



Revista Médica de Trujillo

Publicación oficial de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo - Perú

Artículo Original

Eficacia antifúngica del extracto etanólico de *Eucalyptus globulus* sobre *Candida albicans* in vitro.

Antifungal efficacy of *Eucalyptus globulus* ethanolic extract on in vitro *Candida albicans*

Yvon Christina Macedo-Ramírez¹, Elva Manuela Mejía-Delgado²

1. Interna de Medicina – UPAO 2. Profesora Principal, Sección Microbiología, Departamento de Ciencias Básicas – Medicina UNT

Correspondencia.

RESUMEN

Objetivo: Evaluar la eficacia antifúngica del extracto etanólico de *Eucalyptus globulus* sobre *Candida albicans* in vitro. Material y Método: Se llevó a cabo un estudio analítico, transversal, experimental prospectivo durante 2018 en 60 placas con cepas de *Candida albicans* en la Universidad Nacional de Trujillo. La muestra, obtenida por fórmula, se dividió en 50 repeticiones para el grupo experimental y 10 para los controles. Resultados: La eficacia inhibitoria del extracto etanólico de *Eucalyptus globulus* sobre *Candida albicans* no mostró diferencia estadística significativa frente al fluconazol ($p > 0.05$). La concentración del extracto al 100% de pureza, en cuanto a susceptibilidad sobre *Candida albicans*, no mostró diferencia estadística significativa frente al fluconazol ($p > 0.05$). Conclusiones: El extracto etanólico de *Eucalyptus globulus* mostró eficacia similar al fluconazol. La susceptibilidad del extracto también fue similar al fluconazol únicamente para la concentración al 100%. Palabras Clave: *Candida albicans*, *Eucalyptus globulus*, eficacia.

SUMMARY

Objective: To evaluate the antifungal efficacy of the ethanolic extract of *Eucalyptus globulus* on *Candida albicans* in vitro. Material and Method: An analytical, cross-sectional, prospective experimental study was carried out during 2018 in 60 plates with strains of *Candida albicans* in the National University of Trujillo. The sample, obtained by formula, was divided into 50 repetitions for the experimental group and 10 for the controls. Results: The inhibitory efficacy of ethanolic extract of *Eucalyptus globulus* on *C. albicans* showed no significant statistical difference compared to fluconazole ($p > 0.05$). The concentration of the extract at 100% purity, in terms of susceptibility to *Candida albicans*, showed no significant statistical difference with fluconazole ($p > 0.05$). Conclusions: The ethanolic extract of *Eucalyptus globulus* showed efficacy similar to fluconazole. The susceptibility of the extract was also similar to fluconazole only for the 100% concentration.

Keywords: *Candida albicans*, *Eucalyptus globulus*, efficacy.

Recibido: 03/06/19

Aceptado: 21/06/19

INTRODUCCIÓN

Las infecciones vaginales son comunes en las mujeres de todas las edades y por su frecuencia destacan aquellas debidas a *Candida*, este agente patógeno se presenta aproximadamente en un tercio de las pacientes diagnosticadas con vulvovaginitis, En México, las infecciones vaginales son habituales y de acuerdo a diferentes estudios, la frecuencia de aislamiento de *Candida spp.* se estima entre 25 y 50%. *Candida albicans*, miembro de la flora normal de mucosas del aparato respiratorio, digestivo y genital femenino puede producir infección sistémica, tromboflebitis, endocarditis, infección ocular introducida por vía venosa, catéteres, agujas.^{1,2}

Es el agente causal más importante de las infecciones oportunistas por hongos y un problema creciente en todo el mundo. El género *Candida* incluye cientos de especies, de las cuales más de 40 se han recuperado de muestras humanas y están implicadas en infecciones que ponen en peligro la vida, particularmente en huéspedes inmunocomprometidos. Son una de las causas más comunes de infección del torrente sanguíneo y uno de los aislados más frecuentes de pacientes infectados en unidades de cuidados intensivos (UCI) en muchos países.³

La vulvovaginitis por *Candida* es un problema común asociado a altos índices de morbilidad. En los Estados Unidos de América (EEUU), los signos y síntomas vaginales constituyen una de las principales causas de consulta en Ginecología, con reportes de más de 10 millones al año y representa 25% de las infecciones vaginales. La prevalencia de la candidiasis vulvovaginal es mayor en mujeres obesas y aquellas con diabetes *mellitus* descompensada.⁴

Candida obtiene acceso al lumen vaginal principalmente a partir de la región perianal adyacente; los cambios en el ambiente local determinarán el inicio de la historia natural de la enfermedad. La colonización de la vagina requiere la adherencia de las levaduras a las células epiteliales por medio de mananoproteínas (adhesinas). La infección es mediada por enzimas proteolíticas, fosfolipasas y aspartil-proteinasas que son sintetizadas a partir de los genes *SAP1*, *SAP2* y *SAP3*. La capacidad de *Candida albicans* para cambiar de forma reversible entre la levadura, pseudohifas y morfologías de hifas es ampliamente conocida y es esencial para la patogenicidad en los planos superficiales y sistémicos.^(4,5) Tsai y colaboradores caracterizaron el gen *Hom6* y demostraron su participación en la síntesis de proteínas y en la adhesión celular, lo que puede representar un objetivo prometedor para el desarrollo de nuevos antifúngicos.⁵⁻⁹

En los últimos años se ha observado un mayor interés por los compuestos bioactivos producidos por organismos como las plantas, hongos y bacterias, ya que es muy probable que posean potencial farmacológico y biotecnológico.^{9,10}

