



“EFECTO ANTIFUNGICO *In Vitro* DEL ACEITE
ESENCIAL DE *Syzygium aromaticum* (Clavo de
Olor) SOBRE *Candida albicans*”

TESIS PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE
CIRUJANO DENTISTA

BACHILLER

CARLOS MANUEL VIZCARRA DELGADO

TACNA-PERU

2017

“EFECTO ANTIFUNGICO *In Vitro* DEL ACEITE ESENCIAL DE
Syzygium aromaticum (Clavo de Olor) SOBRE ***Candida***
albicans”.

Esta tesis fue evaluada y aprobada para la obtención del título de Cirujano
Dentista por la Universidad Alas Peruanas.

Mg. ALONSO ERNESTO ALCAZAR ROJAS

C.D. FRANCISCO ALFREDO GONGORA QUISPE

C.D. JANETT CLARISA USCAMAITA GUZMAN

DEDICATORIA

A Dios, por darme fuerzas para seguir adelante y perseverancia para no rendirme frente a las adversidades.

A mis Padres Carlos y Jhoicy, por el apoyo incondicional en todo momento.

A mi hermana Irma, por sus constantes recomendaciones y consejos para mejorar como persona y como profesional.

AGRADECIMIENTO

A Dios, por darme fuerzas para seguir adelante y perseverancia para no rendirme frente a las adversidades.

A mis padres, hermana y familia en general, por el apoyo constante y fuerzas para continuar y poder lograr mis objetivos.

A mi asesor Mblgo. Pablo Vicente Calderón por el tiempo brindado para poder realizar el presente trabajo, paciencia, apoyo constante y su valiosa asesoría.

RECONOCIMIENTO

La realización de esta investigación de tesis fue posible, en primer lugar, a la cooperación brindada por el C.D Alfredo Góngora Quispe, Director de escuela de Ciencias de Salud escuela profesional de Estomatología filial Tacna, infinitas gracias. De igual manera al asesor por su disposición y confianza, que sin él no se hubiera podido recolectar los datos necesarios para el estudio.

Se agradece además al Mblgo. Edwin Denis Obando Velarde, coordinador del laboratorio de microbiología de la Universidad Jorge Basadre Grohmann por su cooperación al facilitarme los ambientes, instrumental y materiales del laboratorio para poder realizar el presente estudio.

Se agradece a todas aquellas personas que en forma directa o indirecta contribuyeron a que este trabajo de investigación pudiera llevarse a cabo. Por ultimo un agradecimiento a mi familia, por su constante paciencia y apoyo que siempre demostraron.

RESUMEN

Objetivo: Determinar la acción antifúngica *In Vitro* del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* “clavo de olor” frente a *Candida albicans* ATCC 90028.

Metodología: Se obtuvo el aceite esencial de *Syzygium Aromaticum* “clavo de olor” mediante la destilación por arrastre de vapor. Se utilizó los métodos de: a) Kirby Bauer, para determinar el grado de sensibilidad en función al tamaño de los halos de inhibición, b) Concentración mínima inhibitoria (CIM) C) Concentración mínima Fungicida (CMF).

Resultados: Se demostró que *Candida Albicans* presenta alta sensibilidad al aceite esencial. La CMI para *Candida Albicans* fue de 31.598 mg/ul. Y la CMF fue de 34.7578 mg/ul.

Conclusión: El Aceite esencial de *Syzygium Aromaticum* “clavo de olor” si presenta acción antifúngica *In Vitro* frente a *Candida Albicans*.

ABSTRACT

Objective: To determine the antifungal action *In Vitro* of the essential oil of *Syzygium aromaticum* "clove" against *Candida albicans* ATCC 90028.

Methodology: The essential oil of *Syzygium aromaticum* "clove" was obtained by steam distillation. We used the following methods: a) Kirby Bauer, to determine the degree of sensitivity as a function of the size of the inhibition halos, b) Minimum inhibitory concentration (MIC) C) Minimum concentration Fungicide (MCF).

Results: It was demonstrated that *Candida albicans* presents high sensitivity to essential oil. The MIC for *Candida albicans* was 31.598 mg/ul and the CMF was 34.7578 mg/ul.

Conclusion: The essential oil of *Syzygium aromaticum* "clove" if it presents antifungal action *In Vitro* against *Candida albicans*.

INDICE

DEDICATORIA.....	3
AGRADECIMIENTO.....	4
RECONOCIMIENTO.....	5
RESUMEN.....	6
ABSTRACT.....	7
INDICE.....	8
INTRODUCCION.....	12

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Planteamiento del Problema.....	13
1.2. Formulación del Problema.....	14
1.2.1. Problema Principal.....	14
1.2.2. Problemas Secundarios.....	14
1.3. Objetivo de la Investigación.....	15
1.3.1. Objetivo General.....	15
1.3.2. Objetivos Específicos.....	15
1.4. Justificación e Importancia de la Investigación.....	16

CAPITULO II
MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la Investigación.....	17
2.2. Bases Teóricas.....	29
2.2.1. Aceites Esenciales.....	29
2.2.2. Syzygium Aromaticum “Clavo de Olor”.....	33
2.2.3. Hongos.....	35
2.2.4. Candida Albicans.....	39
2.2.5. Candidiasis.....	43
2.3 Definición de Términos Básicos.....	46
2.4. Hipótesis de Investigación.....	48
2.4.1. Hipótesis General.....	48
2.4.2. Hipótesis Secundarias.....	48
2.5. Identificación y Clasificación de Variables.....	48

CAPITULO III
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACION

3.1. Diseño de Investigación.....	49
3.1.1. Tipo de Estudio.....	49
3.1.2. Nivel de Investigación.....	49
3.2. Descripción del ámbito de Investigación.....	49
3.3. Métodos de Investigación.....	49
3.3.1. Diseño experimental.....	49
3.3.2. Syzygium Aromaticum.....	50
3.3.3. Método de difusión de disco (Kirby Bauer).....	52
3.3.4. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).....	56
3.3.5. Determinación de la Concentración Mínima Fungicida (CMF).....	58

CAPITULO IV
PRESENTACION, ANALISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS

RESULTADOS.....	59
DISCUSIÓN.....	64
CONCLUSIONES.....	66
RECOMENDACIONES.....	67
FUENTES DE INFORMACIÓN.....	68
ANEXOS.....	71

INDICE DE TABLAS Y GRAFICOS

TABLA 1.

Concentraciones del Aceite Esencial *Syzygium aromaticum*.....55

TABLA 2.

Volúmenes para la Concentración Mínima Inhibitoria.....57

CUADRO 1.

Método de Difusión de Disco (Kirby Bauer).....60

CUADRO 2.

Concentración Mínima Inhibitoria.....62

GRAFICO 2.

Concentración Mínima Inhibitoria.....62

CUADRO 3.

Concentración Mínima Fungicida.....63

GRAFICO 3.

Concentración Mínima Fungicida.....63

INTRODUCCION

En los últimos años se ha presentado un incremento en la incidencia de enfermedades fúngicas en los seres humanos (23); debido al aumento considerable de pacientes inmunocomprometidos, quimioterapia, nutrición parenteral, cirugía de trasplante y uso de agentes antimicrobianos de amplio espectro, agregados a la presencia de SIDA, donde estos se convierten en verdaderas “placas Petri vivientes”, quienes son altamente susceptibles a las infecciones oportunistas. Las infecciones fúngicas sistémicas y dérmicas son la causa de gran morbi-mortalidad en este tipo de pacientes. (24) Mientras que más del 50% los individuos aparentemente saludables hospedan a las cepas de *Candida* como componente normal de la microflora oral, sólo un grupo selecto desarrolla evidencia clínica de su patogenicidad. La cepa predominante y con mayor potencial de patogenicidad en el desarrollo de las infecciones orales es la *Candida albicans*, y se encuentra aislada en el 80% de las lesiones por *Candida*. La prevalencia reportada del microorganismo mencionado, se encuentra en un rango del 3% al 70% en bocas clínicas saludables, con una alta concurrencia en niños, jóvenes y pacientes inmunosuprimidos. Los fármacos disponibles actualmente, tienen una toxicidad importante, producen recurrencia o causan resistencia, razón por la cual se está procurando descubrir nuevos agentes antifúngico más potentes pero sobre todo seguros. (23). Los compuestos derivados de plantas son de interés en este contexto porque ellos comprenden alternativas más seguras y eficaces que los agentes antimicrobianos producidos sintéticamente, lo cual motiva a que estos compuestos naturales sirvan como base para el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos que sean más eficaces que los sintéticos. (25)

Debido a que en diversas investigaciones a nivel mundial se han establecido que muchas plantas aromáticas poseen actividad antibacteriana, antimicótica, antiparasitaria, antiviral e inclusive con efectos insecticidas (26); es que se desarrolla el presente trabajo de investigación a fin de determinar la actividad antifúngica *In Vitro* del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* “Clavo de Olor” frente a *Candida albicans ATCC 90028*; la cual servirá de base para futuros estudios.

CAPITULO I

PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. Planteamiento del Problema.

La frecuencia de infecciones invasoras causadas por *Candida* ha aumentado en forma importante en las últimas décadas, constituyendo actualmente la candidemia un importante agente de infección intrahospitalaria.

Esto se debe en gran parte a avances de la medicina, con la infección de nuevas modalidades terapéuticas. Algunas de ellas, como tratamientos antimicrobianos de amplio espectro, uso de alimentación parenteral, uso de catéteres intravenosos e intubación endotraqueal entre otros, son considerados factores de riesgo para esta infección. Con mayor frecuencia ocurren en pacientes que tienen condiciones de base tales como ser neonatos, prematurez, patología oncológica en quimioterapia, terapia inmunosupresora, ser sometidos a gran cirugía y estar afectados por enfermedades severas que requieren atención en una unidad de cuidados intensivos.(1)

De demostrarse que un producto natural derivado de una planta fuese más efectivo in vitro que uno sintético se convertirá en una excelente alternativa para ser utilizado in vivo, pues en las plantas los principios activos se hallan siempre biológicamente equilibrados por la presencia de sustancias complementarias, que van a potenciarse entre sí, de forma que en general no se acumulan en el organismo, y sus efectos indeseables están limitados. Sin embargo, a pesar que han aumentado las investigaciones científicas en este campo, todavía no se conocen todos los principios activos responsables de las propiedades de muchas plantas. (2)

Considerando que la incidencia por infección de *Candida* está elevándose, y la necesidad de tener alternativas terapéuticas con efectos eficaces y seguros como se les atribuye a las plantas medicinales a lo que se suma el uso empírico del clavo de olor para infecciones micóticas, debido a esto es que formulamos la siguiente problemática con la finalidad de aclarar su efectividad; a fin de emplear agentes antimicrobianos naturales y de esta manera reducir el uso y abuso de los fármacos tradicionales que muchas veces hacen resistencia por un mal empleo y producen daños en todo el organismo. (2)

1.2. Formulación del Problema

1.2.1. Problema Principal

¿Existirá efecto antifúngico *In Vitro* del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* “clavo de olor” sobre *Candida albicans* ATCC 90028?

1.2.2. Problemas Secundarios

- ¿Cuál es el grado de sensibilidad que presenta *Candida albicans* ATCC 90028 al Aceite esencial de *Syzygium aromaticum* “clavo de olor” mediante la técnica de difusión en disco?
- ¿Cuál es la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) del Aceite esencial de *Syzygium aromaticum* “clavo de olor” frente a *Candida albicans* ATCC 90028?
- ¿Cuál es la Concentración Mínima Fungicida (CMF) del Aceite esencial de *Syzygium aromaticum* “clavo de olor” frente a *Candida albicans* ATCC 90028?

1.3. Objetivo de la Investigación

1.3.1. Objetivo General

“Determinar el efecto antifúngico *In Vitro* del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* “clavo de olor” sobre *Candida albicans* ATCC 90028”.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Determinar el grado de sensibilidad que presenta la *Candida albicans* frente al aceite esencial de *Syzygium aromaticum* “clavo de olor” mediante la técnica de difusión en disco.
- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* “clavo de olor” frente a *Candida albicans* ATCC 90028.
- Determinar la Concentración Mínima Fungicida (CMF) del Aceite esencial de *Syzygium aromaticum* “clavo de olor” frente a *Candida albicans* ATCC 90028.

1.4. Justificación e Importancia de la Investigación

Las candidiasis generalmente causada por *Candida albicans*, es una patología que en la actualidad está aumentando y no solo en pacientes inmunocomprometidos, sino en todos aquellos en los que las circunstancias ambientales los exponen.

Existen dos tipos de tratamiento para combatir las enfermedades micóticas, el primero realizado mediante fármacos sintéticos, los cuales presentan ventajas que lamentablemente son opacadas por sus efectos indeseables (fiebre, escalofríos, alergias, toxicidad renal, etc.), por su difícil adquisición por toda la población debido a su costo y por la resistencia que presentan algunas cepas frente a los antifúngico. Existe otra opción de tratamiento, la cual proviene de productos naturales, los cuales son de más fácil adquisición, presentan principios activos equilibrados por lo cual no generan resistencia y sus efectos indeseables son limitados en comparación con los fármacos sintéticos.

