



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA  
SEDE GUAYAQUIL**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**TRABAJO EXPERIMENTAL**

**EVALUACIÓN DE LA EFICACIA ANTIMICÓTICA DEL ACEITE ESENCIAL  
*PIPER IMPERIALE* FRENTE A *CANDIDA SPP.* PROVENIENTES DE MUESTRAS  
CLÍNICAS: UTILIZANDO DOS TÉCNICAS DE SENSIBILIDAD FÚNGICA  
VALIDADAS EN UN HOSPITAL PÚBLICO DE LA PROVINCIA DE SANTA ELENA**

*Trabajo de titulación previo a la obtención  
del título de Ingeniera en Biotecnología*

**AUTORA:** LESLEY ESPERANZA GUARANDA ORRALA

**TUTOR:** CARINA ELIZABETH HIDALGO RAMIREZ, MSc

**GUAYAQUIL-ECUADOR**

**2024**

**CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE  
TITULACIÓN**

Yo, **Lesley Esperanza Guaranda Orrala** con documento de identificación N°  
0991260101 manifestó que:

Soy la autora y responsable del presente trabajo; y, autorizamos a que sin fines de lucro  
la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera  
total o parcial el presente trabajo de titulación.

Guayaquil, 29 de febrero del año 2024

Atentamente,



---

**Lesley Esperanza Guaranda Orrala**  
CI: 0991260101

**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE  
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Yo, **Lesley Esperanza Guaranda Orrala** con documento de identificación N° 0991260101, expreso nuestra voluntad y por medio del presente documento cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del trabajo experimental: **“EVALUACIÓN DE LA EFICACIA ANTIMICÓTICA DEL ACEITE ESENCIAL *PIPER IMPERIALE* FRENTE A *CANDIDA SPP.* PROVENIENTES DE MUESTRAS CLÍNICAS: UTILIZANDO DOS TÉCNICAS DE SENSIBILIDAD FÚNGICA VALIDADAS EN UN HOSPITAL PÚBLICO DE LA PROVINCIA DE SANTA ELENA”**, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: *Ingeniero/a en Biotecnología*, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribimos este documento cuando entregamos el trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 29 de febrero del año 2024

Atentamente,



---

Lesley Esperanza Guaranda Orrala  
CI: 0991260101

## CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, **Carina Elizabeth Hidalgo Ramírez** con documento de identificación 1722655519, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación **“EVALUACIÓN DE LA EFICACIA ANTIMICÓTICA DEL ACEITE ESENCIAL *PIPER IMPERIALE* FRENTE A *CANDIDA SPP.* PROVENIENTES DE MUESTRAS CLÍNICAS: UTILIZANDO DOS TÉCNICAS DE SENSIBILIDAD FÚNGICA VALIDADAS EN UN HOSPITAL PÚBLICO DE LA PROVINCIA DE SANTA ELENA”**, realizado por Lesley Esperanza Guaranda Orrala con documento de identificación N° 0928271758, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 29 de febrero del año 2024

Atentamente,



---

Carina Elizabeth Hidalgo Ramírez  
CI: 1722655519

## **Dedicatoria**

*Dedico esta tesis a Dios y a mis padres, cuya fe en mí ha sido la luz que me ha guiado. Su amor incondicional y apoyo me han dado la fuerza para perseguir mis sueños y superar cada obstáculo.*

*A mis hermanos Nallely, Maybeline y Santiago por las sonrisas y por siempre recordarme el valor de la familia.*

*A mis jefes Patricia Suárez y Pablo Rúaes, por ser un ejemplo para seguir y por brindarme asistencia y orientación en los momentos más importantes de mi carrera.*

*Y a mis compañeros fieles, Mily y Nicky, por su compañía silenciosa y por ser la alegría constante en días largos y noches solitarias.  
A mi mejor amigo que ha sido un apoyo incondicional en esta etapa.*

## **Agradecimiento**

*Este logro es el resultado no solo de mi propio esfuerzo, sino también del apoyo, la inspiración y la sabiduría que muchas personas me brindaron a lo largo de mi carrera.*

*A mi familia, que ha brindado mi apoyo incondicional, y a mis hermanos Nallely, Maybeline y Santiago, por su amor y apoyo inagotable.*

*A la universidad Politécnica Salesiana por brindarme conocimientos estos años de carrera.*

*Quiero expresar mi más sincera gratitud a todos los maestros que me han guiado con su conocimiento y experiencia. Cada lección que he aprendido ha sido una piedra angular para mi educación y futuro profesional.*

*Sin la ayuda y el respaldo constante de mi tutora de tesis, la ingeniería Carina Hidalgo, no habría podido lograr este objetivo. Su sabiduría y paciencia han sido esenciales en cada etapa del desarrollo de este Trabajo de Titulación.*

*A mis amigos Miguel y Christian, por su lealtad y amistad, que me han brindado protección en medio de la tormenta académica.*

*A los amigos que conocí en la universidad.  
A las familias de mis amigos que me dieron una mano en todo momento.*

*A Patricia Suárez, por confiar en mis habilidades y por su valiosa orientación y mentoría.*

*Además, a mis compañeros de cuatro patas, Mily y Nicky, por brindarme afecto durante los momentos de estudio y trabajo.*

*Lesley Guaranda*

## RESUMEN

Esta investigación comprueba el aceite esencial de *Piper imperiale* como una opción de tratamiento para la resistencia de *Candida spp.* a los antifúngicos convencionales. La especie más común en las muestras clínicas examinadas fue *Candida albicans*, que representó el 62% de los casos, seguida por *Candida glabrata* con un 24% y *Candida tropicalis* con un 14%. Se utilizaron métodos de disco de difusión Kirby Bauer y microdilución para medir las zonas de inhibición, cuyos porcentajes de inhibición variaban con la concentración de aceite, alcanzando un 100% de inhibición a concentraciones altas.

*Candida* ATTC 10231, demostró ser efectiva con un porcentaje de inhibición de 100% ; 88,18% ; 80,00% ; 68, 73% a concentraciones de aceite *Piper imperiale* de 2%,1%,0,5% y 0,2% Estos resultados, junto con el análisis estadístico detallado, indican una clara dependencia de la dosis en la actividad antifúngica del aceite; se determina la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC), revelando una notable actividad antimicótica del aceite esencial, especialmente efectiva en concentraciones específicas. En el segundo método se logró un porcentaje de inhibición del 55,61% para *Candida ATTC 10231* con una MIC de 6894, 286 ug/mL.

Los hallazgos destacan la diversidad en la sensibilidad de las cepas a los antifúngicos comunes como voriconazol y fluconazol, así como la eficacia distintiva del aceite esencial para inhibir el crecimiento fúngico. Este estudio no solo confirma que *Candida albicans* es muy común, sino que también confirma la eficacia del aceite esencial de *Piper imperiale* como un posible agente antifúngico, lo que indica que puede combatir cepas de *Candida* incluso en concentraciones bajas.

*Palabras claves: Candida albicans, aceite esencial, Piper imperiale, alternativa natural*

## ABSTRACT

This research tests *Piper imperiale* essential oil as a treatment option for *Candida spp.* resistance to conventional antifungals. The most common species in the clinical samples tested was *Candida albicans*, which accounted for 62% of the cases, followed by *Candida glabrata* with 24% and *Candida tropicalis* with 14%. Kirby Bauer diffusion disk and microdilution methods were used to measure inhibition zones, whose inhibition percentages varied with oil concentration, reaching 100% inhibition at high concentrations.

*Candida* ATTC 10231, proved to be effective with an inhibition percentage of 100 % ; 88,18% ; 80.45% ; 68,73% at *Piper imperiale* oil concentrations of 2%,1%,0.5% and 0.2% These results, together with the detailed statistical analysis, indicate a clear dose dependence in the antifungal activity of the oil; The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined, revealing a remarkable antifungal activity of the essential oil, especially effective at specific concentrations. In the second method, an inhibition percentage of 55.61% was achieved for *Candida ATTC* with a MIC of 6894, 286 ug/mL.

The findings highlight the diversity in the sensitivity of the strains to common antifungals such as voriconazole and fluconazole, as well as the distinctive efficacy of the essential oil in inhibiting fungal growth. This study not only confirms that *Candida albicans* is very common, but also confirms the efficacy of *Piper imperiale* essential oil as a potential antifungal agent. This indicates that it can combat *Candida* strains even at low concentrations.

Key words: *Candida albicans*, essential oil, *Piper imperiale*, natural alternative.



## Contenido

CAPÍTULO I.....	1
ANTECEDENTES.....	1
1.1.    Introducción .....	1
1.2.    Planteamiento del problema .....	4
1.3.    Delimitaciones.....	5
1.4.    Pregunta de investigación.....	5
1.5.    Objetivos. ....	5
1.5.1.  Objetivo General.....	5
1.5.2.  Objetivos Específicos.....	6
1.6.    Hipótesis.....	6
CAPÍTULO II .....	7
MARCO TEÓRICO .....	7
2.1 <i>Candida spp.</i> .....	7
2.1.1.  Prevalencia de las infecciones por <i>Candida</i> en unidad de cuidados intensivos (UCI) a nivel mundial. ....	8
2.1.2.  Mortalidad asociada a las infecciones por <i>Candida</i> .....	9
2.2.  Importancia de la identificación rápida y precisa.....	10
2.3.  Identificación de especies <i>Candida spp.</i> .....	10
2.3.1.  CHROMagar™ <i>Candida</i> Plus como método de identificación de especies de <i>Candida</i> .....	11

2.3.2.	Métodos fenotípicos, moleculares e inmunológicos.....	12
2.4.	Fundamento y metodología .....	13
2.4.1.	Técnica de discos de difusión.....	13
2.4.2.	Técnica de microdilución .....	13
2.5.	Perfil de sensibilidad antifúngica. ....	14
2.6.	2-3-5-Trifenil-2H-tetrazolio 2,3,5-cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) .....	15
2.7.	Antifúngicos comerciales comunes para especies de <i>Candida</i> .....	15
2.8.	Nivel de resistencia a antibióticos en Ecuador.....	16
2.9.	Nuevas alternativas.....	17
2.10.	Familia Piperaceae .....	17
2.10.1.	Generalidades .....	17
2.11.	Género <i>Piper</i> .....	18
2.12.	<i>Piper imperiale</i> .....	19
2.12.1.	Taxonomía.....	19
2.13.	Aceite esencial.....	20
2.13.1.	Composición química.....	20
2.14.	Información de interés sobre <i>Piper imperiale</i> .....	21
2.15.	Importancia de los aceites esenciales frente a infecciones fúngicas. ....	22
2.15.1.	Mecanismo de acción .....	23
2.15.2.	Compuestos químicos del aceite esencial <i>Piper imperiale</i> . ....	23
CAPÍTULO III	.....	26

MATERIALES Y MÉTODOS .....	26
3.1. Tipo de estudio. ....	26
3.2. Tipo de muestreo .....	27
3.3. Tamaño de muestreo.....	27
3.4. Variables .....	27
3.5. Criterios.....	29
3.5.1. Criterios de inclusión: .....	29
3.5.2. Criterios de exclusión:.....	29
3.6. Recolección de datos .....	29
3.7. Protocolos.....	29
3.7.1. Preparación del material.....	32
3.7.2. Preparación de la solución madre o stock .....	33
3.8. Metodología de discos de difusión Kirby Bauer .....	34
3.9. Metodología microdilución .....	37
3.9.1. Preparación del inóculo de <i>Candida spp.</i> .....	37
3.9.2. Preparación de microplaca .....	37
3.9.3. Preparación del indicador de desarrollo microbiano TTC .....	39
3.9.4. Determinación de la concentración inhibitoria mínima .....	39
CAPITULO IV .....	41
RESULTADO Y DISCUSIONES .....	41
4.1.2. Eficiencia de la metodología de difusión en disco Kirby Bauer .....	41

4.1.3. Eficiencia de la metodología Microdilución. ....	43
4.2.1. Resultados del porcentaje de inhibición de la metodología Discos Kirby Bauer.....	45
4.2.1.1. Análisis estadístico de la metodología discos Kirby Bauer .....	47
4.2.2 Determinación de la concentración inhibitoria mínima (MIC) .....	51
CAPÍTULO V .....	55
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	55
5.1. Conclusiones .....	55
5.2. Recomendaciones.....	57
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	58
ANEXOS.....	79

## Índice de Tablas

Tabla 1. Tipo de candida spp.....	7
Tabla 2. Identificación de especies de candida mediante chromagar candida plus.....	88
Tabla 3. Metodologías utilizadas para la identificación de levaduras .....	10
Tabla 4. Taxonomía... ..	19
Tabla 5. Características del aceite esencial de p. Imperiale .....	21
Tabla 6. Aceites esenciales con propiedades antifúngicas.....	23
Tabla 7. Composición se basa en varios compuestos químicos.....	24
Tabla 8. Estructura de la microplaca.....	38
Tabla 9. Volúmenes generales.....	39
Tabla 10. Categorización.....	40
Tabla 11. Porcentaje de inhibición de discos de difusión.....	42
Tabla 12.. Porcentaje de inhibición de la técnica microdilución. ....	44
Tabla 13. Porcentaje de inhibición del aceite esencial.....	46

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Bosquejo general sobre la familia piperaceae .....	18
Ilustración 2. Preparación sobre las ubicaciones de los discos en el agar. ....	36
Ilustración 3 . Concentraciones en los discos en el agar. ....	36
Ilustración 4. % de prevalencia de candida .....	41
Ilustración 5. Gráfica.....	42
Ilustración 6. Gráfica.....	44
Ilustración 7. Gráfica.....	46
Ilustración .8 Mic del aceite esencial .....	52

## Índice de Anexo

Anexo a. Imágenes de las cepas a utilizar .....	79
Anexo b. Proceso experimental .....	79
Anexo c. Especie más prevalente .....	79
Anexo d. Chi-cuadrado de difusión de discos kirby bauer .....	80
Anexo e. Chi-cuadrado microdilución .....	80
Anexo f. Estadística .....	81
Anexo g. % de efecto inhibitorio .....	84
Anexo h. Resultados de microdilución .....	86

## CAPÍTULO I

### ANTECEDENTES

#### 1.1.Introducción

Desde el 2010 al 2023, existe un aumento en infecciones fúngicas en los entornos hospitalarios, según Marque et al., (2023), los principales hongos encontrados en los entornos hospitalarios son géneros de *Candida*, género *Aspergillus*, *Penicillium spp.*, *Rhizopus spp.* y *Mucor spp.*, en el área de cuidados intensivos (UCI) con un porcentaje elevado de mortalidad por su fácil adaptación y propagación.

Las infecciones fúngicas por especies de *Candida* corresponden hasta el 85 % y una mortalidad cercana al 40% considerada enfermedad cosmopolita (Cortés et al., 2020). Afectan varias partes del cuerpo como boca, garganta, esófago, pulmones, etc. En el estudio de Cortés et al., (2018), describe la infección de candidiasis cutánea por *Candida albicans*, en pacientes con diabetes que afecta en mayor medida con descamación, alberga un número pequeño de hongos causa invasiones al tejido hospedador, la frecuencia de estas infecciones aumenta la tasa de fungemia. (Silao et al., 2023).

La identificación rápida y precisa de las especies de levadura es crucial en un entorno hospitalario para procurar un tratamiento adecuado (Tamura et al., 2022).

Desde el 2002 se encontró que “CHROMagar™ *Candida* Plus es una opción valiosa para la detección e identificación de *Candida auris* (Alvarado P et al., 2002). Conde et al., (2014)., menciona el desempeño del medio CHROMagar™ *Candida* en comparación con CHROMagar *Candida* Plus con alta sensibilidad y especificidad para especies de *Candida* aisladas.



El método de difusión de discos, y la técnica de microdilución en caldo propuesta por Conde et al., (2014), por la técnica del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, antiguo NCCLS) determinan la sensibilidad (Mora, 2019).

Córdoba et al, (2022) realiza la técnica de microdilución por paneles colorimétrico Sensititre YeastOne™ (Trek-Thermo Scientific™) (SYO) para determinar la concentración inhibitoria mínima (MIC). El panel es usado para efectuar pruebas de sensibilidad en especies de *Candida* y otras levaduras de rápido crecimiento como *Cryptococcus* spp. y *Aspergillus* spp.

Estas técnicas posibilitarían un rápido control y tratamiento contra esta enfermedad, una vez identificado y determinado la susceptibilidad mediante la concentración inhibitoria mínima (MIC) se procedería a determinar la dosis correcta basándose en la sensibilidad de pacientes a los antibióticos (Ávila Tandazo et al., 2021).

Toso et al., (2023); menciona que el uso de antibióticos como estrategia de medicación para las enfermedades que conduce a resistencia a los antimicrobianos (RAM), lo que pone en desventaja la salud, ya que sus terapéuticas tienen un impacto negativo en medicina.

Ecuador es uno de los países con una biodiversidad no aprovechada, excluyendo varias plantas no comunes con propiedades medicinales (Christgen & Becker, 2019). Los diversos compuestos químicos de los aceites esenciales del género *Piper* abarcan oportunidades antimicrobiana-antifúngica. *Piper imperiale* tiene una variedad de compuestos bioactivos, según Biswas et al., (2022) el aceite esencial de las hojas de *Piper barbatum* (Kunth) consta de  $\alpha$ -phellandrene 43.16 %; sesquisabinene hydrate 8.23 %; limonene 7.04 %; elemol 7.21 %;  $\alpha$ -pinene 5.63 %; carene (delta-3) 4.60 %;  $\beta$  - phellandrene 3.82 % y  $\beta$  - eudesmol 3.49 % estos compuestos inhiben la síntesis de pared celular. Además de evaluar la

actividad antimicrobiana con el aceite demuestra una eficacia contra una amplia gama de microorganismos.

El género *Piper* pertenece a la familia Piperaceae (Mesa & Jaramillo, 2018). Son una familia de plantas con flores que se encuentra en regiones tropicales y subtropicales en todo el mundo, en Ecuador se ha registrado 157 especies nativas. Las piperaceae son plantas arbustivas y trepadoras, las hojas contienen glándulas que producen aceites esenciales (León-Yáñez, 2019). Las flores son en forma de espiga sus frutas son conocidas como bayas, las mismas, contienen propiedades antibacterianas, antifúngicas, antiparasitarias, analgésicas y anticancerígenas (Mohd et al., 2020). Comprende una alta complejidad botánica, química y farmacológica (Cruz et al., 2012); en la medicina tradicional el género *Piper* son utilizadas para tratar enfermedades causadas por bacterias, hongos y protozoos (Mesa & Jaramillo, 2018).

En el estudio de Blank et al., (2015) evaluaron la composición química y toxicidad aguda oral de un aceite esencial *Lippia alba* en ratones, muestra que el aceite esencial compuesto por gerania (45,40%) y neral (30,23%) era tolerado por los ratones en dosis moderada como 900mg/kg, el aceite fue letal a partir de la dosis 1500 mg/kg a 2000mg/kg, los resultados proporcionaron que el aceite *L. alba* contiene potencial terapéutico.

(Samain & Tebbs, 2020) Esta información da cabida a un producto farmacéutico como lo serian pastillas con un porcentaje menor de 0,2 ul de aceite esencial para personas con infecciones fúngicas (Samain & Tebbs, 2020). Esto a la vez ayudaría a personas de cuidados intensivo (UCI). El uso de una combinación de aceite esencial con propiedades antimicrobianas y antioxidantes demuestran una alternativa eficaz y productividad conservando la salud animal y humana (Toso et al., 2023).

Este estudio se enfocará en la evaluación de la actividad antimicótica del aceite esencial *Piper imperiale* frente a *Candida spp.* aisladas de muestras clínicas de un hospital público de la provincia de Santa Elena. Para ello, se evaluará la actividad antifúngica del aceite esencial usando las dos técnicas de sensibilidad.

