



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

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LA CREMA A BASE DEL
EXTRACTO METANÓLICO DE LAS FLORES DE *Nerium
oleander* L. “LAUREL ROSA” SOBRE *Candida albicans*
ATCC 10231

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO
FARMACÉUTICO

AUTORES:

Bach. FERNANDEZ MELENDEZ, EMELY LISSETH
<https://orcid.org/0000-0002-0917-9057>

Bach. ROJAS SUCLUPE, JOSÉ LUIS
<https://orcid.org/0000-0003-3733-9924>

ASESOR:

Mg. LA SERNA LA ROSA, PABLO ANTONIO
<https://orcid.org/0000-0001-7065-012X>

LIMA – PERÚ

2022

DEDICATORIA

A DIOS, quien me dió grandes personas como ejemplo y motivación en mi vida; y hoy me lleva a dedicar este gran logro a MI FAMILIA, de forma especial a mis padres GLADYS y JAIME, son mi mayor fortaleza y un hontanar de amor inagotable.

A mis hermanos: Aracely; Patricia; Edgar; Eduardo y Maythe, que siempre me incentivan a ser mejor cada día, a quienes admiro y respeto porque cada uno ha forjado su camino en esta vida.

Decido dedicar este trabajo, a 4 personas importantes de los cuales siempre aprendí mucho y recibí amor, sabiendo que desde el cielo hoy me miran con orgullo, a mis abuelos Baltazar; Jesús y Delicia y a quien aún sigue a mi lado y es como mi segunda madre, Esperanza.

Y sin lugar a dudas a mi amor José Luis, mi novio que me tomó de la mano; decidiendo compartir juntos esta vida y el sueño de ser profesionales.

Emely Lisseth Fernández Meléndez

Por el don de la vida y la bondad que le precede dedico infinitamente a DIOS, que sin importar mis errores sigue a mi lado y me demuestra su amor al confortarme con la salud de mis padres TELMO y CORINA quienes son mi tesoro más preciado y el motor que impulsa mis días.

Este arduo trabajo es dedicado también a mis hermanas: Roxana; Mariana y Nathaly que siempre me brindan su amor, y al resto de familiares que me demuestran su apoyo en momentos difíciles.

De forma especial dedico esto, a la mujer que llevo a mi vida en el momento exacto a mi novia Emely; deseando que DIOS nos conserve siempre juntos el resto de mi vida y mantenga vivo nuestro amor.

José Luis Rojas Suclupe

AGRADECIMIENTO

Guiados por la fortaleza que nos brinda, iniciamos agradeciendo a DIOS; que es el centro de nuestro ahínco para seguir adelante diariamente y llenarnos de sabiduría en cada momento difícil que encontramos en la elaboración de nuestra tesis y de nuestra vida.

Agradecemos a nuestro asesor de tesis; el Mg. La Serna La Rosa, Pablo Antonio, por su apoyo, conocimientos y pautas indispensables para culminar nuestra tesis. Además de una relación amical, la cual nos brindó la confianza de consultar cualquier duda, durante el proceso de nuestra investigación.

Agradecidos también, con la universidad “María Auxiliadora” por acceder a nuestra investigación y formar la plana docente idónea para nuestra tesis. De tal forma, que hoy en día estamos próximos a cumplir nuestra meta de ser químicos farmacéuticos; una profesión que nos apasiona y de la cual tenemos grandes expectativas a largo plazo.

Para culminar agradecemos al conjunto de profesionales; que conforman nuestro jurado y evaluaron nuestro trabajo de investigación.

ÍNDICE GENERAL

| | Páginas |
|---|----------------|
| I. INTRODUCCIÓN..... | 10 |
| II. MATERIALES Y MÉTODOS | 15 |
| 2.1 Enfoque y diseño de investigación..... | 15 |
| 2.2 Población, muestra y muestreo(19) | 15 |
| 2.3 Variables de investigación..... | 15 |
| 2.4 Técnica e instrumento de recolección de datos | 16 |
| 2.5 Plan de recolección de datos | 16 |
| 2.6. Métodos de análisis estadísticos..... | 21 |
| 2.7 Aspectos éticos | 21 |
| III. RESULTADOS | 22 |
| IV. DISCUSIÓN | 28 |
| 4.1. Discusión de resultados | 28 |
| 4.2. Conclusiones..... | 31 |
| 4.3. Recomendaciones | 31 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 32 |

ÍNDICES DE TABLAS

| | Páginas |
|---|----------------|
| Tabla 1. Metabolitos secundarios presentes en el extracto metanólico de flores de <i>Nerium oleander</i> L. “laurel rosa”..... | 22 |
| Tabla 2. Formulación de la crema a base del extracto metanólico de flores de <i>Nerium oleander</i> L. “laurel rosa” y grupos control que muestran actividad antifúngica sobre <i>Candida albicans</i> ATCC 10231. | 23 |
| Tabla 3. Análisis de la Varianza (ANOVA) de los datos recolectados..... | 25 |
| Tabla 4. Análisis por sub grupos homogéneos mediante la prueba de Tukey | 26 |
| Tabla 5. Sensibilidad antifúngica de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 frente a las cremas a base del extracto metanólico de flores de <i>Nerium oleander</i> L. “laurel rosa” y los grupos control según la escala de Duraffourd..... | 27 |
| Tabla 6. Prueba de normalidad | 46 |
| Tabla 7. Prueba de homogeneidad de varianzas | 46 |

ÍNDICES DE FIGURAS

Páginas

| | |
|---|----|
| Figura 1. Actividad antifúngica sobre <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 de las cremas a base del extracto metanólico de flores de <i>Nerium oleander</i> L. “laurel rosa” a las concentraciones del 15%, 20% y 25% | 24 |
| Figura 2. Recolección de la especie vegetal | 47 |
| Figura 3. Selección y lavado de la muestra más adecuada | 48 |
| Figura 4. Secado de las flores de <i>Nerium oleander</i> L. “Laurel rosa” | 49 |
| Figura 5. Obtención del pulverizado de flores de <i>Nerium Oleander</i> L. “Laurel rosa” | 50 |
| Figura 6. Preparación del macerado y filtración | 51 |
| Figura 7. Obtención del extracto metanólico de <i>Nerium Oleander</i> L. “Laurel rosa” | 52 |
| Figura 8. Prueba de solubilidad..... | 53 |
| Figura 9. Estudio fitoquímico | 54 |
| Figura 10. Preparación de la formulación en crema..... | 55 |
| Figura 11. Preparación del inóculo..... | 56 |
| Figura 12. Preparación de pocitos en agar y aplicación de la crema | 57 |
| Figura 13. Incubación de los cultivos de <i>Candida albicans</i> | 58 |
| Figura: 14. Recolección de datos: Medida del halo de inhibición..... | 59 |

ÍNDICES DE ANEXOS

| | Páginas |
|---|----------------|
| Anexo A. Matriz de consistencia | 36 |
| Anexo B. : Operacionalización de variables | 38 |
| Anexo C. : Ficha de recolección de datos – Estudio Fitoquímico..... | 39 |
| Anexo D. : Ficha de recolección de datos – Microbiología..... | 40 |
| Anexo E. : Carta de presentación..... | 41 |
| Anexo F. : Carta de aceptación | 42 |
| Anexo G. : Certificado de clasificación taxonómica..... | 43 |
| Anexo H: Certificado de análisis de la cepa | 44 |
| Anexo I. : Determinación del comportamiento paramétrico de los datos..... | 46 |
| Anexo J. : Evidencias de la parte experimental | 47 |

RESUMEN

Objetivo: Determinar la actividad antifúngica que poseerá la crema a base del extracto metanólico de flores de *Nerium oleander* L. (laurel rosa) sobre a *Candida albicans* ATCC 10231

Materiales y métodos: La investigación se basó en un estudio de enfoque cuantitativo, explicativo, prospectivo, transversal de diseño experimental con dos grupos control, el positivo conformado por la crema terbinafina al 1% y el negativo por la crema base. La población vegetal estuvo conformada de *Nerium oleander* L. (laurel rosa), la obtención del extracto se realizó por maceración, el cual se incorporó a la crema base a las concentraciones del 15%, 20% y 25%. La actividad antifúngica se evaluó por medio de la técnica de difusión en pozos.

Resultados: Los resultados encontrados se evaluaron en base al tamaño del halo de inhibición para la crema al 15% se obtuvo $8,93 \pm 0,43$ mm, para la crema al 20% fue de $10,73 \pm 0,33$ mm; para la crema al 25% fue de $11,28 \pm 0,37$ mm; por su parte, los grupos control mostraron los siguientes valores, crema base (control negativo) de $6,11 \pm 0,33$ mm y terbinafina 1% (control positivo) de $23,46 \pm 0,42$ mm. Además, *Candida albicans* ATCC 10231 presentó sensibilidad nula a la crema base, fue sensible a las cremas elaboradas a base del extracto metanólico de flores de *Nerium Oleander* L. "Laurel rosa" en todas las concentraciones, y es altamente sensible a la terbinafina.

Conclusiones: La crema a base del extracto metanólico de flores de *Nerium oleander* L. (laurel rosa) presentaron actividad antifúngica sobre a *Candida albicans* ATCC 10231, pero fue menor en comparación con la crema terbinafina.

Palabras clave: Extracto metanólico, *Nerium oleander* L., laurel rosa, actividad antifúngica, *Candida albicans* ATCC 10231.

ABSTRACT

Objective: To determine the antifungal activity of the cream based on the methanolic extract of flowers of *Nerium oleander* L. (pink laurel) on *Candida albicans* ATCC 10231.

Materials and methods: The research was based on a quantitative, explanatory, prospective, cross-sectional study with an experimental design with two control groups, the positive group made up of 1% terbinafine cream and the negative group made up of the base cream. The plant population was made up of *Nerium oleander* L. (pink laurel), the extract was obtained by maceration, which was incorporated into the base cream at concentrations of 15%, 20% and 25%. The antifungal activity was evaluated by means of the well diffusion technique.

Results: The results found were evaluated based on the size of the inhibition halo for the 15% cream, $8.93 + 0.43\text{mm}$ was obtained, for the 20% cream it was $10.73 + 0.33\text{mm}$; for the 25% cream it was $11.28 + 0.37\text{mm}$; On the other hand, the control groups showed the following values: base cream (negative control) of $6.11 + 0.33\text{mm}$ and terbinafine 1% (positive control) of $23.46 + 0.42\text{mm}$. In addition, *Candida albicans* ATCC 10231 showed no sensitivity to the base cream, was sensitive to creams made from the methanolic extract of flowers of *Nerium oleander* L. "Laurel rosa" in all concentrations, and is highly sensitive to terbinafine.