En el campo Odontológico, se presenta como signo patognomónico la candidiasis en pacientes inmunocomprometidos, y también se presenta en pacientes portadores de prótesis ya sea debido a un mal ajuste o adaptación de las placas o por una mala higiene de éstas. Generalmente los pacientes portadores de prótesis totales son los adultos mayores los cuales debido a su edad presentan una respuesta inmunológica menos eficaz, a su vez, muchas veces dejan de lado su salud oral o desconocen los cuidados que se le deben de dar a las prótesis, lo cual los expone de manera directa a padecer esta patología. Por lo cual se procede a realizar la presente investigación, que pretende determinar la acción antifúngica *In Vitro* del Aceite Esencial de *Syzygium aromaticum* "clavo de olor" frente a la *Candida Albicans*, para así tener una alternativa natural para disminuir la tasa de morbilidad producida por *Candida albicans*.

CAPITULO II

MARCO TEORICO

2.1. Antecedentes de la Investigación

2.1.1. Título:

“EXTRACTOS Y ACEITE ESENCIAL DEL CLAVO DE OLOR (*Syzygium aromaticum*) Y SU POTENCIAL APLICACIÓN COMO AGENTES ANTIMICROBIANOS EN ALIMENTOS”

Autor: A.E. Aguilar-González y A. López-Malo

Año: 2013

Método: La aplicación de aceites esenciales de plantas y especias en distintos campos tales como gastronomía, medicina y en la industria de los alimentos es numerosa. El clavo de olor, *Syzygium aromaticum*, también conocido como *Eugenia caryophyllata*. Es una especia ampliamente usada y conocida. Su aceite esencial y extractos han sido analizados y caracterizados debido a que han demostrado tener amplio espectro de acción contra una gran variedad de microorganismos causantes de distintos padecimientos que afectan a humanos, animales y plantas.

Conclusión: El aceite esencial y los extractos de clavo poseen compuestos con una vasta y efectiva actividad antimicrobiana contra gran variedad de organismos, tanto bacterias, mohos y levaduras, la cual puede ser aprovechada dentro de los distintos campos de la industria alimentaria, y como una alternativa natural como desinfectante o como conservador.

2.1.2. Título:

“EFECTO INHIBIDOR DEL ACEITE ESENCIAL DE CLAVO DE OLOR “*Syzygium aromaticum*” COMO AGENTE ANTIMICROBIANO, SOBRE CEPAS DE *Streptococcus mutans*. ESTUDIO *In Vitro*”

Autor: Díaz Ortiz Verónica Consuelo, Muñoz Mora Jorge Eduardo

Año: 2016

Método: Se hizo pruebas microbiológicas en el laboratorio clínico, donde se utilizó la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 35668, que se sembró en placas Petri y se colocó discos de papel filtro embebidos de aceite esencial de clavo de olor a diferentes concentraciones como los son al 25%, 50%, 75% y 100%. Las cuales se incubó a 35°C +/- 2 por 24 horas. Trascurrido el tiempo se visualizó los resultados, en este caso los halos de inhibición alcanzaron un máximo de 22 mm de diámetro, medida muy buena para ser de origen natural. Es así como se comprobó que el aceite esencial de clavo de olor si inhibe a cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 35668.

Conclusión: El aceite de clavo de olor “*Syzygium aromaticum*” si inhibe al *Streptococcus mutans* mediante su efecto antimicrobiano, por ende servirá como base de productos para prevenir y controlar el proceso de caries dental.

2.1.3. Título:

“LA ACTIVIDAD INHIBIDORA DE *Syzygium aromaticum* Y *Cymbopogon citratus* (DC.) STAPF. ACEITES ESENCIALES CONTRA *Listeria monocytogenes* INOCULADAS EN CARNE MOLIDA BOVINA”

Autor: Tales Leandro Coutinho de Oliveira; María das Graças Cardoso; Rodrigo de Araújo Soares; Eduardo Mendes Ramos; Roberta Hilsdorf Piccoli; Victor Maximiliano Reis Tebaldi.

Año: 2013

Método: Esta investigación evaluó el efecto antimicrobiano del clavo (*Syzygium aromaticum*) y hierba de limón (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.). Aceites esenciales (AE) contra *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 crecimiento añadido a la carne molida bovina almacenado bajo refrigeración (5 ± 2 ° C) por tres días. Los AE, fueron extraídos por hidrodestilación y analizados por espectrometría de gas cromatografía de masas (GC-MS), se probaron in vitro usando una metodología de difusión en discos de agar para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC). Las concentraciones de MIC para ambos aceites esenciales en la cultura probados de *L. monocytogenes* fueron 1,56%. Las concentraciones de AE aplicados en la carne molida contaminada fueron 1,56, 3,125 y 6,25% en base a los niveles de MIC y posibles reducciones de actividad por constituyentes de los alimentos.

Conclusión: Las poblaciones de bacterias se redujeron significativamente ($p < 0,05$) después de un día de almacenamiento en muestras de carne molida tratadas con AE de clavo de olor y hierba de limón a concentraciones de 1,56%. No hubo recuentos significativos de *L. monocytogenes* en muestras en las otras concentraciones de los dos aceites aplicados después de que el segundo día de almacenamiento. La evaluación de aceptabilidad sensorial de las muestras de carne bovina molida tratadas con AE mostró que la adición a concentraciones mayores de 1,56% puede promover alteraciones indeseables de sabor, olor y color característico. La aplicación de los AE a bajas concentraciones en los productos alimenticios se puede utilizar en combinación con otros métodos de conservación, tales como la refrigeración, para controlar patógenos y bacterias de descomposición durante la vida útil; que va de acuerdo a las tendencias actuales del mercado, donde los consumidores están solicitando productos naturales.

2.1.4. Título:

“EVALUACION DE LA CAPACIDAD CONSERVANTE DE LOS ACEITES ESENCIALES DE CLAVO (*Syzygium aromaticum*) Y CANELA (*Cinnamomum verum*), SOBRE LA LEVADURA (*Rhodotorula mucilaginosa*) EN LECHE CHOCOLATADA”

Autor: María Victoria Castaño Sepúlveda

Año: 2012

Método: La investigación se desarrolló en tres etapas: inicialmente se obtuvieron los aceites esenciales utilizando la técnica de arrastre con vapor o hidrodestilación y se caracterizó su composición cualitativamente mediante cromatografía de gases – masa, para la segunda fase se evaluaron los aceites esenciales obtenidos mediante el método *In Vitro* para determinar la capacidad mínima inhibitoria comparados con un testigo comercial, y finalmente bajo los resultados anteriormente obtenidos, se determinó la dosis de aplicación dentro de la formulación para el producto lácteo (Leche chocolatada), evaluando su respuesta *In Vivo* y la aceptación por un panel sensorial de consumidores.

Conclusión: Los resultados obtenidos indican el efecto antimicrobiano de los AE de clavo y canela, puesto que en forma individual y en combinación al 50% produjeron acción antimicrobiana sobre la *Rhodotorula mucilaginosa*, lo que indica su potencial aplicación en la industria de alimentos, convirtiéndolos en una alternativa de conservación natural, cuyo uso ayudaría en la disminución de los riesgos toxicológicos aportados por el empleo de los conservantes artificiales o sintéticos.

2.1.5. Título:

“ACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE *Syzygium aromaticum* (L.) MERR. Y L.M.PERRY SOBRE LAS HIFAS DE ALGUNOS HONGOS FITOPATÓGENOS”

Autor: Costa, A.R.T.; Amaral, M.F.Z.J.; Martins, P.M.; Paula, J.A.M.; Fiuza, T.S.; Tresvenzol, L.M.F.; Paula, J.R.; Bara, M.T.F

Año: 2011

Método: Actualmente el uso de métodos alternativos para el control de enfermedades y plagas en la agricultura, con miras a minimizar los daños al medio ambiente ya la salud pública es una práctica reconocida y necesaria. Este trabajo tuvo como objetivo investigar la acción del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. Y L.M.Perry sobre el crecimiento micelial in vitro de los hongos fitopatógenos *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* y *Macrophomina phaseolina*. El análisis por cromatografía gaseosa acoplada con espectrometría de masa permitió la identificación de eugenol (83,6%), acetato de eugenila (11,6%) y cariofilo (4,2%).

Conclusión: La evaluación microscópica de los micelios de los hongos evidenció diversas alteraciones morfológicas, como la presencia de vacuolos, desorganización de los contenidos celulares, disminución en la nitidez de la pared celular, intensa fragmentación y menor turgencia de las hifas. El aceite esencial de clavo presentó actividad fungicida en la concentración de 0,15% sobre el crecimiento de *R. solani*, *F. oxysporum* y *F. solani*, sin embargo no demostró esa actividad sobre *M. phaseolina*. Estos resultados indican perspectivas favorables para posterior uso del aceite de clavo en el control de estos fitopatógenos en la agricultura.

2.1.6. Título:

“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA EN EL ACEITE ESENCIAL DE LA *Syzygium aromaticum* (L.) MEDIANTE EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE SU PRINCIPAL COMPONENTE EUGENOL”

Autor: Inder Singh Rana; Aarti Singh Rana, Ram Charan Rajak

Año: 2011

Método: El aceite de clavo se informa que tiene una fuerte actividad antifúngica frente a muchas especies de hongos. En este estudio hemos evaluado el potencial antifúngico de aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (L.) contra algunos hongos patógenos comunes de plantas y animales a saber, *Fusarium moniliforme* NCIM 1100, *Fusarium oxysporum* MTCC 284, *Aspergillus sp.*, *Mucor sp.*, *Trichophyton rubrum* y *Gypseum Microsporum*.

Conclusión: El estudio microscópico en el efecto de la fracción de aceite de clavo y la columna II en esporas de *Mucor sp.* y *M. gypseum* mostró distorsión y contracción mientras que estaba ausente en otras fracciones de la columna. Por lo tanto, se puede concluir que la acción antifúngica del aceite de clavo de olor se debe a su alto contenido de eugenol.

2.1.7. Título:

“INFLUENCIA DE DIFERENTES MÉTODOS DE ESTERILIZACIÓN SOBRE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS DE PLANTAS MEDICINALES”

Autor: Afortunados, LR; Bacchi, AML; Gavassoni, WL; Pontim, BCA

Año: 2010

Método: La presente investigación se llevó a cabo con el fin de evaluar la actividad antifúngica *In Vitro* de los extractos acuosos de *Allium sativum* (ajo), *Cinnamomum zeylanicum* (canela), *Syzygium aromaticum* (clavo India), sometido a diferentes procesos de desinfección y / o esterilización de desarrollo de *Fusarium solani*. El diseño experimental utilizado para cada experimento fue aleatorizado y 8 tratamientos con 5 repeticiones. El extracto acuoso a una se utilizaron concentración de 20%, sujeto a métodos de filtrado (FI), un baño de agua a 65 ° C en autoclave (BM) a 100 ° C (AT1), tratamiento en autoclave a 120 ° C (AT2) y el control (sólo BDA). Posteriormente los extractos se embebieron en medio PDA, pusieron en placas de Petri, que fueron transferidos de discos miceliales *F. solani* medición de 0,3 cm de diámetro. Después las placas se incubaron a 25 ° C con fotoperiodo de 12 horas. Los tratamientos se analizaron en relación con el crecimiento del micelio de la colonia, y el porcentaje de inhibición de la tasa de crecimiento de *F. solani*.

Conclusión: Se observó en todos los ensayos de crecimiento más hongos en el control, que muestra el potencial antifúngica de extractos. Se observó influencia de los métodos de esterilización sobre la eficacia de extractos de ajo y canela. Por FI ajo proporcionado los mejores resultados, mientras que para el extracto de canela, no hubo diferencias entre las metodologías FI, BM y AT1. Los diferentes métodos utilizados no afectaron a la eficiencia de extracto acuoso de clavo de India.

2.1.8. Título:

“ACTIVIDADES ANTI-INFLAMATORIAS Y ANTINOCICEPTIVAS DEL ACEITE ESENCIAL EUGENOL EN MODELOS ANIMALES EXPERIMENTALES”

Autor: Aparecido N. Daniel; Simone M. Sartoretto; Gustavo Schmidt; Silvana M. Caparroz-Assef; Ciomar A. Bersani-Amado; Roberto Kenji N. Cuman

Año: 2009

Método: El objetivo de este estudio se evaluó la actividad anti-inflamatoria y antinociceptivo de eugenol utilizado para los propósitos de odontología tras la administración oral en modelos animales *In Vivo*. La actividad anti-inflamatoria de eugenol se evaluó por volumen exudados y leucocitos migración inflamatoria en la pleuresía inducida por carragenina y pruebas de edema inducido por carragenina pata en ratas. La actividad antinociceptiva se evaluó usando las pruebas de retorcimiento y placa caliente inducida por ácido acético en ratones.

