



UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
NÚCLEO DE SUCRE  
ESCUELA DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE *Rosmarinus officinalis* (ROMERO) y *Melissa officinalis* (TORONJIL) CONTRA ESPECIES DEL GÉNERO *Candida*, AISLADAS DE PACIENTES CON VULVOVAGINITIS  
(Modalidad: Tesis de Grado)

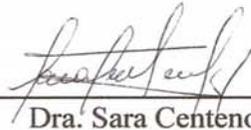
Greisy Carolina Márquez Ruiz

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOANÁLISIS

Cumaná, 2012

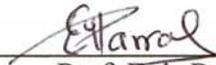
ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE *Rosmarinus officinalis* (ROMERO) y *Melissa officinalis* (TORONJIL) CONTRA ESPECIES DEL GÉNERO *Candida*, AISLADAS DE PACIENTES CON VULVOVAGINITIS

APROBADO POR:



---

Dra. Sara Centeno  
Asesora



---

Prof. Evis Parra  
Jurado Principal



---

Prof. Josefa Díaz  
Jurado Principal

## ÍNDICE

DEDICATORIA .....	i
AGRADECIMIENTO .....	ii
LISTA DE TABLAS .....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
RESUMEN .....	v
INTRODUCCIÓN .....	1
METODOLOGÍA .....	9
Obtención de las muestras.....	9
Procesamiento de las muestras.....	9
Formación de clamidoconidios .....	10
Filamentación en suero .....	10
Obtención de los extractos de <i>Rosmarinus officinalis</i> y <i>Melissa officinalis</i> .....	11
Plantas.....	11
Extracción etanólica .....	11
Suspensión de células.....	12
Actividad antifúngica.....	12
Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).....	13
Análisis estadístico.....	13
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	1
CONCLUSIONES .....	26
RECOMENDACIONES.....	1
BIBLIOGRAFÍA .....	1
HOJAS DE METADATOS .....	35

## DEDICATORIA

A

Dios Todopoderoso por darme la vida, la fuerza para superar todos los obstáculos que se me han presentado y por ser mi guía y bendecir cada paso que doy en este largo camino que aún no termina.

Mis padres Eloina Ruiz y Alejandro Márquez, por ser pilares fundamentales en mi formación, por enseñarme que con humildad, respeto, esfuerzo y dedicación se pueden alcanzar las metas propuestas. Además por ayudar a levantarme y darme ánimos en los momentos que más lo necesite. Este triunfo también es de ustedes. Por eso padres LOS AMO.

Mi familia por estar siempre a mi lado, por creer en mí y apoyarme en cada momento, porque con esfuerzo y dedicación todo se puede.

Mi novio Félix José Morey Sanzonetty porque desde que llegó a mi vida ha estado allí en las buenas y malas llenándola de amor, cariño y felicidad; además, me ha dado apoyo y ánimos para alcanzar todas mis metas.

Las familias Vargas Pico, Henríquez Acuña y a las señoras Ana Arenas y Rosa Bello, por acogerme en sus hogares, aceptarme como otro miembro más y apoyarme durante la realización de esta carrera profesional.

Mis amigos por docena (Alba, Asdays, Uslany, Marbella, Lérida, Armileidys, Johan, Zamara, Henry, Cecilia y Javier) quienes con sus dificultades, defectos, virtudes y saberes han estado allí en las buenas y malas como una gran familia, apoyándonos siempre. Nunca cambien amigos y futuros colegas.

## **AGRADECIMIENTO**

A

La Dra. Sara Centeno por haber aceptado ser mi asesora en este trabajo, quien con sus conocimientos, consejos y a veces hasta regaños me ha formado para que sea cada día mejor persona y sobre todo una gran profesional.

Mi amiga Luz Salazar por la inmensa ayuda prestada en el Laboratorio de Investigaciones Microbiológicas del Departamento de Bioanálisis durante el procesamiento de las muestras para la realización de este trabajo.

Dr. Fernando Boada por su colaboración y ayuda en la toma de las muestras de secreción vaginal necesarias para el desarrollo de este trabajo; así mismo, agradezco a todas las pacientes que voluntariamente aceptaron donar sus muestras.

Todos los profesores que me llenaron con sus conocimientos y me enseñaron que vale la pena luchar por sus sueños, y que si decaía, lo más importantes era levantarme y seguir adelante. Siempre serán mis ejemplos a seguir.

Todas y cada una de las personas que pusieron su granito de arena para que este trabajo se llevara a cabo de una manera satisfactoria.

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Especies del género <i>Candida</i> aisladas de pacientes con vulvovaginitis.....	14
Tabla 2. Halos de inhibición producidos por el extracto acuoso de <i>Rosmarinus officinalis</i> (Romero) y <i>Melissa officinalis</i> (Toronjil) contra <i>Candida albicans</i> , <i>Candida parapsilosis</i> y <i>Candida famata</i> , aisladas de pacientes con vulvovaginitis .....	18
Tabla 3. Concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto acuoso de <i>Rosmarinus officinalis</i> (Romero) frente a <i>Candida albicans</i> , <i>Candida parapsilosis</i> y <i>Candida famata</i> , aisladas de pacientes con vulvovaginitis .....	21
Tabla 4. Concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto acuoso de <i>Melissa officinalis</i> (Toronjil) frente a <i>Candida albicans</i> , <i>Candida parapsilosis</i> y <i>Candida famata</i> , aisladas de pacientes con vulvovaginitis .....	23

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Plantas utilizadas para la obtención de los extractos. A: Romero; B: Toronjil.	11
Figura 2. Cultivo micológico de muestra tomada de paciente con sintomatología de vulvovaginitis.....	15
Figura 3. Examen directo de muestra tomada de paciente con sintomatología de vulvovaginitis.....	15
Figura 4. Formación de clamidoconidios y tubos germinativos por <i>Candida albicans</i> . A: clamidoconidios. B: Tubos germinativos. ....	16
Figura 5. Galería API 20C AUX para la identificación de levaduras. Asimilación de carbohidratos por <i>Candida albicans</i> . ....	16
Figura 6. Actividad antifúngica del extracto de <i>Rosmarinus officinalis</i> (Romero) contra <i>Candida albicans</i> . A: Control; B: <i>Candida albicans</i> .....	19
Figura 7. Actividad antifúngica del extracto de <i>Rosmarinus officinalis</i> (Romero) contra <i>Candida parapsilosis</i> . A: Control; B: <i>Candida parapsilosis</i> .....	19
Figura 8. Actividad antifúngica del extracto de <i>Rosmarinus officinalis</i> (Romero) contra <i>Candida famata</i> . A: Control; B: <i>Candida famata</i> .....	19
Figura 9. Actividad antifúngica del extracto de <i>Melissa officinalis</i> (Toronjil) contra <i>Candida albicans</i> . A: Control; B: <i>Candida albicans</i> . ....	20
Figura 10. Actividad antifúngica del extracto de <i>Melissa officinalis</i> (Toronjil) contra <i>Candida parapsilosis</i> . A: Control; B: <i>Candida parapsilosis</i> .....	20
Figura 11. Actividad antifúngica del extracto de <i>Melissa officinalis</i> (Toronjil) contra <i>Candida famata</i> . A: Control; B: <i>Candida famata</i> . ....	20

## RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar la actividad antifúngica de los extractos de *Rosmarinus officinalis* y *Melissa officinalis* contra especies del género *Candida* aisladas de pacientes con vulvovaginitis. De las 36 muestras tomadas, 12 resultaron positivas al cultivo micológico (33,33%), cuyas pruebas bioquímicas lograron identificarlas como *Candida albicans* (27,77%), *Candida parapsilosis* (2,78%) y *Candida famata* (2,78%). Se obtuvieron extractos de *Rosmarinus officinalis* y *Melissa officinalis* utilizando etanol al 80,00%. Se determinó la actividad antifúngica de los extractos colocando discos de papel impregnados con el respectivo extracto sobre placas de agar papa dextrosa (APD) previamente diseminadas con la suspensión de células levaduriformes. Posteriormente, los halos de inhibición fueron medidos. La concentración mínima inhibitoria (CMI) se llevó a cabo mezclando 100 µl de los extractos en placas con micropozos que contenían, 100 µl de caldo Sabouraud dextrosa y 50 µl de la suspensión de células, correspondiendo la concentración al micropozo con la mayor dilución que no mostrara crecimiento fúngico. De acuerdo a los resultados obtenidos de la actividad antifúngica, ambos extractos presentaron propiedades antifúngicas sobre las especies del género *Candida* aisladas; aunque el extracto de *Melissa officinalis* produjo halos de inhibición de mayor diámetro. La CMI del extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis* se observó en su mayoría en la dilución 1:2,5 para las cepas de *Candida albicans* (DB-Ca 01, DB-Ca 02, DB-Ca 03, DB-Ca 05, DB-Ca 06, DB-Ca 07, DB-Ca 08, DB-Ca 09, DB-Ca 10) y para *Candida famata* (DB-Cf 01), correspondiendo esto a una concentración de 89,65 mg/ml. La cepa de *Candida albicans* (DB-Ca 04) y *Candida parapsilosis* (DB-Cp 01) fueron inhibidas por este extracto a concentraciones de 11,2 mg/ml y 44,82 mg/ml, respectivamente. Sin embargo, el extracto acuoso de *Melissa officinalis* inhibió a 7 cepas de *Candida albicans* y a *Candida famata* en una dilución 1:5, cuya concentración era de 44,00 mg/ml, mientras que a *Candida parapsilosis* (DB-Cp 01) y a las cepas de *Candida albicans* (DB-Ca 01, DB-Ca 02 y DB-Ca 03), las inhibió en la dilución 1:2,5 siendo la concentración de 88,00 mg/ml. De acuerdo a estos resultados se puede concluir que ambos extractos poseen propiedades antifúngicas contra diversas especies del género *Candida* aisladas de pacientes con vulvovaginitis.

## INTRODUCCIÓN

Las infecciones vaginales pueden presentarse en cualquier etapa de la vida de la mujer debidaa múltiples factores, entre los que se pueden enumerar: malos hábitos higiénicos, alimentación inadecuada, uso de ropa sintética, climas cálidos y húmedos, uso de duchas vaginales, cambios hormonales, tratamientos con antibióticos de amplio espectro, tratamientos inmunosupresores y anticonceptivos hormonales, que pueden alterar la flora normal de la vagina, la cual está constituida por *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus* en pequeñas proporciones, *Lactobacillus acydophylus* y especies del género *Candida* (Hunter y Raymond, 1992; Pirotta *et al.*, 2003).

Una de las infecciones que se presenta comúnmente en la mujer es la vulvovaginitis dada por inflamación de la región genital femenina como vulva, vagina y cuello uterino, con frecuencia de transmisión sexual y caracterizada por dolor vulvovaginal, prurito y ardor, los agentes infecciosos que se presentan con mayor frecuencia son: *Tricomonas* y en alto grado especies del género *Candida*. Cuando las infecciones vaginales son producidas por especies del género *Candida* se denominan candidosis, siendo *Candida albicans* el agente etiológico de mayor importancia; sin embargo, se han descrito otras especies patógenas causantes de esta afección, entre ellas *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* (Fernández y Lombardía, 2002; Arenas, 2003; Sheary y Dayan,2005).

En ausencia de los factores mencionados anteriormente, las observaciones clínicas muestran que la candidosis vulvovaginal ocurre predominantemente durante la fase lútea del ciclo menstrual, cuando los niveles de estrógenos y progesterona son altos. Por el contrario, en niñas pre-menstruales, mujeres posmenopáusicas y las que no están recibiendo reemplazo hormonal rara vez se presenta esta infección (Sobel, 1988; Kalo-klein y Witkin, 1989).

Los casos de candidosis vulvovaginal han aumentado notablemente con una incidencia

cercana al 25,00%, ocupando el segundo lugar entre las infecciones vaginales, superado por la vaginosis bacteriana. La candidosis vulvovaginal (CVV) constituye un problema de salud de importancia indiscutible en todo el mundo. Se estima que el 75,00% de las mujeres adultas han tenido al menos un episodio de CVV durante su vida y en varias ocasiones se pudo haber convertido en una candidosis vulvovaginal recurrente, (ocurrencia de tres o cuatro episodios de CVV en un periodo de 12 meses con ausencia de algunos factores predisponentes) (Sobel, 1993; Mardh *et al.*, 2002; Corsello *et al.*, 2003; Sobel, 2007; Souza *et al.*, 2009).

*C. albicans* es un hongo dimórfico presente en los organismos de sangre caliente, incluyendo el hombre. Pertenece a la familia Saccharomycetaceae; su estado anamorfo (asexual) pertenece a la subdivisión Deuteromycotina y su estado teleomorfo (sexual) es Ascomycotina. Dicho organismo coloniza las superficies mucosas de la cavidad oral, vaginal y el tracto digestivo y es causante de una gran variedad de infecciones dependiendo de la naturaleza del organismo hospedero. El proceso de infección comienza con la adherencia del organismo comensal a las células de la mucosa o queratinocitos, que interactúan en la relación de la pared fúngica constituida por polisacáridos con un receptor en la célula epitelial (Casas, 1994; Molero, 1998; Arenas, 2003; Nyirjesy, 2008).

Aunque la invasión inicial depende de los mecanismos inmunes del hospedero, *C. albicans* posee características intrínsecas que promueven su habilidad para causar enfermedad, entre los factores de virulencia se incluyen: la producción de adhesinas como mananos, manoproteínas y quitina presentes en la pared celular (que permiten la unión de la célula fúngica a los receptores del hospedero), de enzimas proteolíticas, especialmente proteasas y fosfolipasas (las cuales facilitan la penetración y degeneración de la queratina y el colágeno; favoreciendo así, la diseminación por los tejidos del hospedero); la transformación morfológica de la fase levaduriforme a la fase filamentosa, lo que también facilita la penetración y permite evadir el sistema de defensa, dado que, la hifa libera mayor cantidad de fosfolipasas siendo más resistente a la fagocitosis; y por

último, los efectos inmunomoduladores de determinantes fúngicos que contribuyen a disminuir la actividad de las defensas del hospedero (Arenas, 2003; Ausina y Moreno, 2005).

Estos factores de virulencia, están controlados por diferentes genes que se expresan en un número determinado y momento concreto, los cuales determinan el fenotipo y virulencia de cada aislamiento; dentro de estos genes se encuentran el gen de la hexosaminidasa (HEX1), genes de proteínas asparticas (SAP1, SAP2, SAP3, SAP4) y un gen que confiere capacidad de producir tubos germinales y aumentar la adhesión (Ausina y Moreno, 2005).

*Candida parapsilosis* es un hongo que se ha convertido en una causa significativa de sepsis y de infecciones de tejido en pacientes inmunodeprimidos. A diferencia de *Candida albicans* y *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* no es un patógeno humano obligado, comúnmente es aislado de otras fuentes como animales domésticos, insectos o suelo; es también un comensal humano normal y es uno de los hongos con más frecuencia aislados de las manos y las membranas mucosas de las personas sanas (Khun *et al.*, 2004).

La incidencia de infecciones por *Candida parapsilosis* ha aumentado considerablemente. Éstase destaca como la segunda o tercera causa más común de especies de levaduras aisladas de hemocultivos en Europa, América del Norte, Asia y Sur de Estados Unidos. Aunque se considera menos virulenta que *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* es la especie de *Candida* con el mayor aumento de incidencia desde 1990. Se ha convertido en una especie patógena de gran importancia, productora de infecciones nosocomiales, causando una amplia variedad de manifestaciones clínicas que incluyen fungemia, endocarditis, artritis séptica, endoftalmitis, peritonitis, pancreatitis y meningitis (Pfaller *et al.*, 2001; Almirante *et al.*, 2006; Colombo *et al.*, 2006; Messer *et al.*, 2006; Trofa *et al.*, 2008).

En los últimos veinte años se ha observado que alrededor de otras diez especies del género *Candida* han incrementado su importancia desde el punto de vista clínico, como agentes causales de candidosis; entre estas se tiene: *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. famata*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. glabrata*, *C. lusitaniae*, *C. pelliculosa*, entre otras. Estas levaduras se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y habitando como comensales en muchos mamíferos y aves. La frecuencia de casos de candidosis reportados por estas levaduras está entre 1 al 30,00% (Mendoza, 2005).

*Candida famata* es una especie relacionada con *Candida albicans*. Generalmente, afecta la piel, y se ha encontrado en las heridas abiertas; así como también, en placas de psoriasis, vías urinarias, parte inferior de las uñas, las retinas de los ojos y mucosa vaginal. A diferencia de *C. parapsilosis*, esta especie presenta resistencia a la anfotericina B, pero puede ser tratada con fluconazol (Rippon, 1988).

Los antimicóticos son sustancias que tienen la capacidad de evitar el crecimiento de algunos tipos de hongos. De las cinco clases de antimicóticos sistémicos que actualmente existen, los azoles son los más utilizados para tratar las infecciones vaginales producidas por especies del género *Candida*, estos incluyen los imidazoles (ketoconazol, miconazol) y los triazoles (fluconazol, itraconazol, voriconazol), los cuales actúan sobre el ergosterol, principal esteroide de la membrana celular de los hongos. Los azoles inhiben la enzima lanosterol desmetilasa, con la consiguiente deficiencia de esteroide y acumulación de sus intermediarios que afectan la estructura de la membrana celular y alteran la función de diversas enzimas de membrana. Estos son fungistáticos y poseen un amplio espectro de actividad (Fortún, 1998; Cowen *et al.*, 2002).

Existen especies que han creado resistencia a los antimicóticos sistémicos. *C. glabrata* y *C. tropicalis* han reportado resistencia importante a la mayoría de los imidazoles; *C. krusei*, *C. tropicalis* y *C. albicans* han desarrollado resistencia a fluconazol; siendo *C. krusei* la que presenta resistencia innata a este antimicótico (Nyirjesy, 1994; Powderly, 1994; Arenas, 2003).

La resistencia a los azoles se encuentra asociada con la sobreexpresión de la enzima ERG11 y mutaciones de otras enzimas que actúan en la síntesis del ergosterol, con eliminación activa de la droga por sobreexpresión de las bombas de flujo y disminución de la permeabilidad de membrana por alteraciones en los esteroides (Cowen *et al.*, 2002).

Esta resistencia presentada por los hongos, ha conducido a que se utilicen plantas medicinales para inhibir el crecimiento de los mismos. Las plantas han sido utilizadas con fines terapéuticos desde tiempo inmemorial, en ellas se biosintetizan gran cantidad de sustancias químicas y se les considera como la fuente de compuestos químicos más importante que existe. Las plantas presentan dentro de su proceso de síntesis dos rutas metabólicas, una donde sintetizan los metabolitos primarios necesarios para el desarrollo de la propia planta como proteínas, lípidos, carbohidratos y algunos micronutrientes. En la segunda ruta se sintetizan los metabolitos secundarios, los cuales protegen a la planta de plagas, enfermedades e inclusive de la invasión de otras plantas y por otro lado, para atraer insectos y aves (polinizantes) (Matsumura *et al.*, 2000; Arguayo, 2002).

Estas cualidades de protección y atracción, se ven reflejadas en propiedades antisépticas, antiinflamatorias, antidepresivas, afrodisiacas, entre otras; dentro de estos metabolitos secundarios son comunes aquellos que presentan actividad biológica, tales como, esteroides, fenoles, flavonoides, glucósidos, quinonas, alcaloides, aldehídos, alcoholes, entre otros (Arguayo, 2002; Soliman y Badaea, 2002; Martínez *et al.*, 2003; Magro *et al.*, 2006).

La actividad biológica de los extractos naturales pueden deberse al sinergismo entre sus diversos componentes ya que, por separado, poseen menos actividad que cuando se encuentran juntos, su mecanismo de acción no se conoce en profundidad, pero se puede señalar que su actividad microbiostática o microbicida está asociada a compuestos lipofílicos que pasan a través de la pared celular y la membrana citoplasmática, desordenando las diferentes capas de polisacáridos, ácidos grasos y fosfolípidos. En bacterias, la permeabilización de la membrana está asociada con pérdida de iones y

reducción del potencial de membrana, colapsando la bomba de protones y reduciendo la cantidad de adenosintrifosfato (ATP), también puede coagular el citoplasma (Souza *et al.*, 2005; Krishnamurthy y Shashikala, 2006).

En células eucariotas, como los hongos, los extractos de plantas pueden provocar despolarización de las membranas mitocondriales por disminución del potencial de membrana afectando el ciclo iónico del calcio y otros canales iónicos; además, reduce el gradiente de pH afectando (como en las bacterias) la bomba de protones y la cantidad de ATP. El cambio de la fluidez de la membrana produce la permeabilidad anormal de radicales, citocromo C, iones de calcio y proteínas como resultado de estrés oxidativo y fallas bioenergéticas. La permeabilización fuera y dentro de la membrana de la mitocondria puede causar la muerte por apoptosis y necrosis (Bakkali *et al.*, 2008).

La familia de las labiadas pertenece al grupo taxonómico dentro del orden de las tubifloras. Se trata de plantas herbáceas o arbustivas, casi siempre aromáticas y con tallos cuadrangulares, con hojas normalmente simples y opuestas. El área de dispersión de la familia comprende prácticamente, la totalidad del planeta tierra y a ésta pertenecen tres mil doscientas especies aproximadamente, dentro de las cuales se encuentran *Rosmarinus officinalis* y *Melissa officinalis* (Curioni y Arizio, 2006).

*Rosmarinus officinalis* (Romero) es una planta de pequeño porte, muy ramificada, de hojas perennes, que puede alcanzar hasta 1 m de altura. Posee hojas verde oscuro, de pequeño tamaño y muy abundantes. Las flores son pequeñas, de color violeta claro o azul vivo de 5 mm de largo. Los metabolitos que presenta le confieren importancia medicinal, por ello se ha considerado como estimulante y antiespasmódica, así como facilitadora de la secreción biliar. También, se le atribuyen propiedades analgésicas, antiirreumáticas, diuréticas, expectorantes, antiepilépticas, antiinflamatorias, antivirales, antimicrobianas y antifúngicas, siendo estas últimas, de gran importancia en la inhibición del crecimiento bacteriano y fúngico (Takaki *et al.*, 2008).

Se han identificado propiedades antibacterianas frente a bacterias Gram positivas y hongos patógenos, incluyendo *Aspergillus*, dichas propiedades han sido relacionadas con los componentes polifenólicos. Los ácidos carnósicos y rosmarínicos serían los principales componentes bioactivos. Sin embargo, otros estudios señalan el borneol, alcanfor y verbenona como los componentes con mayor actividad antimicrobiana (Santoyo *et al.*, 2005; Moreno *et al.*, 2006; Fu *et al.*, 2007).

*Melissa officinalis* (Toronjil) es una planta aromática que mide entre 60-90 cm de altura, con tallos ramificados desde la base, hojas grandes, pecioladas y con márgenes dentados, de color verde claro brillante, sus flores son color blanco o rosado. Al igual que *Rosmarinus officinalis*, presenta metabolitos secundarios con importantes usos medicinales. Su principal componente activo es un aceite esencial compuesto por distintos aldehídos y alcoholes como citral, citronella, geraniol y linalol, a los cuales se les atribuyen propiedades tranquilizantes, digestivas, antiespasmódicas, entre otras (Cardona, 1997; Sitte *et al.*, 2004).

Los aceites esenciales de muchas plantas aromáticas poseen efectos antimicrobianos. Estos aceites se extraen de plantas que por lo general, se encuentran localizadas en climas templados o cálidos de países tropicales, son obtenidos a partir de material vegetal como flores, hojas, tallos, ramas, semillas, frutos, raíces, madera o corteza. Además juegan un rol importante en la protección de las plantas como sustancias antibacterianas, antivirales, antifúngicas, insecticidas y también contra herbívoros por reducir su apetito para tales plantas. Dichos aceites son muy complejos y están constituidos por mezclas de varios componentes como: terpenos, aldehídos, alcoholes, fenoles, ésteres acíclicos, entre otros (Salgueiro *et al.*, 2003; Burt, 2004; Celis, 2007; Bakkali *et al.*, 2008).

Considerando el gran número de compuestos químicos presentes en los aceites esenciales, lo más probable es que su actividad antimicrobiana no se debe a un mecanismo específico, sino que actúan en varias partes de las células. Se han propuesto posibles mecanismos de acción mediante el cual puede ser reducido el crecimiento del

micelio o totalmente inhibido. Por una parte, se le atribuye esta función a los compuestos fenólicos, en donde la anfipaticidad de estos compuestos puede explicar sus interacciones con biomembranas y, por lo tanto, la actividad antimicrobiana (Burt, 2004; Bakkali *et al.*, 2008; Hadizadeh *et al.*, 2009).

De igual forma, los terpenos alteran la permeabilidad celular, rompiendo el embalaje de lípidos provocando cambios en la función y propiedades de la membrana; los flavonoides forman complejos con las proteínas solubles y extracelulares y con la pared de la célula microbiana. Además de estos, los alcaloides producen su efecto al interactuar con la pared celular y el ADN del microorganismo. También es comúnmente aceptado que los efectos tóxicos de los componentes de los aceites esenciales y extractos son responsables de la actividad antimicrobiana, debido que alteran la funcionalidad estructural de la membrana celular (Bard *et al.*, 1988; Sikkema *et al.*, 1995; Domingo y López, 2003; Burt, 2004).

La composición química de los aceites esenciales pueden variar dentro de cada especie por un variedad de razones, incluyendo la presencia de quimiotipos, el momento de la cosecha y el uso de diferentes métodos de extracción (Mercier *et al.*, 2009).

Debido al aumento en la resistencia de los hongos a los antimicóticos, se busca la utilización de extractos naturales como alternativas terapéuticas. Es por ello, que el objetivo de esta investigación fue evaluar la actividad antifúngica de *Rosmarinus officinalis* y *Melissa officinalis* contra especies del género *Candida* aisladas de pacientes con vulvovaginitis, con el propósito de proporcionar alternativas naturales en el tratamiento de esta enfermedad.

## **METODOLOGÍA**

### **Obtención de las muestras**

Se tomaron muestras de secreciones vaginales de pacientes con vulvovaginitis que asistieron a consulta de ginecología del Hospital Clínico “San Vicente de Paúl” en Cumaná, estado Sucre, durante el mes de febrero de 2011.

Las muestras fueron tomadas por el personal médico de la siguiente manera: se colocó un espéculo en la vagina, para visualizar el canal vaginal y cuello uterino; después se tomó la muestra con dos hisopos estériles del fondo del saco vaginal. Cada uno de los hisopos, se introdujo en un tubo de ensayo que contenía 2 ml de solución salina fisiológica estéril. Inmediatamente las muestras fueron transportadas al laboratorio de Investigaciones Microbiológicas del Departamento de Bioanálisis, donde fueron procesadas.

### **Procesamiento de las muestras**

El examen directo se realizó entre lámina y laminilla observando, en el microscopio óptico, una suspensión de la muestra en solución salina fisiológica. En esta preparación se buscó la presencia de blastoconidios y/o seudomicelio (Arenas, 2003).

Las muestras se sembraron por agotamiento en superficie en placas de Petri con agar Sabouraud dextrosa (ASD) y adicionado de cloranfenicol (Himedia Laboratories Limited, India) para evitar el crecimiento bacteriano. Posteriormente, se incubaron a temperatura de 37°C durante un período de 24 h en incubadora (marca Felisa, México). Una vez transcurrido este tiempo, se procedió a realizar el aislamiento de las levaduras, tomando con una asa bacteriológica una colonia aislada la cual, se sembró nuevamente por agotamiento en superficie en otra placa de Petri con ASD. Seguidamente, se incubaron a temperatura de 37°C durante un período de 24 h. Luego, se tomó una nueva

colonia aislada y se sembró en tubos con ASD y se incubaron a temperatura de 37°C durante 24 h. Culminado este período de incubación, se describieron las características macroscópicas de las colonias levaduriformes en crecimiento, tales como: aspecto, borde, superficie, consistencia, reverso y pigmento; finalmente, se identificaron las características microscópicas como blastosporas, hifas y pseudohifas, por tinción con solución de lugol (Arenas, 2003).

### **Formación de clamidoconidios**

Las colonias levaduriformes fueron cultivadas en agar harina de maíz (Himedia Laboratories Limited, India) e incubadas a temperatura ambiente durante 48 h; este medio de cultivo se utilizó para estimular la formación de clamidoconidios, lo que ayudó a distinguir la especie *Candida albicans* de las demás especies del género *Candida* (Casal y Linares, 1981).

### **Filamentación en suero**

Para la observación de tubos germinativos se inoculó una pequeña porción de la colonia desconocida en 0,5 ml de suero humano fresco, incubándose a 37°C en incubadora (marca Felisa, México) durante 2 h. Después de este tiempo, se tomó una gota de la suspensión entre lámina y laminilla, se observó en el microscopio con objetivo de 10X y 40X la presencia o ausencia de tubos germinativos que caracterizan a *Candida albicans*.

Finalmente, a las levaduras aisladas se le aplicó la prueba de auxonograma, la cual se fundamenta en la capacidad que tienen las levaduras para utilizar o asimilar los diferentes carbohidratos, a fin de identificar las diferentes especies del género *Candida*. Esta prueba se realizó utilizando la galería API 20C AUX (bioMérieux), ésta se compone de 20 micropozos con sustratos deshidratados que permiten realizar 19 pruebas de asimilación más un control. Los micropozos se inocularon con un medio mínimo semisólido y las levaduras se reprodujeron si eran capaces de utilizar el sustrato correspondiente. Esta

galería permite identificar un total de 34 especies diferentes. La lectura de estas reacciones se realizó por comparación con un control de crecimiento y la identificación se obtuvo, a partir de un código numérico, mediante un catálogo analítico proporcionado por la casa comercial.

### **Obtención de los extractos de *Rosmarinus officinalis* y *Melissa officinalis***

#### Plantas

Los extractos naturales se obtuvieron de las plantas *Rosmarinus officinalis* (Romero) y *Melissa officinalis* (Toronjil), las cuales fueron adquiridas frescas en el mercado municipal de la ciudad de Cumaná, estado Sucre. Se empleó únicamente hojas y tallos, que se secaron en una estufa (marca Felisa, México) a 45°C durante un período de 5 días o hasta que estuvieran completamente secos, lo que se comprobó determinando el peso seco de las mismas, mediante el uso de una balanza una vez macerados las hojas y tallos.



Figura 1. Plantas utilizadas para la obtención de los extractos. A: Romero; B: Toronjil.

#### Extracción etanólica

Se realizó extracción etanólica, siguiendo el método de Bluma *et al.* (2008). Se mezclaron 3 g de polvo de la planta con 20 ml de etanol al 80,00%, esta mezcla se dejó

en reposo durante 48 h a temperatura ambiente y en oscuridad. El extracto obtenido se filtró con papel de filtro Whatman # 1 y éste a su vez se agregó en una placa de Petri de vidrio, que fue previamente pesada; posteriormente, la placa de Petri que contenía el extracto se guardó en oscuridad hasta que se evaporara completamente el etanol. Se determinó el peso seco del extracto restando el peso de la placa con el extracto y el peso de la placa sin el extracto. Finalmente, el extracto obtenido se resuspendió con agua destilada estéril en una proporción 1:3 y fue depositado en viales que se guardaron en refrigeración.

### **Suspensión de células**

Se tomó un pequeño inóculo de las colonias aisladas y se suspendió en 9 ml de solución salina fisiológica estéril (SSFE). Se comparó la turbidez con el tubo N° 2 de la escala de Mc Farland, que corresponde a una concentración de  $10^6 - 10^7$  células/ml.

### **Actividad antifúngica**

La actividad antifúngica del extracto obtenido se determinó de acuerdo al método de Souza *et al.* (2005). En placas de Petri que contenían agar Sabouraud dextrosa (ASD) fue diseminado uniformemente 100  $\mu$ l de la suspensión de células con asa de Digralski. Posteriormente, se impregnaron discos de papel de filtro Whatman # 1 estériles de 6 mm de diámetro con 50  $\mu$ l de los extractos y se situaron en el medio de las placas de Petri con ASD inoculadas con la suspensión de células. Se contó con un tratamiento control constituido por discos impregnados con el respectivo solvente que se utilizó, en este caso etanol. Las placas se colocaron en una incubadora (Marca Felisa, México) por 72 h a 37°C y fueron examinadas cada 24 h. Los halos de inhibición se midieron usando una regla graduada y se expresaron en milímetros.

### **Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)**

La concentración mínima inhibitoria se determinó siguiendo la metodología descrita por Rasooli y Mirmostafa (2003) y Rasooli *et al.* (2008) con ligeras modificaciones. Para ello se hicieron diluciones seriadas a partir de la mezcla de 100  $\mu$ l del extracto en micropozos de una placa, que contenían 100  $\mu$ l de caldo Sabouraud dextrosa y 50  $\mu$ l de la suspensión de células. Los micropozos se incubaron a 28°C durante 48 h. La concentración mínima inhibitoria correspondió al micropozo con la mayor dilución que no mostró crecimiento fúngico.

### **Análisis estadístico**

La comparación de la actividad antifúngica y la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto de *Rosmarinus officinalis* con la del extracto de *Melissa officinalis* se realizó mediante el análisis estadístico *t*-Student con un nivel de significancia de  $p < 0,05$  usando el programa estadístico Statgraphics en su última versión (Wayne, 2002).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 36 muestras tomadas de pacientes que presentaban síntomas de vulvovaginitis, doce (12) resultaron positivas al cultivo micológico, lo que correspondió al 33,33% de la totalidad de las muestras, observándose colonias levaduriformes de color blanquecino o beige, cremosas, de bordes irregulares o enteros, ligeramente elevadas, cuyas pruebas bioquímicas lograron identificarlas como *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* y *Candida famata* (Tabla 1).

Tabla 1. Especies del género *Candida* aisladas de pacientes con vulvovaginitis.

Especies	Número de casos	Porcentaje (%)
<i>Candida albicans</i>	10	83,33
<i>Candida parapsilosis</i>	1	8,33
<i>Candida famata</i>	1	8,33

*Candida albicans* fue la especie que se aisló con más frecuencia (83,33%) en las pacientes con sintomatología de vulvovaginitis. Resultados similares a los obtenidos por Amblar *et al.* (1998), quienes estudiaron 475 exudados vaginales, encontrando que *Candida albicans* era el agente causal del 79,40% de los casos; así mismo, Panizo (2002), en su trabajo sobre el aislamiento de levaduras en muestras clínicas encontró que el 77,60% de los casos correspondió a *Candida albicans*. Este hecho puede explicarse porque *Candida albicans* presenta carácter dimórfico y una alta capacidad patógena, lo que permite una rápida colonización de la mucosa vaginal (Andaluz *et al.*, 1998; Molero *et al.*, 1998 y Ferrer, 2000).

Existen otras especies involucradas en este proceso infeccioso que se aíslan con relativa frecuencia, como *Candida glabrata* y *Candida guilliermondii*, aunque también se han encontrado implicadas, pero en menor proporción, a otras levaduras como *Candida tropicalis*, *Candida kefyr*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* y *Candida famata* (Reife, 1996).

En las figuras 2, 3 y 4 se observan imágenes fotográficas del cultivo micológico, examen directo, formación de clamidoconidios y tubo germinativo. En la figura 2, se pueden apreciar las colonias levaduriformes que indican el crecimiento de *Candida albicans* en agar Sabouraud dextrosa adicionado con cloranfenicol. Así mismo, en la figura 3, se puede observar la formación de blastoconidios en el examen directo, y en la figura 4, se puede apreciar la formación de tubo germinativo en suero humano y clamidoconidios en agar harina de maíz; siendo estas dos últimas, pruebas específicas para la identificación de *Candida albicans*.



Figura 2. Cultivo micológico de muestra tomada de paciente con sintomatología de vulvovaginitis.

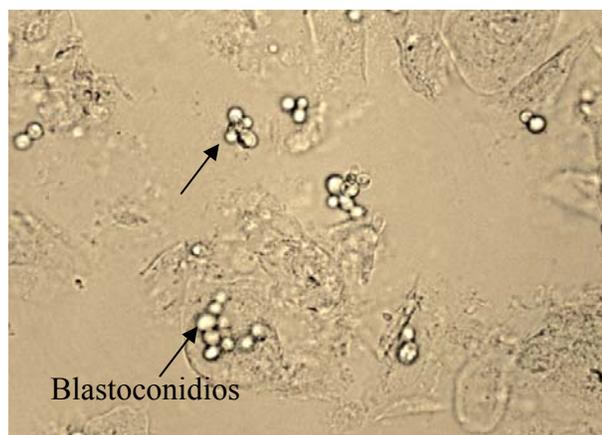


Figura 3. Examen directo de muestra tomada de paciente con sintomatología de vulvovaginitis.

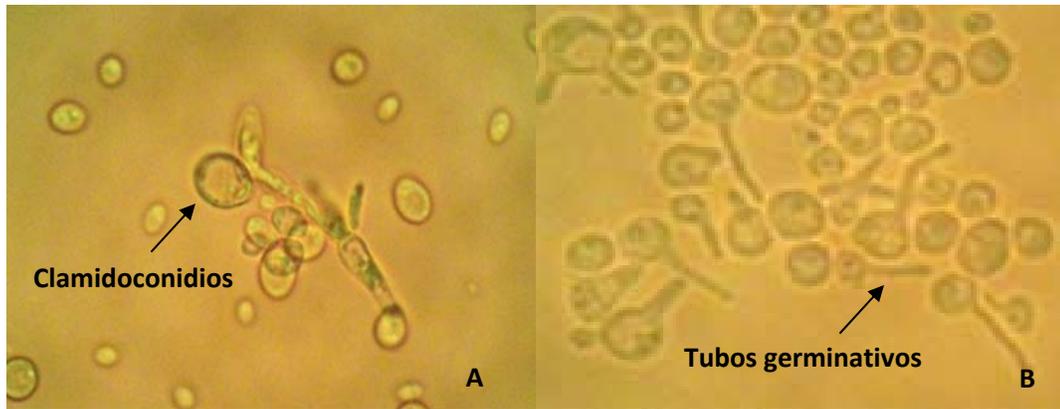


Figura 4. Formación de clamidoconidios y tubos germinativos por *Candida albicans*. A: clamidoconidios. B: Tubos germinativos.

Así mismo, en la figura 5, se muestra una imagen fotográfica de la galería API 20C AUX con la cual fueron identificadas las cepas, en donde se puede apreciar la asimilación de los carbohidratos por una de las cepas de *Candida albicans*.



Figura 5. Galería API 20C AUX para la identificación de levaduras. Asimilación de carbohidratos por *Candida albicans*.

Las plantas medicinales y sus formas derivadas (extractos, jarabes, entre otros), han sido la base de la terapia médica desde hace siglos; éstas aportan una gran cantidad de compuestos químicos con carácter antimicrobiano, algunos de los cuales muestran una actividad *in vitro*; es decir, que sus propiedades farmacológicas y terapéuticas se atribuyen a varios componentes químicos aislados de sus extractos crudos (Domingo y López, 2003; Pereira *et al.*, 2009).

En este estudio se pudo notar que ambos extractos tienen propiedades antifúngicas sobre las especies de *Candida* aisladas; sin embargo, se puede observar que el extracto de *Melissa officinalis* produjo halos de inhibición de mayor diámetro sobre las cepas

DB-Ca 04, DB-Ca 07, DB-Ca 08, DB-Ca 10 y DB-Cf 01, las cuales fueron estadísticamente significativas (Tabla 2). Estos resultados son similares a los obtenidos por Yigit *et al.* (2008), quienes demostraron que el extracto metanólico de *Mentha piperita* presenta actividad anticandidial frente a *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. glabrata*, observándose la mayor actividad antifúngica sobre *C. albicans* con halos de inhibición de 12,30 mm. El efecto moderado de este extracto sobre *C. tropicalis* y *C. glabrata* se observó por la formación de halos de inhibición de 6,80 mm y 8,80 mm, respectivamente. Al mismo tiempo observaron que el extracto metanólico de *Mentha longifolia* también demostró tener actividad antifúngica sobre *C. albicans* con zonas de inhibición de 10,20 mm. Sin embargo, *Mentha longifolia* además de *C. albicans*, presentó actividad moderada frente *C. tropicalis* dando una zona de inhibición de 7,50 mm.

Por otra parte, Hassawi y Kharma (2006), observaron que el extracto de *Plantago lanceolata* inhibió el crecimiento de *C. albicans* produciendo zonas de inhibición de 9,75 mm. Así mismo, Braga *et al.* (2007) han sugerido que el extracto metanólico de esta misma planta muestra actividad antifúngica frente a *C. albicans* y *Cryptococcus neoformans* con zonas de inhibición de 20 mm y 4 mm, respectivamente.

Al comparar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto de *Rosmarinus officinalis* contra las especies del género *Candida* aisladas se observó que esta fue de 1:2,5 para diez de las doce cepas aisladas, mostrando una mayor CMI para la cepa DB-Ca 04 (1:20) seguida de DB-Cp 01 (1:5), correspondiendo esto a concentraciones de 11,2 mg/ml y 44,82 mg/ml, respectivamente (Tabla 3). Sin embargo, la CMI del extracto de *Melissa officinalis* fue de 1:5 para ocho de las cepas aisladas, siendo la concentración de 44,00 mg/ml y de 1:2,5 para el resto de ellas, correspondiendo esto a una concentración de 88,00 mg/ml (Tabla 4). Yigit *et al.* (2008) al experimentar con los extractos metanólicos de *Mentha piperita* y *Mentha longifolia* sobre *Candida albicans* obtuvieron una CMI de 1,25 mg/ml y 2,50 mg/ml. Hassawi y Kharma (2006) obtuvieron una CMI de 200 mg/ml con el extracto de *Plantago lanceolata* sobre *C. albicans*.

Tabla 2. Halos de inhibición producidos por el extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis* (Romero) y *Melissa officinalis* (Toronjil) contra *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* y *Candida famata*, aisladas de pacientes con vulvovaginitis.

Microorganismos	Extractos (Halos de inhibición en mm)		P
	<i>Rosmarinus officinalis</i>	<i>Melissa officinalis</i>	
<i>Candida albicans</i>			
DB- Ca 01	12,0	19,0	0,1098
DB- Ca 02	18,6	30,0	0,0735
DB- Ca 03	11,3	15,0	0,0651
DB- Ca 04	8,3	31,6	0,0038*
DB- Ca 05	26,0	20,0	0,0808
DB- Ca 06	30,6	18,6	0,0546
DB- Ca 07	10,3	18,6	0,0438*
DB- Ca 08	9,3	15,0	0,0223*
DB- Ca 09	24,3	20,3	0,4240
DB- Ca 10	9,0	19,0	0,0036*
<i>Candida parapsilosis</i>			
DB- Cp 01	21,3	20,6	0,8561
<i>Candida famata</i>			
DB- Cf 01	18,3	24,3	0,0158*

Diferencias estadísticamente significativas (\*) entre los halos de inhibición producidos por los extractos de *Melissa officinalis* y *Rosmarinus officinalis* en las cepas de *Candida* estudiadas; según el método *t*-Student ( $p < 0,05$ ). P= P valor.

En las figuras 6, 7, 8, 9, 10 y 11 se observan imágenes fotográficas de los halos de inhibición producidos por el extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis* y *Melissa officinalis* sobre las especies del género *Candida* aisladas de pacientes con vulvovaginitis.

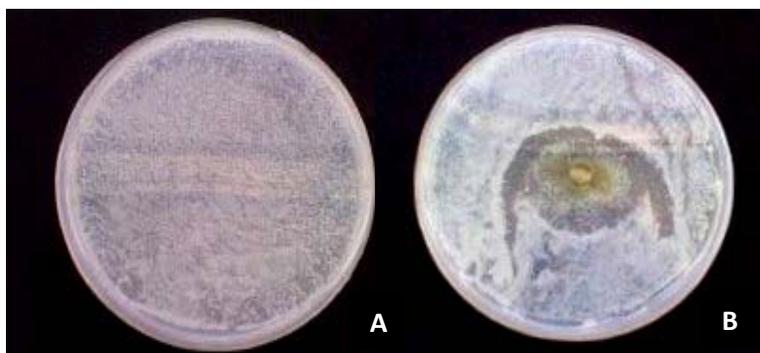


Figura 6. Actividad antifúngica del extracto de *Rosmarinus officinalis* (Romero) contra *Candida albicans*. A: Control; B: *Candida albicans*.

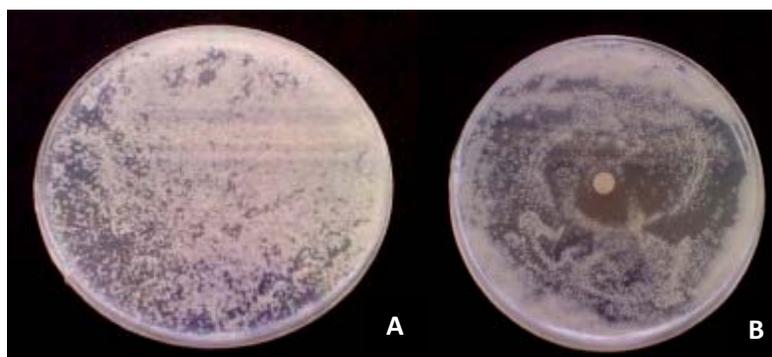


Figura 7. Actividad antifúngica del extracto de *Rosmarinus officinalis* (Romero) contra *Candida parapsilosis*. A: Control; B: *Candida parapsilosis*.

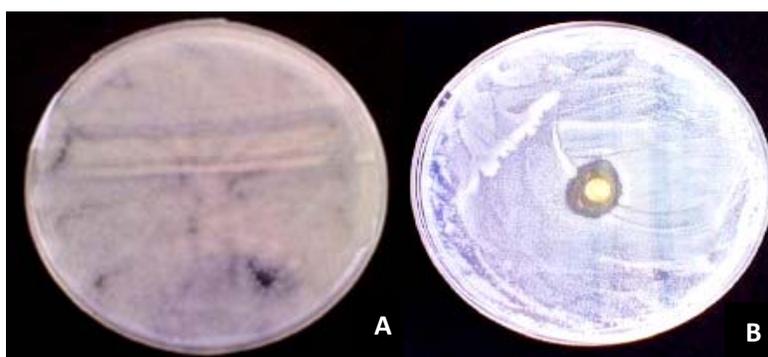


Figura 8. Actividad antifúngica del extracto de *Rosmarinus officinalis* (Romero) contra *Candida famata*. A: Control; B: *Candida famata*.

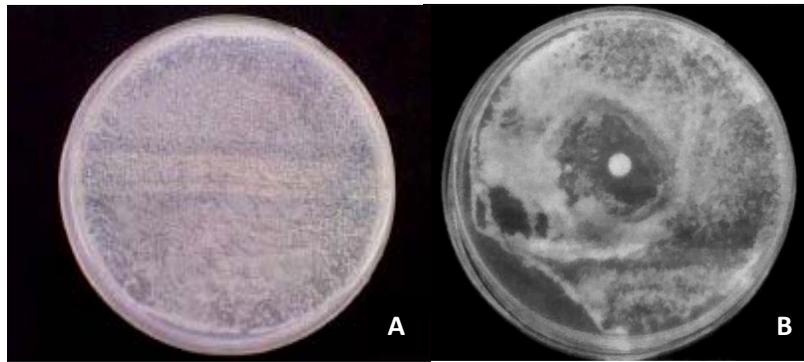


Figura 9. Actividad antifúngica del extracto de *Melissa officinalis* (Toronjil) contra *Candida albicans*. A: Control; B: *Candida albicans*.

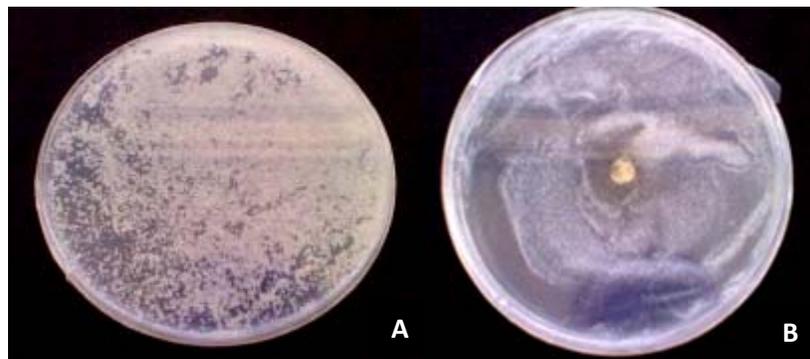


Figura 10. Actividad antifúngica del extracto de *Melissa officinalis* (Toronjil) contra *Candida parapsilosis*. A: Control; B: *Candida parapsilosis*.

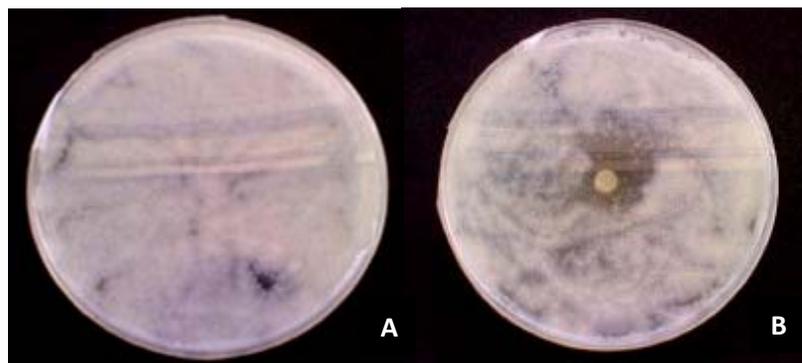


Figura 11. Actividad antifúngica del extracto de *Melissa officinalis* (Toronjil) contra *Candida famata*. A: Control; B: *Candida famata*.

Tabla 3. Concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis* (Romero) frente a *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* y *Candida famata*, aisladas de pacientes con vulvovaginitis.

Extracto	Microorganismos	Concentración Mínima Inhibitoria Diluciones / Concentración (mg/ml)					
		1:2,5	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80
		89,65	44,82	22,4	11,2	5,6	2,8
	<i>Candida albicans</i>						
	DB – Ca 01	+	-	-	-	-	-
	DB – Ca 02	+	-	-	-	-	-
	DB – Ca 03	+	-	-	-	-	-
	DB – Ca 04	+	+	+	+	-	-
	DB – Ca 05	+	-	-	-	-	-
	DB – Ca 06	+	-	-	-	-	-
<i>Rosmarinus officinalis</i>	DB – Ca 07	+	-	-	-	-	-
	DB – Ca 08	+	-	-	-	-	-
	DB – Ca 09	+	-	-	-	-	-
	DB – Ca 10	+	-	-	-	-	-
	<i>Candida parapsilosis</i>						
	DB – Cp 01	+	+	-	-	-	-
	<i>Candida famata</i>						
	DB – Cf 01	+	-	-	-	-	-

(+)= no crecimiento, (-)= crecimiento

Es muy importante señalar que la cepa DB-Ca 04 resulto ser más sensible al extracto de *Rosmarinus officinalis*, ya que fue inhibida a una concentración de 11,2 mg/ml (dilución 1:20), en comparación con el extracto de *Melissa officinalis* que inhibió su crecimiento a una concentración de 44,00 mg/ml (dilución 1:5).

Así mismo, el extracto de *Melissa officinalis* inhibió el crecimiento de la mayoría de las cepas de *Candida albicans* en menor concentración (44,00 mg/ml); en comparación con

el extracto de *Rosmarinus officinalis* que las inhibió a una concentración de 89,65 mg/ml, aunque a la cepa DB-Ca 04 la inhibió a una concentración de 11,2 mg/ml.

Se debe resaltar la diferencia presentada por los extractos sobre las cepas DB-Cp 01 y BD-Cf 01, donde el extracto de *Rosmarinus officinalis* inhibió el crecimiento de estas cepas en las diluciones 1:5 y 1:2,5 lo que corresponde esto a concentraciones de 44,82 mg/ml y 89,65 mg/ml, respectivamente. De manera contraria actuó sobre estas cepas el extracto de *Melissa officinalis*, quien inhibió a la cepa DB-Cp 01 en la dilución 1:2,5 y a la cepa DB-Cf 01 en la dilución 1:5, correspondiendo esto a concentraciones de 88,00 mg/ml y 44,00 mg/ml, respectivamente.

Estudios fitoquímicos realizados con *Melissa officinalis* han demostrado sus numerosos componentes: compuestos polifenólicos (ácido rosmarínico, ácido cafeico), citronelal, geranial, citral, flavonoides (luteolina),  $\alpha$  pineno,  $\beta$  pineno, carvacrol y taninos (Carnat *et al.*, 1998; Bahtiyarca y Cosge, 2006; Guginski *et al.*, 2009; De Martino *et al.*, 2009).

El efecto antifúngico presentado por el extracto de *Melissa officinalis* probablemente se debe a la sinergia entre sus componentes, los cuales se combinan para actuar sobre la membrana celular, alterando su permeabilidad, rompiendo la bicapa de lípidos favoreciendo así la entrada a la célula de sus componentes, causando de esta manera la muerte celular (Bard *et al.*, 1988; Sikkema *et al.*, 1995). El 90,00% de este extracto lo constituyen los terpenos, específicamente los monoterpenos, los cuales juegan un papel importante en la función metabólica de las plantas y resultan menos perjudiciales que los fungicidas químicos. Esto confirma lo señalado por Dorman y Deans (2000) y Longbottom *et al.* (2004) cuando sostienen que los alcoholes terpénicos pueden actuar como desnaturalizantes de proteínas o agentes deshidratantes, pero son más activos cuando la membrana celular ha incrementado su permeabilidad, lo que indica que su objetivo principal puede ser dentro de la célula.

Omidbeygi *et al.* (2007) señala que los componentes de los aceites esenciales y extractos atraviesan la membrana celular, interactuando con las enzimas y proteínas de la

membrana, produciendo así un flujo de protones hacia el espacio extracelular que induce cambios en las células y finalmente su muerte. Así mismo, Andrews *et al.* (1980); Bard *et al.* (1988); Sikkema *et al.* (1995) señalaron que los alcoholes terpénicos como el  $\alpha$  pineno y el  $\beta$  pineno destruyen la integridad celular, inhibe la respiración generando efectos adversos sobre la mitocondria, así como también inhibe el transporte de iones y aumenta la permeabilidad de la membrana.

Tabla 4. Concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto acuoso de *Melissa officinalis* (Toronjil) frente a *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* y *Candida famata*, aisladas de pacientes con vulvovaginitis.

Extracto	Microorganismos	Concentración Mínima Inhibitoria Diluciones / concentraciones (mg/ml)					
		1:2,5	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80
		88	44	22	11	5,5	2,75
	<i>Candida albicans</i>						
	DB – Ca 01	+	-	-	-	-	-
	DB – Ca 02	+	-	-	-	-	-
	DB – Ca 03	+	-	-	-	-	-
	DB – Ca 04	+	+	-	-	-	-
	DB – Ca 05	+	+	-	-	-	-
	DB – Ca 06	+	+	-	-	-	-
<i>Melissa officinalis</i>	DB – Ca 07	+	+	-	-	-	-
	DB – Ca 08	+	+	-	-	-	-
	DB – Ca 09	+	+	-	-	-	-
	DB – Ca 10	+	+	-	-	-	-
	<i>Candida parapsilosis</i>						
	DB – Cp 01	+	-	-	-	-	-
	<i>Candida famata</i>						
	DB – Cf 01	+	+	-	-	-	-

(+)= no crecimiento, (-)= crecimiento

*Rosmarinus officinalis* es una planta de importante uso medicinal; sus principales componentes son: p-cimeno, linalool, timol,  $\alpha$  pineno,  $\beta$  pineno, eucalipto, ácidos fenólicos (rosmarínico, carnósico, cafeico), carnosol, ácido ursólico, luteolina (Ozcan y Chalchat, 2008).

La actividad antifúngica del extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis* posiblemente se debe a la presencia del anillo cimeno y de ácidos orgánicos dentro de sus componentes, quienes actúan de manera sincronizada para causar la muerte celular. En este caso, el anillo cimeno rompe la pared celular y facilita la penetración de los ácidos que desorganizan la estructura interna ocasionando la muerte celular. Además de esto, también contienen en menor concentración  $\alpha$  pineno y  $\beta$  pineno, que como en el caso de *Melissa officinalis* producen la desintegración de la membrana celular (Ozcan y Chalchat, 2008; Borrell *et al.*, 2009).

Estudios realizados por Bozin *et al.* (2007) encontraron que el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* presenta una importante actividad antibacteriana contra cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Salmonella enteritidis* y *Shigella sonnei*, además de poseer una notable actividad antifúngica contra *C. albicans*. Castano *et al.* (2010) realizaron un estudio para probar la actividad bactericida del extracto etanólico y el aceite esencial de la hoja de *Rosmarinus officinalis* sobre bacterias de interés alimentario, obteniendo que el extracto etanólico mostró actividad antimicrobiana contra las bacterias Gram negativas: *Shigella sonnei* y *Salmonella typhimurium*.

De igual forma, Cox *et al.* (2000) demostraron que el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* resultó ser activo contra las bacterias Gram positivas (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*) y Gram negativas (*Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*). También mostró una marcada actividad antifúngica contra *C. albicans*.

Los fenoles son inhibidores del crecimiento microbiano, dependiendo de su estructura

química, razón por la cual los aceites esenciales con alto contenido de fenoles presentan elevada actividad antimicrobiana. La actividad citotóxica de los aceites esenciales se debe principalmente a la presencia de fenoles, aldehídos y alcoholes, mientras que las actividades antibacterianas y antifúngicas se deben a ciertos terpenoides y compuestos fenólicos (Burt, 2004; Celis, 2007; Bakkali *et al.*, 2008).

Los extractos de *Rosmarinus officinalis* y *Melissa officinalis* demostraron actividad antifúngica sobre las especies del género *Candida* aisladas, por lo cual pudieran ser utilizados en el futuro como alternativa terapéutica para el tratamiento de las infecciones producidas por estas especies.

## CONCLUSIONES

*Candida albicans* fue la especie que predominó entre las especies de *Candida* aisladas de pacientes con síntomas de vulvovaginitis.

La actividad antifúngica de los extractos acuosos de *Rosmarinus officinalis* y *Melissa officinalis* sobre las especies del género *Candida* aisladas fue demostrada con este estudio.

La concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto de *Rosmarinus officinalis* se observó a una concentración de 89,65 mg/ml, para 9 cepas de *Candida albicans* y para *Candida famata*; y en una concentración de 11,2 mg/ml para la cepa DB-Ca 04. Además, presentó actividad inhibitoria sobre *Candida parapsilosis* a una concentración de 44,82 mg/ml. Así mismo, el extracto acuoso de *Melissa officinalis* demostró efecto inhibitorio sobre 7 cepas de *Candida albicans* y sobre *Candida famata* a una concentración de 44,00 mg/ml, así como sobre 3 cepas de *Candida albicans* y sobre *Candida parapsilosis* a una concentración de 88,00 mg/ml.

El extracto de *Melissa officinalis* presentó mayor efecto sobre las especies del género *Candida* aisladas, en comparación con el extracto de *Rosmarinus officinalis*

## RECOMENDACIONES

Evaluar la actividad antifúngica de los extractos de *Rosmarinus officinalis* y *Melissa officinalis* contra otras especies productoras de micosis.

Evaluar la actividad antifúngica de otros extractos naturales sobre las especies de *Candida*.

## BIBLIOGRAFÍA

- Almirante, B.; Rodriguez, D.; Cuenca-estrella, M.; Almela, M.; Sanchez, F.; Ayats, J.; Alonso-tarres, C.; Rodriguez-tudela, J. y Pahissa, A. 2006. Epidemiology, risk factors, and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *Journal of Clinical Microbiology*, 44: 1681-1685.
- Amblar, G.; Agudo, E.; Hernández, J.; García, P.; Marín, P. y Mira, J. 1998. Vulvovaginitis por levaduras distintas a *Candida albicans*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 3: 212-213.
- Andaluz, G.; Ciudad, A. y Larriba, G. 1998. Recombinación y dimorfismo en *Candida albicans*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 3: 187-188.
- Andrews, R.; Parks, L. y Spence, K. 1980. Some effects of Douglas fir terpenes on certain microorganisms. *Applied Environmental Microbiology*, 40: 301-304.
- Arenas, R. 2003. *Micología médica ilustrada*. Mc Graw-Hill Interamericana S.A. México.
- Arguayo, G. 2002. *Insecticidas vegetales*. Facultad de Agronomía. Universidad de Concepción. Chillan, Chile.
- Ausina, V. y Moreno, S. 2005. Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Capítulo 60. Editorial Médica Panamericana. Buenos aires, Madrid.
- Bahtiyarca, R. y Cosge, B. 2006. The essential oil of lemon balm (*Melissa officinalis* L.), its components and using fields. *Journal of the Faculty of Agriculture*, 21(1): 116-121.
- Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D. y Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils-a review. *Food Chemical Toxicology*, 46: 446-475
- Bard, M.; Albrecht, M.; Gupta, N.; Guynn, C. y Stilwell, W. 1988. Geraniol interferes with membrane functions in strains of *Candida* and *Saccharomyces*. *Lipids*, 23: 534-538.
- Borrell, J.; Teixido, T. y Borrell, S. 2009. Eficacia de los extractos naturales ricos en anillo cimenol como conservantes de materias primas y alimentos. *Simposium Internacional Biovet*.
- Bozin, B.; Mimica-Dukic, N.; Samojlik, I. y Jovin, E. 2007. Antimicrobial and antioxidant properties of Rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., *Lamiaceae*) essential oils. *Journal Agricultural and Food Chemistry*,

55(19): 7879-7885.

Braga, F.; Bouzada, M. y Fabri, R. 2007. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *Journal of Ethnopharmacological*, 111: 396-402.

Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223-253.

Bluma, R.; Amaiden, M. y Etchevarry, M. 2008. Screening of Argentine plants extracts: impact on growth parameters and aflatoxin B, accumulation by *Aspergillus section flavi*. *International Journal of Food Microbiology*, 122:114-125.

Cardona, M. (ed). 1997. Botánica II. *Ciencias de la naturaleza*. Vol. 5. Editorial Planeta. España.

Carnat, A.; Carnat, A.; Fraisse, D. y Lamaison, J. 1998. The aromatic and polyphenolic composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*) tea. *Pharmaceutica Acta Helveticae*, 72: 301-305.

Casal, M. y Linares, M. 1981. Comparations of six media for production of chlamidospore by *Candida albicans*. *Mycopathology*, 76: 125-128.

Casas, G. 1994. Micología general. Editores de la biblioteca, Caracas.

Castaño, H.; Ciro, G.; Zapata, J. y Jiménez, S. 2010. Actividad bactericida del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis* L. sobre algunas bacterias de interés alimentario. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, 17: 149-154.

Celis, C. 2007. Estudio comparativo de la composición y actividad biológica de los aceites esenciales extraídos de *Lippia alba*, *Lippia origanoides* y *Phyla (Lippia) dulcis*, especies de la familia *Verbenaceae*. Trabajo de grado. Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

Colombo, A.; Nucci, M.; Park, B.; Nouér, S.; Arthington-Skaggs, B.; Da Matta, D.; Warnock, D. y Morgan, J. 2006. For the Brazilian Network Candidemia Study. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *Journal of Clinical Microbiology*, 44: 2816-2823.

Corsello, S.; Spinillo, A.; Osnengo, G.; Penna, C.; Guaschino, S.; Beltrame, A.; Blasi, N. y Festa, A. 2003. An epidemiological survey of vulvovaginal candidiasis in Italy. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology*, 110: 66-72.

Cowen, L.; Anderson, J. y Kohn, L. 2002. Evolution of drug resistance in *Candida albicans*. *Annual Review of Microbiology*, 56: 139-165.

- Cox, S.; Mann, C.; Markham, J.; Bell, H.; Gustafson, J.; Warmington, J. y Wyllie, S. 2000. The Mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*, 88: 170–175.
- Curioni, A. y Arizio, O. 2006. *Plantas aromáticas y medicinales. Labiadas*. Editorial Hemisferio Sur. España.
- De Martino, L.; De Feo, V. y Nazzaro, F. 2009. Chemical composition and in vitro antimicrobial and mutagenic activities of seven lamiaceae essential oils. *Molecules*, 14: 4213-4230.
- Domingo, D. y López, M. 2003. Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Española de Quimioterapia*, 4: 385-393.
- Dorman, H. y Deans, S. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 308-316.
- Fernández, M. y Lombardía, J. 2002. Vulvovaginitis y cervicitis en la práctica diaria. Servicio de ginecología y obstetricia. *Semergen*, 28(1): 15-20
- Ferrer, J. 2000. Vaginal candidosis. Epidemiological and etiological factors. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 71: 7-21.
- Fortún, J. 1998. Antifúngicos: azoles, imidazoles, triazoles. *Medicine*, 7(91): 4231
- Fu, Y.; Zu, Y.; Chen, L.; Shi, X.; Wang, Z.; Sun, S. y Efferth, T. 2007. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. *Phytotherapy Research*, 21(10): 994.
- Guginski, G.; Luiz, A.; Silva, M.; Massaro, M.; Martins, D.; Chaves, J.; Mattos, R.; Silveira, D.; Ferreira, V. y Calixto, J. 2009. Mechanisms involved in the antinociception caused by ethanolic extract obtained from the leaves of *Melissa officinalis* (lemon balm) in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 93: 10-16.
- Hadizadeh, I.; Peivastegan, B. y Kolahi, M. 2009. Antifungal activity of nettle (*Urtica dioica* L.), colocynth (*Citrullus colocynthis* L. Schrad), oleander (*Nerium oleander* L.) and konar (*Ziziphus spina-christil*) extracts on plants pathogenic fungi. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 12: 58-63.
- Hassawi, D. y Kharma, A. 2006. Antimicrobial activity of some medicinal plants against *C. albicans*. *Journal of Biological Sciences*, 6: 109-114.
- Hunter, H. y Raymond, K. 1992. Tratado de candidiasis vaginal. *Antibióticos e Infecciones*, 1: 27-31.

- Kalo-klein, A. y Witkin, S. 1989. *Candida albicans*: celular immune system interactions during different stage of the menstrual cycle. *American Journal of Obstetrics Gynecology*, 161: 1132-1136.
- Krishnamurthy, Y. y Shashiskala, J. 2006. Inhibición of aflatoxin B1 production of *A. flavus*. Isolate from soybean seeds by certain natural products. *Letters Applied Microbiology*, 43: 469-474.
- Kuhn, D.; Mukhejee, P.; Clark, T.; Pujol, C.; Chandra, J. y Hajjeh, R. 2004. *Candida parapsilosis* Characterization in an Outbreak Setting. *Emerging Infectious Diseases*, 10: 1074-1081
- Longbottom, C.; Carson, C.; Hammer, K.; Mee, B. y Riley, T. 2004. Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil is associated with the outer membrane and energy dependent celular processes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54: 386-392.
- Magro, A.; Carolino, M.; Bastos, M. y Mexia, A. 2006. Efficacy of plant extracts against stored products fungi. *Revista Iberoamericana de Micología*, 23: 176-178.
- Mardh, P.; Rodriguez, A.; Genc, M.; Nivikova, N.; Martínez, J. y Guaschino, S. 2002. Facts and myths on recurrent vulvovaginal candidosis: a review on epidemiology, clinical manifestations, diagnosis, pathogenesis and therapy. *International Journal of STD AIDS*, 13: 522-539.
- Martínez, J.; Sulbarán, B.; Ojeda, G.; Ferrer, A. y Nava, R. 2003. Actividad antibacteriana del aceite esencial de mandarina. *Revista de la Facultad de Agronomía (Luz)*. 20: 502-512.
- Matsumura, T.; Kasai, M. y Hayashi, T. 2000.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors from Paraguayan natural medicine, Nangapiry, the leaves of *Eugenia uniflora*. *Pharmaceutical Biology*, 38: 302-307.
- Mendoza, M. 2005. Importancia de la identificación de levaduras. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 25: 13-21.
- Mercier, B.; Prost, J. y Prost, M. 2009. The essential oil of turpentine and its major volatile fraction  $\alpha$  and  $\beta$ - pinenes: a review. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, 22: 331-342.
- Messer, S.; Jones, R. y Fritsche, T. 2006. International surveillance of *Candida* spp. And *Aspergillus* spp.: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (2003). *Journal of Clinical Microbiology*, 44: 1782-1787.
- Molero, G.; Diez, R.; Monje, R.; Navarro, F.; Rios, I. y Martínez, A. 1998. Dimorfismo y

- patogenicidad en *Candida albicans*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 3: 186-187.
- Moreno, S.; Scheyer, T.; Romano, C. y Vojnov, A. 2006. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radical Research*, 40(2): 223-231.
- Nyirjesy, P. 1994. Chronic fungal vaginitis: the value of cultures. *American Journal of Obstetrics Gynecology*, 173(3): 820-823.
- Nyirjesy, P. 2008. Vulvovaginal candidiasis and bacterial vaginosis. *Infectious Disease Clinics of North America*, 22: 637-652.
- Omidbeygi, M., Barzegar, M.; Hamidi, Z. y Nafhdibadi, H. 2007. Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. *Food Control*, 18: 1518-1523.
- Ozcan, M. y Chalchat, J. 2008. Composition and antifungal activity of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) oil from Turkey. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 59(7-8): 691-698.
- Panizo, M.; Reviákina, V.; Dolande, M. y Maldonado, B. 2002. Aislamiento de levaduras en muestras clínicas. Casuística del Departamento de Micología del Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel” (1996-2001). *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 22: 57-63.
- Pereira, R.; Fachineto, R.; Prestes, A.; Puntel, R.; Boschetti, T.; Athayde, M.; Büerguer, M.; Morel, A.; Morsch, V. y Rocha, J. 2009. Antioxidant effects of different extracts from *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita* and *Cymbopogon citratus*. *Neurochemical Research*, 34: 973-983.
- Pfaller, M.; Diekema, D.; Jones, R.; Sader, H.; Fluit, A.; Hollis, R. y Messer, S. 2001. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 3254-3259.
- Pirotta, M.; Gunn, J. y Chondros, P. 2003. Women’s experience of post-antibiotic vulvovaginitis. *Medical Journal Australia*, 179: 43-46.
- Powderly, W. 1994. Resistant candidiasis. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 10(8): 925-929.
- Rasooli, I.; Hadi, M.; Yadegarinia, D.; Gachkar, L.; Allameh, A. y Bagher, M. 2008. Antimycotoxigenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *trachyspermum copticum* L. essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 122: 135-139.

- Rasooli, I. y Mirmostafa, S. 2003. Bacterial susceptibility and chemical composition of essential oils from *Thymus kotschyanus* and *Thymus persicus*. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 51: 2200-2205.
- Reife, C. 1996. Office gynecology for the primary care physician, part I. *Medical Clinics of North America*, 80: 299-319.
- Rippon, J. 1988. *Micología Médica*. Tercera edición. W.B. Saunders Co. Filadelfia, EE.UU.
- Salgueiro, L.; Cavaleiro, C. y Pinto, E. 2003. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Origanum virens* on *Candida* species. *Planta Médica*, 69: 871-874.
- Santoyo, S.; Cavero, S.; Jaime, L.; Ibañez, E.; Señoráns, F. y Reglero, G. 2005. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. *Journal of Food Protection*, 68(4): 790-795.
- Sheary, B. y Dayan, L. 2005. Recurrent vulvovaginal candidiasis. *Australian Family Physician*, 34: 147-150.
- Sikkema, J.; de Bont, J. y Poolman, B. 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 59: 201-222.
- Sitte, P.; Weiler, E.; Kadeiret, J.; Brensinsky, A. y Köner, C. 2004. *Tratado de Botánica*. Treinta y cincoava edición. Editorial Ediciones Omega. España.
- Sobel, J. 1988. Pathogenesis and epidemiology of vulvovaginal candidiasis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 544: 547-557.
- Sobel, J. 1993. Candidal Vulvovaginitis. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 36: 153-212.
- Sobel, J. 2007. Vulvovaginal Candidosis. *The Lancet*, 369: 1961-1971.
- Soliman, K. y Badaea, R. 2002. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food and Chemical Toxicology*, 40(11): 1669-1675.
- Souza, E.; Lima, E.; Freire, K. y Paiva, C. 2005. Inhibitory action of some essential oils and phytochemicals on the growth of various isolated fungi foods. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48(2): 245-250.
- Souza, P.; Storti-Filho, A.; Souza, R.; Damke, E.; Mello, I.; Pereira, M.; Svidizinski, T. y Lopes- consolaro, M. 2009. Prevalence of *Candida* sp. in the cervical vaginal cytology Stained by Harris-Shorr. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 279: 625-629.

Takaki, I.; Bersani-Amado, L.; Vendruscolo, A.; Sartoretto, S.; Diniz, S, Bersani-Amado, C. y Cuman, R. 2008. Anti-inflammatory and anticonceptive effects or *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in experimental animal models. *Journal of Medicinal Food*, 11 (4): 746.

Trofa, D.; Gácsér, A. y Nosanchuk, J. 2008. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 21: 601–625.

Wayne, D. 2002. *Bioestadística*. Cuarta edición. Editorial LIMUSA S.A. México D.F.

Yigit, D.; Yigit, N. y Ozgen, U. 2008. An investigation on the anticandidal activity of some traditional medicinal plants in Turkey. *Journal Compilation Blackwell Publishing Ltd. Mycoses*, 52: 135-140.

## ANEXOS

### ANEXO 1

#### CONSENTIMIENTO VÁLIDO

Bajo la coordinación de la Dra. Sara Centeno, profesora de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, se está realizando el trabajo de grado intitulado ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS DE *Rosmarinus officinalis* (Romero) y *Melissa officinalis* (Toronjil) CONTRA ESPECIES DEL GÉNERO *Candida* AISLADAS DE PACIENTES CON VULVOVAGINITIS.

Yo: \_\_\_\_\_

C.I.: \_\_\_\_\_

Nacionalidad: \_\_\_\_\_

Estado civil: \_\_\_\_\_

Domiciliado en: \_\_\_\_\_

Siendo mayor de edad, en uso pleno de mis facultades y sin que medie coacción ni violencia alguna en completo conocimiento de la naturaleza, forma, duración, propósito, inconvenientes y riesgos relacionados con el estudio médico declaro mediante la presente:

1.- Haber sido informado (a) de manera clara y sencilla por parte del grupo de investigación, de todos los aspectos relacionados con el trabajo de grado intitulado: ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS DE *Rosmarinus officinalis* y *Melissa officinalis* CONTRA ESPECIES DEL GÉNERO *Candida* AISLADAS DE PACIENTES CON VULVOVAGINITIS.

2.- Tener conocimiento claro de que el objetivo del trabajo antes señalado es: evaluar la actividad antifúngica de extractos de *Rosmarinus officinalis* y *Melissa officinalis* contra

especies del género *Candida* aisladas de pacientes con vulvovaginitis que asistan a una consulta ginecológica del Hospital Clínico “San Vicente de Paúl” durante el mes de Febrero del 2011. Cumaná, estado Sucre.

3.- Conocer bien el protocolo experimental expuesto por el investigador en el cual se establece que mi participación en el trabajo consiste en: donar de manera voluntaria la muestra de acuerdo al tipo de infección, la cual será obtenida por el personal especializado y autorizado.

4.- Que la muestra que acepto donar será utilizada única y exclusivamente para estudio micológico.

5.- Que el equipo de personas que realizan esta investigación coordinada por la Dra. Sara Centeno me han garantizado confidencialidad relacionada tanto a mi identidad como a cualquier otra información relativa a mi persona a la que tenga acceso por concepto de mi participación en el trabajo antes mencionado.

6.- Que bajo ningún concepto podré restringir el uso para fines académicos de los resultados obtenidos en el presente estudio.

7.- Que mi participación en dicho estudio no implica riesgos e inconveniente alguno para mi salud o la de mi representado.

8.- Que cualquier pregunta que tenga en relación a este estudio me será respondida oportunamente por parte del equipo antes mencionado, con quienes me puedo comunicar por los teléfonos: (0416) 8381520 con la Br. Greisy Márquez.

9.- Que bajo ningún concepto se me ha ofrecido ni pretendo recibir ningún beneficio de tipo económico producto de los hallazgos que pueda producirse en el referido trabajo de investigación.

## ANEXO 2

### DECLARACIÓN DEL VOLUNTARIO

Luego de haber leído, comprendido y aclarado mis interrogantes con respecto a este formato de consentimiento y por cuanto a mi participación en este estudio es totalmente voluntaria, acuerdo:

1.- Aceptar las condiciones estipuladas en el mismo y a la vez autorizar al equipo de investigadores a realizar el referido estudio en la muestra de secreción vaginal, que acepto donar para los fines indicados anteriormente.

2.- Reservarme el derecho de revocar esta autorización y donación en cualquier momento sin que ello me conlleve algún tipo de consecuencia negativa para mi persona.

Firma del voluntario \_\_\_\_\_

Nombre y Apellido \_\_\_\_\_

C.I.: \_\_\_\_\_

Lugar y fecha \_\_\_\_\_

Firma del testigo \_\_\_\_\_

Nombre y Apellido \_\_\_\_\_

C.I.: \_\_\_\_\_

Lugar y fecha \_\_\_\_\_

Firma del testigo \_\_\_\_\_

Nombre y Apellido \_\_\_\_\_

C.I.: \_\_\_\_\_

Lugar y fecha \_\_\_\_\_

### ANEXO 3

#### DECLARACIÓN DEL INVESTIGADOR

Luego de haber explicado al voluntario la naturaleza del protocolo mencionado, certifico mediante el presente que, a mi leal saber, el sujeto que firma este formulario de consentimiento comprende la naturaleza, requerimientos, riesgos y beneficios de la participación en este estudio. Ningún problema de índole médico, de idioma o de instrucción ha impedido al sujeto tener una clara comprensión de su compromiso con este estudio.

Por el trabajo de grado ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS DE *Rosmarinus officinalis* y *Melissa officinalis* CONTRA ESPECIES DEL GÉNERO *Candida* AISLADAS DE PACIENTES CON VULVOVAGINITIS.

Responsable de la investigación.

---

Br. Greisy C. Márquez R.

---

Dra. Sara Centeno

Lugar y fecha: \_\_\_\_\_

## **HOJAS DE METADATOS**

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/6

<b>Título</b>	ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE <i>Rosmarinus officinalis</i> (ROMERO) y <i>Melissa officinalis</i> (TORONJIL) CONTRA ESPECIES DEL GÉNERO <i>Candida</i> , AISLADAS DE PACIENTES CON VULVOVAGINITIS (Modalidad: Tesis de Grado)
<b>Subtítulo</b>	

Autor(es)

<b>Apellidos y Nombres</b>	<b>Código CVLAC / e-mail</b>	
<b>Márquez Ruiz Greisy Carolina</b>	<b>CVLAC</b>	<b>18.582.570</b>
	<b>e-mail</b>	<b>greisy-lachina@hotmail.com</b>
	<b>e-mail</b>	

**Palabras o frases claves:**

Vulvovaginitis, Candidosis, <i>Rosmarinus officinalis</i> , <i>Melissa officinalis</i> .

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/6

### Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Bioanálisis

El objetivo de esta investigación fue evaluar la actividad antifúngica de los extractos de *Rosmarinus officinalis* y *Melissa officinalis* contra especies del género *Candida* aisladas de pacientes con vulvovaginitis. De las 36 muestras tomadas, 12 resultaron positivas al cultivo micológico (33,33%), cuyas pruebas bioquímicas lograron identificarlas como *Candida albicans* (27,77%), *Candida parapsilosis* (2,78%) y *Candida famata* (2,78%). Se obtuvieron extractos de *Rosmarinus officinalis* y *Melissa officinalis* utilizando etanol al 80,00%. Se determinó la actividad antifúngica de los extractos colocando discos de papel impregnados con el respectivo extracto sobre placas de agar papa dextrosa (APD) previamente diseminadas con la suspensión de células levaduriformes. Posteriormente, los halos de inhibición fueron medidos. La concentración mínima inhibitoria (CMI) se llevó a cabo mezclando 100 µl de los extractos en placas con micropozos que contenían, 100 µl de caldo Sabouraud dextrosa y 50 µl de la suspensión de células, correspondiendo la concentración al micropozo con la mayor dilución que no mostrara crecimiento fúngico. De acuerdo a los resultados obtenidos de la actividad antifúngica, ambos extractos presentaron propiedades antifúngicas sobre las especies del género *Candida* aisladas; aunque el extracto de *Melissa officinalis* produjo halos de inhibición de mayor diámetro. La CMI del extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis* se observó en su mayoría en la dilución 1:2,5 para las cepas de *Candida albicans* (DB-Ca 01, DB-Ca 02, DB-Ca 03, DB-Ca 05, DB-Ca 06, DB-Ca 07, DB-Ca 08, DB-Ca 09, DB-Ca 10) y para *Candida famata*(DB-Cf 01), correspondiendo esto a una concentración de 89,65 mg/ml. La cepa de *Candida albicans* (DB-Ca 04) y *Candida parapsilosis*(DB-Cp 01) fueron inhibidas por este extracto a concentraciones de 11,2 mg/ml y 44,82 mg/ml, respectivamente. Sin embargo, el extracto acuoso de *Melissa officinalis* inhibió a 7 cepas de *Candida albicans* y a *Candida famata* en una dilución 1:5, cuya concentración era de 44,00 mg/ml, mientras que a *Candida parapsilosis*(DB-Cp 01) y a las cepas de *Candida albicans* (DB-Ca 01, DB-Ca 02 y DB-Ca 03), las inhibió en la dilución 1:2,5 siendo la concentración de 88,00 mg/ml. De acuerdo a estos resultados se puede concluir que ambos extractos poseen propiedades antifúngicas contra diversas especies del género *Candida* aisladas de pacientes con vulvovaginitis.

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/6

### Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
<b>Dra. Centeno Sara</b>	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> J <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input checked="" type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	5.702.407
	e-mail	Sara.centeno@gmail.com
	e-mail	
<b>Profa: Parra Evis</b>	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> J <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	10.947.421
	e-mail	eviespin@hotmail.com
	e-mail	
<b>Profa: Díaz Josefa</b>	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> J <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	5.007.425
	e-mail	diazvv@gmail.com
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

**Año Mes Día**

<b>2012</b>	<b>11</b>	<b>16</b>
-------------	-----------	-----------

Lenguaje: SPA \_\_\_\_\_

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/6

### Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis-marquezg.doc	Aplication/word

### Alcance:

Espacial:

Internacional

Temporal:

Temporal

**Título o Grado asociado con el trabajo:** Licenciado (a) en Bioanálisis

**Nivel Asociado con el Trabajo:** Licenciado (a)

**Área de Estudio:** Bioanálisis

**Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:** Universidad de Oriente

# Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/6



UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
CONSEJO UNIVERSITARIO  
RECTORADO

CU N° 0975

Cumaná, 04 AGO 2009

Ciudadano  
**Prof. JESÚS MARTÍNEZ YÉPEZ**  
Vicerrector Académico  
Universidad de Oriente  
Su Despacho

Estimado Profesor Martínez:

Cumplo en notificarle que el Consejo Universitario, en Reunión Ordinaria celebrada en Centro de Convenciones de Cantaura, los días 28 y 29 de julio de 2009, conoció el punto de agenda **"SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN PARA PUBLICAR TODA LA PRODUCCIÓN INTELECTUAL DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UDO, SEGÚN VRAC N° 696/2009"**.

Leído el oficio SIBI – 139/2009 de fecha 09-07-2009, suscrita por el Dr. Abul K. Bashirullah, Director de Bibliotecas, este Cuerpo Colegiado decidió, por unanimidad, autorizar la publicación de toda la producción intelectual de la Universidad de Oriente en el Repositorio en cuestión.

Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
SISTEMA DE BIBLIOTECA  
RECIBIDO POR *[Firma]*  
FECHA 5/8/09 HORA 5:30

Cordialmente,

*[Firma]*  
JUAN A. BOLAÑOS CUMBELO  
Secretario

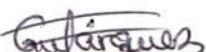


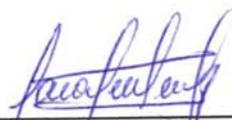
C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación de Telemática, Coordinación General de Postgrado.

JABC/YGC/maruja

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso- 6/6

**Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (vigente a partir del II Semestre 2009, según comunicación CU-034-2009) :** “los Trabajos de Grado son de la exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y sólo podrán ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Consejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Consejo Universitario para su autorización”.

  
**Br. Greisy Márquez**  
Autor (a)

  
**Dra. Sara Centeno**  
Asesor (a)

**POR LA COMISIÓN DE TRABAJO DE GRADO**