## 1.2. Planteamiento del problema

La frecuencia de las infecciones causadas por *Candida spp.* en ambientes hospitalarios, atacando a los pacientes inmunodeprimidos y hospitalarios conlleva un problema grande, cuando esa línea delgada de complicidad se rompe da origen a una patología por eso la identificación es crucial (Oz & Gokbolat, 2018).

Para identificar la especie de *Candida spp.* en muestras clínicas, se utilizará CHROMagar *Candida* Plus como método de identificación, ya que se ha demostrado que es más efectivo que otras técnicas de identificación. Por otra parte, se realizarán dos técnicas manuales de sensibilidad fúngica; difusión de discos y microdilución por Sensititre YeastOne™ (Trek-Thermo Scientific™) (SYO). La comparación entre las dos técnicas de sensibilidad fúngica permitirá determinar la susceptibilidad a los antifúngicos de *Candida spp.*

Para los pacientes en estado UCI (2019), según David & Icaza (2019) esta infección que puede presentar resistencia por la velocidad en que modifican su genoma, el RAM aumenta su propagación por descuido o farmacodependencia arbitraria u otros motivos. Haga clic o pulse aquí para escribir texto. En África existe una resistencia al fluconazol, contra la *Cándida albicans* con un 95 %.

Aceites esenciales han demostrado su efecto antimicrobiano y antifúngico (Załoski et al., 2015), convirtiéndolo en una potencial opción terapéutica.

### 1.3.Delimitaciones

La investigación se centrará en pacientes con afecciones a *Candida*, de muestras obtenidas del propio laboratorio provenientes de muestras de ojo, corazón, aspirados bronquiales de edades de 45 a 60 años y llevar un mejor control. Que incluya infecciones vaginales causadas por hongos de la familia *Candida*, con una población adecuada para el tamaño del estudio, de las especies de *Candida* obtenidas se escogerá el de mayor prevalencia y comparará la eficacia contra el aceite esencial

### 1.4.Pregunta de investigación

El aceite esencial *Piper imperiale* es eficaz contra la *Candida spp.* proveniente de muestras clínicas?

### 1.5.Objetivos.

#### 1.5.1. Objetivo General.

Evaluar la eficacia antimicótica del aceite esencial *Piper imperiale* frente a cepas de *Candida albicans certificada* y *Candida spp.* obtenida de muestras clínicas mediante la aplicación de dos técnicas de sensibilidad fúngica validadas en un hospital público de la provincia de Santa Elena.

### 1.5.2. Objetivos Específicos.

Comparar la efectividad de las técnicas de sensibilidad fúngica, difusión de discos Kirby Bauer y microdilución por Sensititre YeastOne TM (Trek-Thermo Scientific™) (SYO) de muestras de *Candida spp.* obtenidas de un área clínica.

Determinar el porcentaje de inhibición de cepas de *Candida albinas certificada* y *Candida spp.* obtenida de muestras clínicas mediante la técnica de difusión en disco aplicando diferentes concentraciones del aceite esencial de *Piper imperiale*.

Evaluar la concentración mínima inhibitoria (MIC) del aceite esencial en estudio frente a cepas de *Candida* a través de la técnica de microdilución en placa acoplada al uso del indicador de desarrollo microbiano 2,3,5-cloruro de trifeniltetrazolio (TTC).

### 1.6.Hipótesis.

H0: El aceite esencial *Piper imperiale* no es eficaz contra *Candida spp.* proveniente de muestra clínicas.

H1: El aceite esencial *Piper imperiale* es eficaz contra *Candida spp.* proveniente de muestra clínicas.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1 *Candida spp.*

Cuando las personas están saludables o enfermas, diversas poblaciones de bacterias y hongos colonizan a los humanos, y la interacción entre estas poblaciones microbianas puede beneficiar o perjudicar al huésped. (Atiencia-Carrera et al., 2022)

*Candida spp.* son los hongos comensales más comunes que coexisten con cientos de especies diferentes de bacterias en el cuerpo humano. Muchas variedades de *Candida* se han recuperado, incluidas *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* y *C. krusei*, ya sea solas o en conjunto con otras bacterias. (Atiencia-Carrera et al., 2022; Rodríguez et al., 2019). Debido al comportamiento de diseminación y falta de sensibilidad diagnóstica, en el modo de crecimiento de biopelículas, las infecciones polimicrobianas relacionadas con *Candida spp.* con frecuencia han causado altas tasas de mortalidad y morbilidad en adultos y las interacciones bacterianas entre *Candida spp.* han sido objeto de varios estudios (Y. Han et al., 2023)

**Tabla 1. Tipo de *Candida spp.***

<b>Tipo</b>	<b>Especie</b>
<b>Albicans</b>	<i>C. albicans</i>
<b>No albicans</b>	<i>C. krusei</i>
	<i>C. glabrata</i>
	<i>C. tropicalis</i>
	<i>C. dubliniensis</i>

---

*C. parapsilosis*

---

*Nota. 1 Especies de Candida spp. Lazo et al., (2018a)*

Tabla 2. Identificación de especies de Candida mediante CHROMagar Candida Plus.

<b>Especie de Candida</b>	<b>Color en CHROMagar Candida Plus</b>
<i>Candida albicans</i>	Verde-Azul
<i>Candida tropicalis</i>	Azul metalizado con halo rosa
<i>Candida krusei</i>	Rosa y borrosa
<i>Candida glabrata</i>	Malva
<i>Candida parapsilosis</i>	Crema
<i>Cándida auris</i>	Azul claro con halo azul

*Nota. 2 Identificación de diferentes especies de Candida mediante el uso de CHROMagar Candida plus, con la especie emergente Candida auris, y su correspondiente color (Marathe et al., 2022).*

2.1.1. Prevalencia de las infecciones por *Candida* en unidad de cuidados intensivos (UCI) a nivel mundial.

Las infecciones por *Candida* en pacientes son un problema importante a nivel mundial, es considerado microorganismo asociado con infecciones fúngicas en pacientes críticos, la candidiasis invasiva es la forma más común de candidiasis que se origina en la piel y el tracto gastrointestinal (Lazo et al., 2018a). La candidemia ha sido considerada una de las

principales causas de morbilidad y aumenta los costos de atención hospitalaria en todo el mundo en los últimos años (Navas et al., 2021).

### 2.1.2. Mortalidad asociada a las infecciones por *Candida*

En la actualidad, las infecciones de *Candida* son un problema de salud pública importante, con cepas que son resistentes a múltiples medicamentos (Sura et al., 2023). Las infecciones del torrente sanguíneo pueden desarrollarse como resultado de la biopelícula de *Candida* (Nguyen et al., 2024).

Según Rodríguez et al., (2019); en humanos, *Candida spp.* causa infecciones en mucosas y tejidos profundos, estas levaduras pueden formar biopelículas en dispositivos médicos, lo que tiene un impacto significativo en su capacidad para causar enfermedades por su contaminación en donde *Candida spp.* es responsable de alrededor del 20%, con tasas de mortalidad que alcanzan hasta el 30%. La levadura *Candida albicans*, en particular, puede crear biopelículas en una variedad de dispositivos médicos, como catéteres vasculares y urinarios, prótesis articulares, válvulas cardíacas, dispositivos de derivación vascular artificial, marcapasos, dispositivos de asistencia ventricular y derivaciones del sistema nervioso central (Durmaz, 2019).

Estas nuevas especies fúngicas presentan mayor importancia porque algunas tienen perfiles de resistencia a los fármacos antifúngicos comunes, especialmente azoles y equinocandinas. Como medida preventiva la identificación precisa de las levaduras del género *Candida* puede evitar retrasos en el tratamiento de pacientes con infecciones fúngicas invasoras de alto riesgo (Rivera-Sánchez et al., 2006).



## 2.2. Importancia de la identificación rápida y precisa.

Para mejorar el pronóstico de los pacientes, el diagnóstico temprano y preciso de la candidemia es fundamental. La sensibilidad y el rendimiento óptimo de las pruebas diagnósticas actuales son limitadas (Lazo et al., 2018b). Se han utilizado varios índices clínicos que tienen un valor predictivo negativo significativo en esta situación. Estos incluyen el índice de Ostrosky, el índice de *Candida* y la Escala de Pittet, entre otros.

Mientras se confirma el diagnóstico por laboratorio, esto permite identificar a los pacientes que no necesitan un tratamiento antifúngico inmediato. En este sentido, los azoles, los polienos y las equinocandinas son los principales grupos de medicamentos utilizados para tratar la candidemia en las unidades de cuidados intensivos (UCI) (del Palacio et al., 2009)

## 2.3. Identificación de especies *Candida spp.*

En la actualidad, existen varias técnicas fenotípicas para la identificación de levaduras entre las que destacan el medio CHROMagar™ *Candida*, que permiten una identificación presuntiva de las especies de levaduras más comunes y pertinentes. Para la identificación de levaduras, existen sistemas comerciales como API® 20 C AUX o Vitek 2 Compact que utilizan metodologías basadas en la identificación bioquímica (Moreno et al., 2017). Estos sistemas pueden presentar problemas de interpretación en la identificación por falta de experticia en el personal de laboratorio y diferenciar especies con perfiles bioquímicos similares (Barberis et al., 2021).

**Tabla 3. Metodologías utilizadas para la identificación de levaduras**

CHROMagar™ Candida	Después de la maduración de la superficie en el medio, se torna un color específico que dependerá de la especie a la que pertenece.
API® 20 C AUX	Se basa en las recomendaciones del fabricante en un periodo de incubación 48 h a 25 °C.
Vitek	Mediante un inóculo de 3 m en solución salina al 45 %.
Microflex	Cultivos aislados durante 24h a 37 °C

*Nota. 3. Métodos microbiológicos utilizados obtenidos de Zuluaga et al., (2018)*

### 2.3.1. CHROMagar™ *Candida* Plus como método de identificación de especies de *Candida*.

Actualmente, se usan muchos métodos para identificar aislamientos clínicos, como el sistema API 20C o el sistema ATB ID32C, pero estos métodos requieren días para identificarlas (Guerrero Miranda, 2016). El uso de medios diferenciales como Chromagar *Candida*®, que ha sido ampliamente validado, ofrece una identificación presuntiva rápida de especies médicamente importantes como *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei*. Sin embargo,

es importante destacar que varios autores recomiendan realizar pruebas fenotípicas adicionales para confirmar estas especies (Estrada-Barraza et al., 2011).

### 2.3.2. Métodos fenotípicos, moleculares e inmunológicos.

#### 2.3.2.1. Métodos fenotípicos

Los métodos fenotípicos tradicionales para identificar levaduras requieren tiempo variable de 2 a 21 días, y también claves de identificación. Es necesario que sean acompañados de métodos morfológicos y fisiológicos para lograr una identificación presuntiva adecuada (Ferrara et al., 2014). La ureasa y la fenol-oxidasa, la ferrara y la resistencia a la cicloheximida y la termotolerancia son las pruebas más utilizadas para identificar levaduras según criterios fisiológicos (Duré Paredes, 2021).

#### 2.3.2.2. Métodos moleculares.

La secuenciación de ácidos nucleicos es la base de las técnicas moleculares y se ha utilizado como referencia para comparar con otras pruebas de identificación porque ofrece una identificación más precisa (Barberis et al., 2021). Además, las especies crípticas como *C. orthopsilosis*, *C. nivariensis* y *C. bracarensis* pueden ser identificadas mediante técnicas de secuenciación. Estas especies con frecuencia presentan resistencia a los antifúngicos. El uso de técnicas de secuenciación de ADN de secuenciación de ADN requiere personal altamente calificado y se limita a laboratorios con espacio (Ferrer Gómez et al., 2021).

### 2.3.2.3. Métodos inmunológicos

Los métodos inmunológicos utilizan anticuerpos para encontrar y medir antígenos en una muestra. Los métodos inmunológicos se han utilizado para identificar especies de levaduras y detectar antígenos específicos en muestras clínicas (Strating & van Kuppeveld, 2017).

## 2.4. Fundamento y metodología

### 2.4.1. Técnica de discos de difusión

El método de difusión también conocido como método de difusión en disco de Kirby-Bauer, es una técnica de laboratorio que se utiliza para determinar la susceptibilidad antimicrobiana de un microbio o varios antibióticos u otros agentes antimicrobianos (Rodero, 2006). El método implica inocular el microorganismo de interés en una placa de agar y colocar discos impregnados con varios antibióticos. Los diámetros de las zonas de inhibición y los puntos de corte establecidos para cada antibiótico se comparan para interpretar los resultados (Ramos Perfecto et al., 2020).

### 2.4.2. Técnica de microdilución

La técnica de microdilución es un método para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) de un antimicrobiano contra un microorganismo específico (Gil-Romero et al., 2016). El proceso implica la dilución repetida de un antimicrobiano en un medio de cultivo líquido, luego la inoculación del microorganismo en la solución diluida. La concentración más baja de antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible del

microorganismo después de un período de incubación se conoce como MIC (Charles et al., 2016).

## 2.5. Perfil de sensibilidad antifúngica.

La capacidad de los hongos para ser susceptibles o resistentes a los agentes antifúngicos disponibles se conoce como perfil de sensibilidad antifúngica y permite determinar qué medicamento será más efectivo para combatir la infección en particular (Serrano et al., 2013)

El perfil de sensibilidad antifúngica se determina utilizando técnicas de estudio que evalúan la respuesta del hongo a los agentes antifúngicos (López-Ávila et al., 2016a)

La dilución en medio líquido en un tubo o microplaca es uno de los métodos más populares. Este método requiere la preparación de diluciones seriadas de antifúngicos en un medio de cultivo líquido, luego la inoculación del hongo en cada dilución (Fernández et al., 2008).

Los métodos de dilución en medio líquido en tubos o microplacas son estándares en microbiología y micología, permiten evaluar la susceptibilidad de una especie de hongo y una variedad de antifúngicos, así como evaluar la presencia de resistencia antifúngica en una población o entorno clínico específico (Czajka et al., 2023).

La información del perfil de sensibilidad antifúngica es esencial para elegir el tratamiento antifúngico más adecuado. Permite elegir qué antifúngicos serán efectivos contra la especie de hongo involucrada en la infección y ayuda a prevenir el uso inapropiado de antifúngicos que podrían no ser efectivos (Carrillo-Muñoz et al., 2010)

## 2.6. 2-3-5-Trifenil-2H-tetrazolio 2,3,5-cloruro de trifeniltetrazolio (TTC)

Técnica para indicar actividad biológica porque la forma incolora se hidrogena o reduce hasta un pigmento rojo fácilmente visible (Aparicio-Zambrano et al., 2019; Araujo-Baptista et al., 2020). La microdilución en placa junto con el indicador TTC se presenta como una herramienta útil para evaluar la eficacia de estos aceites en la lucha contra *Candida* (Rubert-Nason et al., 2015). Esta técnica se basa en la capacidad de las células fúngicas viables para convertir el 2,3,5-cloruro de trifeniltetrazolio (TTC), un compuesto incoloro, en formazán rojo. La formación de formazán disminuye cuando el aceite esencial inhibe el crecimiento fúngico y la actividad de las deshidrogenasas. Esto permite determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) (Abdulridha & Kareem, 2021).

## 2.7. Antifúngicos comerciales comunes para especies de *Candida*.

Los antifúngicos azólicos son una clase de medicamentos ampliamente utilizada para tratar infecciones fúngicas, incluidas las causadas por especies de *Candida*, son los antifúngicos azólicos, como el fluconazol y el voriconazol. Estos medicamentos funcionan como inhibidor de la enzima lanosterol 14- $\alpha$ -demetilasa, que es necesaria para crear ergosterol, un componente esencial de la membrana celular de los hongos (Brevis Palma et al., 2020).

Antifúngicos poliénicos: En casos más graves de infecciones por *Candida*, como candidemia o infecciones diseminadas, se utiliza la anfotericina B. Este medicamento actúa al unirse al ergosterol en la membrana celular fúngica, creando poros (Molina Berríos et al., 2020). La anfotericina B se administra por vía intravenosa y tiene efectos secundarios

importantes, como nefrotoxicidad, por lo que su uso generalmente se reserva para infecciones más graves y resistentes a otros antifúngicos (Díaz et al., 2012a).

Antifúngicos equinocandinas: Según (Quiles-Melero & García-Rodríguez, 2021b); Un antifúngico utilizado para tratar infecciones invasivas por *Candida* son las equinocandinas, como la caspofungina. Estos medicamentos se dirigen a la enzima 1,3-beta-D-glucano sintasa, que es necesaria para la formación de la pared celular, lo que impide la síntesis de la pared celular fúngica.

Antifúngicos azólicos se utilizan para tratar las infecciones por *Candida* además del voriconazol y el fluconazol. Un antifúngico azólico que se administra por vía oral es el itraconazol, que puede tratar la candidiasis mucocutánea y algunas infecciones sistémicas con eficacia (Nascimento et al., 2018)

## 2.8. Nivel de resistencia a antibióticos en Ecuador

Según Fernández et al., (2008), la resistencia es un problema global conocido como resistencia a los antibióticos es cuando microorganismos, como bacterias, hongos y otros, desarrollan la capacidad de resistir los efectos de los antibióticos, lo que limita la eficacia de los antibióticos como tratamiento de infecciones. El uso de antibióticos inapropiados o indiscriminados, la automedicación, el incumplimiento de las pautas de prescripción y la transmisión de genes de resistencia entre bacterias son algunos de los factores que pueden causar resistencia a los antibióticos.

Del 2014 al 2018, se ha registrado un aumento alarmante en los casos de resistencia a los antibióticos en Ecuador. En Ecuador, se han demostrado niveles significativos de

resistencia a antibióticos como penicilinas, cefalosporinas y fluoroquinolonas, según informes y estudios (Angulo Rodríguez et al., 2023).

## 2.9. Nuevas alternativas

Se han registrado casos en Ecuador y en otros países de resistencia a los antifúngicos en levaduras como *Candida spp.*, la cual es una causa frecuente de infecciones fúngicas en humanos. Es posible que estas levaduras se vuelvan resistentes a los medicamentos antifúngicos como las azoles y las equinocandinas (López-Ávila et al., 2016a).

La resistencia antifúngica requiere la investigación de nuevas alternativas antifúngicas. Esto incluye la creación de nuevos antifúngicos efectivos a base de aceites esenciales, fomentar el uso adecuado de antifúngicos y desarrollar métodos para prevenir infecciones fúngicas (Alajil et al., 2022).

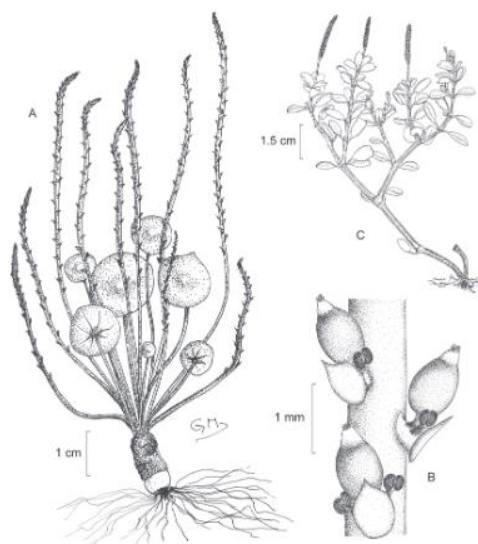
## 2.10. Familia Piperaceae

### 2.10.1. Generalidades

La familia Piperaceae comprende a 3600 especies distribuidas (Su et al., 2024). Los estudios de Oliveira & Rodríguez (2021) la familia Piperaceae son plantas arbóreas, arbustos, hierbas o trepadoras, poseen nudos y superficie pubescente con pelos simples o multicelulares. Los tallos floríferos suelen presentar brácteas o prófilos laterales en ambos lados con hojas terminales, junto con glándulas o eléctricos. Son leñosos a lo largo del tallo y están abiertos, las inflorescencias son terminales, axilares, con flores muy pequeñas y están agrupadas de forma compacta. El fruto es una baya o drupa (Ilustración 1).



