



**UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO**

**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS**

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA**

**Efecto sinérgico antifúngico de la combinación de fluconazol y aceite esencial de  
*Syzygium aromaticum* sobre *Candida albicans*, *in vitro*.**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**

**Médico Cirujano**

**AUTORA:**

Milagros Esther Luyo Hermosa (ORCID: 0000-0003-3244-2295)

**ASESORES:**

Mgtr. David Rene Rodríguez Díaz (ORCID: 0000-0002-9203-3576)

Mgtr. Jaime Abelardo Polo Gamboa (ORCID: 0000-0002-3768-8051)

Dr. Aníbal Manuel Morillo Arquedos (ORCID: 0000-0001-5179-8110)

**LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:**

Enfermedades infecciosas y transmisibles

**TRUJILLO - PERÚ**

**2020**

## **DEDICATORIA**

A:

*Dios, mi familia en especial a mi madre por haberme brindado todo su apoyo incondicional, ser mi fuerza, ejemplo de mujer luchadora y llegar ser cada día mejor persona. Además de apoyarme a realizar mi meta de terminar esta linda profesión que es de servir.*

## **AGRADECIMIENTO**

A:

Dios, por ayudarme cada día a realizar mi meta brindándome ser mejor persona sin él no hubiera podido concluir mi carrera profesional.

A mis padres en especial a mi madre Livia Hermosa Sánchez, por ayudarme cada día a esforzarme y nunca rendirme en el camino además de brindarme todo su amor incondicional.

A mi hijo Oziel Valencia Luyo, es uno de mis grandes motivo y fuerza para lo cual pude concluir con mis metas.

Mis hermanos por brindarme incondicionalmente todo su tiempo y consejos.

**PÁGINA DEL JURADO**

**PROGRAMA ACADÉMICO DE INVESTIGACIÓN**

**JORNADA DE INVESTIGACIÓN N° 2**

**ACTA DE SUSTENTACIÓN**

El jurado encargado evaluar el trabajo de investigación, PRESENTADO EN LA MODALIDAD DE: **Desarrollo Del Proyecto de Investigación**

PRESENTADO POR DON(A):

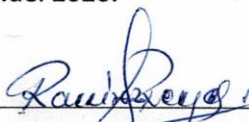
Milagros Esther Luyo Hermosa

CUYO TITULO ES:

Efecto sinérgico antifúngico de la combinación de fluconazol y aceite esencial de *Syzygium aromaticum* sobre *Candida albicans*, *in vitro*.

Reunido en la fecha, escucho la presentación resolución de preguntas por el estudiante, otorgándole el calificativo de: 16... (Numero) Dieciséis..... (Letras).

Trujillo, 13 de Marzo.....del 2020.

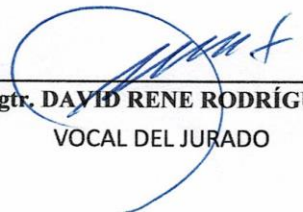


Mgtr. ROXANA ELIZABETH RAMÍREZ REYES.  
PRESIDENTE DEL JURADO



Dra. Patricia Urquiaga Casós  
CNP 25132

Mgtr. SARA PATRICIA URQUIAGA CASÓS.  
SECRETARIA DEL JURADO



Mgtr. DAVID RENE RODRÍGUEZ DÍAZ.  
VOCAL DEL JURADO

NOTA: En el caso de que haya nuevas observaciones en el informe, el estudiante debe levantar las observaciones para dar el pase de la resolución.

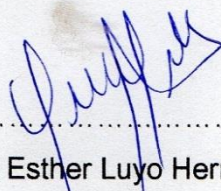
**DECLARATORIA DE AUTENTICIDAD****ANEXO 02****DECLARACIÓN DE AUTORÍA**

Yo Milagros Esther Luyo Hermosa con DNI N° 42094396, estudiante de la Escuela Profesional de Medicina de la Universidad César Vallejo, sede /filial: Trujillo, declaro que el trabajo académico titulado: "Efecto sinérgico antifúngico de la combinación de fluconazol y aceite esencial de *Syzygium aromaticum* sobre *Candida albicans*, *in vitro*" presentado en 43 Folios para la obtención del grado académico/título profesional de: médico cirujano es de mi autoría.

Por lo tanto declaro lo siguiente:

- He mencionada todas las fuentes empleadas en el presente trabajo de investigación identificado correctamente toda cita textual o de paráfrasis proveniente de otras fuentes, de acuerdo establecido por las normas de elaboración de trabajo académico.
- No he utilizado otras fuentes distintas de aquellas expresadamente señaladas en este trabajo.
- Este trabajo de investigación no ha sido previamente presentado completa ni parcialmente para la obtención de otro grado académico o título profesional
- Soy consciente de que mi trabajo puede ser revisado electrónicamente en búsqueda de plagios.
- De encontrar uso de material intelectual ajeno sin el debido reconociendo de su fuente o autor, me someto a las sanciones que determinan el procedimiento disciplinario.

Trujillo, 13 de Marzo del 2020.



.....  
Milagros Esther Luyo Hermosa

DNI:42094396

# ÍNDICE

Dedicatoria .....	ii
Agradecimiento .....	iii
Página del Jurado.....	iv
Declaratoria de autenticidad .....	v
Índice .....	vi
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT .....	viii
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>01</b>
<b>II. MÉTODO.....</b>	<b>06</b>
2.1. Tipo y diseño de investigación .....	06
2.2. Operacionalización de variables.....	07
2.3. Población, muestra y muestreo (incluir criterios de selección).....	07
2.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad .....	08
2.5. Procedimiento.....	09
2.6. Método de análisis de datos.....	11
2.7. Aspectos éticos .....	11
<b>III. RESULTADOS .....</b>	<b>12</b>
<b>IV. DISCUSIÓN .....</b>	<b>16</b>
<b>V. CONCLUSIONES .....</b>	<b>19</b>
<b>VI. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>20</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>21</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>28</b>

## RESUMEN

Se realizó este estudio con el objetivo de evaluar el efecto sinérgico antifúngico de la combinación de fluconazol 25µg y aceite esencial de *Syzygium aromaticum* “clavo de olor” sobre *Candida albicans*, in vitro, mediante el método de difusión en agar de Kirby-Bauer, tomando en cuenta los criterios del CLSI. En esta investigación experimental se evaluó las propiedades antifúngicas del aceite de clavo de olor, sólo y en combinación con fluconazol. Se observó que el aceite esencial *Syzygium aromaticum* presentó actividad antifúngica de  $15,33 \pm 1.3$  mm y en sinergia con el fluconazol obtuvo  $29,58 \pm 0,99$  mm, en comparación con el fluconazol de  $29,17 \pm 1,19$  mm. Se concluyó que el efecto del aceite esencial *Syzygium aromaticum* combinado con el fluconazol y el efecto del fluconazol sólo, no presentan diferencias significativas ( $p=0.746$ ) en sus efectos antifúngicos contra *Candida albicans*.

**Palabras clave:** Agentes antifúngicos, *Candida albicans*, *Syzygium aromaticum*.

## ABSTRACT

This study was carried out with the aim of evaluating the antifungal synergistic effect of the combination of fluconazole 25 $\mu$ g and essential oil of *Syzygium aromaticum* "clove" on *Candida albicans*, in vitro, using the Kirby-Bauer agar diffusion method, taking consider the CLSI criteria. In this experimental investigation the antifungal properties of clove oil were evaluated, alone and in combination with fluconazole. It was observed that the essential oil *Syzygium aromaticum* presented antifungal activity of  $15.33 \pm 1.3$  mm and in synergy with fluconazole obtained  $29.58 \pm 0.99$  mm, compared with fluconazole of  $29.17 \pm 1.19$  mm. It was concluded that the effect of the essential oil *Syzygium aromaticum* combined with fluconazole and the effect of fluconazole alone, do not present significant differences ( $p = 0.746$ ) in their antifungal effects against *Candida albicans*.

