayor espectro de acción antimicrobiana sobre *E. coli* y tiene un efecto leve sobre *S. aureus* y el extracto acuoso no logra tener efecto antimicrobiano sobre la cepa *E. coli*, pero si sobre *S. aureus* cuando las muestras proceden de una altitud baja y alta, finalmente concluyeron que el extracto etanol 96% es mejor solvente que el agua puesto que logra extraer un mayor contenido de metabolitos secundarios que repercute en su porcentaje de inhibición, también comentaron que las altitudes de otro lado demuestran que la actividad antibacteriana varía según la procedencia de la muestra.

Así mismo, Cardenas A. y Farfán P. (2021) estudiaron el efecto antibacteriano in vitro a las concentraciones de 10 µg/ml ; 20 ug/ml sucesivamente hasta el 100 µg/ml del extracto hidroetanólico de *Cymbopogon Citratus* (hierba luisa), con un control positivo clorhexidina 0,12% y control negativo (Dimetilsulfóxido DMSO 1%) sobre *Streptococcus mutans* ATCC 2517, se hizo por el método de maceración por 3 días obteniendo un efecto antibacteriano superior al del control positivo, la concentración de 10 µg/ml presento halos de inhibición entre  $16,37 \pm 0,485$  mm y de  $25,47 \pm 0,362$  mm (100 µg/ml), el control positivo fue de  $14,48 \pm 0,413$  mm.

En tal sentido, se puede concluir que *C. Citratus* presenta efecto antibacteriano y antifúngico tanto en sus extractos acuoso, hidroalcohólico, etanólico y aceite esencial y este efecto varía según el tipo de especie, por lo tanto, el extracto etanólico obtenido presentaría metabolitos con capacidad antimicrobiana no siendo únicamente el componente activo el citral, que según algunos autores sería el componente que ejerce la actividad antimicrobiana a esta planta, inhibiendo la capa lipídica de la membrana celular.

Por otro lado, en lo que corresponde a la comparación de las diferentes concentraciones de los extractos etanólicos contra la actividad antifúngica del fluconazol, representante ideal del grupo químico de los azoles se observó que el halo de inhibición de este último fue de 30.1 mm en promedio, comparado con la leve actividad del extracto etanólico al 75%, 50%, y del 25% v/v, frente a la cepa de nuestro estudio de *Trichophyton rubrum*, evidenciando que presenta mayor actividad antifúngica. Tal como muestran los resultados de Perez P.,et al (2020) donde evidencio el actividad antifúngica del fluconazol sobre la cepa de *Trichophyton rubrum* ATCC 28188 donde obtuvo halo de inhibición promedio de 21.79 mm para esta cepa. Así mismo, Bernilla Samame B, Herna Rosillo AM (2018) compararon el efecto inhibitorio del fluconazol sobre cepas de *Trichophyton rubrum* y *Microsporium canis* al tratar de determinar la susceptibilidad del efecto inhibitorio de terbinafina y fluconazol se realizó con la metodología del CLSI - Protocolo M38-A2 en cuyo caso encontraron que las concentraciones

mínimas inhibitorias (CMI) de fluconazol sobre *T. rubrum* fueron CMI50, 283.0 ug/ml y CMI90, 3582.9 ug/ml.

En tal sentido, en distintos estudios se evidencia el poder antifúngico del fluconazol frente a *Trichophyton rubrum* el cual es empleado en el tratamiento de este hongo, razón por la cual presenta mayor actividad antifúngica que los extractos obtenidos a partir de *Cymbopogon Citratus* (hierba luisa) como se muestra luego del análisis comparativo de los datos mediante la prueba de ANOVA y Tukey.

#### **4.2. Conclusiones**

- Según las pruebas realizadas en el laboratorio los extractos etanólicos de *Cymbopogon citratus* frente a cepas de *Trichophyton rubrum* ATCC 1344 tienen leve actividad antifúngica.
- El extracto etanólico de las hojas de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) en la concentración de 75% tiene mayor actividad antifúngica que al 25% y 25% enfrentarlo a la cepa *in vitro* de *Trichophyton rubrum* ATCC 1344.
- El fluconazol tiene mayor actividad antifúngica que los extractos etanólicos de las hojas de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) en concentraciones de 25%, 50% y 75%.

