

## AUTORIZACIÓN Y DECLARACIÓN JURADA DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD

Yo, BURE CUEVA MARSELINA YOHANA, con DNI 45056842, en mi condición de autor(a) de la tesis/ trabajo de investigación/ trabajo académico presentada para optar el Título Profesional de "Químico Farmacéutico", AUTORIZO a la Universidad María Auxiliadora (UMA) para reproducir y publicar de manera permanente e indefinida en su repositorio institucional, bajo la modalidad de acceso abierto, el archivo digital que estoy entregando, en cumplimiento a la Ley N°30035 que regula el Repositorio Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación de acceso abierto y su respectivo Reglamento.

Asimismo, DECLARO BAJO JURAMENTO<sup>1</sup> que dicho documento es ORIGINAL con un porcentaje de similitud de 25% y que se han respetado los derechos de autor en la elaboración del mismo. Además, recalcar que se está entregando la versión final del documento sustentado y aprobado por el jurado evaluador.

En señal de conformidad con lo autorizado y declarado, firmo el presente documento a los 25 días del mes de enero del año de 2023.



---

MARSELINA YOHANA BURE CUEVA  
DNI: 45056842



---

Mg. ROSA CANDELARIA RAMÍREZ HEREDIA  
DNI: 09033946

---

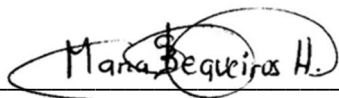
<sup>1</sup> Se emite la presente declaración en virtud de lo dispuesto en el artículo 8°, numeral 8.2, tercer párrafo, del Reglamento del Registro Nacional de Trabajos conducentes a Grados y Títulos - RENATI, aprobado mediante Resolución de Consejo Directivo N° 033-2016-SUNEDU/CD, modificado por Resolución de Consejo Directivo N° 174-2019-SUNEDU/CD y Resolución de Consejo Directivo N° 084-2022-SUNEDU/CD.

## AUTORIZACIÓN Y DECLARACIÓN JURADA DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD

Yo, SEQUEIROS HINOJOSA MARIA SOLEDAD, con DNI 29585270, en mi condición de autor(a) de la tesis/ trabajo de investigación/ trabajo académico presentada para optar el Título Profesional de "Químico Farmacéutico", AUTORIZO a la Universidad María Auxiliadora (UMA) para reproducir y publicar de manera permanente e indefinida en su repositorio institucional, bajo la modalidad de acceso abierto, el archivo digital que estoy entregando, en cumplimiento a la Ley N°30035 que regula el Repositorio Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación de acceso abierto y su respectivo Reglamento.

Asimismo, DECLARO BAJO JURAMENTO<sup>2</sup> que dicho documento es ORIGINAL con un porcentaje de similitud de 25% y que se han respetado los derechos de autor en la elaboración del mismo. Además, recalcar que se está entregando la versión final del documento sustentado y aprobado por el jurado evaluador.

En señal de conformidad con lo autorizado y declarado, firmo el presente documento a los 25 días del mes de enero del año de 2023.



MARIA SOLEDAD SEQUEIROS HINOJOSA  
DNI: 29585270

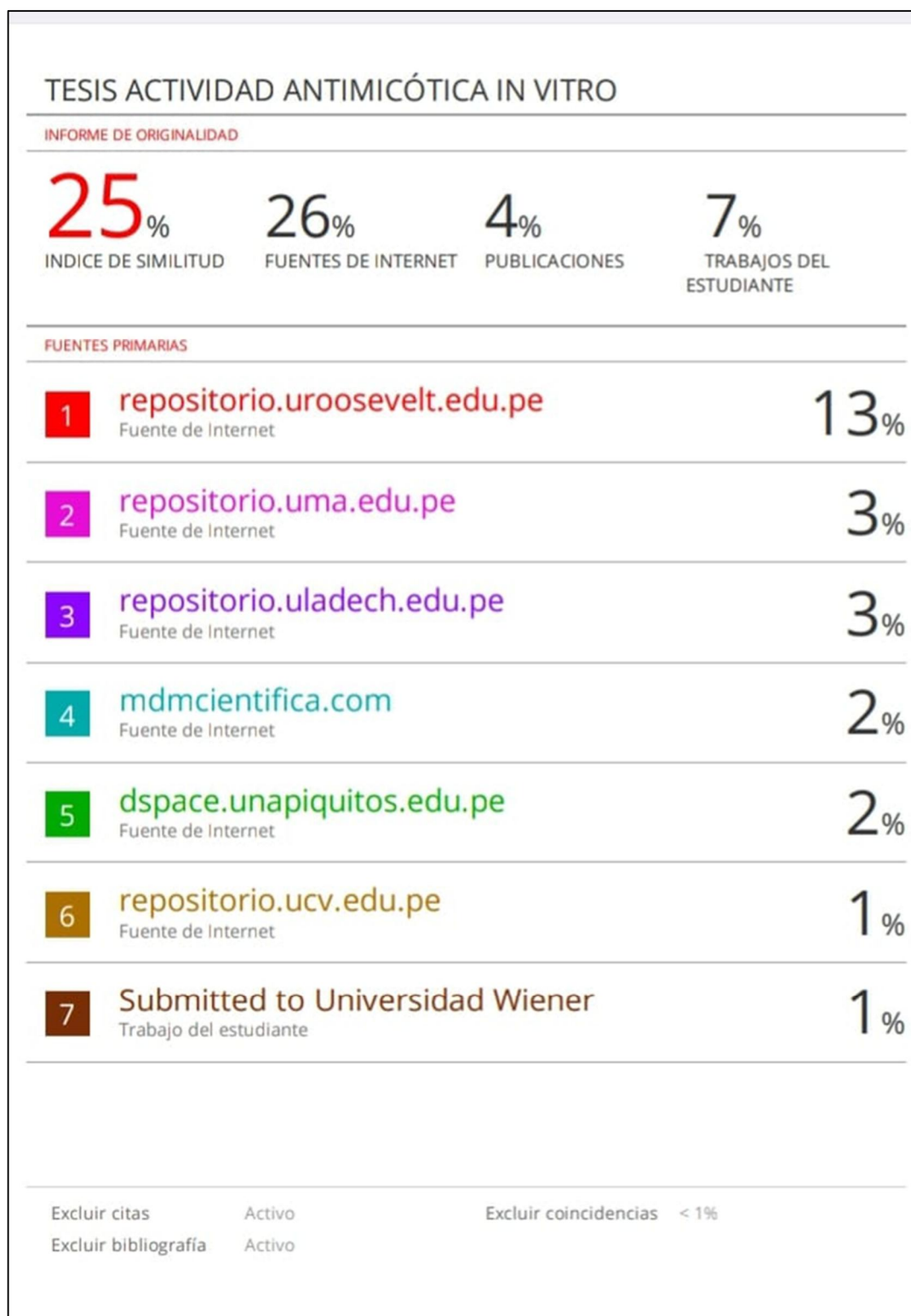


Mg. ROSA CANDELARIA RAMÍREZ HEREDIA  
DNI: 09033946

<sup>2</sup> Se emite la presente declaración en virtud de lo dispuesto en el artículo 8°, numeral 8.2, tercer párrafo, del Reglamento del Registro Nacional de Trabajos conducentes a Grados y Títulos - RENATI, aprobado mediante Resolución de Consejo Directivo N° 033-2016-SUNEDU/CD, modificado por Resolución de Consejo Directivo N° 174-2019-SUNEDU/CD y Resolución de Consejo Directivo N° 084-2022-SUNEDU/CD.

## INFORME DE ORIGINALIDAD - TURNITIN

Q.F BURE CUEVA – SEQUEIROS HINOJOSA (25/01/2023)





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

**ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA *IN VITRO* DEL EXTRACTO  
ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Ruta graveolens* L. “RUDA”  
SOBRE CEPAS EN *Candida albicans* ATCC 10231®**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO  
FARMACÉUTICO

**AUTORES**

**Bach. BURE CUEVA, MARSELINA YOHANA**

<https://orcid.org/0000-0002-2504-3213>

**Bach. SEQUEIROS HINOJOSA, MARIA SOLEDAD**

<https://orcid.org/0000-0002-0477-9862>

**ASESORA**

**Mg. RAMÍREZ HEREDIA, ROSA CANDELARIA**

<http://orcid.org/0000-0001-7675-5969>

Lima – Perú

2022

## DEDICATORIA

A Dios por guiarme y protegerme, ser mi guía en este camino profesional.

A mi familia, en especial a mi padre *Avelino Bure* por su apoyo y confianza y a mi querida madre *Donicia Cueva* por su amor infinito y sus consejos que son un ejemplo para mí.

A mi hermano *Diego*, por su gran esfuerzo y su apoyo infinito.

***Yohana Bure***

A mi familia, mis padres, Alejandro y María, mis hermanas que me brindaron confianza y apoyo moral.

A mi esposo Marco, mis hijos, Anthony, Rodrigo y Fabián; quienes fueron mi mayor motivo e inspiración gracias por su enorme apoyo y paciencia, la cual me dio fortaleza y seguridad para lograr este objetivo como profesional.

A mi querida Dra. Q.F. Graciela Guerra Ugaz, por ser autora de este gran propósito.

***María Soledad***

## **AGRADECIMIENTO**

A nuestra asesora de tesis, Mg. Ramírez Heredia Rosa Candelaria, por su gran paciencia y dedicación, logró guiarnos y motivarnos a culminar nuestro proyecto.

A los Docentes de la escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de La Facultad de la Ciencia de la Salud, por su gran aporte y guía, quienes nos inculcaron valores y enseñanzas para ser mejores personas y profesionales.

A nuestros amigos, futuros colegas en quienes nos apoyamos de una manera incondicional en cada etapa de nuestra vida universitaria.

Por último, agradecer a la Universidad María Auxiliadora por acogernos y permitir obtener nuestro título profesional.