**Key words:** Antifungal agents, *Candida albicans*, *Syzygium aromaticum*.



## I. INTRODUCCIÓN

Un promedio de más de 10 millones de personas presenta candidiasis mucosa que tienen un impacto importante en sus vidas o son fatales. Sin embargo, la gravedad varía desde infecciones mucocutáneas asintomáticas leves hasta infecciones sistémicas potencialmente mortales. Las tasas relativas de infección entre todas las infecciones por *Cándida* varían de acuerdo a muchos factores que influyen para el establecimiento de la patología. Hay al menos una docena de especies de *Candida* que pueden ser patógenas para los humanos; de ellas, *Candida albicans* es el agente de más del 80 % de las candidiasis. (1)

Los factores culturales, socioeconómicos y el número creciente de poblaciones en riesgo son los principales determinantes de las variaciones en la incidencia y la prevalencia de la candidiasis en todo el mundo. Los principales impulsores de las enfermedades por *Candida albicans* es una pandemia de la tuberculosis, asma y aumento de la incidencia de cánceres. (2)

Esta incidencia de candidiasis puede variar sustancialmente de una región a otra, la mayoría de los casos de infección invasiva se atribuyen a *Cándida albicans*, además, los países latinoamericanos tienen una frecuencia muy importante de infección invasiva por *Candida parapsilosis* y *Candida tropicalis*. El uso masivo no controlado de antimicóticos contra *Cándida albicans* ha generado el cambio de patrón de susceptibilidad de esta levadura. Se presentan cada vez más casos de candidemias con resistencia al fluconazol. (3,4)

En los últimos años se está valorando los fitofármacos como alternativa al tratamiento de infecciones en el ser humano. Existen muchas casas naturistas que expenden variados productos vegetales, entre los cuales están los antimicóticos. Las plantas tienen compuestos con múltiples propiedades: antiinflamatorias, antimicrobianas, gastroprotectoras, etc. que no generan secuelas ni trastornos secundarios y que se utilizan desde hace muchos siglos atrás, por todas las poblaciones del mundo. Su uso es considerado una respuesta a los múltiples casos de resistencia a fármacos considerados de primera línea. (5)

Son muchos los estudios que se vienen realizando para demostrar la eficacia de los productos extraídos de plantas (aceite esencial, extractos, zumos, resinas, etc.), contra *Cándida albicans*, los cuales reportan el buen efecto que presentan en condiciones de laboratorio, siendo escasos los trabajos de investigación *in vivo*. Por lo que, existe evidencia de la actividad antimicótica de los compuestos fitoquímicos sobre cepas de *Candida albicans*. (5, 6,7)

Se han realizado investigaciones en diferentes partes del mundo, como los estudios realizados en China por Gonelimali F. et al (8), en Togo por Afanyibo Y. et al (9) y en Francia por Pavesi C. et al (10), que manifiestan las propiedades antifúngicas del aceite esencial y los extractos etanólicos y acuosos de *Syzygium aromaticum* “clavo de olor” sobre *Candida albicans*. En estos trabajos evaluaron la actividad anti-*Candida* por medio del método de Kirby-Bauer, formando zonas de inhibición en las tres investigaciones; 25.2 mm de diámetro en la primera, 10 mm en la segunda y 12.1±2.2 mm en la tercera investigación. (8)

De forma parecida en Sudán, Fateh A et al (11) y Mohamed S et al (12), estudiaron la composición de fitoquímicos y la sensibilidad antifúngica del aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) contra *Candida albicans*, obteniendo halos de inhibición de 26 mm y 32 mm, mediante, los cuales determinaron que *Candida albicans* es sensible al aceite de *Syzygium aromaticum* y es un antifúngico que debe ser considerado en fitoterapia y medicina alternativa y complementaria.

Asimismo, en otras investigaciones, Krumina G et al (13), Mansourian A et al (14) y Ahmad A et al (15), también establecieron los efectos *in vitro* de *Syzygium aromaticum* como antifúngico contra *Candida albicans*. Utilizaron el procedimiento de difusión en agar y a todos se observó inhibición del crecimiento de *Candida albicans*. El clavo indujo la formación de halos de inhibición de 20.8 mm, 29.62 mm y 25 mm de diámetro, proporcionalmente, concluyendo que el aceite de clavo tiene efecto antimicótico. (15)

*Candida albicans* es un hongo unicelular (levadura) con pared celular de quitina y carbohidratos (16). Tienen una morfología de células redondas a ovaladas se

Reproducen por gemación, son las clamidiosporas de paredes gruesas que se observan in vitro (17). Este hongo puede encontrarse en la mucosa del tracto gastrointestinal y genitourinario y, ocasionalmente, causar infecciones mucosas severas y recurrentes, como la candidosis oral y vaginal, así como infecciones invasivas y fatales, especialmente en individuos inmunocomprometidos. (18-19)

Los antifúngicos contra *Candida albicans* que se usan ampliamente son los azoles, los cuales bloquean la síntesis de ergosterol en la membrana citoplásmica. El fluconazol es eficaz contra la candidiasis orofaríngea y vaginal y se recetan ampliamente, pero no son muy efectivos en situaciones clínicas. La patogenicidad de *Candida albicans* aumenta debido a la actividad de resistencia de factores de virulencia como la formación de biofilm (20).

*Candida albicans* tiene un mecanismo de resistencia de mutaciones puntuales en ERG11 que genera disminución en la sensibilidad al fluconazol. Ante la creciente de la resistencia al fluconazol de *Candida albicans*, se han planteado nuevas formas de tratamiento antifúngico. A pesar de ello, no se ha logrado parar la resistencia. Se han propuesto alternativas basadas en compuestos naturales, como aceites esenciales de las plantas medicinales. (21,22)

La actividad antifúngica de los fitoquímicos de un extracto de vegetal no podría reemplazar en su totalidad a los antifúngicos, pero los extractos pueden inhibir de forma diferente. La investigación sobre extractos crudos y aceites esenciales puede ser el primer paso para descubrir un nuevo compuesto químico responsable de la actividad antifúngica (23,24). Los componentes de las plantas medicinales, como el eugenol, el timol, el carvacrol, el geraniol, el linalol, el cinmaldehído y el mentol poseen actividad antifúngica contra *Candida albicans*. Tienen la capacidad de crear poros en la membrana celular y expulsar los medicamentos de la célula y disminuir el contenido de ergosterol de la membrana celular (25). El timol, el eugenol y el carvacrol combinados con fluconazol muestran una interacción sinérgica contra el biofilm de *Candida albicans*. Asimismo, el efecto combinado del timol con fluconazol y anfotericina B dio como resultado una interacción sinérgica entre el timol y el fluconazol. (26,27). La actividad antifúngica sobre *Candida albicans* de

Muchos vegetales, fueron comprobados en muchos trabajos de investigación a nivel mundial. Así lo demuestran los estudios realizados por Al-Snafi (28), Najee et al (29), Nagesh et al (30) y Meireles et al (31), en donde confrontaron a *Candida albicans* contra varios extractos y aceites de diferentes plantas, demostrando que existen muchas plantas, incluido el clavo de olor, que ejercen actividad antifúngica contra esta levadura patógena.

Este estudio se realizó para buscar una alternativa en el control de los microorganismos patógenos humanos que se encuentran en muchos sustratos, y siempre existirá la posibilidad de tomar contacto con ellos y, ocasionalmente, adquirir una infección. Se comprobó la eficacia del aceite de clavo contra *Candida albicans* el cual ha ido adquiriendo resistencia a los fármacos antifúngicos convencionales. La sinergia mostrada del aceite de clavo y fluconazol, indica la posibilidad de complementarse con muchos fármacos que actualmente son utilizados para controlar las infecciones por *Candida albicans*, las cuales requieren de tratamientos largos y generan citotoxicidad.

Este trabajo de investigación estuvo orientado a resaltar la importancia de las plantas medicinales como una alternativa para el tratamiento en sinergia con los antifúngicos convencionales. Asimismo, se valoró la acción antifúngica del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* sobre *Candida albicans* en combinación con fluconazol, lo que permitió demostrar que puede potenciar a los antifúngicos.

Los estudios acerca del aceite de clavo, son escasos en nuestro país; sin embargo, aquellos estudios reportados en otras partes del mundo, evidencian las propiedades antimicóticas. Los datos que se adquirieron en este estudio, es un aporte al conocimiento y la ciencia farmacognosia que puede ser utilizada para otras investigaciones y/o para incluirlas en la medicina alternativa y complementaria.

Asimismo, el aceite esencial del vegetal estudiado es un ingrediente no dañino, ahorrativo y sencillo de adquirir por la sociedad, quedando pendiente el establecimiento de la dosificación, ya que no fue objetivo del presente estudio. Por

Consiguiente, queda a disposición y criterio profesional su uso y/o fuente de información.

Por la información analizada, se sabe hasta ahora que los aceites esenciales tienen propiedades antimicrobianas, por lo que se formula el problema: ¿Tiene efecto sinérgico antifúngico la combinación de fluconazol 25µg y aceite esencial de *Syzygium aromaticum* sobre *Candida albicans*, *in vitro*?

