



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Trabajo de fin de Carrera titulado:

Aceites esenciales de eucalipto, hierba luisa, lavanda y clavo de olor como potenciales antifúngicos frente a *Candida albicans* y *Candida parapsilopsis*. Un estudio *in vitro*.

Realizado por:

Juan Diego Vásquez Córdova

Director del proyecto:

Lino Arisqueta

Como requisito para la obtención del título de:

MAGISTER EN BIOMEDICINA

QUITO, 08 del 2024

DECLARACIÓN JURAMENTADA

Yo, Vásquez Córdova Juan Diego, ecuatoriano, con Cédula de ciudadanía N° 1900481738, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido presentado anteriormente para ningún grado o calificación profesional, y se basa en las referencias bibliográficas descritas en este documento.

A través de esta declaración, cedo los derechos de propiedad intelectual a la

UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido en la Ley de Propiedad Intelectual, reglamento y normativa institucional vigente.



Juan Diego Vásquez Córdova

C.I.: 1900481738

DECLARACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS

Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación.

Lino Arisqueta Herranz

LOS PROFESORES INFORMANTES:

José Rubén Ramírez Iglesias

Jan Carlos Navarro Castro

Después de revisar el trabajo presentado lo han calificado como apto para su
defensa

oral ante el tribunal examinador.



José Rubén Ramírez Iglesias



Juan Carlos Navarro Castro

Quito, 08 de Abril de 2024

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.



Juan Diego Vásquez Córdova

C.I.: 1900481738

Artículo de tesis

Aceites esenciales de eucalipto, hierba luisa, lavanda y clavo de olor como potenciales antifúngicos frente a *Candida albicans* y *Candida parapsilosis*. Un estudio *in vitro*.

Juan Vásquez¹, PhD. Lino Arisqueta^{2*}

¹ Maestría en Biomedicina, Fac Cs Salud, UISEK; juan.vasquez@uisek.edu.ec

Resumen: Las infecciones nosocomiales causadas por especies de *Candida* son un problema de salud pública global. *Candida albicans* es el principal agente causal, pero *Candida parapsilosis* ha cobrado relevancia al superar a *C. albicans* en muchos hospitales. El uso indiscriminado de antifúngicos ha propiciado la resistencia de estos patógenos, por lo que se investigan alternativas terapéuticas como los aceites esenciales de plantas medicinales. Se extrajeron los aceites esenciales *Eucalyptus globulus*, *Cymbopogon citratus*, *Lavandula angustifolia* y *Syzygium aromaticum* por arrastre con vapor. Se evaluó su actividad antimicótica frente a *C. albicans* y *C. parapsilosis* ATCC 22019 (resistente a azoles) mediante microdilución en caldo, empleando concentraciones de 0,5 a 0,0625 mg/ml. Se midió la densidad óptica cada 12 horas durante 36 horas para determinar el crecimiento fúngico. El aceite de clavo de olor inhibió significativamente el crecimiento de *C. albicans* a 0,5 mg/ml, pero no tuvo efecto sobre *C. parapsilosis*. La lavanda presentó mayor inhibición a bajas concentraciones (0,0625 mg/ml) en *C. albicans*. La hierba luisa inhibió similarmente *C. albicans* en todas las concentraciones y tuvo un efecto transitorio sobre *C. parapsilosis*. El eucalipto sólo tuvo un efecto inhibitorio considerable sobre *C. albicans* a altas concentraciones. Los aceites esenciales mostraron actividad antifúngica variable, siendo promisorios contra *C. albicans* pero menos efectivos contra la cepa resistente de *C. parapsilosis*. El clavo de olor y la hierba luisa emergen como candidatos potenciales, pero se requiere investigar más la susceptibilidad de distintas especies de *Candida* y desarrollar estrategias para contrarrestar la resistencia fúngica.

Palabras clave: Aceites esenciales, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, resistencia, Eucalipto, Lavanda, Clavo de olor, Hierba luisa, biofilm, actividad antifúngica

Abstract: Nosocomial infections caused by *Candida* species represent a global public health issue. *Candida albicans* is the primary causative agent, yet *Candida parapsilosis* has gained prominence by surpassing *C. albicans* in many hospitals. The indiscriminate use of antifungals has fostered resistance in these pathogens, prompting the investigation of therapeutic alternatives such as essential oils from medicinal plants. Essential oils from *Eucalyptus globulus*, *Cymbopogon citratus*, *Lavandula angustifolia*, and *Syzygium aromaticum* were extracted via steam distillation. Their antifungal activity against *C. albicans* and azole-resistant *C. parapsilosis* ATCC 22019 was assessed through broth microdilution, using concentrations ranging from 0.5 to 0.0625 mg/ml. Optical density was measured every 12 hours over a 36-hour period to determine fungal growth. Clove oil significantly inhibited the growth of *C. albicans* at 0.5 mg/ml, but had no effect on *C. parapsilosis*. Lavender exhibited greater inhibition at lower concentrations (0.0625 mg/ml) in *C. albicans*. Lemongrass similarly inhibited *C. albicans* across all concentrations and had a transient effect on *C. parapsilosis*. Eucalyptus only showed considerable inhibitory effect on *C. albicans* at high concentrations. The essential oils demonstrated variable antifungal activity, showing promise against *C. albicans* but less effectiveness against the resistant strain of *C. parapsilosis*. Clove and lemongrass emerge as potential candidates, but further research is required to investigate the susceptibility of different *Candida* species and develop strategies to counteract fungal resistance.

Keywords: Essential oils, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, resistance, Eucalyptus, Lavender, Clove, Lemongrass, biofilm, antifungal activity

1. Introducción

Las enfermedades nosocomiales, también conocidas como infecciones asociadas a la atención médica (HAI por sus siglas en inglés), son infecciones que se adquieren en entornos de atención médica, como hospitales, centros de atención a largo y corto plazo, laboratorios y entornos ambulatorios. Estas infecciones pueden ocurrir mientras el paciente está recibiendo atención médica o incluso después de haber sido dado de alta (Sikora & Zahra, 2023). Son causadas por una variedad de microorganismos, incluyendo hongos, bacterias, virus y parásitos. La transmisión puede ocurrir a través del contacto directo e indirecto entre pacientes, trabajadores de la salud, visitantes y objetos contaminados, así como mediante el uso de dispositivos médicos y fuentes ambientales. Es crucial tomar medidas preventivas para reducir la incidencia de estas infecciones y garantizar la seguridad de los pacientes (Santajit & Indrawattana, 2016).

El 80% de las infecciones nosocomiales se concentran en cuatro tipos principales: infecciones del tracto urinario, que se asocian principalmente al uso de catéteres; neumonía, que está asociada al uso de ventiladores mecánicos; infecciones quirúrgicas, que están asociadas al lugar donde se realizan cirugías; y sepsis, que se relaciona con infecciones del torrente sanguíneo. Es importante que los profesionales de la salud y los pacientes tomen medidas preventivas para reducir el riesgo de estas infecciones y garantizar la seguridad en los entornos de atención médica (Monegro et al., 2023).

Además de las infecciones nosocomiales comunes, como las asociadas a dispositivos médicos como catéteres o ventiladores mecánicos, existen otros tipos de infecciones asociadas a la atención médica (HAI) que pueden afectar diferentes partes del cuerpo. Estas incluyen infecciones gastrointestinales, neumonía no relacionada con el uso de ventiladores mecánicos y afectaciones en órganos como el sistema respiratorio, los ojos, la nariz, la boca, los oídos, la piel, los tejidos blandos, el sistema cardiovascular, el sistema nervioso, los huesos y articulaciones, así como los órganos reproductores (Sikora & Zahra, 2023).

A nivel mundial, el número real de personas afectadas por las infecciones asociadas a la atención médica (HAIs) aún no se conoce completamente. Sin embargo, se han llevado a cabo estudios epidemiológicos en Europa y Estados Unidos. En Estados Unidos, se ha observado una prevalencia del 3.2% de HAIs, lo que afecta aproximadamente a 687,200 personas según un estudio realizado en 2015 (Magill et al., 2018). En Ecuador, se ha implementado un subsistema de vigilancia epidemiológica que recopila datos a nivel nacional de varios hospitales en diferentes provincias. Los datos recopilados entre 2017 y 2018 muestran que en el campo de la obstetricia la incidencia asociada a HAIs fue baja, aproximadamente un 0.30. En cuanto a los cuidados intensivos y cuidados intermedios neonatales, las infecciones asociadas al torrente sanguíneo tuvieron una mayor densidad de incidencia con un valor de 5.73, seguidas por la neumonía asociada a ventiladores mecánicos con un valor de 4.00. Finalmente, en el grupo de cuidados intensivos de adultos y pediátricos, la neumonía asociada a ventiladores mecánicos presentó la mayor incidencia con un valor de 8.50 (Subsistema de Vigilancia Epidemiológica Para las Infecciones Asociadas a la Atención en Salud, s.f.).

Candida es una levadura unicelular que normalmente habita la mucosa oral, digestiva y urogenital, pero se convierte en un patógeno oportunista en personas inmunodeficientes o con alteraciones en su microflora debido a factores externos como el uso de antibióticos (Spampinato & Leonardi, 2013). En entornos hospitalarios, *Candida* puede causar infecciones por sobrecrecimiento, conocidas como candidiasis, principalmente por *Candida albicans* (Schuster & Fisher, 2023). Estas infecciones pueden afectar la boca (aftas), la vagina, la piel, las uñas (onicomicosis) y el torrente sanguíneo en casos más graves (Czechowicz et al., 2022). *Candida* tiene la capacidad de adherirse a células superficiales y penetrar los tejidos, así como de producir enzimas que degradan las proteínas, los lípidos, los carbohidratos y las células del huésped; además, genera toxinas que pueden provocar inflamación crónica y forma biopelículas (Talapko et al., 2021). Este hongo es el principal causante de infecciones nosocomiales fúngicas y su estudio es crucial para reducir su prevalencia.

Las infecciones invasivas por *Candida* (ICI) son un problema de salud pública a nivel mundial, con una incidencia de 3,22 por cada 100,000 habitantes en la última década (Oliva et al., 2023). En los ambientes hospitalarios, *Candida* es responsable del 80% de las infecciones fúngicas en pacientes inmunocomprometidos. La incidencia de ICI en las unidades de cuidados intensivos (UCI) es de 10 por cada 100,000 habitantes, con una mortalidad del 49% que se incrementa al 98% en casos de shock séptico (Thomas-Rüddel et al., 2022). En Ecuador, el sistema sanitario carece de registros completos de vigilancia para *Candida*. Sin embargo, un estudio realizado en el Hospital Gineco Obstétrico Isidro Ayora en Quito reveló que, de 201 mujeres embarazadas con una edad promedio de 26 años, el 23.9% presentaba candidiasis vaginal. De estos casos, la especie *C. albicans* fue la más prevalente (Betancourt & Carrera, 2012).

