



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

EFFECTO ANTIMICÓTICO “IN VITRO” DEL ACEITE ESENCIAL DE *Origanum vulgare* “ORÉGANO” Y RESINA DE *Copaifera paupera* “COPAIBA” SOBRE *Candida albicans* ATCC 10231

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTORES:

BACH. REQUEJO MENDOZA, FLOR LILIANA

BACH. VÁSQUEZ ALARCÓN, DARIO

ASESOR

Mg. Q.F. ENRIQUE MONTÁNCHEZ MERCADO

LIMA – PERÚ

2021

Dedicatoria

A Dios por acompañarme en cada decisión y en cada momento de mi vida; por brindarme su dirección y las fuerzas necesarias para seguir adelante a pesar de las dificultades de la vida.

A mis padres, que con sus consejos y dedicación lograron fortalecer mi espíritu para alcanzar mis metas.

Flor Liliana Requejo Mendoza

El presente trabajo de investigación se la dedico en primer lugar a Dios, por darme sabiduría y fuerza necesaria para lograr este anhelo deseado y trazado en mi vida.

A mi padre Victoriano por enseñarme los valores que me han llevado a conseguir una de mis metas, a mi madre María F. por su constante lucha por el bien de su familia. A cada una de mis hermanas María Santos, Guanita Rosa, María teresa y Lucy Maribel por su apoyo incondicional.

A mi hijo Alberto Gabriel por su comprensión y apoyo. A la persona que me alentó y me apoyo incondicional Consuelo Beatriz muchas gracias y que Dios los bendiga siempre.

Dario Vásquez Alarcón

Agradecimiento

Al nuestro asesor Enrique Montánchez Mercado, por apoyarnos durante el proceso de elaboración nuestra tesis y el tiempo que se dio para el desarrollo de este trabajo

Al mis docentes de la escuela de farmacia y bioquímica de la universidad ALAS PERUANAS que aportaron en mí, sus conocimientos y lograron formarme para ser un buen profesional.

Al la UNIVERSIDAD MARIA AUXILIADORA que nos acogió y dio la oportunidad de obtener el título profesional.

Al Dr. Martin Silva Romero, por su gran ayuda, por brindar con paciencia sus conocimientos para el éxito de este trabajo de investigación.

Y a todos los que de una u otra manera han colaborado en la realización de esta tesis.

*A mi maestro y amigo Q.F. Segundo Martín
Silva Romero por el apoyo incondicional al
desarrollo de mi tesis y a la Blga. Flor
Milagros Silva Romero*

*Agradezco a Dios por estar presente en mi
vida brindándome la salud y el conocimiento
para concluir mi meta trazada.*

*A mis grandes amigos de la universidad Flor,
Susana, Ynelda, Renato, Henry y a cada uno
de los docentes por su constante apoyo para
lograr una de mis metas que Dios los bendiga
siempre.*

*A su apoyo incondicional Eva, a la familia
Rodríguez Madalengoitia, mi primo José
David, mis tíos Emilio, Eulogio, María
Angelica y a cada uno de mis amigos decirles,
muchas gracias por creer en mí.*

Índice General

	Páginas
Resumen.....	10
Abstract.....	11
I. INTRODUCCIÓN	12
II. MATERIALES Y MÉTODOS	17
2.1 Enfoque y diseño de investigación	
2.2 Población, muestra y muestreo	
2.3 Variables de investigación	
2.4 Técnica de instrumento de recolección de datos	
2.5 Proceso de recolección de datos	
2.6. Métodos de análisis estadísticos	
2.7 Aspectos éticos	
III. RESULTADOS	21
IV. DISCUSIÓN	27
4.1. Discusión de resultados	
4.2 Conclusiones	
4.3 Recomendaciones	
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
ANEXO.....	36

Índice de Tablas

Tabla 1. Estadística descriptiva de datos grupos analizados	21
Tabla 2. Prueba de la normalidad de los grupos de datos	23
Tabla 3. Prueba de Kruskal – Wallis para muestras independientes	24
Tabla 4. Sensibilidad antimicótica según escala de Duraffourd	26

Índice de Figuras

Figura 1. Gráfico de medias de los grupos de datos	22
Figura 2. Preparación del material de trabajo para extracción de aceite esencial	43
<i>Figura 3. Muestra de orégano en equipo de destilación con arrastre de vapor....</i>	43
<i>Figura 4. Instalación del equipo de destilación por arrastre de vapor</i>	43
<i>Figura 5. Pruebas de las tomas de agua a las líneas del refrigerante.....</i>	43
Figura 6. Instalación y funcionamiento de equipo de destilación con arrastre de vapor	43
Figura 7. Proceso de recolección y separación de las fases acuosa y oleosa del aceite esencial.....	44
Figura 8. Preparación del aceite esencial de orégano y resina de copaiba a diferentes concentraciones.....	45
Figura 9. Preparación del material y equipos de trabajo para microbiología. Esterilizado previo con luz UV	45
Figura 10. Proceso de activación de la cepa ATCC 10231 de <i>Candida albicans</i> .	45
Figura 11. Proceso de dilución y obtención del inóculo de trabajo a la concentración del 0.5 en la escala de McFarland.....	46
Figura 12. Sembrado en placas de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	46
Figura 13. Proceso de rotulado y preparación de los discos a) Rotulado de placas b) Aplicación del aceite de orégano en discos c) Aplicación de resina de copaiba en discos	47
Figura 14. Aplicación de discos con aceite y resina en placas con <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.....	48

Índice de Anexos

Anexo A: Operacionalización de variables	37
Anexo B: Identificación taxonómica <i>Origanum vulgare</i> “Orégano”	39
Anexo C: Identificación taxonómica <i>Copaifera paupera</i> “Copaiba” ¡Error! Marcador no definido.	
Anexo D. Recolección de datos:	38
Anexo E. Certificado de análisis de la cepa <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	39
Anexo F. Evidencias de trabajo de campo	43
Anexo G. Escala de Duraffourd.....	49

Resumen

Objetivo: Demostrar el efecto antimicótico “in vitro” del aceite esencial de *Origanum vulgare* “Orégano” y resina de *Copaifera paupera* “Copaiba” sobre *Candida albicans*.

Métodos: El estudio se basó en un diseño experimental de corte transversal, se emplearon muestras vegetales de *Origanum vulgare* “Orégano” y *Copaifera paupera* “Copaiba”, el aceite de orégano se obtuvo mediante técnica de arrastre por vapor y la resina de copaiba se obtuvo directamente de cortes del árbol, la determinación del efecto antimicótico se determinó mediante la técnica de Kirby-Bauer a distintas concentraciones de las muestras sobre *Candida albicans*, se empleó como control positivo Nistatina y negativo etanol de 96°.

Resultado: Se obtuvo diámetros de 25mm \pm 0.40, 31,2mm \pm 0.32 y 33,2mm \pm 0.31 para el aceite de orégano al 50%, 75% y 100% respectivamente, así mismo, se obtuvo diámetros de 6mm \pm 0.09, 6mm \pm 0.07 y 6,05mm \pm 0.12 para la resina de copaiba al 50%, 75% y 100% respectivamente. El análisis estadístico inferencial se realizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis para muestras independiente la cual mostró que no existe diferencia significativa entre los grupos de datos de la resina de copaiba y el control negativo, sin embargo, el aceite de oregano presentó diferencia significativa entre las distintas concentraciones y el control positivo.

Conclusiones: Se demostró el efecto antimicótico en el aceite de *Origanum vulgare* “Orégano”, sin embargo, la resina de *Copaifera paupera* “Copaiba” presentó actividad nula a todas las concentraciones.

Palabras claves: *Origanum vulgare* “Orégano”, *Copaifera paupera* “Copaiba”, *Candida albicans*, aceite esencial, resina, antimicótico.

Abstract

Objective: To demonstrate the antifungal effect "in vitro" of the essential oil of *Origanum vulgare* "Oregano" and resin of *Copaifera paupera* "Copaiba" on *Candida albicans*.

Methods: The study was based on a cross-sectional experimental design, plant samples of *Origanum vulgare* "Oregano" and *Copaifera paupera* "Copaiba" were used, oregano oil was obtained by means of a steam drag technique and copaiba resin It was obtained directly from tree cuts, the determination of the antifungal effect was determined by the Kirby-Bauer technique at different concentrations of the samples on *Candida albicans*, Nystatin was used as positive control and 96 ° ethanol negative.