En respuesta a la interrogante formulada, se planteó las hipótesis dos hipótesis: H1, La combinación de fluconazol 25µg y aceite esencial de *Syzygium aromaticum* tiene efecto sinérgico antifúngico sobre *Candida albicans in vitro*; y H0, La combinación de fluconazol 25µg y aceite esencial de *Syzygium aromaticum* no tiene efecto sinérgico antifúngico sobre *Candida albicans in vitro*.

En este estudio se consideró como objetivo general, evaluar el efecto sinérgico antifúngico de la combinación de fluconazol 25µg y aceite esencial de *Syzygium aromaticum* sobre *Candida albicans* ,*in vitro*, y como objetivos específicos: a) determinar el efecto antifúngico del fluconazol 25µg combinado con aceite esencial de *Syzygium aromaticum* al 100% sobre *Candida albicans*; b) determinar el efecto antifúngico del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* al 100% sobre *Candida albicans*; c) determinar el efecto antifúngico del fluconazol 25µg sobre *Candida albicans*; y d) determinar el efecto antifúngico del Dimetil Sulfoxido (DMSO) sobre *Candida albicans*.

## II. MÉTODO

### 2.1. TIPO Y DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

**Tipo de investigación:** Este estudio es de tipo básico

**Diseño de investigación:** Experimental, con posprueba de 4 grupos: 1 tratamiento con el vegetal, 1 tratamiento combinado vegetal + antifungico, 1 control positivo (antifungico) y 1 control negativo Dimetil Sulfóxido (DMSO). (32)

RG1	X1	O1
RG2	X2	O2
RG3	X3	O3
RG4	X4	O4

En donde:

RG1-4: Grupos aleatorios de cepas de *Candida albicans*.

X1: Aceite esencial de *Syzygium aromaticum* 100%.

X2: Fluconazol 25µg combinado con aceite esencial de *Syzygium aromaticum* 100%

X3: Control positivo (fluconazol 25µg)

X4: Control negativo Dimetil Sulfóxido (DMSO)

O1-4: Observaciones de los halos de inhibición

### 2.2. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

**Identificación de variables:**

- **Variable Independiente:** Agente antifúngico
- **Variable Dependiente:** Efecto antifúngico

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADORES	ESCALA DE MEDICIÓN
Vd. I: Agente antifúngico sinérgico	La medicación de <i>Candida albicans</i> con agente no farmacológico (syzygium aroantium) y agente farmacológico (fluconazol). (20)	Se dividió en 4 grupos: - Fluconazol 25µg + Aceite de <i>Syzygium aromaticum</i> - Aceite de <i>Syzygium aromaticum</i> 100% - Fluconazol 25µg - Dimetil Sulfoxido (DMSO)	G1  G2  G3 G4	Cualitativa nominal
V. D: Efecto antifúngico	Acción ejercida por agentes tanto físicos, químicos o biológicos sobre los hongos, eliminándolos (fungicida) o inhibiéndolos (fungistático). (29)	Se midió las zonas de reprimir el incremento, siguiendo las normas Estándar M60 del CLSI. (33) Sensible $\geq 17$ mm Intermedio 14-16 mm Resistente $\leq 13$	Eficaz $\geq 17$ mm  No eficaz $< 17$ mm	Cualitativa nominal

### 2.3. POBLACIÓN, MUESTRA Y MUESTREO (incluir criterios de selección)

**POBLACIÓN:** estaba conformada por los cultivos del *Candida albicans* derivados de la cepa ATCC 10231, adquirida en el laboratorio de Microbiología de la Universidad César Vallejo de Trujillo.

**MUESTRA:** El tamaño muestral se evaluó a través de la fórmula estadística hacia la comparación de dos medias, con lo cual se pudo lograr una muestra de 12 repeticiones por grupo estudiado, total 48 observaciones. (34)

$$n = \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 2\sigma^2}{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)^2}$$

Dónde:

- ✓  $Z_{\alpha/2} = 1,96$  Para un nivel de confianza del 95%
- ✓  $Z_{\beta} = 0,84$  para una potencia de prueba del 80%
- ✓  $\bar{X}_1 = 17$  (32)
- ✓  $\bar{X}_2 = 19,17$  (8)
- ✓  $\sigma^2 = 1,9$  (8)
- ✓  $n = 12,02 = 12$  repeticiones

**UNIDAD DE ANÁLISIS:** comprendida por cada cultivo de *Candida albicans*.

**UNIDAD DE MUESTRA:** Se aplicó un muestreo no probabilístico por conveniencia.

#### **CRITERIOS DE SELECCIÓN:**

##### **Criterios de inclusión:**

- Todos los cultivos de *Candida albicans* con 24 horas de sembrado.

##### **Criterios de exclusión:**

- Todos los cultivos de *Candida albicans* contaminados o aquellas que no evidenciaron desarrollo.

## **2.4. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS, VALIDEZ Y CONFIABILIDAD**

**TÉCNICA:** Se utilizó la reconocimiento directo del efecto que se produjo el agente antifúngico sobre *Candida albicans*.



**INSTRUMENTO:** Estuvo constituido por una hoja de recopilación de datos realizada para este estudio, en la cual se registró el resultado del aceite esencial de *Syzygium aromaticum*, el fluconazol y Dimetil Sulfóxido.

(DMSO). (Anexo 1)

## 2.5. PROCEDIMIENTO

Para la obtención de los datos de este trabajo de investigación se siguió los siguientes pasos:

### **Obtención del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* por el método de arrastre con vapor de agua**

Los brotes de flor de *Syzygium aromaticum* “clavo de olor”, se compraron en el emporio zonal Palermo de Trujillo, procedentes de Indonesia, 2 Kilogramos y se trasladaron al laboratorio de Microbiología “San José” de Trujillo, en la cual procedimos a escoger los brotes en buen estado. Se lavaron con agua destilada clorada, se secó sobre papel absorbente estéril y se colocaron sobre bandejas de cartulina, las cuales se llevaron al horno a 40°C por 48 horas. Se reservaron almacenándolas herméticamente en recipientes negros.

El aceite esencial de *Syzygium aromaticum* se obtuvo por el procedimiento de arrastre con vapor de agua; para ello, se calentó (en cocina eléctrica) un balón con agua destilada hasta hervir. El vapor pasó a otro balón con la muestra de clavo de olor, por un conducto. El balón con la muestra se conectó a la vez con un condensador (refrigerante) a través de otro ducto; esto permitió que el vapor del agua pase a través de balón de la muestra y pase al condensador arrastrando los componentes del clavo. Finalmente, el vapor se condensó y fue recepcionado en un embudo de decantación tipo pera. El líquido recibido formó dos fases, quedando el aceite en la superficie por diferencia de densidades. El desarrollo de destilación se realizó en 2 horas. El Aceite Esencial (AE) se llenó en un recipiente de vidrio ámbar estéril y se reservó a temperatura de refrigeración. (35)

### **Cultivo de *Candida albicans* y preparación del inóculo**

Reactivó las cepas de *Candida albicans*, sembrando en agar Sabouraud Glucosado, y se incubó en la estufa a 37°C por un día. Para el ensayo de sensibilidad, se realizó agar Sabouraud Glucosado como centro de cultivo. Se elaboró adecuado recurso para 12 placas Petri (220 ml aprox.) y se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos. Se procedió a servir la cantidad de 18-20 ml por cada placa Petri estériles de plástico desechables de 90x15mm, hasta que secase totalmente.

El inóculo se realizó poniendo 3-4 ml de agua destilada en un tubo de ensayo estéril, donde se le puso suficientes colonias de *Candida albicans* (cultivo de un día), donde se observó una turbidez igual al tubo 0,5 de la escala de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/ml aproximadamente). (36)

### **Evaluación del efecto sinérgico antifúngico por el método de difusión con pozos en agar**

Se evaluó mediante la prueba de susceptibilidad utilizando el método de difusión con pozos en agar, realizando los procedimientos seguidos:

- Se sembró *Cándida albicans*, mojando un hisopo estéril en el inóculo y deslizándolo sobre toda el área del medio de cultivo en las Placas Petri (siembra en superficie); en la cual el microorganismo quedó como cubierto en toda el área.
  
