



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

Eficacia del romero (*Rosmarinus officinalis*) en la inhibición de *Cándida*
Álbicans.

AUTOR

María Fernanda Montúfar Guachilema

AÑO

2019



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

EFICACIA DEL ROMERO (ROSMARINUS OFFICINALIS) EN LA INHIBICIÓN
DE CÁNDIDA ÁLBICANS

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Especialista en Rehabilitación Oral

Profesor guía

Dra. Ma. Gabriela Romero

Autor

María Fernanda Montúfar Guachilema

Año

2019

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

"Declaro haber dirigido el trabajo, Eficacia del romero (*rosmarinus officinalis*) en la inhibición de *Cándida albicans*, a través de reuniones periódicas con el estudiante María Fernanda Montúfar Guachilema en el semestre 2020-00, 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".

Dra. Ma. Gabriela Romero

Especialista en Rehabilitación Oral

0201708492

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

"Declaro haber revisado este trabajo, Eficacia del romero (rosmarinus officinalis) en la inhibición de *Cándida álbicans*, de la estudiante María Fernanda Montúfar Guachilema, en el semestre 2020-00, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación"

Dra. Rocío Coral

Especialista en Rehabilitación Oral

0401149117

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.”

María Fernanda Montúfar

C.I 1723587133

RESUMEN

En razón a las propiedades antifúngicas atribuidas al romero (*rosmarinus officinalis*) descritas en la literatura, el *objetivo* planteado para esta investigación fue comparar la eficacia inhibitoria del extracto acuoso y el aceite esencial de romero sobre *Cándida Álbicans*, uno de los agentes causales de estomatitis subprotésica.

Una vez obtenidos el extracto acuoso al 10% y el aceite esencial puro de romero, se realizó la evaluación de sus propiedades antifúngicas contra *C. Álbicans* (cepa ATCC 102130), mediante la técnica de microdilución en caldo, en la que se utilizó dos policubetas plásticas (Thermo Scientific) de 96 pocillos cada una, dentro de las cuales se realizó la microdilución del extracto acuoso al 10% y del aceite esencial de romero en el inóculo de estudio (*C. Álbicans*) en la escala Mcfarland 0.5, usando como control positivo Clotrimazol al 2%, las policubetas fueron incubadas a 37° durante 24 horas, las lecturas se realizaron con el espectrofotómetro Bio-Tek-Sinergy a la 1 hora, 3 horas y 24 horas.

Resultados: el aceite esencial puro y extracto acuoso al 10% de romero no inhiben por completo la formación de colonias de *C. Álbicans*, sin embargo al realizar el análisis estadístico se obtuvo que, el aceite esencial de Romero es 25.9% más eficaz que el extracto acuoso.

Palabras clave: *Cándida Álbicans*, estomatitis subprotésica, *Rosmarinus officinalis*.

ABSTRACT

Due to the antifungal properties attributed to rosemary (*rosmarinus officinalis*) described in the literature, the aim of this study was to compare the inhibitory efficacy of the aqueous extract and rosemary essential oil on *Candida Álbicans*, one of the causative agents of subprosthetic stomatitis .

Once obtained the 10% aqueous extract and the pure essential oil of rosemary, the evaluation of its antifungal properties was carried out against *C. Álbicans* (strain ATCC 102130), by means of the microdilution technique in broth, in which two microtitre plates were used plastic cups (Thermo Scientific) of 96 wells each, within which the microdilution of the 10% aqueous extract and rosemary essential oil was carried out in the study inoculum (*C. Álbicans*) on the Mcfarland scale 0.5, using as control positive Clotrimazole at 2%, the microtubules were incubated at 37 ° for 24 hours, the readings were made with the Bio-Tek-Sinergy spectrophotometer at 1 hour, 3 hours and 24 hours.

Results: the pure essential oil and 10% aqueous extract of rosemary did not completely inhibit the formation of colonies of *C. álbicans*, however when performing the statistical analysis it was obtained that, the essential oil of Romero is 25.9% more effective than the aqueous extract.

Key words: *Candida Albicans*, subprosthetic stomatitis, *Rosmarinus officinalis*.

ÍNDICE

1.- El Problema	1
1.1 Introducción	1
1.2 Planteamiento del problema	1
1.3 Justificación	2
1.4 Objetivos.....	3
1.4.1 Objetivo general.....	3
1.4.2 Objetivo específico.....	3
2. Marco Teórico.....	4
2.1 Estomatitis subprotésica	4
2.1.1 Etiología de la estomatitis subprotésica.....	4
2.1.2 Clasificación de la estomatitis subprotésica.....	6
2.2 Ambiente oral en pacientes portadores de prótesis	7
2.3 Microorganismos frecuentes de la cavidad oral y su relación con enfermedades sistémicas	9
2.3.1 <i>Cándida álbicans</i>	10
2.4 Métodos de limpieza para las prótesis dentales	11
2.5 El romero (<i>rosmarinus officinalis</i>)	11
2.5.1 Usos del romero (<i>rosmarinus officinalis</i>).....	13
3. Materiales Y Métodos.....	15
3.1 Tipo de investigación	15
3.2 Población de estudio.....	15
3.2.1 Unidad muestral.....	16
3.2.2 Romero (<i>rosmarinus officinalis</i>)	16
3.2 Obtención aceite esencial y extracto acuoso de romero	17
3.2.1 Extracto acuoso	17
3.2.2 Aceite esencial.....	19
3.3 Activación de <i>cándida álbicans</i>	22

3.4 Preparación del inóculo	23
3.5 Microdilución en caldo	25
4. Recolección De Datos.....	30
4.1 Concentración mínima inhibitoria.....	30
5. Análisis Inferencial	31
5.1 Variables	31
5.1.1 Independientes:	31
5.1.2 Dependiente:.....	31
5.2 Hipótesis	31
5.3 Validación de hipótesis	31
5.4 Estadística descriptiva	32
5.5 Test hsd (honestly-significant-difference) de tukey	33
5.6 Anova	38
5.7 Regresión lineal múltiple.....	39
6. Resultados.....	41
6.1 Estadística gráfica.....	41
7. Discusión	43
8. Conclusiones Y Recomendaciones	45
8.1 Conclusión	45
8.2 Recomendaciones	45
Referencias.....	46
Anexos	52

1.- El Problema

1.1 Introducción

La estomatitis subprotésica es definida como la inflamación crónica de la mucosa bucal ocasionada por el contacto de ésta con una prótesis, generalmente mal adaptada o en mal estado, que afecta en la mayoría de casos a la población de edad avanzada. (Rodríguez, Portillo, Lama, Hernández 2014).

Según (AlTarawneh et. al., 2013) múltiples factores etiológicos contribuyen a la aparición de estomatitis protésica, los cuales incluyen microorganismos como *Cándida* (en particular, *Cándida álbicans*) y microorganismos gram-negativos anaerobios, alteración del flujo salival y función de las glándulas salivales, trauma ocasionado por dentaduras mal ajustadas, deficiente higiene oral, respuesta inmune deteriorada.

Una adecuada rutina de limpieza de las prótesis es necesaria para prevenir la estomatitis y mantener saludables a los tejidos de soporte, el uso de agentes limpiadores químicos ofrece resultados más efectivos, el mercado ofrece varios productos, (Iseri et. al., 2000); sin embargo la tendencia actual motiva el uso de agentes naturales como una alternativa a los productos de uso habitual. (Fu et. al., 2007).

1.2 Planteamiento del Problema

Para un paciente portador de prótesis removible el llevar unas adecuadas medidas de higiene oral es tan importante como para un paciente que no porta prótesis. En un paciente portador, los tejidos remanentes son susceptibles de padecer ciertas complicaciones como estomatitis subprotésica, caries dental o enfermedad periodontal ya que las prótesis constituyen una barrera que impide la función limpiadora propia de la lengua y saliva, además son superficies extra donde se retiene la placa bacteriana. Incluso pueden presentarse

complicaciones a nivel sistémico, (O'Donnell et. al., 2016) indicaron la presencia de patógenos respiratorios potenciales que residen en las prótesis dentales lo que eleva el riesgo de desarrollar neumonía por aspiración.

En el estudio de (Millward, Katechial, Morgan 2013) se encontró que el 60.2% de pacientes portadores de prótesis removibles (de un total de 196 pacientes encuestados) tenía un nivel de higiene pobre a moderado, además hubo una relación significativa entre el material de la dentadura y la limpieza de la misma, de los pacientes que usaban prótesis de cromo-cobalto el 69% tenía una buena limpieza de la dentadura, mientras que en aquellos con prótesis de acrílico apenas el 34.7% exhibió un buen nivel de limpieza.

Se usan diferentes métodos para limpiar dentaduras, éstos generalmente se dividen en métodos químicos, mecánicos y físicos. En la actualidad, existe una amplia gama de limpiadores químicos que incluyen glutaraldehído, clorhexidina, y perborato de sodio. La ventaja de estos productos es que ejercen el mínimo daño en las superficies de la dentadura para no aumentar su porosidad y la consecuente acumulación de placa, un método físico mal empleado aumenta el riesgo de erosionar la resina acrílica (Mojard, Khalili, Aalaei 2017).

Según (Ercalik-Yalcinkaya y O'zcan 2014) indicaron que el 85% de pacientes portadores de prótesis removibles limpiaron sus dentaduras artificiales solamente con cepillo y pasta dental o jabón. Esto demuestra que los pacientes necesitan recibir una adecuada instrucción por parte de los profesionales para ejecutar una correcta técnica de limpieza, así como la necesidad de controles posteriores.

1.3 Justificación

En este estudio se propone el uso de un método químico natural para la limpieza de las dentaduras artificiales que resulta de fácil acceso a costos reducidos, en la presente investigación se evaluará la eficacia inhibitoria del romero (*Rosmarinus officinalis*) sobre *Cándida Álbicans* en resinas acrílicas de termocurado.

La tendencia actual es retornar al uso de recursos naturales mediante la obtención de sustancias alternativas que en este caso serán usadas para la limpieza de las prótesis dentales, (Sepehri, Javadian, Khammari, Hassanshian 2017) demostraron la actividad antimicrobiana de las preparaciones de aceite esencial de eucalipto, romero, pachulí, pino y cajuput, estas preparaciones exhiben actividad sobre bacterias gram-positivas, *Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis*, bacterias Gram-negativas, como *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, y la levadura, *Cándida Álbicans*. Además en el estudio de Radaelli et. al., (2016) los extractos foliares de *E. platyloba* y *R. officinalis*, mostraron una fuerte actividad antimicrobiana, siendo más significativa la actividad de *R. officinalis*.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General

Evaluar la eficacia del romero (*Rosmarinus officinalis*) en la inhibición de *Cándida Álbicans*.

1.4.2 Objetivo Específico

Comparar la eficacia inhibitoria del extracto acuoso y el aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*) sobre *Cándida Álbicans*.

2. Marco Teórico

2.1 Estomatitis Subprotésica

Los profesionales de la salud oral nos enfrentamos diariamente al manejo de pacientes desdentados, según (Milward et.al., 2013) al aumentar la expectativa de vida de la población el manejo de estos pacientes en odontología es más frecuente y la tendencia continuará. Existen varias opciones de tratamiento para éstos pacientes desde prótesis removibles hasta implantosoportadas, un gran número de pacientes eligen la opción removable principalmente por factores económicos o simplemente porque no son candidatos para portar una prótesis fija.