*Ilustración 1. Bosquejo general sobre la familia Piperaceae*



*Nota 1. Imagen descriptiva sobre partes de la familia Piperaceae (Samain & Tebbs, 2020)*

### 2.11. Género *Piper*

Las especies de género *Piper* se utiliza en la medicina popular debido a las presencias de contenido aceitoso en las estructuras. Entre las especies con esta característica se encuentran *P. crassinervium* H.B., conocido como jaborandi, *P. hispidinervum* C.DC. (pimiento largo), *P. aduncum* L. (pimiento mono), *P. nigrum* (pimienta negra), entre otros (Rukmini et al., 2019). La mayoría de las especies del género *Piper* se dan en la zona tropical de América (700 spp.), seguida del sur de Asia y Oceanía (300 spp.) (Diaz et al., 2012a).

## 2.12. *Piper imperiale*

*Piper imperiale* también conocida como "ampar" es una planta estudiada por sus riquezas en compuestos fenólicos en partes de las plantas como hoja, flores, tallo y diversas propiedades biológicas y antioxidantes nativa de América Central y Sudamérica (Diaz et al., 2012b). *P. imperiale* se considera un material de partida para el aislamiento bioguiado de andamiajes químicos antioxidantes, antibacterianos y citotóxicos potencialmente importantes.

Según, (Glassmire et al., 2023); Las defensas químicas del *Piper imperiale* incluyen nitrógeno biosintéticamente relacionados, sintenpiridona y piplaróxido (donde la sintenpiridona es el precursor del piplaróxido, así como al menos cinco sesquiterpenos diferentes. Cada uno de estos sesquiterpenos probablemente desempeña un papel sinérgico en la protección de las plantas.

El *piper imperiale* también contiene al menos cinco sesquiterpenos diferentes, y aún no se sabe cómo funcionan para proteger la planta. Se han encontrado varias especies de hormigas facultativas en *P. imperiale*. Sin embargo, no se sabe si las hormigas benefician estas plantas (Richards et al., 2010)

### 2.12.1. Taxonomía

Tabla 4. Taxonomía

<b>Reino</b>	<b>Plantae</b>
<b>División</b>	Tracheophyta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Orden</b>	Piperales
<b>Familia</b>	Piperaceae

<b>Género</b>	Piper
<b>Especie</b>	<i>Piper imperiale</i>
<b>Nombre científico</b>	<i>Piper imperiale</i> (Miq.) C.DC.

*Nota. 4 Obtenidos de (Samain & Tebbs, 2020)*

### 2.13. Aceite esencial

Los aceites esenciales se consideran compuestos volátiles en plantas, formados por una mezcla de alcoholes, aldehídos, cetonas y ésteres, usados en aromaterapia, medicina tradicional, cosmética e industria alimentaria, y se convirtió en alternativa prometedora a los compuestos químicos. (Carhuallanqui Pérez et al., 2020)

#### 2.13.1. Composición química

Según, (Acero-Godoy et al., 2019)

- La composición de los aceites esenciales varía según sus moléculas, son prácticamente monos moleculares, pero existe prevaencia de aceites ricos de 2 o 3 moléculas principales, polis moleculares. Sus componentes se agrupan en terpenos y compuestos fenilpropanoide; constituidos a partor de unidades ded isopreno con cinco carbonos, se dividen en monoterpenos (10 carbono) y sesquiterpeno (15), con variante aciclicas, bicilclicas, oxigenadas y no oxigenadas
- La versatilidad química de los A.E (Aceite Esencial) se enfoca en la identificación y comprensión de mezclas presentes para verificar su funcionamiento biológico

2.14. Información de interés sobre *Piper imperiale*

Tabla 5. Tabla de información del aceite esencial

<b>Característica</b>	<b>Descripción</b>
Origen	Banco de aceites esenciales de los Laboratorios Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana.
Ubicación de la muestra	Provincia de Morona - Santiago, Cordillera de Kutukú.
Coordenadas	2°08'18''S 77°42'52''W.
Número de voucher	003802 (herbario de los Laboratorios Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana).
Técnica de extracción	Arrastre de vapor por cinco horas.
Destilador	250 litros de acero inoxidable.
Propietario del destilador	Fundación Chankuap.
Ubicación del destilador	Macas, provincia de Morona – Santiago.
Coordenadas del destilador	2°18'21.2"S 78°07'08.8"W.

Nota. 4. Información específica sobre el aceite esencial (*Chasipanta Ronquillo & Chicaiza Galarza, 2016a*)

Tabla 4. Características del aceite esencial de *P. imperiale*

<b>Parte vegetal</b>	<b>(Kg)*</b>	<b>AE (mL) *</b>	<b>%R*</b>	<b>Color</b>	<b>Olor</b>	<b><math>\rho</math> (g/mL)</b>	<b>IR</b>
Hojas	11,804	7	0.59	Amarillo fuerte	Mentolado	1,10	1,523

Nota. 5. Información sobre el aceite esencial de *P. imperiale* y sus características (Chasipanta Ronquillo & Chicaiza Galarza, 2016a).

#### 2.15. Importancia de los aceites esenciales frente a infecciones fúngicas.

Los aceites esenciales tienen una fuerte actividad antiadherente y anti-biopelícula suficiente para inhibir el crecimiento de hongos, previniendo la formación de biopelículas (Su et al., 2024), siendo una mezcla compleja de sustancias aromáticas, los aceites constituyen 0,1 a 1 % del peso de la planta, cada A.E posee distintas densidades (López Luegon, 2004b). Se encuentra en estructuras celulares específicamente en las glándulas secretoras comprobado con diversas pruebas con vapor de agua para que esta libere hidrocarburos fenólicos. (Acero-Godoy et al., 2019)

Tabla 6. Aceites esenciales con propiedades antifúngicas

<b>Aceite esencial</b>	<b>Componentes principales</b>	<b>Propiedades antifúngicas.</b>
<b>aceite de orégano</b>	Carvacrol, Timol	Tiene la capacidad de detener el crecimiento de varios hongos

		patógenos, incluido el <i>Fusarium incarnatum</i> .
<b>Aceite de Canela</b>	Eugenol	Tiene características antifúngicas. Puede combatir muchos hongos.
<b>Aceite de Neem</b>	Azadiractina, Nimbidina y Salanina	Contiene sustancias antifúngicas. Es capaz de detener el crecimiento de hongos patógenos.
<b>Aceite de albaca</b>	Terpineno Pineno Estragol Terpineno-4-ol Timol	Son eficaces para combatir hongos patógenos como <i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus spp.</i>

*Nota. 6 (Bustamante Morales et al., 2023a; Diaz et al., 2012c)*

#### 2.15.1. Mecanismo de acción

Según (Cleary et al., 2023);

El mecanismo de acción (MA) utilizado en el campo de medicina para referir que proceso, sustancia o tratamiento produce un fármaco o su alternativo en el cuerpo humano u organismo biológico. Refiriéndose al proceso en que se modifica una diana específico en la célula, como enzima o función. MA es crucial para proporcionar una dosis adecuada de medicamento hacia los pacientes.

#### 2.15.2. Compuestos químicos del aceite esencial *Piper imperiale*.

(Chasipanta Ronquillo & Chicaiza Galarza, 2016). El aceite esencial de *Piper imperiale* es un producto natural obtenido de las hojas de la planta *Piper imperiale*, cuya composición se basa en varios compuestos químicos, como monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanoides y compuestos fenólicos, componen el aceite esencial de *Piper imperiale*. Las

propiedades bioactivas y antioxidantes del aceite se deben estos ingredientes (Rukmini et al., 2019). El estudio de (Chasipanta Ronquillo & Chicaiza Galarza, 2016b) descubrió que el aceite esencial de *Piper imperiale* contenía una variedad de compuestos químicos, incluidos carvacrol, eugenol, timol, linalol y metil.

Tabla 7. composición se basa en varios compuestos químicos

<b>Carvacrol.</b>	Se ha demostrado que el carvacrol, uno de los principales componentes del aceite esencial de <i>Piper imperiale</i> , tiene propiedades antioxidantes, antimicrobianas y antiinflamatorias
<b>Eugenol.</b>	El eugenol, otro compuesto químico crucial en el aceite esencial de Piper imperiale, tiene propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y analgésicas.
<b>Timol.</b>	El timol neutraliza los radicales libres y previene el daño oxidativo contiene propiedades antimicrobianas que combaten una variedad de bacterias, hongos y levaduras.
<b>Linalool.</b>	Son reconocidos por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias ansiolíticas y proteger contra el estrés

---

oxidativo, necesarias para controlar la respuesta inflamatoria y disminuir la ansiedad.

---

*Nota. 7 (Chasipanta Ronquillo & Chicaiza Galarza, 2016)*



## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Tipo de estudio.

Con el objetivo de obtener resultados verificados y precisos, el estudio se diseñó como una investigación experimental cuantitativa, cualitativa y transversal;

El estudio cuantitativo: se utilizó este método para evaluar la sensibilidad antifúngica de cepas de *Candida spp.* Se utilizaron métodos de sensibilidad como la microdilución y los discos Kirby-Bauer para medir de manera precisa la respuesta de las cepas al voriconazol y fluconazol.

Estudio cualitativo: Se realizaron observaciones de los cambios de color en los pocillos con diferentes concentraciones de aceite esencial y halos de inhibición alrededor de las colonias de *Candida* tratadas en este estudio. Estos cambios de color y los tamaños de los halos se examinaron y compararon con controles negativos y positivos que incluían un control con DMSO, se utilizaron tanto cepas clínicas identificadas con CHROMagar *Candida* como una cepa ATCC certificada, lo que permitió obtener resultados comparativos y validar la eficacia del aceite esencial frente a diferentes cepas de *Candida*. Además, se realizó datos estadísticos de Chi-cuadrado para determinar si hay una diferencia significativa por las dos técnicas, entre los resultados observados y los esperados en una o más categorías.

Estudio transversal: En este caso, se utilizaron 100 cepas de *Candida* y se realizaron pruebas de sensibilidad y evaluación del aceite esencial de *Piper imperiale* durante un período de tiempo determinado. Esto permitirá una instantánea de la sensibilidad antifúngica y los efectos del aceite esencial en ese período.

### 3.2. Tipo de muestreo

Se utilizó un método de muestreo no probabilístico para seleccionar las cepas de *Candida spp.* Esto implica que todas las cepas de *Candida spp.* conservadas y almacenadas en el Laboratorio Microbiológico Suárez se seleccionaron directa e intencionalmente de las que cumplieron con los criterios establecidos.

### 3.3. Tamaño de muestreo

La población muestral de la investigación se delimito a una población específica con el fin de mejorar el control de la investigación, se seleccionó una muestra de pacientes con afecciones por *Candida* de entre el rango de edad 30 a 60.

Las muestras se obtuvieron de aislados de pacientes con levadura y de aspirados de ojos, corazón, oído.

Se seleccionará la especie de *Candida* más común y se evaluará la eficacia del aceite esencial contra ella.

### 3.4. Variables

- Variables dependientes

Sensibilidad a las cepas de *Candida spp.* a los antifúngicos y los cambios de color en los pocillos con diferentes concentraciones de aceite esencial.

Tamaño de los halos inhibidores que rodean las colonias de *Candida* tratadas.

- Variables independientes

Las concentraciones de aceite esencial de *Piper imperiale*.

Los antifúngicos de referencia se utilizarán en controles positivos.

- Las variables involucradas

Método de sensibilidad empleado, que incluye microdilución y discos Kirby-Bauer.

Cepa ATCC 10231 y cepa clínica identificada con *Candida* CHROMagar para comparar.

- Variables adicionales:

Características particulares de las cepas de *Candida* que se utilizan.

Factores ambientales del estudio, como la temperatura y la humedad.

Variaciones potenciales en la calidad o concentración del aceite esencial empleado.

- Variables extrañas:

Temperatura de incubación, humedad y composición del medio de cultivo son factores que pueden afectar el crecimiento fúngico.

- Variables de control:

Control negativo (DMSO).

Control positivo (antifúngico).

Control positivo (aceites naturales).

Control ambiental (Agar cromogénico).

Control Blanco (Medio de cultivo).

### 3.5. Criterios

#### 3.5.1. Criterios de inclusión:

- Cepas de *Candida spp.* de muestras clínicas.
- Cepas de *Candida* identificadas con certeza utilizando CHROMagar.
- Cepas de *Candida* sensibles a los antifúngicos.
- Cepas de *Candida* que pueden crecer y desarrollarse adecuadamente.

#### 3.5.2. Criterios de exclusión:

- Cepas de *Candida* contaminadas o de baja calidad.
- Cepas de *Candida* resistente a los antifúngicos de referencia.
- Cepas de *Candida* que representen características atípicas o inusuales.

### 3.6. Recolección de datos

Los resultados de los dos métodos se registrarán para verificar la efectividad del aceite mediante diferentes concentraciones con antifúngicos comerciales.

### 3.7. Protocolos

Técnicas de aislados obtenida de metodología CLSI, Normativa VET01-A4.

técnica de inoculación metodología obtenida de CLSI, Normativa VET01-A4.

Preparación de diluciones seriadas Normativa-110-SSA1-1994.

Técnica microdilución metodología obtenida de CLSI, Normativa M27-A3, M27-A45, M606, M574 y M597.

Manual de Bioseguridad para establecimiento de salud metodología (OPS, OMS).

Los métodos de difusión de levaduras en agar obtenida de CLSI, Normativa (documentos M44-A210 y M606).

En base al estudio de Baharvand et al., (2024) se utilizó CHROMagar *Candida* Plus de Makol Ecuador S.A. para identificar las especies fúngicas de *Candida*. En la preparación del medio de cultivo propuesto por (Valdivieso-Ugarte et al., 2019), se mezclaron 27,7 gramos de medio en un litro de agua purificada, se calentó hasta su ebullición, mediante autoclave. Una vez listo el agar, se sembraron las cepas activadas y se inocularon a 35°C durante 24 horas de acuerdo (Adehala et al., 2019; Baroja et al., 2021).

Se utilizarán técnicas de sensibilidad fúngica de especie de *Candida* para determinar la sensibilidad o resistencia inmediatamente después de ser identificadas.

Metodología de difusión en disco de Stokes (disco de Kirby-Bauer).

(Lacasa & Mazuelos, 2021); A vista de Abbasi Montazeri et al., (2021); se requiere la preparación de un medio de cultivo Mueller Hinton agar (MHA) suplementado con 0,5 g/ml de azul de metileno y 2% de glucosa. La metodología de laboratorio CLSI (Lacasa & Mazuelos, 2021); se utilizó para preparar el medio de cultivo, que consistía en mezclar 38 gramos en un litro de agua destilada, colocar en la autoclave y distribuir.

Solución de glucosa madre (40%)

- 40 g de glucosa • 100 ml de agua destilada

Se calentó suavemente hasta que la glucosa se disolvió.

Solución de metileno azul (5 mg/ml)

- 0,1 g de azul metileno • 20 ml de agua destilada

(Strating & van Kuppeveld, 2017) La solución GAM unificada se obtuvo para la preparación de una suspensión fúngica directa de la metodología de (García, 2021); utilizando un asa flameada y fría. La suspensión tiene un estándar de turbidez de estándar 0.5 en la escala de McFarland. Después, con un asa o un hisopo estéril se sumergió en la suspensión fúngica y se presionó contra la pared del tubo para eliminar el líquido sobrante. Para lograr una distribución homogénea del inóculo, se inoculó toda la superficie de la placa rayando uniformemente en tres direcciones en la superficie del medio MHA y se colocó 2 discos (Fluconazol, voriconazol) (Strating & van Kuppeveld, 2017). Se colocó finalmente la tapa de la caja y se dejó reposar boca. Para determinar la sensibilidad o resistencia de la cepa a cada antifúngico, se compararon los diámetros de la zona de inhibición con los puntos de corte establecidos por el CLSI.

Para determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (MIC) de antifúngicos frente a levaduras, como *Candida spp.*, la metodología microdilución, emplea en las normas del CLSI. De acuerdo con la metodología de Charles et al., (2016); se preparan dos frascos de Sensititre Yeats One System, medio de cultivo y antifúngicos en diferentes diluciones. Para lograrlo, se

utilizaron solución salina fisiológica para suspender las células de levadura en uno de los frascos y se ajustaron las concentraciones celulares de acuerdo con la escala de McFarland, 20  $\mu\text{L}$  de suspensión de levadura se pipetearon en el medio de cultivo Sensititre Yeast One con una micropipeta, se utilizó una micropipeta de 8 canales, de la marca Scilogex, para transferir la solución una caja Petri única estéril (Chuang et al., 2022); 100  $\mu\text{L}$  de suspensión se extrajeron de cada punta de micropipeta y se colocaron en los pocillos adecuados de la placa Sensititre Yeast One (SYO). Para evitar contaminaciones y errores en los resultados, esta transferencia debe realizarse de manera cuidadosa y precisa (Palladini et al., 2023).

(Lacasa & Mazuelos, 2021); Después de la inoculación de los pocillos de la placa SYO. El CLSI (Lacasa & Mazuelos, 2021); se incubó la placa durante 24 horas a una temperatura de 35 °C, la placa SYO se leyó visualmente para determinar si había crecimiento en cada pocillo. Se registró la inhibición o el crecimiento de las levaduras en presencia de varios antifúngicos.

### 3.7.1. Preparación del material

Siguiendo el procedimiento de (García López et al., 2020), se eligieron frascos pequeños de color ámbar que habían sido esterilizados para evitar cualquier contaminación microbiana, la elección del color ámbar fue proteger las soluciones de la luz, que pueden degradar algunos compuestos químicos. Para garantizar la integridad de nuestro estudio y la validez de los resultados, seguimos un protocolo estandarizado de preparación de materiales, como se detalla en el procedimiento de (Ardehali et al., 2019; Baroja et al., 2021). Para cumplir con los requisitos experimentales y las normativas de seguridad, se seleccionó meticulosamente el equipo y los materiales. La metodología utilizada se detalla a continuación:

### Preparación de materiales y equipos.

Durante la manipulación de cepas de *Candida*, utilizamos una Cámara de Flujo Laminar para mantener un ambiente estéril.

Para fomentar su crecimiento, las cepas *Candida* ATCC certificadas fueron incubadas en una incubadora con condiciones controladas.

### Esterilización:

La autoclave se utilizó para desinfectar todos los materiales susceptibles al calor, incluidos tubos de ensayo, hisopos y fundas de autoclave. Para evitar la contaminación cruzada, las puntas de las micropipetas y las placas de micro titulación se esterilizaron y prepararon.

### Preparación y preparación de soluciones:

Los reactivos que necesitamos para nuestras pruebas analíticas son cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio y dimetilsulfóxido (DMSO).

### Información y análisis de datos:

Los datos cuantitativos se recopilaron utilizando un espectrofotómetro y un lector de microplacas, instrumentos esenciales para evaluar la actividad y la concentración de las cepas.

## 3.7.2. Preparación de la solución madre o stock

### Preparación de las soluciones:

Siguiendo las recomendaciones anteriores, elegimos frascos de color ámbar para guardar soluciones sensibles a la luz para proteger la estabilidad de los compuestos químicos.



Se preparó la solución madre en el primer frasco con aceite de *Piper Imperiale*. Se midió cuidadosamente la cantidad de aceite necesaria siguiendo las proporciones establecidas en estudios previos (tabla 1) (Brolis et al., 1998).