- Se hicieron 5 pozos en el cultivo de cada placa recién sembrada, mediante punzonado con un sacabocado estéril de seis milímetros de diámetro.
- Al primer pozo, se agregó 50 µl de la combinación de fluconazol y aceite esencial de *Syzygium aromaticum*.
- Al segundo pozo, se agregó 50 µl de aceite esencial de *Syzygium aromaticum*.
- Al tercer pozo, se agregó 50 µl de fluconazol (control positivo).
- Al cuarto pozo, se agregó 50 µl de Dimetil Sulfóxido (control negativo). (37)

Se dejaron en descanso por un cuarto de hora, donde las placas se incubaron de forma invertida en la estufa a 37°C por 2 días.

La interpretación se realizó mirando y calculando con una regla Vernier, el diámetro de la zona de inhibición de crecimiento fúngico. Se interpretó como sensible o resistente, según lo establecido en el Estándar M60 del CLSI.

## **2.6. MÉTODO DE ANÁLISIS DE DATOS**

Los resultados obtenidos se registraron en la ficha de recolección de datos, se tabularon en una hoja de cálculo en el programa Microsoft Excel 2016; después, fueron procesados con el software estadístico SPSS versión 25. Se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk con la finalidad de comprobar la normalidad de los datos. Asimismo, los datos se estudiaron con pruebas paramétricas, aplicando el análisis de varianza (ANOVA) donde sirve para comparar las medias de los grupos evaluados y observar si existe diferencia significativa entre los tratamientos. También se aplicó la prueba pos hoc HSD Tukey, considerando varianzas diferentes, para identificar los grupos que son similares y diferentes en su efecto antifúngico. (38)

## **2.7. ASPECTOS ÉTICOS**

Se realizó con los aspectos éticos referentes a tratamiento de residuos peligrosos, salvaguardando la salud de las personas y el medio ambiente, según lo establecido en “Manual de Bioseguridad en el Laboratorio” de la Organización Mundial de la Salud (OMS). (39)

### III. RESULTADOS

**Tabla 1.** Efecto antifúngico in vitro del aceite esencial de *Syzygium aromaticum*, solo y en sinergia con fluconazol contra *Candida albicans*.

Grupos de estudio	N	Zonas de inhibición (mm)				
		Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media	
					Límite inferior	Límite superior
AESA	12	15,33	1,303	0,376	14,51	16,16
AESA+FLU	12	29,58	0,996	0,288	28,95	30,22
FLU	12	29,17	1,193	0,345	28,41	29,92
DMSO	12	0,00	0,000	0,000	0,00	0,00
Total	48	18,52	12,301	1,776	14,95	22,09

Fuente: Ficha de recolección de datos

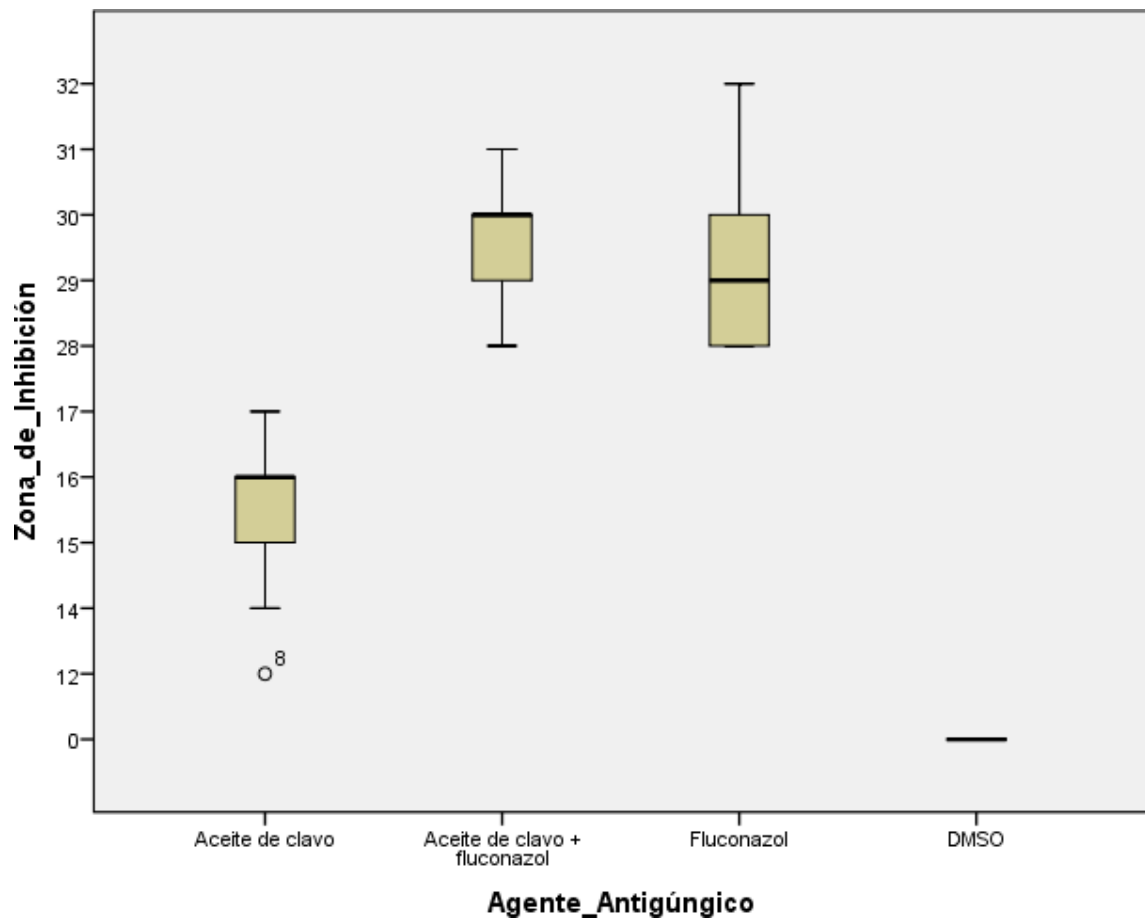
AESA: Aceite esencial de *Syzygium aromaticum*.

AESA+FLU: Aceite esencial de *Syzygium aromaticum* combinado con Fluconazol 25µg

FLU: Fluconazol 25µg (Control positivo)

DMSO: Dimetil Sulfóxido (Control negativo)

El aceite esencial *Syzygium aromaticum* presenta actividad antifúngica de  $15,33 \pm 1,3$  mm y en sinergia con el fluconazol  $29,58 \pm 0,99$  mm, en comparación con el fluconazol de  $29,17 \pm 1,19$  mm.



Fuente: Ficha de recolección de datos

**Figura 1.** Actividad de cuatro agentes antifúngicos: aceite de clavo; aceite de clavo combinado con fluconazol; fluconazol; y dimetil sulfóxido.

El aceite de clavo combinado con fluconazol tuvo efecto antifúngico muy similar al efecto producido por el fluconazol, los cuales formaron zonas de inhibición de  $29,58 \pm 0,99$  mm y  $29,17 \pm 1,19$  mm, respectivamente.

**Tabla 2.** Análisis de varianza (ANOVA) de las medias de los

halos de inhibición generado por el aceite de clavo, aceite de clavo+fluconazol, fluconazol y Dimetil Sulfóxido (DMSO).

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	7066,729	3	2355,576	2290,505	0,000
Dentro de grupos	45,250	44	1,028		
Total	7111,979	47			

Fuente: Ficha de recolección de datos.

Existe diferencia significativa ( $p=0.000$ ) entre los promedios de las zonas de inhibición producidas por grupos evaluados.

**Tabla 3.** Prueba de Tukey que compara los efectos antifúngicos del aceite de clavo, aceite de clavo+fluconazol, fluconazol y Dimetil Sulfóxido (DMSO).

Grupos de estudio	N	Zona de Inhibición (mm)		
		Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
DMSO	12	0,00		
AESA	12		15,33	
FLU	12			29,17
AESA + FLU	12			29,58
Sig.		1,000	1,000	0,746

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

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 12,000.

Fuente: Ficha de recolección de datos

AESA: Aceite esencial de *Syzygium aromaticum*.

AESA+FLU: Aceite esencial de *Syzygium aromaticum* combinado con Fluconazol 25µg

FLU: Fluconazol 25µg (Control positivo)

DMSO: Dimetil Sulfóxido (Control negativo)

El aceite de clavo en combinación con fluconazol presenta el mejor efecto antifúngico con  $29,58 \pm 0,99$  mm, ligeramente superior al fluconazol con  $29,17 \pm 1,19$  mm.

#### IV. DISCUSIÓN

Se realizó este estudio con el objetivo de determinar el efecto antifúngico del aceite esencial de *Syzygium aromaticum*, “clavo de olor”, del fluconazol a 25 $\mu$ g y de la combinación de ambos, contra el hongo patógeno *Candida albicans*, en ensayo a nivel de laboratorio. La sinergia se observó en el efecto que produjo con la formación de zonas de inhibición del crecimiento de la levadura en estudio.