***Los autores***

# ÍNDICE GENERAL

	Páginas
RESUMEN .....	viii
ABSTRACT .....	ix
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. MATERIALES Y MÉTODOS .....	10
II.1. Enfoque y diseño de la investigación .....	10
II.2. Población, muestra y muestreo.....	10
II.3. Variables de investigación .....	11
II.4. Técnicas e instrumentos para la recolección de datos.....	11
II.5. Plan metodológico para la recolección de datos .....	12
II.6. Procesamiento del análisis estadístico .....	14
II.7. Aspectos éticos.....	14
III. RESULTADOS .....	15
IV. DISCUSIÓN .....	23
ANEXOS .....	31

## INDICE DE TABLAS

Páginas

Tabla 1. Solubilidad del extracto etanólico de las hojas de <i>Ruta graveolens</i> L. “Ruda” en solventes polares y apolares.....	25
Tabla 2. Actividad antimicótica in vitro del extracto etanólico de las hojas de <i>Ruta graveolens</i> L. “Ruda” sobre cepas en <i>Candida albicans</i> ATCC 10231® a las concentraciones del 50%, 75% y 100% .....	26
Tabla 3. Prueba de Distribución Normal para cada Grupo de Tratamientos .....	29
Tabla 4. Análisis de la Varianza (ANOVA) .....	30
Tabla 5. Análisis por sub grupos homogéneos mediante la prueba de Tukey .....	30
Tabla 6. Comparación de la sensibilidad antibacteriana según la escala de Duraffourd .....	32



## ÍNDICE DE FIGURAS

Páginas

Figura 1: Actividad antimicótica in vitro del extracto etanólico de las hojas de <i>Ruta graveolens</i> L. “Ruda” sobre cepas en <i>Candida albicans</i> ATCC 10231® a las concentraciones del 50%, 75% y 100% .....	27
Figura 2. Recolección y selección de la muestra vegetal .....	49
Figura 3. Lavado y desinfección de la muestra .....	50
Figura 4. Pulverización y tamizado .....	51
Figura 5. Proceso de maceración .....	52
Figura 6. Proceso de filtración y evaporación .....	53
Figura 7. Preparación de los extractos etanólicos de la planta .....	54
Figura 8. PRUEBA SOLUBILIDAD.....	55
Figura 9. Activación de la cepa .....	56
Figura 10. Preparación del inóculo.....	57
Figura 11. Sembrado de la cepa en placa y preparación de los pozos en agar	57
Figura 12. Aplicación de los extractos en placa .....	58
Figura: 13. Medición de halos: .....	59

## INDICE DE ANEXOS

Páginas

Anexo A. Instrumento de recolección de datos de la actividad antimicótica.....	42
Anexo B. Instrumento de recolección de datos para la prueba de solubilidad .....	43
Anexo C. Matriz de consistencia .....	44
Anexo D. Operacionalización de las variables .....	45
Anexo E. Certificado de calidad de la cepa microbiológica .....	46
Anexo F. Certificación Botánica de la planta.....	48
Anexo G. Evidencias fotográficas .....	49

## RESUMEN

**Objetivo:** Determinar la actividad antimicótica *in vitro* del extracto etanólico de las hojas de *Ruta graveolens* L. “Ruda” sobre cepas de *Candida albicans* ATCC 10231®.

**Método:** El estudio tuvo un enfoque cuantitativo, prospectivo y de diseño experimental el que está conformado por 5 grupos los cuales incluye el control positivo y negativo; la población fue la especie *Ruta graveolens* L. “Ruda” recolectada en un distrito de Monsefú, provincia de Chiclayo – Lambayeque, de la cual se extrajo una muestra de 2,5 kilogramos en hojas. El extracto etanólico se obtuvo por maceración y su actividad antimicótica se evaluó por el método de difusión en pozo, también se evaluó con solvente polares y apolares la solubilidad del extracto. La lectura de los halos fue medida con un vernier digital y los datos fueron registrados en una ficha de recolección.

**Resultados:** El extracto etanólico de *Ruta graveolens* L. “Ruda” fue totalmente soluble en metanol 99.5% y medianamente soluble en etanol 96%, asimismo, los extractos formaron halos de 19mm, 15.87mm y 13mm para las concentraciones del 100%, 75% y 50%, así mismo; el etanol empleado como grupo control negativo tuvo un halo de 6.21mm y la nistatina empleada como control positivo obtuvo un halo de 28mm.

**Conclusión:** El extracto etanólico de las hojas de *Ruta graveolens* L. “Ruda” presenta actividad antimicótica *in vitro* sobre cepas de *Candida albicans* ATCC 10231®, menor a la nistatina.

**Palabras clave:** *Ruta graveolens* L., *Candida albicans*, extracto etanólico, nistatina, actividad antimicótica

## ABSTRACT

**Objective:** To determine the in vitro antifungal activity of the ethanolic extract of *Ruta graveolens* L. "Rude" leaves on *Candida albicans* ATCC 10231® strains.

**Method:** The study had a quantitative, prospective and experimental design approach which is made up of 5 groups which includes the positive and negative control; the population was the species *Ruta graveolens* L. "Ruda" collected in a district of Monsefú, province of Chiclayo - Lambayeque, from which a 2.5-kilogram leaf sample was extracted. The ethanolic extract was obtained by maceration and its antifungal activity was evaluated by the well diffusion method. The solubility of the extract was also evaluated with polar and nonpolar solvents. The reading of the halos was measured with a digital vernier and the data was recorded on a collection sheet.

**Results:** The ethanolic extract of *Ruta graveolens* L. "Rude" was totally soluble in 99.5% methanol and moderately soluble in 96% ethanol, likewise, the extracts formed halos of 19mm, 15.87mm and 13mm for the concentrations of 100%, 75% and 50%. Likewise; the ethanol used as a negative control group had a halo of 6.21mm and the nystatin used as a positive control had a halo of 28mm.

**Conclusion:** The ethanolic extract of *Ruta graveolens* L. "Rude" leaves has in vitro antifungal activity on *Candida albicans* ATCC 10231® strains, less than nystatin.

**Keywords:** *Ruta graveolens* L., *Candida albicans*, ethanolic extract, nystatin, antifungal activity.

## I. INTRODUCCIÓN

La deficiencia del sistema inmune que padecen los pacientes por diversas enfermedades (por ejemplo, pacientes con lupus, VIH, cáncer, diabetes mellitus, etc.) o personas que han tenido algún trasplante de órganos o procesos quirúrgicos, son las que pueden contraer infecciones micóticas de alto riesgo<sup>1</sup>.

De este tipo de afecciones producidas por hongos llamadas micosis, el agente patógeno que más prevalencia tiene es la *Candida albicans*, la cual produce la candidiasis, estas pueden ser adquiridas a nivel intra y extrahospitalario, siendo la de mayor relevancia en pacientes hospitalizados que llegan a producir una candidiasis invasiva que pueden ser mortales para el individuo.<sup>2</sup>

Las estadísticas en todo el mundo reflejan que las candidiasis invasivas en los pacientes hospitalizados se producen en un 40%, no siendo solo *Candida albicans* el único agente causal, pero sí el de mayor predominio, cuando se llega a dar una micosis diseminada en pacientes acarrea un gran problema, a ello se suma la resistencia a los antimicrobianos que dificultan el tratamiento e incrementan los costos por hospitalización.<sup>3</sup>

El máximo ente de la Salud (OMS) reportó que la candidiasis invasiva ha afectado a más de doscientas mil personas a nivel mundial y así mismo ha ocasionado la muerte de cincuenta mil personas, por tal razón la candidiasis se ha ubicado como la cuarta patología de mayor prevalencia a nivel mundial.<sup>4</sup>

Sin embargo, los casos reportados en Latinoamérica no son tan bastos, este problema se inicia con la poca información recopilada no se emplean adecuadamente para dar una estadística más precisa en relación a su incidencia y prevalencia, pero se sospecha que la candidiasis supera en números a los reportados en la zona norte del planeta (esto es debido al sistema de salud deficiente y a la falta de actualización en el uso adecuado del tratamiento para combatir este tipo de infecciones), por otro lado, también es conocido que los reportes sobre esta enfermedad llegan tardíamente en los nosocomios lo que dificulta aún más su tratamiento.<sup>5</sup>

Los pocos reportes de candidiasis existentes a una escala mayor encontrados en Latinoamérica son las publicadas en un estudio la cual se realizó en 20 hospitales donde se reportó que por cada mil pacientes que ingresaban a los nosocomios 1,81 sufrían de esta afección, siendo país vecino de Chile la que obtuvo cifras diminutas de (0,33 / mil), y el país de Colombia la que obtuvo los números de casos más altos con 1,96 por cada mil individuos hospitalizados, al comparar estas cifras con las de Norte América encontramos una diferencia considerable de casos las cuales varía entre 0,28 a 0,42 ingresos por mil personas hospitalizadas y Europa con 0,20 a 0,38 ingresos por mil hospitalizados, la cual refleja las deficiencias sanitarias en el territorio latinoamericano, por su parte los agentes patógenos que producen este tipo de infecciones son *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* y *Candida glabrata*.<sup>6</sup>

En nuestro país (Perú) se realizó un estudio considerando como muestra poblacional a pacientes con VIH/SIDA las cuales de los más de 580 mil casos de infecciones micóticas, 1,557 casos corresponden a micosis producidas por *Candida albicans* y 1,621 a infecciones por aspergilosis invasivas; No obstante estos números reflejados en dicho estudio pueden ser no tan precisos debido a que no se notifican de manera obligatoria, además se puede mencionar que estas cifras reportadas va aumentando desde la década de los años 70 a la actualidad en una proporción de 3 a 20.<sup>7</sup>

A nivel del departamento de Lambayeque en el Hospital Referencial de Lambayeque, se realizó una investigación referente a la candidiasis en pacientes con VIH/SIDA, donde se encontró un incremento de la prevalencia de Candidiasis del tipo oral hasta en un 17.5% de los pacientes estudiados.<sup>8</sup>

En el marco teórico de nuestro estudio podemos mencionar que la *Ruta graveolens* L. (Rutaceae) es conocida popularmente como 'RUDA', su crecimiento es originario en las zonas del sur de Europa y el norte de África. Es utilizado de manera medicinal como estimulante, abortivo, antirreumático, para combatir los parásitos y calmar los espasmos del vientre, además se usa para mejorar el inicio de la menstruación, así también se ha realizado estudios más profundos, en donde han demostrado que *Ruta graveolens* posee una

amplia gama de actividades farmacológicas que incluyen actividad antioxidante (inhibe la degradación oxidativa), repelente de insectos, larvívica, antimicrobiana, antiandrogénica, antidepresiva, antihiper glucémica, antihiperlipidémica, antiinflamatoria, antitumoral y citotóxica en líneas celulares como un anticanceroso. Actualmente, los estudios fotoquímicos le dan atribución a estas acciones farmacológicas por la presencia de ciertos metabolitos como alcaloides, cumarinas, flavonoides, cetonas y terpenos. También se han reportado en tamizajes fotoquímicos la presencia de cetonas, alcoholes, aldehídos y ésteres, las cuales han sido extraídas de las hojas, flores, tallos y raíces de *Ruta graveolens* L. En relación a su aceite esencial se han identificados compuestos como metil-2-cetonas, particularmente la 2-undecanona y la 2-nonanona, la cual representa más del 50% de la composición total de este aceite.<sup>9</sup>

Extracto etanólico, extracto de olor distintivo obtenido a partir de material vegetal crudo ya sea macerándolo o percolándolo en etanol y luego eliminando físicamente el solvente de la mezcla. Estos procesos pueden estar sujetos a operaciones específicas con el fin de eliminar algunos de sus componentes y, como resultado, mejorar notablemente la calidad del producto deseado<sup>10</sup>.