#### **4.3. Recomendaciones**

- Se sugiere estudiar más detalladamente la actividad antifúngica *in vivo* de esta especie vegetal para promover su utilidad en realizar formas farmacéuticas
- Se debe realizar estudios acerca de las propiedades que presenta la raíz, tallo y flor del *Cymbopogon citratus* para que pueden ser aprovechados para el beneficio de la sociedad.
- Se recomienda a las instituciones de salud pública seguir investigando otras especies vegetales enfrentándose a diversas cepas de dermatofitos para generar tratamientos alternativos



- Realizar estudios para determinar la concentración de vitaminas y aminoácidos de la Hierba luisa para ser utilizado como suplemento nutricional.

## V. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. Microbiología Médica. 8ª ed. España: Elsevier; 2017.
2. Jawetz, Melnick, Adelberg. Microbiología médica. 27ª ed. México: McGRAW-HILL/INTERAMERICANA EDITORES, S.A. DE C.V.; 2016.
3. Conejo Fernández A, Martínez Roig A, Ramírez Balza O, Álvez González F, Hernández Hernández A, Baquero Artigao F, *et al.* Documento de consenso SEIP-AEPap-SEPEAP sobre la etiología, el diagnóstico y el tratamiento de las infecciones cutáneas micóticas de manejo ambulatorio. Rev Pediatr Aten Primaria [internet].2016 dic [citado en 30 de septiembre de 2021];18(72):149-172. Disponible en: [https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1139-76322016000400002&lng=es&nrm=iso&tlng=es](https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1139-76322016000400002&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
4. Kaur I, Chaudhary A, Singh H. Clinico-microbiological aspects of tinea corporis in North India: Emergence of Trichophyton tonsurans. Int J Res Dermatol. 2020; 4(2).
5. Jena A, Lenka R, Sahu M. Dermatophytosis in a tertiary care teaching hospital of Odisha: A study of 100 cases of superficial fungal skin infection. J Public Health Res Dev. 2018; 9(7).
6. Sabogal M, Jimenez H, Morales C, Alvarado Z, Colmenares C. Micosis en los pies: descripción clínico-epidemiológica en un centro de referencia de Bogotá, Colombia. Infectio. 2018; 23(1).

7. Cobos Lladó D, Fierro Arias L, Arellano Mendoza I, Bonifaz A. La onicomicosis y su influencia en la calidad de vida. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*. 2016; 14(4):318-327.
8. Calva Herrera YR. Características sociodemográficas y el nivel de conocimiento acerca del autocuidado en pacientes con Diabetes mellitus, Hospital General de Jaén, 2016 [Tesis de Maestría]. Cajamarca - Perú: Universidad Nacional de Cajamarca;2018.
9. Gupta AK, Mays RR. Onychomycosis on Quality of Life: A Systematic Review of the Available Literature. *Skin Appendage Disord* [Internet]. 2018 oct [ citado 12 de octubre de 2021]; 4(4):208-216. Disponible en: <https://doi.org/10.1159/000485632>
10. Fiallos CM, Peñafiel López PG, Villafuerte Logroño JV. Onicomicosis tratamiento oral vs tópico en el adulto, Hospital Provincial General Docente Riobamba. enero-diciembre 2016 [Tesis de Grado]. Chimborazo-Ecuador: Universidad Nacional de Chimborazo; 2018
11. Suscal Espinoza JN, Vite Cano GK. Actividad antimicótica de extractos acuosos y etanólicos de la planta *Senna pistaciifolia* contra la presencia de *Candida albicans* [Tesis de Grado]. Ecuador: Universidad de Guayaquil; 2018.
12. Novillo Logroño FA, Cabezas Sandoval MA. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus*, *Rosmarinus officinalis* y *Cymbopogon citratus* frente a cepas ATCC [Tesis de Grado]. Ecuador: Universidad Central del Ecuador; 2021
13. Carhuas Lastra RDP. Efecto antimicrobiano del *Origanum vulgare*, *Mentha piperita*, *Cymbopogon citratus* sobre el *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus* en el Hospital Militar Central Lima 2017 [Tesis de Grado]. Huánuco - Perú: Universidad de Huánuco; 2018.
14. Mendes Hacke AC, Miyoshi E, Marques JA, Pereira RP. Anxiolytic properties of *Cymbopogon citratus* (DC.) stem extract, essential oil and its