Conclusions: The cream based on the methanolic extract of flowers of *Nerium oleander* L. (pink laurel) showed antifungal activity against *Candida albicans* ATCC 10231, but it was lower compared to the 1% terbinafine cream.

Keywords: Methanolic extract, *Nerium oleander* L., rose laurel, antifungal activity, *Candida albicans* ATCC 10231.

I. INTRODUCCIÓN

Las infecciones fúngicas tienen un gran impacto en la morbilidad y mortalidad humana, sin embargo, las consecuencias de estas enfermedades en la salud no han sido ampliamente evaluadas, además, a pesar de la necesidad urgente de pruebas diagnósticas efectivas, nuevos medicamentos y vacunas seguras y efectivas, los estudios de la fisiopatología de las infecciones fúngicas humanas terminan rezagados con respecto a las enfermedades causadas por otros patógenos. Los hongos más comunes que causan infecciones musculoesqueléticas son *Candida*, *Aspergillus*, hongos dimórficos (*Blastomyces*, *Coccidioides*, *Histoplasma*) y *Cryptococcus*, cuyos síntomas que producen a menudo son subagudos y pueden enmascarse como otros trastornos, lo que puede conducir a retrasos sustanciales en el tratamiento(1,2).

Las infecciones fúngicas, ya sean superficiales o sistémicas, están aumentando y afecta a casi 40 millones de personas en todo el mundo. Entre los patógenos que causan daños en la piel, las infecciones fúngicas son las más comunes, por ejemplo, la candidiasis es una infección fúngica causada por el hongo del género *Candida*, principalmente *Candida albicans* (que es el más común de ellos). Es importante señalar que este hongo vive naturalmente en nuestro cuerpo, en la piel, en el intestino, en la mucosa oral y en la microbiota vaginal, y que junto con las bacterias mantienen el pH ácido en la región íntima, entre 3,8-4,5(3).

La revista europea “Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas” publicó su estudio donde informó que más de 830 millones de personas de diferentes continentes sufren de infecciones dérmicas o sistémicas por hongos, las cuales suelen ser recurrentes, resistentes, crónicas y en algunos casos se desenlaza ocasionando la muerte de los pacientes(3,4).

En el Perú las estadísticas en salud muestran que *Candida albicans* es el principal agente fúngico responsable de las infecciones en las personas con el sistema inmunológico debilitado, con probabilidad de ocasionar una infección a nivel sistémico. Por otro lado, un estudio realizado en el área de odontología informó que cerca del 40% de la población pediátrica con caries a nivel nacional presenta *Candida albicans* al igual que en los adultos, que utilizan prótesis dentales(4–6).

Las plantas medicinales se han recetado durante mucho tiempo en varios países, durante siglos; sin embargo, existe poca información disponible de *Nerium oleander* L. (laurel rosa) bajo la formulación de crema, sobre su uso en infecciones fúngicas en la piel; por lo tanto, el estudio se centra en evaluar la actividad antifúngica de una crema formulada con *Nerium oleander* L. (laurel rosa).

Nerium oleander L. es una especie vegetal que pertenece a la familia Apocynaceae, la cual destaca por tener especies que son utilizadas a nivel mundial por las comunidades con diversos fines, especialmente como ornamentales y medicinales; está compuesta por cerca de 5.000 especies distribuidas en 400 géneros, la familia tiene representantes ampliamente utilizados en la medicina tradicional(7).

Nerium oleander L., también llamado laurel rosa, se cultiva en todo el mundo y es una de las plantas ornamentales más utilizadas. La especie también tiene un gran potencial medicinal, con registros de su uso en Brasil como expectorante, tónico cardíaco, diurético y emético, también se han informado dosis muy pequeñas de extracto de hojas para uso en mordeduras de serpientes, por otro lado, el extracto de flores de *N. oleander* L. tiene usos antinociceptivos y cardiotónicos. Además, tienen registros del uso de su corteza como catártico, febrífugo y fiebre intermitente, las semillas se utilizan como purgante en hidropesía y reumatismo. Toda la planta tiene propiedades anticancerígenas y se investigó su uso en este tratamiento, basándose en el uso popular de la planta en el tratamiento de callos, verrugas, úlceras cancerosas, carcinoma, tumores ulcerativos(8).

La actividad antifúngica del extracto de las partes florales de la especie también se observó frente a importantes hongos patógenos (*F. oxysporum*, *A. alternata*, *Fusarium solani* *Rizoctonia solani*). Así mismo, el compuesto cardenólido extraído de las raíces de *N. oleander*, mostró actividades antibacterianas, los extractos de las raíces y hojas de la planta mostraron resultados efectivos contra bacterias y hongos, también se comprobó la actividad antimicrobiana de los extractos del tallo de la planta, contra *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis*. Por otro lado, el aceite esencial extraído de las flores de *N. oleander* mostró potencial antibacteriano contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*(9).

Existe alrededor de 5 millones de especies de hongos, de este gran número, solo unos pocos cientos de especies causan enfermedades en los humanos,

desafortunadamente *Candida albicans* es la especie fúngica más prevalente que crece como patógeno comensal u oportunista en el huésped humano, se asocia con muchas infecciones potencialmente mortales, especialmente en personas inmunodeprimidas. El genoma de *Candida albicans* es muy flexible y puede soportar una amplia gama de variaciones en un entorno en constante cambio, por lo tanto, la plasticidad del genoma es fundamental para su adaptación y durante mucho tiempo ha sido de gran interés; *C. albicans* tiene un genoma heterocigoto diploide que es muy dinámico y puede mostrar variaciones de reordenamiento cromosómico y aneuploidía de pequeña a gran escala, lo que tiene implicaciones en la resistencia a los medicamentos, la virulencia y la patogenicidad(11).

Los antecedentes nacionales que se relacionan con nuestro estudio citan a los autores tales como, **Chumacero P. y León E. (2021)**, quienes tuvieron como objetivo principal “determinar la actividad contra *Escherichia coli* del extracto de etanol y extracto de metanol de la especie *Nerium oleander*”. Para su ejecución los extractos se prepararon a través de la maceración y posterior filtrado, por otra parte, la actividad bacteriana se evaluó por difusión en disco o llamado también Kirby-Bauer. El extracto etanólico a una concentración del 75% formó una zona inhibitoria de 18.9mm y el extracto con metanol al 100% formó una zona de inhibición de 21mm, confirmando la actividad antibacteriana de ambos extractos de *Nerium oleander* sobre *E. coli*(12).

Asimismo, **Rojas R. (2019)**, por medio de su tesis evaluó el efecto in vitro de un decocto a base de *Nerium oleander* sobre larvas de *Spodoptera frugiperda*, para formular el decocto las hojas de *Nerium oleander* fueron hervidas en agua (1 litro por cada 20 granos de hojas), luego se obtuvieron concentraciones de 0.5%, 1%, 1.5% y 2%. En los resultados se observó que el tratamiento en una concentración al 2% sobre las larvas disminuyó su viabilidad en un 40%, produciendo una muerte del 60%. Se confirma el efecto larvicida in vitro del decocto de hojas de *Nerium oleander*(13).

Por su parte, **Quintanilla C, Guerreño J (2018)**, establecieron por objetivo en su estudio, determinar el efecto anti *Staphylococcus aureus* y anti *Escherichia coli* in vitro de un extracto de etanol a base de las hojas de *Vallesia glabra* (cun cun). Para la ejecución de la tesis la técnica empleada para obtener el extracto de la planta fue

por maceración en frío, posteriormente se disolvió el extracto hasta llegar a una concentración del 10%, 20%, 30%, 50% y 100% para inocularlos en las placas cultivadas con las bacterias, adicionalmente el control negativo fue el etanol y el positivo fue gentamicina, para evaluar la sensibilidad de las bacterias se aplicó la técnica de Kirby-Bauer. Se concluyó que el extracto etanólico de hojas de *Vallesia glabra* inhibió a *Staphylococcus aureus*, más no a *Escherichia coli*(14)

Por otro lado, **Fernández H. (2016)**, por medio de su investigación tuvo por objetivo evaluar la actividad rodenticida del laurel rosa (*Nerium oleander*) a diferentes concentraciones, en el estudio se elaboró una pasta con maíz y hojas secas de *Nerium oleander* (laurel rosa) a las concentraciones de 10%, 20%, 30%, 40% y 50%, se alimentó a ratas por 10 días con este preparado y observo el efecto. Los resultados mostraron que *Nerium oleander* (laurel rosa) posee un efecto letal sobre esto roedores a las concentraciones del 30%, 40% y 50%, concluyendo el estudio que la especie vegetal tiene un efecto rodenticidas en las preparaciones con concentración superior a 30%(15).

De la misma forma, citaremos como antecedentes internacionales a los autores **Dos Santos A. et al (2022)**, quienes ejecutaron un estudio sistemático para conocer la actividad terapéutica de tres plantas medicinales como: *A. cathartica*, *C. roseus* y *Nerium oleander*. Después de seleccionar varios artículos científicos se analizó que dichas plantas presentan efecto antiparasitario, antifebril, laxante, purgante, regenerador epitelial, antiséptico, expectorante, diurético y antiemético. Por lo tanto, estas plantas pertenecientes a la familia Apocynaceae presenta varias acciones terapéuticas(16).

Por su parte, **Ayumi, I. (2021)**, quien definió como objetivo desarrollar un extracto etanólico con efecto antifúngico a partir del látex de *Euphorbia sp* y las hojas *Nerium oleander*. Para su desarrollo se utilizó un moho del género *Rhizopus* que crece habitualmente en el pan, este moho se cultivó en placas Petri con agar y el extracto fue inoculado en dicho cultivo. Ambas especies vegetales mostraron un efecto antifúngico retrasando el crecimiento y eliminando a los hongos(17).

Además, **Esmail, A. (2020)**, investigó los “principios activos y efectos farmacológicos de *Nerium oleander*”. A través de una evaluación fitoquímica se mostró que *Nerium oleander* presenta metabolitos como taninos, saponinas,

alcaloides, flavonoides, fenoles, cardenólidos, glucósidos cardíacos, triterpenoides, triterpenos y esteroides. El efecto antimicrobiano del aceite esencial de *N. oleander* fue evaluado en bacterias grampositivas y gramnegativas, levaduras y mohos, evidenciándose varios grados del efecto antimicrobiano sobre los microorganismos utilizados, la concentración mínima inhibitoria fue de 125 a 500 y 250 a 2000 ug/μl para bacterias y hongos respectivamente. Finalmente, la investigación concluye que *Nerium oleander* presenta actividad farmacológica para combatir varios microorganismos(18).