*Candida albicans* tiene su hábitat en las mucosas, principalmente en la zona vaginal y la piel en zonas húmedas como el intersticio y pliegues de los dedos, zona pélvica, axilas, etc. Además, pueden encontrarse en los dispositivos médicos y materiales utilizados dentro de los hospitales siendo fuente vector para las infecciones micóticas en pacientes hospitalizados. Dentro de sus características morfológicas podemos mencionar que mide aproximadamente entre 2 a 4 micras de diámetro en su forma de levadura, son Gram positivas se reproduce por gemación.<sup>10</sup> Entre los factores de virulencia tenemos a su polimorfismo ya que se pueden encontrar en el medio ambiente en su forma de levadura, pseudohifas e hifas, en el caso de las hifas tienen mayor predominancia para poder infectar en el organismo. Cuenta con proteínas como adhesinas, que son glicoproteínas de la superficie celular y le dan el poder de adherencia en la superficie de los microorganismos. Y por último cuenta con proteínas llamadas invasinas que le dan la propiedad invasora a *Candida albicans* de poder entrar en las células epiteliales y endoteliales del huésped; así mismo, secretan enzimas hidrolasas, proteasas, fosfolipasas y lipasas.<sup>11</sup>

Cuenta con 4 etapas de infección, la primera produce colonización en donde se proliferan y se adhieren formando parte de la microbiota de la piel; cuando el organismo se encuentra con su sistema inmunológico deprimido puede llegar a ocasionar infección superficial la cual involucra que esta penetre y degrada las proteínas del organismo infectado; como tercera etapa cuenta con la infección arraigada en donde penetra tejidos más profundos, llegando al tejido vascular y evadiendo a los cuerpos inmunitarios, por último *Candida albicans* produce infección diseminada que se caracteriza por la adhesión al endotelio, infección a otros tejidos del huésped y se manifiesta en la activación de la cascada de coagulación.<sup>11</sup>

Por otro lado, el término "**antimicóticos**" abarca todos los compuestos químicos, agentes farmacológicos y productos naturales utilizados para tratar la micosis, estos medicamentos antifúngicos representan un grupo farmacológicamente diverso de medicamentos que son componentes cruciales en el manejo médico moderno de las micosis. Si bien la farmacología antimicótica ha avanzado significativamente en las últimas tres décadas, las infecciones fúngicas invasivas comunes todavía tienen una alta tasa de mortalidad<sup>12</sup>.



Entre los antimicóticos utilizados tenemos a la nistatina que es un fármaco antifúngico de vía tópica (en forma de gotas tópicas, óvulos y cremas), su mecanismo de acción radica en la afinidad de adherirse a los esteroides y alterar la permeabilidad de la membrana celular del hongo, haciendo que el líquido intracelular de *Candida* fluya hacia el exterior, produciendo muerte celular. Normalmente su efecto es fungistático y estudios in vitro señalan que es susceptible a *Candida albicans*; *Guilliermondii Candida*; *C. krusei* y *Candida sp.*<sup>12</sup>

La nistatina es un fármaco antifúngico polieno que tiene una actividad fungicida y fungistática de amplio espectro contra una serie de levaduras y hongos. Es uno de los agentes antifúngicos más efectivos sintetizados por bacterias, en este caso una cepa de *Streptomyces noursei*, y está estrechamente relacionado con la Anfotericina B, difiriendo sólo ligeramente en su estructura. La nistatina tiene una mayor actividad antifúngica que la Anfotericina B, sin embargo, se asocia con una toxicidad significativa y no está disponible en una formulación apropiada para uso sistémico, como sufre muy poca absorción después de la administración oral o tópica, la eficacia de la nistatina se limita al tratamiento y prevención de infecciones fúngicas cutáneas, mucocutáneas y gastrointestinales.

El efecto antimicótico de los medicamentos se asocia a la disminución de la proliferación o reproducción de los hongos, en tal sentido detienen o causan la muerte de estos microorganismos.

La prueba de solubilidad se basa en intentar disolver una sustancia en varios solventes. La solubilidad se determinará en un procedimiento por etapas que implica, disolver una sustancia de prueba en los solventes (en el orden de preferencia en base a su polaridad) relativamente en altas concentraciones. Si la sustancia no se disuelve, se aumenta el volumen de disolvente para disminuir la concentración por un factor de 10, y luego la secuencia de procedimientos mecánicos se repite en un intento de solubilizar la sustancia a concentraciones más bajas.<sup>13</sup>

En los casos que no se dispone de información sobre la solubilidad, por lo general, se agrega una cierta cantidad de sustancia al solvente, una parte a la vez y luego se agrega otra porción hasta que el soluto se disuelva por completo.

La cantidad de fracción que debe agregarse para la disolución completa es la cantidad de fracción que el soluto necesita para formar una solución saturada. Los valores de temperatura afectan significativamente los resultados, por lo que la solubilidad casi siempre se prueba a temperatura ambiente.<sup>14</sup>

Los Estándares McFarland (o escala de McFarland) se usan comúnmente en la Prueba de Susceptibilidad a los Antibióticos (AST) para estandarizar el número aproximado de bacterias en una suspensión líquida o cultivo de caldo de la célula bacteriana comparando la turbidez de la suspensión de prueba cultivada con la del Estándar McFarland. Un estándar McFarland es una solución química de cloruro de bario al 1% ( $\text{BaCl}_2$ ) y ácido sulfúrico al 1% ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) solución en proporción adecuada; la reacción entre estos dos productos químicos da como resultado la solución turbia que se debe a la producción de un precipitado fino de sulfato de bario ( $\text{BaSO}_4$ ). Por lo tanto, la solución turbia preparada se utiliza como una solución estándar con la que se comparan y estandarizan las suspensiones bacterianas de los cultivos.<sup>15</sup>

Las cepas ATCC, son un conjunto de especies de bacterias y hongos, que comparten al menos una característica, las cepas son usadas en los laboratorios de microbiología para controlar diferentes procedimientos. Este grupo de material biológico de referencia certificado, son conocidos como American Type Culture Collection (ATCC), esta colección de cepas ATCC comenzó en el año 1925 y son conservadas y transportadas en varios medios, los más usados son: Gelatina, Leche descremada, ácido ascórbico, dextrosa, jabón activado y carbón vegetal.

Las cepas ATCC pueden clasificarse para tres principales usos: referencia, trabajo y reserva; para su uso como referencia, deben obtenerse directamente de una colección certificada con una reseña internacional o nacional, la siembra o repique debe tener un máximo de cuatro a partir de la cepa original; las cepas para trabajo son obtenidas a partir de los cultivos de las cepas de referencia y deben crecer en medios sólidos y estas nunca deben sustituir las cepas de reserva, estas cepas de reserva son idénticas, obtenidas de un subcultivo de las cepas de referencia. Estas son preparadas y cultivadas en el laboratorio, deben guardarse en un lugar exclusivo.

Como antecedentes internacionales:

Tenemos el estudio de Donadu, M., Peralta Y. et al. (2021), en Colombia publicaron su estudio “Aceite Esencial Colombiano de *Ruta graveolens* contra cepas nosocomiales de *Candida* spp resistentes a los antifúngicos”. Los datos obtenidos mostraron que *C. tropicalis* y *C. albicans* fueron las cepas más sensibles mostrando concentraciones inhibitorias mínimas (MIC) de 4.1 µg/mL y 8.2 µg/mL del aceite esencial de Ruda. El ensayo de cinética de muerte por tiempo demostró que el aceite presentó efecto fungicida contra *C. tropicalis* y un efecto fungistático contra *C. albicans*. Además, se erradicó una cantidad del 40% del biofilm formado por *C. albicans* utilizando 8,2 µg/mL del aceite de Ruda tras 1 h de exposición<sup>16</sup>

Dos Reis C., Soares L. y Da Fonseca M. (2021) en la ciudad de Brasil, con su investigación “*Ruta graveolens*, *Pelargonium graveolens* e *Hibiscus cannabinus* como inhibidores farmacológicos naturales del crecimiento de *Candida albicans*”. En este estudio se evaluó in vitro la actividad antifúngica de extractos de *Ruta graveolens*, *Pelargonium graveolens* e *Hibiscus cannabinus* frente al crecimiento de *Candida albicans*, comparando la eficacia de estos extractos vegetales con Fluconazol. Los resultados mostraron que *R. graveolens* es eficaz en la inhibición de *C. albicans* con MIC de 100 mg/mL, en comparación con Fluconazol. Los extractos de Ruda y *H. cannabinus* fueron capaces de inhibir la propagación fúngica de *C. albicans*, pero de forma menos eficiente en comparación con los fármacos comúnmente utilizados en el tratamiento.<sup>17</sup>

Pushpa H, et al (2015) en la India, en su trabajo titulado “Caracterización de la actividad antimicrobiana, antioxidante y anticancerígena de *Ruta graveolens*”. En este estudio se empleó el extracto metanólico de las hojas de *Ruta graveolens* obtenido por maceración, la actividad antimicrobiana de la planta se determinó mediante la técnica de difusión en pozo. Se observó en los resultados que el extracto metanólico de las hojas de *Ruta graveolens* presenta actividad antifúngica contra *Candida albicans*, lo cual se observa con la formación de halo de inhibición de 16 mm; el control positivo (nistatina) empleado, formó un halo de inhibición de 25 mm de diámetro.<sup>18</sup>

Entre los antecedentes nacionales:

Podemos mencionar a Cusquipoma, M. (2018) elaboró su estudio “Efecto antimicótico in vitro del aceite esencial de las hojas de *Ruta graveolens* (Ruda) sobre “*Candida albicans*”. Para su desarrollo, el aceite esencial obtenido por hidrodestilación a partir de las hojas frescas de Ruda, el aceite fue diluido hasta obtener concentraciones de 1.6% y 3.2%, se aplicó la técnica de Kirby-Bauer para determinar el efecto antimicótico del aceite de Ruda y el control negativo fue Fluconazol. Los halos de inhibición formados a las 48 horas fueron de 35.95 mm para el aceite al 1.6% y de 41.25 mm para el aceite al 3.2%, el Fluconazol mostró un halo de 28.69 mm, concluyendo que el aceite esencial presenta efecto antimicótico sobre *Candida albicans*.<sup>19</sup>

Enríquez M. y Gómez G. (2018), en su investigación “Efecto antifúngico in vitro de los extractos hidroetanólicos de *Prosopis pallida* (algarrobo), *Plantago major* (llantén), *Ruta graveolens* (Ruda) sobre *Candida albicans* ATCC 10231®”. Los extractos fueron elaborados por maceración y filtración y se obtuvieron concentraciones de 10% al 100% y un control positivo que fue nistatina. Para evaluar el efecto antifúngico se aplicó el método de difusión en disco. Todos los extractos presentaron efecto antifúngico sobre *Candida albicans*, siendo mayor para el algarrobo que registró halos de 22.90 mm y 21.40 mm para concentraciones de 1000 µg/ml y 900 µg/ml, mientras que para el extracto de Ruda los halos fueron de 21.70 mm, 20.8 mm y 20.3 mm en las concentraciones de 1000 µg/ml, 900 µg/ml y 800 µg/ml.<sup>20</sup>

Vera, J. (2018), publicó su tesis “Eficacia antimicótica de las hojas de *Ruta chalepensis* L. (Ruda) sobre *Trichophyton rubrum*, comparado con Clotrimazol, estudio *in vitro*”. En la ejecución se elaboró un extracto etanólico de las hojas de Ruda a través de la técnica de maceración y luego se evaporó el solvente quedando un extracto seco el cual se diluyó obteniendo concentraciones al 100%, 75% y 50%; la sensibilidad antimicótica se determinó por difusión en disco. Los resultados mostraron halos inhibitorios de 22.5 mm, 15 mm y 11 mm para las concentraciones al 100%, 75%, 50% respectivamente. El Clotrimazol formó un halo de inhibición de 23 mm. Por lo tanto, se concluye que el extracto etanólico de *Ruta chalepensis* L. (Ruda) presenta actividad antimicótica sobre *Trichophyton rubrum*.<sup>21</sup>

Arellano J. et al (2017), publicaron su investigación “Caracterización de compuestos fenólicos presentes en el extracto etanólico de hojas de *Alternanthera lanceolata* (lancetilla)”. Para su desarrollo se realizó la prueba de solubilidad a los extractos en solventes de polaridad creciente, los compuestos fitoquímicos fueron detectados mediante prueba de Shinoda, gelatina y capa fina. Los resultados indicaron que el extracto presentó mejor solubilidad en solventes de mediana polaridad como metanol, etanol y n-Butanol; los compuestos fotoquímicos detectados fueron compuestos fenólicos, flavonoides y glicósidos.<sup>22</sup>

El objetivo general de la investigación es: Determinar la actividad antimicótica *in vitro* del extracto etanólico de las hojas de *Ruta graveolens* L. “Ruda” sobre cepas de *Candida albicans* ATCC 10231®.