Results: Diameters of 25mm + 0.40, 31.2mm + 0.32 and 33.2mm + 0.31 were obtained for oregano oil at 50%, 75% and 100% respectively, likewise, diameters of 6mm + 0.09, 6mm + were obtained. 0.07 and 6.05mm + 0.12 for copaiba resin at 50%, 75% and 100% respectively. The inferential statistical analysis was performed using the Kruskal-Wallis test for independent samples, which showed that there is no significant difference between the data groups of the copaiba resin and the negative control, however, oregano oil presented a significant difference between the different concentrations and the positive control.

Conclusions: The antifungal effect was demonstrated in the oil of *Origanum vulgare* "Oregano", however, the resin of *Copaifera paupera* "Copaiba" showed null activity at all concentrations.

Keywords: *Origanum vulgare* "Oregano", *Copaifera paupera* "Copaiba", *Candida albicans*, essential oil, resin, antifungal.

I. INTRODUCCIÓN

A pesar de que la mayoría de los hongos se encuentran en la naturaleza como saprófitos, algunos tienen la capacidad de colonizar distintos órganos en el ser humano produciendo las infecciones fúngicas¹.

La *Candida albicans* es un hongo tipo levadura que coloniza distintas partes del cuerpo como el tracto respiratorio, digestivo, cavidad oral y vagina produciendo un cuadro patológico conocido como "candidiasis". Se ha observado que en los últimos años se ha presentado un aumento en la incidencia por este tipo de levadura, manifestándose síntomas generalmente graves en pacientes inmunodeprimidos y hospitalizados¹.

Según XIV Encuentro Nacional de Salud y Medicina de la Mujer², se dice que, de cada cuatro mujeres, tres alguna vez en la vida han tenido una infección vaginal, pero que al menos más de la mitad de estas mujeres padecen entre dos y cuatro veces al año de una infección vaginal producida por *Candida albicans*.

La candidiasis vaginal afecta a nivel mundial, al 70 a 75% de mujeres en edad fértil, así mismo, se estima que entre el 40 – 50% de estas presentaran recurrencia, del 5 - 8% presentaran complicaciones graves. Se estima que el 20% de la población sana se encuentran infectadas por *Candida albicans*³.

La situación epidemiológica en los Estados Unidos con respecto a causa séptica muestra en razón a reportes anuales que aumentó durante el periodo 1979 a 2000 en un 207%, correspondiendo al género *Candida* como agente etiológico principal, asimismo, se informó un número de casos de candidemia de 1752, correspondiendo el 44.5% a sucesos ocurridos en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI)⁴.

Estudios epidemiológicos realizados en Brasil, sobre candidemia, demuestran el 34.3 % de prevalencia de *Candida albicans*, contra un 65.7% de *Candida no albicans*, a diferencia del resto de países de América latina en los cuales la prevalencia observada de *Candida albicans* llega al 50.0%⁴.

En el Perú no existen muchos estudios al respecto, en ese sentido, podemos tomar en consideración un reporte realizado de un hospital nacional en el periodo 2004 a 2006, donde señala a la prevalencia de especies causantes de candidemia de un

39.0% para *Candida albicans* y 61.0 % para la especie de *Candida no albicans*, un estudio similar realizado durante el periodo 2009 a 2011 en nueve hospitales nacionales reveló un predominio del 39.9% para la especie de *Candida albicans* y 60.1% para *candida no albicans*⁴.

En pacientes con el VIH/SIDA según estudios realizados en el Perú, se estima 581 174 reportes de enfermedades transmitidas por hongos, de estos 1557 corresponden a candidemia, sin embargo, hay que tener en cuenta que estos números pueden estar subestimados debido a que nuestro país la política sanitaria no exige notificación obligatoria de las enfermedades fúngicas⁴.

A pesar que los fármacos en cierto momento pueden resultar ser muy eficientes su uso indiscriminado conlleva al aumento de resistencia y su ineficacia posterior, tal es así, que ya se ha observado cepas de candida resistentes al fluconazol, no obstante, aún sigue siendo usado en el tratamiento de candidiasis y en cierto modo es usado cuando se presenta resistencia a otro tipo de fármacos⁵.

En América latina y el Perú existe resultados muy similares con respecto a las infecciones fúngicas, asimismo, se observa que el fármaco fluconazol presenta baja resistencia en el tratamiento de micosis y varía según la especie de candida⁴.

En nuestro departamento de Lambayeque se han reportado varios casos de infecciones producidas por *Candida albicans*, siendo estos encontrados en un 15% en trabajadoras sexuales, 6,52% en las reclusas del establecimiento penitenciario de Pícsi, 48,14% en madres gestantes 38,10% en edad fértil de la ciudad de Chiclayo⁶.

Conocedores de esta problemática y de su impacto, presentamos a continuación la base teórica que sustenta la investigación en relación a las variables involucradas.

Origanum vulgare “Orégano” es una planta que proviene de Asia, por sus características aromáticas es muy difundida en el arte culinario, así mismo, se ha empleado en la industria farmacéutica y de perfumería⁷. Esta planta presenta el cafeico, clorogénico, rosmarínico como compuestos fenólicos, apigenol y derivados además de minerales y taninos. El aceite esencial presenta carvacrol, borneol, terpineol, timol y cimeno⁸.

El carvacrol es uno de los constituyentes del aceite esencial que se encuentra en gran cantidad y al que se le atribuye acciones farmacológicas como antimicrobianas, antioxidantes, antimicóticas, antimutagénicas, antígenotóxicas, antihepatotóxicas y hepatoprotectoras⁹.

Así mismo la planta *Copaifera paupera* (Copaiba) se usa como cicatrizante, para tratamiento de hipertensión, en amigdalitis, en casos de asma bronquial crónica, para el tratamiento de cáncer, en problemas urinarios como cistitis, como analgésico para el dolor de oído, para curar hemorroides, herpes, para combatir infecciones, leucorrea¹⁰.

Algunos estudios encontraron que la Copaiba posee sesquiterpénicos (24 hidrocarburos), diterpenos, ác. resínicos (elácico y copaibico); ac. esenciales, trementina, ácido copaifero, B-cariofileno, E-Cubeno, u-Cubebeno, u-humuleno, E-Humuleno y D-Candieno, ácidosresinólico¹¹.

Por otro lado, *Candida albicans*, es el hongo que más micosis produce en las personas. La encontramos en la vagina como parte de la flora natural, mucosa gastrointestinal y bucal. Suelen manifestarse clínicamente como muguet, en la vaginitis, endocarditis, infecciones cutáneas y pulmonar, meningitis, queratomicosis, cistitis, absceso cerebral, entre otras¹².

Lachos E., y Laurente K.¹³ evaluaron el efecto antimicótico in vitro del aceite esencial de *Origanum vulgare* frente a cepas de *Trichophyton rubrum* mediante el método de difusión en agar para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). Los resultados obtenidos muestran efecto antimicótico a una concentración de 0.125%, concluyendo que dicho aceite presenta actividad antimicótica frente a cepas de *Trichophyton rubrum*.

Francia J.¹⁴ determinó actividad antimicrobiana in vitro del aceite de copaiba frente a bacterias patógenas comparado con ceftriaxona, gentamicina y ciprofloxacino sobre *Pseudomonas aeruginosa* mediante la técnica de Kirby-Bauer, llegando a la conclusión que el aceite de copaiba presenta efecto antimicrobiano para *Pseudomonas aeruginosa* pero no para *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*,

Chamba L. ¹⁵ realizó una investigación para demostrar el poder antimicótico de los aceites esenciales de orégano y hierba luisa sobre cepas de *Candida albicans*, observó que el aceite esencial de hierba luisa obtuvo mayor sensibilidad por el hongo que el aceite esencial de orégano, concluyendo que los aceites esenciales de hierba luisa y orégano presentan efectividad antifúngica sobre *Cándida albicans*.

Pfeifer A. et al ¹⁶ realizaron un estudio con el objetivo de evaluar sistemáticamente las propiedades antimicrobianas y citotóxicas de la oleorresina de *Copaifera reticulata*. La fracción ácida de la oleorresina mostró actividad antibacteriana contra cepas grampositivas, *Enterococcus faecium* y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, la purificación de esta fracción produjo 02 ácidos diterpénico que muestran efectividad contra dermatofitos como *Trichophyton rubrum* y *trichopyiton mentagrophytes*.