- constituents in zebrafish (*Danio rerio*). *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2020 oct [ Acceso 19 de noviembre de 2021]; 260:113036. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32473367/>.
15. Avoseh O, Oyedeji O, Rungqu P, Nkeh-Chungag B, Oyedeji A. *Cymbopogon* Species; Etnofarmacología, Fitoquímica y la Importancia Farmacológica. *Moléculas*. 2015 abril 23;20(5):7438–7453.
  16. Ekpenyong CE, Akpan E, Nyoh A. Etnofarmacología, fitoquímica y actividades biológicas de los extractos de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf [Internet]. *Mentón J Nat Med*. 2015 mayo [ Acceso 26 de noviembre de 2021]; 13(5):321-37. Disponible en: [10.1016/S1875-5364\(15\)30023-6](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(15)30023-6)
  17. Heya SM, Verde-Star MJ, Galindo-Rodríguez S, García-Hernández DG, Rivas-Morales C, Robledo-Leal E. Diagnóstico de la tinea pedis y tinea unguium en la zona metropolitana de Monterrey, Nuevo León, México. *Dermatol Rev Mex*. 2021; 65(6): 839-849.
  18. Cáceres Batista EM, Dyett Méndez R. Características clínico-epidemiológicas de tiña de la cabeza en menores de 15 años que acuden a la consulta del Instituto Dermatológico Dominicano y Cirugía de piel (IDDCP) noviembre 2019. febrero de 2021 [Tesis doctoral]. República Dominicana: Universidad Nacional Pedro Henríquez Ureña; 2021.
  19. Manual MSD para profesionales [Internet]. Lima- Perú: Merck Sharp & Dohme Corp. julio 2019 [Acceso 30 de noviembre de 2021]. Fármacos Antimicóticos [ aprox. 3 pantallas]. Disponible en : <https://www.msdmanuals.com/es/professional/enfermedades-infecciosas/hongos/f%C3%A1rmacos-antimic%C3%B3ticos>.
  20. Córdoba S, Vivot W, Szusz W, Albo G. Antifungal Activity of Essential Oils Against *Candida* Species Isolated from Clinical Samples. *Mycopathologia*. 2019 oct;184(5):615-623.
  21. Erhabor JO, Erhabor RC, Ldu M. In vitro antibacterial and cytogenotoxicological properties of the aqueous extract

of *Cymbopogon citratus* Stapf (DC) leaf. Afr Health Sci. 2019 Jun;19(2):2056-2067. doi: 10.4314/ahs.v19i2.29. PMID: 31656489; PMCID: PMC6794529.

22. Dias N, Dias MC, Cavaleiro C, Sousa MC, Lima N, Machado M. Oxygenated monoterpenes-rich volatile oils as potential antifungal agents for dermatophytes. Nat Prod Res. 2017 Feb;31(4):460-464. doi: 10.1080/14786419.2016.1195379. Epub 2016 Jun 16. PMID: 27309978.
23. Bernilla Y, Herna A. Efecto inhibitorio in vitro de terbinafina y fluconazol sobre *Trichophyton rubrum* y *Microsporum canis*, hospital Regional Lambayeque [Internet]. Universidad Pedro Ruíz Gallo; 2018 [citado 8 de julio de 2022]. Disponible en: <https://repositorio.unprg.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12893/3356/BC-TES-TMP-2139.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
24. Salinas M. Efecto de la concentración del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* sobre el crecimiento de *Microsporum canis* y *Trichophyton rubrum* in vitro. 2019 [Internet]. Trujillo-Perú: Universidad Nacional de Trujillo; 2019 [citado 30 de noviembre de 2021]. Disponible en : <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/12542>
25. Huamán H. Evaluación de la capacidad antioxidante y actividad antibacteriana del extracto acuoso y etanólico de hierba luisa (*Cymbopogon citratus*), recolectada de doce distritos de la provincia de Bongará, región Amazonas [Tesis de Grado]. Chachapoya - Perú: Universidad Toribio Rodríguez de Mendoza ; 2019 [citado 30 de noviembre de 2021] Disponible en: <https://repositorio.untrm.edu.pe/handle/20.500.14077/1992>
26. Tantaleán L. Efecto antimicótico de Hierba Luisa (*Cymbopogon citratus*) y una de gato (*Uncaria tomentosa*) contra *Candida albicans* [Tesis de Grado]. Universidad Nacional de Jaén; 2019.
27. Cardenas A y Farfán P. Efecto antibacteriano in vitro del extracto hidroetanólico de *Cymbopogon Citratus* (hierba luisa) sobre