Para un paciente portador de prótesis removable el llevar unas adecuadas medidas de higiene oral es tan importante como para un paciente que no porta prótesis, en un paciente portador, los tejidos remanentes son susceptibles de padecer ciertas complicaciones como estomatitis subprotésica, caries dental o enfermedad periodontal ya que las prótesis constituyen una barrera que impide la función limpiadora propia de la lengua y saliva, además son superficies extra donde se retiene la placa bacteriana. Incluso pueden presentarse complicaciones a nivel sistémico (O'Donnell et. al., 2016).

2.1.1 Etiología de la Estomatitis Subprotésica

La estomatitis subprotésica es la inflamación crónica de la mucosa bucal ocasionada por el contacto de ésta con una prótesis, generalmente mal adaptada o en mal estado, que afecta en la mayoría de casos a la población de edad avanzada. (Rodríguez, Portillo, Lama, Hernández 2014).

Según (AlTarawneh et. al., 2013) múltiples factores etiológicos contribuyen a la aparición de estomatitis protésica, incluyen:

- 1) Microorganismos como *Cándida* (en particular, *Cándida albicans*) y microorganismos gram-negativos anaerobios
- 2) Alteración del flujo salival y función de las glándulas salivales

- 3) Trauma ocasionado por dentaduras mal ajustadas
- 4) Deficiente higiene oral
- 5) Respuesta inmune deteriorada.

Por lo general, la estomatitis subprotésica no manifiesta síntomas sin embargo puede presentarse halitosis, sangrado, inflamación, ardor, xerostomía, sensación dolorosa, disgeusia. (Rodríguez et. al., 2014).

En su estudio (Ercalik-Yalcinkaya, O'zcan 2014) mencionan que otros factores pueden influir en el desarrollo de estomatitis subprotésica, como el tiempo prolongado del uso de la prótesis y un área extensa de mucosa cubierta por la dentadura.

En el estudio realizado por (AlTarawneh et. al., 2013) se confirmó que la estomatitis subprotésica aparece como resultado de la actuación de la prótesis dental como un reservorio de cándida, un flujo salival normal en pacientes sanos actúa como medio de transporte para los microorganismos entre la prótesis y los tejidos pero juega un papel limitado en el desarrollo de estomatitis subprotésica. El ajuste de la dentadura y xerostomía no aparecen como factores primarios, sugieren que el tratamiento de la estomatitis subprotésica debe enfocarse en la desinfección de la dentadura existente o en fabricar una nueva dentadura más que en aplicar una terapia antifúngica sobre los tejidos lesionados.

Estudios han reportado la incidencia de lesiones de la mucosa oral que especialmente están relacionadas con el uso de prótesis removibles, siendo mayor la incidencia de éstas que otros tipos de lesiones de la mucosa oral, encontrándose entre las más frecuentes la estomatitis subprotésica. (Ercalik-Yalcinkaya, O'zcan 2014).

En su estudio (Jørgensen 2000) indica que la cantidad de placa en la prótesis es importante para el desarrollo de estomatitis subprotésica es decir existe una correlación entre la cantidad de placa y el grado de severidad de la estomatitis, además de una relación entre el grado de severidad del eritema de la mucosa palatal y el nivel de colonización por Cándida.

2.1.2 Clasificación de la estomatitis subprotésica

Barata et. al, (2002) indica que Newton divide a la estomatitis subprotésica en 3 categorías o tipos en función de su grado de desarrollo:

2.1.2.1 Tipo I: Estomatitis protésica localizada simple: este tipo de estomatitis se relaciona con el trauma provocado por la prótesis, manifestándose como una inflamación mínima y localizada a manera de un punteado rojizo, presentándose obstrucción de los conductos salivales debido a la presión ejercida por la prótesis.

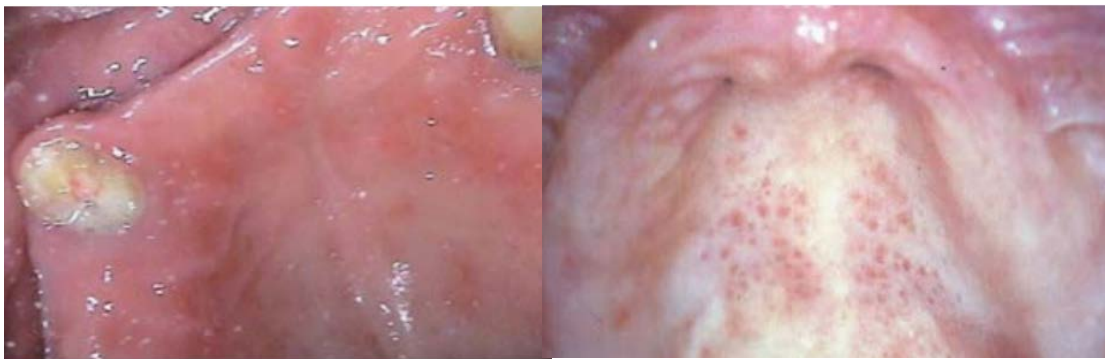


Figura 1: Estomatitis Tipo I. Tomada de Barata (2002).

2.1.2.2 Tipo II: Estomatitis protésica difusa simple: al tratarse de una inflamación propiamente dicha se observa la mucosa en general con un aspecto rojizo, liso, hiperémico e hipertrófico en toda el área sobre la cual se asienta la prótesis.



Figura 2: Estomatitis Tipo II. Tomada de Barata (2002).

2.1.2.3 Tipo III: Estomatitis protética granular o de hiperplasia granular: la mucosa debajo de la prótesis presenta un aspecto nodular e hiperémico, se trata de una inflamación intensa de la mucosa.



Figura 3: Estomatitis Tipo III. Tomada de Barata (2002).

Los tipos II y III, se relacionan con la presencia de placa microbiana (bacteriana o fúngica) en la prótesis y en la mucosa subyacente.

2.2 AMBIENTE ORAL EN PACIENTES PORTADORES DE PRÓTESIS

La instalación de una prótesis dentro de la cavidad bucal produce profundas alteraciones en sus condiciones ambientales, la prótesis es colonizada por microorganismos orales e interrumpe la acción limpiadora propia de la lengua, así como la libre circulación de saliva que contiene sustancias antimicrobianas (Jørgensen 2000).

En el estudio de (Shi et.al. 2016) encontraron que los microorganismos presentes en los dientes y las prótesis de la misma persona son similares entre sí, independientemente de la superficie, es decir el estado de la prótesis podría afectar la salud de los dientes remanentes y viceversa. Con la particular combinación de superficies blandas y duras, la cavidad oral ofrece un entorno único para la colonización microbiana, además de las superficies propias de la cavidad bucal, los microorganismos pueden formar biofilms de manera eficiente

en las superficies artificiales que se incorporan como parte de una restauración dental.

Coulthwaite, Verran (2007) indican que las prótesis dentales son reservorios de placa, cálculos y manchas, de una manera similar a los dientes naturales. El biofilm de una dentadura acrílica es una capa heterogénea densa, compleja que contiene más de 10^{11} microorganismos (hongos y bacterias) y células epiteliales descamadas (Iseri, Uludamar, Kulak 2011). Son realmente pocos los estudios acerca del biofilm de las dentaduras acrílicas, la mayoría de los cuales corresponden a la década de 1980 realizados en pequeños grupos de personas, la mayoría de la literatura sobre este tema se centra en el agente etiológico de la estomatitis subprotésica, *Candida albicans*. El biofilm de la dentadura tiende a ser más acidogénico en el área de contacto directo con los tejidos bucales, esto favorece la colonización de estreptococos y *Candida spp.*, que se encuentra con mayor frecuencia en esta superficie de la prótesis, además de encontrarse una mayor concentración de nutrientes, flujo salival menor, y una topografía rugosa que favorece y protege la presencia de este biofilm.

Es fundamental tener en cuenta que hay presencia de microorganismos patógenos en bocas sanas, la cantidad de dichos patógenos, a más de la manifestación de factores predisponentes pueden marcar la diferencia entre salud y enfermedad. (Coulthwaite, Verran 2007).

Los microorganismos patógenos deben mantenerse en contacto por largos periodos de tiempo con la mucosa para así permitir que los productos del metabolismo microbiano inicien una respuesta inflamatoria de los tejidos., dando lugar a lesiones clínicamente visibles (Jørgensen 2000).

La composición de la microflora oral varía en diferentes superficies dentro de la boca debido a las propiedades físicas y biológicas respectivas de cada sitio (Jørgensen 2000).

2.3 Microorganismos frecuentes de la cavidad oral y su relación con enfermedades sistémicas.

Según (O'Donnell et. al., 2015) se ha informado de una clara relación existente entre enfermedades orales y sistémicas como artritis reumatoide, enfermedad cardiovascular e infección respiratoria. La relación entre la salud oral y los microorganismos presentes en la cavidad bucal con el estado de salud en general es cada vez más reconocida, el biofilm oral ha sido identificado como reservorio de agentes potencialmente patógenos.

En su estudio (Coulthwaite, Verran 2007) mencionan que una deteriorada salud oral tiene un impacto negativo además en la salud psicológica de los pacientes ya que afecta su autoestima y confianza en sí mismos, también indican que se ha reportado una asociación entre la malnutrición y la presencia de candidiasis oral.

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es una de las enfermedades en las que microorganismos orales cumplen un papel importante para su exacerbación además de la importante influencia de una deficiente higiene oral en la recurrencia de enfermedades pulmonares, una parte importante de las pulmonías de origen nosocomial inician con la aspiración de microorganismos provenientes de la boca o nasofaringe hacia el tracto respiratorio inferior. El 55% de casos de exacerbación de EPOC son ocasionados por microorganismos saprofiticos del tracto respiratorio como *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, y *Candida spp.* quienes forman una estructura organizada (biofilm), la patogenicidad de un microorganismo se refleja en su capacidad para formar biofilm, los microorganismos pueden provocar la producción de antígenos que incrementan la reacción inflamatoria del tracto respiratorio (Przybyłowska, Nastalska, Kope, Rubinsztajn, Chazán 2014).

En pacientes con inflamación crónica de la mucosa oral y respuesta inflamatoria sistémica la función mucosiliar del tracto respiratorio está alterada, lo que facilita

la colonización del tracto respiratorio, la estomatitis subprotésica es una de las razones para que se produzca una inflamación crónica de la mucosa bucal en pacientes de edad avanzada portadores de prótesis. El epitelio bucal afectado debajo de la prótesis puede convertirse en el punto de partida para que se desencadene una infección fúngica o bacteriana (Przybyłowska et. al., 2014).

2.3.1 Cándida Álbicans

La Cándida álbicans encontrada en el biofilm de las dentaduras artificiales es un agente determinante para el establecimiento de la estomatitis subprotésica, la cándida es recolectada con más frecuencia y en cantidades grandes de la superficie de la prótesis (que contacta con la mucosa) que del paladar, esto indica que la prótesis constituye un reservorio de microorganismos, siendo necesaria la adherencia de la levadura a la superficie de la prótesis para una posterior colonización del paladar y el desarrollo de un estado de patogenicidad (Iseri et. al., 2011). La forma micelar de Cándida muestra una fuerte adherencia a superficies acrílicas, mediante fosfolipasas y otras enzimas hidrolíticas (Przybyłowska et. al., 2014).

La colonización de la superficie de la prótesis por Cándida se produce por varios aspectos como el grado de adherencia de la levadura, efecto bacteriano de otras especies en el proceso de adhesión, propiedades superficiales de la resina acrílica, además ciertas proteínas séricas derivadas del exudado inflamatorio asociado con la estomatitis incrementa los niveles de adherencia de Cándida, (Jørgensen 2000).