De esta manera, el presente estudio enmarca su investigación en el estudio de principios antimicóticos de *Nerium oleander* L., específicamente sobre *Candida albicans* por su alto poder infectivo y su elevada resistencia antimicótica, iniciando la búsqueda de nuevos principios a partir de esta planta, que ayuden al tratamiento de estas enfermedades o sean complementarios al tratamiento farmacológico mediante la elaboración de una formulación farmacéutica que permita la aplicabilidad del principio.

El estudio planteado se enfoca en la problemática ocasionada por enfermedades cuyo agente etiológico es *Candida albicans* el cual produce la enfermedad conocida como candidiasis, que afecta de forma recurrente y habitual a la población, además, de la resistencia que este microorganismo presenta frente a un tratamiento farmacológico convencional, por lo mismo, de demostrarse la actividad antifúngica de una formulación magistral (crema) a base del extracto metanólico de las flores de *Nerium oleander* L. "laurel rosa" permitiría al área de salud tomar como alternativa natural el uso de esta crema en afecciones por candidiasis, asimismo, se reducirían los niveles de resistencia del microorganismo y el costo del tratamiento sería económicamente más accesible

Por otro lado, el objetivo general establecido en la presente investigación es determinar la actividad antifúngica que poseerá la crema a base del extracto metanólico de flores de *Nerium oleander* L. (laurel rosa) sobre a *Candida albicans* ATCC 10231.

La hipótesis principal que se ha planteado en la presente investigación es la siguiente: La crema a base del extracto metanólico de flores de *Nerium oleander* L. (laurel rosa) presenta actividad antifúngica frente a *Candida albicans* ATCC 10231.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Enfoque y diseño de investigación

La investigación se centró en un análisis cuantitativo, basado en el estudio estadístico de las variables, además correspondió a un estudio prospectivo y transversal al momento de realizar la recolección de los datos; por tanto, el diseño del estudio fue experimental(19).

2.2 Población, muestra y muestreo(20)

La **población vegetal** estuvo conformada por 5 Kg de planta (incluyendo flores y ramas) de *Nerium oleander* L. "laurel rosa" recolectada en el distrito de Pimentel, del departamento de Lambayeque ubicada a 6.78° de latitud Sur y 79.88° de longitud Oeste.

La **población biológica** estuvo representada por la cepa microbiológica de *Candida albicans* ATCC 10231 de la empresa Gen Lab Perú.

La **muestra** se conformó por 2 Kg, de flores de *Nerium oleander* L. "laurel rosa" la cual cumplió los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

Criterios de inclusión:

- De estar en estado fresco, recién recolectada
- No debe mostrar signos de contaminación o deterioro mecánico
- Debe haber sido identificada por un profesional botánico
- De un solo tamaño

Criterios de exclusión:

- Los cultivos no deben haber sido tratados con plaguicidas
- La especie vegetal solo debe corresponder al lugar de recolección indicado
- No se puede emplear otro tipo de especie o variedad de la planta

El **tipo de muestreo** por la cercanía al sitio de recolección y la facilidad de obtención del permiso para la extracción corresponde al no probabilístico por conveniencia.

2.3 Variables de investigación

Variable independiente

Extracto metanólico de flores de *Nerium oleander* L. (laurel rosa) en crema a diferentes concentraciones

Definición conceptual: Preparado farmacéutico en crema conformado por principios activos de *Nerium oleander* L

Definición operacional: Elaboración de crema base con agregado de extracto metanólico de *Nerium oleander* L.

Variable dependiente

Actividad antifúngica sobre *Candida albicans* ATCC 10231.

Definición conceptual: Inhibición en el crecimiento del hongo por acción antifúngica del preparado farmacéutico(21).

Definición operacional: Medición del diámetro del halo de inhibición formado en cultivos de *Candida albicans*

2.4 Técnica e instrumento de recolección de datos

Técnica:

- Maceración: Fermentación en solventes polares o medianamente polares de una muestra vegetal por determinado tiempo, extrayendo por acción física los componentes de la planta al solvente(22).
- Difusión en pozo: Método comúnmente empleado para determinar o medir la acción de una sustancia sobre un tipo de microorganismos específico, mediante la acción directa de la sustancia con el cultivo microbiológico(23).

Instrumento de recolección:

- Ficha de recolección de datos
- Instrumento de medición digital

2.5 Plan de recolección de datos

2.5.1. Autorización y coordinaciones previas para la recolección de datos

Previo al inicio de los procedimientos se coordinó con el propietario del terreno de cultivo confirmando su aceptación mediante un documento escrito (anexo F), luego se procedió a recolectar la muestra vegetal por la mañana.

Se recolectó una muestra integra para realizar identificación botánica por el especialista botánico, quien emitió un certificado de clasificación botánica (anexo G).

2.5.2. Recolección de la muestra vegetal

Se recolectó aproximadamente 5 kg de la planta las cuales que luego de la selección mediante criterios de inclusión y exclusión se emplearon 2 kilogramos de flores, posteriormente se procedió a lavar con abundante agua destilada para luego ser desinfectadas con lejía (0.5%) por 5 minutos y finalmente se enjuagaron.

Luego se colocaron las flores sobre papel kraft en una mesa a temperatura ambiente y bajo sombra, se dejó secar por 24 horas y posteriormente se llevó a una estufa eléctrica para su desecado completo, luego se trozaron en partículas pequeñas y pulverizó mediante un molino de cuchillas, el pulverizado obtenido fue tamizado para uniformizar las partículas del polvo.

2.5.3. Preparación del extracto metanólico de flores de *Nerium oleander* L. (laurel rosa):

El pulverizado obtenido se colocó en un frasco de color oscuro para evitar el paso de la luz de 4 litros de capacidad luego se agregó metanol (1 litro) y dejó en maceración por un periodo de tiempo de 10 días, con agitación de 5 minutos cada 12 horas para uniformizar la mezcla.

Luego de este tiempo se filtró y lo que se obtuvo fue colocado en una estufa eléctrica para evaporar el solvente, el producto obtenido se consideró el extracto seco de las flores, se obtuvo aprox. 28,9gr de extracto seco. Seguido se realizó las disoluciones al 100% (4mg de extracto seco con 4ml de metanol), 75% y 50%.

2.5.4 Marcha fitoquímica

El procedimiento aplicado para la determinación de los metabolitos de la planta se tomó del estudio realizado por Lozano N. (2015)(24), el cual se desarrolló de la siguiente forma:

Alcaloides: Se empleó la reacción de Dragendorff donde en un tubo de ensayo se agregó 1 ml del extracto y posteriormente se agregó 1 ml de ácido clorhídrico al 1%, se llevó a calor directo por 2 minutos y luego se enfrió y agregó 3 gotas del reactivo de Dragendorff. Un precipitado naranja ladrillo indica una reacción positiva.

Taninos y compuestos fenólicos: Se agregó 1 ml del extracto y luego adicionó 3 gotas del reactivo de cloruro férrico. La coloración rojo-vino evidencia la existencia de compuestos fenólicos, un color verde intenso demuestra la existencia de taninos pirocatecólicos, un color azul evidencia la existencia de taninos pirogaláctonicos.

Saponinas: Se colocó 1 ml del extracto y agregó 4 ml de agua destilada, se mezcló vigorosamente por 2 minutos, luego se observó si existe presencia de espuma con 2 mm de espesor y permanencia por más de 2 minutos, lo que indicaría la presencia de saponina.

Flavonoides: Se agregó 1 ml de la muestra en un tubo de ensayo y luego se agregó 1 ml de HCl cc, se llevó a calor directo por 10 minutos, luego se dejó enfriar y se agregó 1 ml de H₂O destilada y 2 ml de alcohol isoamílico, la formación de una coloración roja a marrón en la zona del alcohol es una prueba de la presencia de flavonoides.

Aminoácidos: En un tubo de vidrio con 1 ml del extracto se agregó 3 gotas de reactivo de Ninhidrina, luego se llevó a baño maría (45°C) por 10 min. luego se retiró y dejó enfriar, la aparición de un color azul-violeta confirma la existencia de aminoácidos.

Aminoácidos azufrados: En un tubo de vidrio con 1 ml del extracto se agregó 3 gotas de reactivo de acetato de plomo, se agito por 1 minutos y se dejó reposar por 5 minutos, la formación de un precipitado blanco lechoso indica la presencia de aminoácidos azufrados.

Mucilago: Una alícuota de 2ml del extracto se llevó a una temperatura de 0 a 5°C por un tiempo de 10 minutos, luego de los cuales se retiró y observo la presencia de una consistencia gelatinosa, que indicará la presencia de mucilago.

Quinonas: A 1ml del extracto se agregó 1 ml de cloroformo se mezcló totalmente y luego agregó 1 ml de NaOH y nuevamente se agito, se dejó reposar por 10 minutos hasta identificar la separación de dos fases, la formación de una coloración rosado-roja indica en la fase acuosa, indica la presencia de quinonas.

Triterpenos y Esteroides: Se empleó el método de Liebermann-Burchard, a una alícuota de 1 ml del extracto se agregó 0.5 ml de ácido acético glacial y luego 5 gotas de H₂SO₄ concentrado por la pared del tubo de ensayo sin agitar, la formación rápidamente de un color rosado-rojo que cambia azul o azul verdoso luego indica la presencia de estructuras esteroidales, la formación de un color rosado-rojo que cambia a verde intenso o verde oscuro indica la presencia de estructuras esteroidales.

2.5.5. Elaboración de la crema formulada a base del extracto metanólico de las flores *Nerium oleander* L. (laurel rosa):

Para su elaboración, primero se obtuvo la crema base, para lo cual se pesaron los insumos para la fase oleosa, alcohol cetílico 3.75g más la cera blanca de abejas 0.25g y se mezclaron en baño maria hasta formar una mezcla lechosa; a continuación la fase acuosa que consta del propilenglicol 1.25g y lauril sulfato de sodio 0.5g se mezcla en otro recipiente a baño maria. Para formar la crema se incorpora la fase acuosa en la fase oleosa con agitación moderada hasta lograr una homogenización de las fases y obtener la crema base.