Es consensuado que el desarrollo de nuevos fármacos antimicrobianos y terapias alternativas es crucial y urgente. La medicina tradicional abarca una amplia variedad de terapias y prácticas que varían entre países y entre regiones. En el África, el uso terapéutico de las plantas en las prácticas tradicionales de salud es común y extendido, antes de la introducción de los antibióticos y otros medicamentos modernos.¹⁰⁻¹²

La OMS reconoce que en la actualidad más del 80% de la población mundial utiliza la medicina tradicional como principal recurso para el

cuidado de la salud y, dentro de la medicina tradicional, las plantas son el principal elemento empleado. El Perú cuenta con una mega diversidad de plantas, de las cuales muchas son plantas medicinales cuyas partes o extractos se utilizan como drogas o medicamentos para el tratamiento de alguna afección o enfermedad que padece un individuo.^{13,14}

Se han utilizado diversas técnicas microbiológicas para demostrar la actividad antimicrobiana de plantas frente a microorganismos patógenos para el hombre. Entre ellas la utilización de extractos de plantas; es una mezcla compleja, con multitud de compuestos químicos, obtenible por procesos físicos, químicos y/o microbiológicos a partir de una fuente natural y utilizable en cualquier campo de la tecnología. Para la preparación del extracto el etanol es uno de los disolventes orgánicos más utilizados.^{15,16}

La capacidad de solubilizar una amplia variedad de sustancias, bajo precio, toxicidad relativamente baja y el hecho de ser un solvente favorable al medio ambiente están entre las propiedades más atractivas que hacen los extractos etanólicos populares. Dependiendo del método de preparación, no hay necesidad de eliminación previa de etanol. Tomando como ejemplo la técnica de desplazamiento con disolvente, el extracto etanólico se puede añadir a la fase orgánica y el disolvente se separa al final de la formación de nano partículas / nano emulsiones.¹⁶

El género *Eucalyptus*, con más de 700 especies, es una de las principales fuentes de madera dura en todo el mundo y el árbol más utilizado en las plantaciones industriales. Pertenece a la familia *Myrtaceae*, subfamilia *Leptospermoidae*, se trata de un género botánico muy rico y diverso.

El árbol es originario de Australia, Tasmania y diversas islas de la zona. De sus lugares de origen ha sido distribuido artificialmente por todo el mundo, especialmente en zonas de clima mediterráneo, subtropical y tropical. La altura del eucalipto es muy variable, existiendo eucaliptos arbóreos y otros arbustivos.^{17,18}

El tronco de los eucaliptos arbóreos puede ser recto o flexuoso. Muchas especies presentan una cepa fuertemente engrosada, formando un tubérculo leñoso de gran importancia en la regeneración y como reserva de nutrientes. La corteza del tronco adulto es un elemento importante de identificación. Puede ser de diverso color, textura, grosor y constitución; el tamaño y forma de las hojas varían con la edad, cuando jóvenes son opuestas y oblongadas; cuando maduras son lanceoladas, estrechas, encorvadas, con numerosas glándulas oleíferas, las flores son globosas y las semillas negras redondeadas.¹⁸

El eucalipto tiene muchas propiedades benéficas para la salud humana y animal así como también para el control de enfermedades causadas por hongos debido a su composición es decir sus principios activos. El principal componente del aceite esencial es el éter óxido terpénico cineol o eucaliptol, constituyendo el 70-80%.^{19,20}

Los aceites esenciales también tienen menos probabilidades de estar asociados con el desarrollo de resistencia por hongos, como se observa con fungicidas sintéticos, y son menos peligrosos para el medio ambiente y la salud humana. Por lo tanto, el uso de aceites esenciales para la prevención y el tratamiento de las infecciones ha ido ganando popularidad en el campo de la investigación durante la última década.^{21,22}

Muchos extractos de plantas y aceites esenciales tienen actividad biológica tanto in vitro como in vivo, lo que ha justificado la investigación de la medicina tradicional centrada en la caracterización de su actividad antimicrobiana. Los aceites de eucalipto actúan como fungicidas y fungicidas contra *C. albicans*. El eucalipto blanco o albar "*Eucalyptus globulus*" es la especie más frecuentemente usada de este género, a nivel mundial.^{23,24}

Los aceites esenciales del eucalipto pueden extraerse mediante varios métodos: expresión, destilación con vapor de agua, extracción con solventes volátiles, enflorado y con fluidos supercríticos. Hay al menos un aceite esencial que puede erradicar la infección fúngica de forma permanente y dentro de sólo unos pocos días.^{24,25}

Los aceites esenciales, son mezclas complejas de sustancias, generalmente conteniendo 20 a 80 compuestos, los más principales son terpenos y terpenoides que causan la inhibición del crecimiento de algunas especies de hongos como en el caso de *C. albicans*. Vratnica y col. determinaron que el principio activo de *E. globulus* es el cineol, esta planta contiene un alto contenido de 1,8-cineol. Hendry et al. probaron 1,8-cineol contra *Candida albicans*. Se describe que el *Eucalyptus* una rica fuente de productos naturales bioactivos que incluyen terpenoides, taninos, flavonoides, glucósidos cardiacos y derivados de floglucinol.^{26, 27,28}

El aceite esencial de *Eucalyptus* se puede obtener de varias partes diferentes de la planta, sin embargo, la mayor concentración de aceite esencial de *Eucalyptus* se ha encontrado en las hojas. Se ha analizado las hojas de eucalipto por cromatografía de gases y reportaron monoterpenos como agentes antimicrobianos principales de la planta.²⁹⁻³³