En un estudio experimental se demostró que la estomatitis subprotésica asociada a Cándida está relacionada con la transformación de la forma blastopórica de Cándida en forma micelial (Jørgensen 2000).

Los potenciales factores virulentos de Cándida son sus ácido proteinasas extracelulares capaces de degradar colágeno, queratina y albúmina, de hecho la alta actividad proteolítica es la característica principal de las especies más virulentas de Cándida, con Cándida Álbicans a la cabeza de la lista, seguida de *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. glabrata*, (Jørgensen 2000).

2.4 Métodos de limpieza para las prótesis dentales.

El cuidado de la salud bucal de los pacientes portadores de prótesis está relacionado con su calidad de vida ya que como hemos hablado hay una estrecha relación entre afecciones orales y sistémicas. Cada método de limpieza de las prótesis dentales presenta sus respectivas ventajas y desventajas, y pueden ser usados de acuerdo a las necesidades y condiciones individuales de cada paciente (Coulthwaite, Verran 2007).

Una adecuada rutina de limpieza de las prótesis es necesaria para prevenir la estomatitis y mantener saludables a los tejidos de soporte, una efectiva remoción de la placa se logra con cierto grado de destreza manual que usualmente está disminuida en los pacientes de edad avanzada, el uso de agentes limpiadores químicos ofrece resultados más efectivos, el mercado ofrece varios productos que se dividen en 5 grupos: peróxidos alcalinos, hipocloritos alcalinos, ácidos diluidos orgánicos e inorgánicos, desinfectantes y enzimas. La mayoría de estos productos son comercializados en formada de tabletas efervescentes de fácil uso, (Iseri et. al., 2000).

Existen varios estudios que comparan la efectividad de varias técnicas de limpieza de las prótesis, sin embargo (Ramage et. al., 2012) indican que para asegurar la eliminación eficiente de la biopelícula microbiana es importante someter a las dentaduras a procesos regulares de desinfección.

Un método de limpieza ideal debe no alterar las propiedades físicas y mecánicas de las dentaduras, no alterar su color y estabilidad dimensional a más de poseer un efecto bactericida y fungicida (Papadiochou, Polyzois 2017).

2.5 El romero (*rosmarinus officinalis*)

El romero (*R. officinalis* L.) es un término se deriva del griego“(rhops y yrinos)” que significa “arbusto marino” ya que su crecimiento se da de preferencia en las costas, (Alonso 2004), sin embargo por su gran capacidad de adaptación se la puede encontrar en otras zonas.

Estudios actuales están encaminados a desarrollar nuevas alternativas para controlar infecciones microbianas, en odontología no cabe duda de que una de las afecciones más frecuentes en pacientes portadores de dentaduras es la estomatitis subprotésica, cuyo agente causal (entre otros varios factores) es la *C. Albicans*. El análisis de las actividades antifúngicas de plantas medicinales podrían facilitar la identificación de compuestos que potencialmente podrían desarrollarse en nuevos agentes antifúngicos (Yiang et. al., 2011).

El aceite esencial del romero posee una actividad antimicrobiana que resulta de un sinergismo de sus componentes, pudiendo convertirse en un potencial antimicrobiano natural (Gauch et. al., 2014).

El Romero (*Rosmarinus officinalis*) originario de la región Mediterránea, es una planta aromática y ornamental que pertenece a la familia de la menta, es un arbusto común, de hoja perenne, aromático que crece en muchos lugares del mundo, sus hojas frescas o secas suelen utilizarse en la preparación de alimentos, (Di Oliveira et. al., 2017).

En una reciente evaluación de la actividad antimicrobiana de *R. officinalis*, Jiang et al., (2011) han identificado 1,8-cineol (26.54%), -pino (20.14%), alcanfor (12.88%), canfeno (11.38%) y -pineno (6.95%) como los principales constituyentes del aceite esencial.

En el estudio de (Radaelli 2016) se identificó que los compuestos más abundantes en todos los aceites esenciales de las plantas estudiadas (entre ellas el romero) fueron compuestos oxigenados, especialmente monoterpenos oxigenados y fenilpropanoides. La combinación de monoterpenos y sesquiterpenos oxigenados,

Los fenilpropanoides y alcoholes representaron el 96.56%% de los compuestos oxigenados para *R. officinalis*.

2.5.1 Usos del romero (*Rosmarinus officinalis*)

El uso del romero en la antigüedad se remonta al año 5000 a.c en la civilización Egipcia, donde colocaba la planta en las tumbas de los faraones, mientras que para los griegos y romanos el romero era una planta sagrada símbolo de la muerte y el amor, (Ambrose et al. 2016); (Lax 2014).

En el continente Europeo la planta se utilizaba para fortalecer el sistema circulatorio; en 1330 se obtuvo por primera vez el aceite esencia de romero y desde entonces es usado en la industria de la perfumería. (Ambrose et al. 2016). En el año 1665 cuando ocurrió la gran plaga, se colocaba romero dentro de bolsas para inhalar sus vapores al desplazarse dentro de áreas infectadas. Durante la segunda guerra mundial se utilizó romero en los hospitales franceses para matar gérmenes. (Schiller y Schiller 2008).

Esta especie debe su fama a sus propiedades farmacológicas y valor nutricional, en la industria alimentaria es usada como condimento y conservante debido a su potencial antioxidante y antimicrobiano, además es usado también en la elaboración de productos cosméticos. (Borrás-Linares et al. 2014).

En su estudio (Marchiori, 2004) indica que el té de romero es usado para el tratamiento de trastornos gástricos y enfermedades relacionadas con el dolor y la inflamación.

Como se mencionó, otra forma de uso de *R. officinalis* es su aceite esencial, que también se emplea para tratar dispepsia y formas más leves de trastornos gastrointestinales espasmódicos, inflamaciones, alteraciones circulatorias, dolor muscular o articular (Rašković et al., 2014).

Se ha reportado en ensayos in vivo e in vitro la actividad antiinflamatoria del aceite esencial de romero (Takaki et al., 2008); (Inoue et al., 2005); (de Melo et al., 2011).

El alto contenido de principios activos que le otorgan al romero propiedades químicas y bioquímicas ha permitido que se lo utilice con fines terapéuticos, aromáticos y gastronómicos (Ávila-Sosa et. al., 2011).

Debido a uso a través de la historia, el que se ha mantenido hasta la actualidad, el romero fue elegido la Hierba del Año por la Asociación Internacional de Hierbas IHA en el 2018 Borges et. al,(2019).

3. Materiales y métodos

3.1 Tipo de investigación

Experimental, in vitro, comparativa.

3.2 Población de estudio

Cepa estandarizada a ensayarse *Cándida Álbicans* ATCC 10231 (Lot. 443-860, FV: 30/04/2020 U.S.A) que fue proporcionada por MEDIBAC INC S.A. importadora de insumos para laboratorios clínicos y la especie vegetal romero taxonómicamente identificada por el Herbario Nacional de Ecuador.



Figura 4: *C. Álbicans* (Cepa ATCC 102130)

3.2.1 Unidad muestral:

Extracto acuoso de Romero al 10%

Aceite esencial de Romero al 100%

Cándida álbicans en escala 0.5 MacFarland

3.2.2 Romero (*Rosmarinus officinalis*)

Las hojas frescas de romero se recolectaron en cultivos de la provincia de Pichincha, parroquia La Merced. Las muestras fueron identificadas en el Herbario Nacional Ecuatoriano como:

Familia: Lamiaceae

Especie: *Rosmarinus officinalis* L.

Observaciones: Subarbusto introducido y cultivado en los Andes.

Las muestras frescas se trasladaron al laboratorio de Química de la Universidad de las Américas en refrigeración a una temperatura de 4 °C, (Coy, Acosta 2013).



Figura 5: Romero (*Rosmarinus officinalis*)

3.2 Obtención Aceite Esencial y Extracto acuoso de Romero

Los aceites esenciales de varias plantas han sido investigados en busca de propiedades antibióticas, constituyendo una alternativa al uso de antimicrobianos convencionales, lo que resulta de mucha utilidad debido a un aumento de resistencia, en este caso de *C. albicans* frente a agentes antifúngicos comerciales (Carvalho et. al., 2012), (Cleveland et. al., 2015).

La obtención del extracto acuoso y aceite esencial de las hojas de romero (*Rosmarinus officinalis*) fue realizada con el apoyo de una especialista en bioquímica de la Universidad de la Américas.

3.2.1 Extracto acuoso

Para la obtención del extracto acuoso de Romero se liofilizó (se eliminó el agua por completo), con ayuda de un liofilizador, marca **Buchi** modelo **Lyovapor L-200**.

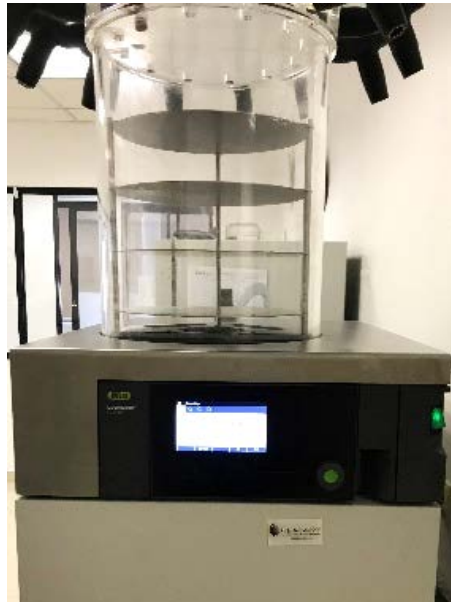


Figura 6: Liofilizador marca Buchi modelo Lyovapor L-200.

Para la obtención del extracto al 10% se pesó 10g de romero seco en una balanza Analítica marca **Ohaus** modelo **PA214** y se colocó en un vaso de precipitación con 100 ml de agua destilada. Posteriormente se colocó en una plancha de calentamiento y agitación marca **Fisher Scientific** modelo **Isotemp** a 50°C durante dos horas. (Gauch et. al 2014).



Figura 7: balanza Analítica Ohaus.

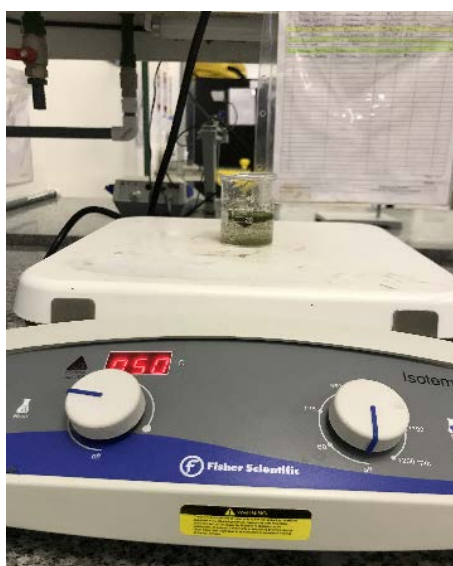


Figura 8: plancha de calentamiento y agitación Fisher Scientific

El extracto obtenido se filtró por filtro jeringa de 0.45 μm marca **Rephiquick** para los análisis microbiológicos. (Höfling et. al 2010).



Figura 9: filtro jeringa de 0.45 μm marca Rephiquick.

3.2.2 Aceite Esencial

Para la obtención del aceite esencial de Romero puro (al 100%) se liofilizó (se eliminó el agua por completo), con ayuda de un liofilizador, marca **Buchi** modelo **Lyovapor L-200**.