Para la preparación de la crema con extracto metanólico de las flores de *Nerium oleander* L.(laurel rosa), a la crema base se incorpora la disolución del extracto seco al 100% y seguidamente se mezcló con una espátula para uniformizar la crema. De esa forma se obtuvo las cremas a las concentraciones del 15 %, 20% y 25% respectivamente.

Fórmula:

| | |
|-----------------------------|-------|
| Alcohol cetílico..... | 3.75g |
| Cera blanca de abejas | 0.25g |
| Propilenglicol..... | 1.25g |

Lauril sulfato de Sodio0.5g
Agua conservantecsp. 25g

2.5.6. Reactivación de la cepa de *Candida albicans*(25):

Para la reactivación de la cepa de *Candida albicans* proporcionada por la empresa distribuidora Gen Lab. del Perú, el cual vino en la presentación de un sachet con el liofilizado de la cepa, se siguieron los protocolos convencionales brindados por el proveedor para la activación, para lo cual se dejó a temperatura ambiente por 2 horas, luego se abrió el sachet y mezcló el liofilizado con agua estéril, se retiró con un hisopo el contenido de la cepa y se aplicó a dos placas Petri con agar Sabouraud e incubó por 48 horas.

Luego de transcurrido este tiempo se evidenció la formación de colonias y retiró con un hisopo estéril dos colonias del cultivo para re-suspenderlo en agua destilada, se hicieron diluciones sucesivas 1:10 hasta obtener una concentración bacteriana de 1.5×10^8 UFC, mediante la comparación con la escala de McFarland 0.5.

El inóculo obtenido se empleó para realizar los sembrados en placas con agar Mueller Hinton.

2.5.7. Evaluación de actividad antimicótica de las flores *Nerium oleander* L. (laurel rosa):

- a) Se realizó un sembrado en superficie del inóculo mediante la técnica en estrías en 30 placas con agar Mueller Hinton
- b) Se prepararon con un sacabocado 3 pocitos (6 mm de diámetro) en 15 placas con cultivo y en 15 placas 2 pozos del mismo diámetro, mediante el siguiente procedimiento:
 - En las placas con 3 pocitos se colocaron 20 ul de la crema de extracto metanólico (grupo experimental) al 15 %, 20% y 25% respectivamente
 - En las placas con 2 pocitos se colocaron 20 µl de la crema base y 20 µl de terbinafina respectivamente

- Las placas se incubaron por 24 horas a una temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5$; luego de este tiempo se identificó el crecimiento del microorganismo y los halos de inhibición formados, luego se procedió a realizar la recolección de datos mediante la medición de la zona de inhibición con el instrumento de medición digital (vernier), registrando los datos obtenidos en la ficha de datos.

Nuestra investigación se realizó en el laboratorio MICROCLIN, sucursal-Chiclayo.

2.6. Métodos de análisis estadísticos

En el análisis de los datos recolectados se emplearon los programas Microsoft Excel 2016 y el SPSS versión 26, para obtener los parámetros estadísticos y representar los datos mediante tablas y figuras, además se realizaron las pruebas estadísticas de normalidad y homogeneidad de varianzas para posteriormente aplicar las pruebas de contrastación de ANOVA y Tukey con una significancia de 0,05.

2.7 Aspectos éticos

Se consideraron los principios éticos de todo trabajo de investigación, evitando el riesgo de daño a los que participaron en el estudio mediante las medidas de bioseguridad y tratamiento de residuos sólidos para evitar el daño al medio ambiente, por otro lado el principio de veracidad, confirmando que los resultados obtenidos son verídicos y sometiéndonos a las pruebas de plagio que establece la Universidad, así mismo, los autores son los únicos responsables de la información que está contenida en el presente estudio.(26,27)

III. RESULTADOS

Tabla 1. Metabolitos secundarios presentes en el extracto metanólico de flores de *Nerium oleander* L. “laurel rosa”.

| IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS | | |
|---|---------------------|-----------|
| Metabolitos Secundarios | Reactivos | Resultado |
| Quinonas | Borntrager | - |
| Compuestos fenólicos | FeCl ₃ | +++ |
| Flavonoides | Shinoda | ++ |
| Mucílagos | | - |
| Taninos | FeCl ₃ | + |
| Alcaloides | Dragendorff | ++ |
| Triterpenos / Esteroides | Liebermann Burchard | ++ |
| Aminoácidos | Ninhidrina | - |
| Aminoácidos azufrados | Acetato de plomo | - |
| Saponinas | Espuma | - |

Leyenda:

| | |
|-----------|--------|
| Ausente | (-) |
| Escaso | (+) |
| Leve | (++) |
| Moderado | (+++) |
| Abundante | (++++) |

Interpretación:

En la tabla 1 se muestra el resultado de la marcha fitoquímica obtenida al exponer el extracto metanólico de las flores de *Nerium oleander* L. “laurel rosa” a diferentes reactivos los cuales al reaccionar con los metabolitos muestran cambios de coloración, precipitado, turbidez, entre otros; los metabolitos secundarios encontrados fueron compuestos fenólicos, flavonoides, taninos, alcaloides y triterpenos.

Tabla 2. Formulación de la crema a base del extracto metanólico de flores de *Nerium oleander* L. “laurel rosa” y grupos control que muestran actividad antifúngica sobre *Candida albicans* ATCC 10231.

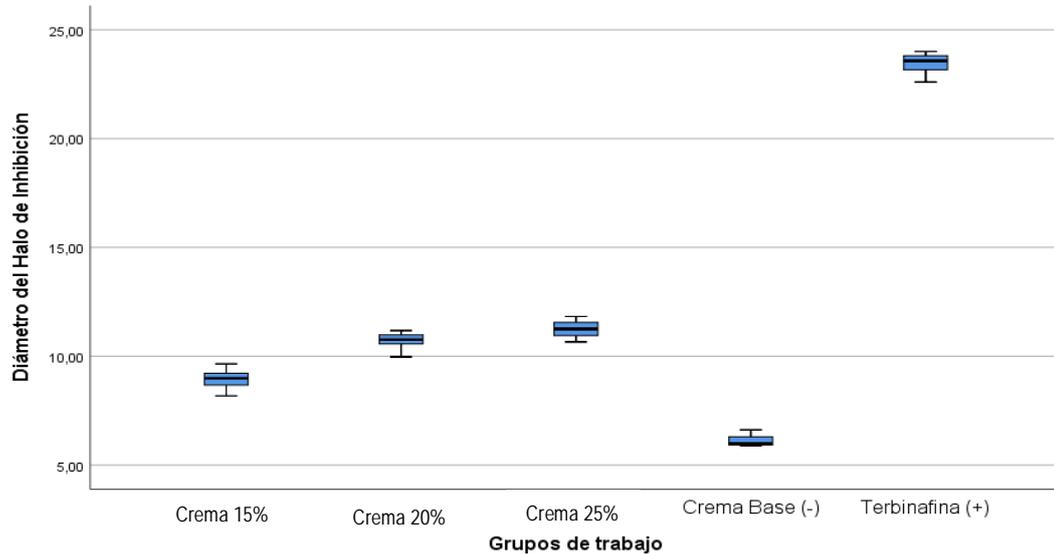
| Diámetro del halo de inhibición (mm) | | | | | | | | |
|--------------------------------------|----|-------|----------------|----------------|------------------------------------|-----------------|--------|--------|
| | N | Media | Desv. Estándar | Error Estándar | 95% Intervalo de confianza para la | | | |
| | | | | | Media | | Mínimo | Máximo |
| | | | | | Límite inferior | Límite superior | | |
| Crema al 15% | 15 | 8,93 | 0,43 | 0,11 | 8,69 | 9,17 | 8,18 | 9,65 |
| Crema al 20% | 15 | 10,73 | 0,33 | 0,09 | 10,54 | 10,91 | 9,97 | 11,18 |
| Crema al 25% | 15 | 11,28 | 0,37 | 0,10 | 11,07 | 11,49 | 10,66 | 11,83 |
| Crema Base (-) | 15 | 6,11 | 0,33 | 0,06 | 5,98 | 6,24 | 5,90 | 6,62 |
| Terbinafina (+) | 15 | 23,46 | 0,42 | 0,11 | 23,23 | 23,70 | 22,60 | 24,00 |

Fuente: Elaboración propia

Interpretación:

Los estadísticos obtenidos con respecto a la actividad antifúngica relacionada con el diámetro de la zona de inhibición formada sobre el cultivo de *Candida albicans* ATCC 10231, por las cremas elaboradas a base de *Nerium oleander* L. (laurel rosa) a las concentraciones del 15%, 20% y 25%; así mismo, para la crema base (control negativo) y control positivo (terbinafina), se muestran en la tabla 2, los estadísticos presentados son la media, desviación estándar, error estándar, el intervalo de confianza con respecto a la media con un nivel de confianza del 95% y los valores máximo y mínimo encontrados para cada grupo de datos como se muestra en la tabla, los valores obtenidos para la crema al 15% fue de $8,93 \pm 0,43$ mm, para la crema al 20% fue de $10,73 \pm 0,33$ mm; para la crema al 25% fue de $11,28 \pm 0,37$ mm; por su parte, los grupos control mostraron los siguientes estadísticos, crema base (control negativo) de $6,11 \pm 0,33$ mm y terbinafina (control positivo) de $23,46 \pm 0,42$ mm.

Figura 1. Actividad antifúngica sobre *Candida albicans* ATCC 10231 de las cremas a base del extracto metanólico de flores de *Nerium oleander* L. “laurel rosa” a las concentraciones del 15%, 20% y 25%



Fuente: Elaboración propia

Los datos obtenidos con respecto a la media y desviación estándar se muestran en la figura 1, donde nos permite apreciar valores más altos en los diámetros de los halos de inhibición de los grupos experimentales (crema a base de *Nerium oleander* L. (laurel rosa) a las concentraciones del 15%, 20% y 25%;) con respecto al control negativo, lo que demuestra la presencia de actividad antifúngica, así mismo, al comparar con el grupo control positivo se observa que este último presenta mayor actividad antifúngica.

Tabla 3. Análisis de la Varianza (ANOVA) de los datos recolectados

| Diámetro del halo de inhibición | | | | | |
|---------------------------------|-------------------|----|-------------------|----------|----------|
| | Suma de cuadrados | df | Media al cuadrado | F | p-valor. |
| Entre grupos | 2664,574 | 4 | 666,144 | 4984,335 | 0,000 |
| Dentro de grupos | 9,355 | 70 | 0,134 | | |
| Total | 2673,930 | 74 | | | |

Fuente: SPSS ver. 26

Análisis:

En la tabla 3, se observa mediante el análisis de la varianza (ANOVA), en el cual realizó una comparación de los valores promedio de los halos de inhibición entre grupos de tratamiento para determinar diferencias entre sus valores, en tal sentido, el análisis estadístico devuelve un valor $p < 0,05$; existiendo diferencia estadísticamente significativa entre los valores promedio de los halos de inhibición de los grupos.