*Streptococcus mutans* ATCC 25175 [Tesis de Grado]. Lima Perú Universidad Inca Garcilaso de la Vega; 2021

28. Perez P, Cabrera Y. Actividad antimicótica in vitro del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. (orégano) frente a *Candida albicans* ATCC 10231 Y *Trichophyton rubrum* ATCC 28188 [Internet]. Universidad María Auxiliadora; 2020 [citado 8 de julio de 2022]. Disponible en: [https://repositorio.uma.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12970/377/EFECTO ANTIBACTERIANO DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE Desmodium molliculum %28kunt%29.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.uma.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12970/377/EFECTO_ANTIBACTERIANO_DE_LOS_EXTRACTOS_ETANÓLICOS_DE_Desmodium_molliculum_%28kunt%29.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
29. Romero Veramendi AR., Baldeón Mendoza IV. Actividad antibacteriana del extracto etanólico de las flores de *Tropaeolum majus* L. (mastuerzo), frente a *Staphylococcus epidermidis*, por la técnica de Kirby-Bauer [Tesis de Grado]. Lima Perú Universidad Inca Garcilaso de la Vega; 2019.
30. Morocho-Yaguana LA, Carrión-Lliguín AM, Cambizaca-Mora GdP, Riascos-Jaramillo HD. Actividad antimicótica del aceite esencial de *Plumbago scandens* L.(Plumbaginaceae). CEDAMAZ [Internet]. 2021.[citado 31 de noviembre del 2021]; 11(1),6-12. Recuperado a partir de <https://revistas.unl.edu.ec/index.php/cedamaz/article/view/1030>
31. Pérez Paucar PD, Cabrera Salazar Y. Actividad antimicótica *in vitro* del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. (Oregano) frente a *Candida albicans* ATCC 10231 y *Trichophyton rubrum* ATCC 28188. [Tesis de grado]. Lima - Perú: Universidad María Auxiliadora; 2020.
32. Huamán Culqui H. Evaluación de la capacidad antioxidante y actividad antibacteriana del extracto acuoso y etanólico de hierba luisa (*Cymbopogon citratus*), Bongará, Región Amazonas [Tesis de grado]. Chayapocha- Perú: Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas; 2019.
33. García Ybañez ÁL. Efecto antifúngico del extracto etanólico de *origanum vulgare* (Orégano) sobre *candida albicans* ATCC 10231 [Internet]. Trujillo-Perú: Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote; 2019 [citado el 31

de noviembre del 2021]. Disponible en :  
<http://repositorio.uladech.edu.pe/handle/123456789/10815>

34. Saravia Mendoza DM, Quillash Ramos FE. Extracto hidroalcohólico de acíbar de *Aloe vera (L) Burn.* (Sábila) y su efecto antifúngico sobre cultivos de *Trichophyton rubrum* estudios *in vitro* [Tesis de grado]. Lima Perú: Universidad Inca Garcilaso de La Vega; 2019.
35. Rodríguez Villavicencio JE. Efecto antifúngico del extracto de *Allium sativum* en cepas de *Trichophyton rubrum* ATCC 1344, contrastado con ketoconazol, estudio *in vitro* [Tesis de grado]. Trujillo-Perú: Universidad César Vallejo; 2018.
36. Samadi, Shaista S, Manjari S, Neeta , Shruti S, Sushil G, et al. Antifungal efficacy of herbs. J Oral Biol Craniofac Res. 2018; 1(9).
37. Cardenas Pachas B, Farfán Villafuerte E. Efecto antibacteriano *in vitro* del extracto hidroetanólico de *Cymbopogon Citratus* (hierba luisa) sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Tesis de Grado. Piura, Perú: Universidad César Vallejo, Facultad de Ciencias de la Salud. 2021.