Los antifúngicos son la principal herramienta para tratar la candidiasis. Los medicamentos más comunes son los azoles, equinocandinas, polienos y análogos de nucleósidos (Spampinato & Leonardi, 2013). Sin embargo, el uso

excesivo de estos medicamentos ha llevado a que la *Candida* desarrolle resistencia a ellos, especialmente en pacientes inmunocomprometidos (Shivaswamy & Sumana, 2020). La resistencia surge por mecanismos como la alteración de la diana del fármaco, debida a cambios en la estructura de 14 α -desmetilasa, encargada de la síntesis del ergosterol; modificación del fármaco, que es degradado por enzimas producidas por el hongo; eflujo del fármaco, mediante el cual el antifúngico es expelido por bombas de transporte que disminuyen su concentración intracelular; y la adaptación al estrés, por la cual se activan vías de señalización, como la vía HOG (High osmolarity glycerol), que regulan la respuesta a estrés osmótico (Kanafani & Perfect, 2008). Por esta razón, se investigan otras opciones terapéuticas, como el empleo de plantas medicinales y sus compuestos bioactivos, para disminuir la dependencia de los antifúngicos en el manejo de las infecciones.

La Organización mundial de la salud define como medicina tradicional y natural al uso de plantas medicinales como tratamiento alternativo para diversas enfermedades (Francisco et al., 2013). A lo largo de la historia, las civilizaciones antiguas han utilizado partes esenciales de ciertas plantas para tratar enfermedades y mejorar la salud. Estas plantas no solo se utilizan como tratamiento, sino también como medida preventiva (Yuan et al., 2016). Para ser considerada medicinal, una planta debe contener principios activos con propiedades farmacológicas comprobadas. Los extractos de plantas medicinales, especialmente los aceites esenciales, pueden tener efectos bacteriostáticos o bactericidas sobre diferentes microorganismos (Schmeda-Hirschmann & Yesilada, 2005).

Los aceites esenciales (AE), también conocidos como aceites volátiles, son sustancias extraídas de plantas aromáticas que poseen propiedades volátiles. Estas sustancias son responsables de brindar el aroma característico a las flores, atrayendo así a los polinizadores (López Luegon, 2004). Actualmente, el término "aceites esenciales" se utiliza para referirse a sustancias obtenidas mediante presión del pericarpio o arrastre con vapor. Por lo general, se encuentran en la superficie de la planta y pueden estar asociados con otras sustancias como resinas o gomas. Además de su función en la atracción de polinizadores, los aceites esenciales también desempeñan un papel importante en la protección contra insectos y herbívoros, así como en la protección contra el estrés hídrico (M. Sharma et al., 2022). Presentan características como ser insolubles en agua, pero solubles en disolventes orgánicos y alcoholes. A temperatura ambiente, son incoloros, aunque con el tiempo pueden adquirir un tono amarillento debido a la oxidación. La mayoría de los aceites esenciales son menos densos que el agua y tienen un alto índice de refracción (Dhifi et al., 2016). Su composición química incluye una mezcla variable de terpenos en la mayoría de los casos. El método más común para extraerlos es el arrastre por vapor, aunque también se pueden obtener mediante presión en frío o utilizando disolventes orgánicos. Después de la destilación, se obtiene un subproducto llamado hidrolato (López Luegon, 2004).

Los AE tienen propiedades terapéuticas debido a sus componentes, incluyendo características antimicrobianas que los hacen útiles como sustitutos o potenciadores de ciertos antibióticos (Kalemba & Kunicka, 2005). Sin embargo, el aumento en la demanda, y la creencia de que todo lo natural es inofensivo, ha llevado a un consumo indiscriminado de estas sustancias. Se recomienda aplicar una concentración máxima de un AE puro de 1% a 2% como tratamiento en salud (Tisserand & Young, 2013). Es importante tener en cuenta que pueden inducir efectos secundarios, como reacciones alérgicas, y ser venenosos si se absorben a través de la piel, se ingieren o se inhalan en dosis inadecuadas (Das et al., 2019). Además, algunos pueden interactuar con ciertas drogas y causar efectos adversos (Pfaller et al., 2004). Por lo tanto, es vital determinar los componentes de estos aceites, evaluar su efectividad y utilizarlos adecuadamente.

Las hojas de eucalipto (*Eucalyptus globulus*) han demostrado tener un efecto microbicida significativo contra ciertos microorganismos responsables de infecciones nosocomiales. Un estudio realizado por Bokaeian, et al., reveló que los AE de eucalipto tienen propiedades fungicidas, disminuyendo significativamente la concentración de *C. albicans* en homogenizados de hígado y riñón (Bokaeian et al., 2010). Por otro lado, el AE de la hierba luisa (*Cymbopogon citratus*) también conocida como hierba de limón, ha mostrado actividad antimicrobiana frente a *C. albicans*, por sus componentes como el citral o geraniol, que tienen la capacidad de dañar la membrana de las levaduras (Gao et al., 2020). Otros AE con actividad antifúngica son los de lavanda (*Lavandula angustifolia*) y clavo de olor (*Syzygium aromaticum*), relacionados con sus bioactivos como el linalol y eugenol, respectivamente (Kalemba & Kunicka, 2005). Si bien se han realizado varias investigaciones con los AE descritos en *Candida albicans*, son pocos los trabajos que se han llevado a cabo para otras especies de *Candida* que son también de la precaución hospitalaria.

La presente investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto antifúngico de los aceites esenciales de eucalipto, hierba luisa, lavanda y clavo de olor, como alternativa antifúngica natural, sobre *Candida albicans* y *Candida parapsilosis*, dos especies de *Candida* frecuentes en entornos hospitalarios. Se determinó su capacidad de inhibir el crecimiento de los hongos mediante ensayos de microdilución. De esta forma, se buscó comprender las propiedades microbicidas de estos AE, identificar las especies de *Candida* susceptibles a su acción y explorar su potencial aplicación contra otros patógenos.

2. Materiales and Métodos

2.1. Materiales

En la tabla 1 y 2 se muestran los diferentes reactivos y equipos utilizados en el experimento.

Tabla 1 Reactivos utilizados para el experimento

Reactivo	Fórmula	Marca
DMSO	C ₂ H ₆ OS	Millipore Sigma
Agua destilada	H ₂ O	
Fluconazol	C ₁₃ H ₁₂ N ₆ F ₂ O	Medigener
Solución salina		

Tabla 2 Equipos utilizados para el experimento

Equipo	Modelo	Marca
Manta calefactora	98-IB-250	Faithfull
Incubadora	PCD-C6(5)000	Peaks
Cámara de flujo laminar	RCH-1200	REBELK
Agitador	MSH420	BOECO
Autoclave	25X-1	All american
Microscopio	B-383 PLI	Optika
Lector ELISA	Mulatizan Sky	ThermoScientific
Balanza analítica	BAS31PLUS	BOECO
Refrigeradora	2015KLXB	Durex

2.1.1. Material vegetal

Para la obtención del material vegetal, se adquirió hierba luisa (*Cymbopogon citratus*), eucalipto (*Eucalyptus globulus*), lavanda (*Lavandula angustifolia*) y clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) en el mercado del sector Andalucía, ubicado al norte de Quito. Posteriormente, las hojas de hierba luisa y eucalipto fueron lavadas con agua destilada, mientras que se separaron las hojas y flores de lavanda y clavo de olor. El material vegetal fue secado a temperatura ambiente (25°C) durante 96 horas y luego triturado con un molino eléctrico. Finalmente, se almacenó en frascos de vidrio herméticos, los cuales fueron refrigerados a 4°C hasta su uso en los análisis.

2.1.2. Microorganismos

Los microorganismos se obtuvieron de dos fuentes distintas: *Candida albicans* de la mucosa vaginal de una paciente del hospital General Vicente de Calderón en Quito, identificada por microscopía con el método de tubo germinal, y *Candida parapsilosis* ATCC 22019, una cepa comercial aislada de la mucosa humana. Se determinó la susceptibilidad de ambas especies al fluconazol mediante difusión por disco, *C. parapsilosis* ATCC 22019 fue la única especie resistente al antifúngico. Las cepas se conservaban congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, en crioviales, en el cepario del hospital.

2.2. Metodología

2.2.1 Obtención de aceites esenciales

El método de extracción de los AE de las plantas se basó en el principio de la destilación por arrastre de vapor, que consiste en hacer pasar vapor de agua a través del material vegetal para arrastrar consigo las moléculas volátiles de los aceites (Zaouali et al., 2010). El esquema del montaje experimental se muestra en la figura 1. Para cada destilación, se pesó una muestra de 200 g de material vegetal previamente triturado, que se colocó en una media de nailon para evitar que se dispersara en el agua. Se llenó un matraz de destilación de 1000 mL con 750 mL de agua destilada y se acopló al destilador. Se reguló la temperatura del matraz a $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se mantuvo constante durante 2 h y 30 min, de acuerdo con estudios previos de Rivas et al. (AC et al., 2012). Durante este tiempo, el vapor de agua y los aceites se condensaron en el refrigerante y se recogieron en un matraz colector. Al finalizar la destilación, se separó la fase acuosa de la fase oleosa y se midió el volumen de aceite obtenido. El AE se guardó en un frasco de vidrio oscuro y se conservó en un congelador hasta su posterior análisis (Da Porto et al., 2009).



Figura 1 se ilustra el montaje del equipo de destilación por arrastre con vapor empleado para la extracción de aceites esenciales. La totalidad de la instrumentación y materiales de laboratorio necesarios fueron suministrados gentilmente por la Universidad Internacional SEK de Ecuador.

2.2.2 Obtención de aceites esenciales

Tras la destilación, se dejó separar el destilado en sus fases acuosa y oleosa. La fase oleosa (aceite esencial) se aisló con un embudo de separación, se recolectó en un matraz previamente tarado y se secó para determinar su masa exacta. Con el dato de masa de aceite obtenido y la masa inicial de materia prima vegetal, se calculó el porcentaje de rendimiento de extracción según la Ecuación 1:

$$R = \frac{V(\text{ml})}{P(\text{g})} * 100$$

Ecuación 1 fórmula de rendimiento, donde V es el volumen expresado en mililitros y P es el peso en gramos

2.2.3 Densidad relativa

La densidad del AE obtenido se determinó empleando un picnómetro de volumen conocido (25 ± 0.05 mL), previamente secado y pesado en una balanza analítica. El picnómetro se llenó con una alícuota de AE y se volvió a pesar para determinar la masa de la muestra. Conocidos el volumen y la masa de aceite, se calculó la densidad utilizando la ecuación 2. Todas las mediciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como valor promedio \pm desviación estándar. La densidad relativa se calculó utilizando la fórmula:

$$\rho = \frac{\rho_{\text{sustancia}}}{\rho_{\text{H}_2\text{O}}}$$

Ecuación 2 fórmula de densidad relativa, siendo ρ sustancia la densidad del aceite esencial y ρ la densidad del agua

2.2.4 Cultivo microbiológico

El aislamiento y cultivo de *Candida albicans* y *Candida parapsilopsis* se realizó siguiendo la metodología descrita por Dias-Souza et al. (2017) con algunas modificaciones. Brevemente, para mantener la viabilidad de las cepas, se efectuaron resiembras semanales en placas con agar Sabouraud incubadas a 37°C durante 24-36 h. Las colonias desarrolladas presentaron las características macroscópicas distintivas del género *Candida*, incluyendo coloración blanca-cremosa, textura cremosa, elevación convexa y bordes enteros (Neppelenbroek et al., 2014). El análisis microscópico en 40X evidenció la presencia de blastoconidias de morfología ovalada. Previamente a la determinación de actividad antimicótica, los cultivos de levaduras se re-inocularon en caldo Mueller Hinton, ajustando la turbidez de la suspensión de acuerdo a la escala 0.5 de McFarland e incubando a 37°C con agitación constante 18-24 h para alcanzar la fase exponencial de crecimiento.