Alzamora L, et al en un estudio acerca de la actividad antimicrobiana in vitro de los aceites esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas utilizo aceite de *Eucalyptus globulus* obtenido por método de destilación por arrastre de vapor sobre *Candida spp* observando una zona de inhibición de 14 mm, encontrando así que la *Candida albicans* es sensible frente a este aceite esencial. Damjanovic B. Y col Su objetivo fue determinar la actividad antimicrobiana del aceite esencial del *Eucalyptus globulus* Labill. La composición química del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* Labill., crecido en Montenegro, se analizó por gas, se evaluó la cromatografía de espectrometría de masas y su actividad antimicrobiana contra 17 microorganismos.^{34,35}

El rendimiento del aceite esencial fue del 1,8% (w / w) en la base del peso fresco, mientras que el análisis resultó en la identificación de un total de 11 constituyentes, 1,8 cineol (85,8%), α -pineno (7,2%), y β -mirceno (1,5%) son los componentes principales. Las pruebas de actividad antimicrobiana ha revelado que el aceite esencial de *E. globulus* tiene lugar una fuerte actividad antimicrobiana, especialmente contra *Candida albicans*. Martins N et al. El extracto de *Eucalyptus globulus* también presentó un potencial antifúngico significativo, siendo eficaz contra diecisiete cepas de *Candida albicans* (diámetro de halo entre 9-21 mm).³⁶

Rodríguez B Y Col. Estudiaron la actividad antifúngica in vitro de *Eucalyptus globulus* sobre *Candida sp*. Se preparó extractos etanólicos y se reactivaron los cultivos de *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida albicans* y *Candida sp.*, los extractos y cultivos fueron enfrentados mediante la prueba de difusión en disco. se encontraron halos de inhibición (16 mm) que evidenciaron el antagonismo producido. El análisis estadístico determinó que no hay

diferencias significativas ($p > 0.05$) de los extractos etanólicos de eucalipto y antifúngicos sobre *Candida* sp. Es decir tienen actividad antifúngica, sobre *Candida* sp.³⁷

Material y método:

Diseño del estudio:

Tipo: Analítico, transversal, prospectivo.
Diseño específico: Experimental.

Recolección de la muestra.

Se recolectó 1 Kg de hojas de eucalipto por la mañana, del distrito de Otuzco, provincia Otuzco, región La libertad, durante el mes de febrero del año 2018.

Un ejemplar completo de la planta se llevó al Herbarium Truxillense de la Universidad Nacional de Trujillo para su identificación y posterior verificación taxonómica.

Preparación de la muestra vegetal.

Selección: la muestra vegetal recolectada fue transportada al laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo, en donde se seleccionaron las hojas que estuvieron en buenas condiciones y se eliminaron las sustancias extrañas presentes en la muestra.

Lavado y desinfección: Luego se procedió a lavar las hojas con agua destilada, seguido de una desinfección, utilizando hipoclorito de sodio al 0.5 %. Posteriormente se realizó un enjuague de la hoja con suficiente agua destilada estéril, esto es para retirar los residuos de hipoclorito.

Secado: Las hojas de eucalipto fueron colocadas sobre papel Kraft y sometidas a secado primero a temperatura ambiente por 24 horas, luego en

la estufa de circulación de aire a una temperatura de 40°C.

Pulverización: Una vez secadas las hojas de eucalipto, estas se pulverizaron con ayuda de un molino.

Tamizaje: Los polvos obtenidos fueron tamizados utilizando el tamiz 0.7.

Almacenamiento: Los polvos de las hojas de eucalipto obtenidos fueron guardados en un frasco de vidrio de color ámbar de boca ancha.

Preparación del extracto etanólico

Se pesaron con exactitud 300 g de polvo de eucalipto, previamente tamizados. Luego se colocaron en frascos de vidrio de color ámbar de boca ancha, de capacidad de 1 litro y se añadió etanol al 70° G.L. (Gay Lussac), cantidad suficiente hasta cubrir la muestra por sobre 2 cm de altura. Se mezcló bien, teniendo en cuenta que la mezcla debía ocupar como máximo las $\frac{3}{4}$ partes del recipiente. Se taparon los recipientes y se maceraron por 7 días, agitándose 15 minutos, dos veces al día.

Transcurrido el tiempo de maceración, se filtraron los macerados, al vacío con papel de filtro Whatman N° 1. Las soluciones resultantes fueron llevadas a sequedad en una cámara de secado al vacío a una presión reducida y a una temperatura de 40 °C; luego se pesaron los residuos secos (en total 26.1 gr) y se guardaron en refrigeración a 2 °C en frasco de vidrio de color ámbar estéril. A partir de estos residuos secos, se prepararon las concentraciones de 5%, 25%, 50%, 75%, 100% disueltas en etanol de 70° G.L. (Gay Lussac) respectivamente. Finalmente, los extractos etanólicos fueron guardados en frascos de vidrio de color ámbar y en refrigeración (4-8°C) hasta su posterior utilización.⁽³⁹⁾

Cepa Fúngica

La cepa de *Candida* se obtuvo del cepario del laboratorio de la Sección Microbiología de la Facultad de Medicina de la UNT, para confirmar la especie se empleó el medio agar Sabouraud y las pruebas de confirmación como la prueba de los tubos germinales. Una vez identificada cada cepa como *Candida albicans* fue conservada en tubos con agar Sabouraud hasta la realización del trabajo experimental.