Así mismo, la hipótesis general formulada del estudio es: El extracto etanólico de las hojas de *Ruta graveolens* L. “Ruda” presenta actividad antimicótica *in vitro* sobre cepas en *Candida albicans* ATCC 10231®

## MATERIALES Y MÉTODOS

### I.1. Enfoque y diseño de la investigación

El enfoque es cuantitativo, las variables del estudio luego de ser cuantificadas serán analizadas estadísticamente mediante el programa SPSS versión 26 mediante pruebas inferenciales de ANOVA y Tukey.<sup>23</sup>

El diseño es experimental, en la medida que las variables serán modificadas o manipuladas para determinar su relación de causalidad deliberadamente.<sup>24</sup>

El tipo de investigación corresponde a la transversal, prospectiva debido a que los datos serán recolectados en un solo periodo de tiempo y estos serán obtenidos luego del planteamiento del estudio en la etapa de ejecución.<sup>25</sup>

### I.2. Población, muestra y muestreo

#### **Población vegetal**

Está conformada por 5.00 kilogramos de *Ruta graveolens* L. sembrada en el terreno de cultivo, la cual se obtuvo del caserío Villa Hermosa, distrito de Monsefú, provincia de Chiclayo, departamento de Lambayeque, ubicada a una latitud Sur de 6,8752° y longitud Oeste de 79,8655° a 29 m.s.n.m.

#### **Población biológica:**

Conformada por microorganismo *Candida albicans* obtenida por intermedio del laboratorio Microclin SRL.

#### **Muestra vegetal:**

La cantidad de muestra necesaria para la investigación será de 2,5 kilogramos de hojas de *Ruta graveolens* L. "Ruda".

Criterio de inclusión: se seleccionaron las hojas que cumplieron con los requisitos de peso color y tamaño.

Criterio de exclusión: se excluyeron las hojas con signos de contaminación y/o deterioro y que hayan sido recolectadas en zonas geográficas diferentes.

### **Muestra biológica:**

Cultivo puro microbiano de Cepa de *Candida albicans* ATCC 10231® proporcionada y certificada por Microbiologics.

El muestreo seleccionado en la investigación será el no probabilístico, por conveniencia debido a la facilidad de acceso y disponibilidad del investigador para la muestra vegetal.

### **I.3. Variables de investigación**

- **Variable independiente:** Extracto etanólico de las hojas de *Ruta graveolens* L. "Ruda".

**Definición conceptual:** Producto obtenido por proceso físico con etanol de 96° que contiene los metabolitos secundarios de *Ruta graveolens* L. "Ruda".

**Definición operacional:** Maceración etanólica por 10 días con agitación constante y posterior filtrado y concentrado.

- **Variable dependiente:** Actividad antimicótica *in vitro* sobre *Candida albicans*.

**Definición conceptual:** Acción de inhibir el crecimiento bacteriano de *Candida albicans* mediante la aplicación de un extracto o sustancia.

**Definición operacional:** Medición del diámetro del halo de inhibición formado por el extracto etanólico de *Ruta graveolens* L. "Ruda" sobre cultivos de *Candidaalbicans*.

### **I.4. Técnicas e instrumentos para la recolección de datos**

#### **Técnicas:**

**Maceración:** Proceso físico mediante el cual se pone en contacto un solvente (etanol) con una muestra vegetal por cierto periodo de tiempo (10 días) a temperatura ambiente, facilitando la extracción de los metabolitos contenidos en la muestra.<sup>26</sup>

**Difusión en pozo:** Técnica microbiológica que se emplea para determinar la actividad antibacteriana de las muestras mediante la aplicación de estas en pozos construidos en agar con cultivos bacterianos.<sup>27</sup>

## **Instrumentos:**

Ficha de recolección de datos: Ficha que permite el registro de los datos recolectados del tamaño del diámetro del halo de inhibición.

Instrumento de medición (vernier): Instrumento de medida que permite obtener el valor del tamaño del halo de inhibición de manera precisa.

## **I.5. Plan metodológico para la recolección de datos**

### **Recolección y preparación de la muestra vegetal**

- La muestra fue recolectada de la zona caserío Villa Hermosa, distrito de Monsefú, provincia de Chiclayo, departamento de Lambayeque para lo cual se coordinó con los dueños del terreno de cultivo.
- Se recolectaron aproximadamente 2.500g de *Ruta graveolens* L. "Ruda"
- Luego fueron lavadas con agua y desinfectadas con lejía al 0.1% por 5 min. Posteriormente se colocaron en una mesa sobre papel kraft para ser secadas a temperatura ambiente por 2 días.

### **Preparación del extracto etanólico**

- Las hojas secadas a temperatura ambiente (2 días), fueron colocadas en una estufa (EUROTECH) para completar su secado y deshidratación.
- Se llevaron las hojas a una temperatura de 45°C por un tiempo aproximado de 10 horas.
- Luego se realizó el pulverizado en un molinillo.
- Posteriormente se tamizó y se colocó el pulverizado dentro de una botella de vidrio oscuro o ámbar para protegerlo de la luz.
- Se adicionó etanol de 96° y se dejó en maceración a temperatura ambiente, agitando vigorosamente por 5 minutos, 3 veces al día durante 10 días.
- Luego de este tiempo el macerado se filtró y luego se colocó en la estufa a 45 °C, para lograr la evaporación del solvente, por un aproximado de 3-4 días, hasta lograr la evaporación completa.
- Para la preparación de los extractos de *Ruta graveolens* L. "RUDA" a las concentraciones del 50%, 75% y 100%, se pesó 150 mg, 225 mg y 300 mg en un frasco ámbar y se disolvió con 3 ml de etanol de 96° respectivamente.



### **Prueba de solubilidad**

- Se tomó 500 mg del extracto seco de *Ruta graveolens* L. "Ruda" y se colocó en 8 tubos de ensayo.
- Se agregó 1 ml de los solventes: agua destilada, metanol, etanol, terbutanol, acetona, cloroformo, Dimetilsulfoxido y éter respectivamente
- Se agitó vigorosamente por 1 minuto y dejó reposar
- Se observó si existía solubilidad, considerando como escala valorativa: totalmente soluble (+++), medianamente soluble (++) , ligeramente soluble (+) e insoluble (-).

### **Reactivación de la cepa de *Candida albicans*:**

- A la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231<sup>®</sup>, se le agregó la solución estéril contenida en el envase del producto para reconstituir el liofilizado.
- Luego se aplicó en estrías en placa Petri con agar Sabouraud.
- Posteriormente se llevó a incubación por 48 horas a 36°C.
- Transcurrido este tiempo se verificó el crecimiento de las colonias de *Candida albicans* ATCC 10231<sup>®</sup>.

### **Sembrado en placa de las cepas**

- De la placa con el cultivo de *Candida albicans* ATCC 10231<sup>®</sup>, se tomó 3 colonias, las que se suspendieron en un tubo de ensayo con 10 ml de suero fisiológico.
- Se tomó de este 1 ml y se agrega a otro tubo de ensayo con 9 ml de suero fisiológico.
- Se realizaron 3 diluciones (1:10) necesarias, hasta obtener una turbidez similar al tubo 0.5 de la Escala de McFarland; este último tubo fue considerado el inóculo de trabajo.
- Del inóculo, se realizaron sembrados en 30 placas Petri, separando 2

grupos de 15.

- En el primer grupo se realizaron 3 pocitos que correspondieron a las concentraciones del 50%, 75% y 100% de los extractos.
- En el otro grupo de 15 placas se prepararon 2 pocitos correspondientes a los grupos control.
- En cada pocito se aplicaron 30 uL de cada tratamiento respectivamente.

#### **Evaluación de la actividad antimicótica**

- Las placas fueron llevadas a incubación a 36°C por 24 horas.
- Luego se identificó el crecimiento del halo de inhibición formado y se registraron los datos en la ficha de recolección respectivamente.
- Las medidas de los halos de inhibición fueron tomadas por medio de un pie de rey digital (vernier).

#### **I.6. Procesamiento del análisis estadístico**

El procesamiento del análisis estadístico se realizó empleando primero; estadística descriptiva, para mostrar el comportamiento de los datos recolectados, así mismo, la estadística inferencial, para determinar la normalidad y distribución homogéneas de las varianzas mediante la aplicación de la prueba de Shapiro-Wilk y la prueba de Levene, para la contrastación de la hipótesis del estudio, se aplica la prueba de ANOVA y Tukey, con un nivel de significancia de 0.05 empleando el programa estadístico SPSS versión 26.

#### **I.7. Aspectos éticos**

Por ser un estudio experimental *in vitro* con manejo de material biológico de alto riesgo, se aplicaron los criterios y principios de bioseguridad en el laboratorio, siguiendo las guías y protocolos de los manuales internacionales en laboratorios de ensayo para evitar riesgos en las personas participantes; así mismo, se dispuso de procesos para evitar la contaminación del medio ambiente con la contaminación de residuos biológicos mediante las normas establecidas por el Ministerio de Salud.

## II. RESULTADOS

### Contrastación de la hipótesis específica 1:

**H<sub>0</sub>:** El extracto etanólico de las hojas de *Ruta graveolens* L. “Ruda” no presentansolubilidad en solventes polares y apolares

**H<sub>1</sub>:** El extracto etanólico de las hojas de *Ruta graveolens* L. “Ruda” presentan solubilidad en solventes polares y apolares

**Tabla 1. Solubilidad del extracto etanólico de las hojas de *Ruta graveolens* L. “Ruda” en solventes polares y apolares.**

Tubo	Solvente	Solubilidad
N°1	Agua destilada	+
N°2	Metanol	+++
N°3	Etanol	++
N°4	Ter-butanol	+
N°5	Acetona	+
N°6	Cloroformo	-
N°7	Dimetilsulfoxido	++
N°8	Éter	-

Elaboración: propia

Leyenda:

- ❖ (+++): totalmente soluble
- ❖ (++): medio soluble
- ❖ (+): ligeramente soluble
- ❖ (-): insoluble

### Interpretación:

**Tabla 1**, los resultados del análisis de solubilidad del extracto etanólico de *Ruta graveolens* L. “Ruda” en solventes polares y apolares, se observa que es totalmente soluble (+++) en metanol, medianamente soluble (++) al etanol y Dimetilsulfoxido, ligeramente soluble (+) en acetona, ter-butanol y agua destilada; insoluble (-) en cloroformo y éter.