Tabla 3 medios de cultivo utilizados

Medio de cultivo	Composición	Microorganismo
Saboroud	1% de peptona, 4% de glucosa	<i>Candida albicans</i>
	y 1,5% de agar	<i>Candida parapsilopsis</i>
Muller Hilton	2.0 g de extracto de carne. 17.5 g de hidrolizado de caseína. 1.5 g de almidón, 4% de glucosa	

En la Tabla 3 se detallan las formulaciones de los diferentes medios de cultivo utilizados en este estudio para el aislamiento, mantenimiento y ensayos con *Candida*. El medio líquido empleado para los ensayos de actividad antimicótica consistió en caldo Sabouraud suplementado con 4% de glucosa (p/v), con el objetivo de proveer una fuente adicional de carbono y energía que promoviera el crecimiento óptimo de las levaduras durante los experimentos de exposición a los agentes antimicóticos.

2.2.5 Ensayo antimicrobiano de los aceites esenciales por micro dilución en caldo

Las levaduras se cultivaron en caldo Mueller Hinton a 37°C durante 18-24 horas, hasta obtener una concentración de aproximadamente 2×10^6 blastoconidias/ml, que se determinó por recuento directo en cámara de Neubauer. Esta concentración es la recomendada por EUCAST para ensayos antifúngicos por microdiluciones (Arendrup et al., 2012). Se prepararon soluciones de los AE a 100 mg/ml, usando la densidad relativa de cada aceite (v/v), y,

posterior, se ajustó el volumen a 1 ml con DMSO al 3% en agua destilada (p/v). A partir de estas soluciones, se hicieron diluciones seriadas 1:1 (p/v) en DMSO al 3% en agua destilada (D1 a D4), obteniendo concentraciones de 0,5 mg/ml o 0,05% (D1), 0,25 mg/ml o 0,025% (D2), 0,125 mg/ml o 0,0125% (D3) y 0,0625 mg/ml o 0,00625% (D4) de AE. Se usaron fluconazol al 4% en agua destilada y DMSO al 3% en agua destilada como controles positivo y negativo, respectivamente.

Se evaluó el efecto antimicrobiano de los AE mediante ensayos en placas de 96 pocillos, realizados por triplicado. Se usaron un control positivo y un control negativo, según se indica en la Figura 2. Se prepararon las siguientes soluciones stock: 792 μ L de caldo Müeller Hinton + blastoconidias ($\approx 2 \times 10^6$ blastoconidias/ml) y 8 μ L de AE con su dilución correspondiente, 792 μ L de caldo Müeller Hinton + blastoconidias ($\approx 2 \times 10^6$ blastoconidias/ml) y 8 μ L de fluconazol al 4% en agua destilada (control positivo), y 792 μ L de caldo Müeller Hinton + blastoconidias ($\approx 2 \times 10^6$ blastoconidias/ml) y 8 μ L de DMSO al 3% en agua destilada (control negativo). Luego, se añadieron 190 μ L de cada solución stock a cada pocillo.

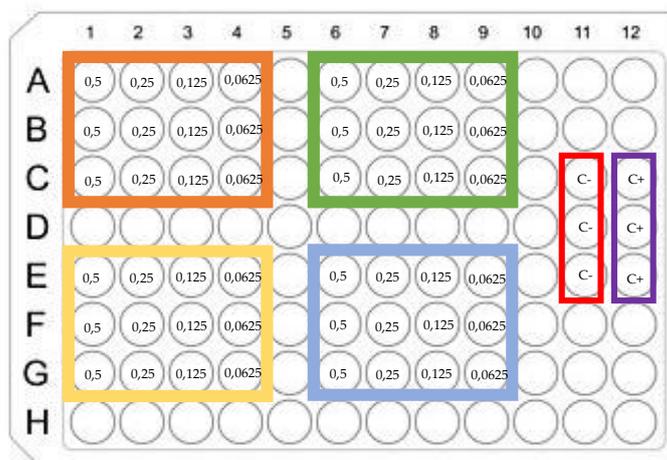


Figura 2 muestra la distribución de los diferentes aceites esenciales y controles en la placa de 96 pocillos, de acuerdo al siguiente código de colores: naranja para el aceite de hierba luisa (*Cymbopogon citratus*); verde para el aceite de eucalipto (*Eucalyptus globulus*); amarillo para el aceite de lavanda (*Lavandula angustifolia*); y celeste para el aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*). El control negativo se identificó con el color rojo y el control positivo con el color morado. Los valores se encuentran en las unidades de mg/ml.

2.2.6 Lecturas en espectrofotómetro

Para evaluar el efecto de los tratamientos sobre el crecimiento celular, se determinó la densidad óptica (DO600nm) de cada pocillo mediante espectrofotometría a 600 nm. Se realizó una lectura inicial (tiempo 0 h) previo a incubar la placa a 35 °C con agitación constante. Posteriormente, se efectuaron lecturas cada 12 h durante 36 h de incubación.

2.2.6 Análisis estadístico

Los datos se analizaron calculando la media y la desviación estándar para cada tratamiento. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existían diferencias significativas entre los distintos AE con respecto a cada especie de *Candida*. Posteriormente, se llevó a cabo una prueba de comparaciones múltiples de Dunnett para comparar la eficacia de los diferentes aceites contra el control. Se consideró estadísticamente significativo un valor $p < 0.05$.

3. Resultados

3.1 Porcentaje de rendimiento

El gráfico 1 muestra el porcentaje de rendimiento de AE obtenido a partir de 200 gramos de biomasa de las cuatro plantas estudiadas. El clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) presentó el mayor rendimiento con un 5,75%, seguido por el eucalipto (*Eucalyptus globulus*) con un 2,5%. Por otro lado, la hierba luisa (*Cymbopogon citratus*) y la lavanda (*Lavandula angustifolia*) obtuvieron rendimientos más bajos de 1,15% y 1% respectivamente. Estos resultados muestran una amplia variabilidad en la capacidad de producción de AE entre las especies estudiadas, siendo *S. aromaticum* la más eficiente con casi 6 veces más rendimiento que *L. angustifolia*.

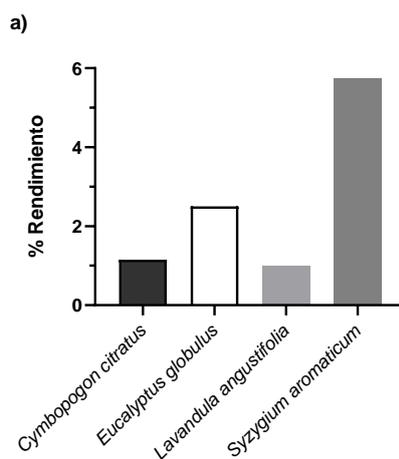


Figura 2 Se presenta un gráfico de barras comparando el porcentaje de rendimiento de aceite esencial de cuatro especies vegetales a partir de 200g de biomasa.

3.2 Densidad relativa

En la tabla 4 se muestra que el aceite con la mayor densidad relativa fue el de clavo de olor, con 1,025 g/ml. Le siguió el aceite de citronela con 0,985 g/ml. Los aceites de eucalipto y lavanda presentaron densidades más bajas de 0,897 g/ml y 0,857 g/ml, respectivamente.

Tabla 4 Densidad relativa de cada especie vegetal

Aceite esencial	Densidad (g/ml)
<i>Syzygium aromaticum</i>	1,03 ± 0,03
<i>Eucalyptus globulus</i>	0,89 ± 0,04
<i>Lavandula angustifolia</i>	0,85 ± 0,02
<i>Cymbopogon citratus</i>	0,98 ± 0,03

En la Tabla 4 se muestra los resultados de las densidades relativas medidas en miligramos por mililitro (g/ml) de cuatro aceites esenciales: clavo de olor (*Syzygium aromaticum*), eucalipto (*Eucalyptus globulus*), lavanda (*Lavandula angustifolia*) y hierba luisa (*Cymbopogon citratus*).

3.3 Efecto antimicrobiano de los aceites esenciales sobre *Candida albicans* y *Candida parapsilopsis*

3.3.1 Clavo de olor (*Syzygium aromaticum*)

El AE de clavo de olor inhibió el crecimiento de *Candida albicans* de forma concentración-dependiente (Figura 4). A una concentración de 0,5 mg/ml (0,05%), el aceite presentó el máximo efecto inhibitorio, con un 29% de reducción del crecimiento a las 12 horas. La inhibición disminuyó con el tiempo y, a las 36 horas, solo fue del 13% ($p < 0,05$). Por el contrario, el AE no tuvo un efecto significativo sobre la viabilidad de *Candida parapsilopsis* (Figura 5).