Preparación del inóculo:

Método de suspensión directa de colonias:

El método de suspensión directa de colonias es el más adecuado para la preparación del inóculo.

(1) Se preparó el inóculo haciendo un cultivo en solución salina de las colonias aisladas seleccionadas de una placa de agar Sabouraud después de 18 a 24 horas de incubación.

(2) Se ajustó la turbidez de la suspensión hasta que fuera equivalente al estándar 0,5 de la escala de McFarland. Se obtuvo así una suspensión con aproximadamente de 1.5×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC)/ml para *Candida albicans*. Para realizar este paso con exactitud, se utilizó una luz adecuada para comparar el tubo del inóculo con el estándar 0,5 de McFarland frente a una tarjeta de fondo blanco y líneas negras.

Prueba de efectividad antifúngica: Mediante la técnica de Kirby y Bauer

Inoculación de las placas

(1) Dentro de los 15 minutos después de haber ajustado la turbidez de la suspensión del inóculo, se sumergió un hisopo de algodón estéril en la suspensión ajustada. Se rotó el hisopo varias veces y presionó firmemente por

las paredes internas del tubo por encima del nivel del líquido. Este procedimiento eliminó el exceso de líquido del hisopo.

(2) Se inoculó la superficie seca de una placa de agar Sabouraud estriando con el hisopo toda la superficie del agar estéril. Se repitió el procedimiento estriando dos veces más el hisopo, rotando la placa aproximadamente 60° cada vez para asegurar una distribución homogénea del inóculo. Como paso final, se debió estriar el hisopo por el borde del agar.

(3) Se incubó en estufa, la tapa se dejó entreabierta durante tres a cinco minutos, pero no más de 15 minutos, para permitir que el exceso de humedad de la superficie se absorbiera antes de aplicar los discos impregnados con el antibiótico.

Determinación del efecto antifúngico.

Se estableció mediante la difusión de discos de Kirby y Bauer, el cual consiste en preparar discos de papel de filtro estériles, los cuales fueron sumergidos dentro de cada concentración de *E. globulus*: 5, 25, 50%, 75% y 100% por el periodo no menor de 1 hora, luego con una aguja estéril, éstos se colocaron sobre los cultivos de *Candida albicans* en las placas petri previamente preparadas; las placas se mantuvieron en la misma posición por un periodo de 5 minutos. Luego de este tiempo las placas se voltearon de posición y se incubaron a 37° C, durante 24 horas. Todo el procedimiento se llevó a cabo dentro del diámetro de 10 cm de la llama de un mechero.

La lectura de los resultados, se llevó a cabo después de las 24 horas, mediante la inspección visual de cada placa. Se efectuó tomando el registro en milímetro de los halos de inhibición del crecimiento de *Candida albicans*.

Concentración inhibitoria mínima:

Los tubos experimentales con 05 de extracto etanólico de *Eucalyptus globulus* al 5%, 25%, 50%, 75% y 100 a los cuales se les adicionó la 05 de la solución preparada de *C. albicans*. Los controles estuvieron constituidos por:

- a) *Candida albicans* y fluconazol
- b) *Candida albicans* sin ningún tratamiento

Todos los tubos se incubaron a 37°C por 24 horas. Los resultados se observaron mediante la turbidez. Colocándose los resultados mediante cruces. (Una + ligera turbidez, ++ turbidez media y +++ alta turbidez). (Anexo 14)

Para determinar el efecto fungicida de cada uno de los tubos se sembró 0.1 mL en placas con agar sabraud y dispersando la muestra con asa de Driglasky en toda la superficie de la placa, incubándose posteriormente en la estufa a 37°C por 24 horas; luego de lo cual se contabilizaron las colonias en cada una de las placas dando los resultados en unidades formadoras de colonias por mililitro: UFC/mL.

La técnica de recolección de datos para todo el experimento fue la observación sistemática, los datos se registraron en la ficha de recolección de datos que se constituyó en nuestro instrumento.

Análisis de datos:

El procesamiento de la información fue automático en un equipo de cómputo Windows 8.1 Pro @2013 Microsoft Corporation. Se utilizó el paquete estadístico **SPSS** (Statistical Package for the Social Science) V24.0 -13 de junio 2016.

Estadística descriptiva: Para analizar la información se construyeron tablas de distribución de frecuencias de una entrada con sus valores absolutos. Se calculó su media y su desviación estándar.

Estadística analítica: Para determinar el efecto in vitro del extracto etanólico de *Eucalyptus globulus* sobre *Candida*, se aplicó estadística descriptiva a base de media y desviación estándar. Además se calculó la prueba t de diferencia de medias tomando en consideración el valor p obtenido, el cual se consideró significativo si se detectó menor a 0.05.

2.6 Aspectos éticos:

El presente estudio contó con la autorización de la Escuela de Medicina de la Universidad Privada Antenor Orrego, en concordancia con las recomendaciones establecidas en la declaración de Helsinki, adoptada por la 18ª Asamblea Médica Mundial en Helsinki, Finlandia, Junio 1964 y modificada por la Asamblea Médica Mundial en Tokio, enero 2004. (40)

Sin embargo en el presente trabajo se respetó el principio ético adoptado en el capítulo 6 del código de ética del Colegio Médico del Perú titulado: "Del trabajo de investigación", específicamente el 6 Art. 48º, donde se considera la veracidad en la publicación de los resultados obtenidos en el estudio. Así mismo, se tuvieron en cuenta los principios de bioseguridad correspondiente a trabajos in vitro. (41).