## VI. ANEXOS

### ANEXO 1. Instrumentos de recolección de datos

#### TABLA DE RECOLECCIÓN DE DATOS DEL ENSAYO MICROBIOLÓGICO

<b>INVESTIGADORES</b>	1. CHINCHAY BONILLA, ROCIO CECILIA 2. VILCHEZ BEJARANO, GIANELLA JUDITH				
<b>FECHA:</b>					
<b>MUESTRA</b>	Extracto etanólico de <i>Cymbopogon citratus</i>				
<b>CULTIVO</b>	<i>Trichophyton rubrum</i>				
Cultivo	Muestra control	Fluconazol	Extracto etanólico al 25%	Extracto etanólico al 50%	Extracto etanólico al 75%
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
<b>OBSERVACIONES</b>					

## ANEXO 2. Matriz de consistencia

Formulación del problema	Objetivos	Hipótesis
<b>Problema General</b>	<b>Objetivo General</b>	<b>Hipótesis General</b>
¿Tendrá el extracto etanólico de las hojas de <i>Cymbopogon citratus</i> actividad antifúngica in vitro frente a <i>Trichophyton rubrum</i> ?	Determinar la actividad antifúngica in vitro del extracto etanólico de las hojas de <i>Cymbopogon citratus</i> frente a <i>Trichophyton rubrum</i>	El extracto etanólico de las hojas de <i>Cymbopogon citratus</i> tiene actividad antifúngica sobre el cultivo in vitro de <i>Trichophyton rubrum</i> .
<b>Problemas Específico</b>	<b>Objetivos Específicos</b>	<b>Hipótesis Específicas</b>
1. ¿Cuál de los extractos etanólicos de <i>Cymbopogon citratus</i> 25%, 50% y 75% tendrá mayor actividad antifúngica in vitro sobre <i>Trichophyton rubrum</i> ?	1. Determinar la concentración del extracto etanólico de <i>Cymbopogon citratus</i> que tendrá mayor efecto antifungico in vitro sobre <i>Trichophyton rubrum</i> .	1. Los extractos etanólicos de <i>Cymbopogon citratus</i> en las concentraciones 25%, 50% y 75%; tendrán mayor efecto antifungico <i>in vitro</i> sobre <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 1344.
2. ¿Cuál tendrá mayor actividad antifúngico <i>in vitro</i> sobre <i>Trichophyton rubrum</i> , los extractos etanólicos de <i>Cymbopogon citratus</i> o la solución de fluconazol de 2 mg/mL de concentración?	2. Comparar la actividad antifúngica del extracto etanólico de las hojas de <i>Cymbopogon citratus</i> y la solución de fluconazol de 2 mg/ml de concentración frente a <i>Trichophyton rubrum</i>	2. Los extractos etanólicos de <i>Cymbopogon citratus</i> en las concentraciones 25%, 50% y 75%; tendrán mayor efecto <i>in vitro</i> sobre <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 1344 que la solución de fluconazol de 2 mg/ml de concentración



### ANEXO 3. Operacionalización de las variables

VARIABLES	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIONES	INDICADORES	ESCALA DE MEDICIÓN	Nº DE ÍTEMS	VALOR
<b>Variable independiente</b> Extracto etanólico de las hojas de <i>Cymbopogon citratus</i>	Solución saturada de componentes de la especie vegetal en estudio que se obtiene al someterlo al proceso de maceración durante un tiempo prolongado.	Se consigue el extracto etanólico colocando los 1 kg de la especie vegetal en un recipiente de vidrio ámbar, colocando 2 litros de etanol de 96° y dejándolo macerar por 7 días	Extracto etanólico de <i>Cymbopogon citratus</i> diluido en diferentes concentraciones.	25 50 75	Razón	3	%
<b>Variable dependiente</b> Actividad antifúngica sobre <i>Trichophyton rubrum</i>	Es la capacidad de una sustancia para inhibir el crecimiento o eliminar a un hongo	Se inocularon placas petri con las cepas fúngicas <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 1344 y se expondrán a las sustancias experimentales	Halo de inhibición (mm)	<8mm 8-14mm 14-20mm >20mm	Razón	4	Nulo Sensible Muy sensible sumamente sensible

## ANEXO 4. Identificación Taxonómica de *Cymbopogon citratus* (Hierba luisa)

Hamilton W. Beltrán S.  
Consultor Botánico  
Calle Natalio Sánchez 251- Jesús María  
hamiltonbeltran@yahoo.com

### CERTIFICACIÓN BOTÁNICA

El Biólogo colegiado, certifica que la planta conocida como "HIERBA LUISA" proporcionada por los Bachilleres, **ROCIO CECILIA CHINCHAY BONILLA y GIANELLA JUDITH VILCHEZ BEJARANO**, Tesisistas de la Universidad María Auxiliadora, ha sido estudiada científicamente y determinada como *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf y de acuerdo al Sistema de Clasificación de Cronquist 1981, se ubica en las siguientes categorías:

Reino: Plantae  
División: Magnoliophyta  
Clase: Liliopsida  
Subclase: Commelinidae  
Orden: Poales  
Familia: Poaceae  
Género: *Cymbopogon*  
Especie: *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf

Se expide la presente certificación a solicitud de los interesados para los fines que estime conveniente.