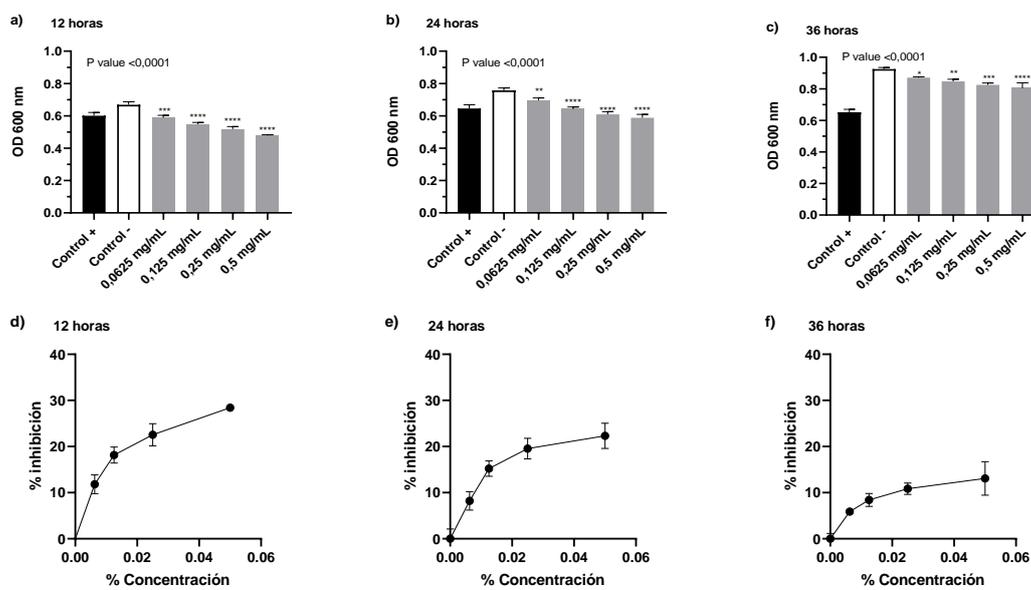


Figura 3 Absorbancias a 600nm y porcentaje de inhibición de *Candida albicans* frente al aceite esencial de clavo de olor a las 12 horas (a y d), 24 horas (b y e), y 36 horas (c y f), utilizando (* = p -value $< 0,05$; ** = p -value $< 0,01$; *** = p -value $< 0,001$; **** = p -value $< 0,0001$). Las figuras a, b y c están expresadas sus concentraciones en unidades de mg/ml (eje x) y las figuras d, e y f se encuentran expresadas en unidades de porcentaje de concentración (eje x).

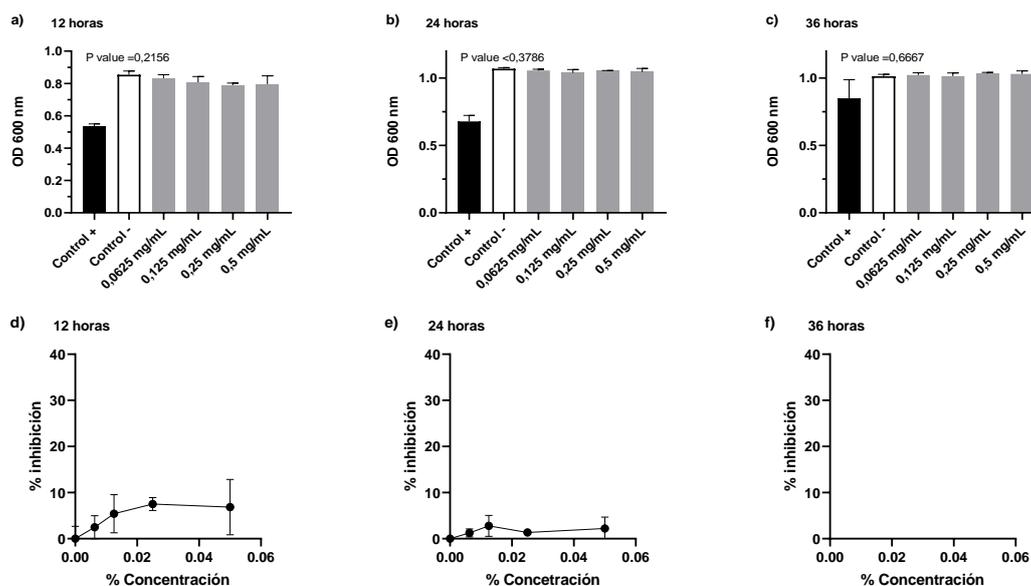


Figura 4 Absorbancias a 600nm y porcentaje de inhibición de *Candida parapsilopsis* frente al aceite esencial de clavo de olor a las 12 horas (a y d), 24 horas (b y e), y 36 horas (c y f). (* = p -value $< 0,05$; ** = p -value $< 0,01$; *** = p -value $< 0,001$; **** = p -value $< 0,0001$). Las figuras a, b y c están expresadas sus concentraciones en unidades de mg/ml (eje x) y las figuras d, e y f se encuentran expresadas en unidades de porcentaje de concentración (eje x).

3.3.2 Lavanda (*Lavandula angustifolia*)

Contrariamente a lo esperado, las diluciones más bajas, tuvieron mayor efecto antifúngico que las concentraciones altas (Figura 6). La concentración de 0,0625 mg/ml (0,00625%) alcanzó el 22% de inhibición a las 12 horas y disminuyó al 18% a las 24 y 36 horas, dejando a las concentraciones de 0,25 mg/ml (0,025%) y 0,5 mg/ml (0,05%) sin efecto significativo a las 36 horas sobre *C. albicans*. El aceite solamente tuvo efecto inhibitorio significativo sobre *C. parapsilopsis* a las 24 horas en la con una concentración de 0,25 mg/ml (0,025%) y 0,5 mg/ml (0,05%) (Figura 7).

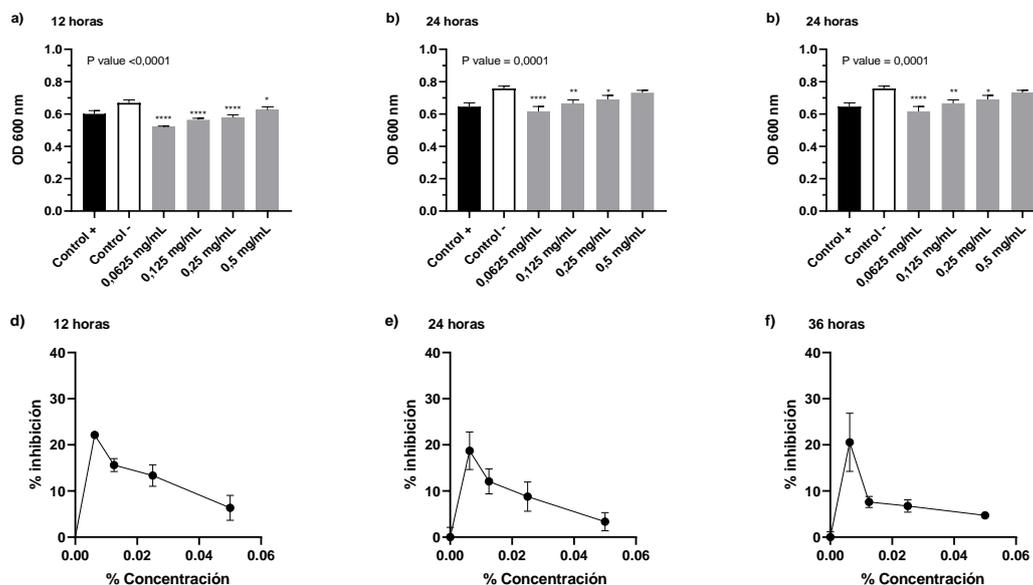


Figura 5 Absorbancias a 600nm y porcentaje de inhibición de *Candida albicans* frente al aceite esencial de lavanda a las 12 horas (a y d), 24 horas (b y e), y 36 horas (c y f). (* = p-value < 0,05; ** = p-value < 0,01; *** = p-value < 0,001; **** = p-value < 0,0001). Las figuras a, b y c están expresadas sus concentraciones en unidades de mg/ml (eje x) y las figuras d, e y f se encuentran expresadas en unidades de porcentaje de concentración (eje x).

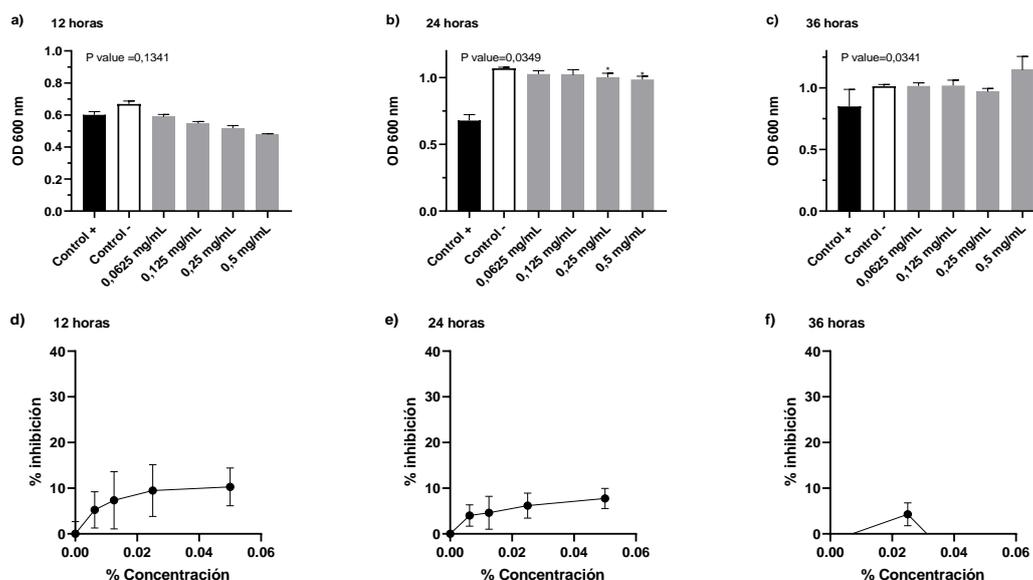


Figura 6 Absorbancias a 600nm y porcentaje de inhibición de *Candida parapsilopsis* frente al aceite esencial de lavanda a las 12 horas (a y d), 24 horas (b y e), y 36 horas (c y f). (* = p-value < 0,05; ** = p-value < 0,01; *** = p-value < 0,001; **** = p-value < 0,0001). Las figuras a, b y c están expresadas sus concentraciones en unidades de mg/ml (eje x) y las figuras d, e y f se encuentran expresadas en unidades de porcentaje de concentración (eje x).

3.3.3 Hierba Luisa (*Cymbopogon citratus*)

El AE de hierba luisa muestra una inhibición similar de *Candida albicans* a diferentes concentraciones (Figura 8). Esta inhibición se conserva a lo largo del tiempo, aunque con menor eficacia, salvo en la concentración de 0,5 mg/ml (0,05%), que mantiene su efectividad. En cambio, el aceite tiene un efecto inhibitorio transitorio sobre *C. parapsilopsis*, alcanzando un máximo de 15% a las 12 horas con la concentración de 0,5 mg/ml (0,05%), disminuye a las 24 horas y desaparece a las 36 horas (Figura 9).