RESULTADOS

Tabla N°1 La CMI del extracto etanólico de *E. globulus* frente a *Candida albicans* fue al 5%, ya que no se observó turbidez lo mismo ocurrido con todas las demás concentraciones del extracto utilizadas, tampoco se observó turbidez en el control de *Candida albicans* con fluconazol, en cambio se encontró alta turbidez en los tubos de *Candida albicans* sin tratamiento, la turbidez indica crecimiento de dicho microorganismo.

Tabla N°2 No se encontraron unidades formadoras de colonias en ninguna de las concentraciones del extracto etanólico de *Eucalyptus globulus* frente a *Candida albicans*, pero si se observaron UFC en el control de *Candida albicans* sin tratamiento 10^5 UFC/levaduras por mL.; estadísticamente la prueba t entre el extracto y el control de *Candida albicans* con fluconazol mostró un valor p de 0.63 lo que indicaría que no hay diferencia significativa entre el extracto y el grupo control mencionado.

Tabla N°3 Según los resultados, las concentraciones del extracto etanólico correspondientes a 5%, 25% 50% y 75% estadísticamente fueron inferiores a $p < 0.05$, es decir si hubo diferencia estadística frente al grupo control con fluconazol. Sólo la concentración al 100% mostró un valor $p > 0.05$, es decir no hubo diferencia estadística al compararse con el grupo control de fluconazol.

TABLA N°1: CONCENTRACIÓN MINIMA INHIBITORIA DEL EXTRACTO ETANÓLICO de *Eucalyptus globulus* SOBRE *Candida albicans* IN VITRO SEGÚN CONCENTRACIÓN

EFICACIA							
TURBIDEZ N° DE TUBO	GRUPO EXPERIMENTAL (EXTRACTO ETANÓLICO)					GRUPOS DE CONTROL	
						C. albicans CON FLUCONAZOL (2mg/mL)	C. albicans SIN TRATAMIENTO
	5%	25%	50%	75%	100%	CMI	CMI
1	-	-	-	-	-	-	+++
2	-	-	-	-	-	-	+++
3	-	-	-	-	-	-	+++
4	-	-	-	-	-	-	+++
5	-	-	-	-	-	-	+++
6	-	-	-	-	-	-	+++
7	-	-	-	-	-	-	+++
8	-	-	-	-	-	-	+++
9	-	-	-	-	-	-	+++
10	-	-	-	-	-	-	+++

CMI= CONCENTRACIÓN MINIMA INHIBITORIA

TABLA N°2: EFICACIA INHIBITORIA DEL EXTRACTO ETANÓLICO de *Eucalyptus globulus* SOBRE *Candida albicans* IN VITRO SEGÚN CONCENTRACIÓN

N° DE PLACA	EFICACIA					
	GRUPO EXPERIMENTAL (EXTRACTO ETANÓLICO) *					GRUPO CONTROL (FLUCONAZOL)†
	5%	25%	50%	75%	100%	(2mg/mL)
	UFC‡					UFC‡
1	0	0	0	0	0	8
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	6
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0

*Prueba $t=0.000$; $p=1.000$
 *† Prueba $t=0.662$; $p=0.63$
 ‡Unidad formadora de colonias/ml.

Fuente: Resultados de laboratorio obtenidos por observación sistemática para el extracto etanólico de *Eucalyptus globulus* y grupo control, 2018.

TABLA N°3: SUSCEPTIBILIDAD de *Candida albicans* FRENTE AL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Eucalyptus globulus*, MEDIANTE LA TÉCNICA DE KIRBY-BAUER

N° DE PLACA	SUSCEPTIBILIDAD					GRUPO CONTROL (FLUCONAZOL 2mg/mL) LONGITUD DEL HALO * (mm)
	GRUPO EXPERIMENTAL (EXTRACTO ETANÓLICO)					
	LONGITUD DEL HALO *(mm)					
	5% [†]	25% [‡]	50% [§]	75%	100%	
1	6	10	14	13	16	16
2	6	10	12	13	20	20
3	6	13	10	13	18	16
4	6	13	13	13	20	20
5	6	13	11	15	20	22
6	6	13	11	15	20	23
7	6	10	13	12	18	20
8	6	10	19	15	17	20
9	6	10	14	15	14	20
10	6	10	14	15	11	22

* En milímetros. [†]p= 0.000 [‡]p= 0.000 [§]p= 0.0000 ^{||}p= 0.000 ^{|||}p= 0.052
Rango del grupo experimental: 6-20
Rango del grupo control: 16-23

Fuente: Resultados de laboratorio obtenidos por observación sistemática para el extracto etanólico de *Eucalyptus globulus* y grupo control, 2018.

DISCUSIÓN

Esta investigación determinó la eficacia antifúngica del extracto etanólico de *Eucalyptus globulus* sobre *Candida albicans* in vitro a partir de una investigación experimental llevada a cabo en el laboratorio de Microbiología, de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo, durante febrero a mayo del 2018. El agente patógeno que constituyó el motivo del experimento se reconoce en la literatura médica como causa principal de infecciones por hongos, además de reportar un incremento constante de infecciones a nivel mundial³. Si bien es cierto las infecciones que produce pueden tratarse médicamente con antifúngicos tanto tópicos como sistémicamente, se reporta una pérdida de la eficacia de estos fármacos⁸, lo que llevó a considerar al *Eucalyptus globulus* como alternativa, tomando en consideración que Gonza y cols. mencionan sus propiedades benéficas en la salud del ser humano²⁰. Cabe precisar también que, para el experimento fue necesario comprobar la eficacia de la planta en forma de extracto etanólico frente a un antifúngico de aplicación

común como lo es el fluconazol, además de evaluar dicha eficacia según distintas concentraciones del extracto preparadas en laboratorio.