Lima, 13 abril del 2022

  
Bigo. Hamilton Beltrán  
Hamilton W. Beltrán Santiago  
Físlogo - Botánico  
1 88 2719

## ANEXO 5. Evidencias fotográficas del trabajo de campo

### Elaboración del extracto etanólico de *Cymbopogon citratus*.



Recolección e identificación de las hojas de *cymbopogon citratus* (Hierba Luisa)



se seleccionará y se limpiará  
con agua destilada.



Las hojas se cortan en trozos medianos.



se colocarán en un recipiente de vidrio  
ámbar, se le adicionará alcohol de 96° y  
macera por 7 días.



se filtró mediante gravedad y se logró obtener un extracto concentrado.



Preparación de los extractos se colocaron en fioles de 100 ml; 25 ml, 50 ml y 75 ml y se aforaron con agua destilada.



obteniendo de esa manera mediante dilución simple los extractos de 25%, 50% y 75% v/v.



La cepa *T. rubrum* 1344 proporcionada por el laboratorio de la facultad de Medicina de la UNT.



se seleccionó colonia y se transfiere en un tubo de ensayo que contiene 5 ml de solución salina.



Observamos la turbidez en el tubo y comparamos con el patrón estándar 0.5 de la escala de Mc Farland

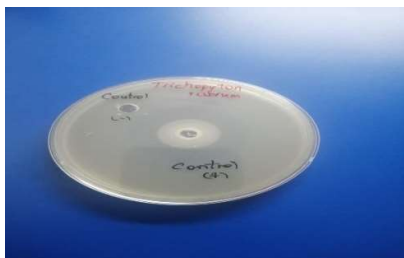
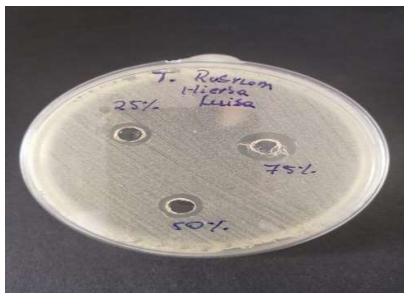


se sumergió un hisopo estéril en la solución del *T. rubrum* y después se dispersó en la superficie de la placa.