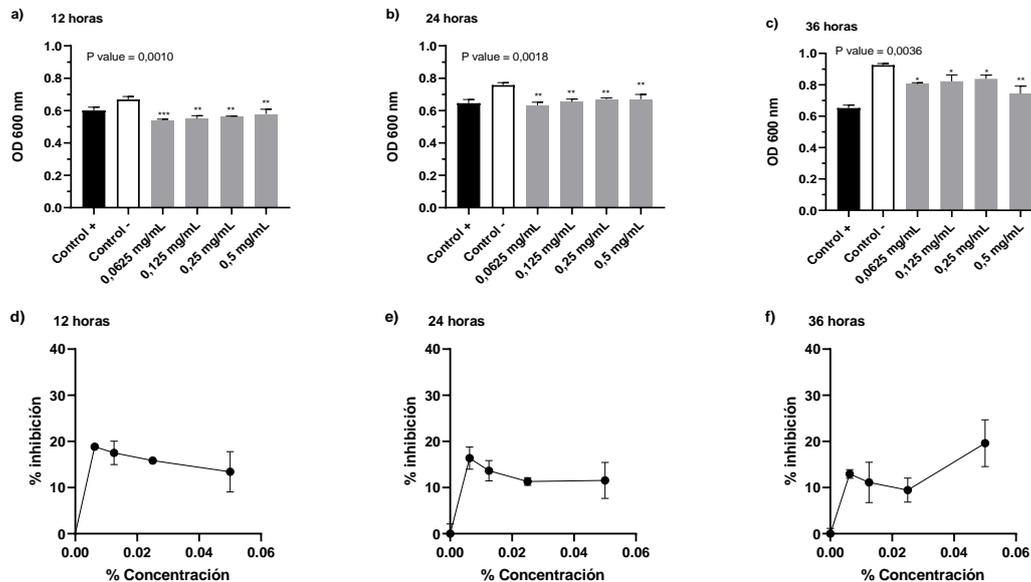


Figura 7 Absorbancias a 600nm y porcentaje de inhibición de *Candida albicans* frente al aceite esencial de hierba luisa a las 12 horas (a y d), 24 horas (b y e), y 36 horas (c y f). (* = p-value < 0,05; ** = p-value < 0,01; *** = p-value < 0,001; **** = p-value < 0,0001). Las figuras a, b y c están expresadas sus concentraciones en unidades de mg/ml (eje x) y las figuras d, e y f se encuentran expresadas en unidades de porcentaje de concentración (eje x).

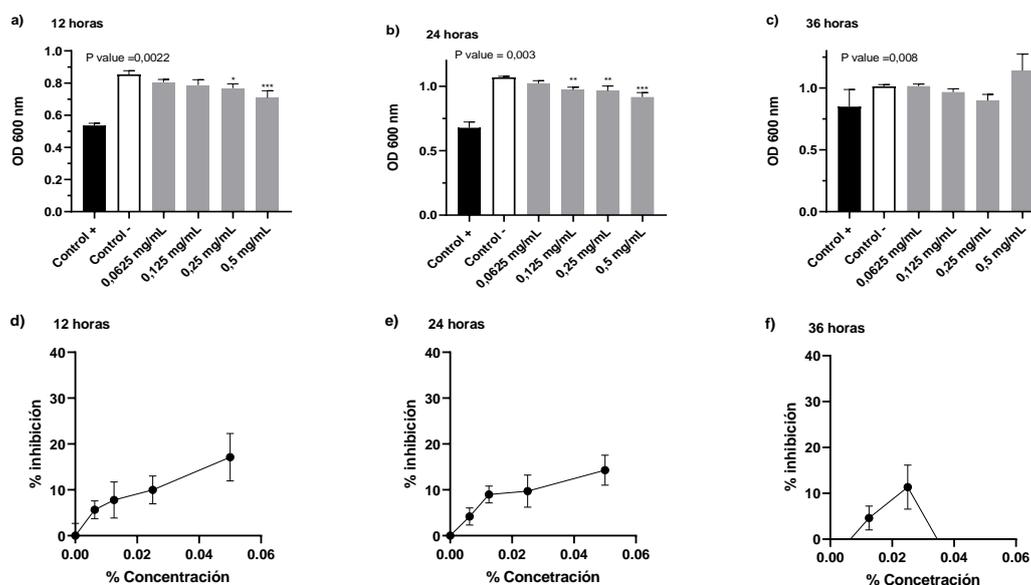


Figura 8 Absorbancias a 600nm y porcentaje de inhibición de *Candida parapsilopsis* frente al aceite esencial de hierba luisa a las 12 horas (a y d), 24 horas (b y e), y 36 horas (c y f). (* = p-value < 0,05; ** = p-value < 0,01; *** = p-value < 0,001; **** = p-value < 0,0001). Las figuras a, b y c están expresadas sus concentraciones en unidades de mg/ml (eje x) y las figuras d, e y f se encuentran expresadas en unidades de porcentaje de concentración (eje x).

3.3.4 Eucalipto (*Eucalyptus globulus*)

El aceite de Eucalipto muestra una potente actividad antimicrobiana a una concentración de 0,5%, con un 18% de inhibición, pero no tiene ningún efecto a una concentración de 0,00625% (0,0625 mg/ml), frente a *C. albicans* (Figura 10). Además, el aceite es ineficaz contra *C. parapsilopsis* (Figura 11).

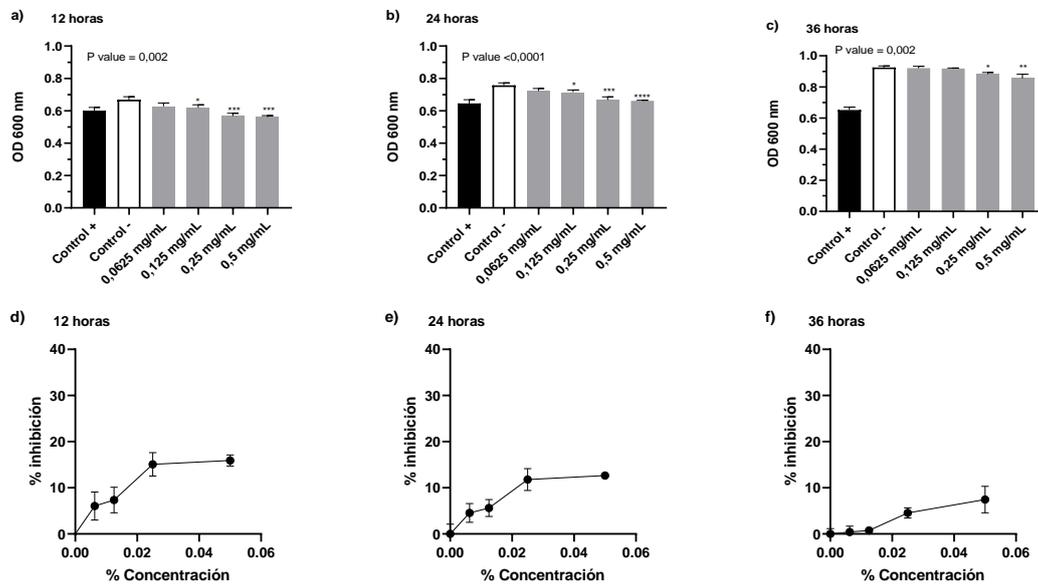


Figura 10 Absorbancias a 600nm y porcentaje de inhibición de *Candida albicans* frente al aceite esencial de hierba luisa a las 12 horas (a y d), 24 horas (b y e), y 36 horas (c y f). (* = p-value < 0,05; ** = p-value < 0,01; *** = p-value < 0,001; **** = p-value < 0,0001). Las figuras a, b y c están expresadas sus concentraciones en unidades de mg/ml (eje x) y las figuras d, e y f se encuentran expresadas en unidades de porcentaje de concentración (eje x).

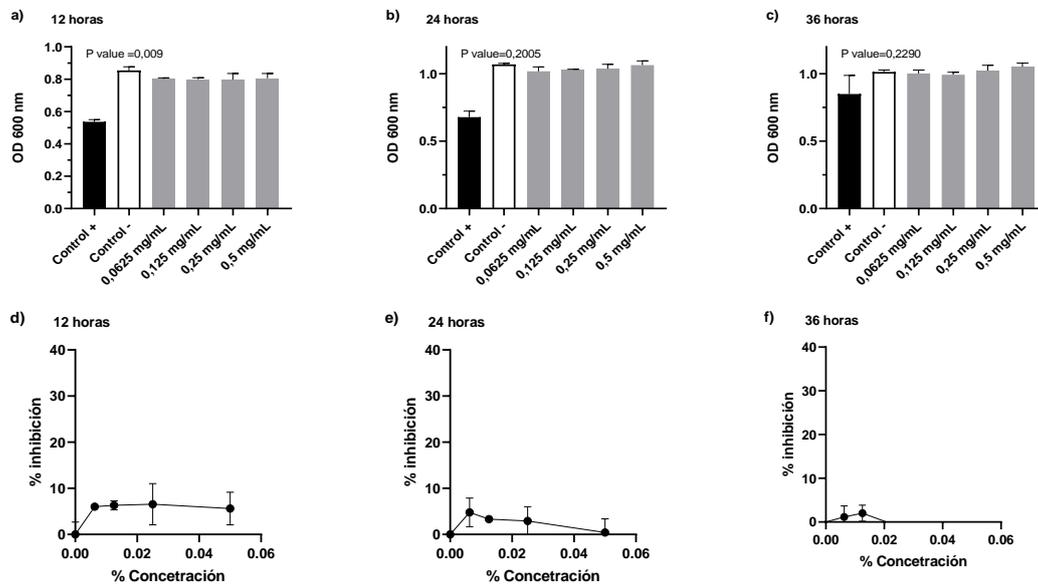


Figura 9 Absorbancias a 600nm y porcentaje de inhibición de *Candida parapsilopsis* frente al aceite esencial de eucalipto a las 12 horas (a y d), 24 horas (b y e), y 36 horas (c y f). (* = p-value < 0,05; ** = p-value < 0,01; *** = p-value < 0,001; **** = p-value < 0,0001). Las figuras a, b y c están expresadas sus concentraciones en unidades de mg/ml (eje x) y las figuras d, e y f se encuentran expresadas en unidades de porcentaje de concentración (eje x).

4. Discusión

El sistema de arrastre con vapor es un método eficiente de extracción de aceites esenciales (AE), dado que facilita el arrastre de los compuestos volátiles al permitir que las partículas de agua penetren las glándulas vegetales que los contienen. Sin embargo, este proceso también conlleva limitaciones, ya que algunos compuestos termosensibles, como los ésteres, pueden degradarse por acción del calor o sufrir hidrólisis. Además, la dilución del aceite en la fase acuosa requiere etapas posteriores de separación y purificación (Machado et al., 2022). Los rendimientos obtenidos en este estudio para las especies *Cymbopogon citratus*, *Eucalyptus globulus*, *Lavandula angustifolia* y *Syzygium aromaticum*, concuerdan con los reportados en la literatura (Guan et al., 2007; Mohamed Hanaa et al., 2012; Sartorelli et al., 2007; Zheljzkov et al., 2013). El mayor rendimiento del AE de clavo se atribuye a su elevada concentración de eugenol y a la alta densidad de glándulas secretoras que se concentran en los botones florales (Cortés-Rojas et al., 2014).