Tabla 8. Protocolo para seguir

Selección y calidad del aceite:	Elegir un aceite de alta calidad y pureza que provenga de una fuente confiable, que haya sido producido y almacenado adecuadamente para mantener sus propiedades intactas (Morales S., 1958).
Medición precisa de la cantidad de aceite:	Medición cuidadosamente con una pipeta o una balanza analítica la cantidad de aceite necesaria para la preparación de la solución madre (Rodriguez et al., 2023).

*Nota.* 8. Proceso (Morales S., 1958; Rodriguez et al., 2023; Tincusi et al., 2019).

### 3.8. Metodología de discos de difusión Kirby Bauer

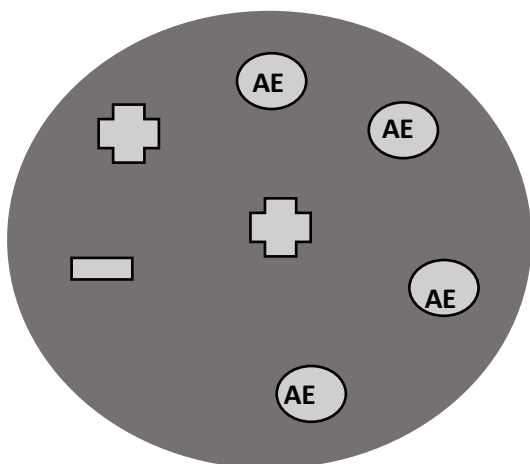
Se realizó el proceso en un área estéril, con los materiales necesarios, siguiendo las normas de la Organización Panamericana de Salud y la Organización Mundial de Salud (2018). Primero, se marcaron los sectores donde se colocarían los discos con sus controles (Ilustración 3.) (Feng et al., 2023). Siguiendo la metodología de (Rózańska et al., 2023) se preparó un inóculo con cepas de *Candida spp.* certificada ATCC 10231 y *Candida* clínica (albicans) (Anexo). Para lograrlo, se preparó la suspensión de hongos de acuerdo con

(Shakeel et al., 2023), se diluyó la cepa de interés en solución salina en la escala de McFarland con un espectrofotómetro, para garantizar una concentración celular adecuada y reproducible en todas las pruebas. Después de preparar el inóculo, se utilizó un hisopo estéril para sembrar las cepas de *Candida* sobre la superficie del agar Muller-Hinton GAM. Se asegurará que el inóculo se distribuya uniformemente en todo el agar (Shaw et al., 2023).

Se realizó la preparación de discos blancos para impregnar el aceite esencial (AE) de *Piper imperiale* en concentraciones seriadas partiendo desde 2%, 1%, 0,2%, 0,1%, estos discos se obtuvieron de tubos que habían sido preparados previamente, y se agregaron 10  $\mu$ l de AE en cada uno de ellos con una micropipeta. Tal como menciona Diniz-Neto et al., (2024), en un estudio previo de esta metodología que permitió evaluar el impacto del AE en concentraciones y obtener datos sobre su actividad antimicrobiana en diferentes niveles de concentración

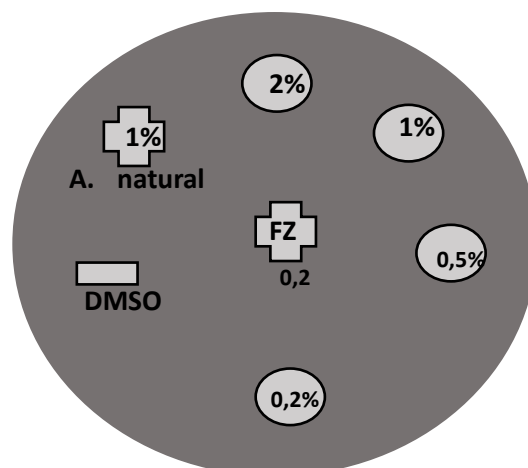
Cada placa de agar tenía dos controles positivos además de los discos impregnados con AE. El fluconazol al 0,2 un antifúngico ampliamente utilizado y conocido por su actividad inhibidora contra cepas de *Candida* fue el primer control positivo (Bustamante Morales et al., 2023). Un disco impregnado con un aceite esencial natural que contenía Terpinol al 1% que tiene fuertes propiedades antifúngicas que combaten una variedad de bacterias u hongos patógenas resistentes a los medicamentos (Merghni et al., 2023), siendo el segundo control positivo, por último, se le añadió un control negativo DMSO dimetilsulfóxido, estos controles permitieron la comparación de la actividad de AE con antimicrobianos de referencia.

Ilustración 2. Preparación sobre las ubicaciones de los discos en el agar.



Autora (2024)

Ilustración 3. Concentraciones en los discos en el agar.



Autora (2024)

Respecto a la lectura de halos de inhibición se realizará mediante la metodología de (García López et al., 2020; Lopardo, 2021) interpretando los resultados mediante una prueba cualitativa dependiendo su forma y nivel de delimitación alrededor del antibiótico.

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{Diametro de halo de inhibición de discos (mm)}}{\text{Diametro de halo de inhibición de control positivo (mm)}} * 100$$

4. La levadura es extremadamente sensible al aceite esencial con un halo de inhibición de menos de 30 mm.
5. La levadura es sensible al aceite esencial con un halo de inhibición de 25 mm.
6. La levadura es moderadamente sensible al aceite esencial con un halo de inhibición de 15-20 mm.
7. El halo de inhibición menor a 15 mm indica que la levadura es resistente al aceite esencial.

### 3.9. Metodología microdilución

#### 3.9.1. Preparación del inóculo de *Candida spp.*

Según las normas y procedimientos del capítulo XV de CLSI (Lacasa & Mazuelos, 2021), se preparó el inóculo con una aproximación de cinco colonias de diámetro mínimo de 1 mm, se incubó durante 24 horas en solución salina (CINa 0,85%). Se agitó, y con ayuda de un espectrofotómetro se ajustó la densidad óptica a 0,5 McFarland a una longitud de onda de 530 nm.

#### 3.9.2. Preparación de microplaca

Se emplearon materiales y procedimientos con ciertas modificaciones de acuerdo con las referencias de (Lopardo, 2021) y (Castro Méndez et al., 2019), el ensayo se llevó a cabo en placas de 96 micropozos, en donde se disolvió el aceite de *Piper imperial* en dimetilsulfóxido (DMSO) en diversas concentraciones (240 g/L).

Se agregó 180 µL de medio de cultivo a los pocillos A1 hasta H1. En el primer tratamiento se agregó 20 µl de aceite esencial, de las filas A1 hasta A3, posteriormente desde la fila B en los pocillos 1,2,3 hasta la fila H se coloca medio de cultivo y aplica una dilución seriada.

Para el control positivo comercial (fluconazol) representado con las letras CC, se colocó 180 µl de medio de cultivo con 20 µl del fluconazol, y posteriormente se realizó una dilución en series, proceso replicado en los controles naturales (CN) Las filas A7- A9- hasta la fila H7-H9

En cuanto al control negativo en columna del pocillo 10, se replicó el proceso descrito previamente.

Tabla 8. Estructura de la microplaca.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	T1	T1	T1		CC		CN1	CN2	CN3	DMSO	M+I	MC
<b>B</b>	T1	T1	T1		CC		CN1	CN2	CN3	DMSO	M+I	
<b>C</b>	T1	T1	T1		CC		CN1	CN2	CN3	DMSO	M+I	
<b>D</b>	T1	T1	T1		CC		CN1	CN2	CN3	DMSO	M+I	
<b>E</b>	T1	T1	T1		CC		CN1	CN2	CN3	DMSO	M+I	
<b>F</b>	T1	T1	T1		CC		CN1	CN2	CN3	DMSO	M+I	
<b>G</b>	T1	T1	T1		CC		CN1	CN2	CN3	DMSO	M+I	
<b>H</b>	T1	T1	T1		CC		CN1	CN2	CN3	DMSO	M+I	

Nota 8 T: Tratamiento aceite esencial, CC: control positivo comercial; CN1: Control natural Terpeneol, CN1: Control natural Citral; CN3: Control natural Pineol, DMSO: Control negativo (Mosquera et al., 2020)

Tabla 9. Volúmenes generales

Microorganismo	Medio de cultivo GAM (uL)	Inóculo (uL)	TTC (trifeniltetrazolio cloruro) (uL)	Volumen final
<i>Candida Albicans 10231</i>	100	40	30	170

Nota. 9. Volumen del inóculo, TTC y medio de cultivo (De La Cruz Mora & Ulloa Curizaca, 2020)

De la suspensión de la levadura realizada se colocaron 40ul del inóculo en los pocillos con medio de cultivo excepto la columna 12, se incubaron durante 24 grados centígrados (Valdivieso-Ugarte et al., 2019) por 24 horas de incubación, se agregaron 30  $\mu$ L de 2,3,5-cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) al 1% en cada pozo.

Se desarrolló una escala numérica (0, 1, 2, 3, 4) para realizar las lecturas visuales con base en datos establecidos por el Comité Nacional para Estándares de Laboratorios Clínicos (CNCCLS, 2002). Estos se indican como porcentaje de inhibición del crecimiento (IC) de acuerdo con el crecimiento.

Después del proceso de incubación en 48 se procedió con la preparación del 2,3,5-cloruro de trifeniltetrazolio (TTC).

### 3.9.3. Preparación del indicador de desarrollo microbiano TTC

Un día antes del ensayo, el colorante TTC se preparó en una concentración del 1%, para esto, se pesaron 100 mg de indicador TTC y se diluyó en 10 mL de agua destilada estéril. Dado que el TTC es sensible a la luz y al calor, la solución se conserva en refrigeración en un frasco ámbar (De La Cruz Mora & Ulloa Curizaca, 2020).

A las 24 horas de incubación, se agregaron 30  $\mu$ L de 2,3,5-cloruro de trifenil tetrazolio (TTC) al 1% en cada pozo (Carrodegua-Gonzalez & Zúñiga-Orozco, 2023).

### 3.9.4. Determinación de la concentración inhibitoria mínima

La clasificación creada por Başer & Buchbauer, (2020) que se adaptó a levaduras, se utilizó para la interpretación de los resultados.

Tabla 10. Categorización

<b>MIC</b>	<b>Sigla</b>	<b>ug/mL</b>
Muy fuerte	MF	< 500
Fuerte	F	$\geq$ 500
Moderada	M	500<MIC<5000

débil	D	5000<MIC<20000
ausente	A	>20000

*Nota. 10. Descripción de la categorización (Başer & Buchbauer, 2020)*

Según (Pearson et al., 2019); las lecturas son en base a:

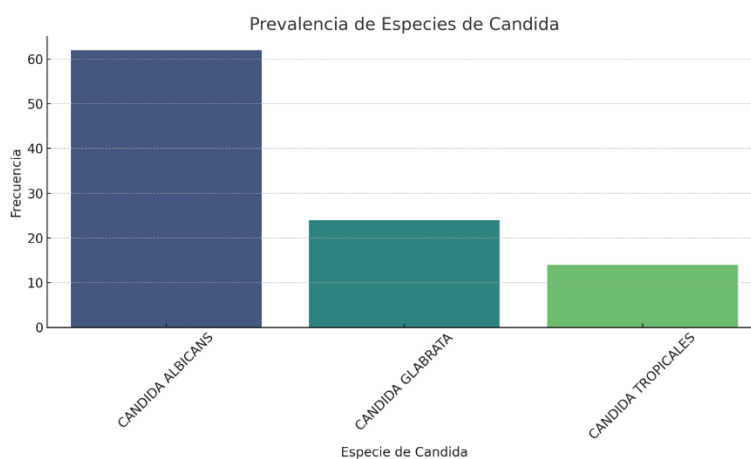
4. Si la placa de control de pureza se muestra contaminada, la prueba de MIC no puede ser interpretada y debe ser repetida.
5. Leer el punto final MIC como la concentración más baja del agente antimicrobiano que inhibe completamente el crecimiento del organismo detectado por observación directa sin ayuda de ningún aparato óptico.

## CAPITULO IV

### RESULTADO Y DISCUSIONES

El análisis clínico de los datos mostró que la especie *Candida albicans* era la más común entre las muestras examinadas, con 62 casos de cada 100, lo que representa una frecuencia relativa del 62 %. *Candida glabrata* tenía 24 casos y una frecuencia relativa del 24%, mientras que *Candida tropicalis* tenía 14 casos y una frecuencia relativa del 14% (ANEXO C). Sin embargo, la cantidad de estas últimas es significativamente menor, lo que demuestra que *Candida albicans* prevalece en la muestra examinada (Gráfica 6), datos similares con el estudio de Virginia et al., (2020), revelando que *Candida albicans* es la especie más común de *Candida* y puede infectar varias partes del cuerpo, principalmente en mujeres, pero también en hombres en el área genital.

*Ilustración 44. % de Prevalencia de Candida*



*Nota. Por la autora (2024)*

#### 4.1.2. Eficiencia de la metodología de difusión en disco Kirby Bauer



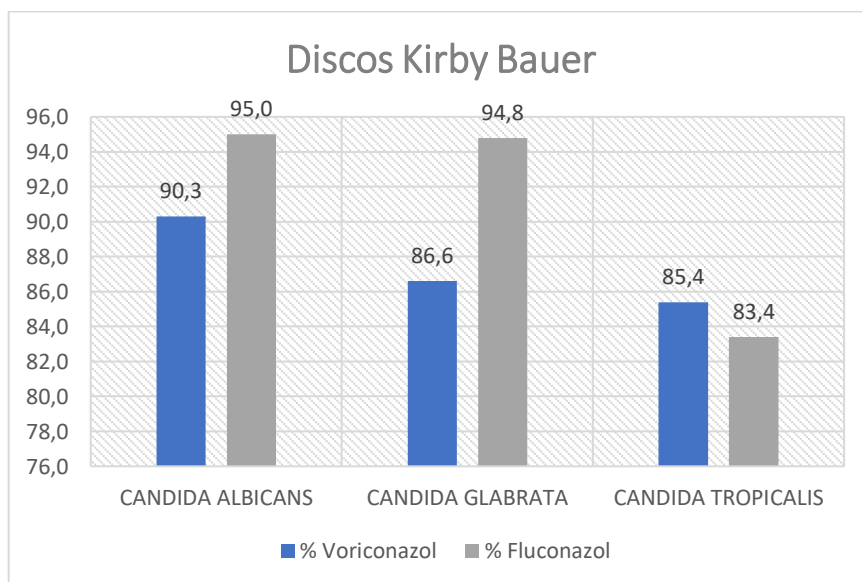
Se evaluó la eficacia de susceptibilidad en la especie de estudio a los antibióticos voriconazol y fluconazol. Los hallazgos mostraron variaciones significativas en las zonas de inhibición en comparación con los puntos de corte para voriconazol y fluconazol, lo que indica una variabilidad en la sensibilidad de las cepas de *Candida*.

Tabla 11. Porcentaje de inhibición de discos de difusión

Especie de Candida	% Voriconazol	% Fluconazol
<i>Candida Albicans</i>	90,3	95,0
<i>Candida Glabrata</i>	86,6	94,8
<i>Candida Tropicalis</i>	85,4	83,4

Nota 11. Elaborado por la autora (2024)

Ilustración 5. Gráfica



Nota 5. Elaborado por la autora (2024)

Los estudios de sensibilidad antifúngica en discos de difusión para las especies de *Candida* obtenida de muestras clínicas frente a voriconazol y fluconazol indican que, *Candida*

*albicans*, *Candida glabrata* y *Candida tropicalis* son altamente inhibidos (ANEXO D). En particular, *Candida albicans* se inhibe al 90,3% con voriconazol y 95,0 % con fluconazol; *Candida glabrata* inhibe el 86,6 % con voriconazol, 94,8% con fluconazol; *Candida tropicalis* inhibe el 85,4 % con voriconazol, 83,4 con fluconazol. Estas especies se inhiben con voriconazol y fluconazol, la media de las especies pertenece 23 mm y 20 mm para *C. albicans*, 20 mm y 22 mm para *C. glabrata*, y 20 mm y 18 mm para *C. tropicalis*.

Todas las especies estudiadas son sensibles a ambos antifúngicos después de comparar estos diámetros de inhibición con los puntos de corte establecidos por el CLSI (García-Meniño et al., 2020), indicando los diámetros de inhibición que superan los umbrales mínimos para ser considerados sensibles,  $\geq 25$  mm para voriconazol y  $\geq 18$  mm para fluconazol, y utilizan para confirmar la sensibilidad.

La especie *Candida albicans* en este estudio mostró un diámetro de inhibición de 23 mm, lo que indica su sensibilidad al voriconazol. Además, *Candida glabrata* y *Candida tropicalis* fueron sensibles a este antifúngico con diámetros de inhibición superiores al umbral de sensibilidad de 24 mm y 20 mm, respectivamente.

En relación con el fluconazol, la sensibilidad de *Candida albicans* se mide por un diámetro de inhibición. El presente estudio clínico confirma la sensibilidad de *Candida albicans*, ya que su diámetro de inhibición frente al fluconazol es de 25 mm. La medida de un diámetro de 20 mm también cumple con el criterio de sensibilidad para *Candida glabrata*, que es igual o superior a 19 mm. *Candida tropicalis*, que tiene un diámetro de 22 mm, tiene la misma sensibilidad al fluconazol que el punto de corte.

#### 4.1.3. Eficiencia de la metodología Microdilución.

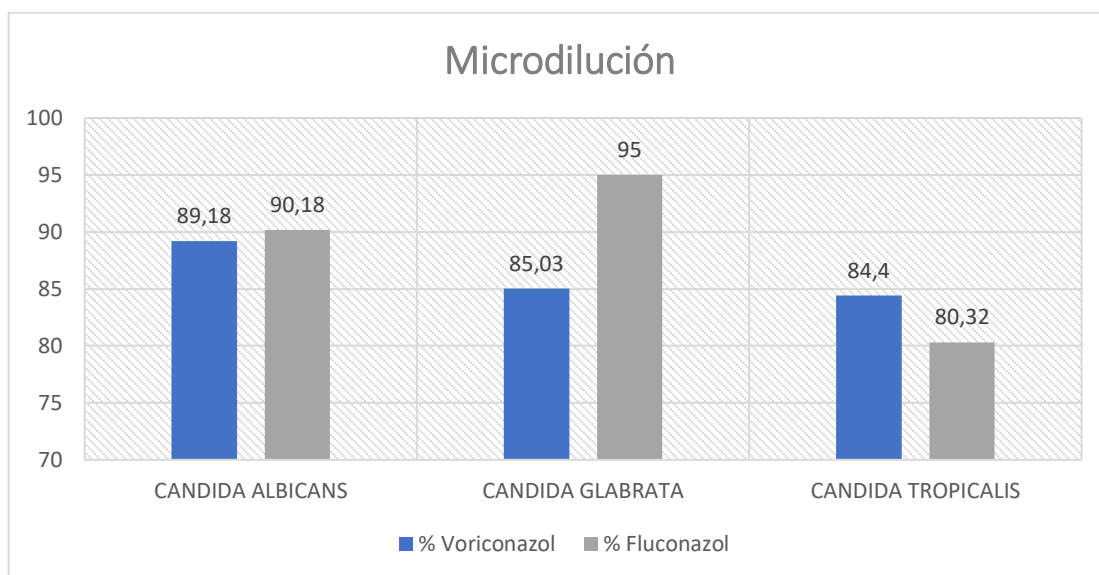
En contraste, técnica mostro sensibilidad y un porcentaje de inhibición

Tabla 12. Porcentaje de inhibición de la técnica microdilución

Especie de Candida	% Voriconazol	% Fluconazol
<i>Candida Albicans</i>	89,18	90,18
<i>Candida Glabrata</i>	85,03	95
<i>Candida Tropicalis</i>	84,4	80,32

Nota 12. Elaborada por la autora (2024)

Ilustración 6. Gráfica



Cuando se exponen a dos antifúngicos, voriconazol y fluconazol, los resultados de la técnica muestran inhibición hacia las especies de *Candida spp.* El voriconazol inhibió el crecimiento de *Candida albicans* en un 89,18% y el fluconazol en un 90,18%, lo que indica que ambos tratamientos fueron efectivos. El voriconazol inhibió a *Candida tropicalis* en un 84,4%, mientras que el fluconazol inhibió a *Candida tropicalis* en un 80,32%, lo que indica una leve preferencia por la respuesta al voriconazol. Para *Candida glabrata*, el voriconazol

demostró una inhibición del 85,03%, mientras que el fluconazol demostró una inhibición superior del 95%, lo que indica una preferencia por la respuesta al fluconazol en esta especie (ANEXO E).