Marchioro N. et al ¹⁷, compararon la actividad antimicrobiana de muestras de aceite-resina de copaiba natural y comercial (*Copaifera* sp.) sobre las bacterias *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* mediante la técnica de difusión en pozo, encontrando que el aceite de copaiba natural y comercial tienen diferencias mínimas en el potencial de inhibición de patógenos específicos. *Escherichia coli* ATCC 25922 fue más sensible que *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Un estudio realizado por Simoes C. et al, tuvo por objetivo evaluar la actividad antimicrobiana de la óleo-resina de copaíba contra *Streptococcus sp* en biofilm dental, para lo cual se realizó un estudio fitoquímico, se utilizó el método de difusión en agar Brain Heart Infusión obteniendo que el gel de aceite de copaiba experimental y el gel de clorhexidina al 1% mostraron actividad antibacteriana contra los microorganismos probados¹⁸.

De esta manera, la presente investigación determinó la efectividad de estas dos especies orégano y copaiba que servirán en el tratamiento de enfermedades relacionadas a las micosis, especialmente por las producidas por el género *Candida albicans*, porque son estas las que comúnmente se encuentran en las infecciones comunes y hospitalarias, además de haberse reportado una alta incidencia en la última década.

De esta manera el estudio aportará información actualizada que servirá de guía y consulta a investigaciones futuras relacionadas con el tema, aportando la metodológica y técnicas que permitirán la elaboración de proyectos futuros.

El estudio también adquiere importancia social ya que aporta a la comunidad un tratamiento antimicótico alternativo, sin producir resistencia, además de disminuir la prevalencia de este tipo de infección.

Se puede observar importancia práctica, ya que puede implementarse programas hospitalarios y de atención comunitaria, para brindar tratamientos naturales en personas con infecciones micóticas.

El objetivo general del presente estudio es demostrar el efecto antimicótico “in vitro” del aceite esencial de *Origanum vulgare* “Orégano” y resina de *Copaifera paupera* “Copaiba” sobre *Candida albicans* ATCC, para lo cual nos hemos planteado los siguientes objetivos específicos:

- Determinar el efecto antimicótico “in vitro” el aceite esencial de *Origanum vulgare* “Orégano” sobre *Candida albicans* ATCC 10231
- Determinar el efecto antimicótico “in vitro” la resina de *Copaifera paupera* “Copaiba” sobre *Candida albicans* ATCC 10231
- Comparar el efecto antimicótico “in vitro” del aceite esencial de *Origanum vulgare* “Orégano” y resina de *Copaifera paupera* “Copaiba” sobre *Candida albicans* con nistatina.

La hipótesis que se plantea en el estudio es que el aceite esencial de *Origanum vulgare* “Orégano” y resina de *Copaifera paupera* “Copaiba” presenta efecto antimicótico sobre *Candida albicans* ATCC 10231

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Enfoque y diseño de investigación

El enfoque de la investigación es del tipo cuantitativo con un diseño experimental y transversal ^{19,20}.

Es experimental, debido a la participación e influencia sobre las variables que presenta el investigador, quien manipula las variables para obtener los resultados, del mismo modo, es un estudio transversal, porque la recolección, identificación y análisis de las variables y su respuesta se realiza en un solo momento.

2.2 Población, muestra y muestreo

La población del estudio **está** conformada por las cepas de *Candida albicans*, *Origanum vulgare* “Orégano” y *Copaifera paupera* “Copaiba” las cuales fueron recolectadas en el distrito de Inkahuasi de la provincia de Ferreñafe, departamento de Lambayeque ubicado a 6.2364 grados de latitud Sur y 79.3147 de longitud Oeste y en el distrito de Nauta, provincia de Loreto, departamento de Loreto ubicado a 4.507310 grados de latitud Sur y 73.5837 de longitud Oeste.

La muestra que se recolectó fue de 5 kilogramos de *Origanum vulgare* y 100 ml de oleo resina de *Copaifera paupera* mediante un tipo de muestreo no probabilístico por conveniencia. La cepa que se empleó en el estudio microbiológico fue *Candida albicans* ATCC 10231.

2.3 Variables de investigación

Las variables de estudio se detallan en el cuadro a continuación.

VARIABLE INDEPENDIENTE	DIMENSIONES	TIPO	ESCALA	INDICADORES	UNIDAD DE MEDIDA/PUNTO DE CORTE
Aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> "Orégano"	Concentración	Cuantitativo	Ordinal	100%	Porcentaje
Resina de <i>Copaifera paupera</i> "Copaiba"				75%	
				50%	
VARIABLE DEPENDIENTE	DIMENSIONES	TIPO	ESCALA	INDICADORES	UNIDAD DE MEDIDA/PUNTO DE CORTE
Efecto antimicótico	Halo de inhibición	Cuantitativo	Ordinal	Nula Sensible Medio Muy sensible	≤ 8mm 9mm a 14mm 15mm a 19mm ≥ a 20mm

Variable independiente: Aceite esencial de *Origanum vulgare* "Orégano" y Resina de *Copaifera paupera* "Copaiba"

Definición conceptual: Concentración al 50%, 75% y 100% del aceite de orégano y resina de copaiba

Definición operacional: Aceite de orégano elaborado mediante método de arrastre con vapor y resina obtenida mediante corte directo en tronco del árbol.

Variable dependiente: Efecto antimicótico frente a *Candida albicans*

Definición conceptual: El diámetro del halo de inhibición es la zona donde no existe crecimiento del hongo que se relaciona con el efecto antimicótico.

Definición operacional: El efecto antimicótico se evaluó mediante el método de Kirby Bauer, con lectura directa de los halos de inhibición

2.4 Técnica de instrumento de recolección de datos

La técnica empleada será la de Kirby-Bauer, técnica estandarizada para medir el poder antimicrobiano de las sustancias y el instrumento de recolección de los datos que se empleó fue el vernier digital²².

2.5 Proceso de recolección de datos

2.5.1. Obtención del aceite esencial de *Origanum vulgare* “Orégano”:

Se pesó 5000g de hojas secas de *Origanum vulgare* “Orégano”, luego se instaló el equipo de arrastre por vapor, se agregó 8 litros de agua y se colocó 500g de muestra en el recipiente del equipo, se selló e instaló el refrigerante con las líneas a la toma de agua.

Se colocó el equipo a una cocina eléctrica y dejó calentar hasta ebullición, se colocó en el extremo de la salida del equipo una pera de decantación y se dejó destilar por 3 horas, luego se realizó la misma operación hasta que se agotó la muestra.

2.5.2. Obtención de la resina de *Copaifera paupera* “Copaiba”:

La resina de *Copaifera paupera* “Copaiba” se obtuvo realizando cortes en diagonal en “V” en la parte del tronco del árbol, las que fueron recolectadas en un recipiente estéril color ámbar de aproximadamente 100 ml que posteriormente fueron almacenadas a una temperatura entre 2 a 8°C.

2.5.3. Reactivación de la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231:

La reactivación de la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231 se realizó según la información técnica del catálogo de la empresa importadora de la cepa, siguiendo los protocolos de bioseguridad.

2.5.4. Sembrado en placa de cepa de *Candida albicans* ATCC 10231:

Obtenida la cepa activada, se extrajo una colonia y se procedió a preparar el inóculo, con diluciones seriadas empleando solución salina fisiológica hasta llegar a una concentración del 0.5 en la escala de McFarland. Posteriormente con un hisopo y eliminando el exceso por las paredes del tubo de vidrio, se extrajo una muestra de la

solución y procedió a sembrar en la superficie del medio de cultivo, agar de Müller Hinton, de manera uniforme en toda la placa.

2.5.5. Evaluación del efecto antimicótico:

Para la evaluación del efecto antimicótico se empleó discos de papel filtro estériles de aproximadamente 6mm de diámetro a los cuales se les aplicó cada una de las concentraciones del extracto de aceite esencial de orégano y la resina de copaiba al 50%, 75 % y 100 %.