## Análisis:

El estudio de la solubilidad en diferentes solventes, tanto polares como no polares, explican la estructura molecular de los metabolitos obtenidos, por afinidad con estos solventes.

## Decisión:

Se rechaza la hipótesis  $H_0$  y se acepta la hipótesis  $H_1$ , que indica que “El extracto etanólico de las hojas de *Ruta graveolens* L. “Ruda” presentan solubilidad en solventes polares y apolares”

## Contrastación de la hipótesis específica 2:

**$H_0$ :** El extracto etanólico de las hojas de *Ruta graveolens* L. “Ruda” no presenta actividad antimicótica *in vitro* sobre cepas en *Candida albicans* ATCC 10231® en concentraciones mayores al 50%, 75% y 100%.

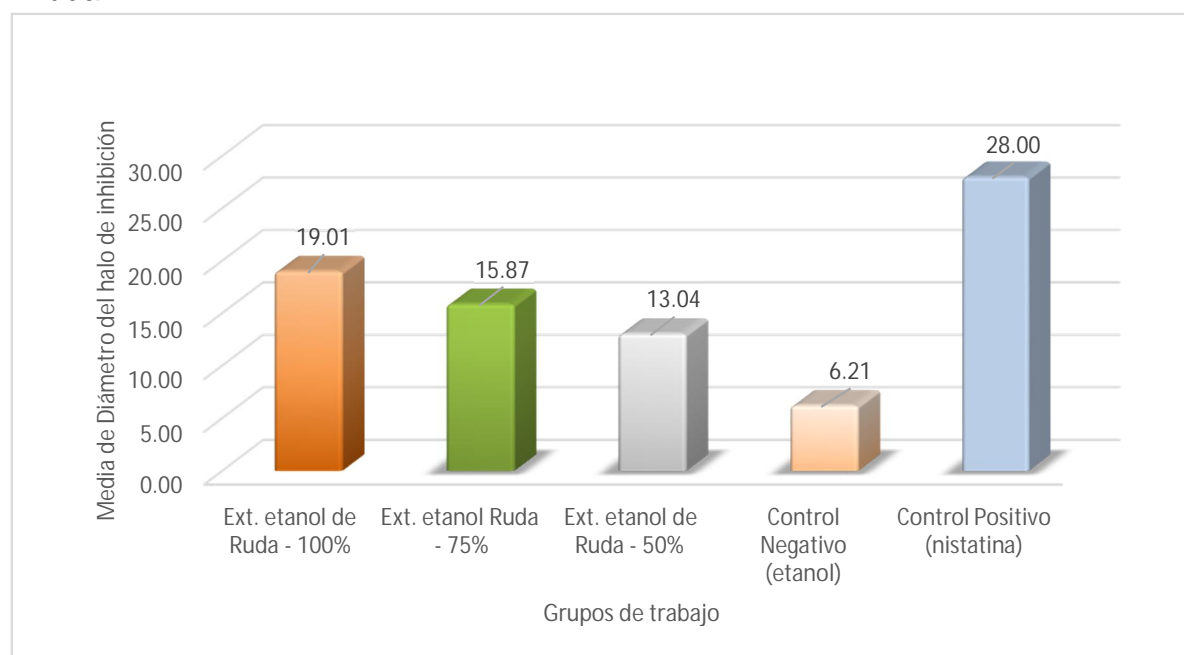
**$H_1$ :** El extracto etanólico de las hojas de *Ruta graveolens* L. “Ruda” presenta actividad antimicótica *in vitro* sobre cepas en *Candida albicans* ATCC 10231® en concentraciones mayores al 50%, 75% y 100%.

**Tabla 2.** Actividad antimicótica *in vitro* del extracto etanólico de las hojas de *Ruta graveolens* L. “Ruda” sobre cepas en *Candida albicans* ATCC 10231® a las concentraciones del 50%, 75% y 100%.

	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		
Ext. etanol de Ruda - 100%	15	19,01	0,44	0,11	18,76	19,25	18,30	19,98
Ext. etanol Ruda - 75%	15	15,87	0,40	0,10	15,65	16,09	15,26	16,62
Ext. etanol de Ruda - 50%	15	13,04	0,33	0,09	12,85	13,22	12,70	13,73
Control Negativo (etanol)	15	6,21	0,20	0,05	6,10	6,32	5,96	6,66
Control Positivo (nistatina)	15	28,00	0,45	0,12	27,75	28,24	26,91	28,63

Fuente: Elaboración propia

**Tabla 2.** Se puede apreciar el tamaño del halo de inhibición de cada grupo de trabajo, mediante el programa SPSS versión 26, para obtener los datos estadísticos; Media, desviación estándar, límites de confianza, el máximo y mínimo encontrados de los valores promedio de los halos de inhibición obtenidos del extracto etanólico de *Ruta graveolens* L. “Ruda” sobre cepas en *Candida albicans* ATCC 10231®, el valor promedio del halo de inhibición al 50% es (13,04mm), 75% (13,04mm) y al 100% (19,01mm), en el control negativo (etanol) se obtuvo halos de inhibición de 6,21mm, y en el control positivo los halos de inhibición fueron de 28,00mm, demostrando efecto antimicótico de los extractos etanólicos de *Ruta graveolens* L. “Ruda”.



**Figura 1:** Actividad antimicótica in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Ruta graveolens* L. “Ruda” sobre cepas en *Candida albicans* ATCC 10231® a las concentraciones del 50%, 75% y 100%.

**Fuente:** Elaboración propia

### **Interpretación:**

**figura 1:** Se observa de manera gráfica, los promedios de los halos de inhibición de cada grupo de trabajo del extracto etanólico de *Ruta graveolens* L. “Ruda” en las diferentes concentraciones, podemos ver que el grupo control nistatina (positivo), obtuvo el mayor promedio del halo de inhibición 28.00 mm y para el extracto etanólico de *Ruta graveolens* L. al 100% obtuvo una media de 19.01 mm.

**Análisis:**

Los datos recolectados con respecto al tamaño del halo de inhibición según el método de difusión en pozo, relacionan la actividad antimicótica *in vitro* del extracto etanólico de las hojas de *Ruta graveolens* L. "Ruda" sobre cepas en *Candida albicans* ATCC 10231<sup>®</sup>, de cada grupo de trabajo analizado a las concentraciones del 50%, 75% y 100%, muestran mayor halo de inhibición comparado con el grupo control negativo (etanol), en tal sentido, se puede deducir, que existe actividad antimicótica contra este hongo.

**Decisión:**

Se rechaza la hipótesis  $H_0$  y se acepta la hipótesis  $H_1$ , que indica que "El extracto etanólico de las hojas de *Ruta graveolens* L. "Ruda" presenta actividad antimicótica *in vitro* sobre cepas en *Candida albicans* ATCC 10231<sup>®</sup> en concentraciones mayores al 50%, 75% y 100%".

### Contrastación de la hipótesis específica 3:

**H<sub>0</sub>:** El extracto etanólico de las hojas de *Ruta graveolens* L. "Ruda", no presenta mayor actividad antimicótica *in vitro* sobre cepas en *Candida albicans* ATCC 10231<sup>®</sup> que la nistatina.

**H<sub>1</sub>:** El extracto etanólico de las hojas de *Ruta graveolens* L. "Ruda", presenta mayor actividad antimicótica *in vitro* sobre cepas en *Candida albicans* ATCC 10231<sup>®</sup> que la nistatina.

**Tabla 3. Prueba de Distribución Normal para cada Grupo de Tratamientos**

	Grupos de trabajo	Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.
<b>Diámetro del halo de inhibición (mm)</b>	Ext. etanol de Ruda 100%	0,969	15	0,843
	Ext. etanol Ruda 75%	0,959	15	0,680
	Ext. etanol de Ruda 50%	0,877	15	0,073
	Control Negativo (etanol)	0,894	15	0,077
	Control Positivo (nistatina)	0,868	15	0,081

Fuente: SPSS ver. 26

### Interpretación:

Se muestran en el análisis realizado, según las pruebas de Shapiro-Wilk para confirmar la distribución normal de los datos analizados, con un nivel de confianza del 95,00%, el nivel de significancia calculado en la tabla supera el nivel de 0,05 establecido por el estudio, por lo tanto, se confirma que todos los grupos de trabajo presentan distribución normal.

**Tabla 4. Análisis de la Varianza (ANOVA)**

Diámetro del halo de inhibición					
	Suma de cuadrados	df	Media al cuadrado	F	p-valor.
<b>Entre grupos</b>	3850,236	4	962,559	6831,432	0,000
<b>Dentro de grupos</b>	9,863	70	0,141		
<b>Total</b>	3860,100	74			

FUENTE: SPSS ver. 26

**Interpretación:**

**Tabla 4**, la prueba de ANOVA o análisis de la varianza aplicada a los grupos de trabajo mediante el programa SPSS versión 26, luego del análisis se observa un p-valor obtenido menor al nivel de significancia del estudio; por lo tanto, la prueba nos confirma que existe diferencia estadísticamente significativa en al menos uno de los grupos de trabajo.

**Tabla 5. Análisis por sub grupos homogéneos mediante la prueba de Tukey**

Diámetro de inhibición						
HSD Tukey <sup>a</sup>						
Grupos de trabajo	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
<b>Control Negativo (etanol)</b>	15	<b>6,21</b>				
<b>Ext. etanol de Ruda 50%</b>	15		<b>13,03</b>			
<b>Ext. etanol Ruda 75%</b>	15			<b>15,87</b>		
<b>Ext. etanol de Ruda 100%</b>	15				<b>19,00</b>	
<b>Control Positivo (nistatina)</b>	15					<b>27,99</b>
<b>Sig.</b>		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

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



### **Interpretación:**

**Tabla 5**, muestra un análisis complementario a la prueba de ANOVA, el cual se realizó mediante la prueba de Tukey, por sub grupos homogéneos, este análisis determinó diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos de trabajo, mostrando en la tabla superior los niveles según el grado y tamaño de halos de inhibición. Se observa que el control negativo (etanol) se ubica en el nivel 1 sin efecto antimicótico sobre *Candida albicans* ATCC 10231<sup>®</sup>, seguido por las concentraciones al 50%, 75% y 100% del extracto de *Ruta graveolens* L. “Ruda” respectivamente y finalmente el control positivo(nistatina)ubicado en el nivel inferior obtuvo mayor efecto inhibitorio sobre *Candida albicans* ATCC 10231<sup>®</sup>.