El análisis de los datos recopilados reveló una tendencia creciente en la resistencia de diversas especies patógenas a los tratamientos convencionales. (López-Ávila et al., 2016b) destaca la capacidad de las especies para adaptarse y evolucionar en respuesta a las presiones selectivas impuestas por el uso extensivo de agentes químicos. (Cárdenas Parra & Perez Cárdenas, 2020; Rojas et al., 2020) resalta la aparición de tipos de bacterias y virus que exhiben una fuerte resistencia a los medicamentos antibióticos y antivirales convencionales.

Este fenómeno plantea un desafío para la salud pública y demuestra la urgencia de investigar y desarrollar estrategias de tratamiento alternativas.

#### 4.2.1. Resultados del porcentaje de inhibición de la metodología Discos Kirby Bauer

Los resultados del estudio de la cepa clínica y certificada revelan actividad antifúngica con un control Terpeneol al 1% y Fluconazol al 0,2% como control comercial.

Según los hallazgos, el aceite exhibe una fuerte actividad antifúngica en ambas cepas. La inhibición para la cepa certificada ATCC 10231, con una concentración de aceite del 2%, fue del 83,33% de inhibición, disminuyendo a 73,33% a la concentración del 1%, mientras que a las concentraciones de 0.5 %, y 0,2 %, se presentaron porcentajes de inhibición del 66,67 % y 56,67% de forma respectiva. Estos datos indican que la actividad antifúngica disminuye junto con la concentración de aceite. En la cepa clínica, se observó una inhibición del 62,67% con una concentración de aceite del 2%, que mostró un ligero aumento del 64,67% al 1 % de concentración, alcanzando el máximo de inhibición con valores del 66,67% en la

concentración de 0.5 %, por último, la concentración de 0,2% presentó un porcentaje de inhibición del 64,67%. En comparación con la cepa certificada, estos hallazgos muestran una menor variabilidad en la respuesta antifúngica.

Comparado con el control comercial, la cepa certificada ATCC 10231 demostró una inhibición completa. La inhibición para la cepa clínica fue del 78,33% al 2% de concentración, aumentando al 80% de inhibición en concentraciones del 1% y 0,5%, y permaneciendo en el 80% al 0,2% (**ANEXO G**).

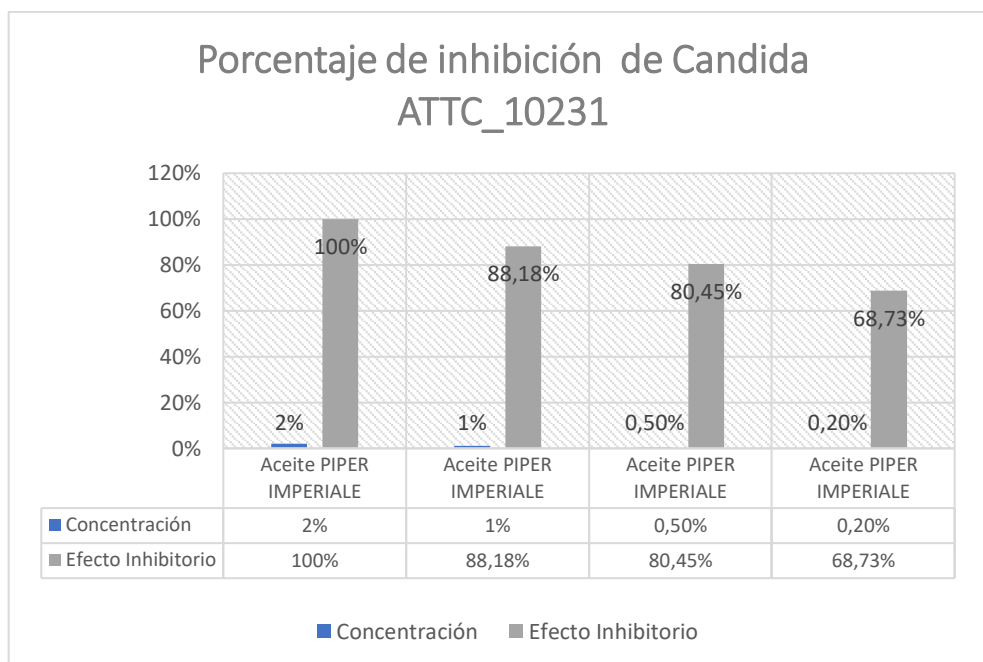
El presente estudio examinó la eficacia del aceite de interés como agente antifúngico contra la cepa de Candida ATCC 10231 mediante la técnica difusión en disco. Se realizaron pruebas con cuatro concentraciones diferentes de aceite: el 2%, el 1%, el 0,5% y el 0,2%. Los resultados obtenidos se muestran en un gráfico de barras y se tabularon (**ANEXO H**). El porcentaje de inhibición de crecimiento fúngico en comparación con un control comercial Fluconazol, se muestra en la tabla 13.

**Tabla 13. Porcentaje de inhibición del aceite esencial**

<b>Tratamiento</b>	<b>Concentración</b>	<b>Efecto Inhibitorio</b>
<i>Aceite Piper imperiale</i>	2%	100%
<i>Aceite Piper imperiale</i>	1%	88,18%
<i>Aceite Piper imperiale</i>	0,50%	80,45%
<i>Aceite Piper imperiale</i>	0,20%	68,73%

*Nota 13. Elaborado por la autora (2024)*

*Ilustración 7. Gráfica*



*Nota 9. Elaborado por la autora (2024)*

Esta actividad antifúngica se debe a la compleja combinación de compuestos presentes en los aceites esenciales, que pueden actuar de manera sinérgica para dañar la membrana celular de los hongos, inhibir su crecimiento y/o destruir las células fúngicas (Lee et al., 2013). Se ha demostrado que aceites esenciales como el de orégano, lavanda, eucalipto y árbol de té tienen una fuerte actividad antifúngica contra *Candida* (Yassin et al., 2020). Estos hallazgos están en línea con la literatura científica que indica que, entre otros compuestos, el timol, el carvacrol y el eucaliptol son responsables de las propiedades antimicrobianas observadas (Monseratt et al., 2021). Se ha encontrado que el AE de *Piper auritum* contiene principalmente una fracción oxigenada rica en sesquiterpenos, así como una fracción hidrocarbonada rica en safrol, b-linalol, cineol y acetato de terpineol.

#### 4.2.1.1. Análisis estadístico de la metodología discos Kirby Bauer

En el Anexo F, el análisis estadístico de inhibición de *Candida* ATTC 10231, evaluó dos tratamientos: control natural y control comercial. Cada grupo tenía una muestra de cuatro tamaños. Aunque no se consideran directamente los medios del porcentaje de inhibición para cada tratamiento, se mostró en un gráfico con puntos azules junto con sus respectivas desviaciones estándar. El porcentaje de inhibición para el control natural fue de 7,09543, mientras que el control comercial fue de 8,30109. Para evaluar la normalidad de las distribuciones, se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk, con una hipótesis nula que suponía que los datos seguían una distribución normal, el valor p es superior a 0,5 indica que la hipótesis nula no debe rechazarse. La prueba de Levene se utiliza para comparar las variaciones entre los dos tratamientos. La hipótesis nula de esta prueba afirmaba que las variaciones eran iguales, y un valor p superior a 0.1 indicaría que las variaciones eran homogéneas. Para identificar diferencias significativas entre los medios de ambos tratamientos, se utilizó una prueba T de Student para muestras independientes. Se estima que la hipótesis nula indicaba que no había diferencias significativas, y se estima que la hipótesis debería rechazarse si el valor p es inferior a 0.05.

Después de realizar el análisis, se evaluó el efecto inhibidor de *Piper imperiale* en cuatro concentraciones diferentes: 2%, 1%, 0.5% y 0.2%. Para obtener una muestra con un tamaño total de dos, cada concentración fue replicada dos veces. Se calculó la media correspondiente después de medir el porcentaje de inhibición en cada concentración. Para determinar si había diferencias significativas en la capacidad de inhibición entre las concentraciones probadas, los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA).

La hipótesis nula ( $H_0$ ) de la ANOVA afirmó que las medias de los porcentajes de inhibición entre diferentes concentraciones eran homogéneas, mientras que la hipótesis alternativa ( $H_a$ )

afirmó que al menos una media era significativamente diferente. El valor p de 0.155, que superó el umbral de significancia establecido ( $\alpha = 0.05$ ), fue el resultado de la ANOVA, lo que llevó a la conclusión de que no había suficiente evidencia para rechazar la hipótesis nula. Esto demuestra que las variaciones entre las medias de inhibición de las concentraciones estudiadas no eran estadísticamente significativas.

Además, se realizó el examen post-hoc de Tukey HSD para comparar múltiples tratamientos medianos. Este análisis proporcionó un desglose detallado de las diferencias entre cada par de concentraciones. Incluyó la diferencia de medios, el error estándar asociado, el valor p correspondiente y los intervalos de confianza del 95%. Los valores de p de esta prueba fueron consistentemente altos, lo que sugiere que no hay diferencias significativas entre las concentraciones.

Los resultados gráficos encontrados en anexos mostraron intervalos de confianza del 95% para la media del porcentaje de inhibición en cada concentración de *Piper\_impereale*. En algunos casos, las barras de error, que muestran la variabilidad de los datos, se extendieron ampliamente. Estas barras muestran la variabilidad inherente a las muestras de tamaño pequeño.

La eficacia antifúngica del fluconazol y el terpineol contra *Candida* muestra patrones de inhibición diferentes. El fluconazol se utiliza como control comercial y tiene una mayor inhibición frente a la cepa ATTC 10231, lo que indica una actividad fuerte incluso a dosis bajas. Según (Diniz-Neto et al., 2024).

Este antifúngico es más efectivo en penetrar en las células fúngicas e interactuar con su objetivo enzimático a menores concentraciones debido a su naturaleza concentración-dependiente, la mayor susceptibilidad de la cepa certificada en comparación con la cepa



clínica puede indicar una menor resistencia propia de las cepas de laboratorio, lo que destaca el problema de la resistencia en cepas aisladas de entornos clínicos (Barberis et al., 2021).

Por otro lado, el terpineol, un control natural, funciona mejor en una concentración del 1 %, pero tiene un efecto menor en concentraciones más bajas y altas en la cepa certificada. La solubilidad, la estabilidad y la interacción del terpineol con las membranas celulares de *Candida* pueden reflejarse en este perfil de dosis-respuesta. La discrepancia en la eficacia del terpineol entre las cepas clínicas y *Candida ATTC 10231* demuestra la importancia de tener en cuenta la variabilidad genética entre las cepas de *Candida* al evaluar los tratamientos antifúngicos (Aldardeer et al., 2020).

La eficacia antifúngica del fluconazol y el terpineol contra *Candida* muestra patrones de inhibición diferentes. El fluconazol, se utiliza como control comercial, tiene una inhibición mayor en concentraciones bajas frente a la cepa ATTC 10231, lo que indica una actividad fuerte incluso a dosis bajas. Según (Diniz-Neto et al., 2024); Este antifúngico es más efectivo en penetrar en las células fúngicas e interactuar con su objetivo enzimático a menores concentraciones debido a su naturaleza concentración-dependiente, la mayor susceptibilidad de la cepa certificada en comparación con la cepa clínica puede indicar una menor resistencia propia de las cepas de laboratorio, lo que destaca el problema de la resistencia en cepas aisladas de entornos clínicos (Barberis et al., 2021).

Por otro lado, el terpineol, un control natural, funciona mejor en una concentración del 1 %, pero tiene un efecto menor en concentraciones más bajas y altas en la cepa certificada. La solubilidad, la estabilidad y la interacción del terpineol con las membranas celulares de *Candida* pueden reflejarse en este perfil de dosis-respuesta. La discrepancia en la eficacia del terpineol entre las cepas clínicas y *Candida ATTC 10231* demuestra la importancia de tener en cuenta la variabilidad genética entre las cepas de *Candida* al evaluar los tratamientos antifúngicos (Aldardeer et al., 2020).

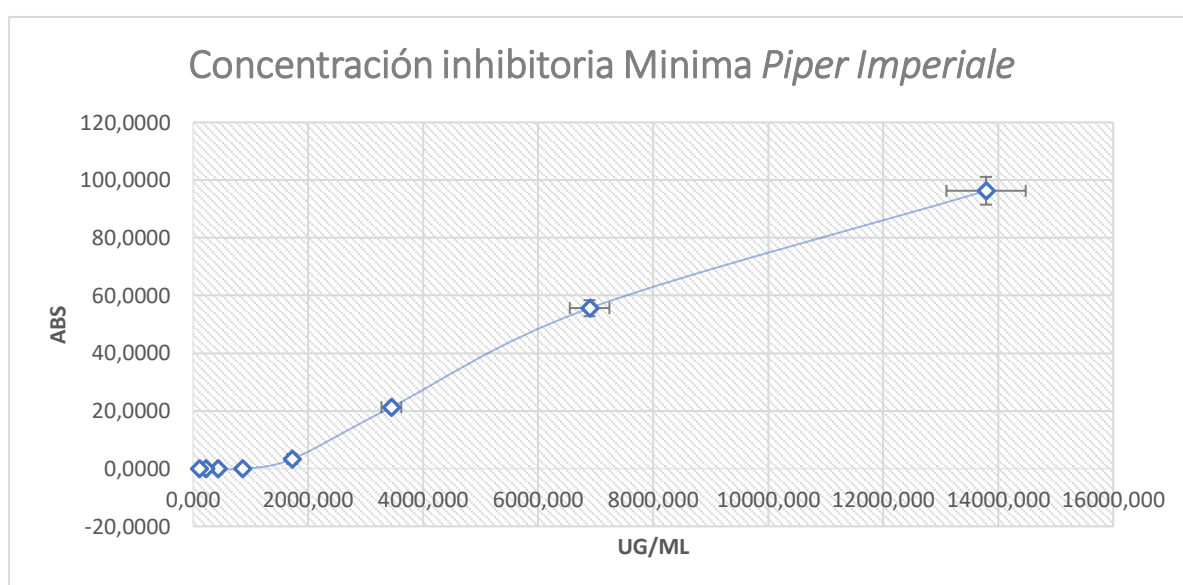
Estos hallazgos demuestran que el aceite de *Piper imperiale* tiene un gran potencial antifúngico contra *Candida*, lo que permite validar su uso tradicional en el tratamiento de hongos. Una revisión sistemática confirma que una exposición a altas concentraciones de aceite esencial puede ser tóxica para el organismo (Hahn & Maron, 2016). Esto se debe a que ciertos componentes de estos aceites, como el cariofileno, cariofilenoxida y cariofilenoacetato, tienen propiedades irritantes y citotóxicas que, si se sobrepasan ciertos niveles, pueden causar daños hepáticos y renales (Dosoky & Setzer, 2018). La efectividad del aceite *Piper*, varía dependiendo las diferentes concentraciones, en concentraciones altas consta de un % de inhibición mayor en comparación a menores concentraciones, Winkelman, (2018) concuerdan con los porcentajes de inhibición en concentraciones mínimas relatando un efecto adverso en el cuerpo si se excede la cantidad de rango establecido por la norma ISO 4730 (Ossa-Tabares et al., 2020).

#### 4.2.2 Determinación de la concentración inhibitoria mínima (MIC)

El aceite esencial de estudio evidenció una Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de 6894, 286 ug/ml y corresponde a una inhibición de 55,61% del crecimiento de *Candida ATTC (ANEXO I)* como se muestra en la *Ilustración 10*. Estos resultados muestran que, aunque son significativos, se consideran débiles en comparación con la literatura existente. Las propiedades antifúngicas de los aceites esenciales se han estudiado ampliamente y varios autores exhiben efectos inhibidores significativos sobre las especies de *Candida*, el estudio de Sonigra & Meena (2018), propone al aceite esencial de *Origanum vulgare*, que inhibió la morfogénesis, la adhesión y la viabilidad de las biopelículas de *Candida albicans* con un

porcentaje de inhibición de la morfogénesis, la adhesión y la proliferación de un 50%, y mostró efectos sinérgicos con fluconazol en contraste con nuestros datos, la cual mostró una MIC de 10714,286 ug/mL, logrando una inhibición de 57,96 de la *Candida* ATTC 10231, lo que se consideró una actividad moderada en comparación con la literatura referenciada (Mondello et al., 2006).

#### *Ilustración 8. MIC del aceite esencial*



*Nota. Elaborado por la Autora, (2024)*

Se ha demostrado que la eficacia del aceite esencial es dosis-dependiente, con una inhibición casi total de 96,2961% a la concentración máxima probada de 13788,571 ug/ml.

No obstante, la inhibición disminuye significativamente a concentraciones inferiores a 1723,571 ug/ml y es inexistente en concentraciones inferiores a 861,786 ug/ml.

De manera similar, el aceite esencial de romero y sus componentes, como el 18-cineol y el  $\alpha$ -pineno, provocaron la muerte celular en concentraciones más altas y también inhibieron la morfogénesis de las hifas y la formación de biopelículas en concentraciones

subinhibitorias. La concentración del control natural ( $\alpha$ -pineno) mostro una MIC de 12285,714 y porcentaje de inhibición de 98,26 %.

Las cepas resistentes a *C. albicans* experimentaron concentraciones de MIC de hasta 9250 g/mL. Sin embargo, los aceites esenciales de la familia Piperaceae, son conocidos por sus múltiples actividades biológicas, han demostrado efectos antifúngicos contra *Candida albicans* con valores MIC tan bajos como 1800 ug/uL. Esto indica que estos aceites podrían utilizarse en tratamientos (Shahina et al., 2022).

La técnica de microdilución en placa acoplada junto con el indicador TTC es una herramienta útil para detectar comportamiento enzimático en evaluación de infección por *Candida*.

Una de las características de virulencia más discutidas es el dimorfismo *albicans*, que hace referencia entre alterar levadura e hifales (G. Han & Vaishnava, 2023). Ambos tipos morfológicos son cruciales para la virulencia y realizan diferentes funciones durante las diversas etapas del desarrollo de la enfermedad, como la adhesión, invasión, daño, diseminación, evasión inmune y respuesta del huésped (Fang et al., 2023). El dimorfismo de *C. albicans*, se observa tanto en aislamientos clínicos como en cepas de referencia ATCC, es un componente crucial que afecta su patogenicidad y respuesta a los tratamientos (Lu, 2021). Según Theiß et al., (2022), *Candida albicans* es un hongo dimórfico que puede causar infecciones oportunistas graves en las personas. (Spoială et al., 2022). Dado que la capacidad del hongo para cambiar de su forma es un mecanismo esencial para su supervivencia y patogenicidad, *Candida albicans* puede influir en los resultados tanto en aislamientos clínicos como en cepas ATCC (Alkhars et al., 2023).