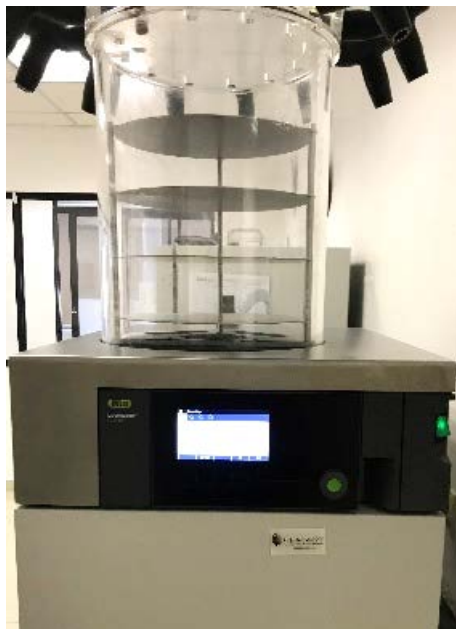


Figura 10: un liofilizador, marca Buchi modelo Lyovapor L-200.

Se colocó una cantidad de 100 g de romero y 100 ml de agua destilada dentro del balón de destilación para obtención de aceites esenciales, se mantuvo durante 48 horas a temperatura ambiente para que se pueda extraer el aceite esencial, la pureza del aceite se puede apreciar por su densidad, su color y sobre todo el olor característico. El sistema está conformado por:

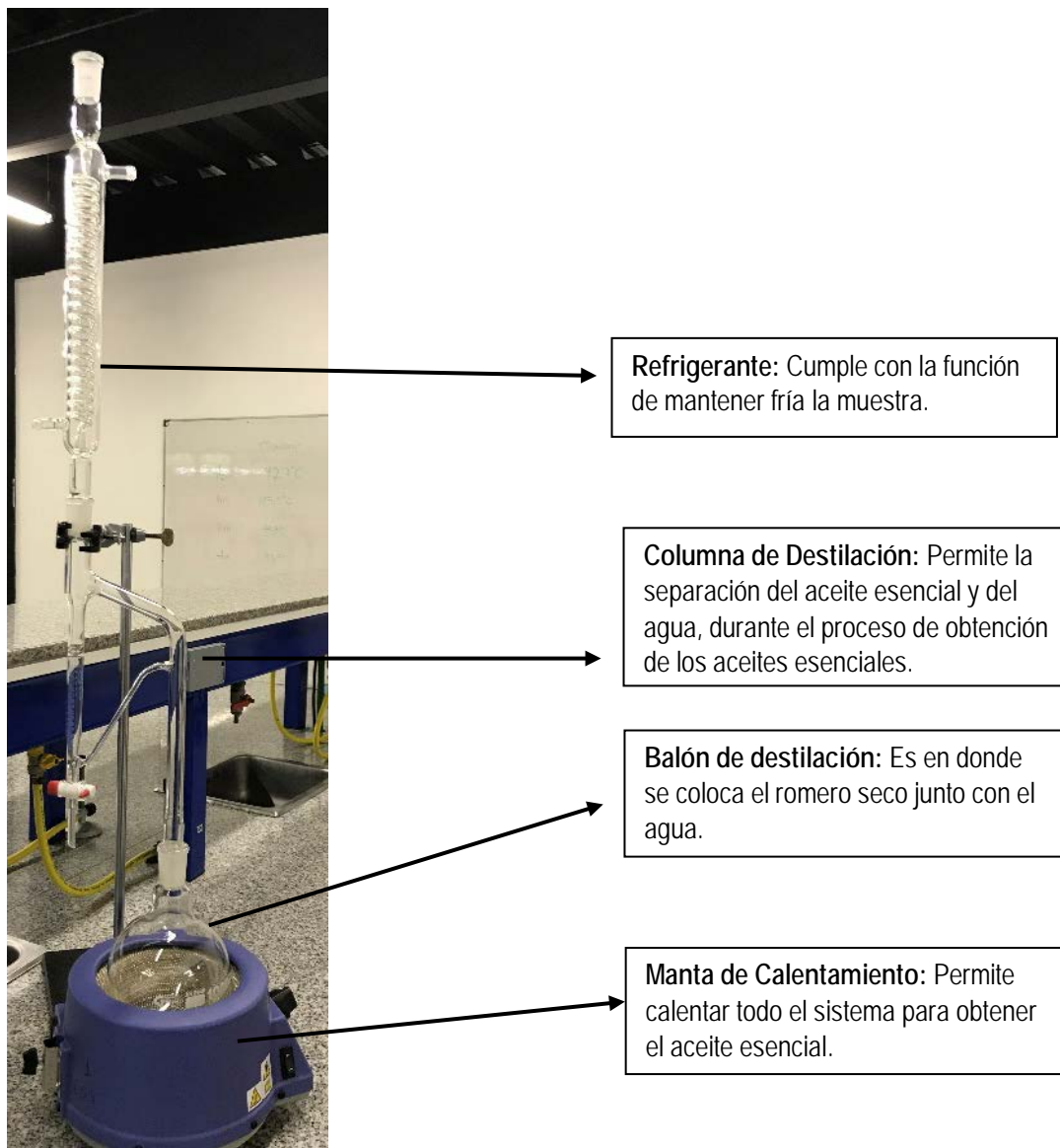


Figura 11: sistema de obtención de aceite esencial.

Se obtuvo alrededor de 5 ml de aceite esencial Y 7 ml de extracto acuoso al 10%. El aceite esencial y los extractos fueron almacenados a una temperatura de 4°C dentro de frascos que los protejan del paso de la luz hasta el momento de su uso en los análisis microbiológicos.



Figura 12: extracto acuoso al 10% y aceite esencial puro de romero.

Tabla 1: Secuencia de obtención de aceite y extracto de romero. Fuente: Elaboración propia.

Fecha	Hora	Equipo	Proceso
19/11/2018	10:00 am	Liofilizador Marca: Buchi Modelo Lyovapor L200	Secado de Romero previo congelación de la muestra a -80°C.
20/11/2018	14:00 pm	Balanza Analítica Marca: Ohaus Modelo PA214	Pesaje de la muestra para obtención extracto acuoso.

20/11/2018	14:10 pm	Planta de agitación y Calentamiento Marca: Fisher Scientific Modelo: Isotemp	Agitación de la muestra para obtención de extracto acuoso durante dos horas.
20/11/2018	16:30 pm	N/A	Filtración de la muestra por filtro jeringa.
21/11/2018	08:00 am	Equipo de obtención de aceites esenciales	Se colocó dentro del balón el romero y agua destilada para obtener el aceite esencial.
23/11/2018	15:00 pm	N/A	Obtención de 5 ml de aceite esencial.

3.3 Activación de *Cándida Álbicans*

La activación del espécimen (*Cándida Álbicans*) obtenida de la cepa ATCC 10231 (Lot. 443-860, FV: 30/04/2020 U.S.A) se realizó transfiriendo las cepas congeladas liofilizadas a un tubo de ensayo estéril, con 2ml de medio de cultivo Sobouraud Dextrose líquido, que posteriormente fue incubado a 37°C durante 24 horas siguiendo las especificaciones técnicas del proveedor de la cepa (Microbiologics-Medibac).



Figura 13: activación de Cándida Álbicans.

3.4 Preparación del inóculo

La metodología a continuación descrita sigue las indicaciones del manual de microbiología del CLSI (2018).



Figura 14: Colonias de C. álbicans activadas.



Figura 15: turbidímetro.

Para evitar falsos positivos o negativos es necesario estandarizar el inóculo a una concentración de 0,5 en la escala Mcfarland (y así tener una población homogénea en todos los pocillos), lo cual se obtuvo mediante una suspensión directa de las colonias previamente activadas en 20 ml de medio de cultivo Sobouraud líquido, la dilución para lograr un inóculo final de 5×10^8 UFC/ml (0,5 en la escala Mcfarland) se logró mediante el uso del turbidímetro, el cual, mediante un análisis óptico determina la cantidad de sustancias en un líquido (estándares de turbidez), obteniendo como resultado una concentración de 0,5 en la escala Mcfarland que fue usada como solución fúngica. (Brochot et. al 2014). El número de microorganismos puede aumentar por duplicación, para prevenir esto es recomendable que la inoculación con la suspensión estandarizada no exceda los 15 minutos posteriores a su preparación.

3.5 Microdilución en caldo

Para esta prueba se utilizará policubetas plásticas de 96 pocillos (12 por 8) cada una de fondo redondeado (Thermo Scientific). Cada policubeta debe incluir un grupo control de crecimiento (sin antimicótico), y un control negativo (medio de cultivo sin inocular).

La distribución de los extractos y grupos control en las filas y columnas de las policubetas realizada con micropipeta (Boeco) fue la siguiente:

Columna 1: 100 μ l de medio de cultivo Sabouraud Dextrose caldo (control de no contaminación del medio de cultivo).

Columna 2: 100 μ l de medio de cultivo Sabouraud Dextrose caldo más 100 μ l de solución fúngica (control de crecimiento del microorganismo).

Columna 3: 100 μ l de compuesto puro clotrimazol al 2% Kasper et. al., (2015) (control de no contaminación de los compuestos).

Columna 3 Fila A: aceite esencial al 100%

Columna 3 Fila C: extracto acuoso al 10%

Columna 3 Fila E: extracto acuoso al 3%

Columna 3 Fila G: crema antimicótica al 2% (control positivo)

En cada pocillo a partir de la **Columna 4** se colocó 20 μ l de solución fúngica más los compuestos puros.

A partir de la **columna 5** los compuestos fueron diluidos de la siguiente manera:

El aceite esencial al 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20% hasta llegar al 10% en la comuna 12.

El extracto acuoso al 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3% hasta llegar al 2% en la columna 12.

Crema antifúngica al 2%, 1.5%, 1% hasta llegar al 0.5% en la columna 7.

Para facilitar la lectura visual no se utilizó los pocillos de las filas B, D, F y H.

Las policubetas fueran colocadas en la incubadora a 37°C durante 24 horas.

La inoculación se realizó con micropipeta (Boeco) dentro de la cámara de bioseguridad para evitar la contaminación de las muestras; todos los experimentos se realizaron por duplicado en cada concentración, (Brochot et. al 2017), (Jiang 2011).



Figura 16: policubeta Thermo Scientific.

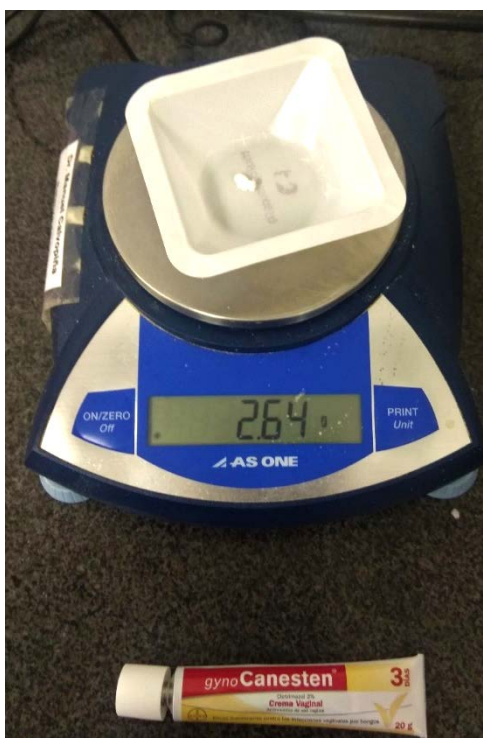


Figura 17: crema Clotrimazol al 2%.