Después, con pinza estéril se colocó los discos embebidos con la sustancia a analizar sobre los cultivos del hongo en placas petri preparadas previamente. Se colocó cinco discos por cada placa 01 control negativo (Etanol 96°), 01 control positivo (Nistatina), 01 disco al 100%, 01 disco al 75% y 01 disco al 50%, con 15 repeticiones de cada uno tanto para las muestras de aceite de orégano como para la resina de copaiba.

Luego se llevó a incubación por 24 horas a $35^{\circ}\text{C} \pm 1$, para posteriormente determinar el efecto antimicótico en placa mediante la lectura de los halos de inhibición formados, con el vernier digital. Los datos fueron registrados en el instrumento de recolección de datos (ver anexo B) y contrastados con la escala de Duraffourd (ver anexo H).

2.6. Métodos de análisis estadísticos

Los datos obtenidos fueron analizados mediante un software estadístico SPSS versión 26, se determinó la estadística descriptiva de cada grupo de datos, así mismo, se realizaron pruebas de estadísticas de normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk, posteriormente se realizó la prueba inferencia de Kruskal-Wallis para datos no paramétricos. Se emplearon para cada caso un nivel de significancia alfa = 0.05.

2.7 Aspectos éticos

Debido al diseño experimental in vitro se consideró el principio de no maleficencia, no se produjo daño ni lesiones al personal participante de la investigación ni al medio ambiente cuidando en todo momento seguir los protocolos de bioseguridad en el laboratorio y desechos de residuos sólidos.

III. RESULTADOS

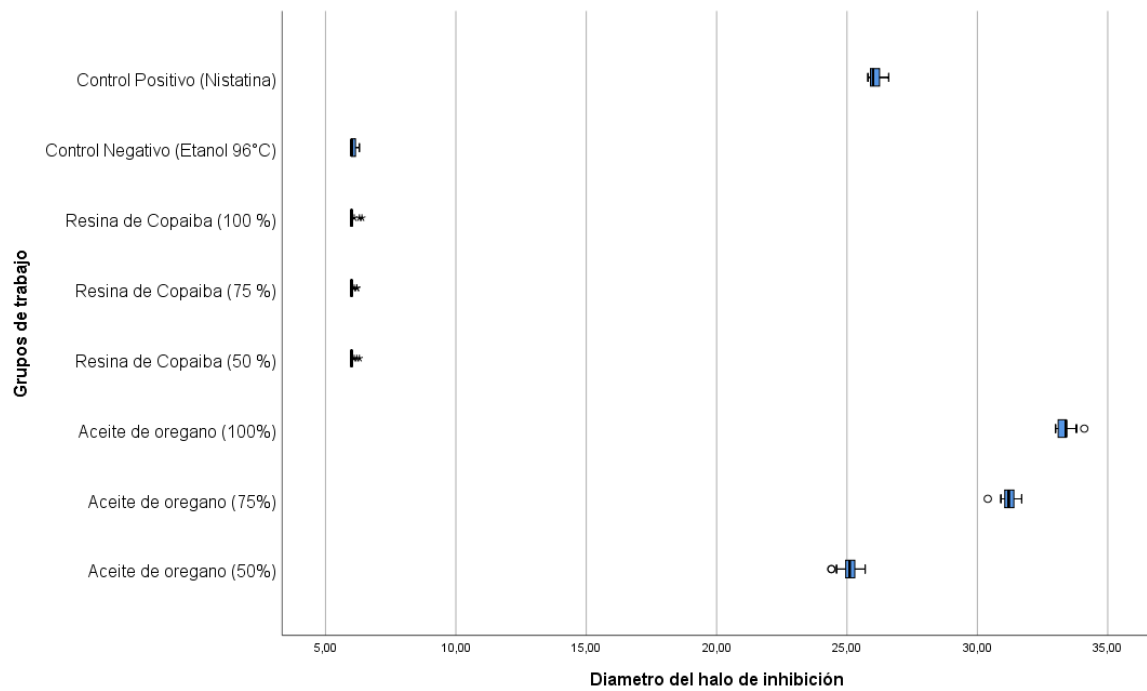
Tabla 1. Estadística descriptiva de datos grupos analizados

Diámetro del halo de inhibición

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Intervalo de confianza para la media		Minimum	Maximum
					Límite inferior	Límite superior		
Aceite de orégano (50%)	15	25,1	0,400	0,103	24,86	25,30	24,40	25,70
Aceite de orégano (75%)	15	31,2	0,321	0,083	31,01	31,37	30,40	31,70
Aceite de orégano (100%)	15	33,2	0,315	0,081	33,21	33,56	33,00	34,10
Resina de Copaiba (50 %)	15	6,0	0,091	0,023	5,99	6,09	6,00	6,30
Resina de Copaiba (75 %)	15	6,0	0,072	0,018	5,993	6,07	6,00	6,20
Resina de Copaiba (100 %)	15	6,05	0,124	0,032	5,984	6,12	6,00	6,40
Control Negativo (Etanol 96°C)	15	6,07	0,116	0,03003	6,008	6,14	6,00	6,30
Control Positivo (Nistatina)	15	26,07	0,246	0,06360	25,936	26,2097	25,80	26,60
Total	120	17,49	11,752	1,07282	15,367	19,6160	6,00	34,10

Fuente: SPSS ver. 26. 2020

La tabla 1 muestra los valores de la media, desviación estándar y error estándar, así como los intervalos máximo y mínimo con una confianza del 95% y sus respectivos valores máximo y mínimo obtenidos para cada grupo de datos analizados incluyendo los controles negativos y positivos mediante el programa estadístico SPSS versión 26. Se puede observar una relación creciente en el promedio del tamaño de los halos de inhibición formados en el grupo del aceite de orégano conforme aumenta la concentración de este. No se observa aumento del tamaño del halo de inhibición en el grupo de la resina de copaiba, el tamaño promedio del halo es comparable con el control negativo.



Fuente: SPSS ver. 26. 2020

Figura 1. Gráfico de medias de los grupos de datos

En la figura 1, se muestra el comportamiento creciente del efecto antimicótico en relación a su concentración del aceite de orégano sobre *Cándida albicans*, sin embargo, no se observa ningún efecto antimicótico en la resina de copaiba, mostrando un efecto similar al control negativo (etanol 96°). El control positivo de nistatina muestra un efecto antimicótico inferior (26.07mm) al aceite de orégano para las concentraciones de 75% y 100%, con un halo de inhibición promedio de 31.2mm y 32.2mm. La concentración al 50% del aceite de orégano presento un efecto menor al control positivo.

Tabla 2. Prueba de la normalidad de los grupos de datos

	Grupos de trabajo	Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.
Diámetro del halo de inhibición	Aceite de orégano (50%)	0,901	15	0,099
	Aceite de orégano (75%)	0,942	15	0,406
	Aceite de orégano (100%)	0,870	15	0,034
	Resina de Copaiba (50 %)	0,520	15	0,000
	Resina de Copaiba (75 %)	0,514	15	0,000
	Resina de Copaiba (100 %)	0,502	15	0,000
	Control Negativo (Etanol 96°C)	0,664	15	0,000
	Control Positivo (Nistatina)	0,906	15	0,118

Fuente: SPSS ver. 26. 2020

La tabla 2, muestra el análisis de la normalidad de los grupos de datos empleando la prueba de Shapiro-Wilk, se observa un nivel de significancia mayor al alfa de 0.05 para el caso del grupo de datos del aceite de orégano al 75% y el control positivo de nistatina los cuales presentan un valor de 0.406 y 0.118 respectivamente, por lo tanto, solo estos grupos de datos presentan distribución normal, el resto de grupos de datos no presentan distribución normal.

Tabla 3. Prueba de Kruskal – Wallis para muestras independientes

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Diámetro del halo de inhibición is the same across categories of Grupos de trabajo.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	0,000	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,050.