Conclusión:

Los valores promedio de los halos de inhibición de los distintos grupos de datos presentan diferencias estadísticamente significativas entre sí; es decir, los grupos analizados presentan diferente actividad antifúngica.

Además, un valor $p < 0,05$ rechaza la hipótesis nula (H_0) y acepta la hipótesis alterna (H_1), donde se afirma que si presenta actividad antifúngica la crema a base del extracto metanólico de flores de *Nerium oleander* L. "laurel rosa" frente a *Candida albicans* ATCC 10231.

Así mismo se muestra, los valores obtenidos para los halos de inhibición de las cremas a base del extracto metanólico de flores de *Nerium oleander* L. "laurel rosa" a sus diferentes concentraciones (observar tabla 2), donde se evidencia que la crema con extracto metanólico de flores de *Nerium oleander* L. "laurel rosa" al 15% presenta un halo de inhibición de $8,93 \pm 0,43$ mm, para la crema con extracto metanólico de flores de *Nerium oleander* L. "laurel rosa" al 20% presenta un halo de inhibición de $10,73 \pm 0,33$ mm y para la crema con extracto metanólico de flores de *Nerium oleander* L. "laurel rosa" al 25% presenta un halo de inhibición de $11,28 \pm 0,37$ mm. Estos resultados en comparación con la crema base (control negativo)

que presento un halo de inhibición de $6,11 \pm 0,33\text{mm}$; evidencia que las cremas con extracto metanólico de flores de *Nerium oleander* L. “laurel rosa” a sus diferentes concentraciones tiene mayor actividad antifúngica frente a *Candida albicans* ATCC10231 (observar tabla 4).

Por otro lado, los resultados de los halos de inhibición de las cremas a base del extracto metanólico de flores de *Nerium oleander* L. “laurel rosa” en todas sus concentraciones (15%, 20% y 25%) comparados con los parámetros en la escala de Duraffourd (observar tabla 5), refuerza la aceptación de H1 en nuestra investigación porque se evidencia claramente la sensibilidad presente en *Candida albicans* ATCC 10231 a las cremas a base del extracto metanólico de flores de *Nerium oleander* L. “laurel rosa” en todas sus concentraciones (15%, 20% y 25%).

Hipótesis de contrastación:

H1: La crema a base del extracto metanólico de flores de *Nerium oleander* L. “laurel rosa” si presenta actividad antifúngica frente a *Candida albicans* ATCC 10231.

H0: La crema a base del extracto metanólico de flores de *Nerium oleander* L. “laurel rosa” no presenta actividad antifúngica frente a *Candida albicans* ATCC 10231.

Tabla 4. Análisis por sub grupos homogéneos mediante la prueba de Tukey

| Diámetro de inhibición | | | | | | |
|------------------------|----|------------------------------|------|-------|-------|-------|
| HSD Tukey ^a | | | | | | |
| Grupos de trabajo | N | Subconjunto para alfa = 0.05 | | | | |
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Crema Base (-) | 15 | 6,11 | | | | |
| Crema al 15% | 15 | | 8,93 | | | |
| Crema al 20% | 15 | | | 10,73 | | |
| Crema al 25% | 15 | | | | 11,28 | |
| Terbinafina (+) | 15 | | | | | 23,46 |

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

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 15,000.

Fuente: SPSS ver. 26

Análisis:

En la tabla 4, se muestra el análisis estadístico de la prueba de Tukey, la cual se basa en un análisis similar comparativo de los grupos de datos, pero a diferencia de la prueba de ANOVA, esta prueba devuelve la comparación por pares y permite determinar la actividad antifúngica entre todos los grupos de datos; de la tabla se observa que los valores promedios de los grupos de tratamientos son diferentes todos entre sí, correspondiente mayor actividad antifúngica a la crema terbinafina empleada como grupo control positivo.

Tabla 5. Sensibilidad antifúngica de *Candida albicans* ATCC 10231 frente a las cremas a base del extracto metanólico de flores de *Nerium oleander* L. “laurel rosa” y los grupos control según la escala de Duraffourd

| Tratamiento | Sensibilidad nula | Sensible | Muy sensible | Altamente sensible |
|-----------------|-------------------|----------|--------------|--------------------|
| | ≤ 8 mm | 8–14 mm | 15-20 mm | > 20 mm |
| Crema Base (-) | 6,11 | | | |
| Crema al 15% | | 8,93 | | |
| Crema al 20% | | 10,73 | | |
| Crema al 25% | | 11,28 | | |
| Terbinafina (+) | | | | 23,46 |

La sensibilidad antifúngica de *Candida albicans* ATCC 10231 frente a las cremas a base del extracto metanólico de flores de *Nerium oleander* L. “Laurel rosa” y los grupos control se muestra en tabla 5, las que fueron valoradas tomado como referencia la escala de Duraffourd; se aprecia que la crema base (control negativo) presentó sensibilidad nula, se observa también que el hongo es sensible a las cremas elaboradas a base del extracto metanólico de flores de *Nerium oleander* L. “Laurel rosa” a todas las concentraciones, y es altamente sensible a la terbinafina (control positivo).

IV. DISCUSIÓN

4.1. Discusión de resultados

La ineffectividad de los tratamientos farmacológicos, por el uso repetitivo de los mismos. En infecciones causadas por *Candida Albicans* es la razón de esta investigación, decidiendo así elaborar una crema de uso tópico con actividad antifúngica mediante la incorporación de los principios activos obtenidos de las flores de *Nerium oleander* L. “Laurel rosa”. Cuyos resultados hallados se discuten a continuación:

Con respecto al primer objetivo se identificó en el extracto metanólico de flores de *Nerium oleander* L. “laurel rosa” compuestos fenólicos (+++), flavonoides (++) , taninos (+), alcaloides (++) y triterpenos (++) luego del estudio fitoquímico realizado, estos resultados se corroboran con los encontrados por **Esmail, A. (2020)**, quien realizó un estudio fitoquímico de las hojas de *Nerium oleander* y pudo identificar alcaloides, flavonoides, taninos, fenólicos, saponinas, cardenólidos, glucósidos cardíacos, triterpenoides, triterpenos y esteroides resultados que se muestran similares a los encontrados en el estudio fitoquímico de esta investigación, a estos principios activos se les atribuye actividad antimicrobiana y farmacológica de esta planta.

Con respecto al segundo objetivo, se evidenció actividad antifúngica sobre *Candida albicans* ATCC 10231 de las cremas a base del extracto metanólico de flores de *Nerium oleander* L. “laurel rosa” a las concentraciones del 15%, 20% y 25% mediante la formación de halos de inhibición para la crema al 15% de $8,93 \pm 0,43\text{mm}$, para la crema al 20% de $10,73 \pm 0,33\text{mm}$; para la crema al 25% de $11,28 \pm 0,37\text{mm}$; superior al del control negativo empleado (crema base) de $6,11 \pm 0,33\text{mm}$. Del mismo modo, **Chumacero P. y León E. (2021)**, evaluaron el efecto antibacteriano de los extractos etanólicos y metanólicos de *Nerium oleander* sobre *Escherichia coli* obteniendo halos de inhibición para el extracto metanólico al 100% de las hojas de la planta de 21.040mm, estos valores si bien es cierto superan los resultados obtenidos, se debe valorar el hecho de encontrar actividad antimicrobiana en los

extractos de esta planta, además de considerar que el estudio trabajo bajo una formulación farmacéutica.

Como tercer objetivo, se confirmó que todas las cremas elaboradas al 15%, 20% y 25% poseen actividad antifúngica contra *Candida albicans* ATCC 10231, lo que se demuestra en la figura 1, al observar la diferencia en los tamaños de los halos de inhibición de los grupos experimentales con el control negativo. Por otro lado, **Rojas R. (2019)**, también evaluó el efecto del decocto de *Nerium oleander* sobre larvas III de *Spodoptera frugiperda* in vitro observando que poseen propiedades o principios activos contra estas larvas, así mismo, **Fernández H. (2016)**, observó que esta planta tiene la capacidad de combatir plagas, por tal motivo, evaluó la actividad rodenticida del laurel rosa (*Nerium oleander*) a diferentes concentraciones, los resultados mostraron que *Nerium oleander* (laurel rosa) posee un efecto letal sobre estos roedores a las concentraciones del 30%, 40% y 50%.

Dos Santos A. et al (2022), por su parte evaluó el poder de esta planta mediante una revisión sistémica de diferentes estudios, evidenciando que esta es utilizada para la parasitosis, fiebre, laxante, purgante, antiséptico, cicatrizante, antihemorrágico, expectorante, antídoto en mordedura de serpientes, diurético y emético lo que demuestra sus propiedades medicinales, por lo que, son una fuente de metabolitos con interés farmacológico.

Es reconocida la actividad que presenta los extractos de esta planta en diferentes formulaciones, lo que se debe principalmente a sus principios activos, los que permanecen sin cambio al ser preparados de distinta manera o mezclados con otros componentes, lo que la hace una especie vegetal prometedora en distintos campos.

Con respecto al cuarto objetivo, luego de realizar la comparación de la actividad antifúngica de las cremas elaboradas a base del extracto metanólico de flores de *Nerium oleander* L. "laurel rosa" con terbinafina sobre *Candida albicans* ATCC 10231 se evidencia que estas presentan menor efecto antifúngico que la crema terbinafina empleada como control positivo.

Por su parte, **Ayumi, I. (2021)**, desarrolló una solución antimicótica a partir de las hojas de *Nerium oleander*, para combatir un microorganismo (moho) que crece en el pan, demostrando que esta planta presenta actividad frente a este microorganismo, retrasando la aparición de hongos y eliminándolos, pero determinó que dicho preparado tiene menor acción que los productos comerciales del mercado, sin embargo, es una buena alternativa natural. En ambos estudios se muestra que una formulación a base de especies vegetales no llega a tener el mismo efecto que un producto comercial el cual está elaborado a base de componentes químicos que producen daño también al medio ambiente o representan riesgo para los manipuladores, lo que no sucede con los productos naturales.