Los resultados de este estudio indican que los AE empleados tienen una actividad antifúngica contra *Candida albicans*, pero no poseen el mismo efecto frente a *Candida parapsilopsis*. Los AE de *Syzygium aromaticum*, *Eucalyptus globulus*, *Cymbopogon citratus* y *Lavandula angustifolia* han demostrado efectos antimicrobianos sobre *Candida albicans*, pero se han estudiado poco en otras especies de *Candida* de relevancia clínica. Entre estas, *Candida parapsilopsis* ha cobrado importancia en los últimos años, al ser la segunda especie más frecuente en hemocultivos y superar a *C. albicans* en muchos hospitales de Sudamérica (Medrano et al., 2006), Asia (Nakamura & Takahashi, 2006) y Europa (Pfaller et al., 2001). El AE de clavo de olor mostró un efecto inhibitorio sobre *C. parapsilopsis* ATCC 90018, una cepa comercial sensible a los antifúngicos, según el estudio de Pinto et al. (2009). Sin embargo, nuestro AE no tuvo el mismo efecto sobre *C. parapsilopsis* ATCC 22019, una especie de *Candida* resistente a los azoles, debido a una mutación en el gen ERG11 que le confiere la capacidad de sobreexpresar bombas de eflujo y eliminar el aceite más eficazmente (Bhattacharya et al., 2020; Lotfali et al., 2016; M. Sharma et al., 2022). Esta resistencia también se observó frente a los AE de lavanda y eucalipto, lo que indica que esta cepa tiene una ventaja adaptativa frente a estos tres aceites y requiere una mayor atención.

El AE de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor) presenta actividad antifúngica frente a *Candida albicans* y otros dermatofitos. Su mecanismo se basa en tres componentes: eugenol (80-90%), β -Cariofileno y acetato de eugenilo (10-40%) (Haro-González et al., 2021). El eugenol altera la membrana de *Candida*, aumenta su permeabilidad e impide la síntesis de ergosterol (Didehdar et al., 2022). El ergosterol es un esteroide presente en la membrana celular de *Candida*, desempeñando un papel crucial en otorgar fluidez y mantener la integridad de la misma (Sanglard et al., 2003). El β -Cariofileno inhibe la enzima que convierte lanosterol en ergosterol (Eleodoro et al., 2016). El acetato de eugenilo bloquea los receptores del *quórum sensing*, que regulan los *biofilms* (Musthafa et al., 2016). Nuestro estudio presentó un efecto antimicótico comparable al de Pinto et al., donde su AE de clavo de olor inhibió significativamente el crecimiento de *C. albicans* a concentraciones de 0,0064% a 0,125% (2009). Sin embargo, otros estudios han reportado que la concentración mínima eficaz es de 1 mg/ml (0,1% de AE) disuelto en DMSO, lo que sugiere la necesidad de realizar más diluciones para obtener datos más precisos (Hekmatpanah et al., 2022). Además, la eficacia inhibitoria del clavo de olor fue disminuyendo con periodos de incubación más largos. Jácome evaluó el efecto del AE de clavo de olor sobre *Candida albicans* mediante ensayos en disco con diferentes concentraciones. Midió los halos de inhibición a las 48, 72 y 96 horas y observó que disminuían con el tiempo. Atribuyó este fenómeno a la fotosensibilidad del aceite (2019). El eugenol es un fenol con un doble enlace entre el anillo bencénico y el hidroxilo (A. Sharma et al., 2022). La luz, sobre todo la ultravioleta, puede romper este doble enlace y generar radicales libres. Estos radicales reaccionan con el oxígeno y forman peróxidos, que son inestables y oxidantes. Los peróxidos causan más degradación del eugenol, rompiendo el anillo bencénico y formando aldehídos, cetonas, ácidos y otros subproductos con menor o nula actividad antimicrobiana (Timar & Beldean, 2022).

Además de los mecanismos de resistencia descritos en la introducción, *C. albicans* puede contrarrestar el efecto fungicida formando *biofilms* en respuesta al estrés. El *biofilm* es una estructura tridimensional compuesta por exopolisacáridos, proteínas, lípidos y otros componentes, que facilita la adhesión de *Candida* a las superficies y la protege de los fármacos y del sistema inmune (Del Pozo & Cantón, 2016). En nuestros estudios detectamos una masa sólida en el fondo de cada pocillo de la placa de 96, lo que evidencia la existencia de *biofilms* (esto ocurrió en cada uno de los tratamientos de los diferentes aceites). La densidad óptica de los pocillos se incrementó con el tiempo, lo que indica que el AE de clavo de olor estimuló el crecimiento de los *biofilms*. Estos resultados concuerdan con los de Khan & Ahmad (2012), quien demostró que el AE de *Syzygium aromaticum* inhibe el *biofilm* de *C. albicans* en un 43% a una concentración de 0,5 mg/ml, mientras que a concentraciones inferiores la formación de biopelículas aumenta hasta un 73%. En nuestro caso, la mayor inhibición se observó también a 0,5 mg/ml, pero fue inferior a la reportada por Khan, que puede estar influenciada por la calidad y pureza del aceite extraído.

El AE de *Lavandula angustifolia* se compone principalmente de dos compuestos bioactivos con actividad fungicida: el linalol (20%-45%) y el acetato de linalilo (25%-60%) (Mijatovic et al., 2022). El linalol es un alcohol

terpénico que puede unirse al sitio activo de la ATP sintasa, bloqueando su actividad e inhibiendo la producción de ATP (Medeiros et al., 2022). El acetato de linalilo es un éster que también tiene la capacidad de modificar la membrana de los hongos (Blaskó et al., 2017). Estudios similares a los nuestros utilizaron el AE de lavanda frente a *C. albicans* y encontraron que el aceite tenía una actividad antifúngica a una concentración de 0,09% a 2% (D'Auria et al., 2005). Sin embargo, la concentración de los compuestos bioactivos puede tener un efecto antifúngico inverso al esperado. En la presente investigación, encontramos que, a mayor concentración del AE menor efecto inhibitorio posee. Estos resultados de asemejan al estudio de Behmanesh et al., (2015), quienes encontraron que, el AE de lavanda a una concentración de menor dilución 1:80, disuelto en DMSO, era eficaz para inhibir el crecimiento de *C. albicans*, pero a concentraciones mayores el efecto disminuía. En las pruebas que realizamos, diluciones menores a 0,05% tuvieron un efecto inhibitorio mayor. La causa de este efecto no está clara, pero podría deberse a la permeabilidad del AE. Los compuestos bioactivos de la lavanda alteran la membrana de *C. albicans* a bajas concentraciones, pero a altas concentraciones saturan el sitio de acción y provocan estrés en la levadura, lo que puede desencadenar en la activación de genes de resistencia frente antifúngicos (Yang et al., 2020). De manera similar a nuestro trabajo, un estudio previo encontró que el AE de lavanda, $\approx 0,0014\%$ (v/v 16 μ L/ml), inhibió la viabilidad del *biofilm* de *Candida albicans* en un 60%, pero no lo eliminó totalmente, y a medida que aumentaba el tiempo, la actividad del AE fue disminuyendo (Alves-Silva et al., 2023).

Entre los compuestos del AE de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) que tienen actividad antifúngica frente a *C. albicans* se encuentran el citral y el citronelol (Shah et al., 2011). La intercalación de ambos bioactivos en la membrana celular provoca una alteración de la permeabilidad, lo que facilita la salida de iones y otras sustancias vitales para *Candida albicans* (Almeida et al., 2013). De manera similar a nuestro estudio, un trabajo previo demostró que el AE de hierba luisa disuelto en DMSO tenía un efecto fungicida de casi un 100% de eficacia frente a *C. albicans* a una concentración de 0,00275% a 0,02% (Paiva et al., 2022). En nuestro caso, la mínima dilución fue de 0,00625%, pero se pudo observar que el efecto fue similar en todas las concentraciones utilizadas (Figura 6). Por otro lado, el AE de hierba luisa mostró un efecto antimicótico sobre *C. parapsilopsis* ATCC 22019 durante las primeras 24 horas, pero este se perdió a las 36 horas. Esto sugiere que la cepa podría resistir el aceite de hierba luisa bajo condiciones no favorables, activando genes de respuesta al estrés (FKS, CDR, MDR, ERG11) y formando *biofilms* (Costa-de-oliveira & Rodrigues, 2020; Pristov & Ghannoum, 2019). Se ha demostrado que el AE esencial de hierba luisa puede inhibir el crecimiento de biopelículas a una concentración de 0,3125% (Gao et al., 2020). En nuestro estudio, pudimos observar que el AE a una concentración menor (0,05%), redujo el crecimiento de *biofilms* a lo largo del tiempo, alcanzando una densidad óptica máxima de 0,8 nm a las 36 horas. Este efecto no se presentó en los demás AE. Un estudio reveló que se necesitan concentraciones de 0,125% para inhibir *biofilms* de *S. aureus* susceptibles a metilicina (Adukwu et al., 2012). Suponiendo que las concentraciones del citral en el aceite son similares a los nuestros, se necesitó 0,05% del AE para disminuir el *biofilm* de *C. albicans*, pero no con la misma eficacia. Por consiguiente, se sugiere que para inhibir de manera más efectiva el crecimiento de levaduras, sería prudente emplear concentraciones más elevadas del AE.

El AE de *Eucalyptus globulus* exhibió un efecto inhibitorio sobre *C. albicans* que se intensificó con el incremento de las concentraciones, pero que se atenuó notablemente con el transcurso del tiempo, llegando a anularse en las concentraciones más bajas. Estos resultados son consistentes con los obtenidos por Boukhatem et al., (2020), quienes emplearon el método de difusión en disco con concentraciones de 0,071%, 0,142% y 0,212% de AE de eucalipto, y no hallaron ningún efecto antifúngico frente a *C. albicans*. Esto podría indicar que el AE de eucalipto no tiene una actividad antimicrobiana relevante a bajas concentraciones. Por el contrario, Bokaeian et al., (2010) demostraron que suministrando 0,25% de AE disuelto en agua, el efecto inhibitorio sobre *C. albicans* en ratones era positivo, lo que sugiere que se requieren concentraciones más altas de AE para obtener una acción antifúngica eficiente. Un aspecto relevante es que la actividad antifúngica del aceite varía según la especie de Eucalipto de la que se extrae. Se ha demostrado que el AE de *Eucalyptus globulus* tiene un efecto con el 2 mg/ml a 8mg/ml de concentración sobre *C. albicans* y *C. parapsilopsis* ATCC 22019, mientras que *Eucalyptus citriodora* con 0,25 mg/ml de concentración presenta un efecto antimicótico más potente (Priscila Barbosa, 2018). El efecto antimicrobiano está asociado a los bioactivos eucaliptol (1,8-cineol) y alfa-terpineol (Rahimi-Nasrabadi et al., 2012). El eucaliptol es un componente lipofílico que puede alterar la permeabilidad de la membrana celular de *Candida*, al insertarse en las bicapas lipídicas y generar especies reactivas de oxígeno (ROS) que inducen un estrés oxidativo (Martínez-Pabón & Ortega-Cuadros, 2020). El alfa-terpineol también tiene un efecto dañino sobre la membrana celular de *Candida*, pero con mayor potencia, ya que puede inhibir las proteínas de eflujo que confieren resistencia a los antifúngicos (Heloísa de Souza Borges et al., 2021). La composición de los AE varía según la especie de Eucalipto de la que se extraen. El AE de *E. citriodora* contiene más alfa-terpineol que el *E. globulus*, y esta característica posiblemente lo hace un mejor antimicótico (Elangovan & Mudgil, 2023; Tolba et al., 2015). Para identificar los bioactivos con actividad antimicótica presentes en el aceite esencial extraído, nuestro estudio requiere evaluar sus componentes mediante cromatografía líquida o de gases acoplada a espectrometría de masas.