### **Análisis:**

Luego del análisis estadístico realizado con un nivel de significancia de 0.05, se demuestra a partir de la prueba estadística de ANOVA y Tukey, que la nistatina presenta mayor halo de inhibición, presentando diferencia estadísticamente significativa con el resto de los grupos de trabajo, lo que demuestra la mayor actividad antimicótica in vitro sobre cepas de *Candida albicans* ATCC 10231<sup>®</sup>

### **Decisión:**

Del análisis de los datos se rechaza la Hipótesis **H<sub>1</sub>** y se acepta la hipótesis **H<sub>0</sub>**, que indica que el extracto etanólico de las hojas de *Ruta graveolens* L. “Ruda” no presentamayor actividad antimicótica in vitro sobre cepas de *Candida albicans* ATCC 10231<sup>®</sup>que la nistatina.

**Tabla 6. Comparación de la sensibilidad antibacteriana según la escala de Duraffourd**

Tratamiento	Sensibilidad nula $\leq 8$ mm	Sensible 8–14 mm	Muy sensible 15-20 mm	Altamente sensible > 20 mm
Control Negativo (etanol)	6,21			
Ext. etanol de Ruda 50%		13,03		
Ext. etanol Ruda 75%			15,87	
Ext. etanol de Ruda 100%			19,00	
Control Positivo (nistatina)				27,99

**Tabla 6**, se muestra la escala comparativa de Duraffourd mediante la cual se puede determinar la sensibilidad de *Candida albicans* con respecto a los grupos de trabajo, se observa que este hongo es altamente sensible al control positivo (nistatina), muy sensible al extracto etanólico de *Ruta graveolens* L. “Ruda” al 100% y 75%, así mismo, es sensible al extracto etanólico de *Ruta graveolens* L. “Ruda” al 50% y presenta sensibilidad nula al control negativo.

### III. DISCUSIÓN

#### 4.1. Discusión de Resultados

Las infecciones micóticas se han convertido en una de las infecciones que ataca a las personas comúnmente y que más problemas de salud producen debido a la resistencia de estos a los antimicóticos generalmente producido por la especie *Candida albicans*; por tal motivo, la presente investigación evaluó la actividad antimicótica del extracto etanólico de las hojas de *Ruta graveolens* L. “Ruda” frente a cultivos in vitro de *Candida albicans* ATCC 10231, encontrando los siguientes resultados que se discuten a continuación.

El extracto etanólico de las hojas de *Ruta graveolens* L. “Ruda” presentó solubilidad al someterse a solventes con distinta polaridad, encontrando al emplear metanol que fue totalmente soluble(+++), con etanol y Dimetilsulfoxido (++) se presentó medianamente soluble, con agua destilada, ter- butanol y acetona(+) fue ligeramente soluble, con cloroformo y éter(-) fue insoluble, así mismo, se demostró en un trabajo realizado por Arellano J y colaboradores donde determinaron el grado de solubilidad de los extractos etanólicos de las hojas de *Alternanthera lanceolata* (Lancetilla), dando también como resultados que los extractos etanólicos tienen mejor solubilidad con los solventes de tipo metanol y etanol, corroborándose ambos estudios con resultados semejantes, este tipo de análisis es importante para determinar, qué solventes permiten con facilidad la disolución de los extractos y del mismo modo, facilitan la extracción de los metabolitos secundarios contenidos en la matriz celular de la planta, en ambos estudios se comprobó que el extracto etanólico tiene principios activos (metabolitos secundarios) con características semejantes al etanol y metanol.

Por otro lado, al evaluar los extractos etanólicos de las hojas de *Ruta graveolens* L. “Ruda” sobre cepas en *Candida albicans* ATCC 10231® a las concentraciones del 50%, 75% y 100%, se evaluó el tamaño de la zona de inhibición que produjeron sobre el cultivo en placa, obteniendo que al 50% el halo de inhibición formado fue de 13,04, al 75% de 15,87; y 100% de 19,01; por otro lado, el control negativo empleado (etanol) obtuvo halo de inhibición de 6,21 y el control positivo obtuvo halo de 28,00, en tal sentido al comparar el

tamaño del halo de inhibición formado por los extractos de *Ruta graveolens* L. “Ruda” con el grupo control negativo se confirma que *Ruta graveolens* L. “Ruda”, sí presenta actividad antimicótica in vitro frente a cepas de *Candida albicans* ATCC 10231®, tal como lo confirma la investigación realizada por Dos Reis C., Soares L. y Da Fonseca M. (2021) en Brasil sobre el extracto etanólico de *Ruta graveolens* L. “Ruda”, frente a *Candida albicans*, mediante el método de concentración mínima inhibitoria encontrando un MIC = 100 mg/mL, del mismo modo, Pushpa H, et al (2015) en la India realizó un estudio sobre el extracto metanólico de *Ruta graveolens* L. frente a *Candida albicans* por el método de difusión en pozo, donde logró demostrar actividad antimicrobiana mediante la formación de halos de inhibición de 16 mm para la concentración al 100%; estos resultados al ser evaluados en las mismas condiciones de análisis se muestran similares a los resultados encontrados en nuestro estudio con el extracto etanólico, puesto que para la concentración al 100% se obtuvo un halo de inhibición promedio de 19.0 mm, con respecto a este último estudio de Pushpa H, en comparación con el nuestro, podemos deducir que el metanol extrae mejor los metabolitos secundarios con actividad antibacteriana, que el etanol empleado en nuestro estudio o que las concentraciones de estos presentes en la planta difieren ya que no corresponde a la misma zona geográfica, sin embargo, al comparar nuestros resultados con los obtenidos por Enríquez M. y Gómez G. (2018), quien evaluó el extracto hidroetanólico de *Ruta graveolens* L. (Ruda) sobre *Candida albicans* ATCC 10231® a las concentraciones del 1000 µg/ml, 900 µg/ml y 800 µg/ml muestra halos de inhibición de 21.70 mm, 20.8 mm y 20.3 mm respectivamente, al comparar estos resultados con los nuestros se contraponen, sin embargo, existen los factores que diferencian los estudios, como el solvente empleado para la extracción y la concentración empleada para los análisis, pero sin embargo, nuestros resultados se muestran similares con el estudio realizado por Vera, J. (2018), en el extracto etanólico de hojas de *Ruta chalepensis* L. (Ruda) a las concentraciones de 100%, 75% y 50%; encontrando halos de inhibición de 22.5 mm, 15 mm y 11 mm respectivamente, a pesar de ser dos variedades distintas se observa que presentan la misma actividad antimicótica, siendo las medidas de halos de inhibición cercanas a nuestro a las mismas concentraciones de trabajo (100%, 75% y 50%).

Al comparar los resultados obtenidos por los grupos experimentales de *Ruta graveolens* L. (Ruda) a las concentraciones de 100%, 75% y 50%, y la nistatina sobre el mismo microorganismo (*Candida albicans* ATCC 10231®) demostrándose diferencias estadísticamente significativas en todos los grupos analizados (control y experimentales), demostrándose mayor la actividad antimicótica en el grupo control positivo conformado por la nistatina en comparación con los extractos de *Ruta graveolens* L. (Ruda), similares resultados encontró Dos Reis C., Soares L. y Da Fonseca M. (2021) al comparar la eficacia antifúngica del Fluconazol contra *Candida albicans*, siendo el Fluconazol el que presentó mayor eficacia antifúngica, por otro lado, Vera, J. (2018), encontró también mayor efecto antifúngico en el Clotrimazol que en los extractos, al igual que Pushpa H, et al (2015) encontró al comparar con nistatina, estos estudios confirman la mayor actividad que presentan los medicamentos empleados como patrón en comparación con los extractos. Además de los extractos de esta planta *Ruta graveolens* L. presentar efecto antifúngico sobre *Candida albicans*, también se ha demostrado que el aceite de presenta efectividad antifúngica como lo demuestra los estudios realizados por Donadu, M., Peralta Y. et al. (2021), donde empleando el método de concentración mínima inhibitoria (MIC), demostró que el aceite presentó efecto fungistático contra cepas resistentes de *Candida albicans*, por otro lado, un estudio nacional realizado por Cusquipoma, M. (2018), también evaluó el aceite esencial de *Ruta graveolens* L. (Ruda) a las concentraciones de 1.6% y 3.2% contra cepas de *Candida albicans*, mediante la técnica de Kirby-Bauer encontrando de 35.95 mm para el aceite al 1.6% y de 41.25 mm para el aceite al 3.2%, el fluconazol mostró un halo de 28.69 mm, resultados que se muestran superiores a los encontrados en nuestro estudio, lo que puede explicar que el aceite presenta metabolitos secundarios con mayor actividad antimicótica contra *Candida albicans* o en mayor cantidad que el extracto etanólico.

#### 4.1. Conclusiones

1. Se determinó la actividad antimicótica *in vitro* del extracto etanólico de las hojas de *Ruta graveolens* L. "Ruda" sobre cepas de *Candida albicans* ATCC 10231®.
2. El extracto etanólico de las hojas de *Ruta graveolens* L. "Ruda" es totalmente soluble al metanol y medianamente soluble al etanol y Dimetilsulfoxido.
3. La actividad antimicótica *in vitro* del extracto etanólico de las hojas de *Ruta graveolens* L. "Ruda" sobre cepas en *Candida albicans* ATCC 10231® a las concentraciones del 50%, 75% y 100% formaron halos de inhibición de 13,04mm, 15,87mm y 19,01mm respectivamente, lo que confirma dicha actividad comparada con el control negativo (6,21mm).
4. Se determinó que la nistatina presenta mayor actividad antimicótica *in vitro* que el extracto etanólico de las hojas de *Ruta graveolens* L. "Ruda" a las concentraciones del 100%, 75% y 50%, sobre cepas en *Candida albicans* ATCC 10231®.

#### 4.1. Recomendaciones

- Se recomienda evaluar el poder antimicrobiano del *Ruta graveolens* L. “Ruda” contra diferentes microorganismos e integrado en formulaciones farmacéuticas.
- Realizar estudios de toxicidad en animales, sobre la *Ruta graveolens* L. “Ruda”, para determinar su inocuidad antes de ser probado en consumo directo.
- Difundir el uso de plantas medicinales como tratamiento alternativo para combatir infecciones micóticas y bacterianas y contrarrestar el incremento de la resistencia microbiana.
- Profundizar en el estudio de los metabolitos presentes en *Ruta graveolens* L. “Ruda” mediante técnicas extractivas y estudios de identificación analítica.