En la Tabla 1 se muestra que, el resultado antifúngico del aceite esencial del *Syzygium aromaticum* sólo, es menor que en sinergia con fluconazol sobre *Candida albicans*, observándose zonas de inhibición de 15.33 $\pm$ 1.30 y 29.58 $\pm$ 1.93mm, respectivamente. Asimismo, se observa que el efecto del fluconazol (control positivo) tuvo un halo de inhibición de 29.17 $\pm$ 1.19mm, lo cual es muy similar al efecto cuando está en combinación con el aceite de clavo. Sin embargo, se encontró que, si produjo actividad antifúngica el aceite de clavo cuando se confrontó con *Candida albicans*, produciendo zonas de inhibición cuyas medidas fueron cercanas a lo mínimo establecido por el Instituto de estándares para el laboratorio clínico (CLSI), (17mm) para considerarse como sensible (eficaz) contra esta levadura. (33)

El resultado obtenido para el efecto antifúngico de la combinación del fluconazol con el aceite esencial de *Syzygium aromaticum*, es ligeramente superior al efecto del fluconazol sólo, 29.58 mm y 29.17 mm, respectivamente, por ello se infiere que el aceite de clavo no repotencia al fluconazol porque la diferencia entre ambos efectos está dentro del rango de la desviación estándar y del intervalo de confianza (DE = 0.996  $\pm$  0.288 [IC 95% = 28.95 – 30.22] y DE = 1.193  $\pm$  0.345 [IC 95% = 28.41 – 29.92], respectivamente), por lo que se considera que tienen el mismo efecto antifúngico contra *Candida albicans*.

La sinergia del aceite de clavo y fluconazol observado en este estudio, produjo efecto antifúngico de 29.58 mm, superior al efecto del aceite de clavo encontrado en diversas investigaciones, como las de Gonelimali F. et al (8), Afanyibo Y. et al (9), Pavesi C. et al (10), Fateh A et al (11), Krumina G et al (13) y Ahmad A et al (15), quienes reportan zonas de inhibición de 25.2 mm, 10 mm, 12.1 mm, 26 mm, 20.8



mm y 25 mm, respectivamente. Sin embargo, tuvo menor efecto antifúngico que lo informado en la investigación de Mohamed S et al (12), quienes indican la formación de zonas de inhibición de 32 mm de diámetro, producidas por *Syzygium aromaticum*.

La figura 1 indica el efecto antifúngico que alcanzaron los 4 grupos de agentes a los cuales se expuso la cepa de *Candida albicans*. Se observa que, según la medida los promedios de las zonas de inhibición, son diferentes los efectos alcanzados por los 4 grupos de estudio, siendo el grupo 2 (combinación de fluconazol + aceite esencial de clavo) el que logró mayor efecto antifúngico (29.58 mm). Sólo el aceite esencial de clavo alcanzó 15.33 mm. Un resultado menor se reporta en el estudio de Pavesi et al. (10), quienes encontraron zonas de inhibición de  $12.1 \pm 2.2$  mm de diámetro, pero en otro trabajo de investigación observaron que el aceite de clavo tuvo mayor actividad antifúngica, como el de Mansourian et al (14) quienes reportan 29.62 mm y Mohamed et al (12), que informan que el aceite de clavo tuvo mucha más actividad antifúngica contra *Cándida albicans*, formando halos de inhibición de hasta 32 mm de diámetro.

Estos hallazgos diferentes se deberían principalmente a la variabilidad de la composición química del aceite de clavo. Los factores que determinan el rendimiento y la composición del aceite esencial son numerosos, estos parámetros incluyen las variaciones estacionales, el origen geográfico, la genética, el tiempo de recolección, el clima y la composición del suelo del área de muestreo, además de las etapas de crecimiento de la planta, lo que hace que la composición química del aceite esencial de la misma especie sea diferente en la cantidad y tipos de metabolitos secundarios. (40,41)

El aceite esencial del brote de clavo (*Syzygium aromaticum*) tiene efecto antibacterianas, antifúngicas, insecticidas y antioxidantes. Estas propiedades se deben principalmente a sus derivados fenólicos. Eugenol, es un compuesto de fenilpropeno con fuertes actividades biológicas y antimicrobianas, es el elemento primordial del aceite esencial de clavo, desempeña un papel importante en la inhibición del crecimiento de bacterias y hongos. Puede desnaturalizar proteínas y reaccionar con fosfolípidos en la membrana celular. También afecta el transporte

de iones y ATP en la cual cambia el perfil de ácidos grasos. Se ha encontrado un mecanismo antimicrobiano del eugenol, que afecta no solo a la membrana sino también a la envoltura de las células fúngicas y bacterianas. (42,43)

En la Tabla 2 Los resultados del análisis de varianza entre los grupos de agentes antifúngicos evaluados, e indica que existe diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0.000$ ) en dos o más promedios de las zonas de inhibición (efectos antifúngicos) de los 4 grupos analizados. Por lo que, se realizó la prueba pos hoc de Tukey para identificar los grupos que se diferencian.

En la Tabla 3 se comparan los promedios de los 4 grupos de compuestos analizados y se comprueba que el promedio de los halos de inhibición que conforman el fluconazol y la combinación de fluconazol + aceite de clavo, no tienen diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0.746$ ), por lo que se infiere que tienen el mismo efecto antifúngico por encontrarse en el mismo subconjunto. Sin embargo, estos 2 grupos se diferencian en su efecto con el aceite de clavo y con el Dimetil Sulfoxido (DMSO).

Los componentes fitoquímicos activos del aceite esencial de clavo de olor son los que determinan las diferencias significativas en el efecto antimicrobiano. Los análisis del aceite esencial, a partir de los brotes de clavo, reportan que se identificaron hasta 32 componentes. Los principales componentes del aceite de brote de *Syzygium aromaticum* fueron eugenol (70 y 82.6%) y  $\beta$ -cariofileno (19.5 y 7.2%), se observaron desigualdad significativas con relación al acetato de eugenilo (2.1 y 6.0%),  $\alpha$ -humuleno (1.9 y 0.8%), (E)  $\alpha$ -bergamoteno (1.3 y 0.2 %), isoeugenol-I (0.8 y 0.1%),  $\gamma$ -cadineno (0.8 y 0.2%), (E) -nerolidol (0.1 y 0.4%), alo-aromadendreno (0.3 y 0.1%) y selineno (0.1 y 0.3%). (44)

## V. CONCLUSIONES

El fluconazol combinado con aceite esencial de *Syzygium aromaticum* al 100% presenta efecto sinérgico antifúngico contra *Candida albicans*, en estudio in vitro.

El aceite esencial de *Syzygium aromaticum* al 100% tiene efecto antifúngico sobre *Candida albicans*.

El fluconazol tiene efecto antifúngico sobre *Candida albicans* y estuvo dentro de los parámetros establecidos en el estándar M60 del Instituto de estándares para el laboratorio clínico (CLSI).

El Dimetil Sulfoxido (DMSO) no tiene efecto antifúngico contra *Candida albicans* y estuvo dentro de lo esperado, según para el laboratorio clínico (CLSI)

## I. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar estudios en donde se combine el aceite esencial de *Syzygium aromaticum* con otros antifúngicos para que determinar la existencia de sinergia y potencialización del fármaco.

Se recomienda realizar estudios de eficacia antifúngica y antibacteriana con aceite esencial de *Syzygium aromaticum* contra otros patógenos.

Se recomienda estudiar los componentes fitoquímicos del aceite esencial de clavo que se expander en nuestro medio, para conocer los quimiotipos de *Syzygium aromaticum*.

Se recomienda realizar investigaciones sobre efecto antifúngico in vivo en modelos animales para conocer el comportamiento de los fitoquímicos como antifúngico en interacción con la maquinaria celular y molecular.

Se recomienda aplicar en pacientes voluntarios como uso tópico en el tratamiento de micosis superficial por *Candida albicans*.