El procedimiento experimental se completó sin registrar pérdida de placas, por lo que las 60 consideradas inicialmente en el estudio fueron analizadas e incluidas en la investigación. Como ya se ha mencionado 10 de ellas constituyeron el grupo control que recibieron fluconazol. La recolección de los datos por medio de la observación sistemática fue realizada sin aplicación de alguna técnica de enmascaramiento, ya que el mismo profesional que se encargó de la aplicación de procedimientos fue el responsable de su lectura y registro por limitación de recursos para llevar a cabo el trabajo. Así mismo no se consideró un conjunto de placas con placebo por la misma razón. El resultado obtenido refleja apropiadamente lo observado en las placas estudiadas, aunque por el tamaño y la ausencia de un grupo testigo debemos reconocer limitación de los resultados obtenidos. Aun así, al tomar en cuenta un grupo de placas que

recibieron fluconazol, los resultados pueden marcar el inicio de investigaciones más completas que confirmen nuestros hallazgos.

Dentro de nuestros hallazgos se estableció la eficacia inhibitoria del extracto etanólico de *Eucalyptus globulus* sobre *Candida albicans* según concentración. Si bien es cierto nuestro primer objetivo era determinar la concentración mínima inhibitoria del extracto en estudio, no fue necesario presentar un resultado estadístico sobre esto debido a que, independientemente de la concentración, la observación sistemática arrojó que en ninguna se identificó turbidez. Es así que presentamos la primera tabla para responder al primer objetivo directamente mientras que para responder estadísticamente al segundo objetivo presentamos la segunda tabla, el cual mostró la comparación del extracto etanólico según diferentes concentraciones frente al grupo control, es decir, el que recibió fluconazol. Es así que las comparaciones se hicieron de dos formas, la primera para establecer que, por deducción lógica, no había diferencia en las unidades formadoras de colonias entre las diversas concentraciones por ser de cero unidades en todos los casos y, la segunda, comparando el promedio identificado en el extracto frente al promedio obtenido por fluconazol, que tampoco mostró diferencia estadística significativa, lo que nos permitió considerar que la eficacia de la planta en estudio fue similar al fármaco.

En la tabla N°3 se estableció la susceptibilidad de *Candida albicans* al extracto etanólico de *Eucalyptus globulus* mediante la técnica de Kirby-Bauer. Para ello se necesitó medir el diámetro de los halos de inhibición en milímetros. Así se pudo observar que, en el caso del grupo experimental del extracto se logró identificar diámetros del halo entre 6 a 20 mm., mientras que para el caso del grupo control con fluconazol el rango comprendió de 16 a 23 mm. Estos resultados pueden compararse con la investigación de Alzamora y cols.³⁴ quienes encontraron una zona de inhibición de 14 mm. Si bien el rango del presente estudio, abarca un

diámetro menor con la concentración al 5% del extracto etanólico de *Eucalyptus globulus*, el valor máximo supera lo observado por dicho investigador. El resultado puede compararse de manera individual ya que, dependiendo de la concentración, los diámetros del halo se incrementaron. Dicha investigación coincide con lo que observamos ya que se confirma susceptibilidad al extracto. El resultado guarda similitud también con lo reportado por Martins y cols.³⁶ De manera general, al sumar todas las concentraciones del extracto se apreció un promedio general de 12.32 mm lo que indica sensibilidad de *Candida albicans* al extracto etanólico de *Eucalyptus globulus*, mientras que para fluconazol fue de 19.9 mm. Para conocer si las diferentes concentraciones de la planta investigada mostraban diferencia estadística con el fluconazol se determinó por diferencia de medias un valor p el cual fue significativo en concentraciones del 5 al 75%, lo cual sugirió superioridad del fluconazol. Sin embargo, al compararse con la concentración al 100%, no hubo diferencia con el fármaco, lo cual permite considerar que la susceptibilidad es similar en ambos.

Nuestra investigación no incluyó variables adicionales, se tomaron en cuenta criterios de selección y se mostró rigurosidad en los procedimientos del experimento, no se identificaron variables intervinientes que pudieran afectar el resultado.

Nuestro trabajo cumplió con los objetivos propuestos y consideramos que el resultado es relevante además sugerir la ejecución de investigaciones más amplias con un grupo testigo adicional además de enfocarse en una concentración del extracto al 100%.

Dentro de las limitaciones se ha mencionado previamente que no utilizamos un placebo y la comparación fue directa con el grupo que recibió fluconazol. Sin embargo, el procedimiento se llevó a cabo con todas las recomendaciones técnicas, mismas que fueron realizadas por un profesional del área de laboratorio.

CONCLUSIONES

1. Todas las concentraciones del extracto etanólico de *Eucalyptus globulus* mostraron eficacia inhibitoria frente a *Candida albicans*.
2. No se identificó diferencia estadística significativa de las concentraciones frente al fluconazol ($p=0.63$) en cuanto a las unidades formadoras de colonias.
3. No hubo diferencia en la susceptibilidad de *Candida albicans* frente al extracto etanólico de *Eucalyptus globulus* al 100% con respecto al fluconazol.