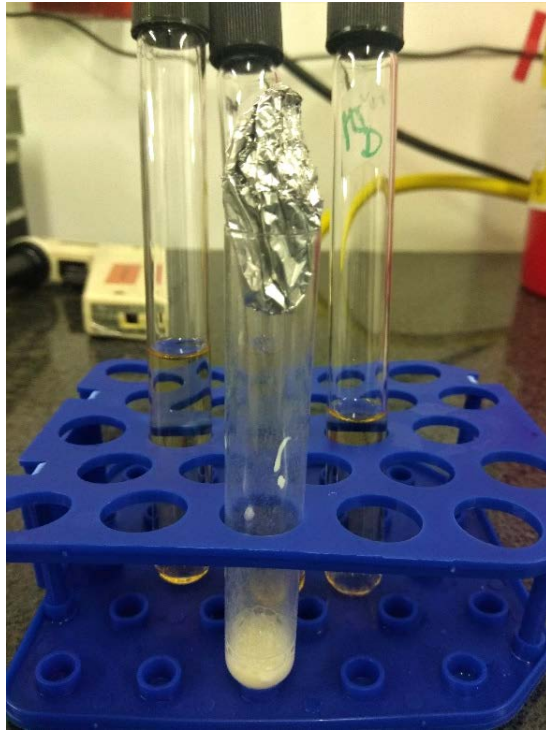


Figura 17: dilución de crema Clotrimazol al 2%.



Figura 18: Medio de cultivo Sabouraud Dextrose líquido.

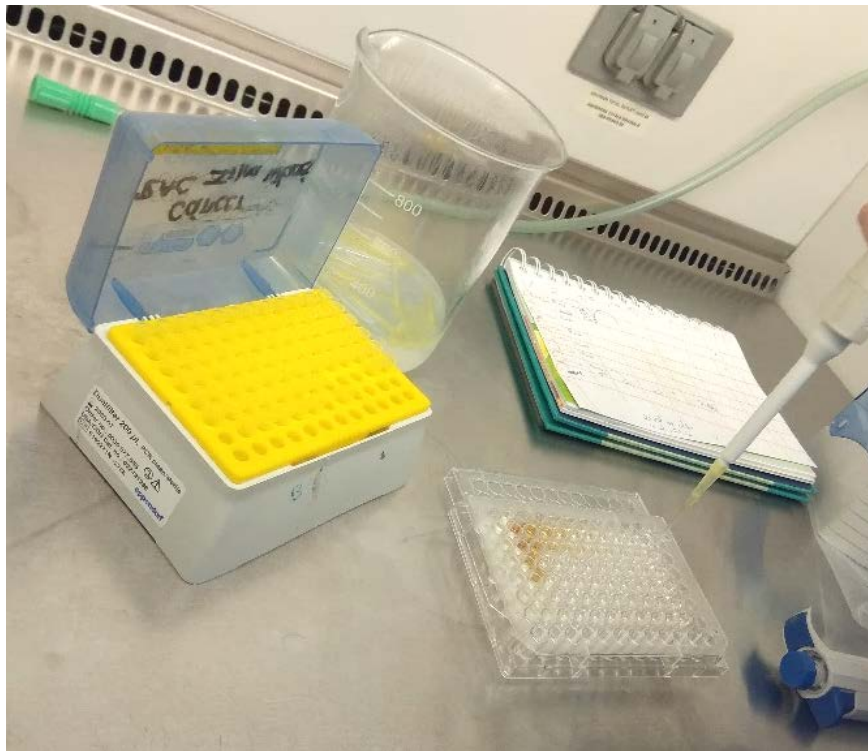


Figura 19: distribución de grupos de estudio.

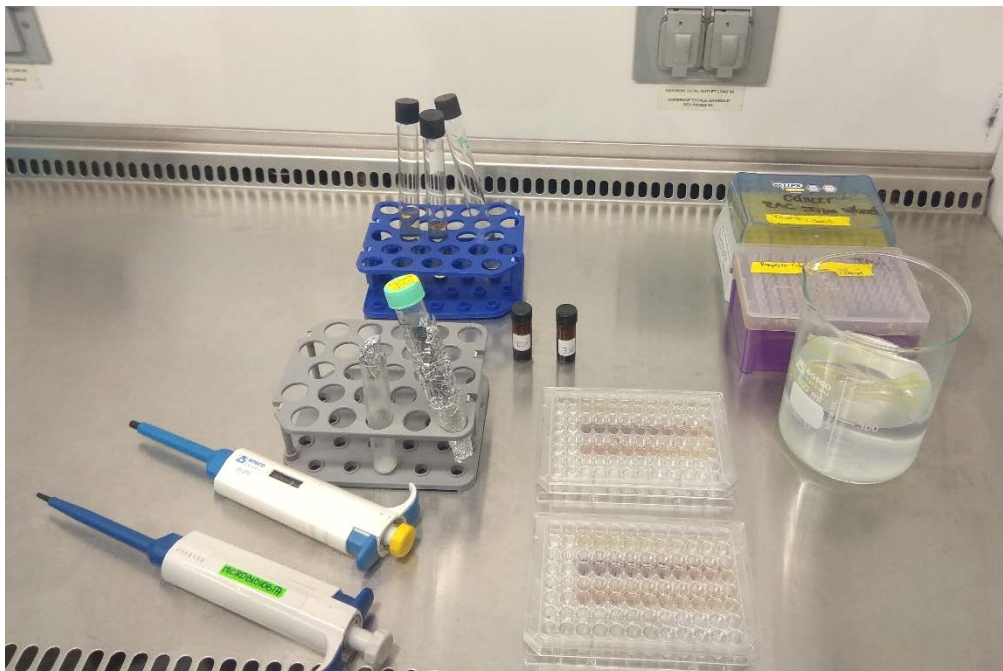


Figura 20: cámara de bioseguridad.



Figura 21: incubación de las muestras.

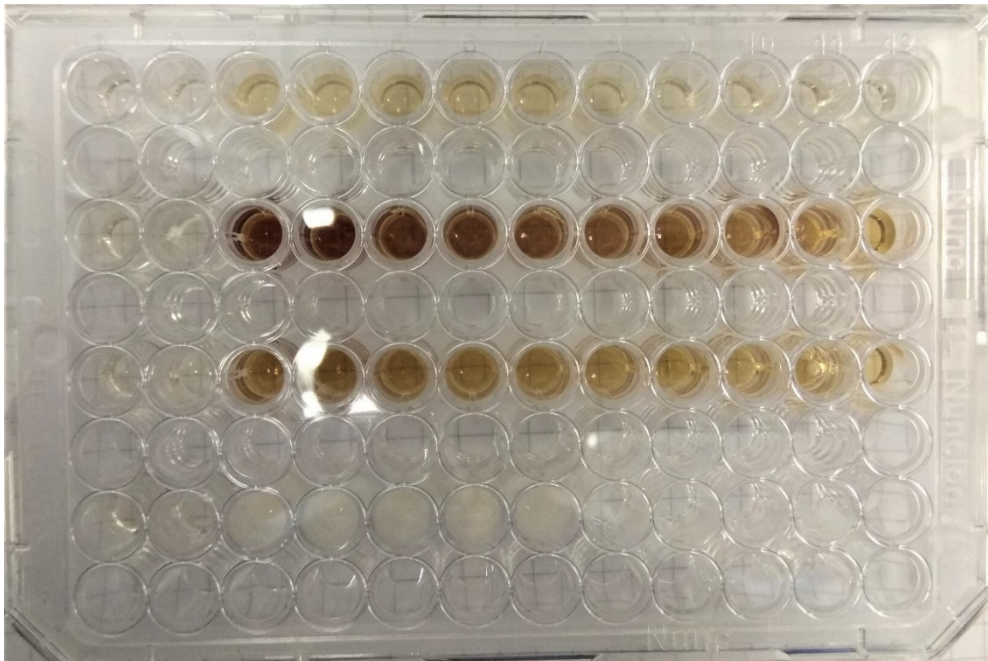


Figura 22: muestra a ser analizada.

4. Recolección de datos

4.1 Concentración mínima inhibitoria

La menor concentración de un antibiótico con la propiedad de inhibir por completo el desarrollo bacteriano dentro de un pocillo es denominada CIM, la evidente usencia de turbidez en el caldo representa el punto final, para poder determinar este punto final de crecimiento, es necesario que cada tubo o pocillo sea comparado con el pocillo control de crecimiento. Una alternativa para la lectura de los resultados de esta prueba y que a su vez los registrará, es el uso de una máquina lectora que pueda diferenciar entre desarrollo y ausencia del mismo. El ensayo se considera válido si en el pocillo control de crecimiento se observa un botón de crecimiento > 2 mm de diámetro o turbidez neta. (MIC testing 2012). (Ksouri et. al 2017). En este estudio para la lectura de los resultados se utilizó el espectrofotómetro del laboratorio de Bioquímica de la UDLA (BioTek-Sinergy HT) en los siguientes intervalos de tiempo: hora 0, hora 1, hora 3 y hora 24.

El espectrofotómetro mide la cantidad de luz absorbida por una muestra al proyectar un haz de luz sobre la misma, lo que nos brinda información acerca de la naturaleza y cantidad de la sustancia en la muestra, esto es expresado en unidades de absorbancia, la concentración de la muestra es proporcional a la absorbancia.



Figura 23: espectrofotómetro BioTek-Sinergy HT.

5. Análisis inferencial

5.1 Variables:

5.1.1 Independientes:

- **Romero**

-Aceite esencial de Romero al 100%.

-Extracto acuoso de Romero al 10%.

5.1.2 Dependiente:

- **Cándida Álbicans**

-Colonias de Cándida Álbicans (serán utilizadas dos unidades de medida, la Unidad de absorbancia UA y las unidades formadoras de colonias UFC, a partir de las UA se determina el valor de la UFC).

5.2 Hipótesis

El aceite esencial de romero presenta mayor efecto inhibitorio en la formación de colonias de Cándida Álbicans que el extracto acuoso al 10%.

5.3 Validación de hipótesis

Para la validación de la hipótesis planteada, primero se transforma la hipótesis relacional en hipótesis estadística:

H_1 : El aceite esencial de romero presenta mayor efecto inhibitorio en la formación de colonias de Cándida Álbicans que el extracto acuoso al 10%.

H_0 : El aceite esencial de romero NO presenta mayor efecto inhibitorio en la formación de colonias de Cándida Álbicans que el extracto acuoso al 10%.

Una vez identificada la hipótesis estadística, se establecen los datos y categorías de las variables de estudio:

1. Se cuenta con tres grupos de experimentación, que tienen correspondencia directa con las variables de la investigación:
 - a. Extracto acuoso al 10%
 - b. Aceite esencial de romero
 - c. Uso de crema al 2% como grupo control
2. En cada uno de los grupos, se determinó dos categorías de estudio:
 - a. Promedio hora (UA).
 - b. Número de levaduras en muestra (UFC).
3. Finalmente, se establece el tiempo de análisis de las muestras:
 - a. 1 hora
 - b. 3 horas
 - c. 24 horas

Bajo estas consideraciones se crea la base de datos en SPSS (ANEXO)

Una vez construida la base de datos, se establece estadística descriptiva en base a la respuesta del número de levaduras (UFC) en relación con cada grupo de datos:

5.4 Estadística descriptiva

Al realizar el análisis de la desviación estándar en relación con la media se concluye en que no existe normalidad de datos, lo que sugiere la utilización de pruebas estadísticas no paramétricas.

Tabla 2. Estadísticos descriptivos
Estadísticos descriptivos.