El impacto del dimorfismo de *Candida albicans* en las técnicas de microdilución y la susceptibilidad a los antifúngicos han sido los principales temas de investigación. Un estudio colaborativo de ocho centros (Anaissie et al., 2023), evaluó la reproducibilidad de un método

que utiliza agitación para dispersar los tipos de crecimiento observados en las pruebas con fluconazol tanto dentro como fuera del laboratorio. Los resultados indican que la agitación y una modificación del criterio de punto final mejoran la concordancia intra e interlaboratorio y aumentan la frecuencia de MIC interpretables (Alkhars et al., 2023).

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1. Conclusiones

La comparación de la difusión de discos Kirby Bauer y la microdilución por Sensititre YeastOne TM no ha demostrado diferencias significativas en términos de sensibilidad y practicidad. Esto demuestra la importancia de elegir el método más adecuado para el diagnóstico de resistencia y antimicóticos en entornos clínicos. Este descubrimiento es fundamental para optimizar el tratamiento de infecciones fúngicas, asegurando la selección de tratamientos efectivos basados en la resistencia específica de los patógenos.

El aceite esencial *Piper Imperiale* tiene propiedades antifúngicas, los resultados muestran que pueden detener el crecimiento de la cepa *Candida* ATTC. La técnica de microdilución en placa ha demostrado que la MIC del aceite esencial es de 6894,286 ug/ml, lo que indica una inhibición del 55,61% de la cepa probada este resultado confirma la actividad inhibidora del aceite y su posible uso como antifúngico.

La capacidad antifúngica del aceite esencial de estudio se ha demostrado, los hallazgos muestran que se logra una inhibición del 100% a una concentración de 2% del aceite esencial, igualando una eficacia significativa con el control comercial del fluconazol. Al reducir la concentración de aceite esencial en un 1%, la inhibición disminuyó en un 88% y continuó disminuyendo en un 80% y un 68% en las concentraciones de 0,5% y 0,2%, respectivamente.

La investigación sobre la actividad antimicótica del aceite esencial de *Piper imperiale* contra *Candida* spp. muestra su potencial como una alternativa a los tratamientos antifúngicos convencionales. Los resultados positivos sugieren que este compuesto natural puede ayudar a

combatir infecciones por *Candida spp.* Esto abre la puerta a nuevas investigaciones que podrían ayudar a crear nuevas formas de tratamiento más efectivas y seguras.

Estos resultados indican que los aceites esenciales de varias plantas pueden ayudar a combatir hongos patógenos, especialmente *Candida*. La variabilidad en la susceptibilidad de las cepas de *Candida* a diferentes aceites esenciales y sus componentes demuestra la necesidad de enfoques individualizados en el desarrollo de terapias antimicóticas alternativas. La sinergia potencial entre los aceites esenciales y los antifúngicos convencionales también puede mejorar la eficacia de los medicamentos existentes. Esto es particularmente importante frente a la creciente resistencia a los medicamentos.

## 5.2.Recomendaciones

- Explorar la sinergia entre aceites esenciales y antifúngicos convencionales.
- Tener en cuenta el desarrollo de formulaciones que permitan la liberación sostenida de los componentes del aceite esencial a concentraciones más bajas con el fin de reducir la toxicidad.
- Realizar estudios adicionales para profundizar en el conocimiento de los mecanismos de acción, la dosificación ideal y la seguridad del uso del aceite esencial de *Piper imperiale*.
- Evaluar los efectos sinérgicos potenciales que podrían reducir las concentraciones necesarias y reducir la resistencia a los medicamentos al combinar el aceite esencial de *Piper imperiale* con antifúngicos convencionales.
- Desarrollar formulaciones farmacéuticas que incorporan el aceite esencial de *Piper imperiale*, optimizando su biodisponibilidad y estabilidad, y evaluando su eficacia y seguridad en ensayos clínicos.
- Utilizar técnicas de ingeniería genética para mejorar las cepas de plantas productoras de *Piper imperiale*.
- Investigar el funcionamiento del aceite esencial de *Piper imperiale* a nivel celular y molecular para comprender cómo interactúa con las células de *Candida* y cómo puede superar la resistencia.
- Investigar la eficacia del aceite esencial de *Piper imperiale* en la prevención y eliminación de biopelículas de *Candida*, así como su posible incorporación en materiales y superficies para crear recubrimientos antifúngicos en entornos clínicos y alimentarios.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbasi Montazeri, E., Khosravi, A. D., Khazaei, S., & Sabbagh, A. (2021). Prevalence of methicillin resistance and superantigenic toxins in *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with cancer. *BMC Microbiology*, *21*(1). <https://doi.org/10.1186/S12866-021-02319-7>
- Abdulridha, A. A., & Kareem, S. K. (2021). Post-mortem Gross Detection of Early Myocardial Infarction using Triphenyl Tetrazolium Chloride Test. *Indian Journal of Forensic Medicine & Toxicology*, *15*(4), 642. <https://doi.org/10.37506/IJFMT.V15I4.16778>
- Acero-Godoy, J., Guzmán-Hernández, T., Muñoz-Ruiz, C., Acero-Godoy, J., Guzmán-Hernández, T., & Muñoz-Ruiz, C. (2019). Revisión documental de uso de los aceites esenciales obtenidos de *Lippia alba* (Verbenaceae), como alternativa antibacteriana y antifúngica. *Revista Tecnología En Marcha*, *32*(1), 3–11. <https://doi.org/10.8845/TM.V32.I1.4114>
- Alajil, O., Sagar, V. R., Kaur, C., Rudra, S. G., Vasudev, S., Chandran, D., Sharma, K., Kumar, M., & Lorenzo, J. M. (2022). Chemical Characterization of Apricot Kernel: Nutraceutical Composition, Amino Acid, and Fatty Acid Profile. *Food Analytical Methods*, *15*(9), 2594–2604. <https://doi.org/10.1007/S12161-022-02317-Z>
- Aldardeer, N. F., Albar, H., Al-Attas, M., Eldali, A., Qutub, M., Hassanien, A., & Alraddadi, B. (2020). Antifungal resistance in patients with Candidaemia: A retrospective cohort study. *BMC Infectious Diseases*, *20*(1). <https://doi.org/10.1186/S12879-019-4710-Z>
- Alkhars, N., Gaca, A., Zeng, Y., Al-Jallad, N., Rustchenko, E., Wu, T. T., Eliav, E., & Xiao, J. (2023). Antifungal Susceptibility of Oral Candida Isolates from Mother-Infant Dyads to

Nystatin, Fluconazole, and Caspofungin. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, 9(5).

<https://doi.org/10.3390/jof9050580>

Alvarado P, D., Díaz J, M. C., & Silva, V. (2002). Identificación y susceptibilidad antifúngica de *Candida* spp aisladas de micosis invasora. Influencia del porcentaje de inhibición del crecimiento para la determinación de CIM. *Revista Médica de Chile*, 130(4), 416–423.

<https://doi.org/10.4067/S0034-98872002000400009>

Anaissie, E. J., Paetznick, V. L., Ensign, L. G., Espinel-Ingroff, A., Galgiani, J. N., Hitchcock, C. A., Larocco, M., Patterson, T., Pfaller, M. A., Rex, J. H., & Rinaldi, M. G. (2023). Microdilution antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* with and without agitation: an eight-center collaborative study.

*Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(10), 2387–2391.

<https://doi.org/10.1128/AAC.40.10.2387>

Angulo Rodríguez, D. A., Angulo Rodríguez, A., Fernanda, M., & Ortiz, S. (2023).

Antifúngicos actuales y futuros enfoques terapéuticos: artículo de revisión.

*Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*, 20(4), 469–477.

Aparicio-Zambrano, R., Rojas-Fermín, L., Velasco, J., Usubillaga, A., Sosa, M., & Rojas, J. (2019). Chemical characterization and antimicrobial activity of the essential oil of the leaves of *Libanothamnus neriifolius* (Asteraceae). *Revista Peruana de Biología*, 26(1), 95–100. <https://doi.org/10.15381/RPB.V26I1.15912>

Araujo-Baptista, L., Vimos-Sisa, K., Cruz-Tenempaguay, R., Falconí-Ontaneda, F., Rojas-Fermín, L., & González-Romero, A. C. (2020). Chemical components and antimicrobial activity of the essential oil of *lasiocephalus ovatus* (Asteraceae) that grows in Ecuador.

*Acta Biologica colombiana*, 25(1), 22–28. <https://doi.org/10.15446/ABC.V25N1.75728>

Ardehali, S. H., Azimi, T., Fallah, F., Aghamohammadi, N., Alimehr, S., Karimi, A. M., & Azimi, L. (2019). Molecular detection of ALS1, ALS3, HWP1 and SAP4 genes in *Candida* Genus isolated from hospitalized patients in Intensive Care Unit, Tehran, Iran. *Cellular and Molecular Biology*, 65(4), 15–22.

<https://doi.org/10.14715/CMB/2019.65.4.3>

Atienza-Carrera, M. B., Cabezas-Mera, F. S., Tejera, E., & Machado, A. (2022). Prevalence of biofilms in *Candida* spp. bloodstream infections: A meta-analysis. *PLOS ONE*, 17(2), e0263522. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0263522>

Ávila Tandazo, M. K., Villacís Villacís, A. G., & Silverio, C. (2021). Evaluación de susceptibilidad en *Candida* spp por colorimetría obtenida en gestantes de un hospital obstétrico. *Revista Vive*, 3(9), 227–246.

<https://doi.org/10.33996/REVISTAVIVE.V3I9.62>

Baharvand, R., Fallah, F., Jafari, P., & Azimi, L. (2024). Co-colonization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Candida* spp. in children with malignancies. *AMB Express*, 14(1), 22. <https://doi.org/10.1186/S13568-024-01667-7>

Barberis, C., Ledesma, M., Álvarez, C., Famiglietti, A., Almuzara, M., & Vay, C. (2021). Análisis de la diversidad de aislados clínicos de *Actinomyces/Actinotignum* en un hospital universitario. *Revista Argentina de Microbiología*, 53(3), 202–209.

<https://doi.org/10.1016/J.RAM.2020.11.005>

Baroja, I., Guerra, S., Coral-Almeida, M., Ruíz, A., Galarza, J. M., de Waard, J. H., & Bastidas-Caldes, C. (2021). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal colonization among health care workers of a tertiary hospital in Ecuador and associated

risk factors. *Infection and Drug Resistance*, 14, 3433–3440.

<https://doi.org/10.2147/IDR.S326148>

Başer, K. H. C. (Kemal H. C., & Buchbauer, G. (2020). *HANDBOOK OF ESSENTIAL OILS: science, technology, and applications*.

Biswas, P., Anand, U., Saha, S. C., Kant, N., Mishra, T., Masih, H., Bar, A., Pandey, D. K., Jha, N. K., Majumder, M., Das, N., Gadekar, V. S., Shekhawat, M. S., Kumar, M., Radha, Proćków, J., Lastra, J. M. P. de la, & Dey, A. (2022). Betelvine (Piper betle L.): A comprehensive insight into its ethnopharmacology, phytochemistry, and pharmacological, biomedical and therapeutic attributes. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 26(11), 3083–3119. <https://doi.org/10.1111/JCMM.17323>

Blank, A. F., Camêlo, L. C. A., De Fátima Arrigoni-Blank, M., Pinheiro, J. B., Andrade, T. M., Dos Santos Niculau, E., & Alves, P. B. (2015). Chemical diversity in *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown Germplasm. *Scientific World Journal*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/321924>

Brevis Palma, C. P., Carrasco Jorquera, D. A., Donoso Torres, W. K. (Profesora guía), & Vasquez Ibarra, S. (Profesora informante). (2020). *Antifúngicos convencionales y terapias alternativas o complementarias para la candidiasis oral: revisión narrativa*.

Brolis, M., Gabetta, B., Fuzzati, N., Pace, R., Panzeri, F., & Peterlongo, F. (1998). Identification by high-performance liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry and quantification by high-performance liquid chromatography - UV absorbance detection of active constituents of *Hypericum perforatum*. *Journal of Chromatography A*, 825(1), 9–16. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00697-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00697-9)

- Bustamante Morales, K., Custode Pérez, A., Herrera Reyes, S., Jaramillo Aguilar, E., & Barrezueta Unda, S. (2023). Potencial antifúngico de extractos de plantas y aceites esenciales contra *Fusarium incarnatum*. *Polo Del Conocimiento: Revista Científico - Profesional*, ISSN-e 2550-682X, Vol. 8, N<sup>o</sup>. 10 (OCTUBRE 2023), 2023, Págs. 534-551, 8(10), 534–551. <https://doi.org/10.23857/pc.v8i10.6140>
- Cárdenas Parra, L. Y., & Perez Cárdenas, J. E. (2020). Mecanismos de resistencia a fluconazol expresados por *Candida glabrata*: una situación para considerar en la terapéutica. *Investigación En Enfermería: Imagen y Desarrollo*, 22. <https://doi.org/10.11144/JAVERIANA.IE22.MRFE>
- Carhuallanqui Pérez, A., Salazar Salvatierra, M. E., Ramos Delgado, D., Carhuallanqui Pérez, A., Salazar Salvatierra, M. E., & Ramos Delgado, D. (2020). Efecto antimicrobiano del aceite esencial de Orégano frente a *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 22(1), 25–33. <https://doi.org/10.18271/RIA.2020.530>
- Carrillo-Muñoz, A. J., Tur-Tur, C., Hernández-Molina, J. M., Santos, P., Cárdenas, D., & Giusiano, G. (2010). Antifúngicos disponibles para el tratamiento de las micosis ungueales. *Revista Iberoamericana de Micología*, 27(2), 49–56. <https://doi.org/10.1016/J.RIAM.2010.01.007>
- Carrodegua-Gonzalez, A., & Zúñiga-Orozco, A. (2023). Métodos utilizados para la selección de parentales en pre-mejoramiento genético de plantas. *Cultivos Tropicales*, 43(2), e15. <https://ediciones.inca.edu.cu/index.php/ediciones/article/view/1666>

- Castro Méndez, C., García Sánchez, E., & Martín-Mazuelos, E. (2019). Actualización de los métodos de estudio de sensibilidad in vitro a los antifúngicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 37, 32–39. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(19\)30180-6](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(19)30180-6)
- Charles, M. K., Berenger, B. M., Turnbull, L. A., Rennie, R., & Fuller, J. (2016). Variability of  $\beta$ -lactam susceptibility testing for *Streptococcus pneumoniae* using 4 commercial test methods and broth microdilution. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 84(3), 240–245. <https://doi.org/10.1016/J.DIAGMICROBIO.2015.11.014>
- Chasipanta Ronquillo, E. C., & Chicaiza Galarza, T. S. (2016a). *Evaluación de la actividad antioxidante bioautográfica de 5 variedades de aceites esenciales amazónicos (Ocotea quixos; Psidium guajava; Eugenia stipitata; Piper auritum; Piper imperiale)*. <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/12141>
- Chasipanta Ronquillo, E. C., & Chicaiza Galarza, T. S. (2016b). *Evaluación de la actividad antioxidante bioautográfica de 5 variedades de aceites esenciales amazónicos (Ocotea quixos; Psidium guajava; Eugenia stipitata; Piper auritum; Piper imperiale)*. <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/12141>
- Christgen, S. L., & Becker, D. F. (2019). Role of proline in pathogen and host interactions. *Antioxidants and Redox Signaling*, 30(4), 683–709. <https://doi.org/10.1089/ARS.2017.7335>
- Chuang, Y.-C., Lin, H.-Y., Wang, J.-T., Yang, J.-L., Lin, C.-Y., Huang, S.-H., Chen, Y.-C., & Chang, S.-C. (2022). *Daptomycin area under the curve to minimum inhibitory concentration ratio by broth microdilution for predicting the outcome of vancomycin-resistant Enterococcus bloodstream infection*. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113710>

- Cleary, D. F. R., Oliveira, V., Gomes, N. C. M., Bialecki, A., & De Voogd, N. J. (2023). A comparison of free-living and sponge-associated bacterial communities from a remote oceanic island with a focus on calcareous sponges. *FEMS Microbiology Ecology*, *99*(3). <https://doi.org/10.1093/FEMSEC/FIAD014>
- Cortés Hidalgo, A. P., Roa Dueñas, O. H., Méndez Fandiño, Y. R., & Álvarez Moreno, C. A. (2018). Opciones terapéuticas frente a especies de *Candida* resistentes a las equinocandinas. *Universitas Médica*, *59*(2). <https://doi.org/10.11144/JAVERIANA.UMED59-2.CAND>
- Cortés, J. A., Ruiz, J. F., Melgarejo-Moreno, L. N., & Lemos, E. V. (2020). Candidemia en Colombia. *Biomédica*, *40*(1), 195. <https://doi.org/10.7705/BIOMEDICA.4400>
- Cruz, S. M., Cáceres, A., Álvarez, L. E., Apel, M. A., & Henriques, A. T. (2012). Chemical diversity of essential oils of 15 *Piper* species from Guatemala. *Acta Horticulturae*, *964*, 39–46. <https://doi.org/10.17660/ACTAHORTIC.2012.964.4>
- Czajka, K. M., Venkataraman, K., Brabant-Kirwan, D., Santi, S. A., Verschoor, C., Appanna, V. D., Singh, R., Saunders, D. P., & Tharmalingam, S. (2023). Molecular Mechanisms Associated with Antifungal Resistance in Pathogenic *Candida* Species. *Cells*, *12*(22). <https://doi.org/10.3390/CELLS12222655>
- David, J., & Icaza, L. (2019). Cepas de *Candida albicans* en pacientes con diabetes mellitus. *RECIMUNDO*, *3*(1), 1306–1339. [https://doi.org/10.26820/RECIMUNDO/3.\(1\).ENERO.2019.1306-1339](https://doi.org/10.26820/RECIMUNDO/3.(1).ENERO.2019.1306-1339)
- De La Cruz Mora, M. A., & Ulloa Curizaca, N. J. (2020). Evaluación de la actividad antimicrobiana y antiinflamatoria de flavonoides presentes en las flores de *Dalea coerulea* (L.f.) Schinz & Thell. <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/18443>

- del Palacio, A., Villar, J., & Alhambra, A. (2009). Epidemiología de las candidiasis invasoras en población pediátrica y adulta. *Revista Iberoamericana de Micología*, 26(1), 2–7.  
[https://doi.org/10.1016/S1130-1406\(09\)70002-6](https://doi.org/10.1016/S1130-1406(09)70002-6)
- Diaz, L. E., Munoz, D. R., Prieto, R. E., Cuervo, S. A., Gonzalez, D. L., Guzman, J. D., & Bhakta, S. (2012a). Antioxidant, antitubercular and cytotoxic activities of Piper imperiale. *Molecules*, 17(4), 4142–4157.  
<https://doi.org/10.3390/MOLECULES17044142>
- Diaz, L. E., Munoz, D. R., Prieto, R. E., Cuervo, S. A., Gonzalez, D. L., Guzman, J. D., & Bhakta, S. (2012b). Antioxidant, Antitubercular and Cytotoxic Activities of Piper imperiale. *Molecules 2012, Vol. 17, Pages 4142-4157*, 17(4), 4142–4157.  
<https://doi.org/10.3390/MOLECULES17044142>
- Diniz-Neto, H., Silva, S. L., Cordeiro, L. V., Silva, D. F., Oliveira, R. F., Athayde-Filho, P. F., Oliveira-Filho, A. A., Guerra, F. Q. S., & Lima, E. O. (2024). Antifungal activity of 2-chloro-N-phenylacetamide: a new molecule with fungicidal and antibiofilm activity against fluconazole-resistant *Candida* spp. *Brazilian Journal of Biology*, 84.  
<https://doi.org/10.1590/1519-6984.255080>
- Dosoky, N. S., & Setzer, W. N. (2018). Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oils of Curcuma Species. *Nutrients*, 10(9).  
<https://doi.org/10.3390/NU10091196>
- Duré Paredes, C. P. (2021). *Diferenciación fenotípica, molecular y perfil de sensibilidad antifúngica de Candida albicans y Candida dubliniensis aisladas de pacientes ambulatorios y hospitalizados*.  
<http://repositorio.conacyt.gov.py/handle/20.500.14066/3944>



- Durmaz, S. O. (2019). Typing and Antifungal Susceptibility of *Candida* Spp. Isolated from Clinical Samples. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, 14(4), 001–003. <https://doi.org/10.26717/BJSTR.2019.14.002570>
- Estrada-Barraza, D., Dávalos Martínez, A., Flores-Padilla, L., Mendoza-De Elias, R., & Sánchez-Vargas, L. O. (2011). Comparación entre métodos convencionales, ChromAgar *Candida*® y el método de la PCR para la identificación de especies de *Candida* en aislamientos clínicos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 28(1), 36–42. <https://doi.org/10.1016/J.RIAM.2010.11.003>
- Fang, T., Xiong, J., Wang, L., Feng, Z., Hang, S., Yu, J., Li, W., Feng, Y., Lu, H., & Jiang, Y. (2023). Unexpected Inhibitory Effect of Octenidine Dihydrochloride on *Candida albicans* Filamentation by Impairing Ergosterol Biosynthesis and Disrupting Cell Membrane Integrity. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 12(12). <https://doi.org/10.3390/antibiotics12121675>
- Feng, H., Prasad, R., & Chakraborty, D. (2023). Effects of broiler litter age and application rate on nutrient mineralization under laboratory condition. *Agrosystems, Geosciences and Environment*, 6(4). <https://doi.org/10.1002/AGG2.20445>
- Fernández, A., Velasco, D., Lueiro, F., & Bou, G. (2008). Estudio de sensibilidad antifúngica para posaconazol y caspofungina en levaduras responsables de infección fúngica invasiva (2002-2003). Evaluación del sistema E-test. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 26(2), 82–84. <https://doi.org/10.1157/13115542>
- Ferrara, G., Panizo, M. M., Mazzone, M., Pequenezze, M. D., & Reviakina, V. (2014). Estudio comparativo entre los sistemas automatizados Vitek YBC® y Microscan Walk Away RYID® con los métodos fenotípicos convencionales para la identificación de levaduras

de interés clínico. *Investigación Clínica*, 55(4), 297–310.