SUGERENCIAS

1. Se sugiere tomar en consideración los resultados obtenidos para favorecer estudios más amplios tomando en consideración la concentración al 100% de la planta.
2. Debería considerarse la investigación animal, en el caso de obtener resultados positivos con estudio más amplios.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pineda-Murillo Javier, Cortés-Figueroa Arturo Ángel, Uribarren-Berrueta Teresita del Niño Jesús, Castañón-Olivares Laura Rosio. Candidosis vaginal. primera parte: revisión de la clínica, epidemiología y situación de México. Revista médica Risaralda. 2015; 21(1):58-63
2. Eduardo J. Muñoz Ganoza Aislamiento de *Candida albicans* de mujeres con candidiasis vaginal atendidas en el Hospital Regional Docente de Trujillo-Perú, 2012. Revista Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú. Vol 32, N° 1, Enero-Junio, 2012, pp. 44-103
3. Tejas R, Padalia H, Chanda S. The potential of plant extracts against multidrug resistant *Candida* species- A review. The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs (A. Mendez-Vilas, Ed.) 2015: 246-255
4. M. C. Javier Pineda-Murillo Candidosis vaginal. primera parte: revisión de la clínica, epidemiología y situación de México. Rev. Méd. Risaralda 2015; 21 (1): 58-63
5. Lee JE, Oh JH, Ku M, Kim J, Lee JS, Kang SO. Ssn6 has dual roles in *Candida albicans* filament development through the interaction with Rpd31. FEBS Lett. 2015 Feb 13;589(4):513-20. doi: 10.1016/j.febslet.2015.01.011.
6. Lu Y, Su C, Liu H. *Candida albicans* hyphal initiation and elongation. Trends Microbiol. 2014;22(12):707-714. doi:10.1016/j.tim.2014.09.001.
7. Tsai PW, Chien CY, Yeh YC, Tung L, Chen HF, Chang TH, et al. *Candida albicans* Hom6 is a homoserine dehydrogenase involved in protein synthesis and cell adhesion. J Microbiol Immunol Infect. 2016 Mar 31. pii: S1684-1182(16)30022-6. doi: 10.1016/j.jmii.2016.03.001.
8. López K. , Lugo C. , Arias J. , Zavala J. Mecanismos de resistencia antifúngica de los azoles en *Candida albicans*. Una revisión Rev Biomed 2016; 27:127-136
9. Dezzi Ş, Bădărău A, Bischin C, Vodnar D, Silaghi-Dumitrescu R, Gheldiu A et al. Antimicrobial and Antioxidant Activities and Phenolic Profile of *Eucalyptus globulus* Labill. and *Corymbia ficifolia* (F. Muell.) K.D. Hill & L.A.S. Johnson Leaves. Molecules. 2015;20(12):4720-4734.
10. Vieira M, Bessa L, Martins M, Arantes S, Teixeira A, Mendes Â et al. Chemical Composition, Antibacterial, Antibiofilm and Synergistic Properties of Essential Oils from *Eucalyptus globulus* Labill. and Seven Mediterranean Aromatic Plants. Chemistry & Biodiversity. 2017;:e1700006
11. Gonzales M, Ramirez D.: Antecedentes y situación reguladora de la medicina herbaria en Cuba. U.A. E. M. 2013 – 45(3): 36 – 45
12. Tshivhase V, Njinga R, Mathuthu M, Dlamini T. Transfer Rates of ²³⁸U and ²³²Th for *E. globulus*, *A. mearnsii*, *H. filipendula* and Hazardous Effects of the Usage of Medicinal Plants From Around Gold Mine Dump Environs. International Journal of Environmental Research and Public Health. 2015;12(12):15782-15793.
13. Maria I. Etno-farmacología en Iberoamérica, una alternativa a la globalización de las prácticas de cura. Instituto de Investigaciones Científicas Tropicales. Programa de Desarrollo Global. Estudios de Etno-Desarrollo en América Latina, África, Asia y Pacífico. Cuadernos Geográficos, 41 (2007-2), 61-95
14. Organización mundial de la salud. Temas de salud. Medicina tradicional. 2009 OMS.
15. Gabriela I. Yáñez A.1 y J. Ramiro Velasteguí S. Investigación De La Actividad Antimicrobiana Y Fitoquímica De Extractos De Plantas Medicinales Frente A Los Microorganismos Patógenos *Escherichia coli* y *Candida albicans*, 2012 (2)
16. Zorzi G, Carvalho E, von Poser G, Teixeira H. On the use of nanotechnology-based strategies for association of complex matrices from plant extracts. Revista Brasileira de Farmacognosia 25 (2015) 426–436
17. Oliveira L, Breton M, Bastolla F, Camargo S, Margis R, Frazzon J et al. Reference Genes for the Normalization of Gene Expression in *Eucalyptus* Species. Plant and Cell Physiology. 2011;53(2):405-422.
18. Mena Zablach, Marina Lilian. “Estudio sobre las propiedades antifúngicas de aceite de *Eucalyptus globulus* (Eucalipto) en *Cándida albicans*”. El Salvador. Facultad de Química y Farmacia. Universidad de El Salvador. 2012. Páginas: 3,6,20,21,25 y 26.
19. Ben Hassine D, Abderrabba M, Yvon Y, Lebrihi A, Mathieu F, Couderc F et al. Chemical Composition and in