Pairwise Comparisons of Grupos de trabajo

Sample 1-Sample 2	Test Statistic	Std. Error	Std. Test Statistic	Sig.	Adj. Sig. ^a
Resina de Copaiba (75 %)- Resina de Copaiba (50 %)	0,300	12,335	0,024	0,981	1,000
Resina de Copaiba (75 %)- Resina de Copaiba (100 %)	-0,767	12,335	-0,062	0,950	1,000
Resina de Copaiba (75 %)- Control Negativo (Etanol 96°C)	-4,533	12,335	-0,368	0,713	1,000
Resina de Copaiba (75 %)- Aceite de orégano (50%)	38,900	12,335	3,154	0,002	,045
Resina de Copaiba (75 %)- Control Positivo (Nistatina)	-53,900	12,335	-4,370	0,000	,000
Resina de Copaiba (75 %)- Aceite de orégano (75%)	68,900	12,335	5,586	0,000	,000
Resina de Copaiba (75 %)- Aceite de orégano (100%)	83,900	12,335	6,802	0,000	,000
Resina de Copaiba (50 %)- Resina de Copaiba (100 %)	-0,467	12,335	-0,038	0,970	1,000
Resina de Copaiba (50 %)- Control Negativo (Etanol 96°C)	-4,233	12,335	-0,343	0,731	1,000
Resina de Copaiba (50 %)- Aceite de orégano (50%)	38,600	12,335	3,129	0,002	0,049
Resina de Copaiba (50 %)- Control Positivo (Nistatina)	-53,600	12,335	-4,345	0,000	0,000
Resina de Copaiba (50 %)- Aceite de orégano (75%)	68,600	12,335	5,562	0,000	0,000
Resina de Copaiba (50 %)- Aceite de orégano (100%)	83,600	12,335	6,778	0,000	0,000

Resina de Copaiba (100 %)- Control Negativo (Etanol 96°C)	-3,767	12,335	-,305	0,760	1,000
Resina de Copaiba (100 %)- Aceite de orégano (50%)	38,133	12,335	3,092	0,002	0,056
Resina de Copaiba (100 %)- Control Positivo (Nistatina)	-53,133	12,335	-4,308	0,000	0,000
Resina de Copaiba (100 %)- Aceite de orégano (75%)	68,133	12,335	5,524	0,000	0,000
Resina de Copaiba (100 %)- Aceite de orégano (100%)	83,133	12,335	6,740	0,000	0,000
Control Negativo (Etanol 96°C)-Aceite de orégano (50%)	34,367	12,335	2,786	0,005	0,149
Control Negativo (Etanol 96°C)-Control Positivo (Nistatina)	-49,367	12,335	-4,002	0,000	0,002
Control Negativo (Etanol 96°C)-Aceite de orégano (75%)	64,367	12,335	5,218	0,000	0,000
Control Negativo (Etanol 96°C)-Aceite de orégano (100%)	79,367	12,335	6,434	0,000	0,000
Aceite de orégano (50%)- Control Positivo (Nistatina)	-15,000	12,335	-1,216	0,224	1,000
Aceite de orégano (50%)- Aceite de orégano (75%)	-30,000	12,335	-2,432	0,015	0,420
Aceite de orégano (50%)- Aceite de orégano (100%)	-45,000	12,335	-3,648	0,000	0,007
Control Positivo (Nistatina)- Aceite de orégano (75%)	15,000	12,335	1,216	0,224	1,000
Control Positivo (Nistatina)- Aceite de orégano (100%)	30,000	12,335	2,432	0,015	0,420
Aceite de orégano (75%)- Aceite de orégano (100%)	-15,000	12,335	-1,216	0,224	1,000

Each row tests the null hypothesis that the Sample 1 and Sample 2 distributions are the same.

Asymptotic significances (2-sided tests) are displayed. The significance level is ,05.

a. Significance values have been adjusted by the Bonferroni correction for multiple tests.

En la tabla 3, el resumen de la prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes muestra un nivel de significancia menor al alfa de 0.05, por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alterna que indica que existe diferencia en el diámetro de los halos de inhibición de los grupos de datos. El análisis por parejas de grupo de datos determinó que no existe una diferencia significativa en los grupos de datos correspondiente a la Resina de Copaiba y el control negativo, sin embargo, sí existe diferencia significativa en los grupos de datos del aceite de orégano y el control positivo de nistatina.

Tabla 4. Sensibilidad antimicótica según escala de Duraffourd

Sensibilidad antimicótica	Diámetro del halo e inhibición			
	-	+	++	+++
	< 8 mm	9–14 mm	15-19 mm	> 20 mm
Aceite de orégano (50%)				SENSIBLE
Aceite de orégano (75%)				SENSIBLE
Aceite de orégano (100%)				SENSIBLE
Resina de Copaiba (50 %)	NULA			
Resina de Copaiba (75 %)	NULA			
Resina de Copaiba (100 %)	NULA			
Control Negativo (Etanol 96°C)	NULA			
Control Positivo (Nistatina)				SENSIBLE

Fuente: Elaboración propia

La tabla 4 muestra una comparación del efecto antimicótico según la escala de Duraffourd, se observa que el aceite de orégano a las concentraciones del 50%, 75% y 100% son “sensibles” a *Candida albicans* ATCC 10231, así como la Nistatina, sin embargo, la resina de Copaiba presenta sensibilidad “nula”.

IV. DISCUSIÓN

4.1. Discusión de resultados

Los aceites esenciales obtenidos de las plantas son sustancias con un olor característico perceptible al olfato humano, de naturaleza oleosa y se encuentran en todas las partes de las plantas, pero en diferentes concentraciones, por tal motivo, pueden ser extraídos de los tallos, hojas, flores, raíces, etc²³.

Los aceites esenciales están compuestos por diferentes sustancias químicas como hidrocarburos, fenoles, esterres, éteres, aldehídos, cetonas entre otros. En el caso, del aceite de *Origanum vulgare* está conformado por cis- β -Terpineol, γ -terpineno, carvacrol, timol, borneol, cimeno α -terpineno, p-cimeno, etc; aunque algunos de estos compuestos puede estar ausentes y en cantidades variables debido a diversos factores como el clima, lugar, estación de la cosecha, condiciones del suelo, entre otros condicionantes ecológicos.^{9,24,25} Carhuapoma M. et al. indican que el porcentaje de los compuestos se afectado por la altitud del cultivo, así mismo, Arcila–Lozano, et al. afirman que este porcentaje también depende de la estación del año, la recolecciones en otoño presentarían menores concentraciones²⁶.

El orégano comúnmente es usado en alimentos, pero también tradicionalmente se usa para tratar enfermedades. Los aceites esenciales de esta planta han sido investigados en diferentes estudios y se les ha atribuido propiedades farmacológicas antimicrobianas, antihepatotóxicas, antígenotóxicas entre otras, especialmente debido al carvacrol y timol presentes.⁹

El timol y carvacrol son compuestos fenólicos de origen natural que presentan propiedades antimicrobianas, estos componentes tienen varios sitios de acción a nivel de la pared y membrana celular, enzimas metabólicas, sistema genético y síntesis proteicas, lo cual puede causar inhibición en su crecimiento.^{27,28}

Ultee A., et al. lograron demostrar que el carvacrol presenta una alta afinidad por la membrana bacteriana de *B. cereus*, además este se acumula en la membrana citoplasmática produciendo su expansión o hinchazón, el potencial de membrana

también se ve afectado. El estudio demostró que el grupo hidroxilo del carvacrol y timol ayudan a sus propiedades antimicrobianas.²⁹

Los dobles enlaces conjugados que presentan el timol y carvacrol potencian la actividad antimicrobiana de estos compuestos debido a la influencia de su densidad electrónica en dos planos que produce inestabilidad en la membrana³⁰.

La resina de copaiba es extraída del tronco de los árboles y es utilizada en la región de la selva comúnmente para tratar muchas enfermedades, existen también estudios que revelan su poder antimicrobiano a partir de sus componentes sesquiterpenos que poseen, β y trans-cariofileno, α -humuleno, α -cadinol, α -cubebeno, β -elemeno, α -copaeno, trans- α -bergamoteno y β -bisaboleno siendo el β cariofileno el que representa en primer lugar su poder antimicrobiano.

Estudios realizados por Goren et al.,³¹ demostraron la actividad antibacteriana del β -cariofileno contra *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*. Similar estudio como el de Pieri et al.,³² demostró inhibición del crecimiento en cepas de *Staphylococcus aureus* del aceite de copaiba.

En el estudio se determinó el efecto antimicótico del aceite esencial de *Origanum vulgare* "orégano" y de la resina *Copaifera paupera* "copaiba" mediante el método de difusión en disco empleando la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231, los resultados mostraron diámetros de halo de inhibición para el aceite de *Origanum vulgare* "Orégano" de 25.1mm, 31.2mm y 33.2mm a las concentraciones de 50%, 75% y 100% respectivamente, los cuales se muestran en la tabla 1, el tamaño de los halos de inhibición nos demuestra el efecto antimicótico del aceite de *Origanum vulgare* "Orégano" sobre *Candida albicans*, considerándose a este microorganismo sensible a este aceite según la escala de Duraffourd.