[http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0535-51332014000400002&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0535-51332014000400002&lng=es&nrm=iso&tlng=es)

Ferrer Gómez, C., Solís Albamonte, P., Delgado Navarro, C., Salvador García, C., Tormo Palop, N., & Andrés Ibáñez, J. A. (2021). Análisis de casos de candidemia por *Candida auris* en una Unidad de Cuidados Intensivos de Anestesia en un hospital terciario. *Revista Española de Anestesiología y Reanimación*, 68(8), 431–436.  
<https://doi.org/10.1016/J.RENDAR.2020.10.013>

García López, B. C., López Bastida, E. J., Castro Perdomo, N. A., García López, B. C., López Bastida, E. J., & Castro Perdomo, N. A. (2020). Procedimiento para el análisis químico de la contaminación por nitritos y nitratos en aguas de consumo. *Revista Universidad y Sociedad*, 12(5), 190–195. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2218-36202020000500190&lng=es&nrm=iso&tlng=en](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2218-36202020000500190&lng=es&nrm=iso&tlng=en)

García Rodríguez Rafael Cantón J Elías García Sánchez M<sup>a</sup> Luisa Gómez-Lus Luis Martínez Martínez Carmen Rodríguez-Avial Jordi Vila, J. A. (2021). *Procedimientos en Microbiología Clínica*.

García-Meniño, I., Lumbreras, P., Valledor, P., Díaz-Jiménez, D., Lestón, L., Fernández, J., & Mora, A. (2020). Comprehensive Statistical Evaluation of Etest®, UMIC®, MicroScan and Disc Diffusion versus Standard Broth Microdilution: Workflow for an Accurate Detection of Colistin-Resistant and Mcr-Positive *E. coli*. *Antibiotics* 2020, Vol. 9, Page 861, 9(12), 861. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS9120861>

Gil-Romero, Y., Regodón-Domínguez, M., Wilhelmi de Cal, I., López-Fabal, F., & Gómez-Garcés, J. L. (2016). Valoración de 2 técnicas automatizadas de microdilución frente a

- dilución en agar en la determinación de la sensibilidad a fosfomicina en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 34(7), 406–408. <https://doi.org/10.1016/J.EIMC.2015.09.019>
- Glassmire, A. E., Carson, W. P., Smilanich, A. M., Richards, L. A., Jeffrey, C. S., Dodson, C. D., Philbin, C. S., Humberto, G. L., & Dyer, L. A. (2023). Multiple and contrasting pressures determine intraspecific phytochemical variation in a tropical shrub. *Oecologia*, 201(4), 991–1003. <https://doi.org/10.1007/S00442-023-05364-3/FIGURES/5>
- Guerrero Miranda, J. (2016). *Identificación, susceptibilidad y distribución de especies de Cándida obtenidas de muestras clínicas del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI), de enero 2007 a abril 2016.*  
<http://repositorio.puce.edu.ec:80/handle/22000/12484>
- Hahn, P. G., & Maron, J. L. (2016). A Framework for Predicting Intraspecific Variation in Plant Defense. *Trends in Ecology and Evolution*, 31(8), 646–656.  
<https://doi.org/10.1016/j.tree.2016.05.007>
- Han, G., & Vaishnav, S. (2023). Microbial underdogs: exploring the significance of low-abundance commensals in host-microbe interactions. *Experimental & Molecular Medicine*, 55(12), 2498–2507. <https://doi.org/10.1038/s12276-023-01120-y>
- Han, Y., Zuo, Y., Luo, Z., Ju, M., Hua, J., He, B., Wu, Y., & Zhang, J. (2023). Positive sputum culture of *Candida* spp. as a risk factor for 30-day mortality in patients with hospital-acquired pneumonia: A propensity-score matched retrospective clinical study. *Chinese Medical Journal Pulmonary and Critical Care Medicine*, 1(2), 113–118.  
<https://doi.org/10.1016/J.PCCM.2023.04.005>

- Lacasa, C. E., & Mazuelos, M. E. (2021). *Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A) 15a.1. Fundamento.*
- Lazo, V., Hernández, G., & Méndez, R. (2018a). Candidiasis sistémica en pacientes críticos, factores predictores de riesgo. *Horizonte Médico (Lima)*, 18(1), 75–85.  
<https://doi.org/10.24265/HORIZMED.2018.V18N1.11>
- Lazo, V., Hernández, G., & Méndez, R. (2018b). Candidiasis sistémica en pacientes críticos, factores predictores de riesgo. *Horizonte Médico (Lima)*, 18(1), 75–85.  
<https://doi.org/10.24265/HORIZMED.2018.V18N1.11>
- Lee, C. J., Chen, L. W., Chen, L. G., Chang, T. L., Huang, C. W., Huang, M. C., & Wang, C. C. (2013). Correlations of the components of tea tree oil with its antibacterial effects and skin irritation. *Journal of Food and Drug Analysis*, 21(2), 169–176.  
<https://doi.org/10.1016/J.JFDA.2013.05.007>
- Lopardo, H. A. (2021). *Introducción a la microbiología clínica FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Libros de Cátedra.*
- López Luegon, M. T. (2004a). Los aceites esenciales. *Offarm*, 23(7), 88–91.  
<https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-los-aceites-esenciales-13064296>
- López Luegon, M. T. (2004b). Los aceites esenciales. *Offarm*, 23(7), 88–91.  
<https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-los-aceites-esenciales-13064296>
- López-Ávila, K., Dzul-Rosado, K. R., Lugo-Caballero, C., Arias-León, J. J., & Zavala-Castro, J. E. (2016a). Mecanismos de resistencia antifúngica de los azoles en *Candida albicans*.

Una revisión. *REVISTA BIOMÉDICA*, 27(3).

<https://doi.org/10.32776/revbiomed.v27i3.541>

López-Ávila, K., Dzul-Rosado, K. R., Lugo-Caballero, C., Arias-León, J. J., & Zavala-Castro, J. E. (2016b). Mecanismos de resistencia antifúngica de los azoles en *Candida albicans*.

Una revisión. *REVISTA BIOMÉDICA*, 27(3).

<https://doi.org/10.32776/REVBIOMED.V27I3.541>

Lourdes, D. B. F., & Conde, N. (2014). *Identificación de candidas en muestras de secreción vaginal en mujeres de edad fértil Centro Médico Sur Fundación Damas del Honorable Cuerpo Consular*. <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/7599>

Lu, S.-Y. (2021). Oral Candidosis: Pathophysiology and Best Practice for Diagnosis,

Classification, and Successful Management. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, 7(7).

<https://doi.org/10.3390/jof7070555>

Marques, B. C. F. (2023). Infecciones por microbiota fúngica anemófila en entornos

hospitalarios: una revisión narrativa. *Revista Científica Multidisciplinar Núcleo Do Conhecimento*, 96–111.

<https://doi.org/10.32749/NUCLEODOCONHECIMENTO.COM.BR/SALUD/INFECCIONES-POR-MICROBIOTA>

Merghni, A., Belmamoun, A. R., Urcan, A. C., Bobiş, O., & Lassoued, M. A. (2023). 1,8-

Cineol (Eucalyptol) Disrupts Membrane Integrity and Induces Oxidative Stress in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antioxidants*, 12(7).

<https://doi.org/10.3390/ANTIOX12071388>

- Mesa, A. M., & Jaramillo, C. P. (2018). Efecto antipalúdico de las especies del género Piper. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 23(2).  
<https://revplantasmedicinales.sld.cu/index.php/pla/article/view/675/313>
- Mohd, W., Hakimi, N., & Salleh, W. (2020). Actividades fitoquímicas y antiinflamatorias de Piper kadsura (Choisy) Ohwi - una revisión. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 19(3), 289–299.  
<https://doi.org/10.37360/BLACPMA.20.19.3.17>
- Molina Berríos, A., Andrea, D., & Sepúlveda, M. (2020). *Efecto antifúngico y antibiofilm del aceite esencial de Origanum vulgare sobre especies del género cándida*.  
<https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/195556>
- Mondello, F., De Bernardis, F., Girolamo, A., Cassone, A., & Salvatore, G. (2006). In vivo activity of terpinen-4-ol, the main bioactive component of Melaleuca alternifolia Cheel (tea tree) oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic Candida species. *BMC Infectious Diseases*, 6, 158. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-6-158>
- Monseratt, M., Espinoza, A., Antonieta, E., Narváez, G., Sofía, I., López, G., & Barillas, R. (2021). Acción bactericida del aceite esencial de semillas Citrus aurantium, C. sinensis, C. reticulata. *Revista Científica de FAREM-Esteli*, 40, 118–134.  
<https://doi.org/10.5377/FAREM.V10I40.13049>
- Morales S., J. (1958). Control microbiológico de antibióticos: Curvas standard, determinación de potencia y preparación de discos para pruebas de sensibilidad. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 12(1–2), 1–64.  
[http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1726-46341958000100001&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46341958000100001&lng=es&nrm=iso&tlng=es)

- Moreno, X., Reviakina, V., Panizo, M. M., Ferrara, G., García, N., Alarcón, V., Garcés, M. F., & Dolande, M. (2017). Identificación molecular y sensibilidad a los antifúngicos de aislamientos de sangre del complejo *Candida parapsilosis* en Venezuela. *Revista Iberoamericana de Micología*, 34(3), 165–170.  
<https://doi.org/10.1016/J.RIAM.2016.11.005>
- Mosquera, W. G., Criado, L. Y., & Guerra, B. E. (2020). Actividad antimicrobiana de hongos endófitos de las plantas medicinales *Mammea americana* (Calophyllaceae) y *Moringa oleifera* (Moringaceae). *Biomédica*, 40(1), 55.  
<https://doi.org/10.7705/BIOMEDICA.4644>
- Nascimento, E., Bariao, P. H. G., Kress, M. R. V. Z., & Martinez, R. (2018). DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS DE *CRYPTOCOCCUS* SPP ISOLADOS DE PACIENTES IMUNOCOMPETENTES E IMNUNOSSUPRIMIDOS COM CRIPTOCOCOSE. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 22, 4–5. <https://doi.org/10.1016/J.BJID.2018.10.008>
- Navas, J. E. P., Castaño, C., María, L., De, M., Ángeles, L., Juncal, B., Arturo, C., Escobar, Z., Callay Vimos, J. J., Gioconda, A., Zurita, C., Barrera Andaluz, D. E., Del Cisne, G., Laica, L., Andrés, S., & Ipiales, V. (2021). Infecciones adquiridas en la unidad de cuidados intensivos: enfoque preventivo. *AVFT – Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 40(4). <https://doi.org/10.5281/zenodo.5229053>
- Nguyen, B. V. G., Nguyen, H. H. N., Vo, T. H., Le, M. T., Tran-Nguyen, V. K., Vu, T. T., & Nguyen, P. V. (2024). Prevalence and drug susceptibility of clinical *Candida* species in nasopharyngeal cancer patients in Vietnam. *One Health*, 18, 100659.  
<https://doi.org/10.1016/J.ONEHLT.2023.100659>

- Oliveira, J. A. dos S. de, & Rodrigues, D. W. (2021). ÓLEOS ESSENCIAIS DE PIPER L. (PIPERACEAE) E SUA APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA NA AGRICULTURA: UMA REVISÃO DA LITERATURA. *Arquivos Do Mudi*, 25(2), 100–110.  
<https://doi.org/10.4025/arqmudi.v25i2.60107>
- Ossa-Tabares, J. C., Llanos, C. J., & García, A. M. (2020). Evaluación de las características fisicoquímicas y de la actividad antimicrobiana del aceite del árbol de té contra *Cutibacterium acnes* (*Propionibacterium acnes*) ATCC 6919. *Biomédica*, 40(4), 693.  
<https://doi.org/10.7705/BIOMEDICA.5122>
- Oz, Y., & Gokbolat, E. (2018). Evaluation of direct antifungal susceptibility testing methods of *Candida* spp. from positive blood culture bottles. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 32(3). <https://doi.org/10.1002/JCLA.22297>
- Palladini, G., Garbarino, C., Luppi, A., Russo, S., Filippi, A., Arrigoni, N., Massella, E., & Ricchi, M. (2023). Comparison between broth microdilution and agar disk diffusion methods for antimicrobial susceptibility testing of bovine mastitis pathogens. *Journal of Microbiological Methods*, 212, 106796. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2023.106796>
- Pearson, M. A. J., Galas, M., Corso, A., Hormazábal, J. C., Valderrama, C. D., Marcano, N. S., Ramón-Pardo, P., & Melano, R. G. (2019). Consenso latinoamericano para definir, categorizar y notificar patógenos multirresistentes, con resistencia extendida o panresistentes. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 43, 1–8.  
<https://doi.org/10.26633/RPSP.2019.65>
- Quiles-Melero, I., & García-Rodríguez, J. (2021). Revista Iberoamericana de Micología Antifúngicos de uso sistémico. *Rev Iberoam Micol*, 38, 42–46.  
<https://doi.org/10.1016/j.riam.2021.04.004>



- Ramos Perfecto, D., Maita Véliz, L., Maita Castañeda, M., Castro Luna, A., Ramos Perfecto, D., Maita Véliz, L., Maita Castañeda, M., & Castro Luna, A. (2020). Un producto natural de posible apoyo al tratamiento de la periodontitis: Revisión bibliográfica. *Avances En Odontoestomatología*, 36(3), 143–149. <https://doi.org/10.4321/S0213-12852020000300003>
- Richards, L. A., Dyer, L. A., Smilanich, A. M., & Dodson, C. D. (2010). Synergistic Effects of Amides from Two Piper Species on Generalist and Specialist Herbivores. *Journal of Chemical Ecology*, 36(10), 1105–1113. <https://doi.org/10.1007/S10886-010-9852-9>
- Rivera-Sánchez, R., Flores-Paz, R., & Arriaga-Alba, M. (2006). Identificación de especies de *Candida* causantes de vaginitis en la población mexicana. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 24(10), 634–636. <https://doi.org/10.1157/13095375>
- Rodero, L. (2006). *Método de difusión con discos para la determinación de sensibilidad a fluconazol en aislamientos de Candida spp.*
- Rodrigues, M. E., Gomes, F., & Rodrigues, C. F. (2019). *Candida spp./Bacteria Mixed Biofilms. Journal of Fungi 2020, Vol. 6, Page 5, 6(1), 5.* <https://doi.org/10.3390/JOF6010005>
- Rodriguez, B. E. M., Fiedler, J. N., & Chade, M. E. (2023). Capacidad antifúngica de los extractos acuosos de los frutos de *Ilex paraguariensis* frente a los hongos dermatofitos. *Revista de Ciencia y Tecnología*, 39(1), 19–25. <https://doi.org/10.36995/J.RECYT.2023.39.003>
- Rojas, A. E., Pérez, J. E., Hernández, J. S., Zapata, Y., Rojas, A. E., Pérez, J. E., Hernández, J. S., & Zapata, Y. (2020). Análisis cuantitativo de la expresión de genes de resistencia a fluconazol en cepas de *Candida albicans* aisladas al ingreso de adultos mayores a una

unidad de cuidados intensivos de Manizales, Colombia. *Biomédica*, 40(1), 153–165.