## REFERENCIAS

1. Bongomin F, Gago S, Oladele R, Denning D. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision. *J. Fungi* [Internet]. Dic 2017; 3(4): 57. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5753159/pdf/jof-03-00057.pdf>
2. Cortés JA, Reyes P, Gómez CH, Cuervo SI, Rivas P, Casas CA, Sánchez R. Clinical and epidemiological characteristics and risk factors for mortality in patients with candidemia in hospitals from Bogotá, Colombia. *Braz J Infect Dis* [Internet]. 2014; 18(6): 631–637. Disponible en: [https://ac.els-cdn.com/S141386701400169X/1-s2.0-S141386701400169X-main.pdf?\\_tid=075e58ba-2929-4b25-b329-861ef2914069&acdnat=1551936683\\_c5d48473c755f40773e4acf6d4c43c00](https://ac.els-cdn.com/S141386701400169X/1-s2.0-S141386701400169X-main.pdf?_tid=075e58ba-2929-4b25-b329-861ef2914069&acdnat=1551936683_c5d48473c755f40773e4acf6d4c43c00)
3. Nishikaku AS, Melo A, Colombo A. Geographic Trends in Invasive Candidiasis. *Curr Fungal Infect Rep* [Internet]. Dic 2010; 4(4): 210–218. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/227026335\\_Geographic\\_Trends\\_in\\_Invasive\\_Candidiasis](https://www.researchgate.net/publication/227026335_Geographic_Trends_in_Invasive_Candidiasis)
4. Rodríguez L, Bustamante B, Huaroto L, Agurto C, Illescas R, Ramírez R, Díaz A, Hidalgo J. A multi-centric Study of Candida bloodstream infection in Lima-Callao, Peru: Species distribution, antifungal resistance and clinical outcomes. *PLoS One* [Internet]. Abr 2017; 12(4): 1-12. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5395148/pdf/pone.0175172.pdf>
5. Rodriguez V, Rita EM. Antifungal Activity of Brazilian Medicinal Plants against Candida Species. En: Doblin Sandai [Editor]. *Candida albicans*. 1ra ed. Londres: IntechOpen; 2018. Pág. 1-29. Disponible en: <https://www.intechopen.com/online-first/antifungal-activity-of-brazilian-medicinal-plants-against-candida-species>
6. Pirbalouti AG, Bahmani M, Avijgan M. Anti-Candida Activity of Some of the Iranian Medicinal Plants. *Electronic Journal of Biology* [Internet]. 2009; 5(4): 85-88. Disponible en: <http://ejbio.imedpub.com/anticandida-activity-of-some-of-the-iranian-medicinal-plants.pdf>
7. Sharma H, Yunus GY, Agrawal R, Kalra M, Verma S, Bhattar S. Antifungal efficacy of three medicinal plants *Glycyrrhiza glabra*, *Ficus religiosa*, and *Plantago major*

- against oral *Candida albicans*: A comparative analysis. *Indian J Dent Res* [Internet]. Jul-Ago 2016; 27(4): 433-436. Disponible en: <http://www.ijdr.in/article.asp?issn=0970-9290;year=2016;volume=27;issue=4;spage=433;epage=436;aualast=Sharma>
8. Gonelimali FD, Lin J, Miao W, Xuan J, Charles F, Chen M, Hatab SR. Antimicrobial Properties and Mechanism of Action of Some Plant Extracts Against Food Pathogens and Spoilage Microorganisms. *Front. Microbiol* [Internet]. Jul 2018; 9: 1639. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6066648/pdf/fmicb-09-01639.pdf>
  9. Afanyibo YG, Anani K, Esseh K, Sadji Y, Idoh K, Koudouvo K, Agbonon A, Améyapoh Y, Tozo K, Gbeassor M. Antimicrobial Activities of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry (Myrtaceae) Fruit Extracts on Six Standard Microorganisms and Their Clinical Counterpart. *Open Access Library Journal* [Internet]. Ene 2018; 05(12): 1-13. Disponible en: [https://file.scirp.org/pdf/OALibJ\\_2018122911234256.pdf](https://file.scirp.org/pdf/OALibJ_2018122911234256.pdf)
  10. Pavesi C, Banks LA, Hudaib T. Antifungal and Antibacterial Activities of Eugenol and Non-Polar Extract of *Syzygium aromaticum* L. *J. Pharm. Sci. & Res* [Internet]. 2018; 10(2): 337-339. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/47ce/ebd325dd3beb247ef6162f3b1d5749699a03.pdf>
  11. Fateh AL, Rahman FM, Elamin IE, Shayoub ME, Salah OH. Antifungal and phytochemical constituents study of clove oil from *Syzygium aromaticum*. *Wjpls* [Internet]. 2017; 3(10): 211-215. Disponible en: [http://www.wjpls.org/home/article\\_abstract/787](http://www.wjpls.org/home/article_abstract/787)
  12. Mohamed SG, Badri AM. Antimicrobial Activity of *Syzygium aromaticum* and *Citrus aurantifolia* Essential Oils Against Some Microbes in Khartoum, Sudan. *EC Microbiology* [Internet]. 2017; 12(6): 253-259. Disponible en: <https://www.econicon.com/ecmi/pdf/ECMI-12-00405.pdf>
  13. Krumina G, Ratkevicha L, Nikolajeva V, Babarikina A, Babarykin D. Influence of plant extracts on the growth of oral pathogens *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* in vitro. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences*

- [Internet]. 2015; 64(1): 62–67. Disponible en: [http://www.kirj.ee/public/proceedings\\_pdf/2015/issue\\_1/Proc-2015-1-62-67.pdf](http://www.kirj.ee/public/proceedings_pdf/2015/issue_1/Proc-2015-1-62-67.pdf)
14. Mansourian A, Boojarpour N, Ashnagar S, Momen J, Shamshiri AR. The comparative study of antifungal activity of *Syzygium aromaticum*, *Punica granatum* and nystatin on *Candida albicans*; An in vitro study. J Mycol Med [Internet]. Dic 2014; 24(4): 163-168. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1156523314002339?via%3Dihub>
  15. Ahmad A, Shaheen A, Owais M, Gaurav S. Antimicrobial activity of *Syzygium aromaticum* oil and its potential in the treatment of urogenital infections. En: Méndez-Vilas A, editor. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. Carolina del Sur, USA: Formatex Research Center; 2013. p. 865-871. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/ea75/f4ecf9b78027d941d7ebe0de8e2a3976c21e.pdf>
  16. Ryan KJ, Ray CG. Sherris Medical Microbiology. 6<sup>th</sup> ed. Ohio-USA: McGraw-Hill Education; 2014.
  17. Noble SM, Gianetti BA, Witchley JN. *Candida albicans* cell type switches and functional plasticity in the mammalian host. Nat Rev Microbiol [Internet]. Feb 2017; 15(2): 96–108. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5957277/pdf/nihms957547.pdf>
  18. Borges AC, Aparecida C, Nuernberg G. Mini-review – *Candida albicans* biofilms: characteristics, clinical relevance, and drug susceptibility. En: The Battle against microbial pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs. A. Méndez-Vilas, Editor. Series de Microbiología N° 5. Vol. 1. España: FORMATEX; 2015. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/e13d/d9002bdb0a4710d3147624892085e123f0da.pdf?ga=2.265170888.650824754.1552411142-1823112469.1547914656>
  19. Dadar M, Tiwari R, Karthik K, Chakraborty S, Shahali Y, Dhama K. *Candida albicans* - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control – An update. Microb Pathog [Internet]. Abr 2018; 117:128-

138. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/323221760\\_Candida\\_albicans\\_-\\_Biology\\_molecular\\_characterization\\_pathogenicity\\_and\\_advances\\_in\\_diagnosis\\_and\\_control\\_-\\_An\\_update](https://www.researchgate.net/publication/323221760_Candida_albicans_-_Biology_molecular_characterization_pathogenicity_and_advances_in_diagnosis_and_control_-_An_update)
20. Pandurang S, Mohan S. Review on Combinatorial Approach for Inhibiting *Candida albicans* Biofilm. American Journal of Clinical Microbiology and Antimicrobials [Internet]. 2018; 1(5): 1022. Disponible en: [http://www.remedypublications.com/american-journal-of-clinical-microbiology-and-antimicrobials/articles/pdfs\\_folder/ajcm-v1-id1022.pdf](http://www.remedypublications.com/american-journal-of-clinical-microbiology-and-antimicrobials/articles/pdfs_folder/ajcm-v1-id1022.pdf)
21. Whaley SG, Berkow EL, Rybak JM, Nishimoto AT, Barker KS, Rogers PD. Azole Antifungal Resistance in *Candida albicans* and Emerging Non-albicans *Candida* Species. Front Microbiol [Internet]. Ene 2017; 7:2173. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5226953/pdf/fmicb-07-02173.pdf>
22. Kontoyiannis DP. Antifungal Resistance: An Emerging Reality and A Global Challenge. The Journal of Infectious Diseases [Internet]. 2017; 216 (Suppl 3): 431-435. Disponible en: [https://academic.oup.com/jid/article/216/suppl\\_3/S431/4107053](https://academic.oup.com/jid/article/216/suppl_3/S431/4107053)
23. Soliman S, Alnajdy D, El-Keblawy AA, Mosa KA, Khoder G, Noredin AM. Plants' Natural Products as Alternative Promising Anti-Candida Drugs. Pharmacogn Rev [Internet]. Jul-Dic 2017; 11(22): 104-122. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/320020096\\_Plants%27\\_Natural\\_Products\\_as\\_Alternative\\_Promising\\_Anti-Candida\\_Drugs?enrichId=rgreq-488fbd54aca5409aa1904058075d6780-XXX&enrichSource=Y292ZXJQYWdlOzMzMMDAyMDA5NDNjtBUzo1NTUyMTU5ODQ1MTMwMjlAMTUwOTM4NTIxNDc4NA%3D%3D&el=1\\_x\\_3&\\_esc=publicationCoverPdf](https://www.researchgate.net/publication/320020096_Plants%27_Natural_Products_as_Alternative_Promising_Anti-Candida_Drugs?enrichId=rgreq-488fbd54aca5409aa1904058075d6780-XXX&enrichSource=Y292ZXJQYWdlOzMzMMDAyMDA5NDNjtBUzo1NTUyMTU5ODQ1MTMwMjlAMTUwOTM4NTIxNDc4NA%3D%3D&el=1_x_3&_esc=publicationCoverPdf)
24. Negri M, Salci TP, Shinobu-Mesquita CS, Capoci IR, Svidzinski TI, Kioshima ES. Early state research on antifungal natural products. Molecules [Internet]. Mar 2014; 19(3): 2925-56. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6271505/pdf/molecules-19-02925.pdf>



25. Altemimi A, Lakhssassi N, Baharlouei A, Watson DG, Lightfoot DA. Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts. *Plants (Basel)* [Internet]. Sep 2017; 6(4). E42. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5750618/pdf/plants-06-00042.pdf>
26. Kozłowska M, Laudy AE, Przybył J, Ziarno M, Majewska E. Chemical composition and antibacterial activity of some medicinal plants from *Lamiaceae* family. *Acta Pol Pharm* [Internet]. Jul-Ago 2015; 72(4): 757-67. Disponible en: [http://ptfarm.pl/pub/File/Acta\\_Poloniae/2015/4/757.pdf](http://ptfarm.pl/pub/File/Acta_Poloniae/2015/4/757.pdf)
27. Martins N, Barros L, Henriques M, Silva S, Ferreira I. Activity of phenolic compounds from plant origin against *Candida* species. *Industrial Crops and Products* [Internet]. 2015; 74: 648–670. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/247382/>
28. Al-Snafi AE. The Pharmacology of *Apium graveolens*. - A Review. *IJPRS* [Internet]. 2014; 3(1): 671-677. Disponible en: <https://ijprs.com/wp-content/uploads/2018/09/IJPRS-V3-I1-00117.pdf>
29. Najee H, Kamerzan C, Marutescu L, Gheorghe I, Popa M, Pircalabioru GG, Chifiriuc MC, Lazar V. Antifungal activity of some medicinal plant extracts against *Candida albicans* nosocomial isolates. *Romanian Biotechnological Letters* [Internet]. Nov-Dic 2018; 23(6): 14073-14076. Disponible en: <https://www.rombio.eu/vol23nr6/1.pdf>
30. Nagesh SV, Muniappan M, Kannan I, Viswanathan S, Jayachandra K. Antifungal Activity of Various Extracts of *Azadirachta indica* Leaf - an In-Vitro Study. *International Journal of ChemTech Research* [Internet]. 2017; 10(15): 305-311. Disponible en: [http://www.sphinxesai.com/2017/ch\\_vol10\\_no15/3/\(305-311\)V10N15CT.pdf](http://www.sphinxesai.com/2017/ch_vol10_no15/3/(305-311)V10N15CT.pdf)
31. Meireles G, Harue E, Garcia A, Ueda T, Nakamura CV, Dias BP. Effect of plant extracts on planktonic growth and biofilm of *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* [Internet]. 2015; 4(6): 908-917. Disponible en: <https://www.ijcmas.com/vol-4-6/Gustavo%20Meireles%20Costa,%20et%20al.pdf>

32. Hernández R, Fernández C, Baptista M. Metodología de la investigación. 6ta ed. México D.F.: McGraw-Hill Education; 2014.
33. CLSI. Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 1st ed. CLSI Supplement M60. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.
34. Malone HE, Nicholl H, Coyne I. Fundamentals of estimating sample size. Nurse Res [Internet]. May 2016; 23(5): 21-25. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/303312866\\_Fundamentals\\_of\\_Estimating\\_sample\\_size](https://www.researchgate.net/publication/303312866_Fundamentals_of_Estimating_sample_size)
35. Casado I. Optimización de la extracción de aceites esenciales por destilación en corriente de vapor. [Tesis de Título]. Madrid, España: Universidad Politécnica de Madrid; 2018. Disponible en: [http://oa.upm.es/49669/1/TFG\\_IRENE\\_CASADO\\_VILLAVERDE.pdf](http://oa.upm.es/49669/1/TFG_IRENE_CASADO_VILLAVERDE.pdf)
36. CLSI. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline. 2nd ed. CLSI document M44-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009. Disponible en: [https://clsi.org/media/2634/m44ed3\\_sample.pdf](https://clsi.org/media/2634/m44ed3_sample.pdf)
37. Uddhav SB, Sivagurunathan MS. Antibiotic susceptibility testing: A review on current practices. Int J Pharm [Internet]. 2016; 6(3): 11-17. Disponible en: [http://www.pharmascholars.com/articles\\_pdfs/issues/2124638525\\_060302-1657.pdf?title=Antibiotic%20susceptibility%20testing:%20a%20review%20on%20current%20practices](http://www.pharmascholars.com/articles_pdfs/issues/2124638525_060302-1657.pdf?title=Antibiotic%20susceptibility%20testing:%20a%20review%20on%20current%20practices)
38. Kamana R, Mung'atu JK, Ndengo M. Parametric and Non-Parametric Design Based Tests Analysis of the Level and Differentials of Household Consumption Expenditure in Rwanda (2010-2011). ARI - An International Journal for Physical and Engineering Sciences. Sep 2015; 3(1): 105-122. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/311391779\\_Parametric\\_and\\_Non-Parametric\\_Design\\_Based\\_Tests\\_Analysis\\_of\\_the\\_Level\\_and\\_Differentials\\_of\\_Ho](https://www.researchgate.net/publication/311391779_Parametric_and_Non-Parametric_Design_Based_Tests_Analysis_of_the_Level_and_Differentials_of_Ho) usehold Consumption Expenditure in Rwanda 2010-2011

39. Organización Mundial de la Salud – OMS. Manual de bioseguridad en el laboratorio. 3ra. Edición. Ginebra: Ediciones de la OMS; 2005. Disponible en: [http://www.who.int/topics/medical\\_waste/manual\\_bioseguridad\\_laboratorio.pdf](http://www.who.int/topics/medical_waste/manual_bioseguridad_laboratorio.pdf)
40. Pathirana HNK, Wimalasena SHM, De Silva BCJ, Hossain S, Gang-Joon H. Antibacterial activity of clove essential oil and eugenol against fish pathogenic bacteria isolated from cultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Slov VetRes* [Internet]. 2019; 56(1): 31–38. Disponible en: <https://www.slovetres.si/index.php/SVR/article/view/590/254>
41. Elshafie HS, Camele I. An Overview of the Biological Effects of Some Mediterranean Essential Oils on Human Health. *Biomed Res Int* [Internet]. 2017; 2017(1): 1-15. Disponible en: <http://downloads.hindawi.com/journals/bmri/2017/9268468.pdf>
42. Dhifi W, Bellili S, Jazi S, Bahloul N, Mnif W. Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. *Medicines (Basel)* [Internet]. 2016 Sep; 3(4): 1-16. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5456241/pdf/medicines-03-00025.pdf>
43. Lingan K. A Review on Major Constituents of Various Essential Oils and its Application. *Transl Med (Sunnyvale)* [Internet]. 2018; 8(1): 1-5. Disponible en: <https://www.longdom.org/open-access/a-review-on-major-constituents-of-various-essential-oils-and-itsapplication-2161-1025-1000201.pdf>