5. Conclusiones

El sistema de arrastre con vapor se ha confirmado como un método eficiente para la extracción de AE, permitiendo la obtención de compuestos volátiles de especies como *Cymbopogon citratus*, *Eucalyptus globulus*, *Lavandula angustifolia* y *Syzygium aromaticum* con mínima pérdida de integridad. Aunque el proceso puede inducir la degradación de componentes termosensibles, los resultados son coherentes con estudios previos y resaltan la importancia de analizar la composición química del aceite mediante técnicas cromatográficas avanzadas para garantizar la precisión del análisis.

Este estudio también destaca la variabilidad en la actividad antifúngica de los AE, con una eficacia destacada contra *Candida albicans* y una efectividad más limitada contra *Candida parapsilopsis*. Estos resultados enfatizan la urgencia de investigar más a fondo la susceptibilidad de las distintas especies de *Candida* a los AE, considerando la creciente prevalencia de *C. parapsilopsis* en infecciones clínicas globales.

En particular, el AE de clavo de olor emerge como un agente antifúngico prometedor, interrumpiendo la membrana celular de *Candida* e inhibiendo la síntesis de ergosterol, esencial para la integridad celular del hongo. No obstante, en cepas de *Candida* resistentes a los azoles presenta retos notables, subrayando la necesidad de desarrollar estrategias innovadoras para contrarrestar la resistencia fúngica. El aceite de Hierba luisa se presenta como un candidato potencial para la terapia antifúngica, siendo el único aceite con efecto significativo sobre *C. parapsilopsis* en este estudio.

Agradecimientos: Mi más profundo agradecimiento a la Divinidad por darme la oportunidad de vivir y formarme en una institución tan prestigiosa como la UISEK. Extiendo mi gratitud a mis padres y hermanos, cuyo apoyo incondicional ha sido mi pilar. Un especial reconocimiento al Doctor Lino Arisqueta, cuya orientación y contribuciones han sido fundamentales para el éxito de mi proyecto. Finalmente, expreso mi sincero agradecimiento a la ingeniera Stefanie Espín, cuya asistencia fue invaluable para aclarar mis dudas y brindarme apoyo constante a lo largo de mi maestría.

Conflictos de Interés: No existió ningún conflicto de interés.

Referencias citadas

- AC, R. da S., PM, L., MM, B. de A., DC, C., CS, A., & DS, A. (2012). Biological activities of α -pinene and β -pinene enantiomers. *Molecules* (Basel, Switzerland), 17(6), 6290–6304. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES17066305>
- Adukwu, E. C., Allen, S. C. H., & Phillips, C. A. (2012). The anti-biofilm activity of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) essential oils against five strains of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology*, 113(5), 1217–1227. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2672.2012.05418.X>
- Alejandra Jácome Andrade, M., & Alejandra Jácome Andrade, M. C. (2019). Efecto antifúngico del aceite esencial del clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) sobre cepas de *Cándida albicans*.
- Almeida, R. B. A., Akisue, G., Cardoso, L. M. L., Junqueira, J. C., & Jorge, A. O. C. (2013). Antimicrobial activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. on *Staphylococcus* spp., *Streptococcus mutans* and *Candida* spp. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 15(4), 474–482. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722013000400002>
- Alves-Silva, J., Zuzarte, M., Cavaleiro, C., & Salgueiro, L. (2023). Antibiofilm Effect of *Lavandula multifida* Essential Oil: A New Approach for Chronic Infections. *Pharmaceutics*, 15(8). <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS15082142/S1>
- Arendrup, M. C., Cuenca-Estrella, M., Lass-Flörl, C., Hope, W., Arendrup, M. C., Hope, W. W., Flörl, C., Cuenca-Estrella, M., Arikan, S., Barchiesi, F., Bille, J., Chryssanthou, E., Groll, A., Gaustad, P., Järv, H., Klimko, N., Lortholary, O., Matos, T., Moore, C., ... Verweij, P. (2012). EUCAST technical note on the EUCAST definitive document EDef 7.2: method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts EDef 7.2 (EUCAST-AFST)*. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(7), E246–E247. <https://doi.org/10.1111/J.1469-0691.2012.03880.X>
- Behmanesh, F., Pasha, H., Sefidgar, A. A., Taghizadeh, M., Moghadamnia, A. A., Rad, H. A., & Shirkhani, L. (2015). Antifungal Effect of Lavender Essential Oil (*Lavandula angustifolia*) and Clotrimazole on *Candida albicans*: An In Vitro Study. *Scientifica*, 2015, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2015/261397>
- Blaskó, Á., Gazdag, Z., Gróf, P., Máté, G., Sárosi, S., Krisch, J., Vágvölgyi, C., Makszin, L., & Pesti, M. (2017). Effects of clary sage oil and its main components, linalool and linalyl acetate, on the plasma membrane of *Candida albicans*: an in vivo EPR study. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*, 22(2), 175–187. <https://doi.org/10.1007/S10495-016-1321-7>
- Bokaeian, M., Nakhaee, A., Moodi, B., & Khazaei, H. A. (2010). *Eucalyptus globulus* (*Eucalyptus*) Treatment of Candidiasis in Normal and Diabetic Rats. *Iranian Biomedical Journal*, 14(3), 121. <https://pmc/articles/PMC3904063/>
- Boukhatem, M. N., Boumaiza, A., Nada, H. G., Rajabi, M., & Mousa, S. A. (2020). *Eucalyptus globulus* essential oil as a natural food preservative: Antioxidant, antibacterial and antifungal properties in vitro and in a real food matrix (orangina fruit juice). *Applied Sciences* (Switzerland), 10(16), 1–17. <https://doi.org/10.3390/app10165581>
- Cortés-Rojas, D. F., de Souza, C. R. F., & Oliveira, W. P. (2014). Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(2), 90. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(14\)60215-X](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(14)60215-X)

- Costa-de-oliveira, S., & Rodrigues, A. G. (2020). *Candida albicans* Antifungal Resistance and Tolerance in Bloodstream Infections: The Triad Yeast-Host-Antifungal. *Microorganisms*, 8(2). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8020154>
- Czechowicz, P., Nowicka, J., & Gościński, G. (2022). Virulence Factors of *Candida* spp. and Host Immune Response Important in the Pathogenesis of Vulvovaginal Candidiasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(11). <https://doi.org/10.3390/IJMS23115895>
- D'Auria, F. D., Tecca, M., Strippoli, V., Salvatore, G., Battinelli, L., & Mazzanti, G. (2005). Antifungal activity of *Lavandula angustifolia* essential oil against *Candida albicans* yeast and mycelial form. *Medical Mycology*, 43(5), 391–396. <https://doi.org/10.1080/13693780400004810>
- Da Porto, C., Decorti, D., & Kikić, I. (2009). Flavour compounds of *Lavandula angustifolia* L. to use in food manufacturing: Comparison of three different extraction methods. *Food Chemistry*, 112(4), 1072–1078. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2008.07.015>
- Das, S., Horváth, B., Šafranko, S., Jokić, S., Széchenyi, A., & Koszegi, T. (2019). Antimicrobial Activity of Chamomile Essential Oil: Effect of Different Formulations. *Molecules*, 24(23). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24234321>
- Del Pozo, J. L., & Cantón, E. (2016). Candidiasis asociada a biopelículas. *Revista Iberoamericana de Micología*, 33(3), 176–183. <https://doi.org/10.1016/J.RIAM.2015.06.004>
- Dhifi, W., Bellili, S., Jazi, S., Bahloul, N., & Mnif, W. (2016). Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. *Medicines*, 3(4), 25. <https://doi.org/10.3390/MEDICINES3040025>
- Dias-Souza, M. V., dos Santos, R. M., de Siqueira, E. P., & Ferreira-Marçal, P. H. (2017). Antibiofilm activity of cashew juice pulp against *Staphylococcus aureus*, high performance liquid chromatography/diode array detection and gas chromatography-mass spectrometry analyses, and interference on antimicrobial drugs. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25(3), 589–596. <https://doi.org/10.1016/J.JFDA.2016.07.009>
- Elangovan, S., & Mudgil, P. (2023). Antibacterial Properties of *Eucalyptus globulus* Essential Oil against MRSA: A Systematic Review. *Antibiotics*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS12030474>
- Francisco, C., Ochoa, R., Luis, C., Silva, C., Patricia, M., & Galbán, A. (2013). La Medicina Natural y Tradicional y la Medicina Convencional no responden a paradigmas en pugna. *Revista Cubana de Salud Pública*, 39(3), 571–587. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-34662013000300012&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Gao, S., Liu, G., Li, J., Chen, J., Li, L., Li, Z., Zhang, X., Zhang, S., Thorne, R. F., & Zhang, S. (2020). Antimicrobial Activity of Lemongrass Essential Oil (*Cymbopogon flexuosus*) and Its Active Component Citral Against Dual-Species Biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Candida* Species. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 603858. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2020.603858>
- Guan, W., Li, S., Yan, R., Tang, S., & Quan, C. (2007). Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. *Food Chemistry*, 101(4), 1558–1564. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2006.04.009>
- Hekmatpanah, A., Sharifzadeh, A., Shokri, H., Abbaszadeh, S., & Nikaein, D. (2022). Efficacy of *Syzygium aromaticum* essential oil on the growth and enzymatic activity of pathogenic *Candida albicans* strains. *Current Medical Mycology*, 8(1), 12–19. <https://doi.org/10.18502/CMM.8.1.9209>
- Heloísa de Souza Borges, M., Cezar Rodrigues, N., Cristina Muniz Brito, A., Morais Bezerra, I., de Fátima Dantas de Almeida, L., Citar, C., Souza Borges, de M., Rodrigues, C. N., Brito, M. A., Bezerra, M. I., & de Almeida Cinamaldeído, D. L. (2021). Cinamaldeído y terpineol como inhibidores de biopelículas de *Candida albicans* y *Enterococcus faecalis*. *Rev Cubana Estomatol*, 58(2), 3026. <https://revestomatologia.sld.cu/index.php/est/article/view/3026/1904>
- Kalemba, D., & Kunicka, A. (2005). Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10(10), 813–829. <https://doi.org/10.2174/0929867033457719>
- Kanafani, Z. A., & Perfect, J. R. (2008). Resistance to Antifungal Agents: Mechanisms and Clinical Impact. • ANTIMICROBIAL RESISTANCE *Clinical Infectious Diseases*, 46, 120–128. <https://doi.org/10.1086/524071>
- Khan, M. S. A., & Ahmad, I. (2012). Biofilm inhibition by *Cymbopogon citratus* and *Syzygium aromaticum* essential oils in the strains of *Candida albicans*. *Journal of Ethnopharmacology*, 140(2), 416–423. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.01.045>
- López Luegon, M. T. (2004). Los aceites esenciales. *Offarm*, 23(7), 88–91. <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-los-aceites-esenciales-13064296>
- Machado, C. A. ; Oliveira, F. O. ; De Andrade, M. A. ; Hodel, K. V. S. ; Lepikson, H. ; Machado, B. A. S., Machado, C. A., Oliveira Oliveira, F., Antônio De Andrade, M., Valéria, K., Hodel, S., Lepikson, H., Aparecida, B., & Machado, S. (2022). Steam Distillation for Essential Oil Extraction: An Evaluation of Technological Advances Based on an Analysis of Patent Documents. *Sustainability* 2022, Vol. 14, Page 7119, 14(12), 7119. <https://doi.org/10.3390/SU14127119>
- Magill, S. S., O'Leary, E., Janelle, S. J., Thompson, D. L., Dumyatı, G., Nadle, J., Wilson, L. E., Kainer, M. A., Lynfield, R., Greissman, S., Ray, S. M., Beldavs, Z., Gross, C., Bamberg, W., Sievers, M., Concannon, C., Buhr, N., Warnke, L., Maloney, M., ... Edwards, J. R. (2018). Changes in Prevalence of Health Care–Associated Infections in U.S. Hospitals. *The New England Journal of Medicine*, 379(18), 1732. <https://doi.org/10.1056/NEJM0A1801550>
- Martínez-Pabón, M. C., & Ortega-Cuadros, M. (2020). Timol, mentol y eucaliptol como agentes para el control microbiológico en cavidad bucal: una revisión exploratoria. *Revista Colombiana de Ciencias Químico - Farmacéuticas*, 49(1), 44–69. <https://doi.org/10.15446/RCCIQUIFA.V49N1.87006>