Un estudio similar fue el realizado por Chamba L., empleando el aceite esencial de orégano sobre *Candida albicans*, obtuvo halos de inhibición promedio de 12.0mm, 15.4mm y 18.0mm; la Nistatina se usó como control positivo y presentó un halo de inhibición de 8.7mm, demostrando que el aceite tiene un efecto antimicótico sobre *Candida albicans*, resultado similar a nuestro estudio.

Lachos E., y Laurente K. demostraron también actividad antimicótica del aceite esencial de orégano frente a un hongo dermatofito *Trichophyton rubrum*, empleando el método de dilución en medio líquido para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y el método de difusión en agar para la concentración mínima fungicida (CMF), encontrando una CMI al 0.25% y una CMF al 0.125% del aceite de orégano.

Por otro lado, la determinación de la actividad antimicótica de la resina de *Copaifera paupera* "Copaiba" a diferentes concentraciones no mostró efecto contra *Candida albicans*, los datos obtenidos fueron analizados mediante la prueba no paramétrica de Prueba de Kruskal – Wallis demostrándose un efecto nulo o similar al control negativo.

Estudio similar fue el realizado por Francia J, en su estudio donde expusieron el aceite de copaiba frente a cepas ATCC de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* mediante la técnica de difusión en disco, dicho estudio no pudo demostrar efecto antimicrobiano del aceite de copaiba para *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, sin embargo, *Pseudomonas aeruginosa* presentó halos de inhibición de 6mm; se empleó controles positivos de cextriaxona, gentamicina, ciprofloxacino los que mostraron halos de inhibición superiores a los 24mm, por lo tanto, no puede considerarse un efecto antimicótico eficaz del aceite de copaiba para esta bacteria.

En contraposición los estudios realizados por Pfeifer A. et al., de la oleorresina de *Copaifera reticulata* brasileña mostraron actividad antibacteriana contra bacterias gram positivas como *Enterococcus faecium* y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM), en el estudio se empleó la fracción ácida de la oleorresina lo que produjo dos ácidos diterpénicos dicarboxílicos. Del mismo modo Marchioro N. et al., determinaron actividad antimicrobiana de la resina sobre *Staphylococcus aureus* y *E. coli*. Simoes C. et al., encontraron efecto contra *Streptococcus sp.*

Sin embargo, la eficacia antimicrobiana de los compuestos del aceite de copaiba no debe atribuirse de forma aislada. De hecho, es posible que diferentes sesquiterpenos presentes en los aceites de copaiba presenten una interacción sinérgica, contribuyendo así a los efectos antimicrobianos observados en diversos estudios.

El control positivo (nistatina) presentó un halo de inhibición promedio de 26.07 el cual fue contrastado con los tratamientos a base de resina de *Copaifera paupera* "Copaiba" y aceite de *Origanum vulgare* "Orégano", este último presentó mayor efecto a las concentraciones de 75% y 100% y menor efecto a la concentración del 50% comparado con la nistatina.

4.2 Conclusiones

- El aceite esencial de *Origanum vulgare* “orégano” demostró tener efecto antimicótico sobre *Candida albicans* a las concentraciones de 50%, 75% y 100%.
- La resina de *Copaifera paupera* “Copaiba” no demostró tener efecto antimicótico sobre *Candida albicans* a las concentraciones de 50%, 75% y 100%. La prueba de Kruskal-Wallis confirmó su efecto nulo comparado con el control negativo.
- El aceite esencial de *Origanum vulgare* “orégano” presentó efecto antimicótico significativamente mayor sobre *Candida albicans* que la nistatina a las concentraciones de 75% y 100%, la concentración del 50% resultó tener menor efecto.

4.3 Recomendaciones

- Se ha demostrado el efecto antimicótico del aceite de orégano, pero existe la necesidad de promover estudios de aplicación a través de formulaciones farmacéuticas de faciliten el uso de la población.
- Se necesita realizar estudios fitoquímicos con equipos instrumentales que determinen los compuestos y las concentraciones de estos contenidos en los aceites, ya que existe variabilidad de estos debido a diversos factores ecológicos, esto nos permitiría determinar que compuesto permite a la planta presentar su poder antimicótico o la falta de estos.
- Se necesita ampliar estudios con respecto a la resina de *Copaifera paupera* “Copaiba” ya que existe varios estudios con controversia en sus resultados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Prats G. Microbiología Clínica. Alcocer A, editor. España: Editorial Médica Panamericana; 2015.
2. 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/>
3. Tapia P. C. Candidiasis vulvovaginal. Rev Chil infectología [Internet]. agosto de 2008 [citado 17 de julio de 2019];25(4):312-312. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182008000400016&lng=en&nrm=iso&tlng=en
4. Zurita Macalupú S. SITUACIÓN DE LA RESISTENCIA ANTIFÚNGICA DE ESPECIES DEL GÉNERO Candida EN PERÚ. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2018;35(1):126-31.
5. Organización Mundial de la Salud. Modelo OMS de información sobre prescripción de medicamentos: Medicamentos utilizados en las enfermedades cutáneas: Micosis superficiales: Candidosis [Internet]. 1999 [citado 18 de septiembre de 2019]. p. 132. Disponible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Jh2920s/5.3.html#Jh2920s.5.3>
6. Díaz Zapata A. FACTORES EPIDEMIOLÓGICOS RELACIONADOS CON LA CANDIDIASIS VULVOVAGINAL Y PROPUESTA PARA DISMINUIR SU IMPACTO EN GESTANTES DE LOS DISTRITOS DE INKAWASI Y MONSEFÚ. LAMBAYEQUE PERÚ, 2017 – 2018. Universidad Pedro Ruiz Gallo; 2019.
7. Villavicencio J, Moromi H, Salcedo D, Pineda M, Ramos D, Livia S, et al. Efecto antimicótico in vitro de Origanum vulgare sobre cepas de Candida albicans. Odontol SanMarquina. 2016;19(2):5-8.
8. Pinzon R, Liévano D, Rueda D, Mora A, Sandoval A. Vademecum Colombiano de plantas medicinales. Colombia IN de, editor. Vol. 13, Ministerio de Protección Social. Bogota - Colombia; 2014. 576 p.

9. QUINTANILLA BOCÁNGEL JJ. EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL CARVACROL (ACEITE DE ORÉGANO) SOBRE CANDIDA ALBICANS. Rev Investig la Univ Norbert Wiener. 2016;5:33-8.
10. MINAGRI. Copaiba [Internet]. Lima - Perú; 2017 [citado 22 de julio de 2019]. Disponible en: <https://www.minagri.gob.pe/portal/download/pdf/sectoragrario/agricola/lineasdecultivosemergentes/COPAIBA.pdf>
11. Arruda C, Aldana Mejía JA, Ribeiro VP, Gambeta Borges CH, Martins CHG, Sola Veneziani RC, et al. Occurrence, chemical composition, biological activities and analytical methods on *Copaifera* genus—A review. Biomed Pharmacother [Internet]. 1 de enero de 2019 [citado 22 de julio de 2019];109:1-20. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332218348546>
12. Olea Delfina. Presencia de *Candida albicans* y su relación con los valores de CD4+ en pacientes con infección por VIH. Universidad de Granada; 2016.
13. Lachos Miguel V, Laurente Pachamango K. Efecto antimicótico in vitro del aceite esencial de *Origanum vulgare* frente a cepas de *Trichophyton rubrum* [Internet]. Universidad Nacional de Trujillo; 2018 [citado 21 de julio de 2019]. Disponible en: [http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/10104/Lachos Miguel Estrella Vanessa.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/10104/Lachos%20Miguel%20Estrella%20Vanessa.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
14. Francia Francia JJ. Actividad antimicrobiana - in vitro - del aceite de Copaiba frente a bacterias patógenas, Instituto de Medicina Tropical Daniel Alcides Carrión -Facultad de Medicina [Internet]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2013. Disponible en: http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/3458/1/Francia_fj.pdf
15. Chamba Pascal L. Efecto antifúngico del aceite esencial de *Origanum Vulgare* (orégano) y *cymbopogon citratus* (hierba luisa), sobre cepas de *Cándida Albicans* en comparación con la nistatina estudio invitro. Universidad Central de Ecuador; 2015.
16. Pfeifer Barbosa AL, Wenzel-Storjohann A, Barbosa JD, Zidorn C, Peifer C, Tasdemir D, et al. Antimicrobial and cytotoxic effects of the *Copaifera reticulata* oleoresin and its main diterpene acids. J Ethnopharmacol [Internet]. 6 de abril

de 2019 [citado 22 de julio de 2019];233:94-100. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874118331957#!>