**ANEXOS 01:**

**TAXONOMÍA DE LA PLANTA DE SYZYGIUM AROMATICUM  
(CLAVO DE OLOR)**




**Especie:** Syzygium aromaticum  
**Nombre común:**(clavo de olor)  
**Familia:** Mirtáceas  
**Género:** Syzygium  
**Reino:** Plantae  
**División:** Magnoliophyta  
**Clase:** Magnoliopsida  
**Subclase:** Rosidae  
**Orden:** Myrtales


**ANEXO 2**  
**FICHA DE ROLECCIÓN DE DATOS**

N° repet	ZONAS DE INHIBICIÓN (mm)			
	AESA	AESA+FLU	FLU	DMSO
1	14	30	28	0
2	16	31	28	0
3	16	31	32	0
4	15	30	30	0
5	16	28	30	0
6	16	29	29	0
7	15	29	29	0
8	12	28	29	0
9	17	30	28	0
10	16	30	30	0
11	16	30	29	0
12	15	29	28	0

- ✓ AESA: Aceite esencial de *Syzygium aromaticum*.
- ✓ AESA+FLU: Aceite esencial de *Syzygium aromaticum* combinado con Fluconazol 25µg
- ✓ FLU: Fluconazol 25µg (Control positivo)
- ✓ DMSO: Dimetil Sulfoxido (Control negativo)

### ANEXO 3: FICHA DE VALIDACIÓN DE INSTRUMENTO





**UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO**

**FICHA DE VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO**

ÍTEM	CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LA VALIDEZ				CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LOS ASPECTOS ÉTICOS							
	CONTENIDO (Se refiere al grado en que el instrumento refleja el contenido de la variable que se pretende medir)		CONSTRUCTO (Hasta donde el instrumento mide realmente la variable, y con cuanta eficacia lo hace)		RELEVANCIA (El ítem es esencial o importante, es decir, debe ser incluido)		COHERENCIA INTERNA (El ítem tiene relación lógica con la dimensión o el indicador que está midiendo)		CLARIDAD (El ítem se comprende fácilmente, es decir, sus sintácticas y semánticas son adecuadas)		SUFICIENCIA (Los ítems que pertenecen a una misma dimensión bastan para obtener la dimensión de esta)	
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
1	X		X		X		X		X		X	
2	X		X		X		X		X		X	
3	X		X		X		X		X		X	

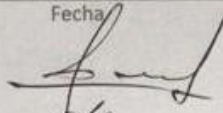
  


CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LOS ASPECTOS ÉTICOS	SI	NO	OBSERVACIONES
El instrumento contiene instrucciones claras y precisas para responder la ficha de cotejos	X		
Los ítems permiten el logro del objetivo de la investigación	X		
Los ítems están distribuidos en forma lógica y secuencial	X		
El número de ítems es suficiente para recoger la información. En caso de ser negativa la respuesta sugiere los ítems a añadir	X		


  

VALIDEZ			
APLICABLE	X	NO APLICABLE	APLICABLE TENIENDO EN CUENTA OBSERVACIÓN
	X		


Validado por Fecha

Jaime Polo Cancha CBP 6951 

Miguel Angel Muñoz Ríos CBP 5830 

María Saldaña Ayala Ravelo CBP 1206 

## ANEXO 4: CONSTANCIA DEL LABORATORIO CLÍNICO




**San Jose**  
**LABORATORIO CLINICO**  
*Calidad y profesionalismo el servicio de tu salud*

**CONSTANCIA DE EJECUCIÓN DE PROYECTO**

El Laboratorio "San José" deja constancia que ha prestado sus instalaciones, en donde la Srta. MILAGROS ESTHER LUYO HERMOSA, estudiante de Medicina de la Universidad César Vallejo de Trujillo, ejecutó la parte experimental de su proyecto de tesis titulado "Efecto sinérgico antifúngico de la combinación de fluconazol y aceite esencial de *Syzygium aromaticum* sobre *Candida albicans*, in vitro", durante los días 17 al 25 de enero de 2020, bajo la orientación y asesoramiento del Microbiólogo Jaime Abelardo Polo Gamboa.

Se expide la presente a solicitud de la estudiante, sólo para fines académicos, a los 2 días del mes de Febrero de 2020.

  
.....  
**José Luis Caila Quevea**  
.....  
MICROBIÓLOGO - C.B.P. 6307  
.....  
Gerente General

**Sede Principal: Francisco Bolognesi 678 Of. 203 - Centro Histórico - Trujillo**  
**Sucursales: Los Corales 277- Barrio Médico Urb. Santa Inés - Trujillo**  
☎ 769999 - 📞 948649844  
✉ [sanjoselabs@hotmail.com](mailto:sanjoselabs@hotmail.com) 🌐 [www.sanjoselabs.amawebs.com/](http://www.sanjoselabs.amawebs.com/)



ACTA DE APROBACIÓN DE ORIGINALIDAD TRABAJO ACADÉMICO

Yo, DAVID RENE RODRIGUEZ DIAZ, docente de la Facultad CIENCIAS DE LA SALUD y Escuela Profesional MEDICINA de la Universidad César Vallejo TRUJILLO (precisar filial o sede), revisor (a) de la tesis titulada

" EFECTO SINERGICO ANTIFUNGICO DE LA COMBINACION DE FLUCONAZOL y ACEITE ESENCIAL DE SYZYGIUM AROMATICUM SOBRE CANDIDA ALBICANS., IN VITRO. "

del (de la) estudiante MILAGROS ESTHER LUYO HERMOZA, constato que la investigación tiene un índice de similitud de 27.7% verificable en el reporte de originalidad del programa Turnitin.

El/la suscrito (a) analizó dicho reporte y concluyó que cada una de las coincidencias detectadas no constituyen plagio. A mi leal saber y entender la tesis cumple con todas las normas para el uso de citas y referencias establecidas por la Universidad César Vallejo.

Lugar y fecha 13 de Marzo del 2020

[Handwritten signature]

David Rodriguez Diaz  
MEDICO CIRUJANO  
C.M.P. 46557

Firma

Nombres y apellidos del (de la) docente


DNI: 4289014



## ANEXO: REPORTE DE ORIGINALIDAD POR EL SOFTWARE TURNITIN



## ANEXO: AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE TESIS REPOSITORIO INSTITUCIONAL UCV.

	<b>AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE TESIS EN REPOSITORIO INSTITUCIONAL UCV.</b>	<b>Código:</b> <b>Versión:09</b> <b>Fecha: 13-03-2020</b> <b>Página: 1 en 1</b>
---	---	--

Yo; Milagros Esther Luyo Hermosa, identificada con de DNI N° 42094396, egresada de la escuela profesional de Medicina Humana de la Universidad Cesar Vallejo filial Trujillo, autorizo la divulgación y comunicación pública de mi trabajo de investigación titulado

**“Efecto sinérgico antifúngico de la combinación de fluconazol y aceite esencial de *Syzygium aromaticum* sobre *Candida albicans*, *in vitro*”.**

En el repositorio institucional de la UCV (<http://repositorio.ucv.edu.pe/>), según lo estipulado en el decreto legislativo 822, Ley sobre Derecho de Autor, Art.33

Fundamentación en caso de no autorización:

.....  
 .....  
 .....

.....  
 Milagros Esther Luyo Hermosa  
 DNI: 42094396

Fecha: Trujillo, 13 de Marzo del 2020.

Revisó	Vicerrectorado de Investigación /DEVAC/responsable del SGC	Aprobó	Rectorado
--------	--	--------	-----------

## ANEXO: AUTORIZACIÓN DE LA VERSIÓN FINAL DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN



### UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

#### AUTORIZACIÓN DE LA VERSIÓN FINAL DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

CONSTE POR EL PRESENTE EL VISTO BUENO QUE OTORGA EL ENCARGADO DE INVESTIGACIÓN DE  
La Escuela Profesional de Medicina.

A LA VERSIÓN FINAL DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN QUE PRESENTA:

Milagros Esther Luyo Hermosa

INFORME TITULADO:

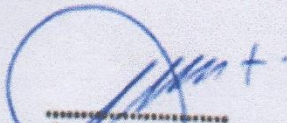
“Efecto sinérgico antifúngico de la combinación del fluconazol y aceite esencial del *Syzygium aromaticum* sobre *Candida albicans*, in vitro”.

PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

Médico Cirujano

SUSTENTADO EN FECHA: 13 de Marzo del 2020.

NOTA O MENCIÓN: 16 (Dieciséis).



.....  
Doris Rodríguez Díaz  
.....  
MEDICO CIRUJANO  
C.M.P. 46557