- Medeiros, C. I. S., de Sousa, M. N. A., Filho, G. G. A., Freitas, F. O. R., Uchoa, D. P. L., Nobre, M. S. C., Bezerra, A. L. D., Rolim, L. A. D. M. M., Morais, A. M. B., Nogueira, T. B. S. S., Nogueira, R. B. S. S., Filho, A. A. O., & Lima, E. O. (2022). Antifungal activity of linalool against fluconazole-resistant clinical strains of vulvovaginal *Candida albicans* and its predictive mechanism of action. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 55. <https://doi.org/10.1590/1414-431X2022E11831>
- Medrano, D. J. A., Brilhante, R. S. N., Cordeiro, R. D. A., Rocha, M. F. G., Rabenhorst, S. H. B., & Sidrim, J. J. C. (2006). Candidemia in a Brazilian hospital: the importance of *Candida parapsilosis*. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 48(1), 17–20. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652006000100004>
- Mijatovic, S., Stankovic, J. A., Calovski, I. C., Dubljanin, E., Pljevljakusic, D., Bigovic, D., & Dzamic, A. (2022). Antifungal Activity of *Lavandula angustifolia* Essential Oil against *Candida albicans*: Time-Kill Study on Pediatric Sputum Isolates. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(19). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27196300>
- Mohamed Hanaa, A. R., Sallam, Y. I., El-Leithy, A. S., & Aly, S. E. (2012). Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as affected by drying methods. *Annals of Agricultural Sciences*, 57(2), 113–116. <https://doi.org/10.1016/J.AOAS.2012.08.004>
- Monegro, A. F., Muppidi, V., & Regunath, H. (2023). Hospital-Acquired Infections. *Cambridge Handbook of Psychology, Health and Medicine, Second Edition*, 736–738. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511543579.182>
- Nakamura, T., & Takahashi, H. (2006). Epidemiological study of *Candida* infections in blood: susceptibilities of *Candida* spp. to antifungal agents, and clinical features associated with the candidemia. *Journal of Infection and Chemotherapy : Official Journal of the Japan Society of Chemotherapy*, 12(3), 132–138. <https://doi.org/10.1007/S10156-006-0438-Y>
- Neppelenbroek, K. H., Seó, R. S., Urban, V. M., Silva, S., Dovigo, L. N., Jorge, J. H., & Campanha, N. H. (2014). Identification of *Candida* species in the clinical laboratory: a review of conventional, commercial, and molecular techniques. *Oral Diseases*, 20(4), 329–344. <https://doi.org/10.1111/ODI.12123>
- Paiva, L. F. De, Teixeira-Loyola, A. B. A., Schnaider, T. B., Souza, A. C. De, Zacaroni Lima, L. M., & Dias, D. R. (2022). Association of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf with nystatin against oral cavity yeasts. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 94(1), 1–13. <https://doi.org/10.1590/0001-376520220200681>
- Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Jones, R. N., Sader, H. S., Fluit, A. C., Hollis, R. J., & Messer, S. A. (2001). International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(9), 3254–3259. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.9.3254-3259.2001>
- Pfaller, M. A., Sheehan, D. J., & Rex, J. H. (2004). Determination of Fungicidal Activities against Yeasts and Molds: Lessons Learned from Bactericidal Testing and the Need for Standardization. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(2), 268. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.2.268-280.2004>
- Pinto, E., Vale-Silva, L., Cavaleiro, C., & Salgueiro, L. (2009). Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *Journal of Medical Microbiology*, 58(11), 1454–1462. <https://doi.org/10.1099/JMM.0.010538-0/CITE/REFWORKS>
- Priscila Barbosa, J. (2018). Anti-*Candida* Activity of Essential Oils from *Eucalyptus* species. A Preliminary Study. *Advances in Dentistry & Oral Health*, 8(3). <https://doi.org/10.19080/adoh.2018.08.555740>
- Pristov, K. E., & Ghannoum, M. A. (2019). Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. *Clinical Microbiology and Infection*, 25(7), 792–798. <https://doi.org/10.1016/J.CMI.2019.03.028>
- Rahimi-Nasrabadi, M., Ahmadi, F., & Batooli, H. (2012). Essential oil composition of *Eucalyptus procera* Dehnh. leaves from central Iran. *Natural Product Research*, 26(7), 637–642. <https://doi.org/10.1080/14786419.2010.541875>
- Santajit, S., & Indrawattana, N. (2016). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *BioMed Research International*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/2475067>
- Sartorelli, P., Marquioreto, A. D., Amaral-Baroli, A., Lima, M. E. L., & Moreno, P. R. H. (2007). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from two species of *Eucalyptus*. *Phytotherapy Research*, 21(3), 231–233. <https://doi.org/10.1002/PTR.2051>
- Schmeda-Hirschmann, G., & Yesilada, E. (2005). Traditional medicine and gastroprotective crude drugs. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1–2), 61–66. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2005.06.002>
- Schuster, J. E., & Fisher, B. T. (2023). Candidiasis. *Pediatric Transplant and Oncology Infectious Diseases*, 195–205.e3. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-64198-2.00035-X>
- Shah, G., Shri, R., Panchal, V., Sharma, N., Singh, B., & Mann, A. S. (2011). Scientific basis for the therapeutic use of *Cymbopogon citratus*, stapf (Lemon grass). *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 2(1), 3. <https://doi.org/10.4103/2231-4040.79796>
- Sharma, A., Bhardwaj, G., Sohal, H. S., & Gohain, A. (2022). Eugenol. *Nutraceuticals and Health Care*, 177–198. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89779-2.00007-7>
- Sharma, M., Grewal, K., Jandrotia, R., Batish, D. R., Singh, H. P., & Kohli, R. K. (2022). Essential oils as anticancer agents: Potential role in malignancies, drug delivery mechanisms, and immune system enhancement. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedicine & Pharmacotherapie*, 146. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2021.112514>

- Shivaswamy, U., & Sumana, M. N. (2020). Antifungal Resistance of *Candida* Species Isolated from HIV Patients in a Tertiary Care Hospital, Mysuru, Karnataka. *Indian Journal of Dermatology*, 65(5), 423. https://doi.org/10.4103/IJD.IJD_385_19
- Sikora, A., & Zahra, F. (2023). Nosocomial Infections. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559312/>
- Spampinato, C., & Leonardi, D. (2013). *Candida* Infections, Causes, Targets, and Resistance Mechanisms: Traditional and Alternative Antifungal Agents. *BioMed Research International*, 2013, 13. <https://doi.org/10.1155/2013/204237>
- Subsistema de vigilancia epidemiológica para las Infecciones Asociadas a la Atención en Salud. (n.d.).
- Thomas-Rüddel, D. O., Schlattmann, P., Pletz, M., Kurzai, O., & Bloos, F. (2022). Risk Factors for Invasive *Candida* Infection in Critically Ill Patients: A Systematic Review and Meta-analysis. *Chest*, 161(2), 345. <https://doi.org/10.1016/J.CHEST.2021.08.081>
- Timar, M. C., & Beldean, E. C. (2022). Modification of Shellac with Clove (*Eugenia caryophyllata*) and Thyme (*Satureja hortensis*) Essential Oils: Compatibility Issues and Effect on the UV Light Resistance of Wood Coated Surfaces. *Coatings*, 12(10), 1591. <https://doi.org/10.3390/COATINGS12101591/S1>
- Yang, S. K., Yusoff, K., Thomas, W., Akseer, R., Alhosani, M. S., Abushelaibi, A., Lim, S. H. E., & Lai, K. S. (2020). Lavender essential oil induces oxidative stress which modifies the bacterial membrane permeability of carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae*. *Scientific Reports*, 10(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55601-0>
- Yuan, H., Ma, Q., Ye, L., & Piao, G. (2016). The Traditional Medicine and Modern Medicine from Natural Products. *Molecules* 2016, Vol. 21, Page 559, 21(5), 559. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES21050559>
- Zaouali, Y., Bouzaine, T., & Boussaid, M. (2010). Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 48(11), 3144–3152. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2010.08.010>
- Zheljzkov, V. D., Cantrell, C. L., Astatkie, T., & Jeliaskova, E. (2013). Distillation Time Effect on Lavender Essential Oil Yield and Composition. *Journal of Oleo Science*, 62(4), 195–199. <https://doi.org/10.5650/JOS.62.195>