	Media	Desviación estándar	N
PROMEDIO INICIAL	1.01106	.930855	31
NÚMERO DE LEVADURAS A 1 HORA	-991290.32258	81253830.873460	31
NÚMERO DE LEVADURAS A 3 HORAS	191664516.12903	319339014.787720	31
NÚMERO DE LEVADURAS A 24 HORAS	158006451.61290	279045781.113045	31

5.5 Test HSD (Honestly-Significant-Difference) de Tukey

Para el caso de los grupos de experimentación y/o las variables de estudio, se utilizó el componente Post Hoc, con El Test HSD (Honestly-significant-difference) de Tukey, es un test que trata de perfilar una hipótesis alternativa genérica (Soporte Minitab, 2017). Para la interpretación de los resultados en HSD Tukey, se aplicó la regla de decisión de sig que se utilizó en Pearson “*si el valor de sig < 0.5, se valida la hipótesis alternativa*”

Tabla 3 Comparaciones múltiples - HSD TUKEY

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) GRUPO DE EXPERIMENTACIÓN	(J) GRUPO DE EXPERIMENTACIÓN	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
NÚMERO DE LEVADURAS A 1 HORA	HSD Tuke 10% y	ACEITE ESENCIAL	6594166.66667	33013482.785275	.978	-75092753.09255	88281086.42589
		CREMA GRUPO CONTROL	-48790119.04762	38459543.555218	.424	-143952500.69650	46372262.60127
		ACEITE ESENCIAL	-6594166.66667	33013482.785275	.978	-88281086.42589	75092753.09255
		CREMA GRUPO CONTROL	-55384285.71429	38459543.555218	.335	-150546667.36317	39778095.93460
		CREMA GRUPO CONTROL	48790119.04762	38459543.555218	.424	-46372262.60127	143952500.69650

		ACEITE ESENCIAL	55384285.7142 9	38459543.55521 8	.33 5	- 39778095.9346 0	150546667.363 17
NÚMERO DE LEVADUR AS A 3 HORAS	HSD Tuke 10% y	EXTRACTO AL ACEITE ESENCIAL	- 317916666.666 67*	109991042.6805 50	.02 0	- 590073031.874 11	- 45760301.4592 2
		CREMA GRUPO CONTROL	- 437488095.238 10*	128135686.9909 89	.00 5	- 754540665.837 95	- 120435524.638 25
		ACEITE ESENCIAL	317916666.666 67*	109991042.6805 50	.02 0	45760301.4592 2	590073031.874 11
		CREMA GRUPO CONTROL	- 119571428.571 43	128135686.9909 89	.62 4	- 436623999.171 28	197481142.028 42
		CREMA GRUPO CONTROL	437488095.238 10*	128135686.9909 89	.00 5	120435524.638 25	754540665.837 95
		ACEITE ESENCIAL	119571428.571 43	128135686.9909 89	.62 4	- 197481142.028 42	436623999.171 28

NUMERO DE LEVADURAS A 24 HORAS	HSD Tuke y	EXTRACTO AL ACEITE ESENCIAL	171433333.333 33	90092640.21473 5	.15 7	- 51487414.5315 3	394354081.198 20
		CREMA GRUPO CONTROL	- 297547619.047 62*	104954749.6360 67	.02 2	- 557242431.244 00	- 37852806.8512 4
		ACEITE ESENCIAL	- 171433333.333 33	90092640.21473 5	.15 7	- 394354081.198 20	51487414.5315 3
		CREMA GRUPO CONTROL	- 468980952.380 95*	104954749.6360 67	.00 0	- 728675764.577 33	- 209286140.184 58
		CREMA GRUPO CONTROL	297547619.047 62*	104954749.6360 67	.02 2	37852806.8512 4	557242431.244 00
		ACEITE ESENCIAL	468980952.380 95*	104954749.6360 67	.00 0	209286140.184 58	728675764.577 33

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 48700102925170060.000.

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel .05.

Al realizar las comparaciones múltiples, según el Test HSD de Tukey, se demuestra que el valor de significancia que mejor cumple la regla de decisión es con los grupos de aceite esencial de romero y crema al 2% (grupo control) en relación con el número de levaduras crecidas a las 24 horas, seguido del extracto acuoso al 10%; lo que sintetiza que existe una mejor respuesta inhibitoria entre los grupos de estudio (eliminando el grupo control) del aceite esencial de romero sobre el extracto acuoso al 10%. Lo que permite concluir que se valida la hipótesis alternativa: *El aceite esencial de romero presenta mayor efecto inhibitorio en la formación de colonias de Cándida Álbicans que el extracto acuoso al 10%.*

5.6 Anova

Para determinar estadísticamente el porcentaje de efecto inhibitorio del aceite de romero sobre la formación de colonias de *Cándida Álbicans*, se aplica la Prueba ANOVA y la Prueba de Regresión Lineal, tomando en cuenta las variables y datos identificados como mejor respuesta, que para este caso son: aceite esencial de romero, crema al 2% y número de levaduras a las 24 horas, teniendo los siguientes resultados:

Tabla 4 Prueba ANOVA

ANOVA^a

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	8.656	3	2.885	4.493	.011 ^b
	Residuo	17.339	27	.642		
	Total	25.995	30			

a. Variable dependiente: ACEITE ESENCIAL DE ROMERO, CREMA AL 2%

b. Predictores: (Constante), NÚMERO DE LEVADURAS A 24 HORAS

En el cuadro de resultados del ANOVA, el valor del estadístico de prueba, **F=4,493**, es significativamente distinto de 1 para cualquier nivel de significación y, por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula de igualdad de medias y se acepta la hipótesis alternativa. En relación con el valor de **sig,=0.01** se demuestra que se cumple la regla de decisión por lo que se ratifica la conclusión en relación con la validación de hipótesis.

5.7 REGRESIÓN LINEAL MÚLTIPLE

Finalmente se utilizó la prueba de regresión lineal múltiple, es una técnica estadística utilizada para estudiar la relación entre variables cuantitativas. (Pérez 2011). De donde se tiene que:

Tabla 5 Regresión Lineal Múltiple

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado ajustado
1	.577 ^a	.333	.259

$R^2 = 0.333$ queda explicada en un 33.3% por las variables explicativas según el modelo lineal considerado

R^2 ajustado = 0.259 (siempre algo menor que R^2)

De donde, se deduce que: El *aceite esencial de romero* presenta mayor efecto inhibitorio en la formación de colonias de *Cándida Álbicans* en un **25.9%** que el *extracto acuoso al 10%*.

6. Resultados

6.1 Estadística gráfica

Al realizar el análisis estadístico gráfico se aplica el Gráfico de Cajas en relación del promedio inicial versus el resultado a las 24 horas de los tres grupos de estudio:

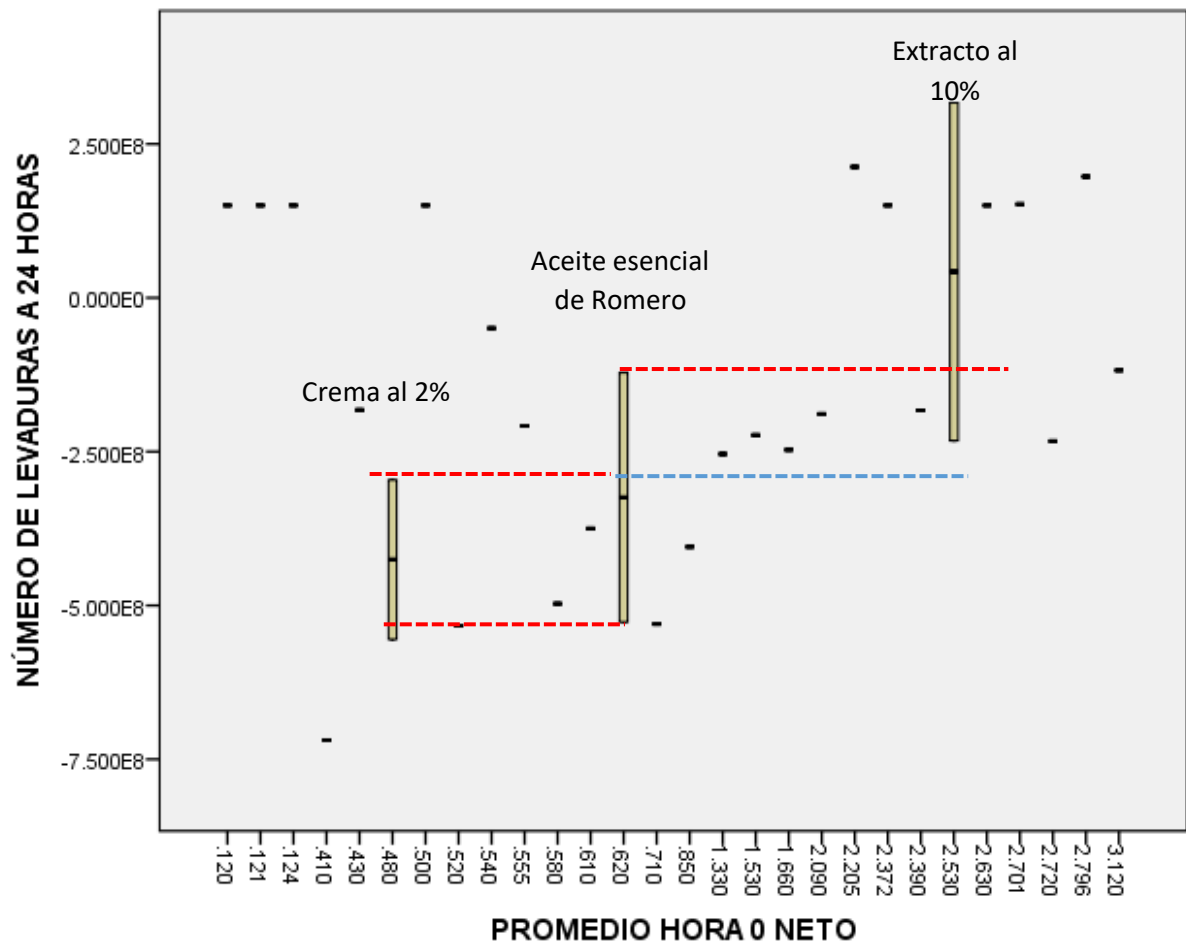


Figura 24: gráfico de cajas.

El aceite esencial y extracto acuoso al 10% de romero no inhiben por completo la formación de colonias de *C. Álbicans*, lo cual se puede apreciar mediante observación directa de la placa de 96 pocillos en los cuales se presentó una clara turbidez (que indica crecimiento del microorganismo) dentro de los pocillos con los líquidos objeto de estudio.

Al realizar el análisis estadístico se obtuvo que, el grupo control crema clotrimazol al 2% presenta la mejor respuesta inhibitoria; luego se posiciona aceite esencial de Romero sobre el extracto al 10% con una relación porcentual baja como se refleja en el gráfico de 25.9%.

7. Discusión

La estomatitis subprotésica es una patología resultante de la confluencia de varios factores, entre ellos una prótesis mal adaptada, higiene bucal y protésica defectuosas, que contribuyen al alojamiento y desarrollo de agentes patógenos, como la *Cándida Álbicans* que es considerada también como uno de los agentes etiológicos de la estomatitis, ya que es el microorganismo que se encuentra con más frecuencia en la superficie de las prótesis que contactan directamente con la mucosa bucal, (AlTarawneh et. al., 2013); (Iseri et. al., 2011).