Con respecto al quinto y último objetivo, se evaluó la sensibilidad antifúngica de *Candida albicans* ATCC 10231 frente a las cremas a base del extracto metanólico de flores de *Nerium oleander* L. “laurel rosa” y los grupos control mediante la valoración del tamaño de los halos de inhibición empleando la escala de Duraffourd, donde se pudo observar que *Candida albicans* ATCC 10231 frente a la crema base (control negativo) presentó sensibilidad nula, se observa también que el hongo es sensible a las cremas elaboradas a base del extracto metanólico de flores de *Nerium oleander* L. “Laurel rosa” a todas las concentraciones, y es altamente sensible a la terbinafina (control positivo)

4.2. Conclusiones

1. Se determinó actividad antifúngica sobre *Candida albicans* ATCC 10231 en las cremas a base del extracto metanólico de flores de *Nerium oleander* L. "laurel rosa" a las concentraciones del 15%, 20% y 25% mediante la formación de halo de inhibición de $8,93 \pm 0,43\text{mm}$; $10,73 \pm 0,33\text{mm}$ y $11,28 \pm 0,37\text{mm}$ respectivamente.
2. Se identificaron los metabolitos secundarios como compuestos fenólicos (+++), flavonoides (++) , taninos (+), alcaloides (++) y triterpenos (++) en el extracto metanólico de flores de *Nerium oleander* L. "laurel rosa".
3. Se determinó que todas las concentraciones de la crema a base del extracto metanólico de flores de *Nerium oleander* L. "laurel rosa" que posee actividad antifúngica sobre *Candida albicans* ATCC 10231 al presentar mayor halo de inhibición que el grupo control negativo.
4. La actividad antifúngica de las cremas a base del extracto metanólico de flores de *Nerium oleander* L. "laurel rosa" son menores que la terbinafina sobre *Candida albicans* ATCC 10231
5. Al evaluar la sensibilidad antifúngica de *Candida albicans* ATCC 10231 se observa que presentó sensibilidad nula a la crema base (control negativo), es sensible a las cremas a todas las concentraciones elaboradas a base del extracto metanólico de flores de *Nerium oleander* L. "Laurel rosa" y es altamente sensible a la terbinafina (control positivo)

4.3. Recomendaciones

- Profundizar el estudio fitoquímico de *Nerium oleander* L. "laurel rosa" con estudios complementarios mediante instrumentos analíticos que permitan identificar la estructuras y separar los metabolitos.
- Evaluar el efecto de las cremas a base de *Nerium oleander* L. "laurel rosa" frente a otros tipos de microorganismos y en diferentes formulaciones farmacéuticas
- Evaluar el efecto sinérgico en formulaciones magistrales de *Nerium oleander* L. "laurel rosa" con otros medicamentos
- Promover el uso de plantas medicinales en el tratamiento farmacológico de las enfermedades.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mayer FL, Wilson D, Hube B. Candida albicans pathogenicity mechanisms. Virulence. 2013;4(2):119-28.
2. Francois M. Duncan W. Bernhard H. Candida albicans pathogenicity mechanisms. Virulence [Internet]. 15 de febrero de 2013 [citado 26 de julio de 2021];4(2):119-28. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3654610/>
3. Jaqueti J., Ramiro P. et al. Epidemiología y etiología de la candidiasis vaginal en mujeres españolas e inmigrantes en Fuenlabrada (Madrid). Rev Esp Quimioter. 2020;33(3):187-92.
4. Cervera C. Candidiasis crónica: El síndrome oculto del siglo XXI [Internet]. Google Libros. [citado 3 de agosto de 2020]. Disponible en: <https://books.google.com.pe/books?id=0u54DwAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=cándida+albicans+pdf&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwj8irz-3v7qAhXKCrkGHa8PCiMQ6AEwAHoECAIQAg#v=onepage&q=cándida+albicans+pdf&f=false>
5. Lazo V., Hernández G. MR. Candidiasis sistémica en pacientes críticos, factores predictores de riesgo [Internet]. Horizonte Médico (Lima). 2020 [citado 23 de noviembre de 2020]. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-558X2018000100011
6. 20minutos.es. El 75 % de las mujeres ha sufrido al menos una vez en la vida alguna infección vaginal [Internet]. XIV Encuentro Nacional de Salud y Medicina de la Mujer. 2016. Disponible en: <https://www.20minutos.es/noticia/2063900/0/75-por-ciento-mujeres/infeccion-vaginal/hongo-candida/>
7. Ekalu A, Ayo RG-O, Habila JD, Hamisu I. A mini-review on the phytochemistry and biological activities of selected Apocynaceae plants. J Prepr. 2019;8(4):269-73.
8. Mostacero J. Característica edafoclimáticas y fitogeográficas de las plantas medicinales del dominio andino noroccidental del Perú, durante 1976 al 2004.

2005;314.

9. INFOJARDIN. Adelfa, Adelfas, Laurel rosa, Balandre - Nerium oleander [Internet]. INFOJARDIN. [citado 9 de julio de 2020]. Disponible en: <https://fichas.infojardin.com/arbustos/nerium-oleander-adelfa.htm>
10. Bruneton J. Farmacognosia: Fitoquímica. Plantas medicinales [Internet]. 2da ed. Editorial Acribia, S.A.; 2010. Disponible en: https://www.editorialacribia.com/libro/farmacognosia-fitoquimica-plantas-medicinales_54366/
11. Rojas N, Chaves E, García F. Bacteriología diagnóstica [Internet]. Universidad de Costa Rica. Costa Rica: Facultad de Microbiología; 2015. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/238053742/BACTERIOLOGIA-DIAGNOSTICA>
12. oleander SOBRE Escherichia coli N, Chumacero Santos B, Elizabeth Bach León Vislao P, Maraví Cabrera Aracely Janett MQ, Naturales R. Efecto antibacteriano del extracto etanólico y metanólico de Nerium oleander (laurel rosa) sobre Escherichia coli. Univ Priv Huancayo Franklin Roosevelt [Internet]. 1 de octubre de 2021 [citado 11 de febrero de 2022]; Disponible en: <http://repositorio.uoosevelt.edu.pe/handle/ROOSEVELT/516>
13. Rojas R. EFECTO DEL DECOCTO DE Nerium oleander L. SOBRE LARVAS III DE Spodoptera frugiperda (SMITH & ABBOT) [Internet]. Universidad Nacional de Trujillo; 2019. Disponible en: <https://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/12568>
14. Quintanilla C, Guerrero J. «EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE VALLESIA GLABRA (CUN CUN) FRENTE A CEPAS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS Y ESCHERICHIA COLI ESTUDIO IN VITRO» [Internet]. Universidad Inca Garcilazo de la Vega; 2018. Disponible en: http://repositorio.uigv.edu.pe/bitstream/handle/20.500.11818/3073/008599_Tesis_GUERRERO_LEZAMA_JACQUELINE-QUINTANILLA_CARHUAMACA_CHRISTIAN.pdf?sequence=3&isAllowed=y

15. Fernandez H. Uso del Laurel rosa (*Nerium oleander*) como rodenticida [Internet]. Universidad Nacional de Cajamarca; 2015. Disponible en: <https://1library.co/document/q7wj3xoz-uso-del-laurel-rosa-nerium-oleander-como-rodenticida.html>
16. Santos AF dos, Santos LT dos, Nascimento MP do, Oliveira EL de, Ribeiro TG, Pereira FD, et al. Revisión de tres especies medicinales y ornamentales de la familia Apocynaceae Juss. Res Soc Dev [Internet]. 16 de enero de 2022 [citado 15 de febrero de 2022];11(2):e1011224876-e1011224876. Disponible en: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/24876>
17. Miyawaki IA, Miyawaki AE, Schwambach C. DESENVOLVIMENTO DE ANTIFÚNGICO A PARTIR DAS PLANTAS “COROA-DE-CRISTO” (*EUPHORBIA SP*) E “ESPIRRADEIRA” (*NERIUM OLEANDER*) / DEVELOPMENT OF ANTI-FUELS FROM THE TREE CROWN (*EUPHORBIA SP*) AND SPIRIT (*NERIUM OLEANDER*) PLANTS. Brazilian J Dev [Internet]. 2021 [citado 15 de febrero de 2022];7(2):20119-32. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/349877502_DESENVOLVIMENTO_DE_ANTIFUNGICO_A_PARTIR_DAS_PLANTAS_COROA-DE-CRISTO_EUPHORBIA_SP_E_ESPIRRADEIRA_NERIUM_OLEANDER_DEVELOPMENT_OF_ANTI-FUELS_FROM_THE_TREE_CROWN_EUPHORBIA_SP_AND_SPIRIT_NERIUM_OLEANDER_PL
18. Al-snafi A. Bioactive ingredients and pharmacological effects of *Nerium oleander* Bioactive ingredients and pharmacological effects of *Nerium oleander*. IOSRPHR J Phamacy [Internet]. 2020;10(9). Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Ali-Al-Snafi/publication/344457461_Bioactive_ingredients_and_pharmacological_effects_of_Nerium_oleander/links/5f7817ff299bf1b53e099845/Bioactive-ingredients-and-pharmacological-effects-of-Nerium-oleander.pdf
19. Anonimo. El diseño de investigación experimental [Internet]. 2016. Disponible en: http://histologia.ugr.es/pdf/Metodologia_III.pdf
20. Lopez P. Poblacion, muestra y muestreo. Punto cero [Internet]. 2016 [citado

- 17 de mayo de 2022];09(08). Disponible en:
http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1815-02762004000100012
21. Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la Terapéutica [Internet]. 12ed ed. Brunton L, Chabner B, Knollmann B, editores. Mc Graw Hill. México: McGraw-Hill/Interamericana; 2018. Disponible en: <https://edimeinter.com/catalogo/novedad/goodman-gilman-las-bases-farmacologicas-la-terapeutica-13a-edicion-2018/>
 22. Muñoz C, Sánchez R. Aplicación de las operaciones unitarias de lixiviación y destilación en la obtención del sustrato con la finalidad de cuantificar el poder antioxidante de la albahaca (*Ocimum basilicum* L.) [Internet]. primera ed. Compas. Grupo Compás; 2018. Disponible en: http://142.93.18.15:8080/jspui/bitstream/123456789/12/1/CAPITULO_1_ARREGLADO_revisar.pdf
 23. Maye B, Miguel G. El antibiograma de discos. Normalización de la Técnica de Kirby-Bauer. *Biomedica*. 2018;35(1):103-9.
 24. Lozano N. Evaluación fitoquímica y actividad biológica de manayupa. *Cienc Invest* [Internet]. 2015;4(2):37-44. Disponible en: <https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/farma/article/view/3535>
 25. Clinical and Laboratory Standards Institute. M100: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 30th Edition [Internet]. CLSI. 2020. Disponible en: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/>
 26. Zurita S, Urcia F. Manual De Procedimientos Técnicos Para El Diagnóstico Micológico [Internet]. 2017. 139 p. Disponible en: https://repositorio.ins.gob.pe/bitstream/handle/INS/915/Manual_de_procedimientos_tecnicos_para_el_diagnostico_micologico.final.pdf?sequence=1
 27. Weldefort AA De, Fernández SEC. Manejo de Residuos Peligrosos/Biomédicos en los Laboratorios de Diagnóstico Universitarios. PAHO. 2016;