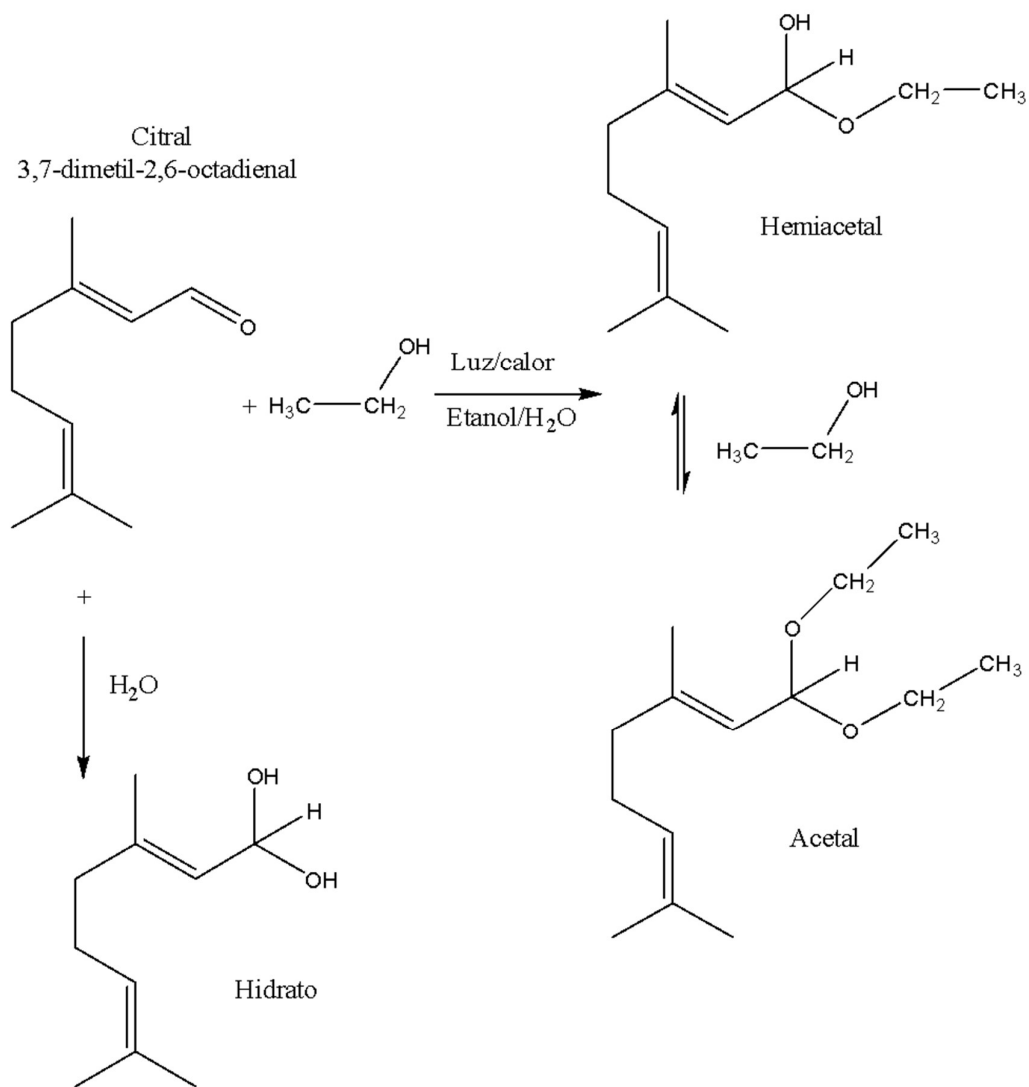


se realizó pocitos y luego se colocó 20  $\mu$ L de las diferentes concentraciones del extracto, fluconazol y alcohol, se incubó por 7 días

finalmente, se midió con vernier digital los halos de inhibición



## ANEXO 6. Formación de hidratos, acetales y hemiacetales a partir del citral



## ANEXO 7. Preparación de medios de cultivo

britannia<sup>▲</sup>

britannialab.com

REF B0213705 REF B0213706

# Mueller Hinton Agar

IVD

### USO

Medio de cultivo recomendado universalmente para la realización de la prueba de sensibilidad a los antimicrobianos.

### FUNDAMENTO

Medio de cultivo nutritivo no selectivo que promueve el desarrollo microbiano. Por su composición, ha sido recomendado por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) antiguamente llamado National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), para ser utilizado en forma rutinaria en la realización del antibiograma en medio sólido, debido a que presenta buena reproducibilidad lote a lote en las pruebas de sensibilidad, su contenido en inhibidores de sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclina es bajo, la mayoría de los patógenos microbianos crece satisfactoriamente y una gran cantidad de datos adicionales que han sido evaluados y avalados usando este medio de cultivo.

Cuando se suplementa con sangre de carnero al 5%, permite realizar las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en especies de estreptococos. También, con el agregado de sangre puede utilizarse para el cultivo y aislamiento de microorganismos nutricionalmente exigentes.

### CONTENIDO Y COMPOSICIÓN

Código B0213705: envase x 100 g.

Código B0213706: envase x 500 g.

### FÓRMULA (en gramos por litro)

INFUSIÓN DE CARNE.....	300.0
PEPTONA ÁCIDA DE CASEÍNA.....	17.5
ALMIDÓN.....	1.5
AGAR.....	15.0
pH FINAL: 7.3 ± 0.1	

**Nota:** la infusión de carne es equivalente a 3 g de polvo.

### INSTRUCCIONES

Suspender 37 g del polvo en 1 litro de agua purificada. Dejar embeber de 10 a 15 minutos. Calentar con agitación frecuente y hervir durante 1 minuto para disolución total. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Enfriar a 45°-50°C y distribuir en placas de Petri estériles, en volumen apropiado para que el espesor sea de 4 mm sobre una superficie horizontal (25-30 ml en placas de 9 cm de diámetro).