Un método de limpieza ideal de las prótesis no debe alterar sus propiedades físicas y mecánicas, tampoco su color y estabilidad dimensional a más de poseer un efecto bactericida y fungicida (Papadiochou, Polyzois 2017); (Iseri et. al., 2000) señala que el uso de agentes limpiadores químicos ofrece resultados más efectivos.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la investigación el aceite esencial de romero presenta mayor efecto inhibitorio en la formación de colonias de *Cándida Álbicans* en un 25.9% que el extracto acuoso al 10%, a diferencia del estudio de (Jiang et. al 2011) donde se encontró que el aceite esencial de romero fue el más activo contra todos los cepas bacterianas estudiadas (*S. epidermidis*, *S. aureus* y *B. subtilis*), Gram negativos (*P. vulgaris*, *P. aeruginosa* y *E. coli*) y hongos (*C. albicans*), mostrando una marcada actividad antifúngica contra *Candida albicans*.

Los resultados de este estudio concuerdan con (Sepehri et.al, 2016) quienes indican que el extracto acuoso de hoja de *R. officinalis* no fue activo contra cepas de *C. albicans*, sin embargo, los extractos etanólicos mostraron buenos efectos inhibitorios contra la mayoría de las cepas de *C. albicans*.

Esta investigación se dirigió al uso de extracto acuoso y aceite esencial de romero, sin ninguna solución añadida ya que como mencionan Solano et. al., (2016) la mayoría de ensayos microbiológicos los realizan con soluciones extractoras de alcohol o etanol, que puede influir en la verdadera actividad

antimicrobiana de esta especie vegetal, tal como lo manifiestan (Araújo-Silva, et, al., 2008) en su investigación, que se ha confirmado que el extracto etanólico de romero posee amplia actividad antimicrobiana frente a un sin número de bacterias orales.

(Carvalho et. al., 2012) indican que de los aceites esenciales estudiados, los de canela, laurel y menta podrían ser una alternativa viable contra *C. Albicans* usados solos o combinados con agentes antifúngicos.

8. Conclusiones y recomendaciones

8.1 Conclusión

- El aceite esencial de Romero presenta eficacia del 25.9% en la inhibición de *C. Albicans* sobre el extracto al 10%.

8.2 Recomendaciones

- Instruir a los pacientes sobre técnicas de limpieza y cuidado de sus prótesis, recalcar que además de la limpieza convencional es necesario someterlas a desinfecciones periódicas, así como recomendar su cambio al menos cada 5 años como lo indica la literatura.
- Continuar en la investigación de propiedades antifúngicas de sustancias de origen natural ya que cada vez se evidencia más casos de microorganismos resistentes a compuestos sintéticos; tomando en cuenta que las sustancias investigadas no posean soluciones extractoras de alcohol o etanol ya que estos compuestos pueden alterar las propiedades antifúngicas reales de las sustancias investigadas.

Referencias

- AlTarawneh, S., Bencharit, S., Mendoza, L., Curran, A., Barrow, D., Barros, S., Preisser, J., Loewy, Z., Gendreau, L., and Offenbacher, S. (2013). Clinical and histological findings of denture stomatitis as related to intraoral colonization patterns of *C. albicans*, salivary flow, and dry mouth. *Journal of Prosthodontic*. January. 22(1):13–22. doi:10.1111/j.1532-849X.2012.00906.x.
- Alonso, J.R. (2004). Tratado de Fitofármacos y Nutraceuticos, 2a. ed., Corpus, Buenos Aires:545.
- Ambrose, D., Manickavasagan, A., Naik, R. (2016). Leafy Medicinal Herbs. CABI, London.
- Araújo-Silva M, Silva M, Higinio J, Vieira-Pereira M, Carvalho A. (2008). Actividade antimicrobiana e antiaderente in vitro do extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. sobre bactérias orais plactonicas. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 18(2): 236-240.
- Avila-Sosa R, Navarro-Cruz A, Vera-López O, Dávila-Márquez R, Melgoza-Palma N, Meza-Pluma R. (2011). Romero (*Rosmarinus officinalis* L.): una revisión de sus usos no culinarios. *Ciencia y Mar*. 15(43): 23-36.
- Barata D, Durán A, Carrillo S. (2002). Estomatitis Protésica. Aspectos clínicos y tratamiento. *Prof. Dent*. 5(10):622-627.
- Borges, R., Ortiz, B., Pereira, A., Keita, H., Carvalho, J. (2019). *Rosmarinus officinalis* Essential oil: A review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved *J etnofarmacol*. 229: 29-45. doi: 10.1016 / j.jep.2018.09.038.
- Borrás-Linares, I., Stojanovic, Z., Quirantes P., R., Arráez-Román, D., Svarc-Gajjié, J. Fernández-Gutiérrez, A., Segura-Carretero, A. (2014). *Rosmarinus officinalis* leaves as a natural source of bioactive compounds. *Int. J. Mol. Sci*. 15, 20585–20606. <https://doi.org/10.3390/ijms151120585>.
- Brochot A, Guilbot A, Haddioui L, Roques C. (2014). Antibacterial, antifungal, and antiviral effects of three essentialoil blends. *MicrobiologyOpen*.;6:e459. <https://doi.org/10.1002/mbo3.459>.

- Carvalhinho, S., Costa, AM, Coelho, AC, Martins, E. y Sampaio, A. (2012). Las susceptibilidades de *Candida albicans* se aíslan de la boca a agentes antifúngicos, aceites esenciales y enjuagues bucales. *Mycopathologia*, 174 (1), 69–76. doi: 10.1007 / s11046-012-9520-4.
- Cleveland, A.A., Harrison, L.H., Farley, M.M., Hollick, R., Stein, B., Chiller, T.M., Lockhart, S.R. and Park, B.J. (2015) Declining incidence of candidemia and the shifting epidemiology of *Candida* resistance in two US metropolitan areas, 2008–2013: results from population based surveillance. *PLoS One* 10:1–12.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2018) Microbiology manual.
- Coulthwaite, L., Verran, J. (2007). Potential pathogenic aspects of denture plaque. *British Journal of Biomedical Science*. 64(4):180-9.
- Coy, C., Acosta, E., (2013). Actividad antibacteriana y determinación de la composición química de los aceites esenciales de romero (*Rosmarinus officinalis*), tomillo (*Thymus vulgaris*) y cúrcuma (*Curcuma longa*) de Colombia. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 18(2):237-246.
- de Melo, G.A.N., Grespan, R., Fonseca, J.P., Farinha, T.O., Silva, E.L., Romero, A.L., Bersani-Amado, C.A., Cuman, R.K.N. (2011). *Rosmarinus officinalis* L. Essential Oil Inhibits In Vivo and In Vitro Leukocyte Migration. *J. Med. Food* 14, 944–946. <https://doi.org/10.1089/jmf.2010.0159>.
- Di Oliveira, J., de Jesus, D., Figueira, L., de Oliveira, F., Pacheco Soares, C., Camargo, S., Jorge, A., de Oliveira, L., (2017). Biological activities of *Rosmarinus Officinalis* L. (rosemary) extract as analyzed in microorganisms and cells. *Experimental Biology and Medicine*. 242(6): 625–634. doi: 10.1177/1535370216688571.
- Ercalik-Yalcinkaya, S., Özcan, M. (2014). Association between oral mucosal lesions and hygiene habits in a population of removable prosthesis wearers. *Journal of Prosthodontics*. 24(4):271–278. doi: 10.1111/jopr.12208.
- Fu, Y., Zu, Y., Chen, L., Shi, X., Wang, Z., Sun, S., y Efferth, T. (2007). *Actividad antimicrobiana de aceites esenciales de clavo y romero solos y en*

combinación. *Phytotherapy Research*, 21 (10), 989–994. doi: 10.1002 / ptr.2179.

Gauch, L., Silveira, F., Esteves, R., Pedrosa, S., Gurgel, E., Arruda, A., Marques-da-Silva, S. (2014). Effects of *Rosmarinus officinalis* essential oil on germ tube formation by *Candida albicans* isolated from denture wearers *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 47(3):389-391. doi.org/10.1590/0037-8682-0137-2013 S.

Höfling J, Anibal P, Obando-Pereda G, Peixoto I, Furletti V, Foglio M, Gonçalves R. (2010). Potencial antimicrobiano de algunos extractos de plantas contra especies de *Candida*. *Revista Brasileira de Biología*. 70(4). doi.org/10.1590/S1519-69842010000500022.

Inoue, K.I., Takano, H., Shiga, A., Fujita, Y., Makino, H., Yanagisawa, R., Ichinose, T., Kato, Y., Yamada, T., Yoshikawa, T. (2005). Effects of volatile constituents of a rosemary extract on allergic airway inflammation related to house dust mite allergen in mice. *Int. J. Mol. Med*. 16, 315–319.

Iseri, U., Uludamar, A., Kulak, Y. (2011). Effectiveness of different cleaning agents on the adherence of *Candida albicans* to acrylic denture base resin. *Gerodontology*. 28(4):271–276. doi: 10.1111/j.1741-2358.2010.00379.x.

Jiang, Y., Wu, N., Fu, Y., Wang, W., Luo, M., Zhao, C., Zu, Y., Liu, X. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. *Environmental toxicology and pharmacology*. 32:63–68. doi:10.1016/j.etap.2011.03.011.

Jørgensen, E. (2000). Ecology of *Candida*-associated Denture Stomatitis. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 12(3):170–185. doi.org/10.1080/089106000750051846.

La actividad antifúngica del clotrimazol contra *Candida albicans* depende de las fuentes de carbono, la fase de crecimiento y la morfología.

Kasper L, Miramón P, Jablonowski N, Wisgott S, Wilson D, Brunke S, Hube B. (2015). Antifungal activity of clotrimazole against *Candida albicans*

depends on carbon sources, growth phase and morphology. *J Med Microbiol.* 64(7): 714-23. Doi: 10.1099 / jmm.0.000082.

Ksouri, S., Djebir, S., Bentorki, AA, Gouri, A., Hadeif, Y., y Benakhla, A. (2017). Actividad antifúngica del extracto de aceites esenciales de *Origanum floribundum* Munby, *Rosmarinus officinalis* L. y *Thymus ciliatus* Desf. contra *Candida albicans* aislada de mastitis clínica bovina. *Journal de Mycologie Médicale*, 27 (2), 245–249. doi: 10.1016 / j.mycmed.2017.03.004.

Kuriyama, T., Williams, DW, Bagg, J., Coulter, WA, Ready, D., y Lewis, MAO (2005). *Susceptibilidad in vitro de Candida oral a siete agentes antifúngicos.* *Microbiología Oral e Inmunología*, 20 (6), 349–353. doi: 10.1111 / j.1399-302x.2005.00236.x

Lax, V. (2014). Estudio de variabilidad química, propiedades antioxidantes y biocidas de poblaciones espontáneas de *Rosmarinus officinalis*. Universidad de Murcia.

Mandras N, Nostro A, Roana J, Scalas D, Banche G, Ghisetti V, Del Re S, Fucale G, Cuffini A and Tullio V. (2016). Liquid and vapour-phase antifungal activities of essential oils against *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida*. *BMC Complementary and Alternative Medicine.* 16(330) DOI 10.1186/s12906-016-1316-5.

Marchiori, V.F. (2004). *Rosmarinus officinalis*. Fundação Herbarium.

McFarland Turbidity Estándar N° 05. (2005). Patrón de turbidez BBL preparado. Dickinsons and company.

MIC testing (2012). Método de Determinación de Sensibilidad Antimicrobiana por Dilución. Clinical and Laboratory Standards Institute. 32(2).

Milward P, Katechia D, Morgan M.Z. (2013). Knowledge of removable partial denture wearers on denture hygiene. *British Dental Journal.* 215:20. doi: 10.1038/sj.bdj.2013.1095.