Anexo A. Matriz de consistencia

| Tema: ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LA CREMA A BASE DEL EXTRACTO METANÓLICO DE FLORES DE <i>Nerium oleander</i> L. “LAUREL ROSA” SOBRE <i>CANDIDA ALBICANS</i> ATCC 10231 | | |
|--|---|--|
| Problema general | Objetivo general | Hipótesis General |
| ¿La crema a base del extracto metanólico de flores de <i>Nerium oleander</i> L. “laurel rosa” poseerá acción antifúngica sobre <i>Candida albicans</i> ATCC 10231? | Determinar la actividad antifúngica que poseerá la crema a base del extracto metanólico de flores de <i>Nerium oleander</i> L. (laurel rosa) sobre a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 | La crema a base del extracto metanólico de flores de <i>Nerium oleander</i> L. (laurel rosa) presenta actividad antifúngica frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 |
| Problemas específicos | Objetivos específicos | Hipótesis específicas |
| ¿Cuáles serán los metabolitos secundarios con actividad antifúngica, que se encuentran presentes en el extracto metanólico de flores de <i>Nerium oleander</i> L. “laurel rosa”? | Identificar los metabolitos secundarios con actividad antifúngica, que se encuentran presentes en el extracto metanólico de flores de <i>Nerium oleander</i> L. “laurel rosa”. | El extracto metanólico de flores de <i>Nerium oleander</i> L. “laurel rosa” presenta metabolitos secundarios con actividad antifúngica. |
| ¿Cuál será la actividad antifúngica sobre <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 de las cremas a base del extracto metanólico de flores de <i>Nerium oleander</i> L. “laurel rosa” a las concentraciones del 15%, 20% y 25%? | Determinar la actividad antifúngica sobre <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 de las cremas a base del extracto metanólico de flores de <i>Nerium oleander</i> L. “laurel rosa” a las concentraciones del 15%, 20% y 25% | Las cremas a base del extracto metanólico de flores de <i>Nerium oleander</i> L. “laurel rosa” a las concentraciones del 15%, 20% y 25% presentan actividad antifúngica sobre <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 |
| ¿Cuál será la formulación de la crema a base del extracto metanólico de flores de <i>Nerium oleander</i> L. “laurel rosa” que posee actividad antifúngica sobre <i>Candida albicans</i> ATCC 10231? | Determinar la formulación de la crema a base del extracto metanólico de flores de <i>Nerium oleander</i> L. “laurel rosa” que posee actividad antifúngica sobre <i>Candida albicans</i> ATCC 10231. | Las cremas a base del extracto metanólico de flores de <i>Nerium oleander</i> L. “laurel rosa” al 15%, 20% y 25% poseen actividad antifúngica sobre <i>Candida albicans</i> ATCC 10231. |
| ¿Cuál será la actividad antifúngica de las cremas a base del extracto metanólico de flores de <i>Nerium</i> | Comparar la actividad antifúngica de las cremas a base del extracto metanólico de flores de <i>Nerium</i> | Las cremas a base del extracto metanólico de flores de <i>Nerium oleander</i> L. “laurel |

| | | |
|---|---|--|
| <p><i>oleander</i> L. "laurel rosa" comparado con terbinafina sobre <i>Candida albicans</i> ATCC 10231?</p> <p>¿Cuál será la sensibilidad antifúngica de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 frente a las cremas a base del extracto metanólico de flores de <i>Nerium oleander</i> L. "laurel rosa" y grupos control?</p> | <p><i>oleander</i> L. "laurel rosa" con terbinafina sobre <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.</p> <p>Evaluar la sensibilidad antifúngica de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 frente a las cremas a base del extracto metanólico de flores de <i>Nerium oleander</i> L. "laurel rosa" y los grupos control</p> | <p>rosa" presentan mayor actividad antifúngica a la terbinafina sobre <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.</p> <p><i>Candida albicans</i> ATCC 10231 es muy sensible a las cremas a base del extracto metanólico de flores de <i>Nerium oleander</i> L. "laurel rosa" y los grupos control sobre <i>Candida albicans</i> ATCC 10231</p> |
|---|---|--|

Anexo B. : Operacionalización de variables

| VARIABLE INDEPENDIENTE | DEFINICIÓN CONCEPTUAL | DIMENSIONES | INDICADORES | UNIDAD DE MEDIDA/PUNTO DE CORTE |
|---|---|------------------------------|--|--|
| Crema a base del extracto metanólico de flores de <i>Nerium oleander</i> L. "laurel rosa" | Formulación farmacéutica obtenida a base de principios activos naturales. | Concentración | 25% | Porcentaje |
| | | | 20% | |
| | | | 15% | |
| VARIABLE DEPENDIENTE | DEFINICIÓN CONCEPTUAL | DIMENSIONES | INDICADORES | UNIDAD DE MEDIDA/PUNTO DE CORTE |
| Actividad antifúngica sobre <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 | Inhibición en el crecimiento o desarrollo normal de los hongos | Tamaño de halo de inhibición | $\leq 8\text{mm}$ 8mm a 14mm 15mm a 20mm > a 20mm | Sensibilidad Nula (-) Sensible (+) Muy Sensible (++) Sumamente Sensible (+++) |

Anexo C. : Ficha de recolección de datos – Estudio Fitoquímico

| Metabolitos Secundarios | Reactivos | Resultado |
|---|---------------------|-----------|
| Quinonas | Borntrager | |
| Compuestos fenólicos | FeCl ₃ | |
| Flavonoides | Shinoda | |
| Antocianinas | NaOH 10% | |
| Taninos | Gelatina | |
| Taninos | Gelatina Sal | |
| Alcaloides | Dragendorff | |
| Alcaloides | Wagner | |
| Alcaloides | Mayer | |
| Triterpenos y Esteroides | Liebermann Burchard | |
| Lactonas α , β insaturadas | Baljet | |
| Azucres Reductores | Benedict | |
| Azucres Reductores | Fehling | |
| Saponinas | Espuma | |

Leyenda:

Ausente (-)
Escaso (+)
Leve (++)
Moderado (+++)
Abundante (++++)

Anexo D. : Ficha de recolección de datos – Microbiología

| Repetición | Concentración de la Crema a base del extracto metanólico de flores de <i>Nerium oleander</i> L. "laurel rosa" | | | Grupos control | |
|------------|---|-------|-------|--------------------------|---------------------------|
| | 15% | 20% | 25% | Negativo (crema base) | Positivo (terbinafina) |
| 1 | 9,01 | 10,62 | 11,47 | 6,62 | 22,96 |
| 2 | 8,50 | 9,97 | 11,05 | 5,98 | 23,23 |
| 3 | 9,52 | 10,59 | 11,44 | 5,90 | 23,57 |
| 4 | 9,65 | 11,07 | 11,67 | 5,92 | 23,72 |
| 5 | 8,67 | 10,76 | 10,66 | 6,02 | 23,84 |
| 6 | 9,22 | 11,18 | 11,79 | 5,92 | 23,74 |
| 7 | 8,89 | 10,81 | 11,83 | 5,98 | 24,00 |
| 8 | 8,99 | 10,89 | 10,85 | 5,95 | 23,07 |
| 9 | 9,21 | 10,81 | 11,60 | 6,26 | 23,32 |
| 10 | 8,28 | 10,53 | 11,50 | 5,92 | 22,60 |
| 11 | 9,11 | 10,54 | 10,85 | 5,91 | 23,94 |
| 12 | 9,36 | 10,30 | 10,85 | 6,12 | 23,77 |
| 13 | 8,18 | 11,11 | 11,18 | 6,33 | 23,12 |
| 14 | 8,70 | 11,11 | 11,21 | 6,42 | 23,89 |
| 15 | 8,68 | 10,59 | 11,25 | 6,40 | 23,20 |

Anexo E. : Carta de presentación



UNIVERSIDAD MARÍA AUXILIADORA

"Año del Fortalecimiento de la Soberanía Nacional"

San Juan de Lurigancho 26 de marzo del 2022

CARTA N°48-2022/EPFYB-UMA

Sres.
FUNDO CABALLO BLANCO
Presente. -

De mi especial consideración:

Es grato dirigirme a ustedes para saludarles en nombre propio y de la Universidad María Auxiliadora, a quien represento en mi calidad de Director de la Escuela de Farmacia y Bioquímica.

Sirva la presente para pedir su autorización a que los bachilleres: FERNANDEZ MELLENDEZ, Emely Lisbeth, DNI 46829775 y ROJAS SUCLUPE, José Luis, DNI 47118463 puedan recopilar datos para su proyecto de tesis titulado: **"ACTIVIDAD ANTIFUNGICA DE LA CREMA A BASE DEL EXTRACTO METANOLICO DE FLORES DE NERIUM OLEANDER L. "LAUREL ROSA" SOBRE CANDIDA ALBICANS ATCC 10231"**.

Sin otro particular, hago propicio la ocasión para expresarle los sentimientos de mi más alta consideración y estima.

Atentamente,

Dr. Javier Semanago-Joaquín
Director de la Escuela Profesional de
Farmacia y Bioquímica

Av. Carlos Beltrán 430, San Juan de Lurigancho
Telf: 309 1111
www.unmaia.edu.pe

Anexo F. : Carta de aceptación

Año del Fortalecimiento de la Soberanía Nacional

Pimentel 03 de abril del 2022

Dr. Jhonnell Samanego Joaquín
Director de la escuela profesional de Farmacia y Bioquímica.

De mi especial consideración:

Es grato dirigirme a usted para saludarle, como bachilleres: FERNANDEZ MELENDEZ, Emely Lisseth, DNI 46829775 y ROJAS SUCLUPE, José Luis, DNI 47118463 autores del proyecto de tesis titulado: "**ACTIVIDAD ANTIFUNGICA DE LA CREMA A BASE DEL EXTRACTO METANOLICO DE FLORES DE NERIUM OLEANDER L "LAUREL ROSA" SOBRE CANDIDA ALBICANS ATCC 10231**".