<https://doi.org/10.7705/BIOMEDICA.4723>

Róžańska, A., Walkowicz, M., Bulanda, M., Kasperski, T., Synowiec, E., Osuch, P., & Chmielarczyk, A. (2023). Evaluation of the Efficacy of UV-C Radiation in Eliminating Microorganisms of Special Epidemiological Importance from Touch Surfaces under Laboratory Conditions and in the Hospital Environment. *Healthcare (Switzerland)*, 11(23). <https://doi.org/10.3390/HEALTHCARE11233096>

Rubert-Nason, K. F., Couture, J. J., Major, I. T., Constabel, C. P., & Lindroth, R. L. (2015). Influence of Genotype, Environment, and Gypsy Moth Herbivory on Local and Systemic Chemical Defenses in Trembling Aspen (*Populus tremuloides*). *Journal of Chemical Ecology*, 41(7), 651–661. <https://doi.org/10.1007/s10886-015-0600-z>

Rukmini, A., Hadi Utomo, D., Laily, A. N., Uin, J. B., Malik, M., Malang, I., Biologi, J. T., & Tulungagung, I. (2019). SKRINING FITOKIMIA FAMILIA PIPERACEAE. *Prosiding Seminar Nasional Hayati*, 7, 6–12. <https://doi.org/10.29407/HAYATI.V7I1.572>

Samain, M.-S., & Tebbs, M. C. (2020). FAMILIA PIPERACEAE. *Flora Del Bajío*. <https://doi.org/10.21829/FB.306.2020.215>

Serrano, R., Gimeno, A., Plumed, L., Pemán, J., Álvarez, B., Plazas, J., & Caturla, J. (2013). Perfil epidemiológico y patrón de sensibilidad de aislamientos causantes de infección fúngica invasora frente a aislamientos fúngicos de colonización en pacientes críticos no neutropénicos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 30(1), 14–20. <https://doi.org/10.1016/J.RIAM.2012.06.003>

Shahina, Z., Homsy, R. Al, Price, J. D. W., Whiteway, M., Sultana, T., & Dahms, T. E. S. (2022). Rosemary essential oil and its components 1,8-cineole and  $\alpha$ -pinene induce

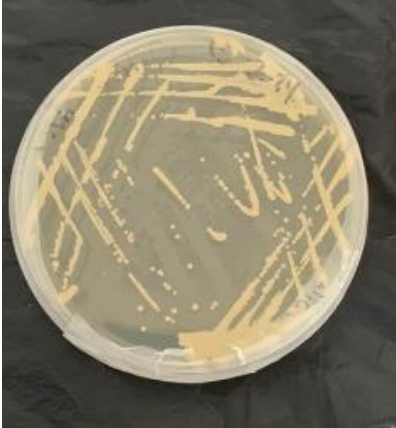

- ROS-dependent lethality and ROS-independent virulence inhibition in *Candida albicans*. *PLOS ONE*, *17*(11). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0277097>
- Shakeel, F., Haq, N., Alshehri, S., Alenazi, M., Alwhaibi, A., & Alsarra, I. A. (2023). Solubility and Thermodynamic Analysis of Isotretinoin in Different (DMSO + Water) Mixtures. *Molecules*, *28*(20). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES28207110>
- Shaw, H. A., Remington, A., McKenzie, G., Winkel, C., & Mawas, F. (2023). Mucosal Immunization Has Benefits over Traditional Subcutaneous Immunization with Group A Streptococcus Antigens in a Pilot Study in a Mouse Model. *Vaccines*, *11*(11), 1724. <https://doi.org/10.3390/VACCINES11111724/S1>
- Silao, F. G. S., Jiang, T., Bereczky-Veress, B., Kühbacher, A., Ryman, K., Uwamohoro, N., Jenull, S., Nogueira, F., Ward, M., Lion, T., Urban, C. F., Rupp, S., Kuchler, K., Chen, C., Peuckert, C., & Ljungdahl, P. O. (2023). Proline catabolism is a key factor facilitating *Candida albicans* pathogenicity. *PLoS Pathogens*, *19*(11 NOVEMBER). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1011677>
- Sonigra, P., & Meena, M. (n.d.). *Metabolic Profile, Bioactivities, and Variations in the Chemical Constituents of Essential Oils of the Ferula Genus (Apiaceae)*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.608649>
- Spoială, A., Ilie, C.-I., Ficai, D., Ficai, A., & Andronescu, E. (2022). Synergic Effect of Honey with Other Natural Agents in Developing Efficient Wound Dressings. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, *12*(1). <https://doi.org/10.3390/antiox12010034>
- Strating, J. R., & van Kuppeveld, F. J. (2017). Viral rewiring of cellular lipid metabolism to create membranous replication compartments. *Current Opinion in Cell Biology*, *47*, 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2017.02.005>

- Su, F., Qin, X.-W., Fan, R., Yan, L., Ji, X.-Z., & Hao, C.-Y. (2024). *Piper motuoense*, a new species of Piperaceae from Xizang, China. *PhytoKeys*, 238, 85–94.  
<https://doi.org/10.3897/PHYTOKEYS.238.115494>
- Sura, K., Rohilla, H., Kumar, D., Jakhar, R., Ahlawat, V., Kaushik, D., Dangi, M., & Chhillar, A. K. (2023). Exploring structural antigens of yellow fever virus to design multi-epitope subunit vaccine candidate by utilizing an immuno-informatics approach. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/S43141-023-00621-7>
- Tamura, T., Alshahni, M. M., & Makimura, K. (2022). Evaluation of CHROMagar™ Candida Plus chromogenic agar for the presumptive identification of *Candida auris*. *Microbiology and Immunology*, 66(6), 292–298. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12973>
- Theiß, S., Köhler, G. A., Kretschmar, M., Nichterlein, T., & Hacker, J. (2022). New molecular methods to study gene functions in *Candida* infections. *Mycoses*, 45(9–10), 345–350.  
<https://doi.org/10.1046/j.1439-0507.2002.00792.x>
- Toso, F., Mestorino, N., & Ardoino, S. (2023). Aceites esenciales como alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento en pollos de engorde. *Investigación Joven*, 10(3), 444–445. <https://revistas.unlp.edu.ar/InvJov/article/view/15477>
- Valdivieso-Ugarte, M., Gomez-Llorente, C., Plaza-Díaz, J., & Gil, Á. (2019). Antimicrobial, antioxidant, and immunomodulatory properties of essential oils: A systematic review. *Nutrients*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/NU11112786>
- Virginia, M., Fernández, P., Caldas Arias, L., Fernanda, L., & Gutiérrez, B. (2020). Infecciones en varones por *Gardnerella Vaginalis*. *Revista Investigaciones Andina*, 22(40). <https://doi.org/10.33132/01248146.1595>

- Winkelman, W. J. (2018). Aromatherapy, botanicals, and essential oils in acne. *Clinics in Dermatology*, 36(3), 299–305. <https://doi.org/10.1016/J.CLINDERMATOL.2018.03.004>
- Yassin, M. T., Mostafa, A. A., Al-Askar, A. A., & Bdeer, R. (2020). In vitro antifungal resistance profile of Candida strains isolated from Saudi women suffering from vulvovaginitis. *European Journal of Medical Research*, 25(1).  
<https://doi.org/10.1186/S40001-019-0399-0>
- Załuski, D., Cieśla, Ł., & Janeczko, Z. (2015). The structure-activity relationships of plant secondary metabolites with antimicrobial, free radical scavenging and inhibitory activity toward selected enzymes. *Studies in Natural Products Chemistry*, 45, 217–249.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63473-3.00007-1>

## ANEXOS

### ANEXO A. Imágenes de las cepas a utilizar

Candida ATTC 10231	Candida Clínica
	
Elaborado por: (La autora, 2024)	

### ANEXO B. Proceso experimental

Realización de dos métodos.	
	
Elaborado por: (La autora, 2024)	

### ANEXO C. Especie más prevalente

<i>Candida spp.</i> más frecuente											
<i>Descripción 2. Tabla estadística</i>											
Code	Count	1%	5%	10%	25%	50%	75%	90%	95%	99%	
CANDIDA ALBICANS	62	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
CANDIDA GLABRATA	24	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
CANDIDA TROPICALES	14	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Total	100	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

Elaborado en Stata por: (La autora, 2024)

## OBJETIVO 1

### ANEXO D. Chi-cuadrado de difusión de discos Kirby Bauer

Estadística -Método 1

#### Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Significación asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	100,000 <sup>a</sup>	2	<,001
Razón de verosimilitud	11,200	2	,004
N de casos válidos	100		

a. 5 casillas (83,3%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es ,01.

Elaborado en SPSS por: (La autora, 2024)

### ANEXO E. Chi-cuadrado microdilución

Estadística -Método 2

#### Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Significación asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	100,000 <sup>a</sup>	2	<,001
Razón de verosimilitud	11,200	2	,004
N de casos válidos	100		

a. 4 casillas (66,7%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es ,01.

Elaborado en SPSS por: (La autora, 2024)

## OBJETIVO 2

## ANEXO F. Estadística

Estadística-% de inhibición con control comercial.

**ESTADISTICOS DESCRIPTIVOS**

	Estadísticos descriptivos							
	N Estadístico	Rango Estadístico	Mínimo Estadístico	Máximo Estadístico	Media Estadístico	Error estándar	Desv. estándar Estadístico	Varianza Estadístico
CANDIDA_ATTC_10231_CN	4	26,66	56,67	83,33	70,0000	5,60919	11,21837	125,852
CANDIDA_ATTC_10231_CC	4	32,00	68,00	100,00	84,0000	6,73300	13,46601	181,333
N válido (por lista)	4							

**Prueba de normalidad**

	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
CANDIDA ATTC 10231 CN	1,000	4	1,000
CANDIDA ATTC 10231 CC	1,000	4	1,000

**PRUEBA DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS**

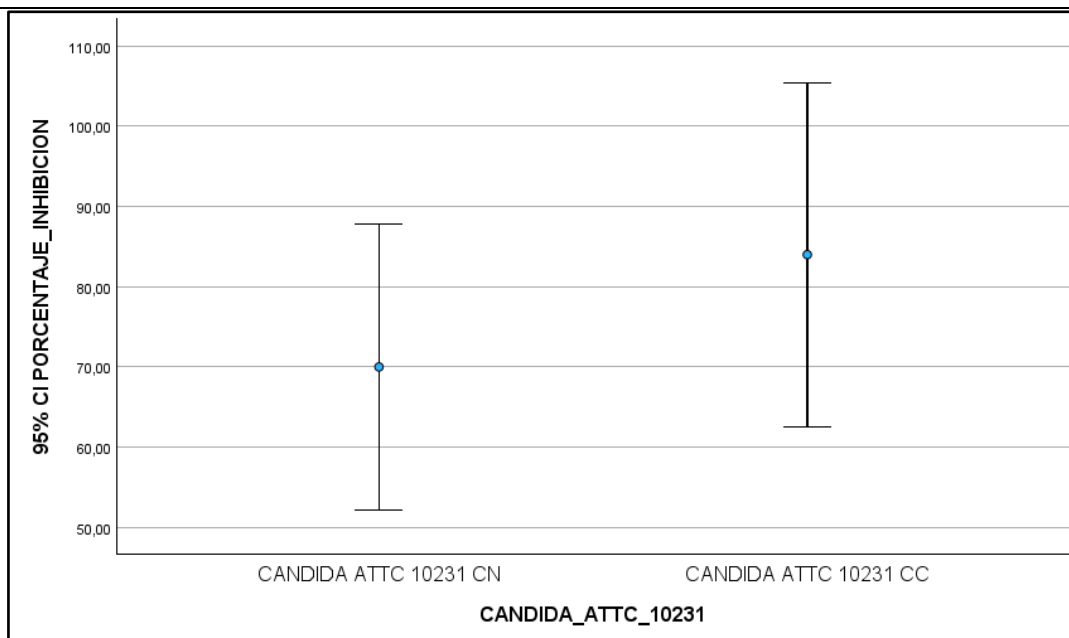
		Prueba de Levene de igualdad de varianzas	
		F	Sig.
PORCENTAJE_INHIBICION	Se asumen varianzas iguales	,137	,724
	No se asumen varianzas iguales		

**Prueba T-Student**

		prueba t para la igualdad de medias				95% de intervalo de confianza de la diferencia	
		Significación		Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	Inferior	Superior
		P de un factor	P de dos factores				
PORCENTAJE_INHIBICION	Se asumen varianzas iguales	,081	,161	-14,00000	8,76335	-35,44314	7,44314
	No se asumen varianzas iguales	,081	,163	-14,00000	8,76335	-35,61385	7,61385

**GRÁFICO**





## PARTE II

### PRUEBA DE NORMALIDA

	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
<i>PIPER IMPEREALE</i>	,843	8	,081
PORCENTAJE INHIBICION	,988	8	,991

### ANOVA

#### PORCENTAJE\_INHIBICION

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	913,978	3	304,659	3,050	,155
Dentro de grupos	399,578	4	99,894		
Total	1313,556	7			

### Tamaños de efecto ANOVA<sup>a,b</sup>

		Estimación de puntos	Intervalo de confianza al 95%	
			Inferior	Superior
PORCENTAJE_INHIBICION N	Eta cuadrado	,696	,000	,794
	Epsilon cuadrado	,468	-,750	,640
	Omega cuadrado efecto fijo	,435	-,600	,609
	Omega cuadrado efecto aleatorio	,204	-,143	,341

a. Eta cuadrado y Epsilon cuadrado se estiman basándose en el modelo de efecto fijo.

b. Las estimaciones negativas pero menos sesgadas se conservan, no se redondean a cero.

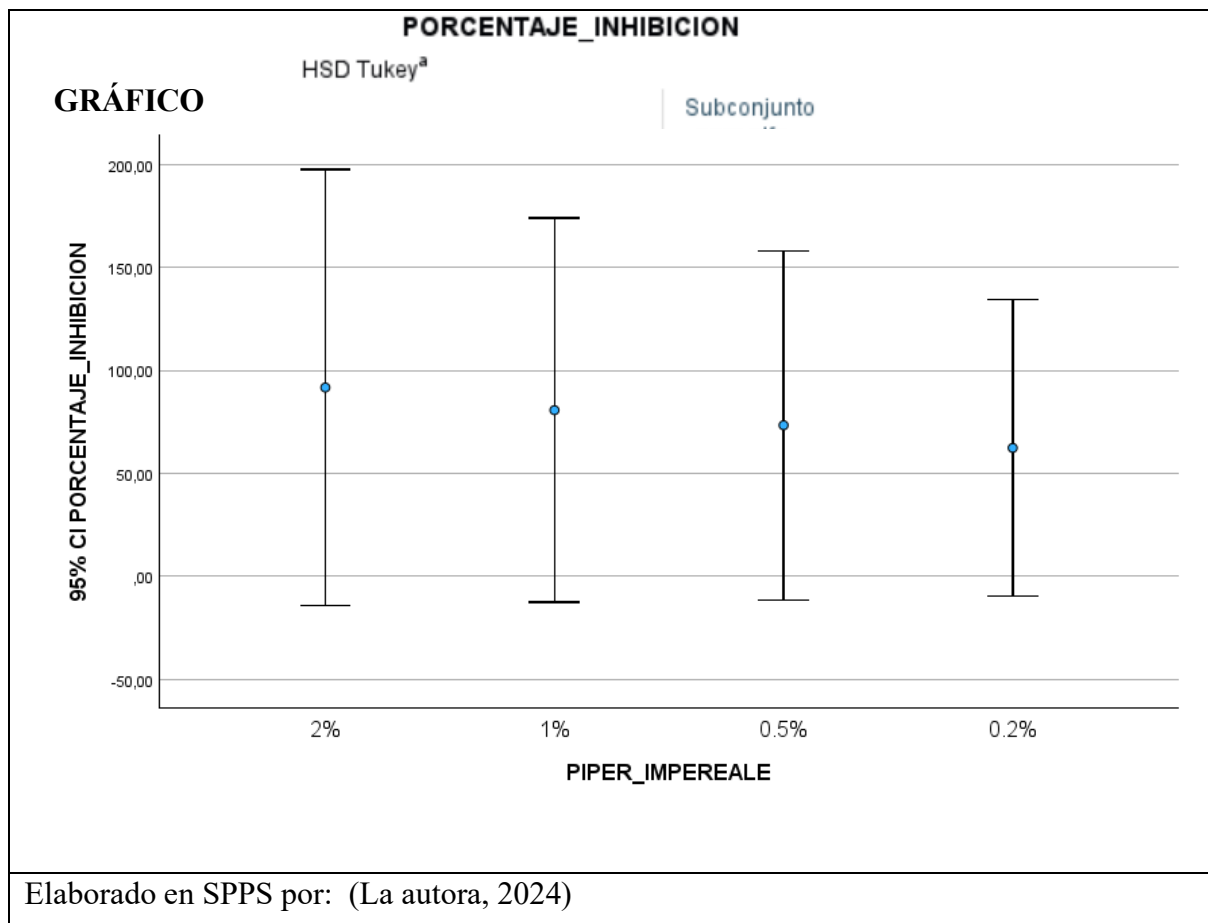
### Comparaciones múltiples

Variable dependiente: PORCENTAJE\_INHIBICION

HSD Tukey

(I) PIPER_IMPEREAL	(J) PIPER_IMPEREAL	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
2%	1%	11,00000	9,99472	,708	-29,6871	51,6871
	0.5%	18,33000	9,99472	,377	-22,3571	59,0171
	0.2%	29,33000	9,99472	,132	-11,3571	70,0171
1%	2%	-11,00000	9,99472	,708	-51,6871	29,6871
	0.5%	7,33000	9,99472	,879	-33,3571	48,0171
	0.2%	18,33000	9,99472	,377	-22,3571	59,0171
0.5%	2%	-18,33000	9,99472	,377	-59,0171	22,3571
	1%	-7,33000	9,99472	,879	-48,0171	33,3571
	0.2%	11,00000	9,99472	,708	-29,6871	51,6871
0.2%	2%	-29,33000	9,99472	,132	-70,0171	11,3571
	1%	-18,33000	9,99472	,377	-59,0171	22,3571
	0.5%	-11,00000	9,99472	,708	-51,6871	29,6871

### Subconjuntos homogéneos



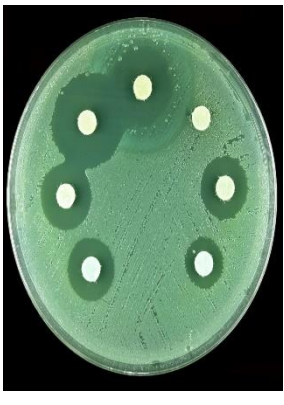





### ANEXO G. Tablas de efecto inhibitorio

% de inhibición CONTROL NATURAL TER 1%				
Cepa / concentración	PI 2%	PI 1%	PI 0,5%	PI 0,2%
CANDIDA ATTC 10231	83,33	73,33333333	66,67	56,67
Cepa / concentración	PI 2%	PI 1%	PI 0,5%	PI 0,2%
CANDIDA CLINICA	62,67	64,00	66,67	64,00

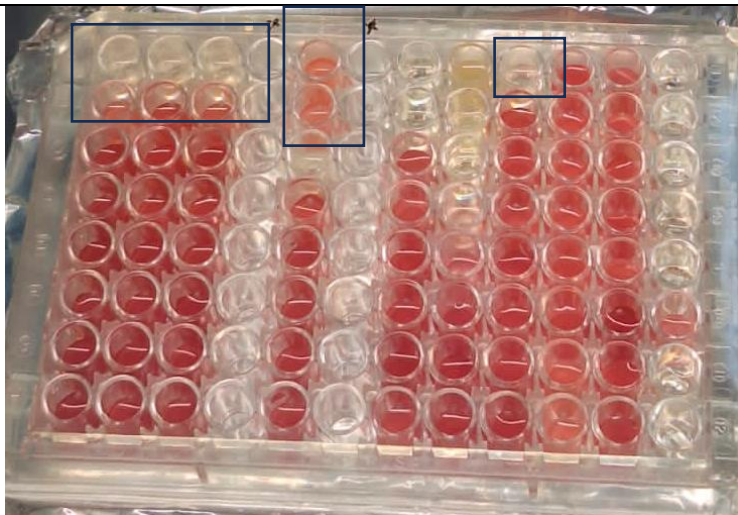
% de inhibición CONTROL COMERCIAL FLUCONAZOL 0,2				
Cepa / concentración	PI 2%	PI 1%	PI 0,5%	PI 0,2%
CANDIDA ATTC 10231	100,00	88,18	80,45	68,73
Cepa / concentración	PI 2%	PI 1%	PI 0,5%	PI 0,2%
CANDIDA CLINICA	78,33	80,00	83,33	80,00

## ANEXO H. Discos Kirby Bauer

<i>Candida</i> ATTC 10231		
Replica 1	Replica 2	Replica 3
		
<p>Nota: Se observa los halos de inhibición en <i>Candida</i> ATTC 10231 de los tratamientos en la parte lateral izquierda, un control negativo sin inhibición y en la parte lateral derecha se encuentra los controles positivos</p>		
<i>Candida</i> Clínica		
Replica 1	Replica 2	Replica 3
		
<p>D Nota: Se observa los halos de inhibición en <i>Candida</i> clínica en menor proporción de los tratamientos realizados en la parte lateral izquierda, un control negativo sin inhibición y en la parte lateral derecha se encuentra los controles positivos</p>		
Elaborado por: (Guaranda, 2024)		

*ANEXO I. Resultado de microdilución*

Candida ATTC 10321



Nota: Se visualiza cuadros azules que indican el inicio del porcentaje de inhibición de los tratamientos con aceite esencial *Piper imperiale*, se observa controles positivos comercial y natural, en la parte final de la columna se observa una contaminación breve en uno de los pocillos.

Elaborado por: (La autora, 2024)