17. Marchioro Pereira NC, Gomes Mariscal A, Pinheiro de Carvalho Nepoceno KL, Coelho Rafael Silva VC, Matias Fernandes H, Vivi VK. Atividade antimicrobiana do óleo-resina de copaíba natural/comercial contra cepas padrão. *J Heal NPEPS*. 2018;3(2):527-39.
18. Simoes C, Olivera N, Venancio G, Milério P, Bandeira M. Antibacterial Activity of Copaiba Oil Gel on Dental Biofilm. *Open Dent J*. 2016;10:188-95.
19. Hernández Sampieri R. Metodología de la Investigación. 6ta edició. México,D.F.: Mc Graw Hill; 2014.
20. Grove S, Gray J. Investigación en Enfermería: Desarrollo de la práctica enfermera basada en evidencia. 7ma ed. Barcelona - España: Elsevier; 2019. 487 p.
21. Gilman, Goodman. Terapéutica, Las bases farmacológicas de la Terapéutica. 12ed ed. Laurence L B, editor. Laurence Brunton. México: McGraw-Hill/Interamericana; 2014.
22. Maye B, Miguel G. El antibiograma de discos. Normalizacion de la Técnica de Kirby-Bauer. *Biomedica*. 2018;35(1):103-9.
23. Dergal SB. Química de los Alimentos. 5ta ed. López Ballesteros G, editor. México; 2012. 744 p.
24. Villavicencio J. et al. Efecto Antimicótico in vitro de *Origanum vulgare* sobre cepas de *Candida albicans*. *Odontol Sanmarquina*. 29 de enero de 2017;19(2):5.
25. Tellez L. CARACTERIZACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES DE SEIS ECOTIPOS DE ORÉGANO (*Origanum vulgare* ssp.) PROCEDENTES DEL VALLE DE URUBAMBA – CUSCO; PERÚ. 2017.
26. Carhuapoma Y. M, Bonilla R. P, Suarez C. S, Villa R, López G. S. Estudio de la composición química y actividad antioxidante del aceite esencial de *Luma chequen* (Moliná) A. Gray «arrayán». *Cienc Invest*. 2005;8(2):73-9.
27. Cárdenas Melgarejo C, Stashenko E, Castañeda M, Blanco Velandia K, Muñoz

- A, Kouznetsov V, et al. Composición y capacidad antioxidante de especies aromáticas y medicinales con alto contenido de timol y carvacrol. *Sci Tech*. 2007;1(33):125-8.
28. Garcia R, Palou E. Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos. *Ingeniería de los Alimentos*. 2008.
 29. Ultee A, Bennik MHJ, Moezelaar R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2002 [citado 2 de enero de 2021];68(4):1561-8. Disponible en: [/pmc/articles/PMC123826/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC123826/?report=abstract)
 30. Ochoa SA, Sánchez-Torres LE, Nevárez-Moorillón GV, Camacho AD, Noguera-Torres B. Essential oils and their components as an alternative in the control of mosquito vectors of disease. *Biomedica*. 2017;37:224-43.
 31. Goren AC, Piozzi F, Akcicek E, Kili T, Arika S, Moziolu E, et al. Essential oil composition of twenty-two *Stachys* species (mountain tea) and their biological activities. *Phytochem Lett*. 1 de diciembre de 2011;4(4):448-53.
 32. Pieri FA, Silva VO, Souza CF, Costa JCM, Santos LF, Moreira MAS. Antimicrobial profile screening of two oils of *copaifera* genus. *Arq Bras Med Vet e Zootec* [Internet]. febrero de 2012 [citado 2 de enero de 2021];64(1):241-4. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352012000100037&lng=en&nrm=iso&tlng=en

ANEXO

Anexo A: Operacionalización de variables

VARIABLE INDEPENDIENTE	DIMENSIONES	TIPO	ESCALA	INDICADORES	UNIDAD DE MEDIDA/PUNTO DE CORTE
Aceite de <i>Origanum vulgare</i> "Orégano" y Resina de <i>Copaifera paupera</i> "Copaiba"	Concentración	Cuantitativo	Ordinal	100%	Porcentaje
				75%	
				50%	
VARIABLE DEPENDIENTE	DIMENSIONES	TIPO	ESCALA	INDICADORES	UNIDAD DE MEDIDA/PUNTO DE CORTE
Efecto antimicótico	Halo de inhibición	Cuantitativo	Ordinal	Nula Sensible Medio Muy sensible	≤ 8mm 9mm a 14mm 15mm a 19mm ≥ a 20mm

Anexo B. Instrumentos y recolección de datos:

Diámetros de los halos de inhibición obtenidos sobre *Candida albicans*

Muestra	Controles		Aceite de <i>Origanum vulgare</i> "Orégano"			Resina de <i>Copaifera paupera</i> "Copaiba"		
	Control Negativo	Control Positivo	50%	75%	100%	50%	75%	100%
1	6,0	25,9	25,5	31,4	33,4	6,0	6,0	6,0
2	6,0	26,2	25,1	31,1	33,1	6,2	6,0	6,0
3	6,2	26,0	25,1	31,2	33,4	6,0	6,2	6,0
4	6,0	25,9	25,1	31,1	33,4	6,0	6,0	6,4
5	6,0	26,4	25,1	31,1	33,4	6,1	6,0	6,0
6	6,3	25,8	24,6	31,5	33,0	6,0	6,0	6,0
7	6,0	26,0	24,8	31,4	33,4	6,0	6,0	6,0
8	6,0	26,3	25,1	30,9	33,4	6,3	6,0	6,3
9	6,1	26,0	24,4	31,7	33,1	6,0	6,2	6,0
10	6,0	25,8	25,1	31,5	33,8	6,0	6,0	6,0
11	6,2	25,8	25,1	31,3	33,0	6,0	6,0	6,1
12	6,0	26,6	24,4	30,9	33,1	6,0	6,1	6,0
13	6,0	26,2	25,6	31,0	33,8	6,0	6,0	6,0
14	6,3	26,3	25,7	31,4	33,4	6,0	6,0	6,0
15	6,0	25,9	25,5	30,4	34,1	6,0	6,0	6,0

CONSTANCIA DE IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA

La Bióloga Flor Milagros Silva Romero con colegiatura del Colegio de Biólogos del Perú Nro. 6238 deja constancia que:

La muestra botánica recibida de los bachilleres **Flor Lilliana Requejo Mendoza y Dario Vásquez Alarcón**, quienes realizan una investigación en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad María Auxiliadora – San Juan de Lurigancho; ha sido estudiada e identificada como: *Origanum vulgare* L. (**Orégano**) y tiene la siguiente posición taxonómica según el sistema de clasificación APG III (Angiosperm Phylogeny Group).

Clase: Equisetopsida
Orden: Lamiales Bromhead
Familia: Lamiaceae Martinov
Género: *Origanum* L.
Especie: *Origanum vulgare* L.

Nombre vulgar: "Orégano"

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada para los fines que considere pertinente.

Lambayeque, 20 de octubre del 2020




Blogo: Flor Milagros Silva Romero
C.B.P. 6238

CONSTANCIA DE IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA

La Bióloga Flor Milagros Silva Romero con colegiatura del Colegio de Biólogos del Perú Nro. 6238 deja constancia que:

La muestra botánica recibida de los bachilleres **Flor Liliana Requejo Mendoza y Dario Vásquez Alarcón**, quienes realizan una investigación en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad María Auxiliadora – San Juan de Lurigancho; ha sido estudiada e identificada como: *Copaifera paupera* (Herzog) Dwyer (Copaiba) y tiene la siguiente posición taxonómica según el sistema de clasificación APG III (Angiosperm Phylogeny Group).