Sirva la presente para informarle que el propietario del "FUNDO CABALLO BLANCO", ubicado en el distrito de Pimentel; el cual pertenece a la provincia de Chiclayo. Nos concedió su permiso, para realizar la recolección de la planta, recopilar datos y llevar a cabo nuestro proyecto de tesis. Para ello queda su firma como prueba de lo mencionado.

Sin otro particular, nos despedimos de usted y reiteramos nuestro agradecimiento.

Atentamente.



SR. ERIK WALTER TELLO DAMIAN.
DNI: 75130499.
Propietario.

Anexo G. : Certificado de clasificación taxonómica

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 "LAUREL ROSA" proporcionado por los Bachilleres, FERNANDEZ MELENDEZ, EMELY LISSET y ROJAS SUCLUPE, JOSÉ LUIS; Tesis de la Universidad María Auxiliadora, ha sido estudiada científicamente y determinada como *Nerium oleander L.* y de acuerdo al Sistema de Clasificación de Cronquist 1981, se ubica en las siguientes categorías:

Reino: PLANTAE
División: MAGNOLIOPHYTA
Clase: MAGNOLIOPSIDA
Subclase: ASTERIDAE
Orden: GENTIANALES
Familia: APOCYNACEAE
Especie: **Nerium**
Especie: *Nerium oleander L.*

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

Lima, 25 de mayo del 2022


Bigo. Hamilton Beltrán
Hamilton Wilmer Beltrán Santiago
Biólogo - Botánico
C.B.P. 2719

Anexo H: Certificado de análisis de la cepa



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

| | |
|---|--|
| Specifications Microorganism Name: Candida albicans Catalog Number: 0443 Lot Number: 443-1006** Reference Number: ATCC® 10231™** Purity: Pure Passage from Reference: 3 | Expiration Date: 2022/12/28 Release Information: Quality Control Technologist: Alexandra D Stensvad Release Date: 2020/11/18 |
| Performance | |
| Macroscopic Features: Small to medium, white, circular, convex, dull colonies. Microscopic Features: Gram positive, ovoidal, budding yeast cells. | Medium: Nutrient Method: Gram Stain (1) |
| ID System: MALDI-TOF (1) See attached ID System results document. | Other Features/ Challenges: Results (1) Germ Tube Test: positive (1) Chlamyospore production: positive  Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE |
| <p><small>*Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.</small></p> <p><small>Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.</small></p> <p><small>⚠ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</small></p> <p>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</p> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div data-bbox="263 1344 470 1512">  ACCREDITED REFERENCE MATERIAL PRODUCER CERT #2655.02 </div> <div data-bbox="438 1500 1380 1556"> <small>(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC, Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.</small> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 20px;"> <div data-bbox="263 1579 470 1747">  ACCREDITED TESTING CERT #2655.01 </div> <div data-bbox="518 1724 885 1758"> <small>(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.</small> </div> </div> | |

Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results



Meaning of Score Values

| Range | Interpretation | Symbols | Color |
|-------------|-------------------------------------|---------|--------|
| 2.00 - 3.00 | High-confidence identification | (+++) | green |
| 1.70 - 1.99 | Low-confidence identification | (+) | yellow |
| 0.00 - 1.69 | No Organism Identification Possible | (-) | red |

Meaning of Consistency Categories (A - C)

| Category | Interpretation |
|----------|--|
| (A) | High consistency: The best match is a high-confidence identification. The second-best match is (1) a high-confidence identification in which the species is identical to the best match, (2) a low-confidence identification in which the species or genus is identical to the best match, or (3) a non-identification. |
| (B) | Low consistency: The requirements for high consistency are not met. The best match is a high- or low-confidence identification. The second-best match is (1) a high- or low-confidence identification in which the genus is identical to the best match or (2) a non-identification. |
| (C) | No consistency: The requirements for high or low consistency are not met. |

Sample Name: Candida albicans
 Sample Description: 0443
 Sample ID: 443-1006
 Sample Creation Date/Time: 2019-03-06T14:55:06.305 ADS
 Applied MSP Library(ies): BDAL, Mycobacteria Library (bead method), Filamentous Fungi Library, Listeria

| Sample Name | Sample ID | Organism (best match) | Score Value |
|-----------------|-----------|-----------------------|-------------|
| A2 (+++) (A) | 443-1006 | Candida albicans | 2.11 |

Comments:

n/a

Anexo I. : Determinación del comportamiento paramétrico de los datos

Tabla 6. Prueba de normalidad

| | Grupos de trabajo | Shapiro-Wilk | | |
|--------------------------------------|-------------------|--------------|----|-------|
| | | Statistic | df | Sig. |
| Diámetro del halo de inhibición (mm) | Crema al 15% | 0,978 | 15 | 0,954 |
| | Crema al 20% | 0,943 | 15 | 0,422 |
| | Crema al 25% | 0,949 | 15 | 0,510 |
| | Crema Base (-) | 0,828 | 15 | 0,008 |
| | Terbinafina (+) | 0,928 | 15 | 0,258 |

Fuente: SPSS ver. 26

Tabla 7. Prueba de homogeneidad de varianzas

| | | Estadístico de Levene | gl1 | gl2 | Sig. |
|---------------------------------|---|-----------------------|-----|--------|-------|
| Diámetro del Halo de Inhibición | Se basa en la media | 2,037 | 4 | 70 | 0,099 |
| | Se basa en la mediana | 1,795 | 4 | 70 | 0,140 |
| | Se basa en la mediana y con gl ajustado | 1,795 | 4 | 67,026 | 0,140 |
| | Se basa en la media recortada | 2,053 | 4 | 70 | 0,096 |

Anexo J. : Evidencias de la parte experimental

Figura 2. Recolección de la especie vegetal



Figura 3. Selección y lavado de la muestra más adecuada



Figura 4. Secado de las flores de Nerium oleander L. “LAUREL ROSA”



Figura 5. Obtención del pulverizado de flores de *Nerium oleander* L. "LAUREL ROSA"



Figura 6. Preparación del macerado y filtración



Figura 7. Obtención del extracto metanólico de *Nerium oleander* L. "LAUREL ROSA"



Figura 8. Prueba de solubilidad

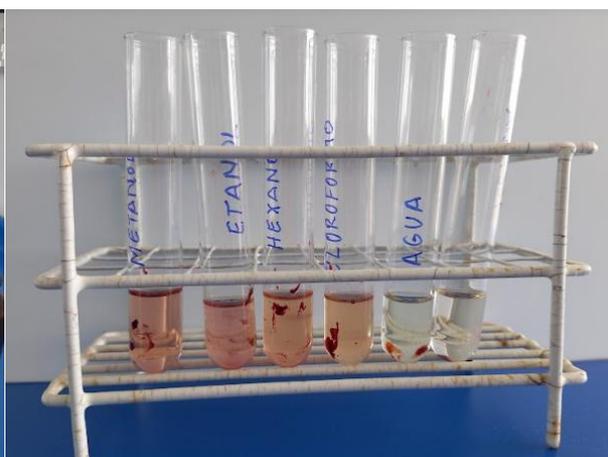


Figura 9. Estudio fitoquímico



Figura 10. Preparación de la formulación en crema



Figura 11. Preparación del inóculo

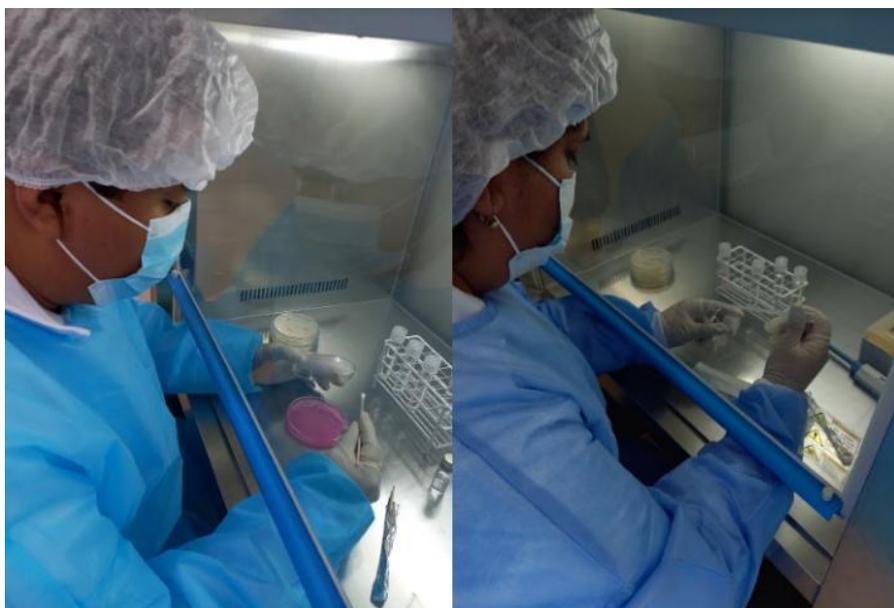


Figura 12. Preparación de pocitos en agar y aplicación de la crema

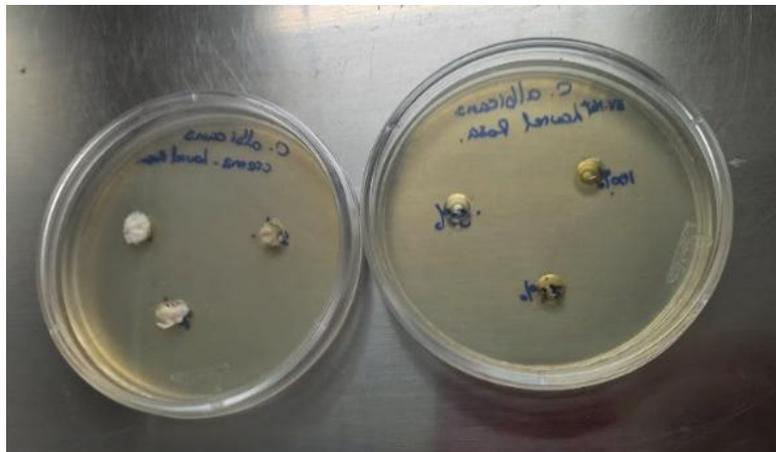


Figura 13. Incubación de los cultivos de *Candida albicans*



Figura: 14. Recolección de datos: Medida del halo de inhibición