## Referencias bibliográficas

1. Zurita S. Situación de la resistencia antifúngica de especies del género *Candida* en el Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 2018;35(1):126–31.
2. Wingard LB. *Basic and Clinical Pharmacology*. Vol. 62, Anesthesia & Analgesia. 2014. 784 p.
3. Cortes J, Ruiz J, Melgarejo L, Lemos E. Candidemia en Colombia. *Biomédica*. 2020;40(1):1–33.
4. Rivero O. Estudio de la resistencia a los antifúngicos en hongos patógenos humanos. Universidad Complutense de Madrid. 2019.
5. Lopes A, Cortes J, Zurita J, Guzman M, Alvarado T, Queiroz F, et al. Recomendaciones para el diagnóstico de la candidemia. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2016;30(3):158–70.
6. Zurita J. Infecciones micóticas: esas enfermedades relegadas de la salud pública. *Bionatura*. 2017;2(3):344–7.
7. Zurita S. Situation of Anti-Fungal Resistance of Species. *Rev Perú MEd Exp Salud Pública*. 2018;35(1):126–31.
8. Fernandez A. Calidad de vida de las personas que viven con VIH/SIDA, en tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA) con manifestaciones dermatológicas en consulta externa de dermatología en el Hospital Regional Lambayeque, en el 2017. Universidad San Martín de Porres; 2019.
9. Attia EZ, Abd El-Baky RM, Desoukey SY, El Hakeem Mohamed MA, Bishr MM, Kamel MS. Chemical composition and antimicrobial activities of essential oils of *Ruta graveolens* plants treated with salicylic acid under drought stress conditions. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018 Dec 1;4(2):254–64.
10. Gonzales A. Obtención de aceites esenciales y extractos etanolicos de plantas del Amazonas, Tesis para Obtener el Grado de Ingeniero Químico, Universidad nacional de Colombia, 2018.
11. Barraza N, Ayala F, Izaguirre H, Luna A, Carranza C. Características clínicas de vulvovaginitis por *Candida albicans* en mujeres en edad reproductiva. *Revista Peruana de Investigación Materno Perinatal*. 2019;8(1):9–17.
12. Francois M, Duncan W, Bernhard H. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*. 2013 Feb 15;4(2):119–28.



13. Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la Terapéutica. 12ed ed. Brunton L, Chabner B, Knollmann B, editors. Mc Graw Hill. México: McGraw-Hill/Interamericana; 2018.
14. NICEATM. Test Method Protocol for Solubility Determination Phase III- Validation Study TEST METHOD PROTOCOL for Solubility Determination In Vitro Cytotoxicity Validation Study Phase III The National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM) Based on Standard Operating Procedure Recommendations from an International Workshop Organized by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM). Natl Toxicol Progr Interag Cent Eval Altern Toxicol Methods. 2013.
15. Test de solubilité chimique [Internet]. Eurolab Laboratory Services. 2021 [citado 1 de junio de 2022]. Disponible en: <https://www.eurolab.net/fr/testler/urun-guvenlik-testleri/kimyasal-cozunurluk-testi/>.
16. Batra S. Preparación del Estándar McFarland en | de Laboratorio Prácticas de Microbiología [Internet]. Paramedics World. 2018 [citado 1 de junio de 2022]. Disponible en: <https://paramedicsworld.com/microbiology-practicals/preparation-of-mcfarland-standard-for-antibiotic-susceptibility-test-ast-in-laboratory/medical-paramedical-studynotes>.
17. Donadu M, Peralta R, Usai D, Maggio F, Molina J, Rizzo D, et al. Colombian essential oil of ruta graveolens against nosocomial antifungal resistant candida strains. Journal of Fungí. 2021;7(5).
18. Reis C, Azevedo L, Casteluber M. Ruta graveolens, Pelargonium graveolens E Hibiscus cannabinus COMO INIBIDORES NATURAIS DO CRESCIMENTO DE Candida albicans. Revista Uningá [Internet]. 2021 Dec 17;58(1): eUJ4124. Available from: <http://revista.uninga.br/index.php/uninga/article/download/4124/2444>.
19. Pushpa H, Shree N, Ramesh D. Screening of Antimicrobial, Antioxidant and Anticancer Activity of Ruta graveolens [Internet]. Semantic Scholar. 2015. Available from: <https://www.semanticscholar.org/paper/Screening-of-Antimicrobial-%2C-Antioxidant-and-of-Pushpa-Shree/fd1b8986e0197fef63e6a90fd555af4f4b3117e8>.
20. Cusquipoma M. Efecto antimicótico in vitro del aceite esencial de las hojas de Ruta graveolens (Ruda) sobre Candida albicans [Internet]. 2018. Available from:

[https://alicia.concytec.gob.pe/vufind/Record/ULAD\\_a1a06adddd15933d1e62ce783cfaae32/Description](https://alicia.concytec.gob.pe/vufind/Record/ULAD_a1a06adddd15933d1e62ce783cfaae32/Description).

21. Enriquez M, Gomez G, Guerrero M. “Efecto antifúngico in vitro de los extractos hidroetanólicos de *Prosopis pallida* (algarrobo), *Plantago major* (llantén), *Ruta graveolens* (Ruda) sobre *Candida albicans* ATCC 10231” [Internet]. 2018. Available from: <https://repositorio.ucv.edu.pe/handle/20.500.12692/26354>.
22. Vera J. Eficacia Anti-Micótica de las hojas de *Ruta chalepensis* L. “Ruda” sobre *Trichophyton rubrum*, comparado con Clotrimazol, estudio in vitro [Internet]. 2018. Available from: <https://repositorio.ucv.edu.pe/handle/20.500.12692/25350>.
23. Arellano J, Ariza A, Avila M, Campbell C, Quispe L, Luna C, et al. Vista de Caracterización de compuestos fenólicos presentes en el extracto etanólico de hojas de *Alternanthera lanceolata* (Benth.) Schinz, Lancetilla. *Revista Peruana de Medicina Integrativa* [Internet]. 2017 [cited 2022 Jun 5];2(3):773–8. Available from: <https://rpmi.pe/index.php/RPMI/article/view/61/59>.
24. Pavón P, Gogeoascoechea M. Metodología de la Investigación II. Universidad Veracruzana, Instituto de Ciencias de la Salud. 2014;44.
25. Anonimo. El diseño de investigación experimental. 2016.
26. Hernández R, Fernández C, Baptista P. Metodología de la Investigación. 6ta ed. México, D.F.: Mc Graw Hill; 2014.
27. McCabe W, Smith CS, Harriot P. Operaciones unitarias en ingeniería química. Séptima Ed. Alayón PER, editor. Mc Graw Hill; 2016.
28. Rodríguez E, Gamboa M, Hernández F, García J. Bacteriología General: Principios y prácticas de laboratorio. 2015.
29. Jarrin J. Actividad antifúngica del extracto hidroalcohólico de hojas de *Moringa oleifera* al 25%, 50%, 75% y 100% sobre cepas de *Candida albicans*. Estudio in vitro. 2018.
30. Autino J, Romanelli G, Ruiz. Diego. Introducción a la Química Orgánica [Internet]. Primera. Argentina: Editorial de la Universidad de La Plata; 2013. 425 p. Disponible en: [editorial@editorial.unlp.edu.ar](mailto:editorial@editorial.unlp.edu.ar)

## **ANEXOS**

## Anexo A. Instrumento de recolección de datos de la actividad antimicótica

### INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA *IN VITRO* DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Ruta graveolens* L. "RUDA" SOBRE CEPAS en *Candidaalbicans*

**Objetivo:** Identificar la actividad antimicótica *in vitro* del extracto etanólico de las hojas de *Ruta graveolens* L. "Ruda" sobre cepas en *Candida albicans* ATCC 10231 a las concentraciones del 50%, 75% y 100%

**Método:** Difusión en agar en pozo, basado en los fundamentos de Kirby Bauer, recomendados por el subcomité de ensayo de susceptibilidad (NCCLS) de los Estados Unidos y la USP 41 en su apartado 11.

Número de ensayos <i>in vitro</i> . Lectura de los halos de inhibición en mm.	GRUPOS EXPERIMENTALES CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO DE RUDA			GRUPOS CONTROL	
	100%	75%	50%	Control Negativo (etanol)	Control positivo (nistatina)
Placa N°01	18,69	14,75	13,12	6,14	27,47
Placa N°02	18,30	16,10	12,75	6,32	28,32
Placa N°03	19,33	16,03	12,87	6,60	28,23
Placa N°04	18,60	16,33	12,70	6,18	28,16
Placa N°05	18,69	15,46	12,78	6,10	28,20
Placa N°06	19,47	15,74	12,97	5,96	28,01
Placa N°07	18,73	16,62	13,52	6,30	27,93
Placa N°08	19,31	16,35	12,72	6,10	27,30
Placa N°09	19,01	15,44	13,23	6,08	28,23
Placa N°10	19,28	15,50	13,40	6,66	26,91
Placa N°11	19,10	16,00	13,33	6,02	28,09
Placa N°12	19,15	14,72	13,73	6,24	28,15
Placa N°13	19,98	15,55	12,80	6,32	28,63
Placa N°14	19,01	16,21	12,74	5,99	27,97
Placa N°15	18,46	15,26	12,88	6,15	28,35
Media de los halos de inhibición (mm)	19,02	15,88	12,99	6,17	27,94

Elaboración propia

Leyenda:

- ❖ nula (-) inferior a 8 mm
- ❖ poco sensible (+) entre 8 a 14 mm
- ❖ sensible (++) entre 14 y 20 mm
- ❖ sumamente sensible (+++) superior a 20 mm

## Anexo B. Instrumento de recolección de datos para la prueba de solubilidad

### INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS PARA LA PRUEBA DE SOLUBILIDAD DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Ruta graveolens* L. (RUDA)

**Objetivo:** Determinar la solubilidad del extracto etanólico de las hojas de *Ruta graveolens* “Ruda” en solventes polares y apolares.

**Método:** Propuesto Autino J. et al (2013), modificado por Jarrin J (2018)<sup>28,29</sup>

Tubo	Solvente	Solubilidad
Nº1	Agua destilada	+
Nº2	Metanol	+++
Nº3	Etanol	++
Nº4	Ter-butanol	+
Nº5	Acetona	+
Nº6	Cloroformo	-
Nº7	Dimetilsulfoxido	++
Nº8	Éter	-

Elaboración: propia

Leyenda:

- ❖ (+++): totalmente soluble
- ❖ (++) : medio soluble
- ❖ (+): ligeramente soluble
- ❖ (-) : insoluble