Clase: Equisetopsida
Orden: Fabales Bromhead
Familia: Fabaceae Lindl.
Género: *Copaifera* L.
Especie: *Copaifera paupera* (Herzog) Dwyer.

Nombre vulgar: "Copaiba"

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada para los fines que considere pertinente.

Lambayeque, 20 de octubre del 2020




Bigo. Flor Silva Romero
C.B.P. 6238

Anexo E. Certificado de análisis de la cepa *Candida albicans* ATCC 10231



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: <i>Candida albicans</i> Catalog Number: 0443 Lot Number: 443-1008** Reference Number: ATCC® 10231™** Purity: Pure Passage from Reference: 3	Expiration Date: 2021/2/28 Release Information: Quality Control Technologist: Alexandra D Stensvad Release Date: 2019/3/18
---	---

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

**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.

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.

⚠ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC, Microbiologics, Inc. It is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.



(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.

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	<i>Candida albicans</i>	2.11

Comments:

n/a

Anexo F. Evidencias de trabajo de campo



Figura 2. Preparación del material de trabajo para extracción de aceite esencial



Figura 3. Muestra de orégano en equipo de destilación con arrastre de vapor



Figura 4. Instalación del equipo de destilación por arrastre de vapor



Figura 5. Pruebas de las tomas de agua a las líneas del refrigerante



Figura 6. Instalación y funcionamiento de equipo de destilación con arrastre de vapor



Figura 7. Proceso de recolección y separación de las fases acuosa y oleosa del aceite esencial



Figura 8. Preparación del aceite esencial de orégano y resina de copaiba a diferentes concentraciones



Figura 9. Preparación del material y equipos de trabajo para microbiología. Esterilizado previo con luz UV



Figura 10. Proceso de activación de la cepa ATCC 10231 de *Candida albicans*

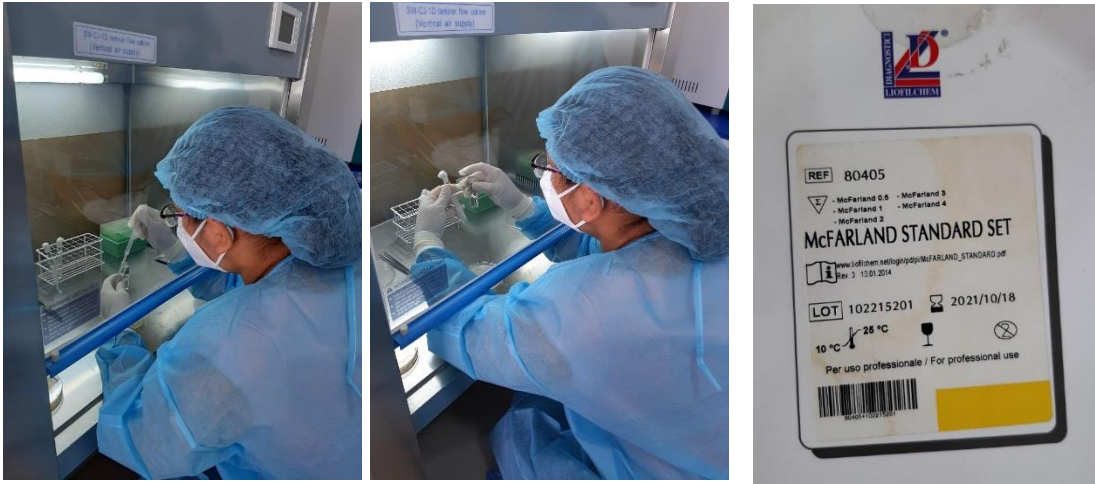


Figura 11. Proceso de dilución y obtención del inóculo de trabajo a la concentración del 0.5 en la escala de McFarland



Figura 12. Sembrado en placas de *Candida albicans* ATCC 10231

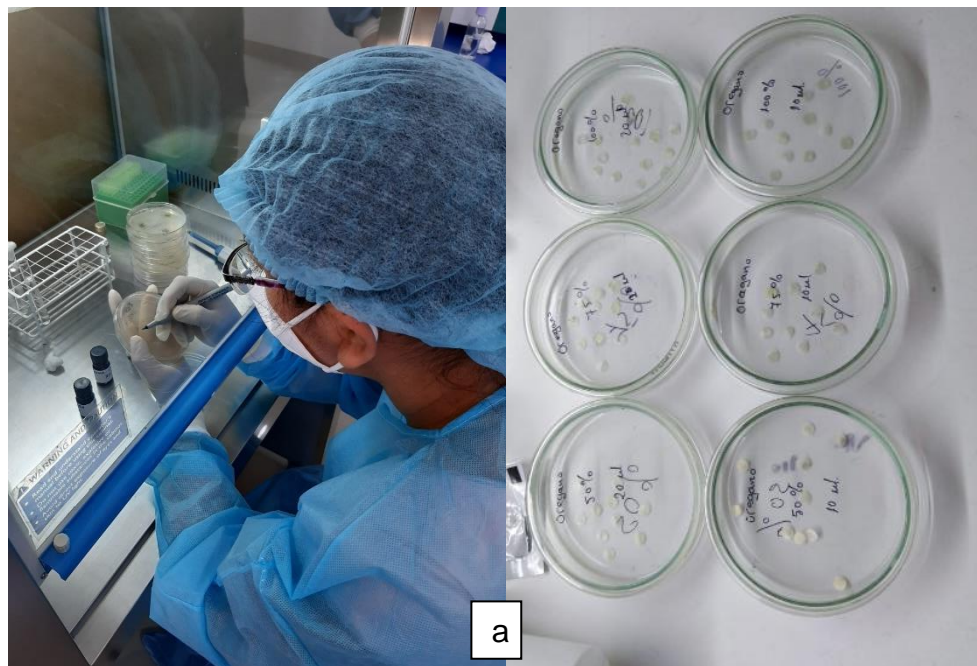


Figura 13. Proceso de rotulado y preparación de los discos a) Rotulado de placas b) Aplicación del aceite de orégano en discos c) Aplicación de resina de copaiba en discos

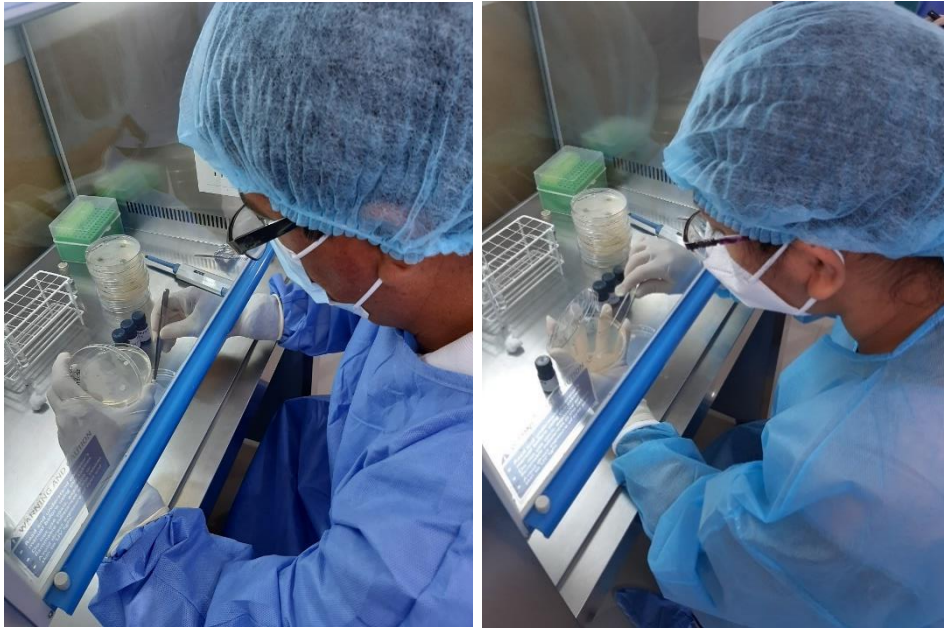


Figura 14. Aplicación de discos con aceite y resina en placas con *Candida albicans* ATCC 10231

Anexo G. Escala de Duraffourd

Sensibilidad antimicótica	Diámetro del halo e inhibición			
	-	+	++	+++
Nula	≤ 8 mm			
Sensible	9–14 mm			
Muy sensible	15-19 mm			
Sumamente sensible	≥ 20 mm			

Fuente: Elaboración propia