Conclusión: Eugenol (200 y 400 mg / kg) redujo el volumen de exudados pleurales sin cambiar los recuentos totales de leucocitos en la sangre. En dosis de 200 mg / kg, eugenol, inhibió el edema inducido por carragenina, 2-4 h después de la inyección del agente flogísticos. En la prueba de la placa caliente, la administración eugenol (100 mg / kg) mostró una actividad poco notable contra la reacción en tiempo-a la incomodidad, registrado como latencia de respuesta, que está bloqueado por la meperidina. Eugenol a dosis de 50, 75 y 100 mg / kg tuvo un efecto antinociceptivo significativo en la prueba de contorsión abdominal acético-inducida por ácido, en comparación con los animales de control. Los datos sugieren que eugenol posee actividades antinociceptivos y anti-inflamatorias.

2.1.9. Título:

“LA SINERGIA ENTRE EL EXTRACTO DE PLANTAS Y MEDICAMENTOS ANTIMICROBIANOS UTILIZADOS EN *Staphylococcus aureus* ENFERMEDADES”

Autor: Joyce Elaine Cristina Betoni; Rebeca Passarelli Mantovani; Lidiane Nunes Barbosa; Luiz Claudio Di Stasi; Ary Fernandes Júnior

Año: 2006

Método: El objetivo de este estudio fue verificar el sinergismo entre los 13 fármacos antimicrobianos y 8 extractos de plantas - "guaco" (*Mikania glomerata*), guayaba (*Psidium guajava*), clavo (*Syzygium aromaticum*), ajo (*Allium sativum*), hierba de limón (*Cymbopogon citratus*), jengibre (*Zingiber officinale*), "carqueja" (*Baccharis Trimeria*) y la menta (*Mentha piperita*) - contra cepas de *Staphylococcus aureus*, y para este propósito, el método de disco fue la prueba de susceptibilidad antimicrobiana realizado. Placas de Petri se prepararon con o sin dilución de extractos de plantas a concentraciones sub-inhedoras en Agar Mueller-Hinton (MHA), y las zonas de inhibición se registraron en milímetros.

Conclusión: Se confirmaron las actividades de los extractos, y la sinergia se verificó para todos los extractos; clavo de olor, guayaba, y hierba de limón presentan la tasa más alta sinergismo con medicamentos antimicrobianos, mientras que el jengibre y ajo mostraron capacidad sinérgica limitada.

2.1.10. Título:

“EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Syzygium aromaticum* SOBRE LA SUPERVIVENCIA DE *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi A* Y *Bacillus cereus*”

Autor: Jessenia M. Gamboa Anticona y María N. Vásquez Valles

Año: 2015

Método: La extracción del aceite esencial (AE) se realizó a partir de brotes de clavo de olor usando el método de destilación por arrastre con vapor de agua. Se prepararon concentraciones del aceite al 10%, 20%, 30% y 40% más Tween 80 como solvente emulsificante. Se emplearon cada uno de los cultivos de *S. typhi*, *S. paratyphi A* y *B. cereus* y se estandarizaron a una turbidez equivalente a 1.5×10^8 células/mL del nefelómetro de MacFarland, los cuales constituyeron los inóculos. El efecto del AE sobre los microorganismos se determinó por el método de difusión en agar utilizándose concentraciones de 10%, 20%, 30% y 40% de aceite; utilizando cloranfenicol (30ug/disco) como control positivo y Tween 80 como control negativo.

Conclusión: La mayor concentración del aceite de *Syzygium aromaticum* tiene mayor efecto inhibitorio sobre la supervivencia de *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi A* y *Bacillus cereus*. La supervivencia de *Bacillus cereus* es menor frente a las diferentes concentraciones del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* que *Salmonella typhi* y *Salmonella paratyphi A*.

2.1.11. Título:

“EFECTO ANTIBACTERIANO Y ANTIFÚNGICO DEL ACEITE ESENCIAL DE: *Menta Piperita* (MENTA), *Origanum Vulgare* (ORÉGANO) y *Cymbopogon Citratus* (HIERBA LUISA) SOBRE *Streptococcus Mutans* ATCC 25175, *Lactobacillus Acidophilus* ATCC 10746 y *Candida Albicans* ATCC 90028”

Autor: E. Medina, A. de Castro, C. Romero y Manuel Brenes

Año: 2012

Método: Se utilizó aceites esenciales de Orégano, Menta, y Hierba Luisa en una concentración de 50%, 90% y 100%, Nistatina (para hongos) y Gluconato de Clorhexidina al 0,12% (para bacterias). Como grupos de control se utilizó el Agua destilada y DMSO.

Conclusión: Se evaluó la actividad antibacteriana y antifúngica in vitro de 3 aceites esenciales, los cuales demostraron su efecto en el siguiente orden: *Cymbopogon citratus* (Hierba Luisa), *Origanum vulgare* (Orégano) y *Menta piperita* (Menta) mismos que representan una buena alternativa para evitar el uso de productos sintéticos en el control de los tres patógenos ensayados. El aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (Hierba Luisa) al 90% posee una mayor actividad antifúngica que antibacteriana, ya que formo un halo inhibitorio de 76.15mm sobre *Candida albicans*.

2.1.12. Título:

“EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE CLAVO DE OLOR (*Syzygium aromaticum*), CANELA (*Cinnamomum zeylanicum*) Y SU COMBINACION SOBRE LA ACCION ANTIFUNGICA EN *Aspergillus flavus* EN AGAR CHICHA DE MAIZ (*Zea Mays* L.), VARIEDAD MORADO”

Autor: Carlos Armas Caballero, Luis Marquez Villacorta, Carla Pretell Vasquez

Año: 2011

Método: Se utilizó el extracto concentrado del maíz (pH 3,2) en combinación con almidón de papa blanca, glucosa y agar para la obtención del agar chicha de maíz morado, al cual se adicionó los aceites esenciales solos o en combinación a las concentraciones de 0,05; 0,10 y 0,20%. Con la técnica de puntura se sembró el hongo en la superficie central del medio de cultivo; las placas se incubaron a 28 °C, evaluándose el diámetro del halo de crecimiento con una regla milimétrica a las 12, 24, 36, 48, 60 y 72 h.

Conclusión: El análisis de varianza, con un nivel de confianza del 95%, determinó el efecto significativo del aceite esencial de clavo de olor, canela y su combinación a las diferentes concentraciones sobre la acción antifúngica en *Aspergillus flavus*. El aceite esencial de clavo de olor al 0,20% produjo la mayor acción fungistática sobre *Aspergillus flavus* en agar chicha de maíz morado durante 72 h a 28 °C.

2.1.13. Título:

“ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA in vitro DEL ACEITE ESENCIAL *Cinnamomun zeylanicum breyn* canela FRENTE A *Candida albicans* ATCC 6538, TACNA, 2012”

Autor: MILAGROS ROSALÍA MARCA CUELLO

Año: 2013

Método: Se obtuvo el aceite esencial de las cortezas *Cinnamomun zeylanicum breyn* "canela" mediante destilación por arrastre de vapor. Utilizando los métodos de: a) Kirby Bauer, se conoció el grado de sensibilidad en función al tamaño de los halos de inhibición, b) Por dilución en medio líquido se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y c) Por difusión en agar la Concentración Mínima Fungicida (CMF) del aceite esencial.

Conclusión: Se demostró que *Candida albicans* presenta alta sensibilidad al aceite esencial. La CMI para *Candida albicans* fue de 0,01895 mg/ml y la CMF fue de 0,020529166 mg/ml. El aceite esencial de *Cinnamomun zeylanicum breyn* presenta actividad antimicótica frente a *Candida albicans*.

2.2. Bases Teóricas

2.2.1. ACEITES ESENCIALES

2.2.1.1. Definición:

Los aceites esenciales son productos volátiles de naturaleza compleja elaborados por ciertos vegetales a los que confieren un aroma agradable.

Se denominan aceites esenciales a los productos que pueden obtenerse por arrastre con corriente de vapor de agua o por expresión del pericarpo de ciertos frutos. (3)

Habitualmente, también se denominan esencias, pero esta denominación es mucho más amplia, ya que engloba aceites esenciales y a otras sustancias obtenidas por métodos extractivos bastante diversos.

Los aceites esenciales son generalmente líquidos a temperatura ambiente aunque algunos solidifican a baja temperatura como por ejemplo, la esencia de anís. Algunos aceites esenciales son inflamables.

2.2.1.2. Propiedades

- a) Color: La mayoría son prácticamente transparentes, incoloro o ligeramente coloreados (amarillentos) con excepciones como la esencia de manzanilla, que contiene camazuleno de un intenso color azul.
- b) Olor: El olor de los aceites volátiles es muy variable, es su propiedad más característica; y es muy sensible ante a exposición al aire.
- c) Sabor: Son casi tan variables como sus olores. Algunos son dulces, otros tienen sabores suaves, picantes, ácidos, cáusticos o ardientes.
- d) Densidad: Generalmente, son menos densos que el agua aunque también hay excepciones como las esencias del clavo de olor y canela que son más densas.
- e) Deterioro: Se oxidan con facilidad y polimerizan dando productos resinosos. La exposición a la luz y el aire deterioran la calidad y destruyen su fragancia. Se deben almacenar en botellas de color ámbar bien llenas tapadas y colocadas en lugar fresco. (3)

f) Solubilidad: Los aceites esenciales suelen ser insolubles en agua (aunque hay ciertas esencias que son parcialmente solubles porque algunos de sus componentes se solubilizan, como por ejemplo los fenoles). Son lipófilos y solubles en disolventes orgánicos apolares (hexano, éter etílico, etc.). La solubilidad en alcohol es variable y siendo solubles en alcoholes de alta graduación. (3)

2.2.1.3. Localización y distribución

Se encuentran casi exclusivamente en vegetales superiores, concretamente en ciertas familias de Angiospermas, de las cuales cabe destacar:

- Coníferas: Pinus sp.
- Apiáceas o Umbelíferas: Anís, Hinojo.
- Labiadas o Lamiáceas: Menta, Melisa, Lavanda.
- Lauráceas: Canela.
- Asteráceas o Compuestas: Manzanilla
- Mirtáceas: Eucalipto, Clavo.
- Rutáceas: Cítricos.

Los aceites esenciales se acumulan en cavidades secretoras, en células, en pelos secretores, canales secretores, etc. (3)

2.2.1.4. Extracción

Se pueden extraer de las muestras vegetales por variados métodos como: expresión, destilación con vapor de agua, extracción con solventes volátiles, enfleurage y con fluidos supercríticos. En la expresión el material vegetal es exprimido para liberar el aceite y este es recolectado y filtrado.

Este método es utilizado para el caso de esencias de cítricos. En la destilación por arrastre con vapor de agua, la muestra vegetal generalmente fresca y cortada en trozos pequeños, es encerrada en una cámara inerte y sometida a una corriente de vapor de agua sobrecalentado, la esencia así arrastrada es posteriormente condensada, recolectada y separada de la fracción acuosa. Esta técnica es muy utilizada especialmente para esencias fluidas, especialmente las utilizadas para perfumería.

Se utiliza a nivel industrial debido a su alto rendimiento, la pureza del aceite obtenido y porque no requiere tecnología sofisticada. (4)

En el método de extracción con solventes volátiles, la muestra seca y molida se pone en contacto con solventes tales como alcohol, cloroformo, etc. Estos solventes solubilizan la esencia pero también solubilizan y extraen otras sustancias tales como grasas y ceras, obteniéndose al final una esencia impura.

Se utiliza a escala de laboratorio pues a nivel industrial resulta costoso por el valor comercial de los solventes, porque se obtienen esencias impurificadas con otras sustancias, y además por el riesgo de explosión e incendio característicos en muchos solventes orgánicos volátiles. (3,4)

En el método de enflorado o enfleurage, el material vegetal (generalmente flores) es puesto en contacto con un aceite vegetal. La esencia es solubilizada en el aceite vegetal que actúa como vehículo extractor. Se obtiene inicialmente una mezcla de aceite esencial y aceite vegetal la cual es separada posteriormente por otro medio físico-químico.

Esta técnica es empleada para la obtención de esencias florales (“rosa”, “jazmín”, “azahar”, etc.), pero su bajo rendimiento y la difícil separación del aceite extractor la hacen costosa. (4,5)

El método de extracción con fluidos supercríticos, es de desarrollo más reciente. El material vegetal cortado en trozos pequeños, licuado o molido, se empaca en una cámara de acero inoxidable y se hace circular a través de la muestra un líquido supercrítico (por ejemplo bióxido de carbono líquido).

Las esencias son así solubilizadas y arrastradas y el líquido supercrítico que actúa como solvente extractor se elimina por descompresión progresiva hasta alcanzar la presión y temperatura ambiente, y finalmente se obtiene una esencia pura. (4)

Aunque presenta varias ventajas como rendimiento alto, es ecológicamente compatible, el solvente se elimina fácilmente e inclusive se puede reciclar, y las bajas temperaturas utilizadas para la extracción no cambian químicamente los componentes de la esencia, sin embargo, el equipo requerido es relativamente costoso, ya que se necesitan bombas de alta presión y sistemas de extracción también resistentes a las altas presiones. (4)

2.2.2. *Syzygium aromaticum* “Clavo de Olor”

2.2.2.1. Generalidades:

El Clavo de Olor (*Syzygium aromaticum* o *Eugenia caryophyllata*) es una especie perteneciente a la familia *Myrtaceae*, la cual se caracteriza por habitar en ambientes principalmente tropicales.