- Vitro Evaluation of the Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Eucalyptus gillii* Essential Oil and Extracts. *Molecules*. 2012;17(12):9540-9558.
20. Gonza K., López E., Zavaleta C., Cruz J. y Mendoza W. Efecto biofungicida de *Trichoderma harzianum* y de extractos de *Eucalyptus globulus*, *Rosmarinus officinalis* y *Ricinus communis* sobre *Rhizoctonia solani*. REBIOLEST. Revista Científica de Estudiantes 1 (1): 43 - 48 Facultad de Ciencias Biológicas - Universidad Nacional de Trujillo - Enero-Junio, 2013
 21. López-Meneses A, Plascencia-Jatomea M, Lizardi-Mendoza J, Rosas-Burgos E, Luque-Alcaraz A, Cortez-Rocha M. Antifungal and antimycotoxigenic activity of essential oils from *Eucalyptus globulus*, *Thymus capitatus* and *Schinus molle*. 2017 (1)
 22. Tyagi A, Malik A. Liquid and vapour-phase antifungal activities of selected essential oils against *Candida albicans*: microscopic observations and chemical characterization of *Cymbopogon citratus*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2010;10:65
 23. Agarwal V, Lal P, Pruthi V. Effect of Plant Oils on *Candida albicans*. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2010;43(5):447-451.
 24. Moreno J, López G, Siche R. Modeling and optimization of extraction process of eucalyptus essential oil (*Eucalyptus globulus*). *Scientia agropecuaria*. 2010;Vol 1:147-154.
 25. Buckle J. Women's Health. *Clinical Aromatherapy*. 2015;:373-394.
 26. Barbosa L, Filomeno C, Teixeira R. Chemical Variability and Biological Activities of *Eucalyptus* spp. Essential Oils. *Molecules*. 2016;21(12):1671.
 27. Assessment report on *Eucalyptus globulus* Labill., *Eucalyptus polybractea* R.T. Baker and/or *Eucalyptus smithii* R.T. Baker, aetheroleum, Based on Article 16d(1) 25 March 2014
 28. Elansary H, Salem M, Ashmawy N, Yessoufou K, El-Settawy A. In vitro antibacterial, antifungal and antioxidant activities of *Eucalyptus* spp. leaf extracts related to phenolic composition. *Natural Product Research*. 2017;VOL. 31, NO. 24, 2927-2930:1-4.
 29. Martins C, Natal-da-Luz T, Sousa JP, Goncalves MJ, Salgueiro L, et al. (2013) Effects of Essential Oils from *Eucalyptus globulus* Leaves on Soil Organisms Involved in Leaf Degradation. *PLoS ONE* 8(4): e61233. doi:10.1371/journal.pone.0061233
 30. Zhou L, Li F, Huang L, Yang Z, Yuan S, Bai L. Antifungal Activity of *Eucalyptus* Oil against Rice Blast Fungi and the Possible Mechanism of Gene Expression Pattern. *Molecules*. 2016;21(5):621.
 31. Mohammad Bokaeian, Alireza Nakhaee, Bitá Moodi and Hossein Ali Khazaei *Eucalyptus globulus* (*Eucalyptus*) Treatment of Candidiasis in Normal and Diabetic Rats 2013.
 32. Mekonnen A, Yitayew B, Tesema A, Taddese S. In Vitro Antimicrobial Activity of Essential Oil of *Thymus schimperi*, *Matricaria chamomilla*, *Eucalyptus globulus*, and *Rosmarinus officinalis*. 2017.
 33. Bey-Ould Si Said Z, Haddadi-Guemghar H, Boulekbache-Makhlouf L, Rigou P, Remini H, Adjaoud A et al. Essential oils composition, antibacterial and antioxidant activities of hydrodistilled extract of *Eucalyptus globulus* fruits. *Industrial Crops and Products*. 2016;89:167-175.
 34. Alzamora L, Morales L, Armas L, Fernández G. Medicina Tradicional en el Perú: Actividad Antimicrobiana in vitro de los Aceites Esenciales Extraídos de Algunas Plantas Aromáticas. *Anales de la Facultad de Medicina*. 2014;62(2):156.
 35. Damjanovic et al. Antimicrobial effect of essential oil isolated from *Eucalyptus globulus* Labill. from Montenegro. *Czech Journal of Food Sciences*, 2011, 29(3): 277- 284.
 36. Martins N, Ferreira I, Barros L, Carvalho A, Henriques M, Silva S. Plants used in folk medicine: The potential of their hydromethanolic extracts against *Candida* species. *Industrial Crops and Products*. 2015;66:62-67.
 37. Rodríguez B. Eficacia antifúngica in vitro de *Uncaria tomentosa* frente a *Eucalyptus globulus* sobre *Candida* sp. [Tesis] Universidad privada anterior Orrego; 2016
 38. Duraffourd C. Iapraz J. Cuaderno de Fitoterapia Clínica. Editorial Masson; Francia 1986. 1° Ed.
 39. Miranda M. Métodos de análisis de drogas y extractos. Universidad Nacional Ciudad de la Habana, Cuba. 2002.
 40. Mazzanti M. Declaración de Helsinki. *Revista colombiana de bioética*. 2001; vol. 6, núm. 1
 41. Colegio Médico del Perú. Código de Ética y Deontología. Lima [Perú]: CMP; 2007.

Citar como: Macedo-Ramírez YC, Mejía-Delgado EMEficacia antifúngica del extracto etanólico de *Eucalyptus globulus* sobre *Candida albicans* in vitro. *Rev méd Trujillo* 2019;14(2):79-91