- Mojarad, N., Khalili, Z., Aalaei, S. (2017). A comparison of the efficacy of mechanical, chemical, and microwave radiation methods in disinfecting complete dentures. *Dental Research Journal*. 14 (2):131-136.
- O'Donnell, L., Smith, K., Williams, C., Nile, C., Lappin, D., Bradshaw, D., Lambert, M., Robertson, D., Bagg, J., Hannah, V., Ramage, G. (2016). dentures are a reservoir for respiratory pathogens. *Journal of Prosthodontics*. 25(2):99-104. doi: 10.1111/jopr.12342.
- Papadiochou, S., Polyzois, G. (2017). Hygiene practices in removable prosthodontics: A systematic review. *International Journal of Dental Hygiene*. 16(2):179-201. doi: 10.1111/idh.12323.
- Pérez, C. (2011). *Técnicas estadísticas con SPSS*. Ed. Prentice Hall.
- Pozzatti, P., Scheid, LA, Spader, TB, Atayde, ML, Santurio, JM, y Alves, SH (2008). *Actividad in vitro de aceites esenciales extraídos de plantas utilizadas como especias contra Candida spp. Resistente a fluconazol y susceptible a fluconazol*. *Canadian Journal of Microbiology*, 54 (11), 950–956. doi: 10.1139 / w08-097
- Przybyłowska, D., Nastalska, L., Kope, E., Rubinsztajn, R., Chazan, R. (2014). Potential respiratory pathogens colonisation of the denture plaque of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Gerodontology*. 33(3):322-7. doi: 10.1111/ger.12156.
- Radaelli M, da Silva B, Weidlich L, Hoehne L, Flach A, da Costa L, y Ethur E. (2016). Antimicrobial activities of six essential oils commonly used as condiments in Brazil against *Clostridium perfringens*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(2):424–430. <http://doi.org/10.1016/j.bjm.2015.10.001>.
- Ramage, G., Zalewska, A., Cameron, D., Sherry, L., Murray, C., Finnegan, M., Loewy, Z., Jagger, D. (2012). A comparative in vitro study of two denture cleaning techniques as an effective strategy for inhibiting *Candida albicans* biofilms on denture surfaces and reducing inflammation. *Journal of Prosthodontics*. 21(7):516-22. doi: 10.1111/j.1532-849X.2012.00865.x.
- Rašković, A., Milanović, I., Pavlović, N., Čebović, T., Vukmirović, S., Mikov, M. (2014). Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.)

- essential oil and its hepatoprotective potential. *BMC Complement. Altern. Med.* 14, 1–9.
- Riquelme, M. (11 de mayo de 2018). *¿Qué Es Y Cómo Se Interpreta El Coeficiente De Correlación De Pearson?* Recuperado el 15 de mayo de 2019, de <https://www.webyempresas.com/coeficiente-de-correlacion-de-pearson/>.
- Rodríguez, M., Portillo, A., Lama, E., Hernández, S. (2014). Lesiones bucales asociadas con el uso de prótesis en pacientes de la comunidad de Kantunil, Yucatán. *Revista ADM.* 71(5): 221-225.
- Sepehri, Z., Javadian, F., Khammari, D., Hassanshahian, M. (2016). Antifungal effects of the aqueous and ethanolic leaf extracts of *Echinophora platyloba* and *Rosmarinus officinalis*. *Current Medical Mycology*, 2(1):305. <http://doi.org/10.18869/acadpub.cmm.2.1.30>.
- Shi, B., Wu, T., McLean, J., Edlund, A., Young, Y., He, X., Lv, H., Zhou, X., Shi, W., Li, H., Lux, R. (2016). The denture-associated oral microbiome in health and stomatitis. *mSphere.* 1(6):215-216. doi: 10.1128/mSphere.00215-16.
- Schiller, C., Schiller, D. (2008). *The Aromatherapy Encyclopedia*. Basic Health Publications, INC., Laguna Beach.
- Solano, X., Moya, T., Zambrano, M. (2016). Inhibición del *Streptococcus mutans*, mediante el uso de extracto acuoso y oleoso de *Rosmarinus officinalis* “romero”. *Revista “ODONTOLOGÍA”.* 19(2):29-34.
- Soporte Minitab. (2017). *¿Qué es el método de Tukey para comparaciones múltiples?* Recuperado el 14 de mayo de 2019, de <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/18/help-and-how-to/modeling-statistics/anova/supporting-topics/multiple-comparisons/what-is-tukey-s-method/>.
- Takaki, I., Bersani-Amado, L.E.E., Vendruscolo, A., Sartoretto, S.M.M., Diniz, S.P.P., Bersani-Amado, C.A.A., Cuman, R.K.N.K. (2008). Anti-Inflammatory and Antinociceptive Effects of *Rosmarinus officinalis* L. Essential Oil in Experimental Animal Models. *J. Med. Food* 11, 741–746. <https://doi.org/10.1089/jmf.2007.0524>.

ANEXOS

INFORME DE IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA



INABIO
Instituto Nacional de Biodiversidad

HERBARIO NACIONAL DEL ECUADOR (QCNE)

Dir.: Avenida Río Coca, E6-115 e Isla Fernandina. Telf.: (593-2) 2441-592

INFORME DE IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA

SOLICITANTE: María Fernanda Montúfar Guachilema

FECHA: 19/09/2018

Nº	FAMILIA	ESPECIE	OBSERVACIONES
1	Lamiaceae	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Origen y distribución: Subarbusto introducido y cultivado en los Andes. 2000-3000 m.

Total de muestras botánicas identificadas: 1

Fuente para identificación, nomenclatura e información:

1. Especímenes botánicos conservados en el Herbario QCNE
2. <http://plants.jstor.org/>
3. <http://www.tropicos.org>.
4. Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador 1999, 2004, 2011

Identificación realizada por: Dra. Diana Fernández, Curadora del Herbario Nacional QCNE

Firma:



CERTIFICACIÓN MICROBIOLOGICS



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: <i>Candida albicans</i> Catalog Number: 0443 Lot Number: 443-860** Reference Number: ATCC® 10231™* Purity: Pure Passage from Reference: 3	Expiration Date: 2020/4/30 Release Information: Quality Control Technologist: Christine Condon Release Date: 2018/5/30
---	--

Macroscopic Features: Small to medium, white, circular, convex, dull colonies. Microscopic Features: Gram positive, ovoidal, budding yeast cells.	Performance Medium: Nutrient Method: Gram Stain (1)
ID System: MALDI-TOF (1) See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results (1) Germ Tube Test: positive (1) Chlamydospore production: positive <div style="text-align: right;"> Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE </div>

**Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.

⚠ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.

(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.



Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results



Meaning of Score Values

Range	Interpretation	Symbols	Color
2.00 - 3.00	High-confidence identification	(+++)	green
1.70 - 1.99	Low-confidence identification	(+)	yellow
0.00 - 1.69	No Organism Identification Possible	(-)	red

Meaning of Consistency Categories (A - C)

Category	Interpretation
(A)	High consistency: The best match is a high-confidence identification. The second-best match is (1) a high-confidence identification in which the species is identical to the best match, (2) a low-confidence identification in which the species or genus is identical to the best match, or (3) a non-identification.
(B)	Low consistency: The requirements for high consistency are not met. The best match is a high- or low-confidence identification. The second-best match is (1) a high- or low-confidence identification in which the genus is identical to the best match or (2) a non-identification.
(C)	No consistency: The requirements for high or low consistency are not met.

Sample Name: Candida albicans
 Sample Description: 0443
 Sample ID: 443-860
 Sample Creation Date/Time: 2018-05-24T13:19:33.672KN
 Applied MSP Library(ies): BDAL, Mycobacteria Library (bead method), Filamentous Fungi Library 1.0, Listeria

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value
A10 (+++)(B)	443-860	Candida albicans	2.07

Comments:

N/A

BASE DE DATOS DE SPSS

GRUPO	HORA0	HORA1	HORA3	HORA24	INICIAL	LEV1H	LEV3H	LEV24H
EXTRACTO AL 10%	.120	.130	.126	.124	.120	150000000...	150000000...	150000000...
EXTRACTO AL 10%	.620	.740	.930	1.031	.120	-35700000...	-92200000...	-12200000...
EXTRACTO AL 10%	2.630	2.630	2.630	2.630	2.620	150000000...	150000000...	150000000...
EXTRACTO AL 10%	3.120	3.331	3.370	3.533	2.600	-60000000...	-31300000...	-11800000...
EXTRACTO AL 10%	2.720	2.984	3.060	3.332	2.320	-10100000...	-13000000...	-23300000...
EXTRACTO AL 10%	2.530	2.739	2.754	3.132	2.150	-79800000...	-54900000...	-23200000...
EXTRACTO AL 10%	2.390	2.419	2.425	3.125	1.780	-7710000.0...	-28900000...	-18300000...
EXTRACTO AL 10%	2.090	2.259	2.332	2.770	1.540	-47500000...	-76600000...	-18900000...
EXTRACTO AL 10%	1.660	1.690	1.696	2.400	1.210	-10000000...	-45100000...	-24700000...
EXTRACTO AL 10%	1.530	1.550	1.552	2.149	1.110	-8960000.0...	-92600000...	-22300000...
EXTRACTO AL 10%	1.330	1.360	1.367	1.956	.960	-12200000...	-61600000...	-25400000...
EXTRACTO AL 10%	.850	.945	.955	1.645	.550	-50600000...	-11300000...	-40500000...
ACEITE ESENCIAL	.121	.117	.117	.010	.116	150000000...	150000000...	150000000...
ACEITE ESENCIAL	.540	.640	.840	.980	.119	-35600000...	-10700000...	-49200000...
ACEITE ESENCIAL	.500	.500	.510	.510	.488	150000000...	150000000...	150000000...
ACEITE ESENCIAL	.710	.810	1.020	1.400	.457	-59300000...	-18400000...	-53000000...
ACEITE ESENCIAL	.620	.720	.950	1.235	.396	-67000000...	-22100000...	-52700000...
ACEITE ESENCIAL	.580	.610	.800	1.302	.335	-18400000...	-13500000...	-49700000...
ACEITE ESENCIAL	.610	.720	.920	1.317	.318	-56400000...	-15900000...	-37500000...
ACEITE ESENCIAL	.520	.630	.810	1.353	.277	-67800000...	-17900000...	-53300000...
ACEITE ESENCIAL	.480	.510	.690	1.363	.241	-18800000...	-13200000...	-55500000...
ACEITE ESENCIAL	.410	.520	.650	1.376	.208	-81500000...	-17800000...	-71900000...
ACEITE ESENCIAL	.480	.530	.610	1.269	.161	-23500000...	-61100000...	-29600000...
ACEITE ESENCIAL	.430	.550	.600	.900	.150	-64300000...	-91100000...	-18200000...
CREMA GRUPO CONTROL	.124	.132	.130	.129	.119	150000000...	150000000...	150000000...
CREMA GRUPO CONTROL	.555	.768	.941	1.162	.117	-73200000...	-13300000...	-20800000...
CREMA GRUPO CONTROL	2.372	2.372	2.371	2.365	2.358	150000000...	150000000...	150000000...
CREMA GRUPO CONTROL	2.796	2.796	2.796	2.223	2.360	.000	.000	197000000...
CREMA GRUPO CONTROL	2.701	2.707	2.730	2.263	2.270	-2260000.0...	-10300000...	152000000...
CREMA GRUPO CONTROL	2.530	2.510	2.615	1.541	2.062	6400000.000	-27200000...	317000000...
CREMA GRUPO CONTROL	2.205	2.060	2.080	1.510	1.716	44400000...	38300000...	213000000...