Es originaria de Indonesia, y actualmente se cultiva en Brasil, Haití, India, Kenia, Madagascar, Malasia, México, entre muchos otros países. Crece en suelos ricos en humus arcillosos, así como en suelos lateríticos (propios de las regiones cálidas, pobres en sílice y altos en hierro y alúmina), profundos y sueltos. (6)

Se obtiene de un árbol perenne que florece dos veces al año. Los botones florales tienen inicialmente un color pálido que poco a poco se convierte en verde para después tornar a un color rojo o marrón oscuro.

Los clavos, son los capullos sin abrir y se cosechan cuando las hojas verdes externas (cáliz) han cambiado de color verde a un amarillo-rosa. Los tallos, las hojas y los botones sin abrir son las partes de esta especia que se utilizan principalmente para la extracción de aceite esencial.

El aceite de clavo de olor ha sido ampliamente investigado debido a su popularidad, vasta disponibilidad y alto rendimiento. Posee muy variados efectos dentro de los que destacan el antiséptico, analgésico, antibacteriano, antifúngico, anestésico y antimutagénico.

2.2.2.2. Características fisicoquímicas

El aceite esencial del clavo es un líquido incoloro o de color amarillo-marrón claro. Tiene un aroma característico y sabor pungente, es miscible en agua y adquiere un color marrón con el envejecimiento o en contacto con el aire. Es fotosensible y termolábil, por lo que la vida de almacenamiento es corta y si no se protege adecuadamente.

Una vez obtenido el aceite, se pueden determinar los componentes de la mezcla por diferentes técnicas, siendo la principal el análisis mediante cromatografía de gases (CG).
(6)

La composición del aceite obtenido por arrastre de vapor presenta en su composición: (6)

- Eugenol 83.6%
- Acetato de Eugenilo 11.6%
- Cariofileno 4.2%

2.2.3. HONGOS

2.2.3.1. Generalidades:

Los hongos constituyen un grupo diverso de microorganismos que ocupan numerosas posiciones ambientales. En general, en la naturaleza son abundantes y llevan una vida libre, y tan solo unos pocos forman parte de la flora humana normal.

Aunque se han descrito numerosas especies de hongos, habitualmente son menos de 100 las que se asocian con la aparición de enfermedades en el ser humano. Al revés de los virus, los parásitos protozoarios y algunas especies de bacterias, para preservar o perpetuar la especie, los hongos no necesitan colonizar o infectar los tejidos del ser humano o de los animales. A excepción de dos casos importantes (candidiasis y la pitiriasis versicolor), todas las infecciones por hongos tienen su origen en una fuente exógena, sea por inhalación o por implantación traumática.

Los hongos son microorganismos eucariotas. Su característica más significativa es que poseen un núcleo envuelto por una membrana nuclear.

Al revés de lo que ocurre en las células de las plantas y en algunas bacterias, los hongos no contienen clorofila, por lo que no pueden sintetizar macromoléculas a partir del dióxido de carbono y la energía procedente de la luz. (7,8)

En consecuencia, en la naturaleza todos los hongos existen como saprofitos (microorganismos que viven sobre materia orgánica muerta o en descomposición), simbiontes (microorganismos que viven conjuntamente y en asociación con otros, con ventajas mutuas para ambos), comensales (dos microorganismos que viven en estrecha relación y en la que mientras que uno se beneficia, el otro ni se beneficia ni resulta perjudicado) o como parásitos (microorganismos que viven sobre o en el interior de un huésped, del que obtienen beneficios sin corresponder a cambio con unas contribuciones útiles; además, en el caso de los patógenos, la relación resulta perjudicial para el huésped). (7,8)

2.2.3.2. Estructura

Los hongos poseen las estructuras típicas de las células eucariotas. En contraste con las células bacterianas, las células de los hongos poseen un complejo citosol que contiene (entre otras estructuras) microvesículas, microtúbulos, ribosomas, mitocondrias, aparato de Golgi, núcleos y un retículo endoplasmático de doble membrana. Los núcleos de los hongos están envueltos por una membrana y contienen prácticamente todo el ADN celular. Asimismo, poseen un nucléolo verdadero y rico en ARN. Una interesante propiedad peculiar de esta membrana es que durante el ciclo mitótico persiste toda la metafase; en cambio, la membrana nuclear de las células de las plantas y los animales se disuelve y vuelve a formarse posteriormente (tras la segregación de los cromosomas a sus centrómeros).

Rodeando el citosol complejo se encuentra otra membrana, el plasmalema, formada por glucoproteínas, fosfolípidos y ergosterol. (8,9)

Es significativo el hecho de que los hongos posean ergosterol (en lugar de colesterol, que es el principal esteroide que se encuentra en los tejidos de los mamíferos), puesto que la mayor parte de las estrategias de tratamiento antifúngico están basadas en la presencia de ergosterol en la membrana de los hongos.

Al revés de lo que ocurre en las células de los mamíferos, inmediatamente por fuera del plasmalema los hongos poseen una pared celular rígida y formada por múltiples capas. La pared celular que es estructural y bioquímicamente compleja, como componente fundamental contiene *Quitina*.

Además de la pared celular, algunos hongos producen también un Polisacárido Capsular. Esta estructura aísla al microorganismo del ambiente que lo rodea, si bien al mismo tiempo permanece en comunicación directa con dicho ambiente; en el caso de los patógenos, este ambiente es el tejido del huésped. La pared celular y algunas estructuras (ej. El material capsular) determinan la virulencia del microorganismo y desempeñan asimismo un papel en la aparición en el huésped de respuestas inmunológicas.

Aunque la mayoría de los hongos presenta una respiración aerobia, algunos poseen una capacidad limitada para anaerobiosis (fermentación) y otros son anaerobios estrictos. Desde el punto de vista metabólico, son heterótrofos y químicamente versátiles.

En comparación con el tiempo de división de las bacterias (minutos), el de estos microorganismos es largo (horas).

Los hongos son Gram positivos; además, sus células vegetativas no son acidorresistentes. (8,9)

Aunque la capacidad de los hongos para causar enfermedad en el ser humano o en los animales parece ser accidental, la mayor parte de los hongos causantes de enfermedades han desarrollado unas características que les permiten adaptarse y proliferar en ambientes hostiles.

Los hongos pueden dividirse en dos formas morfológicas básicas: *Levaduras* e *Hifas*. Además, sus etapas de desarrollo pasan por fases tanto vegetativas como reproductivas. (8)

Las levaduras son unicelulares y se reproducen asexualmente mediante unos procesos denominados formación de formación blastoconidios (gemación) o fisión.

La mayor parte de los hongos presentan unos filamentos tubulares y ramificados (parecidos a hebras) que se denominan “hifas” y que se alargan en sus extremos mediante un proceso llamado “extensión apical”. El término colectivo para un conjunto de hifas es *Micelio*. (9)

Es muy peculiar la morfología de *Cándida Albicans*, que forma parte de la flora normal de la boca, el tracto gastrointestinal, y las membranas que revisten la mucosa de otras cavidades y tejidos. Además de ser levaduriforme o filamentoso, este microorganismo que puede adoptar un morfología de pseudohifa en la que las células se alargan y unen.

La formación de pseudohifas constituye una forma exagerada del proceso de gemación; en este caso, las células recién formadas no adoptan una forma ovalada y se escapan de la célula madre, sino que permanecen unidas a ella y siguen alargándose. (8)

La morfología de los hongos no es fija, puesto que algunos son dimórficos; es decir, pueden existir en forma de micelio o de levadura según las condiciones ambientales del medio en que se encuentran (en la tierra, sobre vegetación en descomposición o en los tejidos del huésped). (8)

2.2.3.3. Levaduras:

El término levadura, se refiere a un germen unicelular nucleario, que se reproduce por gemación, tal designación suele considerarse inadecuada, en parte porque algunas levaduras se reproducen por fusión, y porque muchas producen micelio o pseudomicelio en condiciones adecuadas; en parte porque puede haber otros hongos en una forma unicelular de tipo de levadura que se reproduzcan por gemación. Basándose en la formación de esporas sexuales, algunas levaduras son ascomicetos, otras probablemente son basidiomicetos y otras no se ha comprobado que tengan una etapa sexual y se agrupan con los hongos imperfectos. (9,8)

Dada la distribución ubicua de las levaduras, no solo en el aire, el polvo y el suelo, sino en la superficie del cuerpo y en la boca, tubo digestivo y vagina, no debe sorprender que estas formas se hayan descubierto en muchos procesos patológicos.(8,9)

2.2.4. *Candida albicans*:

2.2.4.1. Descripción micológica:

Hongo dimórfico que forma largas pseudohifas, hifas y blastoconidios (células gemantes subesféricas de 3-8 x 2-7µm). Asimilan y fermentan azúcares. (10)

Numerosas clamidosporas unicelulares, redondas u ovaladas, con gruesa pared refringente (8-16 um de diámetro), situadas al final de las hifas, pseudohifas o laterales sobre blastoconidios ovalados.

Colonias de crecimiento rápido, circulares, lisas, blancas o cremosas, pastosas y blandas, de bordes precisos, centro ligeramente prominente.

2.2.4.2. Descripción taxonómica:

Su descripción taxonómica es la siguiente:

Reino: Fungi

División: Deuteromycota

Clase: Blastomycetes

Orden: Pseudosaccharomycetales

Familia: Cryptococcaceae

Género: Candida

Especie: Albicans

Sinónimos: Monilia albicans, Cándida stellatoidea. (10)

2.2.4.3. Composición Química:

La composición química de *Candida albicans* está representada por 20-40% de proteínas y 30-50% de polisacáridos, mientras que la proporción de lípidos es variable. La fracción lipídica va a depender de la cepa, edad del cultivo, condiciones ambientales y del origen de la fuente de carbono. (8)

La pared celular de la *Candida albicans* está compuesta principalmente por los polisacáridos manán, glucán y quitina. Aunque la síntesis de los componentes de la pared celular esta dinámicamente influenciada por las condiciones de crecimiento y por los estadios metabólicos.

El número de capas y su morfología varían; esta variación está relacionada con varios factores tales como: la etapa de crecimiento celular, la forma de crecimiento (como la levadura o como tubo germinal), la capa seleccionada para su estudio, el medio de cultivo empleado para el crecimiento celular y los procedimientos de fijación. (8)

2.2.4.4. Ecología:

Candida albicans está asociada ecológicamente a seres vivos de sangre caliente. Su temperatura óptima de crecimiento es 37 °C. Los tractos digestivo y respiratorio, junto con la mucosa genital (vagina), son los reservorios más importantes en los seres humanos y origen de candidiasis endógenas.

En estas localizaciones se comporta como un saprobio y su aislamiento no implica por si solo la presencia de infección. La *Candida albicans* no sobrevive durante mucho tiempo en superficies secas pero su supervivencia es mayor cuando hay humedad y se ha aislado de los cepillos dentales, cremas de manos, cosméticos y ropa. (10)

2.2.4.5. Anatomía Patológica y Patogenia:

Candida albicans presenta una serie de factores de patogenicidad que facilitan la colonización y la infección del hospedador. (4)

Entre ellos cabe mencionar el dimorfismo o capacidad del hongo para desarrollar un crecimiento levaduriforme y filamentoso, el cual favorece la evasión de los mecanismos defensivos del hospedador. También existen otros tipos de factores de patogenicidad, tales como:

a) Adhesinas: Que permiten la unión de la célula fúngica a los receptores del hospedador o a materiales plásticos utilizados en medicina, como las prótesis y los catéteres.

b) Proteinasas y Fosfolipasas: Las cuales corresponden a enzimas que favorecen la diseminación por los tejidos del hospedador.

c) Producción de toxinas y sustancias inmunosupresoras: Cabe señalar que la pared celular de *C. albicans* es esencial para su patogenicidad desde el momento en que esta, es requerida para su crecimiento. Además la pared celular le proporciona rigidez y protección a esta especie.

La adherencia de este hongo es superior a la de otras especies de *Candida* y es aumentada por la existencia de una lesión epitelial por los carbohidratos y por la disminución de la flora bacteriana saprofita.

d) Tigmotropismo: Que permite encontrar discontinuidades entre las células y penetrar en los tejidos. (4)

2.2.5. CANDIDIASIS:

2.2.5.1. Generalidades:

En los pacientes con trastornos del sistema inmunitario y en los enfermos internados con patologías graves, las infecciones por hongos son una causa importante de morbilidad y mortalidad. (11)

Las distintas especies de *Candida*, ampliamente distribuidas, son los hongos más comunes causantes de micosis; integran la flora microbiológica normal pero solo 10 especies son causa de enfermedad en los seres humanos. La patología asociada con estos hongos incluye un amplio espectro, desde trastornos leves de la piel y mucosas hasta infecciones potencialmente fatales –candidemia, peritonitis, endocarditis infecciosa, infecciones de catéteres intravasculares y meningitis.

Aunque algunas de las entidades son difíciles de categorizar, se considera que la candidiasis invasiva incluye a la candidemia y a la candidiasis sistémica. (11)

La candidiasis es una infección por hongos que también se conoce por los nombres de Moniliasis, “infección por levaduras”, “infección por hongos”; son causadas por un hongo del género *Candida*, el más frecuente de todos es la *Candida albicans*, que causa alrededor del 90% de las infecciones por hongos.

Los principales factores de patogenicidad que contribuyen al aumento en su capacidad de infectar son la germinación rápida en los tejidos después de diseminarse por el torrente circulatorio; la producción de proteasas, las adhesinas para las proteínas de la matriz extracelular.

Las principales manifestaciones clínicas de *Candida albicans* son de tres tipos: mucocutánea, cutánea y sistémica. (12)

2.2.5.2. Tipos de Candidiasis:

a) Candidiasis Mucocutánea:

La candidiasis de las mucosas afecta sobre todo la cavidad bucal y el conducto vaginal. La candidiasis bucal, es una enfermedad conocida como Muguet, es la manifestación clínica más frecuente de candidiasis en los seres humanos. La infección se manifiesta como placas blancas en la mucosa bucal y la lengua, que, en las infecciones más graves, pueden unirse en una membrana. Estas se adhieren firmemente al epitelio y cuando se las retira revela una base enrojecida y edematosa. El diagnóstico puede hacerse mediante la observación de las pseudohifas y los blastoconidios característicos en la microscopia de las preparaciones teñidas con Gram de frotis del exudado, entre las causas predisponentes figuran la alteración de la flora normal después de la antibiótico terapia prolongada, el pH bajo de las secreciones salivales en los recién nacidos, la hipertrofia de las papilas de la lengua (lengua negra vellosa) y la glositis crónica. La candidiasis bucal se reconoce ahora como una enfermedad que define el SIDA y se observa en el 100% de estos pacientes.

Las mucosas de la tráquea, los bronquios y casi cualquier parte del tubo digestivo, pueden sufrir infecciones por *Candida*. Un ambiente con pH bajo puede explicar esta predisposición, en especial en los pacientes con procesos malignos de la sangre.

La disfagia, el dolor retroesternal, la hemorragia gastrointestinal alta y las náuseas son síntomas asociados. (12)

b) Candidiasis Cutánea:

Las infecciones de la piel suelen afectar las partes húmedas e intertriginosas, como las zonas interdigitales de las manos y los pies, debajo de las mamas, las axilas y los pliegues de la ingle. La infección de las uñas se conoce como onicomycosis, o paroniquia si están afectados los pliegues de la piel que encierran las uñas. La dermatitis de pañal en los recién nacidos también es una manifestación frecuente. La candidiasis mucocutánea crónica es una infección oportunista de la piel y las mucosas, asociada con varios trastornos genéticos que afectan la función de los leucocitos o del sistema endocrino.

c) Candidiasis Diseminada:

La candidiasis sistémica es una enfermedad relativamente rara, que suele suceder como un episodio terminal de los pacientes con neoplasias debilitantes, enfermedades inmunosupresoras y luego del trasplante de órganos, en especial durante el síndrome de rechazo agudo. Los órganos en los cuales pueden producirse la siembra tras la diseminación de las especies de *Candida* a partir de los sitios primarios de infección mucocutánea son:

- Candidiasis del Aparato Urinario
- Endocarditis
- Meningitis por *Candida* (12)

2.3. Definición de Términos Básicos

- ❖ ATCC: Establecida en 1925 como la American Type Culture Collection por los científicos e incorporada en 1947 para servir como centro de depósito y distribución mundial de cultivos de microorganismos, ATCC se ha convertido en el líder mundial en la investigación y el desarrollo de conocimientos especializados para la identificación, caracterización, conservación de y distribución de una amplia gama de líneas de células y microbios. (13)
- ❖ CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CIM): Se define CIM como la mínima concentración de antibiótico que en un período de tiempo predeterminado, es capaz de inhibir el crecimiento in vitro de un inóculo bacteriano previamente estandarizado. (14)
- ❖ PERICARPO: Parte del fruto que rodea a la o las semillas compuesto por epicarpo, mesocarpo y endocarpo (15)
- ❖ LIPÓFILO: Es el comportamiento de toda molécula que tiene afinidad por los lípidos. En una disolución, las partículas lipófilas tienden a acercarse y mantener contacto con los lípidos. (16)
- ❖ SUELOS LATERÍTICOS: La laterita es el suelo propio de las regiones cálidas, caracterizado por la pobreza en sílice y su elevada cantidad de hierro, alúmina y/u otros minerales. Las costras lateríticas se deben a la meteorización de la capa superficial del suelo, es decir, a la acción in situ de los agentes meteorológicos (lluvia, insolación, viento, acción de los seres vivos, etc.). (17)
- ❖ SABOR PUNGENTE: La pungencia o picor es la sensación de ardor agudo producido por productos hortícolas como los pimientos picantes y la cebolla, captada por el sentido del gusto al contacto con algunas sustancias. (18)

- ❖ CONCENTRACION MINIMA FUNGICIDA (CMF): Es la mínima concentración de un antibiótico que en un período de tiempo predeterminado, es capaz de inducir la muerte in vitro del 99.9% de una población bacteriana previamente estandarizada. (14)

- ❖ ACEITE ESENCIAL: Los aceites esenciales, son mezclas de sustancias orgánicas químicamente constituidas por terpenos, sesquiterpenos y compuestos aromáticos que se localizan en determinados órganos de la planta como flores, hojas, frutos; y se les obtienen por destilación dependiendo del método y la condición del vegetal, destacándose entre ellos el de arrastre con vapor de agua. (19)

- ❖ CEPA NATIVA: Son las cepas que no presentan ningún tipo de modificación genética que haya sido inducida por el ser humano, las que se encuentran en un estado similar al que presentan las cepas silvestres.

- ❖ AGAR PDA: se utiliza para el aislamiento y el cultivo de hongos (levaduras, mohos y dermatofitos) a partir de muestras clínicas.
Extracto de patata 4 g, Dextrosa 20 g, Agar-Agar 15 g., con un pH de 5,5.
(20)

- ❖ INMUNODEPRESION: Supresión o disminución de las reacciones inmunitarias. Puede ser debida a la administración deliberada de fármacos inmunosupresores, empleados en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, o en receptores de órganos trasplantados para evitar el rechazo. También puede ser secundaria a procesos patológicos como inmunodeficiencias, tumores o malnutrición. (21)

- ❖ ASCOMYCOTA: Los ascomicetos constituyen el taxón fúngico con mayor número de especies (más de 64.000), desde levaduras microscópicas hasta hongos con esporocarpos complejos. La mayor parte son saprofitos descomponedores y, por tanto, beneficiosos. (22)

2.4. Hipótesis de la Investigación

2.4.1. Hipótesis General

El Aceite Esencial de *Syzygium aromaticum* “clavo de olor” posee una acción antifúngica *In Vitro* sobre *Candida albicans* ATCC 90028.

2.4.2. Hipótesis Secundaria

- La *Candida albicans* presenta una alta sensibilidad frente al aceite esencial de *Syzygium aromaticum* “clavo de olor” mediante la técnica de difusión en disco.
- La Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* “clavo de olor” frente a *Candida albicans* ATCC 90028 es de 0,01895 mg/ml.
- La Concentración Mínima Fungicida (CMF) del Aceite esencial de *Syzygium aromaticum* “clavo de olor” frente a *Candida albicans* ATCC 90028 es de 0,02052 mg/ml.

2.5. Identificación y clasificación de variables

a) Variable Independiente:

- Acción antifúngica del Aceite Esencial de *Syzygium aromaticum* “clavo de olor”.

b) Variable Dependiente:

- *Candida Albicans* ATCC 90028.

CAPITULO III

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Diseño de Investigación

3.1.1. Tipo de Investigación

Experimental.

3.1.2. Nivel de Investigación

Investigación Explicativa.

3.2. Descripción del Ámbito de Investigación

La presente investigación se realizó en los laboratorios Microbiología de la Universidad Jorge Basadre Grohmann, entre los meses de Enero - Abril del 2017, se utilizará aceite esencial de clavo de Olor (***Syzygium aromaticum***) frente a cepas de ***Candida albicans***.

3.3. Métodos de Investigación

3.3.1. Diseño Experimental utilizado:

Aceite esencial de *Syzygium aromaticum* “Clavo de Olor”

Diseño experimental con 12 tratamientos y 3 repeticiones teniendo así 36 unidades experimentales a concentraciones de 39.4975 mg/ul; 78.995 mg/ul; 118.4925 mg/ul; 157.99 mg/ul; 197.9875 mg/ul; 236.985 mg/ul; 276.4825 mg/ul; 315.98 mg/ul; 355.4775 mg/ul; 394.975 mg/ul; 434.4725 mg/ul; 473.97 mg/ul.

3.3.2. *Syzygium aromaticum*

a) Recolección

El clavo de olor en estudio fue obtenido del centro comercial “Polvos Rosados”, comprando 500 gramos de la muestra para los fines de estudio.

b) Extracción

El clavo de olor se agrupa en dos muestras de 250 gr. La obtención del aceite esencial se realizó por el método de destilación por arrastre de vapor de agua.

El equipo de destilación estuvo compuesto por un sistema de doble balón, uno de los cuales contuvo agua destilada (700ml) y fue sometido a calor directo; mientras que en el segundo (capacidad 1000ml) contuvo 250 gramos del clavo de olor, el cual fue el que recibía los vapores de agua, para que luego el vapor producido arrastre los aceites esenciales hasta el refrigerante. Este cambio de temperatura hace que el vapor se condense y se vuelva nuevamente líquida (agua-aceite). El producto destilado se recibió en un depósito estéril y cerrado, observándose un estado bifásico entre agua y aceite esencial, por la diferencia de densidades. Y utilizando las pipetas Pasteur se separó el aceite esencial para luego almacenarse en un tubo de vidrio con tapa rosca cerrado herméticamente y envuelto en papel aluminio para protegerlo de la luz del ambiente. Los aceites esenciales fueron almacenados a temperatura ambiente y en oscuridad hasta su utilización.

Características Organolépticas:

Especie Vegetal	Syzygium Aromaticum
Aspecto	Líquido Traslúcido
Color	Traslúcido
Olor	Característico
Sabor	Pungente

c) Determinación de Densidad:

Donde:

d= densidad (g/ml)

m= masa (g)

v= volumen (ml)

w1= peso probeta (g)

w2= peso probeta con aceite (g)

Vol. Aceite= Volumen de aceite (ml)

Vol. Aceite= 1ml

$$d = \text{masa/volumen}$$
$$d = \frac{W2 - W1}{1\text{ml}}$$
$$d = \frac{(266,197 \text{ gr} - 250,398 \text{ gr})}{1\text{ml}}$$
$$d = 15,799 \text{ gr} = 15799 \text{ mg/ml}$$

3.3.3. Método de Difusión de disco (Kirby Bauer)

a) Cepas (Recolección)

Se utilizó un microorganismo patógeno de importancia clínica, proporcionada por el Ministerio de Salud-Tacna (Minsa): ***Candida albicans ATCC 90028***.

b) Evaluación de la actividad del aceite esencial de *Syzygium aromaticum*.

La actividad antifúngica del aceite se evaluó por el método de Kirby Bauer (difusión en discos).

c) Preparación de la dilución:

En los primeros ensayos se usaron volúmenes de aceite esencial puro (2,5ul – 30ul) para la determinación de los halos de inhibición por el método de difusión en disco (Kirby Bauer). Luego de la incubación a 37°C por 24h se observó en la lectura de las placas que no hubo crecimiento micótico alguno; por lo que se procedió a un segundo ensayo usando volúmenes inferiores a los primeros (1ul – 2,4ul) de aceite esencial puro a lo cual paralelamente se trabajó con un control positivo para ***Candida albicans***; es decir a esta placa no se adicionó el aceite esencial para verificar su crecimiento en el medio de cultivo (Agar Mueller Hinton). Los volúmenes y concentraciones del aceite esencial puro se detallan en las tablas N° 1 y 2, en esta segunda oportunidad si se apreció crecimiento fúngico.

d) Preparación de los discos:

Se impregnaron discos de papel filtro de 6 mm de diámetro (previamente esterilizados) con una cantidad determinada de aceite esencial. Para esto se utilizaron 12 tratamientos con 3 repeticiones por cada tratamiento.

La esterilización consistió en la desnaturalización de los discos con antibióticos, que fueron colocados en un beaker (capacidad de 100ml) con agua destilada aprox. 80ml y llevados a la autoclave a una presión de 20 barr (121°C) por 30 minutos.

Luego desechamos el agua destilada del beaker y los colocamos a la estufa para su secado a 170°C por 1 hora.

TABLA N°1: Concentraciones del Aceite Esencial *Syzygium aromaticum* “Clavo de Olor” en los discos

ACEITE ESENCIAL		
N° Tratamiento	Volúmenes	[] (mg/ul)
T1	2,5	39.4975
T2	5	78.995
T3	7,5	118.4925
T4	10	157.99
T5	12,5	197.4875
T6	15	236.985
T7	17,5	276.4825
T8	20	315.98
T9	22,5	355.4775
T10	25	394.975
T11	27,5	434.4725
T12	30	473.97

FUENTE: Elaboración Propia

Control Negativo: Consiste en un disco de sensibilidad de antibiótico desnaturalizado el cual no contiene aceite esencial como grupo de control, para así descartar la actividad antifúngica del mismo disco. Con el fin de saber entre cuales de estas concentraciones puede estar el CMI; incubándolo a 37°C por un espacio de 24h. Se anotó la presencia y el tamaño del halo de inhibición.

e) Preparación del inóculo micótico de ***Candida albicans*** ATCC 90028:

El agente micótico que se utilizó en el trabajo se cultivó en viales de Agar Mueller Hinton para su mantención; para luego ser activadas en Caldo BHI (Infusión Brain Heart), se homogenizó las colonias y se incubaron a 37°C por el lapso de 6 a 8 horas. Luego se homogenizaron nuevamente las colonias con ayuda del vórtex; para asegurar su total dispersión en el caldo BHI y seguidamente se estandarizó por comparación de turbidez del tubo 0,5 de la escala de Mc Farland cuya población micótica es $1,5 \times 10^8$ UFC/ml. (Anexo N° 3)

f) Preparación del medio para la prueba de sensibilidad:

Se empleó el medio Agar Mueller Hinton, se preparó el medio como indica la casa comercial (34g en 1000ml).

g) Inoculación de las placas:

Se inoculó la placa de Agar Mueller Hinton, utilizando la suspensión estandarizada del agente micótico (***Candida albicans***) a una concentración de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml. Se depositó 100 ul del inóculo micótico sobre la superficie del agar de cada placa correspondientemente, mediante la técnica de diseminación hasta que el inóculo quede distribuido de modo homogéneo. Se dejó secar durante 15 minutos a temperatura ambiente.

h) Dispensación de los discos a las placas inoculadas:

Se procedió a incorporar los discos de 6 mm de diámetro de papel Wathman N°42 previamente esterilizados (“Discos de sensibilidad sin antibióticos”), luego se incorporó en aceite esencial en las diferentes concentraciones, 2,5 ul; 5 ul; 7,5 ul; 10 ul; 12,5 ul; 15 ul; 17,5 ul; 20 ul; 22,5 ul; 25 ul; 27,5 ul; 30 ul, se dejó secar durante 10 minutos para su mejor impregnación. Cada disco fue tomado con una pinza estéril y se colocó sobre la superficie del agar, se presionó suavemente para asegurar el contacto con el medio. Se colocaron 3 discos con aceite esencial y un control negativo (disco sin aceite esencial) en cada placa con Agar Mueller Hinton con su respectiva concentración. Se emplearon un total de 12 placas para esta prueba.

i) Incubación:

Las placas fueron incubadas a 37°C durante 24-48 horas para ver los halos de inhibición.

j) Lectura:

Posterior al periodo de incubación, se midieron los halos de inhibición de crecimiento con el vernier en unidades de milímetros. La lectura se realizó midiendo los halos de inhibición sobre el crecimiento del microorganismo alrededor del disco. El diámetro de esta zona de inhibición fue directamente proporcional a la actividad antifúngica del aceite esencial sobre los microorganismos estudiados.

Para interpretar los resultados se tomó como referencias la clasificación de DURAFFOURD y LAPRAZ (1983). (ANEXO 2)

3.3.4. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).

Se determinó solamente con las concentraciones donde hubo zonas de inhibición micótica.

a) Preparación del inóculo micótico de *Candida albicans* ATCC 90028:

El agente micótico que se utilizó en el trabajo se cultivó en viales de Agar Mueller Hinton para su mantención; para luego ser activadas y enriquecidas en caldo BHI, se homogenizó las colonias y se incubaron a 37°C por el lapso de 2-4 horas y posteriormente observarla cada 30 minutos, hasta llegar a una concentración de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml y comparada con el tubo 0,5 de la escala de Mc Farland. (Anexo 4)

b) Preparación de la solución Madre:

Se preparó una solución madre de 30000 ul totales: 1000 ul de Aceite Esencial con 1000 ul de Dimetilsulfóxido 10% (DMSO) y 28000 ul de caldo infusión cerebro corazón (BHI). La concentración final se obtuvo a partir de la densidad obtenida: 15799 mg/ml.

c) Preparación de la Concentración mínima inhibitoria (CMI) para *Candida albicans* ATCC 90028:

Se colocaron 10 tubos de 15 x 125 mm a los cuales se les agregó lo siguiente:

**TABLA N° 2: Preparación de volúmenes para la Concentración
Mínima Inhibitoria (CMI)**

N° Tubo	Volumen Inicial (Solución Madre)	[] Inicial	BHI	Levadura (Hongos)	Valor Final	[] Final
1	90	47.397	2610	300	3000	15.799
2	108	56.8764	2592	300	3000	18.9588
3	126	66.3558	2574	300	3000	22.1186
4	144	75.8352	2556	300	3000	25.2784
5	162	85.3146	2538	300	3000	28.4382
6	180	94.794	2520	300	3000	31.598
7	198	104.2734	2502	300	3000	34.7578
8	216	113.7528	2484	300	3000	37.9176
9 (+)	0	0	2700	300	3000	0
10(-)	216	0	2784	0	3000	0

Fuente: Elaboración Propia

Nota: Se trabajó con 8 concentraciones y un control positivo, el cual no contiene solución madre pero si levaduras y el negativo, el cual si contiene solución madre pero no contiene levaduras.

d) Incubación:

Se lleva a incubación por espacio de 24 horas a 37°C.

Los diferentes tratamientos se compararon con: Control Positivo (2700 ul BHI + 300 ul Solución micótica) y Control Negativo (216 ul Solución Madre + 2784 ul BHI).

e) Lectura:

Al cabo de las 24 horas se observa la turbidez de los tubos que indico desarrollo micótico. El tubo que no presente turbidez indica la ausencia del crecimiento micótico (igualando al control negativo), que se designa como la concentración mínima inhibitoria (CMI).

3.3.5. Determinación de la Concentración Mínima Fungicida (CMF)

Se tomaron los tubos que no presentan turbidez (Tubo N°6, 7 y 8); de cada uno de ellos se resembró 100 ul de solución por diseminación en placas de Agar Mueller Hinton. Las placas fueron incubadas a 37°C por 24-48 horas, transcurrido este tiempo se contó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) presentes para cada concentración del aceite esencial.

CAPITULO IV

PRESENTACION, ANALISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS

RESULTADOS

Se realizó un estudio “in vitro” de la actividad antifúngica del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* “Clavo de Olor” frente al agente micótico *Candida albicans* ATCC 90028; para lo cual se trabajó con 12 tratamientos con 3 repeticiones. Así mismo se determinó la sensibilidad de *Candida albicans* ATCC 90028 frente al aceite esencial de *Syzygium aromaticum* “Clavo de Olor”.

Se determinó que el aceite esencial de *Syzygium aromaticum* presenta acción inhibitoria frente a *Candida albicans* desde una concentración de 31.598 mg/ul. Mientras que desde una concentración de 34.7578 mg/ul ya existe una acción fungicida.

Los resultados obtenidos en las diferentes pruebas han sido agrupados en cuadros y gráficas para su mejor interpretación.

Cuadro N° 01:

Prueba de la Actividad Antifúngica del Aceite Esencial de ***Syzygium aromaticum*** "Clavo de Olor" frente a ***Candida albicans*** ATCC 90028 por el método de difusión del disco (Kirby Bauer)

ACEITE ESENCIAL DE <i>Syzygium aromaticum</i> "CLAVO DE OLOR"															
Aceite Esencial		N° Discos	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Placa 5	Placa 6	Placa 7	Placa 8	Placa 9	Placa 10	Placa 11	Placa 12	Control (mm)
Volumen (ul)	[] (mg/ul)		Halos (mm)												
2,5	39.4975	1	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	0
		2	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
		3	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
5	78.995	1	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	0
		2	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
		3	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
7,5	118.4925	1	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	0
		2	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
		3	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
10	157.99	1	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	0
		2	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
		3	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
12,5	197.4875	1	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	0
		2	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
		3	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
15	236.985	1	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	0
		2	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
		3	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
17,5	276.4825	1	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	0
		2	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
		3	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
20	315.98	1	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	0
		2	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
		3	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
22,5	355.4775	1	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	0
		2	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
		3	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
25	394.975	1	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	0
		2	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
		3	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
27,5	434.4725	1	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	0
		2	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
		3	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
30	473.97	1	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	0
		2	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
		3	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	

Fuente: Elaboración Propia

Interpretación:

En el cuadro N° 01, se presentan los promedios de halos de inhibición producidos por las diferentes concentraciones del aceite esencial de ***Syzygium aromaticum*** “Clavo de Olor” frente a ***Candida albicans*** ATCC 90028, mediante el método de difusión del disco (Kirby Bauer). Los resultados obtenidos indican su alta efectividad, ya que en todas las placas no hubo crecimiento micótico, solo en el disco de control. Al medir con vernier los halos se observó que en los discos de 2,5 ul existían 40 mm de diámetro, continuando el diámetro de los halos hasta la concentración de 30 ul. Por lo cual indican que ***Candida albicans*** ATCC 90028 es altamente sensible frente a sus diferentes concentraciones del Aceite Esencial de ***Syzygium aromaticum*** “Clavo de Olor”.

Cuadro N° 02:

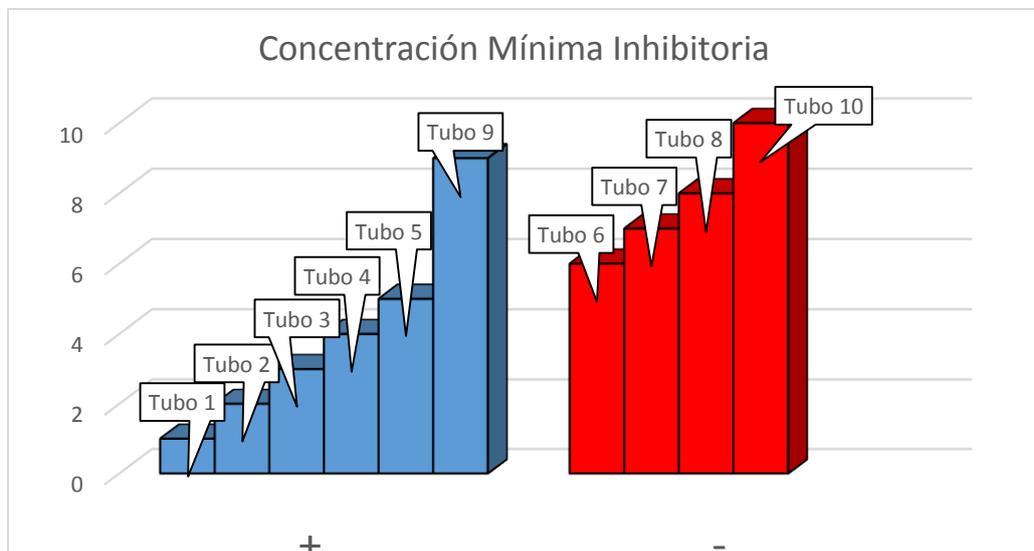
Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* “Clavo de Olor” frente a *Candida albicans* ATCC 90028.

N° Tubo	Volúmenes (ul)	[] Aceite Esencial (mg/ul)	Turbidez
1	1	15.799	+
2	1,2	18.9588	+
3	1,4	22.1186	+
4	1,6	25.2784	+
5	1,8	28.4382	+
6	2	31.598	-
7	2,2	34.7578	-
8	2,4	37.9176	-
9	+	Control +	+
10	-	Control -	-

Fuente: Elaboración Propia

Interpretación:

En el cuadro N° 02, se observa que las concentraciones de 15.799 mg/ul hasta 28.4382 mg/ul presentan turbidez (+), lo que indica la existencia del crecimiento micótico, pero a partir de las concentraciones 31.598 mg/ul hasta 37.9176 mg/ul no presentaron turbidez (-), lo que evidencia que no hubo crecimiento micótico. En el tratamiento N° 6 cuya concentración es 31.598 mg/ul es el CMI, ya que fue el primer tratamiento donde ya no hubo crecimiento micótico.



Cuadro N° 03:

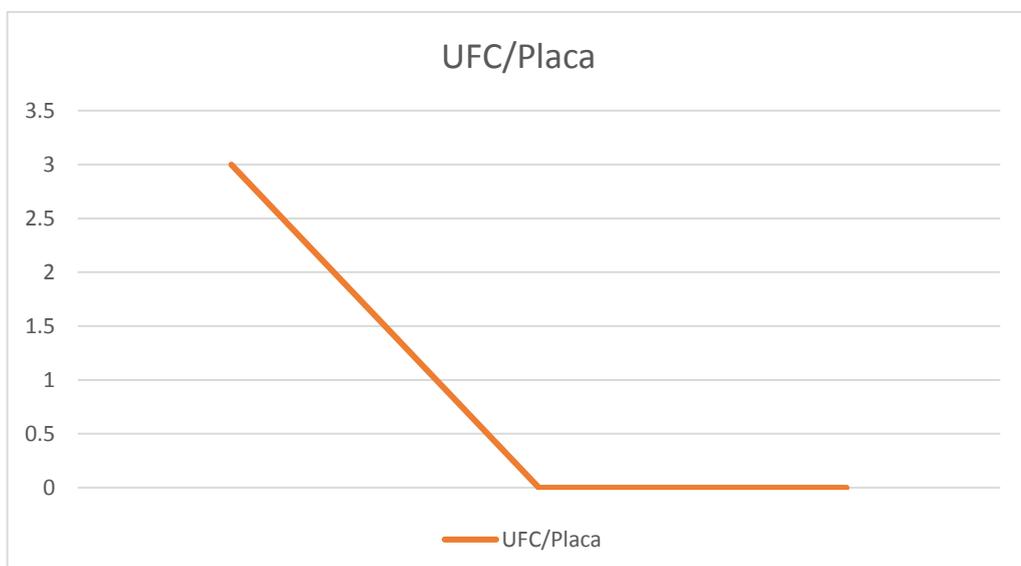
Determinación de la Concentración mínima Fungicida (CMF) del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* “Clavo de Olor” frente a *Candida albicans* ATCC 90028

N° Tubo	[] (mg/ul)	UFC/Placa
6	31.598	3
7	34.7578	0
8	37.9176	0

Fuente: Elaboración Propia

Interpretación:

En el Cuadro N° 03, se muestran solo las concentraciones del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* “Clavo de Olor” donde no se evidencio turbidez, para determinar la concentración mínima fungicida (CMF); observándose que en la concentración de 34.7578 mg/ul hay una inhibición absoluta del crecimiento del crecimiento de *Candida albicans*, mientras que en la concentración 31.598 mg/ul aún existe crecimiento de 3 UFC.



DISCUSION

En la presente investigación de tipo experimental *In Vitro* se buscó determinar el efecto antifúngico de ***Syzygium aromaticum*** (Clavo de Olor). El clavo de olor de la familia *Myrtaceae*, dentro de sus características fisicoquímicas, se presenta un alto poder antifúngico, debido a la presencia del Eugenol y en menor porcentaje Cariofileno.

En el estudio presentado por Díaz y cols., ellos evaluaron el efecto antimicrobiano sobre *Streptococcus mutans*. Lo cual concluye en que el aceite de ***Syzygium aromaticum*** si inhibe al *Streptococcus Mutans* y posee efecto antimicrobiano.

En el estudio presentado por Inder y cols. Ellos evaluaron la actividad antifúngica de ***Syzygium aromaticum***, el cual concluye en que la acción antifúngica del aceite de clavo de olor se debe a su alto contenido de Eugenol. El cual concuerda con los resultados del presente estudio.

El estudio presentado por Afortunados y cols., ellos evaluaron la influencia de los métodos de esterilización sobre los extractos acuosos de plantas medicinales, el cual concluye en que los diferentes métodos utilizados no afectaron a la eficiencia de extracto acuoso de clavo de India.

En el estudio presentado por Aparecido y cols., ellos evaluaron las actividades anti-inflamatorias y antinociceptivas del aceite de Eugenol, ellos concluyen en que el Eugenol posee actividades antinociceptivas y anti-inflamatorias.

En el estudio presentado por Milagros Rosalía Marca Cuello, ella evalúa la actividad antimicótica de *Cinnamomun zeylanicum* frente a *Candida albicans*, ella concluye en que si existe actividad antifúngica frente a *Candida albicans*, con un CMF de 20,52 mg/ul. Comparando este resultado con el presente estudio, el *Syzygium aromaticum* presenta un CMF de 34,75 mg/ul.

Es importante resaltar que, al ser sometido el aceite esencial a menores concentraciones, será menos efectivo o no presentara halos de inhibición. Los experimentos *In Vitro* tienen sus limitaciones en cuanto a la posible eficacia *In Vivo*; los resultados de este estudio merecen atención respecto del efecto citotóxico de dicho aceite esencial.

Por último, tenemos que reafirmar el hecho que en una planta existen diferentes principios activos y que muchos de ellos actúan sinérgicamente, y el aceite esencial del clavo de olor no está exento de esta verdad y se constituye en una alternativa terapéutica buena; sin embargo, aún se requieren estudios más específicos para su utilización con fines terapéuticos.

CONCLUSIONES

- Se determinó que el aceite esencial obtenido de ***Syzygium aromaticum*** “Clavo de Olor” posee una fuerte actividad antifúngica frente a ***Candida albicans*** ATCC 90028.
- El grado de sensibilidad que presenta la ***Candida albicans*** ATCC 90028 frente al aceite esencial de ***Syzygium aromaticum*** “Clavo de Olor” es altamente sensible a concentraciones de 31.598 mg/ul – 473.97 mg/ul.
- La concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de ***Syzygium aromaticum*** para ***Candida albicans*** ATCC 90028 fue de 31.598 mg/ul.
- La concentración mínima fungicida (CMF) del aceite esencial de ***Syzygium aromaticum*** para ***Candida albicans*** ATCC 90028 fue de 34.7578 mg/ul.

RECOMENDACIONES

1. Se debe tener en cuenta la acción antifúngica que presentó el aceite esencial de ***Syzygium aromaticum*** “Clavo de Olor” frente a la ***Candida albicans***, para que sea utilizado en investigaciones futuras frente a otros hongos causantes de micosis locales o sistémicas
2. Realizar pruebas “in vivo” para valorar la efectividad y la toxicidad, como también poder determinar la dosis terapéutica de ***Syzygium aromaticum*** “Clavo de Olor”.
3. Elaborar diferentes formas farmacéuticas de acuerdo a la vía de administración utilizando aceite esencial de ***Syzygium aromaticum*** “Clavo de Olor” para realizar ensayos clínicos en pacientes con candidiasis.

FUENTES DE INFORMACIÓN

1. GUILLEM PRATS. Microbiología Clínica. (2005) 1ra Ed. Panamericana. Argentina. Capítulo 5.
2. CALA H. CERVERA. Candidiasis Crónica. (2003) Barcelona. Pag 10-24.
3. KUKLINSKI CLAUDIA (2003), Farmacognosia “Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural”-Ediciones Omega.
4. CHOQUEHUANCA,G.L. (2004). Tesis “Efecto antibacteriana in vitro del aceite esencial de Satureja boliviana muña frente a bacterias patógenas Gram positivas y Gram negativas”. Universidad Nacional de San Agustín. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias escuela profesional y académica de Biología. Arequipa-Perú.
5. HUAMANÍ ACHATA, MARÍA E. Y COL. (2005) “Determinación de la actividad antifúngica contra *Cándida Albicans* y *Aspergillus niger* de 10 plantas medicinales de 3 departamentos del Perú”. Universidad Nacional Mayor de San Marcos-Facultad de Farmacia y Bioquímica. Lima-Perú.
6. AGUILAR-GONZALES, LOPEZ-MALO. (2013) “Extractos y aceite esencial del clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) y su potencial aplicación como agentes antimicrobianos en alimentos. Universidad de las Américas Puebla-Departamento de Ingeniería Química. Puebla-México.
7. DIXON DM, RHODES JC, FROMTLING R.A. (1999): Taxonomy, classification, and morphology fungi. In Murray PR et al, ed 7, editors: *Manual of clinical microbiology*, Washington, DC, American Society for Microbiology.
8. MURRAY PATRICK R, ROSENTHAL KEN S. (2012). “Microbiología medica” 5ta Edicion-Elsevier science impr.Mosby. Pag 67.

9. LEHMAN (1998). PF: Fungal structure and orphology. In Ajello L, Hay RJ, vol 4, editors: Topley and Wilsons Microbiology and microbial diseases, Medical mycology. London.
10. PONTON J, MORAGUES MD, GENE J, GUARRO J, QUINDOS G. (2002). Revista iberoamericana de micología: Hongos y actinomicetos alergénicos, 1era Edición. España: Bilbao.
11. KONEMAN. Diagnóstico Microbiológico. 6ta Ed. Panamericana. Argentina. Capítulo 21.
12. KONEMAN. ALLEN. JANDA. (1987) "Diagnostico Microbiológico"-Texto y Atlas en color-6ta Edición. Editorial medica Panamericana.
13. MARIA ISABEL MONTOYA ROMERO.(2010) Las cepas ATCC. Herramienta indispensable en el control de calidad interno en Microbiología. Pág. 1-5
14. TAROCO, SEIJA, VIGNOLI. "Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica". Temas de Bacteriología y Virología Médica. Pág. 663-670.
15. FACULTAD DE AGRONOMÍA UNLPAM. Glosario de Términos Botánicos. Pág. 18
16. ROBERT THORNTON MORRISON. ROBERT NEILSON BOYD. (1987). Química Organica. 5ta Ed. Mexico. Pág. 224.
17. LOPEZ-GETA, PULIDO BOSCH, BAQUERO ÚBEDA. Agua, Minería y Medio Ambiente.(2005). España. Ed. V. Serie. Pág. 756.
18. SALVADOR BADUI DERGAL. Química de los alimentos. 4 ed. (2006). Mexico. Pág. 446.

19. Cosco D. Actividad inhibitoria del crecimiento de *Streptococcus mutans* y de flora mixta salival por acción de aceite esencial de la *Matricaria chamomilla* manzanilla. [Tesis, para optar al título de Cirujano Dentista]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2010
20. VERONICA CAÑEDO, TERESA AMES. Manual de Laboratorio para el manejo de Hongos Entomopatógenos. (2004) Perú. Pág. 20.
21. FORBES, SAHM, WEISSFELD. Diagnostico Microbiologico. (2009). 12va Ed. Panamericana. Argentina. Pág. 784.
22. J.J. VILATA. Micosis Cutáneas. Buenos Aires. (2005). Edit. Panamericana. Pág. 29
23. NAVARRO GARCÍA VM, GONZALES A, FUENTES M, AVILES M, RIOS MY, ZEPEDA G, ROJAS M. (2003). Antifungal activities of nine traditional Mexican medicinal plants. *J Ethnopharmacol.* Pag. 85-89.
24. SHEIKH S., RIMPLE B. Et Al. (2011). Spice oil cinamaldehide exhibits potent anticandidal activity against fluconazol resistant clinical isolates. Disponible en: plantasmedicinales.org/index.php?895
25. MAOZ, M. Y NEEMAN, I. (1998). Antimion the fungi *Microsporum canis* and *Trichophyton rubrun* and on three bacterial species Letters in *Applied Microbiology.* Pag.61-63.
26. HUAMANI ACHATA, MARIA E. Y COL. (2005). "Determinación de la actividad antifúngica contra *Candida Albicans* y *Aspergillus niger* de 10 plantas medicinales de 3 departamentos del Perú" Universidad Nacional Mayor de San Marcos- Facultad de Farmacia y Bioquímica. Lima-Perú.

ANEXOS

1. Matriz de Consistencia

PROBLEMA GENERAL	OBJETIVO GENERAL	HIPOTESIS GENERAL	VARIABLE	METODOLOGIA
<p>¿Existirá efecto antifúngico <i>In Vitro</i> del aceite esencial de <i>Syzygium aromaticum</i> “clavo de olor” sobre <i>Candida albicans</i> ATCC 90028?</p>	<p>“Determinar el efecto antifúngico <i>In Vitro</i> del aceite esencial de <i>Syzygium aromaticum</i> “clavo de olor” sobre <i>Candida albicans</i> ATCC 90028”.</p>	<p>El Aceite Esencial de <i>Syzygium aromaticum</i> “clavo de olor” posee una acción antifúngica <i>In Vitro</i> sobre <i>Candida albicans</i> ATCC 90028.</p>	<p>V. Independiente: Acción antifúngica del Aceite Esencial de <i>Syzygium aromaticum</i> “clavo de olor”</p>	<p>Tipo y Nivel de Investigación: Experimental. Investigación explicativa. Método y diseño de investigación: Métodos descriptivo, deductivo, explicativo, analítico y estadístico. Diseño Experimental</p>
<p>Problemas Secundarios:</p> <ul style="list-style-type: none"> • ¿Cuál es el grado de sensibilidad que presenta <i>Candida albicans</i> ATCC 90028 al Aceite esencial de <i>Syzygium aromaticum</i> “clavo de olor” mediante la técnica de difusión en disco? • ¿Cuál es la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del Aceite esencial de <i>Syzygium aromaticum</i> “clavo de olor” frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 90028? • ¿Cuál es la Concentración Mínima Fungicida (CMF) del Aceite esencial de <i>Syzygium aromaticum</i> “clavo de olor” frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 90028? 	<p>Objetivos Específicos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Determinar el grado de sensibilidad que presenta <i>Candida albicans</i> frente al aceite esencial de <i>Syzygium aromaticum</i> “clavo de olor” mediante la técnica de difusión en disco. • Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial de <i>Syzygium aromaticum</i> “clavo de olor” frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 90028. • Determinar la Concentración Mínima Fungicida (CMF) del Aceite esencial de <i>Syzygium aromaticum</i> “clavo de olor” frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 90028. 	<p>Hipótesis Secundarias:</p> <ul style="list-style-type: none"> • La <i>Candida albicans</i> presenta una alta sensibilidad frente al aceite esencial de <i>Syzygium aromaticum</i> “clavo de olor” mediante la técnica de difusión en disco. • La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial de <i>Syzygium aromaticum</i> “clavo de olor” frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 90028 es de 0,01895 mg/ml. • La Concentración Mínima Fungicida (CMF) del Aceite esencial de <i>Syzygium aromaticum</i> “clavo de olor” frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 90028 es de 0,02052 mg/ml. 	<p>V. Dependiente: <i>Candida Albicans</i> ATCC 90028</p>	<p>Técnicas e Instrumentos: Escala de Duraffourd y Lapraz; y Escala de turbidez de Mc Farland.</p>

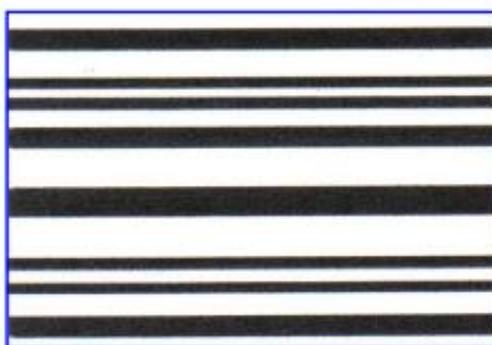
2. Escala de Duraffourd y Lapraz

DURAFFOURD Y LAPRAZ	
NULA (-)	Inferior o igual a 8 mm.
SENSIBILIDAD LIMITE (+)	De 9 a 14 mm.
SENSIBILIDAD MEDIA (++)	De 15 a 19 mm.
ALTAMENTE SENSIBLE (+++)	Igual o superior a 20 mm.

3. Escala de Mc Farland

N°	BaCl ₂ 0,048M ml	H ₂ SO ₄ 0,36M ml	Vf ml	N° Células
0,5	0,05	9,95	10	1,5 x 10 ⁸
1	0,1	9,9	10	3 x 10 ⁸
2	0,2	9,8	10	6 x 10 ⁸
3	0,3	9,7	10	9 x 10 ⁸
4	0,4	9,6	10	12 x 10 ⁸
5	0,5	9,5	10	15 x 10 ⁸
6	0,6	9,4	10	18 x 10 ⁸
7	0,7	9,3	10	21 x 10 ⁸
8	0,8	9,2	10	24 x 10 ⁸
9	0,9	9,1	10	27 x 10 ⁸
10	1	9	10	30 x 10 ⁸

Tabla de comparación para escala de Mc Farland:





Universidad Nacional "Jorge Basadre Grohmann" – Tacna
FACULTAD DE CIENCIAS

Escuela Profesional de: Biología-Microbiología, Física Aplicada y Matemática



"Año del Buen Servicio al Ciudadano"

CONSTANCIA

Se hace constar que el Bachiller de la Escuela Profesional de Estomatología de la Universidad Particular "Alas Peruanas" Señor Carlos Manuel Vizcarra Delgado con código de matrícula N° 20011178825 y con documento de Identidad N° 70080414 realizó la parte experimental de su tesis titulada "EFECTO ANTIFUNGICO *In Vitro* DEL ACEITE ESENCIAL DE *Syzygium aromaticum* (Clavo de Olor) SOBRE *Candida albicans*" con fecha del 09 de enero del 2017 hasta el 31 del presente mes.

La presente se extiende a petición del interesado para los fines que el estime a los treinta y un días del mes de enero del 2017.

Atentamente

Edwin Denis Obando Velarde
BIÓLOGO - MICROBIÓLOGO
Biólogo – Microbiólogo
Especialista del laboratorio de Microbiología
Edwin Denis Obando Velarde

Ciudad Universitaria Av. Miraflores s/n
Apartado 316 Teléfono:052-583000 Anexo: 2102 - Fax: 2101

4. FOTOS:

4.1. Extracción del Aceite Esencial

Foto 01



Se pesa el Clavo de Olor en una balanza analítica.

Foto 02



Obtención del aceite esencial mediante destilación por arrastre de vapor de agua.

Foto 03



Aceite esencial de *Syzygium aromaticum* "Clavo de Olor"

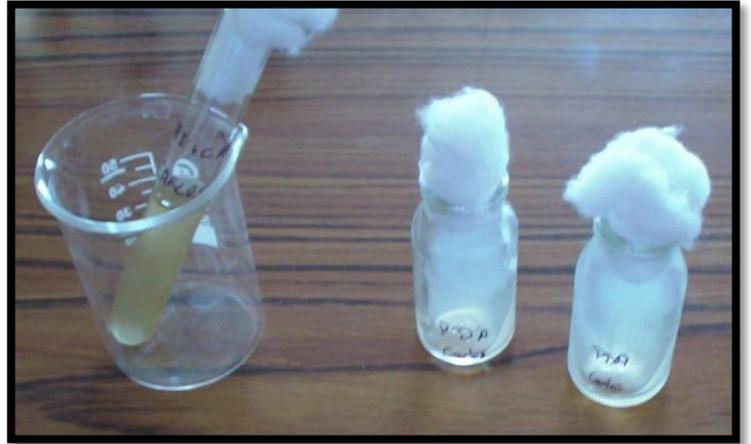
4.2. Preparación de los viales

Foto 04



Cepa Nativa de *Candida albicans*

Foto 05



Activación de las cepas y preparación de viales

Foto 06



Incubar los viales durante 24hrs.

4.3. Kirby Bauer

Foto 07



Diluir el Agar PDA

Foto 08

Aplicar el aceite esencial en los discos de sensibilidad.



Foto 09



Aplicar el Agar PDA en las placas Petri.

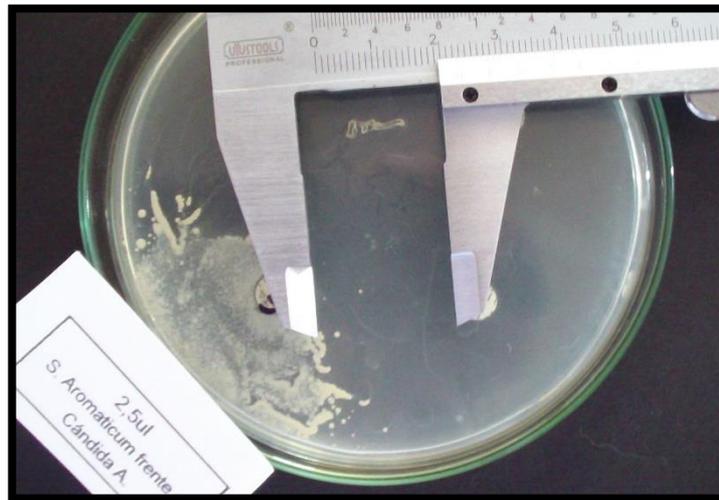
Foto 10



Aplicar los discos con aceite el aceite esencial en las placas con agar e incubarlas.

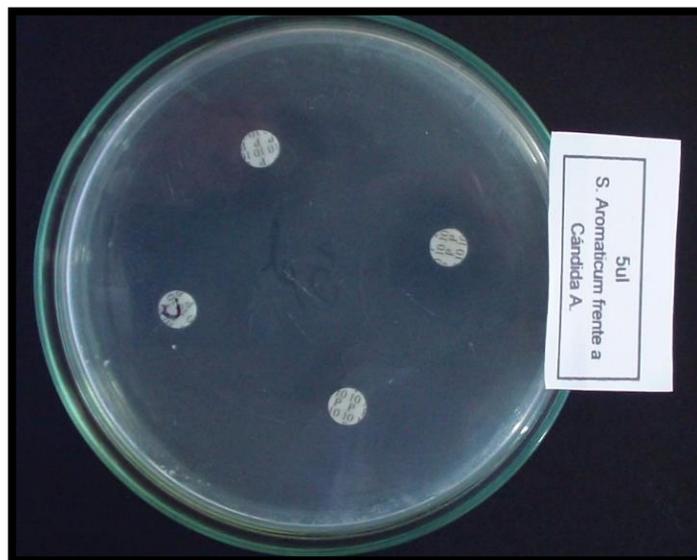
4.4. Sensibilidad

Foto 11



Se utiliza un vernier para medir el halo de inhibición.

Foto 12



No se observa crecimiento fúngico, debido a la sensibilidad de la *Candida albicans* frente al aceite esencial de *Syzygium aromaticum*.

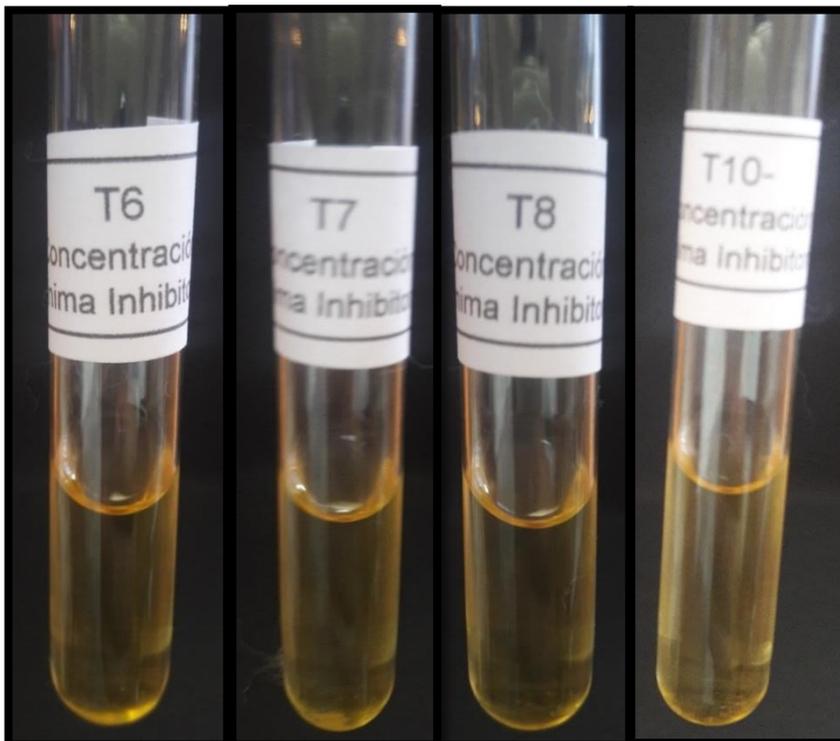
4.5. Concentración Mínima Inhibitoria. (CMI)

Foto 13



Se observa la turbidez de los tubos y se compara con el tubo de control negativo (tubo 10).

Foto 14



Se selecciona los tubos en los cuales no se observe turbidez o indicios de desarrollo micótico.

4.6. Concentración Mínima Fungicida. (CMF)

Foto 15

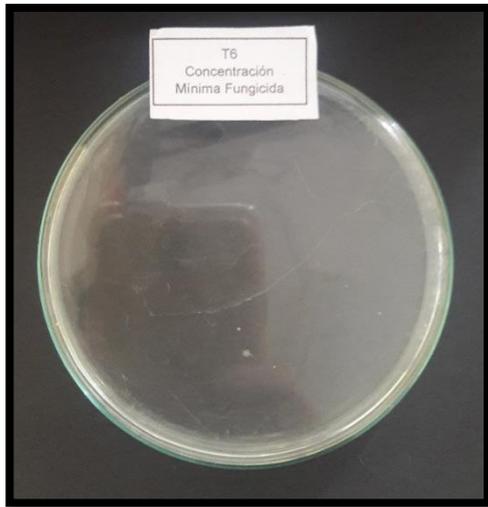
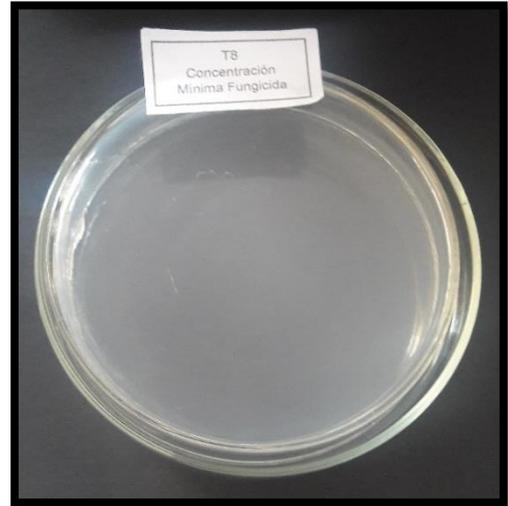


Foto 16



Se procede a incubar los tubos seleccionados en el MIC durante 24, se selecciona las placas en las que no exista crecimiento micótico como el CMF.