## Anexo C. Matriz de consistencia

Formulación del problema	Objetivos	Hipótesis
<b>Problema General</b>	<b>Objetivo General</b>	<b>Hipótesis General</b>
¿Cuál será la actividad antimicótica <i>in vitro</i> del extracto etanólico de las hojas de <i>Ruta graveolens</i> L. "Ruda" sobre cepas en <i>Candida Albicans</i> ATCC 10231?	Determinar la actividad antimicótica <i>in vitro</i> el extracto etanólico de las hojas de <i>Ruta graveolens</i> L. "Ruda" sobre cepas de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	El extracto etanólico de las hojas de <i>Ruta graveolens</i> L. "Ruda" presenta actividad antimicótica <i>in vitro</i> sobre cepas en <i>Candida albicans</i> ATCC 10231
<b>Problemas Específicos</b>	<b>Objetivos Específicos</b>	<b>Hipótesis Específicas</b>
¿Cuál será la solubilidad del extracto etanólico de las hojas de <i>Ruta graveolens</i> L. "Ruda" en solventes polares y apolares?	Determinar la solubilidad del extracto etanólico de las hojas de <i>Ruta graveolens</i> L. "Ruda" en solventes polares y apolares.	El extracto etanólico de las hojas de <i>Ruta graveolens</i> L. "Ruda" presentan solubilidad en solventes polares y apolares
¿Cuál será la actividad antimicótica <i>in vitro</i> del extracto etanólico de las hojas de <i>Ruta graveolens</i> L. "Ruda" sobre cepas en <i>Candida albicans</i> ATCC 10231, en concentraciones del 50%, 75% y 100%?	Identificar la actividad antimicótica <i>in vitro</i> del extracto etanólico de las hojas de <i>Ruta graveolens</i> L. "Ruda" sobre cepas en <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 a las concentraciones del 50%, 75% y 100%	El extracto etanólico de las hojas de <i>Ruta graveolens</i> L. "Ruda" presenta actividad antimicótica <i>in vitro</i> sobre cepas en <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 en concentraciones mayores al 50%, 75% y 100%.
¿Cuál será la concentración con mayor actividad antimicótica <i>in vitro</i> del extracto etanólico de las hojas de <i>Ruta graveolens</i> L. "Ruda" comparada con nistatina sobre cepas en <i>Candida albicans</i> ATCC 10231?	Determinar la concentración con mayor actividad antimicótica <i>in vitro</i> del extracto etanólico de las hojas de <i>Ruta graveolens</i> L. "Ruda" comparada con nistatina sobre cepas en <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.	El extracto etanólico de las hojas de <i>Ruta graveolens</i> L. "Ruda", presenta actividad antimicótica <i>in vitro</i> , en comparación con la nistatina sobre cepas en <i>Candida albicans</i> ATCC 10231

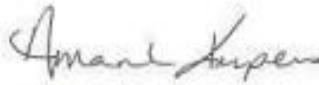


## Anexo D. Operacionalización de las variables

VARIABLES	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIONES	INDICADORES	MEDICIÓN	Nº DE ÍTEMS	VALOR
<b>Variable independiente</b>							
Extracto etanólico de las hojas de <i>Ruta graveolens</i> "Ruda"	Producto obtenido por proceso físico con etanol de 96° que contiene los metabolitos secundarios de <i>Ruta graveolens</i> L. "Ruda"	Maceración de las hojas de la <i>Ruta graveolens</i> L. "Ruda"	Prueba de Solubilidad	*Soluble *Poco soluble *Insoluble	Razón	8	1+ 2+ 3+
			Concentración del extracto	*Porcentaje		3	100 75 50
<b>Variable dependiente</b>							
Actividad antimicótica <i>in vitro</i> sobre cepas de <i>Candida albicans</i>	Acción de inhibir el crecimiento antimicótico de <i>Candida albicans</i> mediante la aplicación de una sustancia	Determinación del tamaño del halo de inhibición (mm)	Método de Difusión de pozo	Diámetros de halos: Escala de Duraffourd y Lapraz.  *Nulo *Poco Sensible *Sensible *Muy sensible	Razón	4	1) ≤ 8mm (-) 2) 8mm-14mm (+) 3) > 14 mm-20mm (++) 4) > 20 mm:(+++)

## Anexo E. Certificado de calidad de la cepa microbiológica



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

<b>Specifications</b> <b>Microorganism Name:</b> Candida albicans <b>Catalog Number:</b> 0443 <b>Lot Number:</b> 443-1006** <b>Reference Number:</b> ATCC® 10231™** <b>Purity:</b> Pure <b>Passage from Reference:</b> 3	<b>Expiration Date:</b> 2022/12/28 <b>Release Information:</b> <b>Quality Control Technologist:</b> Alexandra D Stensvad <b>Release Date:</b> 2020/11/18
<b>Performance</b>	
<b>Macroscopic Features:</b> Small to medium, white, circular, convex, dull colonies. <b>Microscopic Features:</b> Gram positive, ovoidal, budding yeast cells.	<b>Medium:</b> Nutrient <b>Method:</b> Gram Stain (1)
<b>ID System:</b> MALDI-TOF (1)  See attached ID System results document.	<b>Other Features/ Challenges: Results</b> (1) Germ Tube Test: positive (1) Chlamydo-spore 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><small>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</small></p> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div data-bbox="231 1377 438 1534">   <small>ACCREDITED</small>  <small>REFERENCE MATERIAL PRODUCER</small>  <small>CERT #2655.02</small> </div> <div data-bbox="406 1534 1348 1579"> <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="231 1612 438 1769">   <small>ACCREDITED</small>  <small>TESTING CERT #2655.01</small> </div> <div data-bbox="486 1758 853 1792"> <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)	<b>High consistency:</b> 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)	<b>Low consistency:</b> 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)	<b>No consistency:</b> 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 F. Certificación Botánica de la planta

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 "RUDA" proporcionada por los Bachilleres, **Marselina Yohana Bure Cueva Y María Soledad Sequeiros Hinojosa**, Tesistas de la Universidad María Auxiliadora, ha sido estudiada científicamente y determinada como *Ruta graveolens* L. y de acuerdo al Sistema de Clasificación de Cronquist 1981, se ubica en las siguientes categorías:

Reino: Plantae  
División: Magnoliophyta  
Clase: Magnoliopsida  
Orden: Sapindales  
Familia: Rutaceae  
Sub Familia: Rutoideae  
Genero: *Ruta*  
Especie: *Ruta graveolens* L.

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

Lima, 05 junio del 2022

  
Bigo. Hamilton Beltrán  
Hamilton Beltrán Santiago  
Biólogo - Botánico  
C.N. 2719

## Anexo G. Evidencias fotográficas

Figura 2. Recolección y selección de la muestra vegetal



**Figura 3. Lavado y desinfección de la muestra**





**Figura 4. Pulverización y tamizado**





**Figura 5. Proceso de maceración:**



**Figura 6. Proceso de filtración y evaporación**



Figura 7. Preparación de los extractos etanólicos de la planta

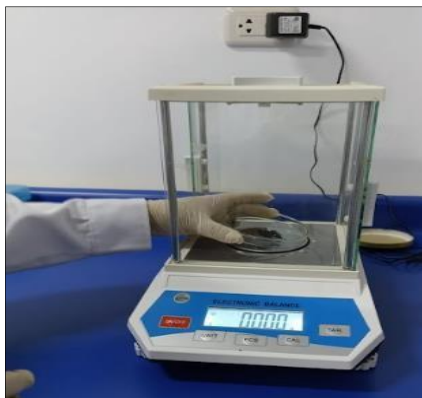
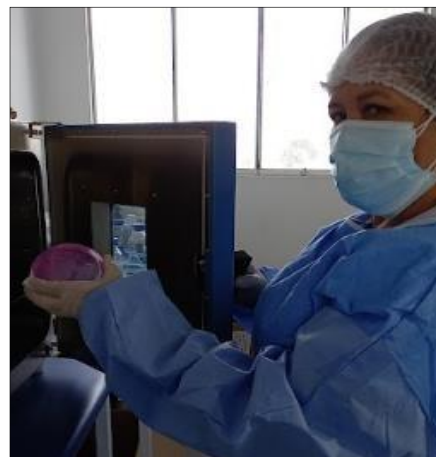


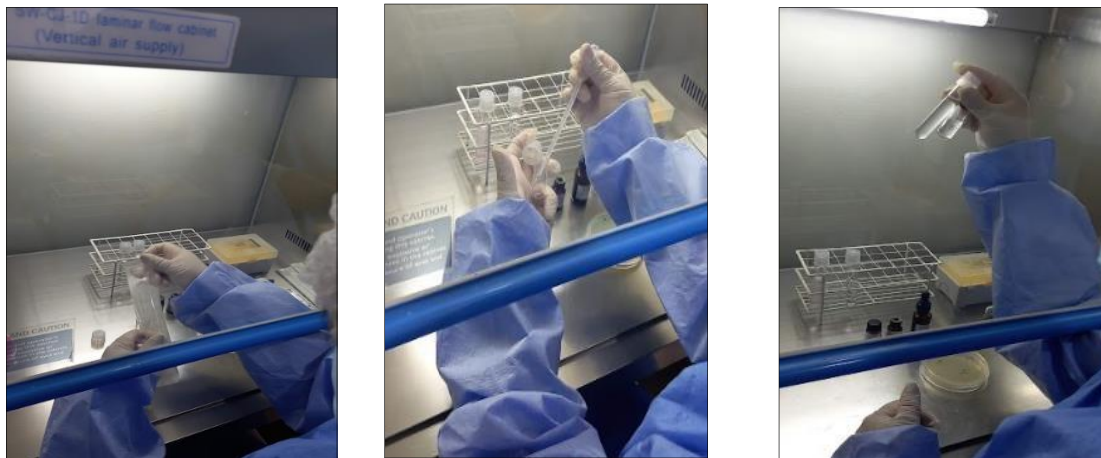




Figura 9. Activación de la cepa



**Figura 10. Preparación del inóculo**



**Figura 11. Sembrado de la cepa en placa y preparación de los pozos en agar**

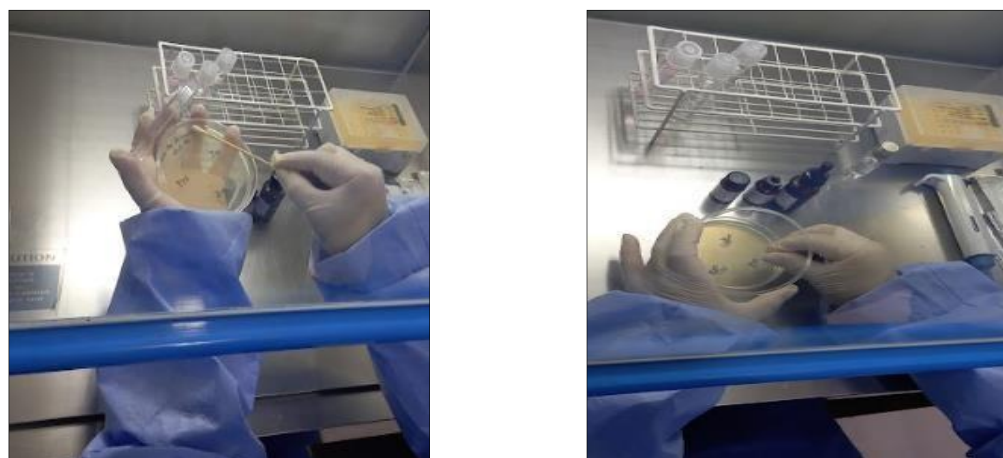


Figura 12. Aplicación de los extractos en placa

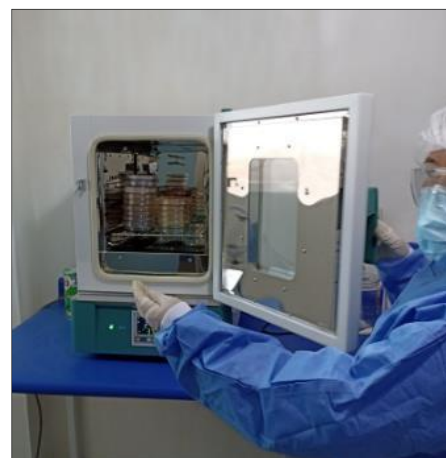




Figura: 13. Medición de halos:

