



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

INFORME DE INVESTIGACIÓN SOBRE:

**“EVALUACIÓN ANTIFÚNGICA Y ANTI BIOFILM DE ACEITES
ESENCIALES EN CANDIDA ALBICANS ATCC 10231”**

Requisito previo para optar por el Título de Licenciada en Laboratorio Clínico

Autora: Acosta Acosta, Lissette Estefania

Tutora: PhD. Proaño Pérez, María Elizabeth

Ambato – Ecuador

Junio 2026

APROBACIÓN DEL TUTOR

En mi calidad de Tutora del Trabajo de Investigación sobre el tema: **“EVALUACIÓN ANTIFÚNGICA Y ANTI BIOFILM DE ACEITES ESENCIALES EN CANDIDA ALBICANS ATCC 10231”** de la Srta. Acosta Acosta Lissette Estefania estudiante de la Carrera de Laboratorio Clínico, considero que reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometida a la evaluación del jurado examinador designado por el H. Consejo Directivo de la Facultad de Ciencias de la Salud.

Ambato, Junio 2026

LA TUTORA

PhD. Proaño Pérez, María Elizabeth

AUTORIA DE TRABAJO DE GRADO

Los criterios emitidos en el Trabajo de investigación sobre:

“EVALUACIÓN ANTIFÚNGICA Y ANTI BIOFILM DE ACEITES ESENCIALES EN CANDIDA ALBICANS ATCC 10231” como también los contenidos, ideas, objetivos, análisis, conclusiones y futura aplicación del trabajo de investigación son de exclusiva responsabilidad de mi persona, como autora de este trabajo de grado.

Ambato, Junio 2026

LA AUTORA

Acosta Acosta, Lissette Estefania

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este proyecto de investigación o parte de él un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación.

Cedo los derechos en línea patrimoniales de mi tesis con fines de difusión pública; además apruebo la reproducción de este proyecto de investigación, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autora.

Ambato, Junio 2026

LA AUTORA

Acosta Acosta, Lissette Estefania

APROBACION DEL JURADO EXAMINADOR

Los miembros del Tribunal Examinador aprueban el Informe de Investigación sobre el tema **“EVALUACIÓN ANTIFÚNGICA Y ANTI BIOFILM DE ACEITES ESENCIALES EN CANDIDA ALBICANS ATCC 10231”** de Acosta Acosta Lissette Estefania, estudiante de la Carrera de Laboratorio Clínico

Ambato, Junio 2026

Para constancia firman

.....
PRESIDENTE

.....
1er VOCAL

.....
2do VOCAL

DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación va dedicado a todas aquellas personas que han pasado por mi vida, porque, aunque hayan partido, siguen estando en cada recuerdo, en cada enseñanza y en cada latido de mi corazón. Su amor, apoyo y legado han sido fundamentales en mi formación personal y profesional.

Quiero dedicarlo especialmente a mis padres: Azucena Acosta, mujer valiente que no se rinde nunca a pesar de las adversidades y que de ella aprendí que cada esfuerzo tiene su recompensa al final; y a mi padre, William Acosta, por enseñarme que cada caída representa una oportunidad para aprender. Gracias a ambos por su amor incondicional, por caer siempre en mí, y por acompañarme en cada paso de mi carrera.

A mis hermanos Alex y Belen, quienes han estado a mi lado en cada etapa de este camino. Gracias por su apoyo incondicional, por su apoyo paciencia y por estar siempre presentes cuando más los necesité. De manera especial, agradezco la ayuda que me brindaron con el cuidado de mi hija durante aquellos momentos en los que debía dedicar largas horas al estudio. Gracias por las risas, los momentos compartidos y por hacer que este proceso fuera más llevadero; sin ustedes, el peso de la carrera habría sido mucho más difícil de sobrellevar.

A mis tíos Milton, Danilo, Alex, Gaby, Paulina, Patty y Vilma, quienes constituyen una parte esencial en mi vida. Gracias por cada abrazo, cada consejo, cada palabra de aliento y cada momento de alegría que compartieron conmigo. Incluso en los momentos más difíciles de mi vida, siempre estuvieron dispuestos a sostenerme, apoyarme y ayudarme a seguir adelante. Su cariño y apoyo fueron fundamentales para alcanzar este logro.

A mi hija, Alaia Sofía, el motor de mi vida y la razón más sangre de mi esfuerzo. Llegaste para llenar mi vida de felicidad y darle un propósito aún más profundo a cada uno de mis sueños. Gracias por acompañarme en tantas noches de desvelo y por ser mi inspiración constante. Aun siendo tan pequeña, con un abrazo o una sonrisa me recordabas que debía seguir adelante. Este logro también es tuyo, porque fuiste mi fuerza en los momentos más complicados.

Finalmente, a mis amigos Sofi, Eve, Natasha, Brayan, Mela y Cris, quienes me acompañaron durante el transcurso de la carrera. Gracias por compartir conmigo momentos de alegría, tristeza, estrés, incertidumbre y aprendizaje. Su amistad, compañía y apoyo hicieron posible que este camino sea llevadero. Agradezco especialmente aquellas ocasiones en las que, con una palabra de aliento o un abrazo sincero, me ayudaron a no rendirme durante los momentos más difíciles de mi vida. Gracias por ser mis compañeros, mis cómplices y

una parte invaluable de esta etapa que hoy culmina con éxito.

Con profundo amor y gratitud, dedico este logro a cada una de las personas que han contribuido, de una u otra manera, a mi crecimiento personal y profesional.

Acosta Acosta, Lissette Estefania

AGRADECIMIENTO

“Pon en manos del Señor todas tus obras, y tus proyectos se cumplirán” - Proverbios 16:3.

Agradezco primeramente a Dios por ser mi guía y mi fortaleza. Como dice este proverbio puse en sus manos cada obra, cada esfuerzo y cada desvelo para llegar a culminar esta etapa, y él ha sido fiel para que este proyecto se cumpla. Sin él, nada de esto habría sido posible.

Doy infinitas gracias a mi familia por apoyarme en cada etapa de esta carrera; gracias a ellos supere cada desafío, siempre con su ayuda, amor incondicional y sus palabras de aliento para no rendirme han hecho que esta etapa que esta por culminar sea un logro también de ellos, ya que han sido el pilar fundamental desde que inicie la carrera.

Al grupo de investigación conformado por el Ing. Bq. PhD. Alberto Bustillos, la Lcda. PhD. Elizabeth Proaño, el Ing. PhD. Orestes López y el Bq. F. Mg. Víctor Guangasig, gracias por la confianza y la oportunidad de formar parte del proyecto “Evaluación de la actividad antimicrobiana y antibiofilm de aceites esenciales microencapsulados”, con Resolución Nro. UTA-

CONIN2024-0025-R. Su colaboración, entusiasmo y compromiso hicieron de este proceso una experiencia enriquecedora y significativa.

Un agradecimiento muy especial a mi tutora, la Lcda. PhD. Elizabeth Proaño, por acompañarme paso a paso, por resolver cada problema con paciencia de artesana durante la parte experimental del proyecto, celebro cada pequeño avance como si fuera suyo, cuando todo parecía derrumbarse, siempre tuvo una palabra o una solución. Me enseñó que investigar es, sobre todo un acto de amor.

Agradezco también, a la Lcda. Mg. Johanna Pérez; por sus consejos y su ayuda hasta el final antes de que iniciara este proyecto. Gracias por su paciencia, y por escucharme cuándo más lo necesitaba, porque incluso en el momento en donde atravesaba una situación difícil, siempre tuvo palabras para motivarme y que no me rindiera, gracias por ser un soporte firme al comenzar la etapa final de la carrera.

A mi compañera de laboratorio, Karen Natasha Maliza Morales, quien siempre estuvo ahí para apoyarme o motivarme a seguir adelante, cuando las cosas no parecían ir bien, sin ella la parte experimental no hubiera sido lo mismo. Gracias, por enseñarme que la amistad sincera y sin envidia sí existe, por tus ocurrencias, por tus chistes e

incluso por hacer de los días largos en el laboratorio no se sientan menos pesados y por tener una palabra de apoyo para mí en todo momento.

De la misma manera, un agradecimiento a la Lcda. Lilian Medina, por el apoyo brindado en el desarrollo de la parte experimental de esta investigación, gracias por siempre ayudarme o responderme cualquier duda, aunque haya sido mínima, su apoyo fue de gran ayuda para la culminación de esta etapa.

Y, por último, un agradecimiento profundo a quien fue como mi segundo tutor para mí durante el desarrollo de esta investigación: al ahora Lcdo. Jefferson Acurio. Gracias por enseñarme que no hay que ser egoísta con el conocimiento; si sabes algo y puedes enseñarlo, hazlo. Gracias por tu paciencia y tu tiempo, porque incluso después de estar graduado siempre estuviste presente para ayudarnos o explicarnos, aunque fuera la pregunta más simple, porque incluso cuando no confiaba en mí misma siempre decías si puedes, si te va a salir, y por último gracias por celebrar y alegrarte por los logros obtenidos durante la parte experimental y por siempre tener una palabra para motivarme y no rendirme durante este proceso.

Acosta Acosta, Lissette Estefania

ÍNDICE GENERAL

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
AUTORIA DE TRABAJO DE GRADO.....	iii
DERECHOS DE AUTOR	iv
APROBACION DEL JURADO EXAMINADOR.....	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTO	ix
INDICE DE TABLAS	xv
ÍNDICE DE GRÁFICOS	xvii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xviii
RESUMEN.....	xix
SUMMARY	xx
INTRODUCCIÓN	1
JUSTIFICACIÓN	2
CAPITULO 1	4
1.1. Antecedentes de investigación.....	4
1.2. Objetivos	10
1.2.1. Objetivo General.....	10
1.2.2. Objetivos específicos	10
CAPITULO II	11
METODOLOGÍA	11
2.1. Materiales	11
2.1.1. Medios de cultivo:.....	11
2.1.2. Instrumentos:	11

2.1.3. Aceites esenciales	13
2.1.4. Cepas de referencia.....	13
2.1.5. Polímeros	13
2.2. Reactivos	13
2.3. Equipos.....	14
2.4. Métodos.....	16
2.4.1. Tipo de investigación.....	16
2.4.2. Población y muestra.....	16
2.4.3. Criterios de inclusión y exclusión.....	16
2.4.4. Hipótesis de investigación	17
2.4.5. Variables de estudio.....	17
2.4.6. Procedimiento para el análisis de laboratorio.....	17
2.4.6.1. Microencapsulación de los aceites esenciales	17
2.4.6.2. Obtención de cepa y actividad antifúngica	18
2.4.6.3. Determinación de pureza de microorganismos.....	18
2.4.6.4. Técnica de Kirby-Bauer modificado	19
2.4.6.5. Concentración mínima inhibitoria (CMI)	21
2.4.6.6. Determinación de la concentración mínima fungicida (CMF)	23
2.4.6.7. Tinción Cristal Violeta	24
2.4.6.8. Determinación de la actividad anti-biopelícula.	25
2.4.6.9. Extracción de ADN.....	26
CAPITULO III	33
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
3.1. Análisis de resultados	33
3.1.1. Control de calidad microencapsulado.....	33

3.1.2.	Actividad antifúngica con técnica de Kirby-Bauer modificada en pocillo.	35
3.1.3.	Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Fungicida	38
3.1.4.	Formación de biopelícula de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.....	42
3.1.5.	Actividad antibiopelícula del aceite esencial microencapsulado de canela.	43
3.1.6.	Actividad antibiopelícula del aceite esencial microencapsulado de canela	44
3.1.7.	Detección de genes asociados a la formación y regulación de biopelícula en <i>C. albicans</i> ATCC 10231	46
3.1.8.	Selección de concentraciones del aceite esencial para purificación del ARN.....	47
3.1.9.	Retrotranscriptasa inversa y reacción de la cadena de la polimerasa convencional	48
3.2.	Discusión	50
3.3.	Verificación de la hipótesis	53
3.3.1.	Hipótesis	53
3.3.2.	Análisis	54
3.3.3.	Comprobación de la hipótesis.....	58
CAPITULO IV.....		59
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		59
4.1.	Conclusiones	59
4.2.	Recomendaciones	60
Referencias Bibliográficas		62
ANEXOS		71

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Reacción de retro transcripción	29
Tabla 2. Componentes de la máster mix para PCR convencional.....	30
Tabla 3. Actividad antifúngica del aceite esencial microencapsulado de canela frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.....	36
Tabla 4. Actividad antifúngica del aceite esencial microencapsulado de Hierba Luisa frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	37
Tabla 5. Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial microencapsulado de canela frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.	39
Tabla 6. Concentración Mínima Fungicida del aceite esencial microencapsulado de canela frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	40
Tabla 7. Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial microencapsulado de Hierba Luisa frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	41
Tabla 8. Concentración Mínima Fungicida del aceite esencial microencapsulado de Hierba Luisa frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	42
Tabla 9. Criterios de clasificación para la formación de biopelícula	42
Tabla 10. Criterios de cepas bacterianas según la capacidad de formación de biopelícula.....	43
Tabla 11. Porcentaje de inhibición de biopelícula de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 frente al aceite esencial microencapsulado de canela	43

Tabla 12. Porcentaje de inhibición de biopelícula de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 frente al aceite esencial microencapsulado de Hierba Luisa.	45
Tabla 13. Concentraciones del aceite esencial microencapsulado de canela y hierba luisa para la purificación del ARN	48
Tabla 14. Validación de hipótesis del aceite esencial microencapsulado de canela	54
Tabla 15. Validación de hipótesis del aceite esencial microencapsulado de hierba luisa.....	55
Tabla 16. Validación de hipótesis del aceite esencial microencapsulado de canela	56
Tabla 17. Validación de hipótesis del aceite esencial microencapsulado de hierba luisa.....	57

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Figura 1. Obtención de la cepa de trabajo.....	19
Figura 2. Preparación de las diluciones.....	20
Figura 3. Distribución de los pocillos en la caja petri	21
Figura 4. Formación de biofilm <i>Candida albicans</i>	24
Figura 3. Espectro de bandas de infrarrojo de Canela (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>). A. Aceite esencial puro de <i>Cinnamomum zeylanicum</i> ; B. Aceite esencial microencapsulado de <i>Cinnamomum zeylanicum</i> ; C. Superpuestos de la mezcla polimérica, aceite esencial puro y microencapsulado.	33
Figura 4. Espectro de bandas de infrarrojo de Hierba Luisa (<i>Cymbopogon citratus</i>). A. Aceite esencial puro de <i>Cymbopogon citratus</i> ; B. Aceite esencial microencapsulado de <i>Cymbopogon citratus</i> ; C. Superpuestos de la mezcla polimérica, aceite esencial puro y microencapsulado.....	35
Figura 5. Actividad antifúngica del aceite esencial microencapsulado de canela frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	36
Figura 6. Actividad antifúngica del aceite esencial microencapsulado de Hierba Luisa frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	38
Figura 7. Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial microencapsulado de canela frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	39
Figura 8. Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial microencapsulado de Hierba Luisa frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.....	41
Figura 9. Inhibición de biopelícula de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 frente al aceite esencial microencapsulado de canela	44
Figura 10. Inhibición de biopelícula de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 frente al aceite esencial microencapsulado de Hierba Luisa.	45
Figura 11 . Identificación del gen <i>SPA3</i> , <i>ACT1</i> y <i>HWP1</i> en <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	47

Figura 12. Amplificación de genes en diferentes concentraciones del aceite esencial microencapsulado de canela y hierba luisa.....	49
---	----

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Procedimiento de viabilidad con resazurina al 0.01 %	71
Anexo 2. Diseño experimental para la evaluación de la actividad anti – biopelícula de aceites esenciales.....	71
Anexo 3. Difusión en pocillo de AE <i>Cinnamomum zeylanicum</i> (Canela) de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.....	72
Anexo 4. Difusión en pocillo de AE <i>Cymbopogon flexuosus</i> (Hierba luisa) de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.....	72
Anexo 5. Viabilidad con resazurina al 0,01% de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231....	73
Anexo 6. Concentración Mínima Fungicida de AE <i>Cinnamomum zeylanicum</i> (Canela) de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	73
Anexo 7. Concentración Mínima Bactericida de <i>Cymbopogon flexuosus</i> (Hierba luisa) de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.	74
Anexo 8. Aprobación tema y tutor.....	76

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

“EVALUACIÓN ANTIFÚNGICA Y ANTI BIOFILM DE ACEITES
ESENCIALES EN *CANDIDA ALBICANS* ATCC 10231”

Autora: Acosta Acosta, Lissette Estefania

Tutora: PhD. Proaño Pérez, María Elizabeth

Fecha: Junio, 2026

RESUMEN

Candida albicans es considerada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) un patógeno de prioridad crítica, asociado a elevadas tasas de mortalidad intrahospitalarias, especialmente en pacientes inmunocomprometidos. Su capacidad de formar biopelículas incrementa la resistencia a los antifúngicos convencionales entre 100 y 1000 veces, y la expresión de genes como *HWP1* y *SAP3* facilitan la adhesión, degradación y maduración de estas estructuras limitando severamente las opciones terapéuticas disponibles.

El objetivo fue evaluar la actividad antifúngica y antibiofilm de los aceites esenciales de canela y hierba luisa frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Se empleó un enfoque cuantitativo y experimental utilizando difusión en pocillo, CMI, CMF, tinción con cristal violeta y RT-PCR. La canela presentó una CMI de 1,56 mg/mL y la hierba luisa de 3,12 mg/mL. La cepa mostró una débil formación de biopelícula (OD=0,585). La hierba luisa inhibió hasta el 99,87% del biofilm y la canela alcanzó el 92,81%. Ambos aceites suprimieron completamente la expresión del gen *HWP1* a 50 mg/mL. Se concluye que los aceites esenciales evaluados poseen potencial antifúngico y antibiofilm, constituyendo una alternativa natural frente a infecciones por *Candida albicans*.

PALABRAS CLAVES: ACEITE ESENCIAL, *CINNAMOMUM ZEYLANICUM*, *CYMBOPOGON FLEXUOSUS*, *CANDIDA ALBICANS*, BIOPELÍCULA, ANTIFÚNGICO.

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
CARRERA DE LABORATORIO CLINICO

“ANTIFUNGAL AND ANTI-BIOFILM EVALUATION OF ESSENTIAL
OILS IN CANDIDA ALBICANS ATCC 10231”

Author: Acosta Acosta, Lissette Estefania

Tutora: PhD. Proaño Pérez, María Elizabeth

Date: Junio, 2026

SUMMARY

Candida albicans is considered by the World Health Organization (WHO) to be a critical priority pathogen, associated with high rates of in-hospital mortality, especially in immunocompromised patients. Its ability to form biofilms increases resistance to conventional antifungals by 100 to 1000 times, and the expression of genes such as HWP1 and SAP3 facilitate the adhesion, degradation, and maturation of these structures, severely limiting available therapeutic options.

The objective was to evaluate the antifungal and antibiofilm activity of cinnamon and lemon verbena essential oils against Candida albicans ATCC 10231. A quantitative and experimental approach was used, employing well diffusion, MIC, MFC, crystal violet staining, and RT-PCR. Cinnamon showed an MIC of 1.56 mg/mL and lemon verbena of 3.12 mg/mL. The strain exhibited weak biofilm formation (OD=0.585). Lemon verbena inhibited up to 99.87% of the biofilm, and cinnamon reached 92.81%. Both oils completely suppressed HWP1 gene expression at 50 mg/mL. It is concluded that the evaluated essential oils possess antifungal and antibiofilm potential, constituting a natural alternative against Candida albicans infections.

KEYWORDS: ESSENTIAL OIL, *CINNAMOMUM ZEYLANICUM*, *CYMBOPOGON FLEXUOSUS*, *CANDIDA ALBICANS*, BIOFILM, ANTIFUNGAL.

INTRODUCCIÓN

La candidiasis causada por *Candida albicans* constituye una de las infecciones fúngicas oportunistas más frecuentes a nivel mundial, especialmente en pacientes inmunocomprometidos y hospitalizados (1,2). La capacidad de este microorganismo para formar biopelículas y expresar factores de virulencia asociados a la adhesión e invasión tisular favorece la persistencia de la infección y disminuye la eficacia de los tratamientos antifúngicos convencionales (2–4). Además, el incremento de la resistencia a fármacos como los azoles ha impulsado la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas con mayor eficacia y menor riesgo de generar resistencia (2–4).

En este contexto, diversos estudios han demostrado que los aceites esenciales poseen compuestos bioactivos con actividad antifúngica y capacidad para interferir en la formación de biopelículas. Por ello, la presente investigación tuvo como objetivo evaluar la actividad antifúngica y antibiofilm de los aceites esenciales de *Cymbopogon flexuosus* (hierba luisa) y *Cinnamomum zeylanicum* (canela) frente a *Candida albicans* ATCC 10231.

Para el desarrollo del estudio se empleó un enfoque cuantitativo y experimental, utilizando técnicas microbiológicas y moleculares. Se determinó la actividad antifúngica mediante ensayos de susceptibilidad, concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima fungicida (CMF). Además, se evaluó la formación de biopelículas mediante la técnica colorimétrica de cristal violeta y se analizó la expresión de genes de virulencia relacionados con este proceso.

Los resultados evidenciaron que ambos aceites esenciales presentaron actividad antifúngica frente a *Candida albicans*; sin embargo, el aceite esencial de canela mostró una mayor eficacia inhibitoria sobre el crecimiento fúngico y la formación de biopelículas. Asimismo, se observó una disminución en la expresión de genes, destacándose la inhibición del gen *HWP1*, relacionado con la adhesión y el desarrollo de biopelículas.

Estos hallazgos sugieren que los aceites esenciales de canela y hierba luisa constituyen alternativas naturales prometedoras para el control de infecciones causadas por *Candida albicans*, aportando evidencia científica que podría contribuir al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas frente a la creciente resistencia antifúngica.

JUSTIFICACIÓN

La resistencia antifúngica se ha consolidado como una de las amenazas más críticas para la salud pública a nivel global. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), existe una grave escasez de medicamentos antifúngicos y métodos de diagnóstico, lo que limita la atención de micosis invasivas las cuales pueden alcanzar tasas de mortalidad de hasta el 88% e patógenos prioritarios (2,3,5,6). En este contexto, *Candida albicans* destaca por su trascendencia clínica, especialmente en pacientes inmunocomprometidos o con estancias prolongadas en unidades de cuidados intensivos, en estas unidades las infecciones pueden progresar a formas sistémicas con una mortalidad intrahospitalaria que oscila entre el 20% y el 50% (7)

La complejidad de este patógeno radica no solo es su perfil de resistencia, sino también en su capacidad para formar biopelículas. Las cuales son estructuras que actúan como una barrera física y biológica, ya que por medio de esta barrera se incrementa la tolerancia a los antifúngicos convencionales entre 100 y 1000 veces en comparación con las células que se encuentran en estado libre (8,9). La persistencia de estas biopelículas está regulada por la expresión de genes clave, como SAP3 y HWP1, los cuales facilitan la adhesión y maduración del biofilm, dejando a los esquemas terapéuticos que se utilizan actualmente en una posición de vulnerabilidad extrema (10,11).

Ante la necesidad imperativa de hallar alternativas terapéuticas más seguras y eficaces, la investigación de productos con compuestos naturales surge como una vía estratégica. A diferencia de los antifúngicos sintéticos como los azoles y polienos los aceites de *Cymbopogon flexuosus* (hierba luisa) y *Cinnamomum zeylanicum* (canela) han mostrado un potencial prometedor debido a su capacidad para inhibir tanto el crecimiento fúngico como la formación de biopelículas (8,9).

Por lo que, en América latina, *C. albicans* es el patógeno más frecuente, por lo que se ha observado que hay un incremento en la prevalencia en la infancia con el 35,1% y adultos mayores con un porcentaje 42,6%, predominando el sexo masculino. Además, factores como la hospitalización con el 20% y en el tiempo de estancia 33.5% son los

que influyen en la morbilidad. Por lo que, la resistencia es más común frente al fluconazol, y la mortalidad es elevada, marcadamente en adultos mayores (12). En países como Ecuador la biodiversidad vegetal ofrece una base estratégica para la búsqueda de nuevos compuestos; sin embargo, el potencial de los productos naturales como agentes anti-biofilm mediante enfoques moleculares aún no han sido ampliamente estudiados (5,13).

La factibilidad de este trabajo se sustenta en el empleo de metodologías estandarizadas y reproducibles, incluyendo la técnica de Kirby.Bauer modificada, el ensayo de resazurina para evaluar la viabilidad metabólica y la tinción de cristal violeta para la cuantificación de biopelículas. Además de la integración de técnicas moleculares las cuales permiten analizar con precisión la expresión genética de los siguientes genes ACT1, HWP1 y SAP3 (14). Por lo expuesto, el objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad antifúngica y antibiofilm de los aceites esenciales de *Cymbopogon flexuosus* y *Cinnamomum zaylanicum* frente a *Candida albicans* ATCC 10231.

CAPITULO 1

1.1.Antecedentes de investigación

Las investigaciones recientes sobre *Candida albicans* han abordado cuatro ejes principales: la resistencia a los antifúngicos, la formación de biopelículas, la identificación clínica de las especies y el estudio de compuestos naturales con actividad antifúngica (15). Esta línea de trabajo ha permitido demostrar que la persistencia de las infecciones por *Candida* se relaciona con mecanismos moleculares de resistencia y con la capacidad del microorganismo para organizarse en biofilms, estructuras que reducen la eficacia terapéutica ((16). A partir de ello, distintos autores han evaluado aceites esenciales y extractos vegetales como alternativas experimentales para inhibir el crecimiento, la virulencia y la formación de biopelículas en cepas de referencia y de interés clínico, lo que constituye el marco inmediato del presente estudio (17).

Kaur y Nobile (2023), en el trabajo “*Antifungal drug-resistance mechanisms in Candida biofilms*”, analizó los mecanismos de resistencia en biopelículas de *Candida*. Su objetivo fue analizar los mecanismos de resistencia presentes en estas estructuras, partiendo de la base de que la biopelícula constituye una condición biológica distinta a la célula planctónica libre. La metodología correspondió a una revisión sistemática de literatura y datos experimentales en los cuales se integró estudios con microplacas de 96 pozos, tinción con cristal violeta, microscopía confocal láser y pruebas de susceptibilidad antifúngica. Como resultados, se identificaron que las biopelículas pueden incrementar la resistencia entre 100 y 1000 veces frente a fármacos como el fluconazol debido a la matriz extracelular y a la heterogeneidad celular. Concluyeron que este mecanismo compromete seriamente el control y eficacia terapéutica de las infecciones por *Candida*; por lo tanto, la presente investigación busca evaluar la *actividad antifúngica y antibiofilm en Cándida albicans ATCC 10231*, con el fin de superar las limitaciones terapéuticas reportadas en biopelículas maduras ((16).

Karpiński et al. (2023), en el estudio “*Anti-Candida and Antibiofilm Activity of Selected Lamiaceae Essential Oils*”. Se propuso evaluar la actividad antifúngica y antibiofilm de varios aceites esenciales de la familia *Lamiaceae*, asumiendo que algunos compuestos vegetales podrían inhibir el crecimiento, la biomasa de biofilm en

Candida. El diseño metodológico consistió en la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), mediante métodos de micro dilución en caldo y la evaluación de la formación de biopelículas en placas de poliestireno de 96 pozos mediante la técnica colorimétrica de cristal violeta para la cuantificación de la biomasa. Los hallazgos más relevantes indicaron que los aceites de *Thymus vulgaris* y *Origanum vulgare* mostraron una eficacia superior, de esta manera registrando valores de CMI menores a 3,125 mg/mL y una reducción superior al 70 % de la biomasa con *Thymus vulgaris* y *Origanum vulgare*. Los autores concluyeron que estos aceites poseen marcada actividad antifúngica y antibiofilm frente al patógeno estudiado, por lo tanto, la presente investigación busca evaluar el aceite esencial de canela y hierba luisa para un análisis de biopelículas y crecimiento fúngico, con el fin de comparar la eficacia con los rangos reportados y así determinar el potencial específicamente frente a *Candida albicans* ATCC 10231 (17).

Adiana et al. (2025), en el estudio *Antimicrobial and Anti-Biofilm Effectiveness of Saurauia vulcani Korth. Ethanolic Extract: An In Vitro Study of Staphylococcus aureus ATCC 25923 and Candida albicans ATCC 10231*. Se enfocó en investigar el potencial que presentan los extractos naturales capaces de inhibir microorganismos resistentes y formadores de biopelículas. Su objetivo fue evaluar la actividad antimicrobiana y antibiofilm del extracto etanólico obtenido de las hojas de *Saurauia vulcani*, de esta manera el diseño metodológico se evaluó mediante técnicas de difusión en agar, microdilución en caldo para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). Asimismo, la eficacia de antibiofilm se determinó a través de ensayos en placas de poliestireno utilizando la técnica colorimétrica de cristal violeta para medir la biomasa residual. Los resultados evidenciaron que el extracto vegetal alcanzó una reducción superior al 50 % en la biomasa del biofilm y una inhibición notable del crecimiento celular a concentraciones medias frente a los patógenos evaluados. Los investigadores concluyeron que el extracto vegetal de *S. vulcani* representa una alternativa prometedora para el desarrollo de nuevas terapéuticas, por ende, el tema de la presente investigación busca realizar una evaluación antifúngica y anti-biofilm en *Candida albicans* ATCC 10231, con el fin de comparar estos niveles de eficacia y así superar las limitaciones terapéuticas de fármacos comunes y así generar evidencia para nuevas investigaciones experimentales (18).

En el estudio realizado por Adeola Tawakalitu Kola-Mustapha et al. (2026), titulado *Essencial oil hydrogels for oral candidiasis: preliminary formulation development, antifungal efficacy, and computational analysis via Monte Carlo simulation*, se evaluó la actividad antifúngica de los aceites esenciales de *Syzygium aromaticum* y *Cymbopogon flexuosus* frente a 14 aislados clínicos y la cepa de referencia de *Candida albicans* ATCC 10231. En el diseño metodológico los autores emplearon el método de microtitulación en donde determinaron que ambos aceites esenciales presentaron una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 100 uL/mL y una concentración mínima fungicida entre 100 y 200 uL/mL dependiendo del aislado analizado. De la misma manera, la combinación de estos dos compuestos naturales en una proporción de 2:1 mostró que los aceites esenciales presentan un afecto aditivo con un porcentaje del 71,43% de los aislados evaluados en este estudio, por lo que los autores obtuvieron un índice de concentración inhibitoria fraccional (FICI) de 0,75. Finalmente, los aceites fueron incorporados en hidrogeles, en los cuales los autores evidenciaron que poseen una mayor actividad antifúngica frente a *Candida albicans*. Por lo que los autores concluyeron que estos compuestos naturales frente a los 14 aislados clínicos destacan un potencial terapéutico para el tratamiento localizado en candidiasis oral (19).

Cruz Choappa y Vieille (2023), en la revisión titulada *Nuevos nombres para antiguas especies fúngicas de importancia médica*, estudiaron el problema de la actualización taxonómica de especies fúngicas de interés médico, entre ellas las pertenecientes al género *Candida*. El objetivo fue analizar los cambios de nomenclatura y su importancia para el diagnóstico y control de las enfermedades fúngicas. La metodología se basó en la revisión de estudios con análisis molecular y secuenciación de la región ITS. Los resultados mostraron que la reclasificación taxonómica modifica la interpretación de hallazgos microbiológicos y la identificación de especies. Los autores concluyeron que la actualización de la nomenclatura fúngica es necesaria para fortalecer la precisión diagnóstica y la vigilancia clínica de estas infecciones (20).

Benzaid et al. (2019), en el estudio *The effects of Mentha × piperita essential oil on C. albicans growth, transition, biofilm formation, and the expression of secreted aspartyl proteinases genes*, evaluaron el impacto del aceite esencial de *Mentha × piperita* sobre

los mecanismos de virulencia y patogenicidad de *Candida albicans*. El diseño metodológico consistió en la extracción del aceite, evaluación del crecimiento y la formación de biofilm a través del ensayo colorimétrico de MTT, además de la cuantificar, la transición morfológica y la expresión de genes *SAP* (1,2,3,9,10) y *HWP1* mediante RT-PCR. Los resultados evidenciaron que la concentración de 10µL/mL inhibió del crecimiento de forma comparable a la anfotericina B, de esta forma logrando además la represión casi completa del gen *HWP1*, el cual es el gen esencial para adhesión y formación de hifas es decir que se encuentra relacionado con la patogenicidad. Los autores concluyeron que este aceite esencial posee actividad antifúngica y capacidad moduladora de mecanismos de virulencia en *Candida albicans*, por esta razón, la presente investigación busca emplear los aceites de canela y hierba luisa para evaluar el impacto que tienen sobre los mecanismos de resistencia de *Candida albicans* ATCC 10231 y sobre la expresión genética de los genes que se encuentran asociados a la formación de biopelículas ((14).

Gao et al. (2020), en el estudio “*Antimicrobial Activity of Lemongrass Essential Oil (Cymbopogon flexuosus) and Its Active Component Citral Against Dual-Species Biofilms of Staphylococcus aureus and Candida Species*”, investigaron el problema de la persistencia de biofilms mixtos resistentes a los tratamientos convencionales que se aplican a infecciones relacionadas con estos patógenos. El objetivo fue evaluar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus* y del citral frente a biopelículas de doble especie. La metodología incluyó ensayos de viabilidad celular mediante MTT, tinción con cristal violeta y microscopía. Los resultados mostraron una reducción superior al 70 % del biofilm en concentraciones entre 0,125 y 0,5 %. Los autores concluyeron que el aceite de *Cymbopogon flexuosus* y su compuesto principal presentan una acción significativa sobre la biomasa y la viabilidad de biopelículas que incluyen especies de *Candida*. Por lo que, la presente investigación busca evaluar la actividad antifúngica y antibiofilm del aceite de hierba luisa o conocido con el nombre científico de *Cymbopogon flexuosus* frente a la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231 para sentar bases para futuras investigaciones y disminuir las limitaciones en las opciones de tratamiento contra infecciones frente a los patógenos (21).

Živković et al. (2025), en el estudio *Comprehensive Phytochemical Analysis and Evaluation of Antioxidant, Antimicrobial, Cytotoxic, and Immunomodulatory Activities of Commercial Cinnamon Bark Essential Oil (Cinnamomum zeylanicum L.)*, analizaron el problema de la caracterización integral del aceite esencial comercial de corteza de canela. El objetivo fue evaluar su composición fitoquímica y sus actividades antioxidante, antimicrobiana, citotóxica e inmunomoduladora. La metodología incluyó análisis fitoquímico del aceite, además, para evaluar la eficacia antimicrobiana utilizaron el método de microdilución en caldo según las directrices del CLSI, de la misma manera complementaron con el ensayo de viabilidad MTT. Los resultados confirmaron la presencia de compuestos con actividad antimicrobiana importante como el componente (E)-cinamaldehído con un porcentaje de (77.93%) siendo este el componente bioactivo más dominante, posteriormente le sigue el eugenol con un porcentaje de (4.34%) y el E-cariofileno con el (3.68%), por lo que, en las pruebas de susceptibilidad el aceite demostró que posee una potente actividad biológica frente a la cepa de referencia, ya que registro una Concentración Mínima Inhibitoria de 7.37µg/mL lo que indica que es un aceite antimicrobiano de alta eficacia. Los autores concluyeron que el aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* presenta propiedades biológicas de interés para aplicaciones biomédicas y farmacológicas debido a la capacidad para inhibir patógenos resistentes, por ende, la presente investigación busca sentar bases sobre la actividad antifúngica y la eficacia del aceite de canela al inhibir la formación de la biopelículas frente a la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231 y nos ayude como una alternativa terapéutica prometedora para tratar las infecciones re (22).

Shahina et al. (2022), en el artículo *Cinnamon Leaf and Clove Essential Oils Are Potent Inhibitors of Candida albicans Virulence Traits*. El problema que guiaba la investigación fue la necesidad de reducir factores de virulencia de *Candida albicans* mediante compuestos naturales. El objetivo consistió en analizar el efecto de los aceites esenciales de *Cinnamomum zeylanicum* y *Eugenia caryophyllus* sobre rasgos de virulencia del hongo, con la hipótesis de que ambos aceites podrían inhibir procesos implicados en la patogenicidad. La metodología incluyó ensayos de susceptibilidad antifúngica mediante microdilución en caldo y evaluación del cambio morfológico de levadura a hifa. Los resultados registraron concentraciones mínimas inhibitorias de

600 µg/mL para canela y 500 µg/mL para clavo, además de inhibición del cambio morfológico a concentraciones subinhibitorias. El estudio concluyó que ambos aceites reducen la virulencia de *Candida albicans* y constituyen candidatos terapéuticos de interés experimental (23).

Qureshi et al. (2025), en el estudio *Exploring the antimicrobial and antibiofilm potency of four essential oils against selected human pathogens using in vitro and in silico approaches*, analizaron el problema de la necesidad de sustancias naturales activas frente a patógenos humanos y sus biopelículas. El objetivo fue explorar la potencia antimicrobiana y antibiofilm de cuatro aceites esenciales mediante enfoques in vitro e in silico. La metodología incluyó micro dilución, difusión en disco y ensayos de biofilm. Los resultados indicaron una actividad antimicrobiana importante y una reducción superior al 60 % en la biomasa de las biopelículas. Los autores concluyeron que los aceites esenciales evaluados poseen propiedades experimentales útiles para el control de microorganismos patógenos y de sus estructuras de persistencia (46).

1.2.Objetivos

1.2.1. Objetivo General

Evaluar la actividad antifúngica y antibiofilm de los aceites esenciales de *Cymbopogon flexuosus* y *Cinnamomum zeylanicum* frente a *Candida albicans* ATCC 10231.

1.2.2. Objetivos específicos

- Determinar la actividad antifúngica de los aceites esenciales de *Cymbopogon flexuosus* y *Cinnamomum zeylanicum* frente a *Candida albicans* ATCC 10231, mediante ensayos de micro dilución en caldo para la determinación de la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima fungicida.
- Identificar la formación de biopelículas de *Candida albicans* ATCC 10231 mediante la técnica colorimétrica de cristal violeta.
- Analizar la expresión de genes de virulencia asociados a la formación de biopelículas mediante técnicas moleculares.

CAPITULO II

METODOLOGÍA

2.1. Materiales

2.1.1. Medios de cultivo:

- Saboreaud-Dextrosa Agar
- Difco™ CHROMagar™ *Cándida*
- Brain Heart Infusion (TM MEDIA, India)
- Blood Agar Base
- Mueller Hinton Agar
- Caldo Mueller Hinton
- Caldo LB -Caldo de Lisogenia (Lysogeny Broth)
- Resazurina
- MTT Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio.

2.1.2. Instrumentos:

- Cajas monopetri
- Caja bipetri
- Asas microbiológicas

- Cuchareta sacabocados o material similar
- Microplaca multiscreen de 96 pocillos con fondo en “U”
- Microplaca multiscreen de 96 pocillos de fondo plano
- Tubos de ensayo
- Hisopos
- Puntas de pipetas de 1000, 10 y 100 uL con filtro
- Puntas de pipetas de 1000, 10 y 100 uL sin filtro
- Puntas de pipetas de 0,5 a 1 uL con filtro
- Pipetas de 1000, 10 y 100 uL
- Pipetas de 0,5 a 1 uL
- Pipetas multicanal
- Papel Parafilm
- Equipo de protección personal
- Eppendorf de 2,5 y 1,5 ml
- Mechero de alcohol
- Gradillas de hielo
- Probetas

- Vasos de precipitación
- Agua destilada
- Bagueta o Varilla de agitación
- Tarjetas para VITEK 2 COMPACT
- Fluconazol
- Solución salina

2.1.3. Aceites esenciales

- *Cymbopogon flexuosus* (Hierba luisa)
- *Cinnamomum zeylanicum* (Canela)

2.1.4. Cepas de referencia

- *Candida albicans* ATCC 10231

2.1.5. Polímeros

- Goma arábica
- Maltodextrina

2.2. Reactivos

- Sybr Green

- Gel agarose
- Ladder de 500 a 100pb
- Dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich) DMSO (0,1% v/v)
- Cristal violeta 0.5%
- Etanol 96%
- Agua destilada
- Kit de Zymon Research Quick ARN Fungal/Bacterial Miniprep
- Kit de Promega GoScript Reverse Transcription System
- Kit de Promega GoTaq qPCR Máster MIX
- Gel de agarosa
- Tris-Acetato-EDTA (TAE)
- Tris-Borato-EDTA (TBE)

2.3. Equipos

- Cabina de flujo laminar
- VITEK 2 COMPACT
- VITEK DENSICHEK
- Lector de placas Victor X3

- Autoclave
- Vortex
- Incubadora
- CFX96 Real-Time System
- Microondas
- Transiluminador UV
- Balanza analítica
- Centrifuga
- microcentrífuga
- Bio-Rad PTC y T100
- Bio-Rad CFX Opus
- Cámara de electroforesis
- ChemiDOC-MP- BIO-RAD
- Nanodrop

2.4. Métodos

2.4.1. Tipo de investigación

La metodología de la investigación que se realizó, titulada “Evaluación antifúngica y anti biofilm de aceites esenciales en *Cándida albicans* ATCC 10231”, tuvo un enfoque cuantitativo basado en la identificación de la actividad antifúngica y anti-biofilm de los aceites esenciales *Cymbopogon flexuosus* (Hierba luisa) y *Cinnamomum zeylanicum* (Canela), así como los genes de virulencia que son los encargados de la producción de biofilm en *Cándida albicans*. Se realizó un estudio experimental mediante la utilización de aceites esenciales frente a la cepa de trabajo. Esta evaluación se llevó a cabo a través de técnicas microbiológicas y moleculares, que incluyeron la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), Concentración mínima fungicida (CMF), la cuantificación de la formación de biopelículas mediante tinción de cristal violeta, y la expresión de genes asociados a la formación de biopelículas y maduración en *Cándida albicans* ATCC 10231, mediante las técnicas moleculares.

2.4.2. Población y muestra

No aplica. Pues se utilizó la cepa de (*Cándida albicans* ATCC 10231), que se tuvo en los laboratorios de la Universidad, esta cepa se va a evaluó frente al AE de *Cymbopogon flexuosus* (Hierba luisa) y *Cinnamomum zeylanicum* (Canela). La cepa de *Candida albicans* ATCC 10231 ha sido catalogada y aislada por American Type Culture Collection (ATCC).

2.4.3. Criterios de inclusión y exclusión

No aplica en este estudio. La razón por la cual no se aplican estos criterios es porque este estudio es de carácter experimental, la cual emplea de manera obligatoria las cepas que se encuentran relacionadas con el estudio, es por este motivo que, no se utilizan individuos como elementos para la realización de este estudio, aunque, en ciertas

situaciones pueden existir varios aspectos a considerar como criterios de exclusión, por ejemplo, al evidencia que la cepa no se encuentra en óptimas condiciones o que la cepa se encuentre contaminada.

2.4.4. Hipótesis de investigación

- **Hipótesis nula:** Los aceites esenciales de *Cymbopogon flexuosus* y *Cinnamomum zeylanicum* no presentan actividad antifúngica y anti-biofilm contra *Cándida albicans* ATCC 10231.

-**Hipótesis alternativa:** Los aceites esenciales de *Cymbopogon flexuosus* y *Cinnamomum zeylanicum* presentan actividad antifúngica y anti-biofilm contra *Cándida albicans* ATCC 10231.

2.4.5. Variables de estudio

-**Variable dependiente:** Actividad antifúngica, actividad antibiofilm y regulación de los genes *ACT1*, *HWP1* y *SAP3*.

-**Variable independiente:** Aceites esenciales de *Cymbopogon flexuosus* y *Cinnamomum zeylanicum*.

2.4.6. Procedimiento para el análisis de laboratorio

2.4.6.1. Microencapsulación de los aceites esenciales

En el proceso de microencapsulación de los aceites esenciales de hierba luisa y canela o conocidos con sus nombres científicos de *Cymbopogon flexuosus* y *Cinnamomum zeylanicum* se realizó con goma arábica y maltodextrina. En primer lugar, se pesaron en la balanza analítica 38,4 g de maltodextrina y 21,6 g de goma arábica, después se homogenizó la mezcla para integrar estos polímeros en una sola fase. Posteriormente, se midió en una probeta 200 ml de agua destilada, se llevó a agitación y se añadió poco a poco la mezcla de los polímeros para que se homogenizara con el agua destilada evitando que se hagan grumos al añadir los polímeros.

En una probeta se midió 15 ml de aceite esencial y se añadieron cuidadosamente poco a poco a los polímeros dispersos con el propósito de que estos emulsionaran. El proceso de emulsión duró de 15 a 20 minutos con agitación constante para evitar que no se pierda la fase de emulsión. Para el proceso de microencapsulación, se utilizó agua destilada para limpiar el filtro, después se agregó la emulsión al secador de aspersión Büchi mini spraydryer B-290 en donde se le configuró a este equipo a una temperatura de entrada de 180 °C y 80 °C la temperatura de salida (25,26).

Después del proceso de microencapsulación se recolectó en un frasco estéril y se procedió a analizar la lectura de los espectros de la banda al infrarrojo ATR-FTIR Nicolet IR 100 para así evaluar el proceso de microencapsulación.

2.4.6.2. Obtención de cepa y actividad antifúngica

Para la obtención de la cepa de trabajo se descongeló el vial a temperatura ambiente. Luego se realizó la siembra en 5 ml de caldo BHI empleando la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231, seguidamente se incubó por 48 horas a 37 °C.

2.4.6.3. Determinación de pureza de microorganismos

La determinación de la pureza del microorganismo se realizó con el objetivo de garantizar que los resultados obtenidos sean fiables. En primera instancia, se efectuó la siembra del microorganismo en el medio de cultivo Difco™ CHROMagar™ *Candida* y posteriormente, se incubó a 37°C por un periodo de 24 horas. Seguidamente, se procedió a emplear una colonia de la levadura para analizarla en el equipo Vitek 2 Compact, luego de haber identificado la pureza de la levadura de *Candida* se realizó la siembra en 5 ml del medio de cultivo BHI y finalmente, se incubó por 37°C por 48 horas en la incubadora (27).

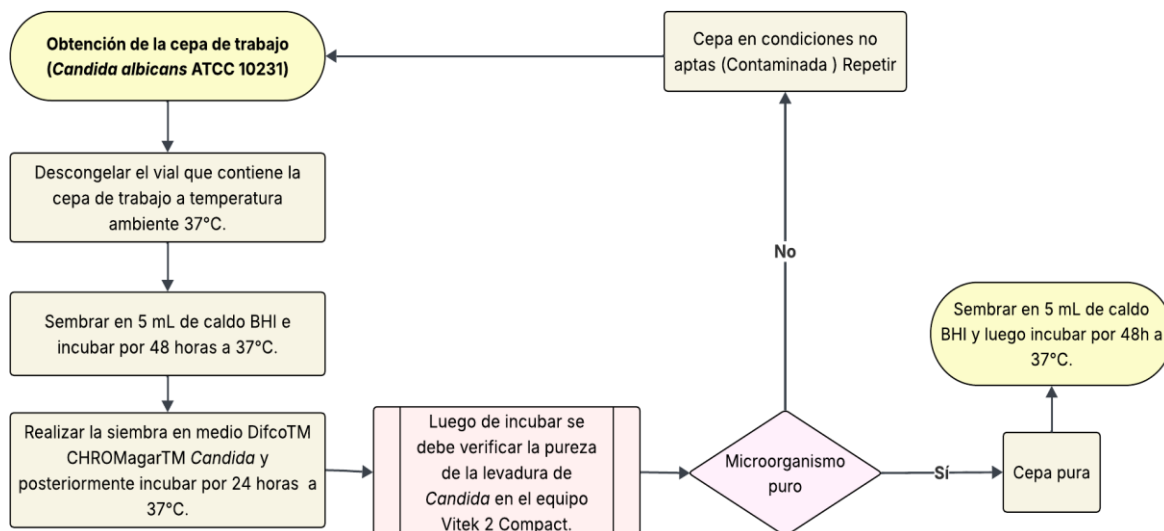


Figura 1. Obtención de la cepa de trabajo.

Elaborado por Acosta Acosta Lissette Estefania

2.4.6.4. Técnica de Kirby-Bauer modificado

Para esta técnica se preparó diluciones como se muestran en la (Figura 2) en donde se empleó 1g de aceite esencial micro encapsulado de *Cymbopogon flexuosus* y *Cinnamomum zeylanicum* y se disolvió en 1000 µL DMSO al 0.1% para poder obtener una mezcla uniforme mediante homogenización y así llegar a las concentraciones requeridas en la prueba de susceptibilidad las concentraciones que se empleó fueron 50 mg/mL, 25 mg/mL, 12.5 mg/mL, 6.25 mg/mL, 3.12 mg/mL, 1.56 mg/mL, 0.78 mg/mL y 0.39 mg/mL

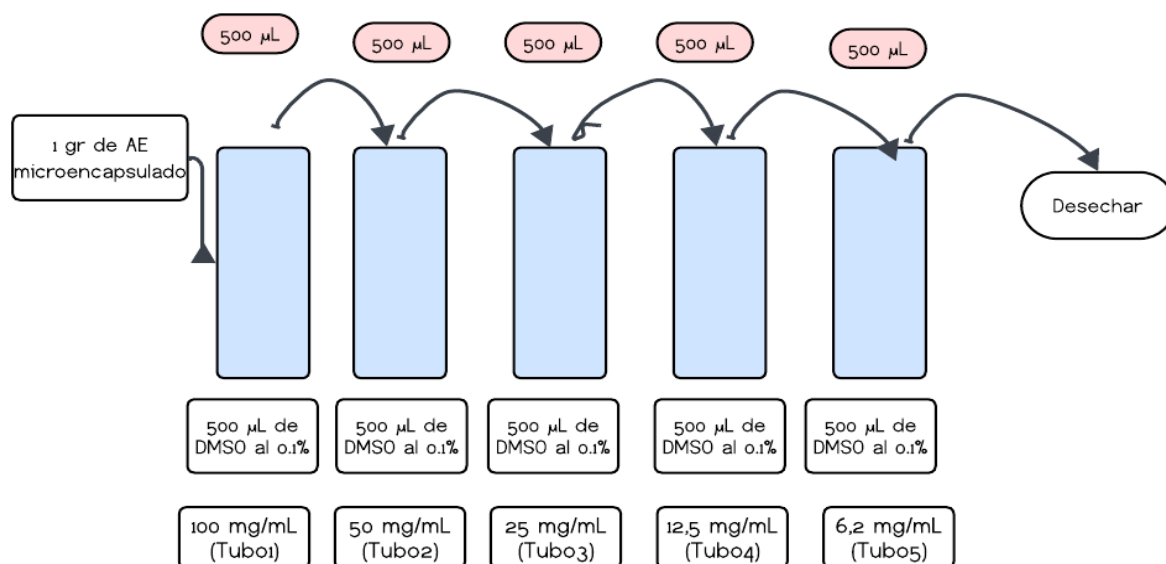


Figura 2. Preparación de las diluciones.

Elaborado por Acosta Acosta Lissette Estefania

Posteriormente, de haber realizado las diluciones se realizó el inóculo microbiológico utilizando la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231. La estandarización del inóculo se llevó a cabo ajustando la turbidez de la suspensión fúngica a 0.5 en la escala McFarland, se utilizó el equipo DensiCheck, asegurando así una concentración fúngica uniforme. Una vez inoculado el agar Mueller Hinton, se procedió a realizar pozos sobre la superficie del agar con el apoyo de un sacabocas estéril de 6mm de diámetro y en cada uno de ellos se depositó 25 µL de los aceites esenciales en estudio, se dejó reposar por 30 minutos y finalmente se incubó la caja invertida a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 h y posteriormente se midió los halos de inhibición al siguiente día (28,29). Estos halos se midieron con una regla de 30 cm el diámetro del pozo dentro de la medida total, es decir que, si el hongo en estudio creció hasta el borde se reportó según las directrices del CLSI para la susceptibilidad de los antifúngicos. En casos donde la disposición del pozo o la extensión del halo impidan una lectura del diámetro completa, se midió el radio desde el centro del pozo hasta el límite del crecimiento y se multiplico el valor por dos para así obtener el diámetro final (28–31). Sin embargo, hay que tener en

cuenta que se le puede agregar azul de metileno para poder visualizar de mejor manera los halos de inhibición, es decir, se debe aplicar los mismos pasos para la prueba de susceptibilidad de difusión en agar tradicional con ciertas modificaciones efectuadas (27,28).

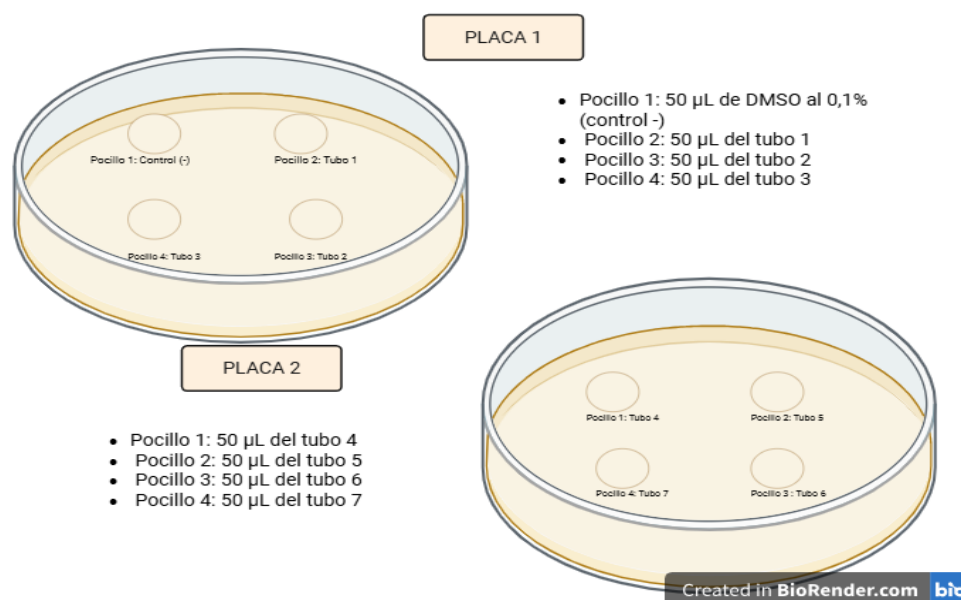


Figura 3. Distribución de los pocillos en la caja petri

Elaborado por Acosta Acosta Lissette Estefania

Difusión en pocillos

Se disolvió 1 g de aceite esencial micro encapsulado en 1000 μ L de DMSO al 0.1%. Posteriormente se realizó la escala McFarland a 0.5 con ayuda de un hisopo estéril y utilizando el VITEK® DENSICHEK® (29–31).

-Difusión en pocillos: Para esto se perforó el agar con un sacabocado estéril de 6mm, cuatro veces para poder formar los pocillos en el agar inoculado con la cepa de referencia. Se añadió 100 μ L del aceite esencial micro encapsulado, según corresponda (29–31).

-Difusión sin pocillos: No se realizó ninguna perforación en el agar, simplemente se colocó 100 μ L del aceite esencial que fue micro encapsulado en el centro del agar que fue inoculado (29–31).

2.4.6.5. Concentración mínima inhibitoria (CMI)

La concentración mínima inhibitoria (CMI), se define como la menor concentración de un agente antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento de una cepa específica, esta técnica se fundamenta en que la resazurina un tinte azul que no es fluorescente actúa como un indicador de óxido de esta manera generando una reducción que al ser captado por células viables es reducido por resorufina a un color rosa fluorescente, permitiendo una discriminación visual clara entre la inhibición y el crecimiento del hongo (12,32–34). Para su determinación se siguieron protocolos estandarizados. Para ello, se optó por el ensayo de resazurina en microplaca de fondo en U.

El proceso comenzó con la reactivación de la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231 en el agar Mueller Hinton. Posteriormente, se preparó una suspensión fúngica en solución salina estéril (NaCl 0.9%), ajustando la turbidez mediante la escala McFarland a 0.5, para ello se utilizó el VITEK® DENSICHECK®, este ajuste garantizó una densidad estandarizada de aproximadamente (1×10^6 UFC/mL), la cual fue esencial para que los resultados de la CIM sean comparables y a la misma vez reproducibles. Adicionalmente, se realizó modificaciones al protocolo en base a las necesidades del hongo (*Candida albicans* ATCC 10231), con la escala que se preparó, se procedió a realizar una disolución 2:1 es decir 2000 μ L del inóculo del hongo de la escala de McFarland y 1000 μ L de la solución salina al 0.9%, esta disolución se utilizó en la microplaca de fondo U para la viabilidad celular (12,32–34).

Para la solución madre de 1:1, se disolvió 1 g de aceite esencial microencapsulado en 1000 μ L de DMSO al 0.1%. Posteriormente, se realizó diluciones seriadas en ocho tubos estériles con DMSO al 0.1%, obteniendo así concentraciones desde 0.50 mg/mL en el primer tubo del cual se transfirió este al segundo tubo para tener una concentración de 25 mg/mL y así sucesivamente hasta una concentración final de 0.39 mg/mL (29,35).

Seguidamente, se preparó la microplaca de 96 pocillos de fondo en U, en esta placa se pipeteó 50 μ L de caldo Luria Bertani Broth Miller (LB), y se realizó una división de la placa donde se rotuló de la siguiente manera, se tuvo en el pocillo 1 el control positivo donde se colocó 50 μ L de caldo + 20 μ L de bacteria + 20 μ L del antibiótico (Fluconazol), en el pocillo 10 y 11 se colocó el control de caldo que únicamente fue de 50 μ L de caldo (LB), en los pocillos 8 y 9 se colocó el control de aceites que fue

50 µL de caldo + 100 µL de AE en el pocillo 8 se pipeteó el aceite esencial de canela y en el 9 el aceite esencial de hierba luisa en todas sus concentraciones desde la 50 mg/mL hasta la concentración final de 0.39 mg/mL, de la misma manera en el pocillo 12 se colocó el control negativo que contó con 50 µL de caldo + 20 µL de bacteria. Por último, la parte de tratamiento a partir de pocillo 2 hasta el 7 en donde se depositó 50 µL de caldo + 100 µL de AE + 20 µL de bacteria. Finalmente, la placa se selló con parafilm y se incubó a una temperatura de 37°C durante 24 horas. ((12,32))

En cuanto a la absorbancia se midió en el lector de placas a 570nm, Victor X3 en el programa de rezasurin 570 nm y con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de viabilidad celular en relación con los controles, permitiendo de esta forma determinar la concentración mínima inhibitoria (36–38). A partir de las absorbancias obtenidas, se calculó el porcentaje de viabilidad celular y se determinó la CMI, mediante la siguiente formula.

$$\text{Viabilidad celular} = \frac{(\text{Absorbancia real} - \text{Control negativo})}{(\text{Control positivo} - \text{Control negativo})} \times 100$$

2.4.6.6. Determinación de la concentración mínima fungicida (CMF)

A partir de los pocillos es donde no ocurrió el cambio de color de azul a violeta, es decir para distinguir si el aceite inhibió el crecimiento del hongo, se realiza la concentración mínima fungicida (CMF) en donde se sembró un volumen de 100 µL de cada pocillo, es decir, en donde no existió el desarrollo del microorganismo en la placa de micro titulación de CMI, esta placa se incubó a 37 °C por 24 horas a 48 horas para hongos. Posteriormente, después de haber inoculado la sustancia en el sólido (Agar Muller Hinton), se consideró que el aceite elimino el 99.9% de la población original es decir el efecto fungicida (39,40).

2.4.6.6. Formación de biopelícula

Para la formación de biopelícula se realizó el siguiente procedimiento según lo descrito por el autor Gulati et al. (2018) con adaptaciones para *Candida albicans* ATCC 10231(41). A partir del aislamiento del microorganismo, se colocó una colonia en un tubo de ensayo de 12 mm con solución salina estéril al 0.9%, de esta manera ajustando la turbidez a 0.5 McFarland para hongos, (equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL), con ayuda del VITEK® DENSICHEK®(42–44). Posteriormente, se realizó una dilución 1:20 del inóculo inicial donde se mezcló 100 µL a de la Escala McFarland y 1900 µL de solución salina estéril al 0.9%, Sin embargo, se realizaron adaptaciones para *Candida*

en el cultivo debido a que la cepa pura se cultivó en un tubo cónico y se incubó por 24 h posterior a la incubación se pipeteó 100 μ L del caldo BHI a las placas de 96 pocillos con fondo plano, seguidamente, se añadieron 100 μ L del cultivo puro en BHI en cada pozo y para culminar las placa se selló con papel Parafilm y se incubó por 35 °C durante 24 horas debido a que se trata de un hongo.

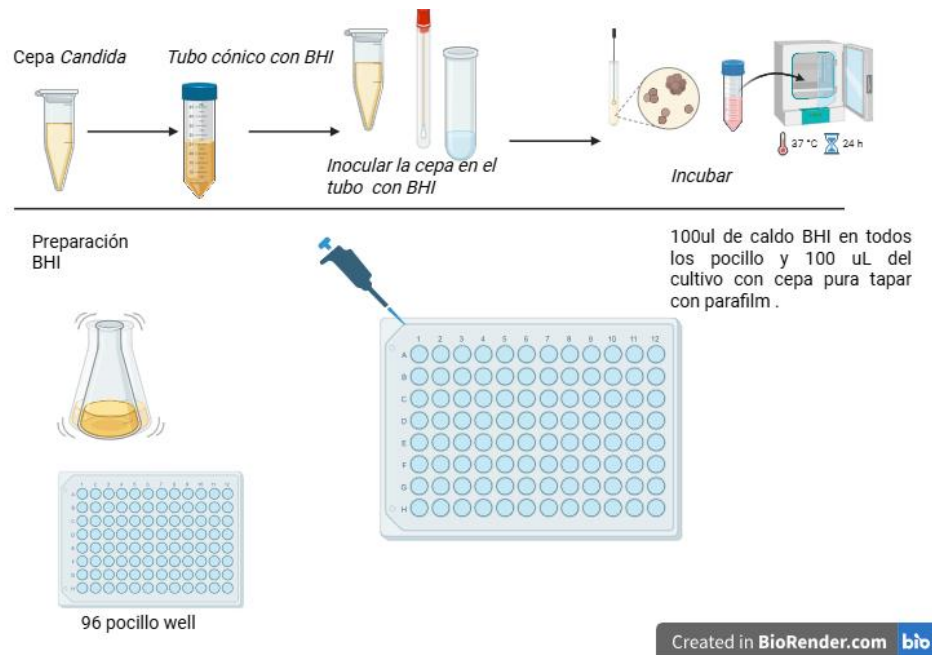


Figura 4. Formación de biofilm *Candida albicans*

Elaborado por Acosta Acosta Lissette Estefania

2.4.6.7. Tinción Cristal Violeta

Para aumentar la sensibilidad del método se incluyó para la placa con 96 pocillo el paso de fijación con metanol según lo descrito por Peeters et al. (2008), después de la decantación del medio de cultivo y los primeros tres lavados, después se pipeteó metanol en los pocillos. Sin embargo, hay que tener en cuenta que estos protocolos fueron tomados como referencia para su adaptación para *Candida* (45) la misma manera se tomó como referencia el protocolo descrito por Christensen et al. (1985) con modificaciones al momento de la cuantificación (44).

Después de haber incubado la placa de 96 pocillos con la solución del hongo se procedió a retirar el papel Parafilm y se eliminó el cultivo con la finalidad de remover las células planctónicas y posteriormente se secó la placa con papel absorbente. ((44)

Luego, de la formación de la biopelícula del hongo, se procedió a quitar el exceso de caldo por decantación, esto se lo realizó absorbiendo cada pocillo con la ayuda de una pipeta uno por uno, para evitar que el biofilm se desprenda, posterior a eso se procedió a lavar un total de 2 veces con agua destilada con un volumen de 150 µL, se dejó secar a temperatura ambiente cubriendo la placa con aluminio para evitar contaminaciones durante 15 a 30 min hasta no observó gotas visibles.

A continuación, se adicionó 150 µL de etanol al 95% para fijar el biofilm, se dejó por 30 minutos, luego se decantó y se agregó 200 µL de cristal violeta al 1% y se dejó por 30 minutos, posteriormente se desechó el contenido y se realizó 3 lavados con agua destilada con un volumen de 150 µL, se dejó secar y se adiciono el etanol al 95% para cuantificar la biopelícula en el Víctor TM X3, mediante la lectura de densidad óptica a 570 nm.

2.4.6.8. Determinación de la actividad anti-biopelícula.

Primero se cuantificó la biomasa y posteriormente, se clasificó la cepa de *Candida* en formador débil, moderado o fuerte de biopelícula. Seguidamente, se realizó el ensayo de la densidad óptica para así evaluar la disrupción de la biopelícula para esto se siguió el protocolo propuesto por Gulati et al. (2018) (41).

Los resultados de esta actividad se expresaron en % con la siguiente fórmula.

$$\%Inhibición = \frac{100 - (Muestra OD570)}{Control OD 570 * 100}$$

Por otra parte, para la preparación de las diluciones, se mezcló 1 g de aceite esencial microencapsulado y se disolvió en 1000 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) al 0.1% de esta manera, alcanzando solución madre con una concentración de 100 mg/mL. Seguidamente, se preparó el caldo Brain Heart Infusion (BHI) al doble de su concentración y el inculó de *Candida* se ajustó 1,7 en la escala de McFarland. Luego, este inóculo fue diluido es una proporción de 1:20 empleando aquí solución salina estéril al 0.9%. Finalmente, para el ensayo de micro titulación estériles se depositó en cada uno de los pocillos el medio BHI, seguidamente se dispensó los tratamientos con sus respectivas diluciones con el tratamiento y para concluir, el inculó diluido. Las placas se sellaron con papel Parafilm y se incubaron a 37 °C durante 24 horas a 48

horas, una vez transcurrido este tiempo se realizó la tinción con la técnica colorimétrica de cristal violeta para evaluar los resultados de la formación de biopelícula en *Candida albicans* ATCC 10231.

2.4.6.9. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN de la cepa pura de *Candida albicans* ATCC 10231. Se utilizó el protocolo de Quick – DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep Kit de Zymo Research con número de catálogo D6005, número de lote 224196 y fue almacenado a temperatura ambiente, primero se pipeteó 200 µL de TBE al 1X en un tubo eppendorf, se tomó una colonia pura con un isopo y se homogenizó bien, luego se centrifugó por 10 minutos a 6000 g, luego de la centrifugación se descartó el sobrenadante dejando solo el pellet. Entonces, para la extracción del ADN por kit primero se añadió 750 µL de BashingBead™ Buffer en el tubo eppendorf se suspendió y luego se transfirió a un ZE BashingBead™ Lysis Tube (46).

Luego se mezcló dirección horizontal en un vortex por 20 minutos, se llevó a la centrifuga por 1 minuto a 10 000 x g, de esta mezcla se transfirió 400 µL del sobrenadante a una Zymo – Spin™ III- F Filter que se encontró en un tubo colector y se centrifugó a 8 000 x g por un minuto. Se adicionó 1200 µL de Genomic Lysis Buffer al filtrado del tubo de recolección. Posterior a eso se transfirió 800 µL de la mezcla a una columna Zymo-Spin™ IICR en un tubo de recolección y se centrifugó a 10 000 x g durante un minuto, finalmente se desechó el filtrado y se debe repetir este proceso (46).

Luego se añadió 200 µL de DNA Pre-Wash Buffer a la columna Zymo – Spin™ IICR en un nuevo tubo de recolección y se centrif a 10 000 x g durante 1 minuto. Se añadió 500 µL g – DNA Wash Buffer a la columna Zymo – Spin™ IICR y se centrifugo a 10 000 x g durante 1 minuto. Para terminar, se transfirió la columna Zymo – Spin™ IICR a un tubo limpio de microcentrífuga de 1,5 mL y se añadió 50 µL de DNA elution Buffer directamente a la matriz de la columna, se centrifugo a 10 000 x g durante 30 segundos para así poder eluir el ADN (46).

2.4.6.9.1. Extracción y Purificación del ARN

Para la extracción y purificación de ARN se debe seguido previamente el protocolo que se encontró descrito en la sección 2.4.6.8. Determinación de la actividad anti-biopelícula, además se consideró el ANEXO 2, no se tomó en cuenta para este protocolo el paso de la técnica colorimétrica con cristal violeta para la biopelícula. Se seleccionó las siguientes concentraciones para la extracción de ARN (47):

1. *Candida albicans* ATCC 10231 Sin tratamiento
2. *Candida albicans* ATCC 10231 con tratamiento de *Cinnamomum zeylanicum* a 50 mg/mL
3. *Candida albicans* ATCC 10231 con tratamiento de *Cinnamomum zeylanicum* a 0.39 mg/mL
4. *Candida albicans* ATCC 10231 con tratamiento de *Cymbopogon flexuosus* a 50 mg/mL
5. *Candida albicans* ATCC 10231 con tratamiento de *Cymbopogon flexuosus* a 0.39 mg/mL

Después de haber seleccionado las 5 muestras, a estas se les agregó 200 µL de TBE 1X, se raspó con un palillo estéril el fondo y las paredes de cada uno de los pocillos donde se encontró las respectivas concentraciones a usarse para la extracción, se transfirió cada una de las concentraciones a un tubo eppendorf y luego se centrifugó a 16 000 x g durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante dejando únicamente el pellet, posterior a eso se procedió a extraer el ARN utilizando el Quick – RNA™ Miniprep kit de Zymo Research del catálogo número R2014, del lote número 256463, se lo almacenó a temperatura ambiente, de la misma manera se verificó la fecha de caducidad de marzo 2027 y se siguió el protocolo detallado en el kit descrito de la siguiente manera (47):

Se resuspendió el pellet celular en 800 µL de RNA Lysis Buffer y se transfirió la mezcla hacia un tubo ZR BashingBead Lysis. Seguidamente se homogenizó en el vortex realizando movimientos horizontales durante un tiempo de 10 minutos. Se centrifugó el tubo durante un minuto para que así se sedimenten los residuos. Luego se transfirió el sobrenadante a una columna Zymo – Spin™ IIIICG en un tubo de recolección y se centrifugó de 10 000 rpm a 16 000 rpm x g durante 30 segundos (47).

Se guardó el filtrado que estuvo en el tubo colector, pues a este tubo colector se procedió a agregar un volumen igual de etanol (95 – 100 %) es decir que se tuvo una relación de (1:1) y se mezcló bien. Se transfirió la mezcla a una columna Zymo – Spin™ IICR en un tubo de recolección y se centrifugo de 10 000 rpm a 16 000 rpm x g durante 30 segundos. Luego, se desechó el filtrado y se agregó 400 µL de RNA Prep Buffer a la columna, seguidamente se centrifugo a las mismas revoluciones mencionadas anteriormente y se desechó el filtrado. Para culminar se añadió 700 µL de RNA Wash Buffer a la columna se centrifugo y se desechó el filtrado (47).

Finalmente, se añadió 400 µL de RNA Wash Buffer y se centrifugó la columna por un minuto para asegurar la eliminación completa del tampón de lavado. Luego, se transfirió con mucho cuidado la columna a un tubo libre de nucleasas, para terminar, se añadió 50 µL de agua libre de DNasa/RNasa directamente a la matriz de la columna y se centrifugó, se colocó el ARN eluido en una gradilla que se encontró congelada. Para la cuantificación y determinación de la pureza del ARN extraído, se colocó 2 µL de eluido en el NanoDrop de Thermo Scientific y se realizó la lectura, obteniendo la curva correspondiente a las absorbancias a 260 nm y 280 nm (47).

2.4.6.9.2. Retrotranscripción

Con el ARN extraído y cuantificado mediante el NanoDrop de Thermo Scientific se procedió a sintetizar ADNc utilizando el kit GoScript™ Reverse Transcription System (Promega), que lleva un número de lote 0000653182 y con fecha de caducidad 25 de marzo 2027, para esto se siguió el protocolo sugerido en el kit. En primer lugar, se mezcló y se centrifugó cada uno de los componentes antes de ser usados, se combinó 4 µL de ARN experimental con 1 µL de cebador random para obtener un volumen final de 5 µL. A continuación, se cerró el tubo que contenía la mezcla de ARN y cebador y se lo llevó al termociclador durante un tiempo de 5 minutos. Inmediatamente, la mezcla se colocó en una gradilla con hielo durante 5 minutos y luego se centrifugó por 10 segundos y se procedió a recoger la condensación, de esta manera manteniendo los tubos cerrados sobre el hielo hasta agregar la mezcla de retro transcripción. Para finalizar, la preparación de la reacción de retro transcripción se realizó en un tubo estéril que se encontró sobre hielo, donde se colocaron los componentes

correspondientes según el protocolo del kit para completar la reacción los cuales se detallan en la siguiente tabla (48).

Cantidad de componentes para retrotranscriptasa	
Recombinante RNasa	0.5 µL
Buffer GoScript	4 µL
MgCl ₂	2.6 µL
PCR Nucleotide Mix	1 µL
Go Script	1 µL
Agua libre de nucleasas	5.9 µL
TOTAL	15 µL

Tabla 1. Reacción de retro transcripción

Elaborado por: Acosta Acosta Lissette Estefania

Para concluir el procedimiento se agregó 15 µL de la mezcla de retrotranscripción a cada tubo de reacción, a estos tubos se los mantuvo continuamente en hielo; luego, se añadieron 5 µL de la mezcla de ARN y cebador para obtener un volumen de 20 µL. Acto seguido, se realizó la etapa de anillamiento colocando los tubos en un bloque térmico a 25°C durante 5 minutos, para la extensión, los tubos se incubaron en un bloque térmico a 42 °C durante una hora. Por último, se procedió a la inactivación de la transcriptasa inversa incubando los tubos a una temperatura de 70 °C durante el tiempo de 15 minutos, completando así la síntesis del ADNc (48).

2.4.6.9.3. Expresión de los genes ACT1, HWP1 y SAP3.

Después de sintetizar ADNc, se procedió a realizar la PCR basado en Estrada – Barraza et al. (2011), siguiendo el protocolo establecido para *Candida albicans* ATCC 10231(49) :

Para la preparación de la mezcla de la reacción se estandarizó un volumen de 25 µL. Se descongeló la GoTaq Máster Mix, de la misma manera el agua libre de nucleasas, estas se descongelaron a temperatura ambiente y se agitó en el vortex

por un tiempo de 5 segundos a baja velocidad (49). Finalmente se preparó la máster mix correspondiente según lo detallado en la (Tabla 2)

Componentes para la reacción	Volumen	Final concentración
GoTaq Master Mix	12.5 µL	1X
Primer Forward	5 µL	
Primer Reverse	5 µL	
Agua libre de nucleasas	1.5 µL	-
Total	24 µL	

Tabla 2. Componentes de la máster mix para PCR convencional

Elaborado por: Acosta Acosta Lissette Estefania

Primero, se agregó el volumen correspondiente de la mezcla sin ADN a cada tubo; luego, se añadió 1 µL del ADN plantilla o agua en el caso de los controles negativos para la obtención de un volumen final de 25 µL, seguidamente se homogenizó en el vortex por 5 segundos y finalmente se llevó al termociclador empleando el siguiente programa (49):

Se empezó con una fase inicial de desnaturalización a 96 °C por 5 minutos, seguida de 38 ciclos, iniciando con una temperatura de 96 °C por 30 segundos, seguida por la fase de alineación a 54 °C por 30 segundos y una fase de elongación a 72 °C por 30 segundos; finalmente fue programada una fase de elongación final a 72 °C por 10 minutos (49).

○ *Preparación del buffer TBE 1X y gel agarosa*

Se utilizó una solución de TBE 10X, a partir de la cual se preparó 1000 mL de solución de trabajo con una concentración de 1X, por lo que, para realizar el cálculo, se debió tomar en cuenta que se partía de una solución comercial 10X. El cálculo fue el siguiente (49):

$$V1 * C1 = V2 * C2$$

$$V1 = \frac{V2 * C2}{C1}$$

$$V1 = \frac{1000 \text{ mL} * 1X}{10X}$$

$$V1 = 100 \text{ mL} - - - - \text{TBE } 10X$$

$$\text{Volumen agua destilada} = 1000 \text{ mL} - 100 \text{ mL} = 900 \text{ mL}$$

Se tomó 100 mL de TBE al 10X comercial el cual se aforo con 900 mL de agua destilada para llegar una concentración final de TBE 1X. Luego se pesó el gel de agarosa a una concentración de 1.7 % para ello se realizó el siguiente calculo:

% para ello se realizó el siguiente calculo:(50)

$$\text{gramos de agarosa} = \frac{V_{\text{mL}} * 1.7\%}{100}$$

$$\text{gramos de agarosa} = \frac{30 * 1.7\%}{100}$$

$$\text{gramos de agarosa} = 0.51$$

Entonces, se pesó 0.51 gramos de gel de agarosa los cuales se disolvieron en 30 mL de TBE 1X, esta mezcla se homogenizó en el microondas por 1 minuto hasta que se encontró completamente disuelta, luego se añadió 3 µL del intercalante SYBR Safe en el gel disuelto y se mezcló para que se integre. Se colocó la solución del gel preparada en el molde y se ubicó el peine para formar los pocillos. Se dejó solidificar por 30 minutos, posteriormente se retiró el peine y se llenó la cámara con el TBE 1X hasta su aforo máximo o hasta cubrir el gel.

○ Electroforesis

Para el protocolo de electroforesis se dispensó un volumen de 5 ul por muestra y controles, del Ladder se pipeteó un volumen de 3 ul. En el primer pocillo se colocó el Ladder, en los pocillos 2 se colocó la cepa pura de *Candida albicans* ATCC 10231 con el gen de control ACT1, en los pocillos 3 y 4 se colocó la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231 los tratamientos de 0,50 y 0,39 de canela con el gen ACT1, en los pocillos 5 y 6 se colocó la cepa de referencia con los tratamientos de 0,50 y 0,39 de hierba luisa y en el pocillo 7 se colocó el control negativo (CN). Seguidamente se pipeteó en los pocillos 8 se colocó la cepa pura de *Candida albicans* ATCC 10231 con el gen *HWP1*, en los pocillos 9 y 10 se colocó la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231 con los tratamientos de 0,50 y 0,39 de canela, con el gen *HWP1*, en los pocillos 11 y 12 se colocó la cepa de referencia con los tratamientos de 0,50 y 0,39 de hierba luisa y en el

pocillo 13 se colocó el control negativo (CN). Posteriormente se siguió el mismo proceso y se pipeteó en el pocillo 14 la cepa pura de *Candida albicans* ATCC 10231 con el gen *SAP3*, en el pocillo 15 y 16 se colocó la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231 los tratamientos de 0,50 y 0,39 de canela con el gen *SAP3*, en los pocillos 17 y 18 se colocó la cepa de referencia con los tratamientos de 0,50 y 0,39 de hierba luisa y en el pocillo 19 se colocó el control negativo (CN). Finalmente, se colocó la tapa de la cámara de electroforesis y se conectaron los cables de acuerdo con las cargas correspondientes y se configuró a 100 v por 30 minutos. Al finalizar la corrida, se desconectaron los cables y se apagó la fuente de poder, se llevó el gel a la foto documentador ChemicDOC Bio – Rad para la visualización e identificación de los fragmentos de ADN amplificados. (51) (52).

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis de resultados

3.1.1. Control de calidad microencapsulado

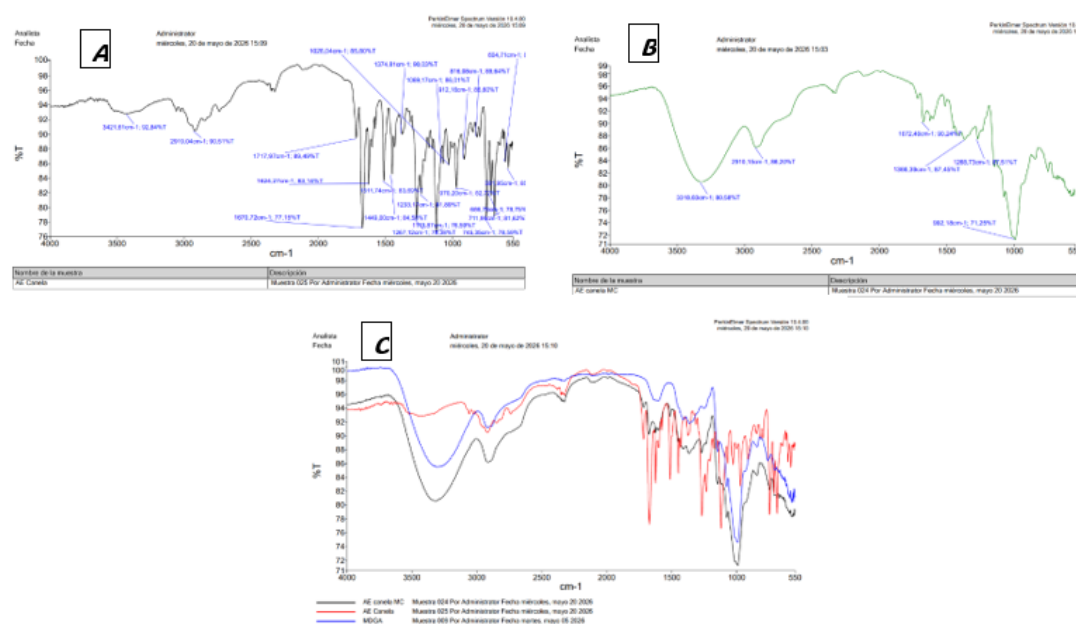


Figura 3. Espectro de bandas de infrarrojo de Canela (*Cinnamomum zeylanicum*). A. Aceite esencial puro de *Cinnamomum zeylanicum*; B. Aceite esencial microencapsulado de *Cinnamomum zeylanicum*; C. Superpuestos de la mezcla polimérica, aceite esencial puro y microencapsulado.

Fuente: ATR-FTIR, Nicolet IR100 (Alemania)

Realizado por: Acosta Acosta Lissette Estefannia

En el análisis de la Figura 3 se muestra la comparación entre los espectros obtenidos mediante Reflectancia Total Atenuada – Infrarrojo por Transformada de Fourier (ATR – FTIR).

En el literal A, correspondiente al aceite esencial puro de canela, se identificaron las principales bandas de absorción del cinamaldehído, que es el compuesto activo mayoritario de esta especie. La banda a 1670,72 cm⁻¹ indica la presencia del grupo aldehído unido al anillo aromático, señal característica de este compuesto. Las señales

entre 1511,74 y 686,76 cm^{-1} confirman la presencia del anillo aromático y de compuestos fenilpropanoides. La banda en 2919,04 cm^{-1} corresponde a las cadenas alifáticas propias del aceite. Estas señales en conjunto confirman que la muestra corresponde a aceite esencial de canela.

En el literal B, correspondiente al aceite esencial microencapsulado de canela, el espectro está dominado por las señales de la cápsula de maltodextrina y goma arábiga: la banda ancha a 3318,83 cm^{-1} y la señal intensa a 992,18 cm^{-1} , propias de los carbohidratos de la cubierta. Sin embargo, la banda a 1672,40 cm^{-1} del cinamaldehído sigue siendo visible, lo que indica que el aceite esencial quedó retenido dentro de la cápsula y conservó sus compuestos activos después del proceso de secado por atomización.

En el literal C, la superposición de los tres espectros muestra que el aceite puro y el microencapsulado comparten las mismas bandas principales, mientras que la matriz sola (MDGA) solo presenta las señales de los carbohidratos. Esto confirma que la microencapsulación conservó la composición química del aceite de canela sin alterarla como se muestra en la (figura 3).

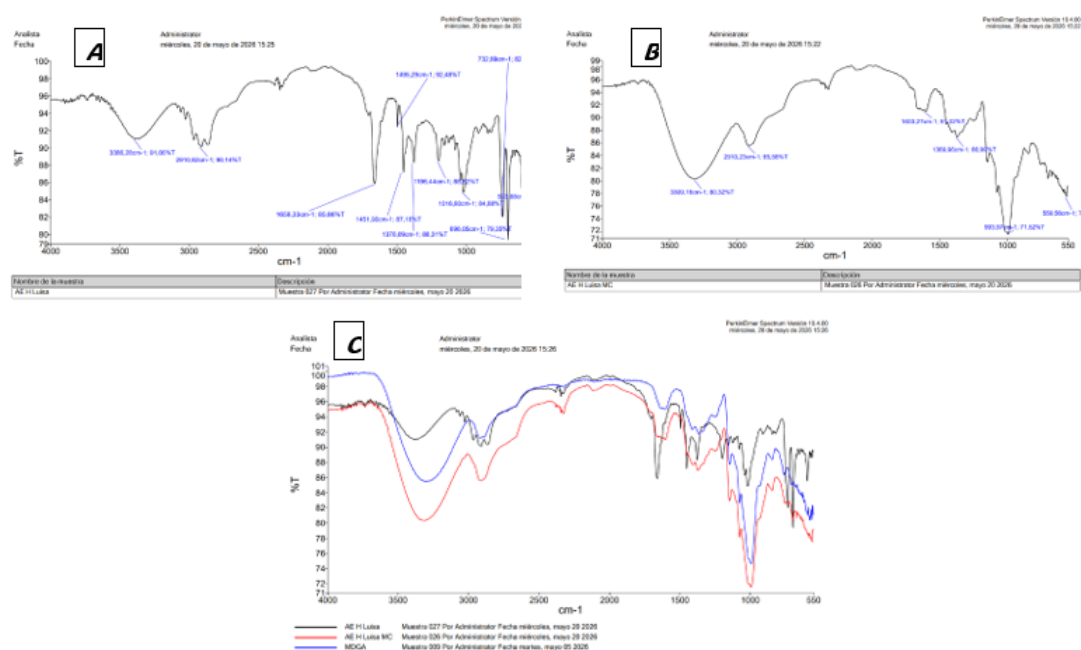


Figura 4. Espectro de bandas de infrarrojo de Hierba Luisa (*Cymbopogon citratus*). A. Aceite esencial puro de *Cymbopogon citratus*; B. Aceite esencial microencapsulado de *Cymbopogon citratus*; C. Superpuestos de la mezcla polimérica, aceite esencial puro y microencapsulado.

Fuente: ATR-FTIR, Nicolet IR100 (Alemania)

Realizado por: Acosta Acosta Lissette Estefannia

En el análisis de la Figura 4 se muestra la comparación entre los espectros obtenidos mediante Reflectancia Total Atenuada – Infrarrojo por Transformada de Fourier (ATR – FTIR).

En el literal A, correspondiente al aceite esencial puro de hierba luisa, se identificaron las bandas características del citral, compuesto activo mayoritario de esta especie. La banda a $1658,33\text{ cm}^{-1}$ indica la presencia del grupo aldehído insaturado propio del citral. Las señales a $1196,44\text{ cm}^{-1}$ y $1016,80\text{ cm}^{-1}$ corresponden a grupos oxigenados de los mono terpenos, y las bandas entre $732,89$ y $696,05\text{ cm}^{-1}$ confirman la presencia de compuestos terpénicos insaturados. La banda a $3386,28\text{ cm}^{-1}$ señala la presencia de alcoholes terpénicos como el geraniol. Estas señales en conjunto confirman que la muestra corresponde a aceite esencial de hierba luisa.

En el literal B, correspondiente al aceite esencial microencapsulado de hierba luisa, al igual que en el caso anterior, el espectro está dominado por las señales de la cápsula: la banda ancha a $3309,16\text{ cm}^{-1}$ y la señal intensa a $993,97\text{ cm}^{-1}$, propias de los carbohidratos. No obstante, la banda a $1603,27\text{ cm}^{-1}$, que coincide con la región del citral observada en el aceite puro, sigue siendo detectable, lo que confirma que el aceite esencial quedó retenido dentro de la cápsula y conservó sus compuestos activos tras el proceso de secado por atomización.

En el literal C, la superposición de los tres espectros muestra que el aceite puro y el microencapsulado comparten las mismas bandas principales, mientras que la matriz sola (MDGA) solo presenta las señales de los carbohidratos. Esto confirma que la microencapsulación conservó la composición química del aceite de hierba luisa sin alterarla como se evidencia en la (figura 4).

3.1.2. Actividad antifúngica con técnica de Kirby-Bauer modificada en pocillo.

Para la susceptibilidad antifúngica se aplicó la técnica de Kirby-Bauer modificada en pocillo, como agente antifúngico se utilizó el aceite esencial microencapsulado de canela y de hierba luisa contra *Candida albicans* ATCC 10231.

Concentración del aceite esencial de canela	Halos de inhibición (mm)
0,39 mg/mL	6
0,78 mg/mL	6
1,56 mg/mL	6
3,12 mg/mL	6
6,25 mg/mL	6
12,5 mg/mL	6
25 mg/mL	16
50 mg/mL	17

Tabla 3. Actividad antifúngica del aceite esencial microencapsulado de canela frente a *Candida albicans* ATCC 10231

Elaborado por Acosta Acosta Lissette Estefania

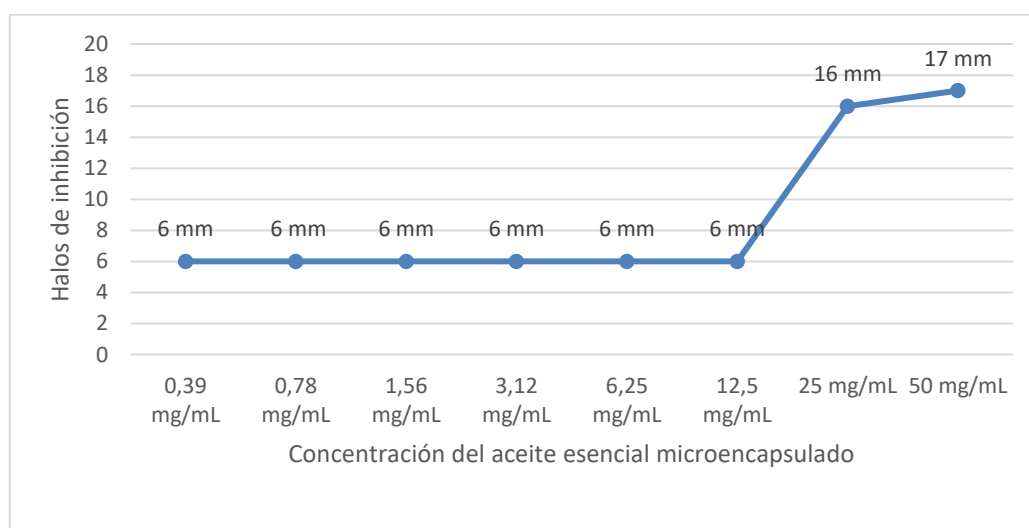


Figura 5. Actividad antifúngica del aceite esencial microencapsulado de canela frente a *Candida albicans* ATCC 10231

Elaborado por Acosta Acosta Lissette Estefania

Los resultados de la actividad antifúngica de canela en pocillo demostraron que, de 0,39 mg/mL a 12,5 mg/mL, no se evidenció inhibición fúngica, reportándola como 6 mm. Por el contrario, en la concentración de 25 mg/mL el halo fue de 16 mm de diámetro; del mismo modo, en la concentración de 50 mg/mL el halo fue de 17 mm, como se observa en la (Tabla 3) y la (Figura 5). Estos resultados demuestran que el aceite de canela inhibe el crecimiento bacteriano en altas concentraciones.

Concentración del aceite esencial de Hierba Luisa	Halos de inhibición (mm)
0,39 mg/mL	6 mm
0,78 mg/mL	6 mm
1,56 mg/mL	6 mm
3,12 mg/mL	6 mm
6,25 mg/mL	6 mm
12,5 mg/mL	6 mm
25 mg/mL	6 mm
50 mg/mL	6 mm

Tabla 4. Actividad antifúngica del aceite esencial microencapsulado de Hierba Luisa frente a *Candida albicans* ATCC 10231

Elaborado por Acosta Acosta Lissette Estefania

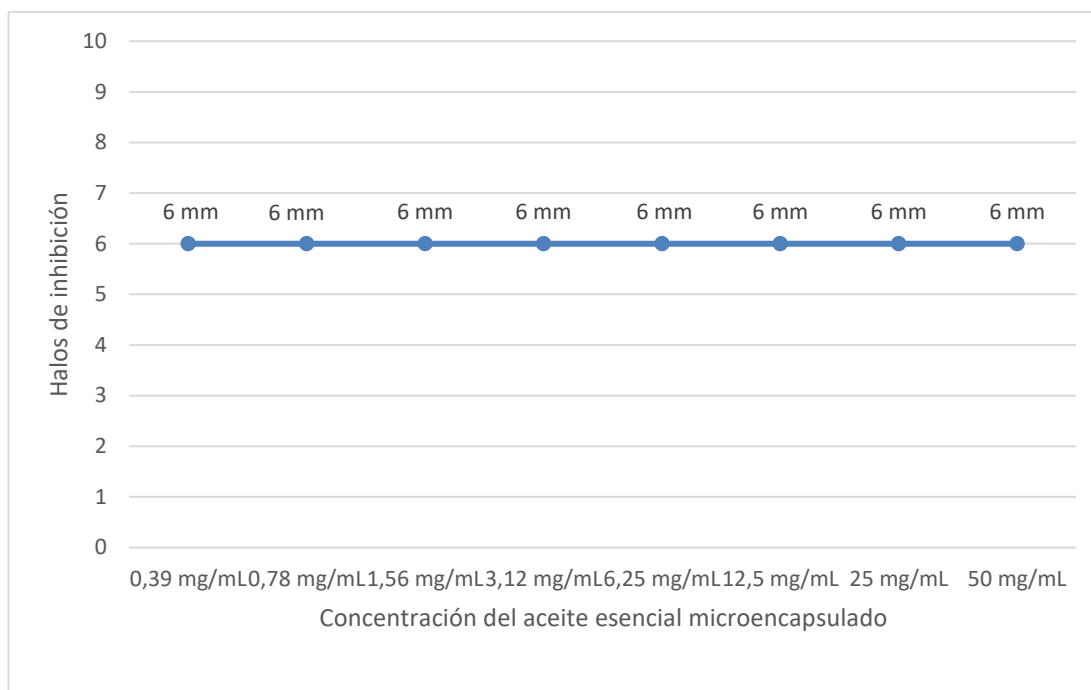


Figura 6. Actividad antifúngica del aceite esencial microencapsulado de Hierba Luisa frente a *Candida albicans* ATCC 10231

Elaborado por Acosta Acosta Lissette Estefania

Los resultados de la actividad antifúngica de hierba luisa en pocillo demostraron que desde la concentración de 0,39 mg/mL hasta la última concentración de 50 mg/mL, no se evidenció halo de inhibición, reportándolo como 6 mm, como se evidencia en la (Tabla 4) y la (Figura 6). Estos resultados demuestran que en el aceite esencial microencapsulado de hierba luisa con la técnica de Kirby-Bauer modificada no se evidencia actividad antifúngica.

3.1.3. Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Fungicida

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se define como la menor concentración de un agente antifúngico capaz de inhibir el crecimiento de un hongo. Para poder evidenciar este parámetro se utilizó resazurina, que es un compuesto químico azul que cambia de color cuando se somete a oxidación y se reduce irreversiblemente a resorufina, un compuesto de color rosa.

Por otra parte, la Concentración Mínima Fungicida (CMF) corresponde a la menor concentración de un agente antifúngico para matar a un hongo. Para su determinación se sembró en agar sangre concentraciones superiores a la CMI y se evaluó el crecimiento, aquella concentración donde no se observó colonias se determinó como CMF.

**Aceite esencial microencapsulado de
canela**

Concentración (mg/mL)	Viabilidad	Inhibición
50	0%	100%
25	0%	100%
12,5	0%	100%
6,25	0%	100%
3,12	0%	100%
1,56	0%	100%
0,78	86,70%	13,30%
0,39	84,00%	16,00%

Tabla 5. Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial microencapsulado de canela frente a *Candida albicans* ATCC 10231.

Elaborado por Acosta Acosta Lissette Estefania

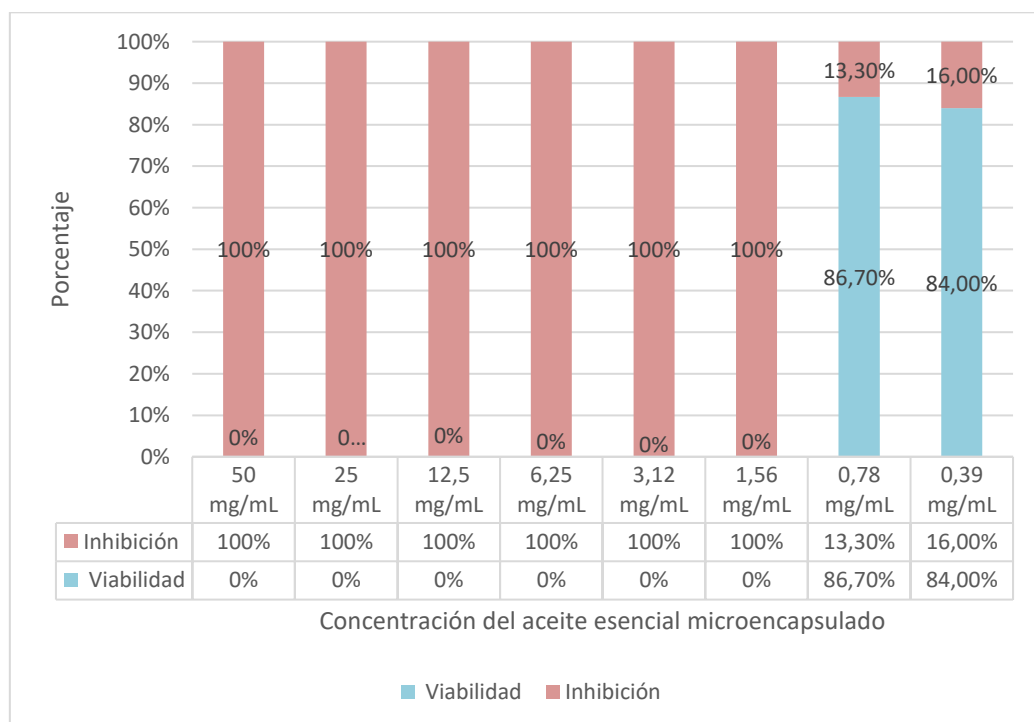


Figura 7. Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial microencapsulado de canela frente a *Candida albicans* ATCC 10231

Elaborado por Acosta Acosta Lissette Estefania

Aceite esencial microencapsulado de canela								
Concentración (mg/mL)	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39
Crecimiento bacteriano	-	-	-	-	+	+	+	+
Efectividad				CMF	CMI			
	1			1				
CMF/CMI								
1								

Tabla 6. Concentración Mínima Fungicida del aceite esencial microencapsulado de canela frente a *Candida albicans* ATCC 10231

Elaborado por Acosta Acosta Lissette Estefania

El aceite esencial microencapsulado de la canela mostró una alta capacidad para inhibir el crecimiento fúngico, además de presentar actividad fungicida frente a *C. albicans*. En las concentraciones de 50 mg/mL hasta la concentración de 1,56 mg/mL, la viabilidad fue del 0%, con una inhibición del 100%. Sin embargo, en las concentraciones bajas, como el 0,78 mg/mL, se evidenció una viabilidad del 86,70%. Asimismo, en la concentración de 0,39 mg/mL, la viabilidad fue de 84%. En la concentración de 0,78 mg/mL se observó el metabolismo de la resazurina; en cambio, en la concentración de 1,56 mg/mL no se evidenció la alteración de color azul a violeta y se lo determinó como CMI. La CMF fue de 6,25 mg/mL, como se muestra en las (Tablas 5 y 6) y en la (Figura 7), puesto que desde esa concentración no se observó crecimiento fúngico ni en concentraciones superiores. La relación CMB/CMI fue de 1 lo que indica que el aceite microencapsulado de canela tiene actividad fungicida.

Aceite esencial microencapsulado de Hierba Luisa

Concentración (mg/mL)	Viabilidad	Inhibición
50	0%	100%
25	0%	100%
12,5	0%	100%
6,25	0%	100%
3,12	0%	100%
1,56	8,40%	91,60%
0,78	21,90%	78,10%
0,39	43,10%	56,90%

Tabla 7. Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial microencapsulado de Hierba Luisa frente a *Candida albicans* ATCC 10231

Elaborado por Acosta Acosta Lissette Estefania

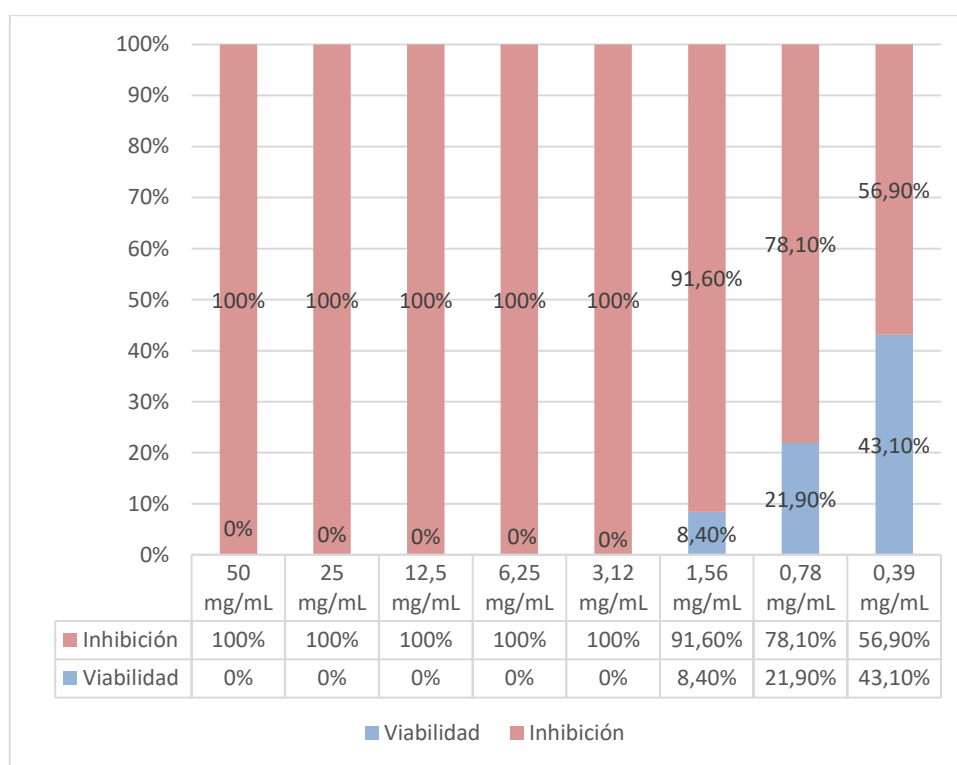


Figura 8. Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial microencapsulado de Hierba Luisa frente a *Candida albicans* ATCC 10231.

Elaborado por Acosta Acosta Lissette Estefania

Aceite esencial microencapsulado de Hierba Luisa								
Concentración (mg/mL)	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39
Crecimiento bacteriano	-	-	-	-	+	+	+	+
Efectividad				CMF	CMI			
	1				1			
	CMF/CMI							
	1							

Tabla 8. Concentración Mínima Fungicida del aceite esencial microencapsulado de Hierba Luisa frente a *Candida albicans* ATCC 10231

Elaborado por Acosta Acosta Lissette Estefania

El aceite esencial microencapsulado de Hierba Luisa mostró una alta capacidad para inhibir el crecimiento fúngico, además de presentar actividad fungicida frente a *C. albicans*. En las concentraciones de 50 mg/mL hasta la concentración de 3,12 mg/mL, la viabilidad fue del 0%, con una inhibición del 100%. Sin embargo, en las concentraciones bajas, como el 1,56 mg/mL, se demostró una viabilidad del 8,40%; a la concentración de 0,78 mg/mL, se evidenció una viabilidad del 21,90%. Asimismo, en la concentración de 0,39 mg/mL, la viabilidad fue de 43,10%.

En la concentración de 1,56 mg/mL se observó el metabolismo de la resazurina; en cambio, en la concentración de 3,12 mg/mL no se evidenció la alteración de color azul a violeta y se lo determinó como CMI. La CMF fue de 6,25 mg/mL, como se evidencia en la (Tabla 7 y 8) y la (Figura 8), puesto que desde esa concentración no se observó crecimiento fúngico ni en concentraciones superiores. La relación CMB/CMI fue de 1, lo que indica que el aceite microencapsulado de Hierba Luisa tiene actividad fungicida.

3.1.4. Formación de biopelícula de *Candida albicans* ATCC 10231

<i>Cut-off</i>	No formador	Débil formador	Moderado formador	Fuerte formador
0,525	≤ 0,53	0,53-1,05	1,05-2,1	≥ 2,1

Tabla 9. Criterios de clasificación para la formación de biopelícula

Elaborado por Acosta Acosta Lissette Estefania

Microorganismo	Absorbancia	Clasificación
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0,585	Débil formador

Tabla 10. Criterios de cepas bacterianas según la capacidad de formación de biopelícula

Elaborado por Acosta Acosta Lissette Estefania

La formación de biopelículas se puede clasificar como débil formadora si la OD se encuentra entre 0,53 y 1,05; formadora moderada si se encuentra entre 1,05 - 2,1 y fuerte formadora si es mayor a 2,1, como se detalló en las (Tablas 9 y 10). En el caso de *Candida albicans*, se obtuvo una OD de 0,585, cayendo en la clasificación de débil formador de biopelícula.

3.1.5. Actividad antibiopelícula del aceite esencial microencapsulado de canela.

Concentraciones del aceite esencial microencapsulado	Porcentaje de inhibición de la biopelícula
Control positivo	0%
0,39 mg/mL	19,90%
0,78 mg/mL	36,70%
1,56 mg/mL	61,09%
3,12 mg/mL	62,03%
6,25 mg/mL	60,76%
12,5 mg/mL	50,68%
25 mg/mL	77,22%
50 mg/mL	92,81%
Control negativo	100%

Tabla 11. Porcentaje de inhibición de biopelícula de *Candida albicans* ATCC 10231 frente al aceite esencial microencapsulado de canela

Elaborado por Acosta Acosta Lissette Estefania

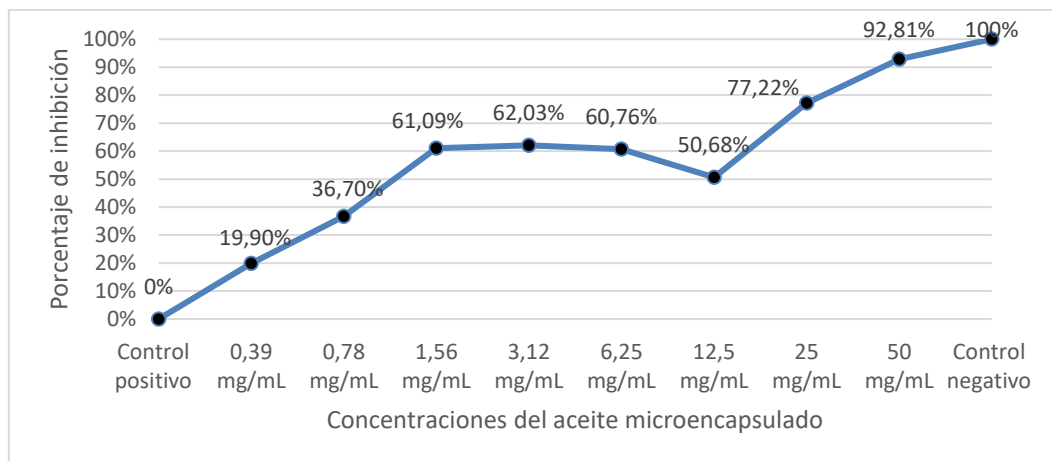


Figura 9. Inhibición de biopelícula de *Candida albicans* ATCC 10231 frente al aceite esencial microencapsulado de canela

Elaborado por Acosta Acosta Lissette Estefania.

La actividad antibiopelícula del aceite esencial de canela obtuvo los siguientes resultados: en la concentración de 50 mg/mL, la inhibición fue del 92,81%; en 25 mg/mL, del 77,2%; en 12,5 mg/mL, del 50,68%; en las concentraciones de 6,25 mg/mL, 3,12 mg/mL y 1,56 mg/mL, fue de 60,76%, 62,03% y 61,09%, respectivamente. En concentraciones bajas se evidenció mayor formación de la biopelícula; en la concentración de 0,78 mg/mL fue de 36,70% y en la última concentración fue de 19,90%. Estos resultados demuestran que la formación de la biopelícula de *Candida albicans* depende de la concentración del aceite esencial microencapsulado, observándose inhibición en concentraciones altas como 25 mg/mL y 50 mg/mL, sin embargo, en concentraciones bajas como 0,39 mg/mL la inhibición es mínima, como se muestra en la (Tabla 11) y (Figura 9).

3.1.6. Actividad antibiopelícula del aceite esencial microencapsulado de canela

Concentraciones del aceite esencial microencapsulado	Porcentaje de inhibición de la biopelícula
<i>Control positivo</i>	0%
0,39 mg/mL	0%
0,78 mg/mL	0%
1,56 mg/mL	6%
3,12 mg/mL	58,94%
6,25 mg/mL	90,80%
12,5 mg/mL	99,87%
25 mg/mL	99,87%
50 mg/mL	86,56%
<i>Control negativo</i>	100%

Tabla 12. Porcentaje de inhibición de biopelícula de *Candida albicans* ATCC 10231 frente al aceite esencial microencapsulado de Hierba Luisa.

Elaborado por Acosta Acosta Lissette Estefania

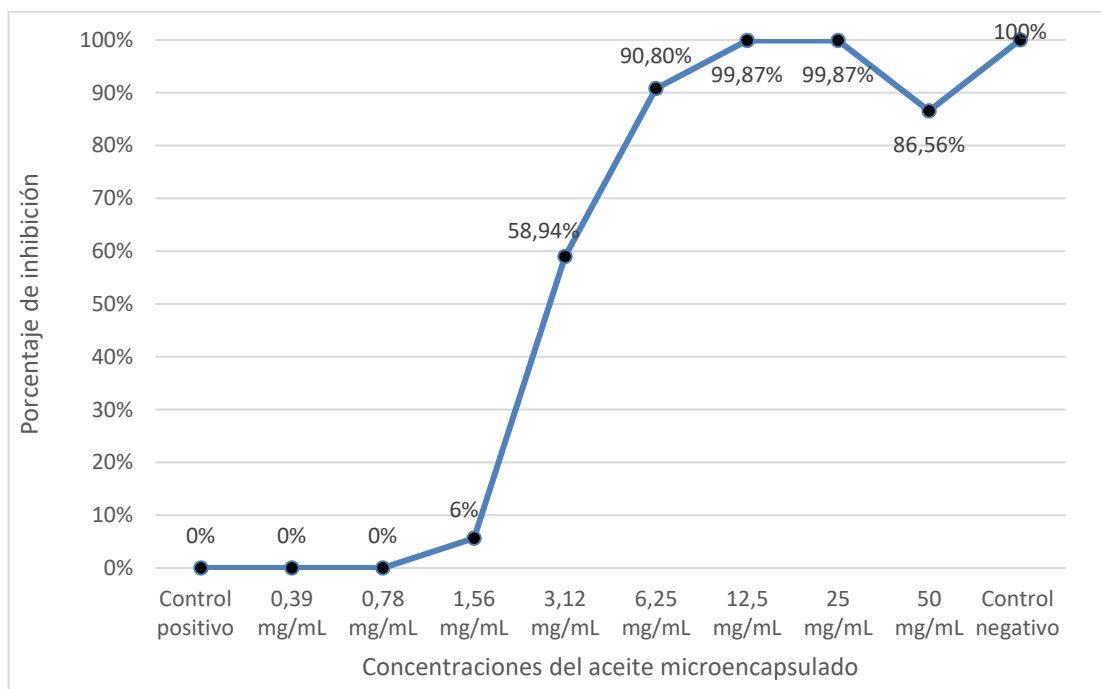


Figura 10. Inhibición de biopelícula de *Candida albicans* ATCC 10231 frente al aceite esencial microencapsulado de Hierba Luisa.

Elaborado por Acosta Acosta Lissette Estefania

La actividad anti-biopelícula del aceite esencial de hierba luisa obtuvo los siguientes resultados: en la concentración de 50 mg/mL, la inhibición fue de 86,56%; en las concentraciones de 25 mg/mL y 12,5 mg/mL, la inhibición fue de 99,87% en ambas concentraciones. La inhibición bajó en la concentración de 3,12 mg/mL a 90,80%, y conforme disminuía la concentración, la inhibición también lo hacía, puesto que en la concentración de 1,56 mg/mL fue de tan solo el 6%. En las dos últimas concentraciones que corresponden a 0,78 mg/mL y 0,39 mg/mL, la inhibición fue nula, reportándola como 0%. Estos resultados demuestran que en concentraciones de 50 mg/mL a 6,25 mg/mL, la inhibición es superior al 90%, a diferencia de concentraciones bajas, donde no se evidencia inhibición de la biopelícula, como se muestra en la (Tabla 12) y (Figura 10).

3.1.7. Detección de genes asociados a la formación y regulación de biopelícula en *C. albicans* ATCC 10231

Candida albicans ATCC 10231 tiene la capacidad de formar una comunidad compleja de microorganismos que se adhieren a superficies rugosas y presentan gran resistencia a los antimicrobianos. La estructura recibe el nombre de biopelícula, que está regulada por genes como *SAP3* y *HWP1*; cada uno sintetiza proteínas que ayudan a la formación de biopelículas en *C. albicans*.

La identificación de los genes *SAP3* y *HWP1* se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa convencional; la finalidad fue determinar si *C. albicans* ATCC 10231 posee los genes formadores de biopelículas.

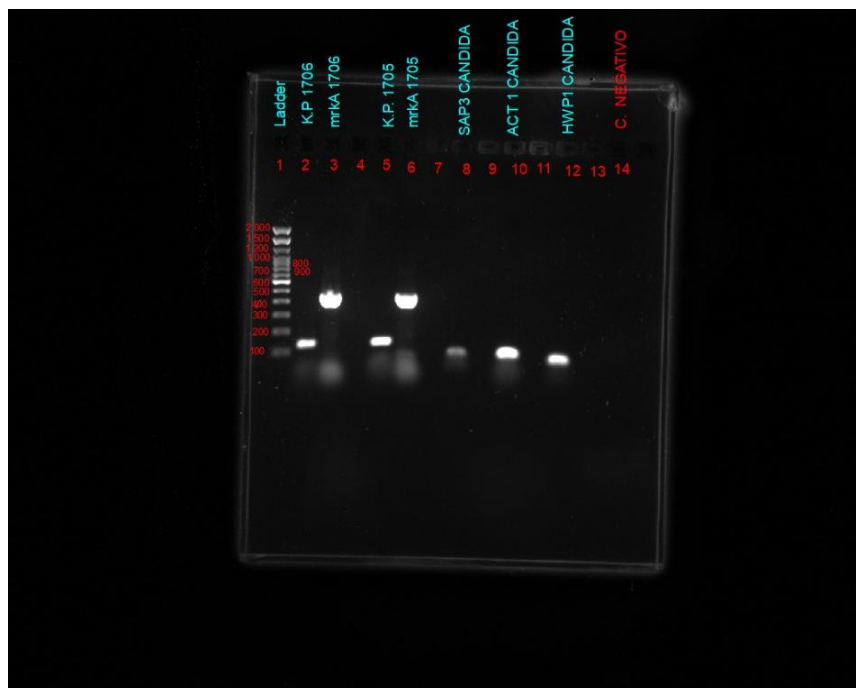


Figura 11. Identificación del gen *SAP3* y *HWP1* en *Candida albicans* ATCC 10231
Elaborado por Acosta Acosta Lissette Estefania

Los resultados demuestran que *C. albicans* ATCC 10231 la presencia de los genes *SAP3* y *HWP1* se expresan en cepas no tratadas. En el gel de agarosa para la electroforesis el orden fue el siguiente: En el primer pocillo se colocó el Ladder que tiene un rango de 100 pb a 2000 pb, en los siguientes siguiente pocillos se colocaron los genes amplificados, en el octavo se coloco *SAP3* donde se evidencio que el peso molecular es de aproximadamente 87 pb, en el décimo pocillo se coloco *ATC1* con un peso aproximado de 87 pb, el cual fue el control interno en la corrida, en el doceavo pocillo se coloco al gen *HWP1* con un peso de 67 pb. Y en el último pocillo es decir en el catorce se colocó el control negativo, que no contenía ningún gen, como se muestra en la (Figura 11).

3.1.8. Selección de concentraciones del aceite esencial para purificación del ARN

Para la purificación del ARN se siguió el protocolo anteriormente descrito en el apartado de metodología. Se utilizó la biopelícula de *C. albicans* tratada con los aceites esenciales microencapsulados de canela y hierba luisa a diferentes concentraciones, como se evidencia en la (Tabla 13).

Genes productores de biopelículas **Concentración del aceite esencial**

<i>SAP3</i>	50 mg/mL de canela
	0,39 mg/mL de canela
	Control positivo
<i>HWP1</i>	50 mg/mL de hierba luisa
	0,39 mg/mL de hierba luisa
	Control positivo

Tabla 13. Concentraciones del aceite esencial microencapsulado de canela y hierba luisa para la purificación del ARN

Elaborado por Acosta Acosta Lissette Estefania

3.1.9. Retrotranscriptasa inversa y reacción de la cadena de la polimerasa convencional

Después de la purificación del ARN de las concentraciones anteriormente descritas, se procedió a realizar la retrotranscriptasa inversa con el protocolo mencionado en el apartado de Metodología con la finalidad de sintetizar ADNc de cada una de las concentraciones. Luego se ejecutó el protocolo para la amplificación de los genes que regulan la formación de la biopelícula. Se preparó el gel de agarosa y la electroforesis para revelar la amplificación de los genes a diferentes concentraciones del aceite esencial microencapsulado de canela y hierba luisa.

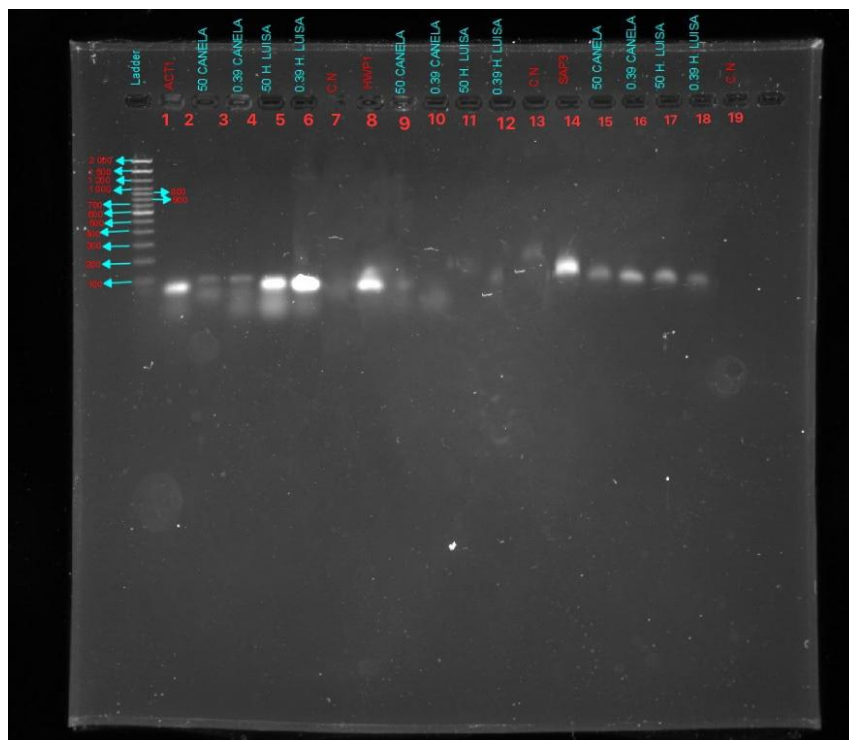


Figura 12. Amplificación de genes en diferentes concentraciones del aceite esencial microencapsulado de canela y hierba luisa

Elaborado por Acosta Acosta Lissette Estefania

Los resultados de la amplificación de los genes evaluados fueron los siguientes:

Control interno *ACT1*. en el segundo pocillo se encuentra el control positivo del gen *ACT1*, en el tercer y cuarto pocillo se encuentra el aceite de canela en concentraciones de 50 mg/mL y 0,39 mg/mL respectivamente, donde se evidencia una tenue franja del amplicón del gen *ACT1*. En los pocillos quinto y sexto se encuentra el aceite esencial de hierba luisa a concentraciones de 50 mg/mL y 0,39 mg/mL, respectivamente. Se evidencia una fuerte franja que corresponde a la presencia del gen de control interno *ACT1* con (87pb) en las concentraciones altas y bajas de los aceites. Por último, en el séptimo pocillo se encuentra el control negativo sin ninguna amplificación.

Por otro lado, en el octavo pocillo se encuentra el control positivo del gen *HWP1*; en el noveno y décimo pocillo se encuentra el aceite de canela en concentraciones de 50 mg/mL y 0,39 mg/mL, respectivamente, donde no se evidenció el amplicón del gen *HWP1*, lo que indica inhibición del gen en altas y bajas concentraciones. Asimismo, en los pocillos undécimo y duodécimo se encuentra el aceite esencial de hierba luisa a concentraciones de 50 mg/mL y 0,39 mg/mL, respectivamente; no se evidencia en el

amplicón del gen *HWP1* con (67pb) en las concentraciones altas y bajas de los aceites. Por último, en el decimotercero pocillo se encuentra el control negativo sin ninguna amplificación.

De igual modo, en el decimocuarto pocillo se encuentra el control positivo del gen *SAP3*; en el decimoquinto y decimosexto pocillo se encuentra el aceite de canela en concentraciones de 50 mg/mL y 0,39 mg/mL, respectivamente, donde se evidencia una franja del amplicón del gen *SAP3* con (87pb). En los pocillos decimoséptimo y decimoctavo se encuentra el aceite esencial de hierba luisa a concentraciones de 50 mg/mL y 0,39 mg/mL, respectivamente. Se evidencia una fuerte franja que corresponde a la presencia del gen *SAP3* en las concentraciones altas y bajas de los aceites. Por último, en el decimonoveno pocillo se encuentra el control negativo sin ninguna amplificación, como se evidencia en la (Figura 12).

3.2. Discusión

Candida albicans es un patógeno de gran trascendencia clínica, el cual se encuentra frecuentemente en pacientes inmunocomprometidos o con estancias prolongadas en las unidades de cuidados intensivos, donde su capacidad para formar biopelículas incrementa la tolerancia a los antifúngicos convencionales hasta 1000 veces (2,3,5,6). Esta resistencia se encuentra regulada por los genes de virulencia clave como lo son los genes *ITS1*, *ITS2*, *ALS1*, *ALS3*, *ERG11*, *MDR1*, *ACT1*, *SAP3* y *HWP1*; sin embargo, se tomó como referencia el gen *ACT1* como control interno y los genes *SAP3* y *HWP1* los cuales se encargan de la adhesión y maduración de las biopelículas (10,14,53–55). Ante la limitada disponibilidad de opciones terapéuticas en los diversos servicios de salud, este estudio evaluó la actividad de los aceites esenciales de *Cymbopogon flexuosus* y *Cinnamomum zeylanicum*. Para asegurar la estabilidad de sus compuestos activos, los aceites esenciales fueron microencapsulados mediante spray drying con los polímeros de maltodextrina y goma arábica (26,56–58), que es una técnica la cual favorece la liberación controlada de metabolitos secundarios como el cinamaldehído y el citral (21–23,26).

La evaluación de la actividad antimicrobiana fue determinada mediante la técnica de Kirby-Bauer modificada (difusión en pocillos) (29–31,59), el aceite de canela

demostró halos de inhibición de 16 mm en la concentración de 25 mg/mL y de 17 mm en la concentración de 50 mg/mL (Tabla 3; Figura 5), mientras que las concentraciones iguales o menores de 12,5 mg/mL no mostraron actividad (6 mm). Por el contrario, el aceite esencial de hierba luisa, reportó una ausencia total de halos de inhibición (6 mm) en todas las dosis del tratamiento aplicadas (Tabla 4; Figura 6). Los resultados obtenidos son comparables con lo descrito por Adiana et al. (2025), quienes, al evaluar extractos naturales mediante difusión en Agar, señalaron que la eficacia depende de la capacidad del compuesto para difundir en el medio (18). De la misma manera, según Magaldi et al. (2004), la técnica de difusión en pocillos es fundamental para el cribado de antifúngicos, pero factores como lo son la densidad del inóculo influyen directamente en la visibilidad del halo (31). Asimismo, la nula actividad de hierba luisa bajo este método puede explicarse por lo planteado por Montero-Recalde et al. (2018), quienes sugieren que ciertos métodos de medición de sensibilidad pueden presentar limitaciones inherentes para detectar la actividad de ciertos compuestos, ya que las condiciones del agar sólido van a hacer que se dificulte la migración de los agentes activos hacia el microorganismo (28–30,59). De esta manera, esto refuerza la necesidad de seguir las directrices del CLSI para la interpretación de susceptibilidad, considerando que los halos de 6 mm indican resistencia o falta de difusión efectiva en las condiciones del ensayo (29,30,59).

Respecto a la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Fungicida (CMF), ambos aceites mostraron un efecto dosis-dependiente significativo (Canela: $R=0,948$; Hierba luisa: $R=0,928$), como se muestra en las (Tablas 14 y 15). El canela registró un CMI de 1,56 mg/mL y una CMF de 6,25 mg/mL, como se evidencia en la (Tabla 5; Figura 7), mientras que la hierba luisa presentó una CMI de 3,12 mg/mL y una CMF de 6,25 mg/mL (Tabla 6; Figura 8). En ambos casos, la relación de CMF/CMI de 1 confirmó una actividad antifúngica (Tabla 6 y 8). Estos valores demuestran una potencia superior a los reportados por Adeola Tawakalitu Kola-Mustapha et al. (2026), quienes fijaron la CMI de estos aceites en 100 μ L/mL (19). Además, la eficacia observada se alinea con los rangos de Karpiński et al. (2023), quienes establecen que los aceites vegetales con alta actividad registran Concentraciones Mínimas Inhibitorias menores a 3,125 mg/mL (60).

En cuanto a la actividad antibiofilm, a pesar de que la cepa ATCC fue clasificada como un formador decil ($OD=0,585$) según los criterios de clasificación que se utilizaron para *Candida albicans*, las inhibiciones logradas fueron notables, como se observa en las (Tablas 9 y 10). La hierba luisa alcanzó una inhibición excepcional del 99,87% en concentraciones de 12,5 mg/mL y 25mg/mL (Tabla 11; Figura 9), superando el 70% de la reducción reportado por Gao et al. (2020) para esta especie (21). Por otra parte, la canela logró una inhibición máxima del 92,81% a 60 mg/mL (Tabla 12: Figura 10). Estos resultados validan lo expuesto por Qureshi et al. (2025), quienes destacan que los aceites esenciales poseen una potencia antibiofilm superior al 60% contra patógenos que se encuentran en los seres humanos (24).

A nivel molecular, se evaluó la presencia de los genes *HWP1* y *SAP3* en la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231, ambos se encuentran relacionados con la formación y desarrollo de biopelículas. El gen *SAP3* participa principalmente en la secreción de proteinasas aspárticas asociadas a la invasión tisular y al establecimiento inicial de la infección (61), mientras que *HWP1* interviene en la adhesión celular y la transformación morfológica de levadura a hifa, procesos que son fundamentales durante la formación y maduración de la biopelícula (62). Tras la exposición a los aceites esenciales microencapsulados, en concentraciones de 50mg/mL y 0,39mg/mL, se observaron comportamientos diferenciados en la amplificación de estos marcadores. El gen *ACT1*, utilizado como control constitutivo, mostró una banda notable más tenue de aproximadamente (87 pb) tras el tratamiento con canela, como se muestra en la (Figura 12). Este debilitamiento sigue una interferencia en la expresión basal del hongo, coincidiendo con los expuestos por Mucci et al. (2017) y Estrada-Barraza et al. (2011) sobre la importancia de estos marcadores para validar la estabilidad genómica tras un tratamiento.(49,63). En cuanto al gen *SAP3*, se encarga de codificar proteinasas aspárticas secretadas que favorecen la degradación de las proteínas, de la misma manera participa en la invasión tisular y el establecimiento inicial de la biopelícula. Presentó amplificación en todos los tratamientos evaluados, observándose bandas de aproximadamente (87 pb) de los aceites esenciales microencapsulados de canela y hierba luisa es decir que este permaneció detectable en todos los ensayos, como se muestra en la (Figura 12). Según Benzaid et al. (2019), la acción de los aceites esenciales suele ser selectiva, de esta forma priorizando la inhibición de la

morfogénesis sobre la secreción enzimática basal (14). Finalmente, la detección de bandas el gen *SAP3* con aproximadamente (87 pb) y la inhibición total observada en *HWP1* con (67 pb), como se muestra en la (Figura 12), sugiere que los aceites microencapsulados ejercen un efecto diferencial sobre los genes asociados a la formación de biopelículas en *Candida albicans*. Esto concuerda y respalda con lo reportado por Shahina et al. (2022), quienes señalan que la canela es un potente inhibidor de rasgos de virulencia específicos sin afectar necesariamente de forma inmediata toda la integridad genómica este hongo (23).

En conclusión, los resultados obtenidos demuestran que la microencapsulación de los aceites esenciales permitió conservar su actividad biológica frente a *Candida albicans* ATCC 10231, demostrando efectos antifúngicos, antibiofilm y moduladores sobre los genes asociados a la virulencia, adhesión y maduración de las biopelículas. En conjunto, los resultados sugieren que estos compuestos naturales actúan mediante mecanismos complementarios que afectan el crecimiento de patógeno estudiado relacionados con la formación de biofilm. Por ello los aceites esenciales microencapsulados de *Cinnamomum zeylanicum* y *Cymbopogon flexuosus* constituyen una alternativa prometedora para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas dirigidas al control de infecciones ocasionadas por *C. albicans*.

3.3. Verificación de la hipótesis

El análisis estadístico se realizó de dos formas

- Los resultados de viabilidad por el método colorimétrico de resazurina aplicando la correlación entre la concentración y la viabilidad, además se realizó la comprobación de la significancia mediante la prueba estadística de ANOVA, mediante el programa IBM SPSS Statistics.

Los resultados obtenidos de la actividad antibiofilm a diferentes concentraciones de los aceites *Cymbopogon flexuosus* y *Cinnamomum zeylanicum* se analizaron de igual manera mediante la prueba estadística de ANOVA y aplicando el test de comparación múltiple de Bonferroni`s.

3.3.1. Hipótesis

- **Hipótesis nula (H0):** Los aceites esenciales de *Cymbopogon flexuosus* y *Cinnamomum zeylanicum* no presentan actividad antifúngica y antibiofilm contra *Candida albicans* ATCC 10231.
- **Hipótesis alternativa (H1):** Los aceites esenciales de *Cymbopogon flexuosus* y *Cinnamomum zeylanicum* presentan actividad antifúngica y antibiofilm contra *Candida albicans* ATCC 10231

3.3.2. Análisis

- Viabilidad del aceite esencial microencapsulado de canela frente a *C. albicans* ATCC 10231

Resumen de modelo

Modelo		R		R2	
1		0,948		0,899	
Prueba Anova	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	Valor p
Regresión	0,534	1	0,534	53,470	0,000
Residuo	0,060	6	0,010		
Total	0,594	7			

Tabla 14. Validación de hipótesis del aceite esencial microencapsulado de canela

Elaborado por Acosta Acosta Lissette Estefania

Los resultados mostraron una correlación negativa de $R=0,948$ entre la concentración del aceite esencial microencapsulado de canela y la viabilidad de *C. albicans* ATCC 10231. Esto demuestra que, a mayor concentración, menor viabilidad. Por otro lado, en la prueba de Anova se demuestra una significancia de $p < 0,001$, confirmando que la concentración del aceite de canela tiene un efecto significativo sobre la viabilidad

- Viabilidad del aceite esencial microencapsulado de hierba luisa frente a *C. albicans* ATCC 10231

Resumen de modelo

Modelo		R		R2	
1		0,928		0,862	
Prueba	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	Valor p
Anova					
Regresión	1,797	1	1,797	37,464	0,001
Residuo	0,288	6	0,048		
Total	2,085	7			

Tabla 15. Validación de hipótesis del aceite esencial microencapsulado de hierba luisa

Elaborado por Acosta Acosta Lissette Estefania

Los resultados mostraron una correlación negativa de $R=0,928$ entre la concentración del aceite esencial microencapsulado de hierba luisa y la viabilidad de *C. albicans* ATCC 10231. Esto demuestra que, a mayor concentración, menor viabilidad. Por otro lado, en la prueba de Anova se demuestra una significancia de $p < 0,001$, confirmando que la concentración del aceite de hierba luisa tiene un efecto significativo sobre la viabilidad.

Análisis de resultados de formación de biopelícula consistió en un análisis de varianza (Anova) de una vía, con la finalidad de determinar diferencia entre el porcentaje de inhibición de la biopelícula y las concentraciones del aceite esencial microencapsulado. También se realizó la prueba estadística de Bonferroni para evaluar el nivel de significancia que existe entre el control positivo y las diferentes concentraciones.

La prueba estadística para la formación de biopelícula

- c. Inhibición de la biopelícula del aceite esencial microencapsulado de canela frente a *C. albicans* ATCC 10231.

Prueba de ANOVA	SS	DF	MS	F	Valor p
Tratamiento (entre columnas)	17958,539	8	2244,817	74,741	0,000
Residual (aleatorio)	540,624	18	30,035		
Total	18499,164	26			
Comparación de Bonferroni	Diferencia de medias	95,00% CI of Diff		Significancia	P ajustado
CP vs 0,39	-23,08	-39,97 a -6,19		Sí	0,002
CP vs 0,78	-41,31	-58,20 a -24,42		Sí	0,000
CP vs 1,56	-64,16	-81,05 a -47,27		Sí	0,000
CP vs 3,12	-61,29	-78,18 a -44,40		Sí	0,000
CP vs 6,25	-59,81	-76,70 a -42,92		Sí	0,000
CP vs 12,5	-53,36	-70,25 a -36,47		Sí	0,000
CP vs 25	-72,04	-88,93 a -55,15		Sí	0,000
CP vs 50	-92,41	-109,30 a -75,52		Sí	0,000

Tabla 16. Validación de hipótesis del aceite esencial microencapsulado de canela

Elaborado por Acosta Acosta Lissette Estefania

Los resultados de la prueba estadística de Anova muestra una alta significancia, lo que indica que la concentración del aceite tiene un efecto significativo sobre la biopelícula. La prueba de Bonferroni demostró que desde las concentraciones más bajas hasta las concentraciones más altas del aceite esencial microencapsulado de canela presentaron diferencias significativas con el control positivo con $p=0,0001$. Estos resultados indican que el aceite esencial inhibe significativamente la formación de biopelícula de *C. albicans*

- d. Inhibición de la biopelícula del aceite esencial microencapsulado de hierba luisa frente a *C. albicans* ATCC 10231

Prueba de ANOVA	SS	DF	MS	F	Valor p
Tratamiento (entre columnas)	48918,533	8	6114,817	55,421	0,000
Residual (aleatorio)	1986,012	18	110,334		
Total	50904,545	26			
Comparación de Bonferroni	Diferencia de medias	95,00% CI of Diff		Significancia	P ajustado
CP vs 0,39	0,00	-32,37 a 32,37		No	1,000
CP vs 0,78	0,00	-32,37 a 32,37		No	1,000
CP vs 1,56	-20,34	-52,71 a 12,03		No	1,000
CP vs 3,12	-60,12	-92,49 a -27,75		Sí	0,000
CP vs 6,25	-92,38	-124,75 a -60,01		Sí	0,000
CP vs 12,5	-99,87	-132,24 a -67,50		Sí	0,000
CP vs 25	-99,87	-132,24 a -67,50		Sí	0,000
CP vs 50	-82,51	-114,88 a -50,14		Sí	0,000

Tabla 17. Validación de hipótesis del aceite esencial microencapsulado de hierba luisa.

Elaborado por Acosta Acosta Lissette Estefania

Los resultados de la prueba estadística de Anova muestran una alta significancia, lo que indica que la concentración del aceite tiene un efecto significativo sobre la biopelícula. La prueba de Bonferroni demostró que en las concentraciones bajas como 0,39 mg/mL, 0,78 mg/mL y 1,56 mg/mL no existe diferencia significativa cuando se las compara con el control positivo, es decir, en estas concentraciones no inhibe la biopelícula de *C. albicans*.

En cambio, en concentraciones que van desde 3,12 mg/mL hasta 50 mg/mL si existe diferencias significativas con $p=0,0001$. Estos resultados demuestran que en concentraciones altas del aceite esencial microencapsulado de hierba luisa inhibe la formación de la biopelícula de *Candida albicans*.

3.3.3. Comprobación de la hipótesis

Conforme a los datos analizados con las pruebas estadísticas antes descritas, se acepta la hipótesis alternativa, que fundamenta lo siguiente: Los aceites esenciales de *Cymbopogon flexuosus* y *Cinnamomum zeylanicum* presentan actividad antifúngica y antibiofilm contra *Candida albicans* ATCC 10231

CAPITULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

Los aceites esenciales microencapsulados de *Cymbopogon flexuosus* y *Cinnamomum zeylanicum* presentaron actividad fúngica y antibiofilm frente a la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231, siendo el aceite de hierba luisa el que mostro mayor eficacia en la inhibición de biofilm con un porcentaje de 99,87%, mientras que canela destacó en la inhibición del crecimiento planctónico con una CMI menos a 1,56mg/mL. Estos hallazgos respaldan el potencial de los aceites esenciales como alternativas terapéuticas complementarias frente a infecciones por *Candida albicans*

Ambos aceites esenciales microencapsulados inhibieron el crecimiento de *C. albicans* de forma dosis-dependiente. El aceite de canela mostró una correlación negativa altamente significativa ($R=0,948$; $p<0,001$), con una CMI de 1,56mg/mL y una CMF de 6,25mg/mL, mientras que el aceite de hierba luisa presentó una correlación negativa significativa ($R=0,928$; $p<0,001$), con una CMI de 3,12 mg/mL y una CMF de 6,25 mg/mL. Es por ello, que ambos aceites presentaron una relación CMF/CMI igual a 1, confirmando su efecto fungicida. Los resultados de la difusión en pocillos mostraron halos de inhibición solo para la canela a altas concentraciones (16mm a 25mg/mL y 17 mm a 25 mg/mL), mientras que la de hierba luisa no evidencio halos de inhibición en todas las concentraciones 6mm, atribuibles a las características fitoquímicas de la microencapsulación.

La cepa de *Candida albicans* ATCC 10231 demostró la capacidad de formación de biopelícula débil con un OD de 0,585, confirmada por el ensayo mediante la técnica colorimétrica de cristal violeta. El aceite microencapsulado de canela inhibió significativamente el biofilm a concentraciones de 50 mg/mL (92,81%), 25 mg/mL (77,22%) y 1,56 mg/mL (61,09%), mientras que a concentraciones bajas como 0,39 mg/mL la inhibición fue mínima (19,90%). El aceite de hierba luisa presento una mayor consistencia inhibitoria frente a biofilm, alcanzando de esta manera una inhibición excepcional del 99,87% a concentraciones de 12,5mg/mL y 25 mg/mL, y

mantuvo actividad antibiofilm significativa desde concentraciones de 3,12 mg/mL (58,94%), hasta 50 mg/mL (86,56%), aunque a concentraciones menores como 0,78 mg/mL y 0,39 mg/mL la inhibición fue nula.

Los genes *SAP3*, *ACT1* y *HWP1*, asociados a la adhesión, regulación y maduración del biofilm, fueron identificados mediante PCR convencional en la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231 sin tratamiento, con amplificación a los tamaños esperados (aproximadamente 87 pb, 87pb y 67pb respectivamente). La cepa tratada con canela a 50 mg/mL y 0,39mg/mL mostraron una amplificación tenue del gen *ACT1* y una franja evidente del gen *SAP3*, mientras que el gen *HWP1* no evidencio amplificación en ninguna de las concentraciones que fueron evaluadas. De la misma manera con el aceite de hierba luisa a concentraciones de 50 mg/mL y 0,39mg/mL mantuvieron amplificaciones fuertes de los genes *ACT1* y *SAP3* en ambas concentraciones, y al igual que con canela, no se evidencio amplificación del gen *HWP1*, clave para la adhesión y formación de hifas, mientras que los genes *ACT1* y *SAP3* permanecen detectables, lo que sugiere una acción molecular de los aceites sobre los mecanismos de virulencia asociado a la expresión genética.

En conclusión, los aceites esenciales microencapsulados de hierba luisa como demostró ser el más prometedor de los dos aceites evaluados en cuanto a la inhibición del biofilm (99,87% a 12,5-25 mg/mL), mientras que el aceite de canela mostró una mayor eficacia en la inhibición del crecimiento planctónico (CMI de 1,56 mg/mL), de esta forma, posicionando a ambos aceites esenciales estudiados como candidatos óptimos para opciones terapéuticas complementarios frente a *Candida albicans* ATCC 10231.

4.2. Recomendaciones

-Se recomienda evaluar los aceites esenciales de canela y hierba luisa frente a aislados clínicos de *Candida albicans* y otras especies de *Candida* no *albicans* para confirmar si la actividad antifúngica y antibiofilm se mantiene en cepas con diferentes perfiles de resistencia y la capacidad de formación de biopelículas.

-Dado que la técnica de Kirby-Bauer modificada subestimó la actividad de la hierba luisa al evidenciar la ausencia de los halos de inhibición, se sugiere optimizar las condiciones de difusión en agar es decir el uso de emulsionantes como el DMSO o medios suplementados e implementar la microdilución en caldo como método de referencia para futuros cribados de aceites esenciales con compuestos que tengan baja difusibilidad.

-Se propone realizar estudios de qPCR para cuantificar la reducción relativa de la expresión de los genes *HWP1*, *ACT1* y *SAP3* tras el tratamiento con los aceites, así como evaluar otros genes que se encuentren asociados a la formación de biopelículas para comprender el espectro completo de la modulación molecular ejercido por estos compuestos naturales en tiempo real.

-Dado el excelente perfil antibiofilm del aceite de hierba luisa a concentraciones de 12,5mg/mL- 25mg/mL, se recomienda explorar su aplicación en formulaciones farmacéuticas para el tratamiento de candidiasis, junto con estudios de seguridad y de citotoxicidad en cultivos celulares.

-Finalmente, se sugiere realizar estudios de sinergia combinando los aceites de canela y hierba luisa con antifúngicos convencionales como el fluconazol y la Anfotericina B para determinar posibles efectos aditivos o sinérgicos, los cuales permitan reducir las dosis terapéuticas y minimizar los efectos adversos en el tratamiento de infecciones por *Candida albicans*.

Referencias Bibliográficas

1. Borman AM, Abdolrasouli A, Johnson EM. Name changes for fungi of medical importance, 2022–2024. *Journal of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology; 2025. doi:10.1128/jcm.02041-24 PubMed PMID: 40899797.
2. Riera FO, Caeiro JP, Angiolini SC, Vigezzi C, Rodriguez E, Icely PA, et al. Invasive Candidiasis: Update and Current Challenges in the Management of This Mycosis in South America. *Antibiotics*. MDPI; 2022. doi:10.3390/antibiotics11070877 PubMed PMID: 35884131.
3. Ünal N, Karakoyun AS, Ünal İ, Turunç T, Lass-Flörl C, Ilkit M. Epidemiological Characteristics and Mortality Predictors of Candidemia Due to *Candida albicans*: A Single-Center Experience from Türkiye. *Journal of Fungi*. 1 de noviembre de 2025;11(11). doi:10.3390/jof11110788
4. Mantilla-Florez YF, Tuta-Quintero E, Brito-Rodriguez AJ, Clavijo-Moreno LC. Candidiasis and *Candida albicans*. *Bol Malariol Salud Ambient*. 1 de julio de 2021;61(3):391-400. doi:10.52808/bmsa.7e5.613.003
5. La OMS publica sus primeros informes sobre pruebas y tratamientos relacionados con las micosis [Internet]. [citado 12 de abril de 2026]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news/item/01-04-2025-who-issues-its-first-ever-reports-on-tests-and-treatments-for-fungal-infections>
6. World Health Organization. WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. 2022;1:1-48.
7. Parambath S, Dao A, Kim HY, Zawahir S, Izquierdo AA, Tacconelli E, et al. *Candida albicans*—A systematic review to inform the World Health Organization Fungal Priority Pathogens List. *Med Mycol*. 27 de junio de 2024;62(6). doi:10.1093/MMY/MYAE045 PubMed PMID: 38935906.
8. Angane M, Swift S, Huang K, Butts CA, Quek SY. Essential Oils and Their Major Components: An Updated Review on Antimicrobial

- Activities, Mechanism of Action and Their Potential Application in the Food Industry. *Foods*. MDPI; 2022. doi:10.3390/foods11030464
9. Rashed AA, Rathi DNG, Nasir NAHA, Rahman AZA. Antifungal Properties of Essential Oils and Their Compounds for Application in Skin Fungal Infections: Conventional and Nonconventional Approaches. *Molecules*. 1 de febrero de 2021;26(4):1093. doi:10.3390/molecules26041093 PubMed PMID: 33669627.
 10. Alim D, Sircaik S, Panwar SL. The Significance of Lipids to Biofilm Formation in *Candida albicans*: An Emerging Perspective. *Journal of Fungi* 2018, Vol 4, Page 140. 18 de diciembre de 2018;4(4):140. doi:10.3390/jof4040140
 11. Wijesinghe GK, de Oliveira TR, Maia FC, de Feiria SB, Barbosa JP, Joia F, et al. Efficacy of true cinnamon (*Cinnamomum verum*) leaf essential oil as a therapeutic alternative for *Candida* biofilm infections. *Iran J Basic Med Sci*. 1 de junio de 2021;24(6):787-95. doi:10.22038/ijbms.2021.53981.12138
 12. Mohamed MF, Abdelmegeed SM, Abdelsattar AS, Abouelkhair AA, Abutaleb NS, Seleem MN. Dronedarone synergizes with colistin against planktonic and biofilm forms of multidrug-resistant Gram-negative pathogens. *Microbiol Spectr*. 3 de febrero de 2026;14(2). doi:10.1128/SPECTRUM.03006-25 PubMed PMID: 41432158.
 13. de Macedo LM, Dos Santos ÉM, Militão L, Tundisi LL, Ataíde JA, Souto EB, et al. Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L., syn *salvia rosmarinus* penn.) and its topical applications: A review. *Plants*. MDPI AG; 2020. doi:10.3390/plants9050651 PubMed PMID: 32455585.
 14. Benzaid C, Belmadani A, Djeribi R, Rouabhia M. The effects of mentha × piperita essential oil on *C. Albicans* growth, transition, biofilm formation, and the expression of secreted aspartyl proteinases genes. *Antibiotics*. 1 de marzo de 2019;8(1). doi:10.3390/antibiotics8010010
 15. Lee Y, Puumala E, Robbins N, Cowen LE. Antifungal Drug Resistance: Molecular Mechanisms in *Candida albicans* and beyond. *Chemical Reviews*. American Chemical Society; 2021. p. 3390-411. doi:10.1021/acs.chemrev.0c00199 PubMed PMID: 32441527.

16. Kaur J, Nobile CJ. Antifungal drug-resistance mechanisms in *Candida* biofilms. *Current Opinion in Microbiology*. Elsevier Ltd; 2023. doi:10.1016/j.mib.2022.102237 PubMed PMID: 36436326.
17. Karpiński TM, Ożarowski M, Seremak-Mrozikiewicz A, Wolski H. Anti-*Candida* and Antibiofilm Activity of Selected Lamiaceae Essential Oils. *Frontiers in Bioscience - Landmark*. 1 de febrero de 2023;28(2). doi:10.31083/J.FBL2802028 PubMed PMID: 36866556.
18. ADIANA ID, SUFARNAP E, SATRIA D, DARWIS AF, MUHAMMAD M, DERIATY T. ANTIMICROBIAL AND ANTI-BIOFILM EFFECTIVENESS OF SAURAUIA VULCANI KORTH. ETHANOLIC EXTRACT: AN IN VITRO STUDY OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS ATCC®25923™ AND CANDIDA ALBICANS ATCC®10231™. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 9 de diciembre de 2025;42-7. doi:10.22159/ijap.2025.v17s4.07
19. Kola-Mustapha AT, John FT, Bello RH, Adedeji OJ, Ghazali YO, Khalid-Salako FA, et al. Essential oil-based hydrogels for oral candidiasis: preliminary formulation development, antifungal efficacy, and computational analysis via Monte Carlo simulation. *Front Cell Infect Microbiol*. 7 de abril de 2026;16:1774370. doi:10.3389/FCIMB.2026.1774370/TEXT PubMed PMID: 42022799.
20. Cruz Choappa R, Vieille Oyarzo P. Nuevos nombres para antiguas especies fúngicas de importancia médica New names for ancient fungal species of medical importance. *Rev Chilena Infectol* [Internet]. 2023. Disponible en: www.revinf.cl
21. Gao S, Liu G, Li J, Chen J, Li L, Li Z, et al. Antimicrobial Activity of Lemongrass Essential Oil (*Cymbopogon flexuosus*) and Its Active Component Citral Against Dual-Species Biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Candida* Species. *Front Cell Infect Microbiol*. 22 de diciembre de 2020;10:603858. doi:10.3389/fcimb.2020.603858 PubMed PMID: 33415085.
22. Živković M, Stanisavljević I, Gajović N, Pavlović S, Simović Marković B, Jovanović IP, et al. Comprehensive Phytochemical Analysis and

- Evaluation of Antioxidant, Antimicrobial, Cytotoxic, and Immunomodulatory Activities of Commercial Cinnamon Bark Essential Oil (*Cinnamomum zeylanicum* L.). *International Journal of Molecular Sciences* 2025, Vol 26, Page 6482. 5 de julio de 2025;26(13):6482. doi:10.3390/ijms26136482 PubMed PMID: 40650258.
23. Shahina Z, Molaeitabari A, Sultana T, Dahms TES. Cinnamon Leaf and Clove Essential Oils Are Potent Inhibitors of *Candida albicans* Virulence Traits. *Microorganisms*. 1 de octubre de 2022;10(10):1989. doi:10.3390/MICROORGANISMS10101989/S1
 24. Qureshi KA, Parvez A, Ismatullah H, Almahasheer H, Al Rugaie O. Exploring the antimicrobial and antibiofilm potency of four essential oils against selected human pathogens using in vitro and in silico approaches. *PLoS One*. 1 de abril de 2025;20(4):e0315663. doi:10.1371/journal.pone.0315663 PubMed PMID: 40273059.
 25. Bringas-Lantigua M, Expósito-Molina I, Reineccius GA, López-Hernández O, Pino JA. Influence of Spray-Dryer Air Temperatures on Encapsulated Mandarin Oil. *Drying Technology*. 2011;29(5):520-6. doi:10.1080/07373937.2010.513780
 26. Sousa VI, Parente JF, Marques JF, Forte MA, Tavares CJ. Microencapsulation of Essential Oils: A Review. *Polymers (Basel)*. 1 de mayo de 2022;14(9):1730. doi:10.3390/POLYM14091730 PubMed PMID: 35566899.
 27. Maldonado I, Fernández Canigia L, Vivot W, Domecq P, Davel G, Córdoba S. Evaluación de tres métodos para la detección de la sensibilidad in vitro de especies de *Candida* a los antifúngicos. *Rev Argent Microbiol [Internet]*. 2011 [citado 13 de abril de 2026];43(2):120-6. Disponible en: https://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-75412011000200010&lng=es&nrm=iso&tlng=es
 28. Montero-Recalde M, Vayas L, Avilés-Esquivel D, Pazmiño P, Erazo-Gutierrez V. Evaluación de dos métodos para medir la sensibilidad de inhibición de crecimiento de la cepa certificada de *Staphylococcus*

- aureus subsp. aureus. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. 2018;29(4):1543-7. doi:10.15381/RIVEP.V29I4.15185
29. (ClinicalandLaboratoryStandardsInstitute) CLSI. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts, 3rd Edition. CLSI document [Internet]. 2020 [citado 13 de abril de 2026];24(15):1-21. Disponible en: <https://clsi.org/shop/standards/m44/>
 30. CLSI. M27: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Wayne (PA): Clinical Laboratory Standard Institute [Internet]. 2017 [citado 13 de abril de 2026];4th ed:19087-1898. Disponible en: <https://clsi.org/shop/standards/m27/>
 31. Magaldi S, Mata-Essayag S, Hartung De Capriles C, Perez C, Colella MT, Olaizola C, et al. Well diffusion for antifungal susceptibility testing. International Journal of Infectious Diseases. 2004;8(1):39-45. doi:10.1016/j.ijid.2003.03.002 PubMed PMID: 14690779.
 32. Del Pozo JL, Cantón E. Candidiasis asociada a biopelículas. Rev Iberoam Micol. 1 de julio de 2016;33(3):176-83. doi:10.1016/J.RIAM.2015.06.004 PubMed PMID: 27395021.
 33. Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: Development, architecture, and drug resistance. J Bacteriol. 2001;183(18):5385-94. doi:10.1128/JB.183.18.5385-5394.2001/FORMAT/EPUB PubMed PMID: 11514524.
 34. Moreno Calderón X, Ruiz Requena ER, Martinez Vargas IA, Oliveira D. Resazurina como indicador colorimétrico en la susceptibilidad a biopelículas sésiles de *Candida* spp., aisladas de hemocultivos frente a fluconazol. Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas. 15 de enero de 2026;28(2):51-9. doi:10.71034/svbe.2025.28.2.07
 35. Vista de Evaluación de dos métodos para medir la sensibilidad de inhibición de crecimiento de la cepa certificada de *Staphylococcus aureus* subsp. aureus [Internet]. [citado 13 de abril de 2026]. Disponible en:

<https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/veterinaria/article/view/15185/13328>

36. Dos Santos Correa RM, Mota TC, Guimarães AC, Bonfim LST, Burbano RR, De Oliveira Bahia M. Cytotoxic and Genotoxic Effects of Fluconazole on African Green Monkey Kidney (Vero) Cell Line. *Biomed Res Int*. 2018;2018:6271547. doi:10.1155/2018/6271547 PubMed PMID: 30515410.
37. Van Meerloo J, Kaspers G, Cloos J. Cell sensitivity assays: The MTT assay. *Methods Mol Biol*. 24 de marzo de 2011;731:237-45. doi:10.1007/978-1-61779-080-5_20
38. Jones LJ, Gray M, Yue ST, Haugland RP, Singer VL. Sensitive determination of cell number using the CyQUANT® cell proliferation assay. *J Immunol Methods*. 2001;254(1-2):85-98.
39. Galdiero E, Salvatore MM, Maione A, de Alteriis E, Andolfi A, Salvatore F, et al. GC-MS-based metabolomics study of single-and dual-species biofilms of *Candida albicans* and *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Mol Sci*. 1 de abril de 2021;22(7):3496. doi:10.3390/IJMS22073496/S1 PubMed PMID: 33800643.
40. Teixeira-Santos R, Gomes LC, Vieira R, Sousa-Cardoso F, Soares OSGP, Mergulhão FJ. Exploring Nitrogen-Functionalized Graphene Composites for Urinary Catheter Applications. *Nanomaterials*. 1 de septiembre de 2023;13(18):2604. doi:10.3390/NANO13182604/S1
41. Gulati M, Lohse MB, Ennis CL, Gonzalez RE, Perry AM, Bapat P, et al. In Vitro Culturing and Screening of *Candida albicans* Biofilms. *Curr Protoc Microbiol*. 1 de agosto de 2018;50(1). doi:10.1002/CPMC.60 PubMed PMID: 29995344.
42. da Silva Gündel S, de Souza ME, Quatrin PM, Klein B, Wagner R, Gündel A, et al. Nanoemulsions containing *Cymbopogon flexuosus* essential oil: Development, characterization, stability study and evaluation of antimicrobial and antibiofilm activities. *Microb Pathog*. 1 de mayo de 2018;118:268-76. doi:10.1016/J.MICPATH.2018.03.043 PubMed PMID: 29581028.

43. Barros JMHF, Santos AA dos, Silva ACF da, Chamberlain ALV, Assis HCS de, Siebel AM, et al. Nanoencapsulation of Cinnamon Essential Oil in Zein: Physicochemical Properties, In Vitro Release, and Antifungal Activity. *ACS Appl Polym Mater.* 10 de octubre de 2025;7(19):12998-3010. doi:10.1021/ACSAPM.5C02214
44. Moreno X, Ventura M, Panizo MM, Garcés MF. Assessment of biofilms formation of bacterial and fungal isolates using qualitative Congo red agar and semiquantitative crystal violet microtiter methods. *Biomedica.* 2023;43:77-88. doi:10.7705/BIOMEDICA.6732 PubMed PMID: 37721922.
45. Márton R, Nagy B, Molnár M. Biofilm development of *Candida boidinii* and the effect of tyrosol on biofilm formation. *Biotechnology Letters* 2023 45:11. 13 de octubre de 2023;45(11):1541-54. doi:10.1007/S10529-023-03432-5 PubMed PMID: 37831285.
46. Kit de minipreparación rápida de ADN para hongos y bacterias – Zymo Research International [Internet]. [citado 1 de junio de 2026]. Disponible en: <https://zymoresearch.eu/products/quick-dna-fungal-bacterial-miniprep-kit>
47. Kit Quick-RNA Miniprep: ¡Consigue una muestra gratis ahora! – Zymo Research International [Internet]. [citado 1 de junio de 2026]. Disponible en: <https://zymoresearch.eu/products/quick-rna-miniprep-kit?srsId=AfmBOopH93EBuvMmkrsz8HYOo8a2vFhaO2IAZC9cfaS05klsEZgLxZJe>
48. GoScript™ Reverse Transcription System Protocol [Internet]. [citado 1 de junio de 2026]. Disponible en: <https://worldwide.promega.com/es-es/resources/protocols/technical-manuals/101/goscript-reverse-transcription-system-protocol/>
49. Estrada-Barraza D, Dávalos Martínez A, Flores-Padilla L, Mendoza-De Elias R, Sánchez-Vargas LO. Comparación entre métodos convencionales, ChromAgar Candida® y el método de la PCR para la identificación de especies de *Candida* en aislamientos clínicos. *Rev Iberoam Micol.* enero de 2011;28(1):36-42. doi:10.1016/j.riam.2010.11.003 PubMed PMID: 21167300.

50. Estrada-Barraza D, Dávalos Martínez A, Flores-Padilla L, Mendoza-De Elias R, Sánchez-Vargas LO. Comparación entre métodos convencionales, ChromAgar Candida® y el método de la PCR para la identificación de especies de *Candida* en aislamientos clínicos. *Rev Iberoam Micol.* 1 de enero de 2011;28(1):36-42. doi:10.1016/J.RIAM.2010.11.003 PubMed PMID: 21167300.
51. Marmiroli N, Maestri E. Polymerase Chain Reaction (PCR). *Food Toxicants Analysis: Techniques, Strategies and Developments.* 7 de julio de 2025;147-87. doi:10.1016/B978-044452843-8/50007-9 PubMed PMID: 36943981.
52. C.V. GSA de. medigraphic.com.
53. Magalhães J, Correia MJ, Silva RM, Esteves AC, Alves A, Duarte AS. Molecular Techniques and Target Selection for the Identification of *Candida* spp. in Oral Samples. *Applied Sciences (Switzerland).* 1 de septiembre de 2022;12(18):9204. doi:10.3390/APP12189204/S1
54. Ferrer C, Colom F, Frasés S, Mulet E, Abad JL, Alió JL. Detection and Identification of Fungal Pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S Ribosomal DNA Typing in Ocular Infections. *J Clin Microbiol.* 2001;39(8):2873. doi:10.1128/JCM.39.8.2873-2879.2001 PubMed PMID: 11474006.
55. Huma ZE, Saleem S, Imran M, Raza SM, Jabeen K, Arshad F. Role of ERG11 and MDR1 genes in cycloheximide and multidrug resistance in *Candida* species. *Brazilian Journal of Microbiology.* 1 de septiembre de 2024;55(3):2569. doi:10.1007/S42770-024-01436-5 PubMed PMID: 38980650.
56. Pilicheva B, Uzunova Y, Katsarov P. Comparative Study on Microencapsulation of Lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.) and Peppermint (*Mentha piperita* L.) Essential Oils via Spray-Drying Technique. *Molecules* 2021, Vol 26, Page 7467. 9 de diciembre de 2021;26(24):7467. doi:10.3390/MOLECULES26247467 PubMed PMID: 34946549.
57. Benavides A, Martín-Álvarez P, Vázquez L, Reglero G, Señoráns F, Ibáñez E. Optimization of Countercurrent Supercritical Fluid Extraction

- of Minor Components from Olive Oil. *Curr Anal Chem*. 27 de octubre de 2013;10(1):78-85. doi:10.2174/1573411011410010007
58. Fernandes B, Oliveira MC, Marques AC, dos Santos RG, Serrano C. Microencapsulation of Essential Oils and Oleoresins: Applications in Food Products. *Foods*. 1 de diciembre de 2024;13(23):3873. doi:10.3390/FOODS13233873 PubMed PMID: 39682947.
 59. Lacasa CE, Mazuelos ME. Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A) 15a.1. Fundamento.
 60. Karpiński TM, Ożarowski M, Seremak-Mrozikiewicz A, Wolski H, Karpiński TM, Ożarowski M, et al. Anti-Candida and Antibiofilm Activity of Selected Lamiaceae Essential Oils. *Frontiers in Bioscience-Landmark* 2023 28 (2). 16 de febrero de 2023;28(2). doi:10.31083/j.fbl2802028 PubMed PMID: 36866556.
 61. Malinovská Z, Čonková E, Váczi P. Biofilm Formation in Medically Important Candida Species. *Journal of Fungi*. 1 de octubre de 2023;9(10):955. doi:10.3390/JOF9100955 PubMed PMID: 37888211.
 62. Mayer FL, Wilson D, Hube B. Candida albicans pathogenicity mechanisms. *Virulence*. 15 de febrero de 2013;4(2):119. doi:10.4161/VIRU.22913 PubMed PMID: 23302789.
 63. Mucci MJ, Cuestas ML, Landanburu MF, Mujica MT. Prevalence of Candida albicans, Candida dubliniensis and Candida africana in pregnant women suffering from vulvovaginal candidiasis in Argentina. *Rev Iberoam Micol*. 1 de abril de 2017;34(2):72-6. doi:10.1016/j.riam.2016.09.001 PubMed PMID: 28385421.

ANEXOS

Anexo 1. Procedimiento de viabilidad con resazurina al 0.01 %

	CONTROL POSITIVO	CANELA			HIERBA LUISA			CONTROL ACEITES		CONTROL CALDO		CONTROL NEGATIVO	CONCENTRACIONES
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	
A	50 ul 10 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 mg/mL
B	50 ul 10 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	25 mg/mL
C	50 ul 10 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	12,5 mg/mL
D	50 ul 10 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	6,25 mg/mL
E	50 ul 10 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	3,12 mg/mL
F	50 ul 10 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	1,56 mg/mL
G	50 ul 10 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	0,78 mg/mL
H	50 ul 10 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	50 ul 100 ul 20 ul 20ul	0,39 mg/mL
CANELA HIERBA LUISA													
	Volumen del medio de cultivo LB												
	Volumen de la solución de AE + DMSO 0,1 %												
	Volumen del inóculo												
	Volumen de resazurina al 0.01 %												
	Volumen de antibiótico												

Realizado por: Acosta Acosta Lissette Estefania

Anexo 2. Diseño experimental para la evaluación de la actividad anti – biopelícula de aceites esenciales.

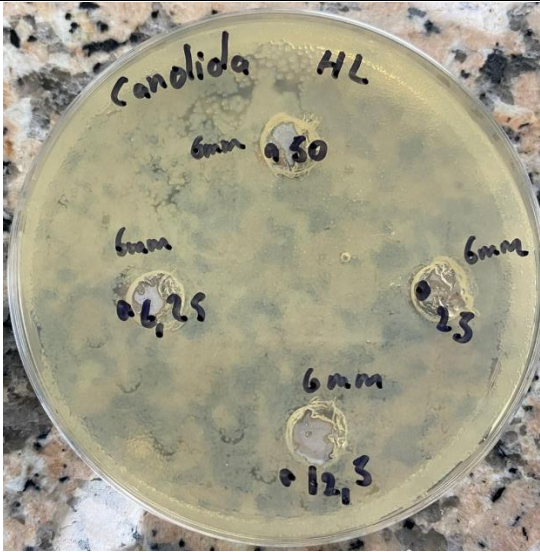
	BIOFILM <i>Candida albicans</i> ATCC 10231												CONCENTRACIONES
	CONTROL POSITIVO	CANELA			HIERBA LUISA			CONTROL CALDO		CONTROL ACEITES		CONTROL NEGATIVO	
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	
A	100 ul 10 ul 10 ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul	100 ul	100 ul 100 ul	100 ul 100 ul	100 ul 10 ul	50 mg/mL
B	100 ul 10 ul 10 ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul	100 ul	100 ul 100 ul	100 ul 100 ul	100 ul 10 ul	25 mg/mL
C	100 ul 10 ul 10 ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul	100 ul	100 ul 100 ul	100 ul 100 ul	100 ul 10 ul	12,5 mg/mL
D	100 ul 10 ul 10 ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul	100 ul	100 ul 100 ul	100 ul 100 ul	100 ul 10 ul	6,25 mg/mL
E	100 ul 10 ul 10 ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul	100 ul	100 ul 100 ul	100 ul 100 ul	100 ul 10 ul	3,12 mg/mL
F	100 ul 10 ul 10 ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul	100 ul	100 ul 100 ul	100 ul 100 ul	100 ul 10 ul	1,56 mg/mL
G	100 ul 10 ul 10 ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul	100 ul	100 ul 100 ul	100 ul 100 ul	100 ul 10 ul	0,78 mg/mL
H	100 ul 10 ul 10 ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul 100 ul 10ul	100 ul	100 ul	100 ul 100 ul	100 ul 100 ul	100 ul 10 ul	0,39 mg/mL
CANELA HIERBA LUISA													
	Volumen de caldo BHI												
	Volumen del inóculo												
	Volumen del AE + DMSO 0,1%												
	Volumen antibiótico												

Realizado por: Acosta Acosta Lissette Estefania

Anexo 3. Difusión en pocillo de AE *Cinnamomum zeylanicum* (Canela) de *Candida albicans* ATCC 10231.

Difusión en pocillo de AE <i>Cinnamomum zeylanicum</i> (Canela) de <i>Candida albicans</i> ATCC 1023.	
	
50 mg/mL, 25 mg/mL, 12,5 mg/mL y 6,25 mg/mL	3,12 mg/mL, 1,56 mg/mL, 0,78 mg/mL y 0,39 mg/mL

Anexo 4. Difusión en pocillo de AE *Cymbopogon flexuosus* (Hierba luisa) de *Candida albicans* ATCC 10231.

Difusión en pocillo de AE <i>Cymbopogon flexuosus</i> (Hierba luisa) de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	
	
50 mg/mL, 25 mg/mL, 12,5 mg/mL y 6,25 mg/mL	3,12 mg/mL, 1,56 mg/mL, 0,78 mg/mL y 0,39 mg/mL

Anexo 5. Viabilidad con resazurina al 0,01% de *Candida albicans* ATCC 10231

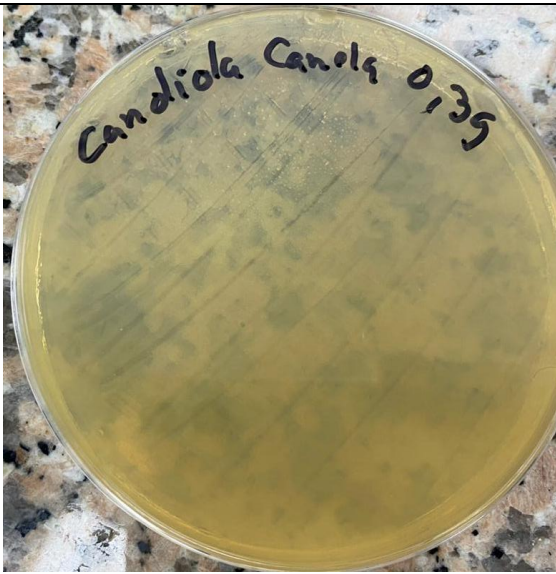


Anexo 6. Concentración Mínima Fungicida de AE *Cinnamomum zeylanicum* (Canela) de *Candida albicans* ATCC 10231

Concentración Mínima Fúngica de AE de *Cinnamomum zeylanicum* (Canela) de *Candida albicans* ATCC 10231

Cara anterior



50 mg/mL	3,12 mg/mL
	
1,56 mg/mL	0,78 mg/mL
	
0,39 mg/mL	

Anexo 7. Concentración Mínima Bactericida de *Cymbopogon flexuosus* (Hierba luisa) de *Candida albicans* ATCC 10231.

Concentración Mínima Fúngica de AE de *Cymbopogon flexuosus* (Hierba luisa)
de *Candida albicans* ATCC 10231

Cara anterior



50 mg/mL



3,12 mg/mL



1,56 mg/mL



0,78 mg/mL



0,39 mg/mL

Anexo 8. Aprobación tema y tutor



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
CONSEJO DIRECTIVO

Resolución Nro. UTA-CD-FCS-2026-0467

Ambato, 05 de marzo de 2026

UNIVERSIDAD TECNICA DE AMBATO

Consejo Directivo de la Facultad de Ciencias de la Salud, mediante sesión ordinaria del 04 de Marzo de 2026, en conocimiento del acuerdo UTA-UAT-FCS-2026-0104-A, suscrito por el Lcdo. Mg. Mario Vilcacundo Córdova, sugiriendo se apruebe la modalidad Trabajo de Titulación del/la señor/ita ACOSTA ACOSTA LISSETTE ESTEFANIA con cédula de ciudadanía No 1804724951 estudiante de la carrera de Laboratorio Clínico, para el período académico enero – julio 2026.

Que, el numeral 6.1 del Instructivo del Reglamento para la Titulación de Grado en la Universidad Técnica de Ambato, aprobado mediante la Resolución Nro. CAU-P-681-2023, de fecha 29 de noviembre de 2023, y reformado mediante la Resolución Nro. CAU-P-290-2025, de fecha 19 de mayo de 2025, establece las modalidades de titulación y el procedimiento para su aprobación.

CONSEJO DIRECTIVO, RESUELVE:

APROBAR la modalidad Trabajo de Titulación del/la señor/ita ACOSTA ACOSTA LISSETTE ESTEFANIA con cédula de ciudadanía No 1804724951 estudiante de la carrera de Laboratorio Clínico, para el período académico enero – julio 2026, según el siguiente detalle:

Opción modalidad	Proyecto de investigación
Tema	Evaluación antifúngica y anti biofilm de aceites esenciales en Candida albicans ATCC 10231
Tutor	PhD. María Elizabeth Proaño Pérez

- **DEJAR CONSTANCIA** de que el presente trabajo de titulación forma parte del proyecto de investigación: "Evaluación de la actividad antimicrobiana y antibiofilm de aceites esenciales micro encapsulados", aprobado mediante la Resolución Nro. UTA-CONIN-2023-0185-R.

Documento firmado electrónicamente

Dr. José Luis Herrera López
PRESIDENTE CONSEJO DIRECTIVO - FCS