Previo a su distribución en placas de Petri, puede ser suplementado con 5% de sangre ovina desfibrinada estéril (**Britasheep**) preparándose así Mueller Hinton Sangre Agar.

### CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO

Medio de cultivo deshidratado: color beige, homogéneo, libre desluzamiento.

Medio de cultivo preparado: color ámbar claro.

Suplementado con sangre: color rojo cereza.

### ALMACENAMIENTO

Medio de cultivo deshidratado a 10-35 °C.

Medio de cultivo preparado a 2-8 °C.

### PROCEDIMIENTO

#### Siembra

Hisopado en superficie.

El inóculo microbiano dependerá del grupo microbiano o microorganismo en estudio.

#### Incubación

La atmósfera, el tiempo y temperatura de incubación dependerán del grupo microbiano o microorganismo en estudio.



GRUPO MICROBIANO MICROORGANISMO	INÓCULO MICROBIANO	INCUBACIÓN
Enterobacterias <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Crecimiento en medio líquido o suspensión directa de la colonia equivalente al estándar 0,5 de Mc Farland.	En aerobiosis, a $35 \pm 2$ °C durante 16 a 18 horas
<i>Enterococcus</i> spp.	Crecimiento en medio líquido o suspensión directa de la colonia equivalente al estándar 0,5 de Mc Farland.	En aerobiosis, a $35 \pm 2$ °C durante 16 a 18 horas. Si se ensaya el disco de vancomicina 30 ug incubar 24 horas.
<i>Acinetobacter</i> spp. <i>Burkholderia cepacia</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Crecimiento en medio líquido o suspensión directa de la colonia equivalente al estándar 0,5 de Mc Farland.	En aerobiosis, a $35 \pm 2$ °C durante 20 a 24 horas.
<i>Staphylococcus</i> spp.	Suspensión directa de la colonia equivalente al estándar 0,5 de Mc Farland.	En aerobiosis, a $35 \pm 2$ °C durante 16 a 18 horas. En el caso que se ensayen los discos de cefoxitina, con <i>Staphylococcus coagulasa</i> negativa y en todos los casos al ensayar oxacilina y vancomicina, incubar las placas durante 24 horas.
<i>Vibrio cholerae</i>	Suspensión directa de la colonia equivalente al estándar 0,5 de Mc Farland.	En aerobiosis a $35 \pm 2$ °C durante 16 a 18 horas.
<i>Streptococcus pneumoniae</i> Streptococcus grupo viridans Streptococcus spp. Grupo Beta Hemolítico.	Suspensión directa de la colonia equivalente al estándar 0,5 de Mc Farland.	En atmósfera con 5 % de CO <sub>2</sub> , a $35 \pm 2$ °C durante 20 a 24 horas.

#### INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

- Los lotes de agar Mueller Hinton Britannia cumplen con las normas descriptas en el documento M6 - P del NCCLS: "Evaluating production lots of dehydrated Mueller Hinton agar". Esto es muy importante pues algunos lotes pueden variar significativamente y si las bacterias no crecen adecuadamente, las zonas de inhibición en las pruebas de difusión son generalmente más grandes, quedan fuera de los límites de control de calidad y pueden llevar a resultados erróneos.

- Los medios que contienen cantidades excesivas de timidina o timina pueden revertir el efecto inhibitorio de las sulfonamidas y trimetoprima, produciendo así zonas de inhibición mas pequeñas y por lo tanto informes de falsa resistencia. Para evaluar el contenido de timidina del lote de agar Mueller Hinton, se utiliza la cepa de control de calidad: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 frente a discos de

TMS. En un medio satisfactorio, se produce una zona clara de inhibición del desarrollo de diámetro 20 mm o mayor.

- Otro aspecto de cuidado en el control de calidad en el agar Mueller Hinton es que las variaciones en cationes divalentes principalmente calcio y magnesio pueden afectar los resultados con tetraciclina, polimixina y aminoglucósidos cuando se ensayan cepas de *Pseudomonas* spp. Por tal motivo, se deben cumplir los límites de control de calidad publicados por el CLSI.

- Los resultados deben ser cuidadosamente observados con todos los organismos de control para evitar datos aberrantes debido al medio de cultivo. Para aquellas cepas que no puedan crecer satisfactoriamente en el Agar Mueller Hinton no suplementado, se agrega sangre defibrinada de camero al agar fundido y enfriado, en concentración final al 5% (v/v).