

**UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN - TACNA**

**Facultad de Ciencias de la Salud**

**Escuela Académico Profesional de Farmacia y Bioquímica**

**ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA “*in vitro*” DEL ACEITE ESENCIAL**

***Cinnamomun zeylanicum* Breyn “canela” FRENTE A**

***Cándida albicans* ATCC 6538, TACNA, 2012**

**TESIS**

**Presentada por:**

**Bach. MILAGROS ROSALÍA MARCA CUELLO**

**Para optar el Título Profesional de:**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO**

**TACNA – PERÚ**

**2013**

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASABRE GROHMANN-TACNA

Facultad de Ciencias de la Salud

Escuela Académico Profesional de Farmacia y Bioquímica

ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA "in vitro" DEL ACEITE ESENCIAL  
*Cinnamomum zeylanicum* Breyn "canela" FRENTE A  
*Cándida albicans* ATCC 6538, TACNA, 2012

TESIS

Presentada por:

Bach. MILAGROS ROSALÍA MARCA CUELLO

Para optar el Título Profesional de:

QUÍMICO FARMACÉUTICO

Aprobado por Unanimidad ante el siguiente jurado

  
Mgr. MARÍA DALILA SALAS DE CORNEJO  
Presidenta

  
Dr. RICARDO ORTÍZ FAUCHEUX  
Miembro

  
Q.F. YEMILE BERRIOS ESPEJO  
Miembro

  
Q.F. ORLANDO RIVERA BENAVENTE  
Asesor

## **DEDICATORIA**

A Dios, por ser mi guía y maestro en mi vida personal y profesional, por ser la luz que alumbra mis días oscuros. Por darme la fortaleza y perseverancia para seguir adelante y no rendirme a pesar de las circunstancias adversas.

A mis padres Carlos y Asunción, por su paciencia, amor y dedicación en mi formación de hija y estudiante, gracias por su sacrificio y apoyo incondicional en todo momento de mi vida.

A mis hermanas (Judhit, Karen y Belinda) y hermanito (Mathías) que con sus palabras de aliento y sonrisas me motivaban a seguir adelante.

A Eduardo, por ser mi compañero y amigo incondicional en todo momento.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, por ser mi guía y apoyo incondicional en mi vida.

A mis padres, por ayudarme a lograr mis objetivos.

A mi hermana Judhit y hermanos pequeños (Karen, Belinda y Mathías) por brindarme su cariño y palabras de aliento cuando más lo necesité.

A mi asesor Q.F. Orlando Rivera Benavente por su tiempo brindado en la preparación y realización del presente trabajo, dedicación y su valiosa asesoría.

Al Mblgo. Edwin Obando Velarde por su constante apoyo, paciencia, dedicación y consejos para la culminación de este trabajo.

A la Q.F. Yemile Berríos Espejo por su apoyo y palabras de aliento para seguir adelante con mi tesis.

Al C.D. Percy Huamán Álvaro, por su amistad, apoyo y palabras de motivación para la realización de mi tesis.

## CONTENIDO

	Pág.
<b>RESUMEN</b>	
<b>ABSTRACT</b>	
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO I: EL PROBLEMA</b>	<b>4</b>
1.1. Planteamiento del Problema	4
1.2. Formulación del Problema	6
1.3. Justificación	6
1.4. Objetivos	8
1.4.1. Objetivo General	8
1.4.2. Objetivos Específicos	8
1.5. Hipótesis	9
1.6. Determinación de Variables	9
1.7. Operacionalización de Variables e Indicadores	10
<b>CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO</b>	<b>11</b>
2.1. Antecedentes	11

2.2. Bases Teóricas	17
2.2.1. Aceites Esenciales	17
2.2.1.1. Definición	17
2.2.1.2. Propiedades	17
2.2.1.3. Localización y distribución	19
2.2.1.4. Función de los aceites esenciales en el vegetal	20
2.2.1.5. Composición química	20
2.2.1.6. Extracción de aceites esenciales	21
2.2.1.7. Usos de los aceites esenciales	24
2.2.2. <i>Cinnamomum zeylanicum</i> Breyn ( <i>Canela</i> )	26
2.2.2.1. Hábitat y distribución geográfica	26
2.2.2.2. Descripción general	27
2.2.2.3. Clasificación taxonómica	27
2.2.2.4. Composición química del aceite esencial	28
2.2.2.5. Propiedades Medicinales	28
2.2.3. Hongos	29
2.2.3.1. Generalidades:	29
2.2.3.2. Estructura	31
2.2.3.3. Levaduras	36
2.2.4. <i>Cándida albicans</i>	38
2.2.4.1. Descripción micológica	38

2.2.4.2. Descripción taxonómica	38
2.2.4.3. Composición química	39
2.2.4.4. Ecología	41
2.2.4.5. Anatomía patológica y patogenia	41
2.2.4.6. Epidemiología	43
2.2.5. Candidiasis	45
2.2.5.1. Generalidades	45
2.2.5.2. Tipos de candidiasis	47
<b>CAPÍTULO III: MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>53</b>
3.1. Lugar de Estudio	53
3.2. Tipo de Estudio	53
3.3. Unidades de Estudio	53
3.3.1. Biológico	53
3.3.2. Microbiano	53
3.4. Material de Laboratorio	53
3.5. Metodología	56
3.5.1. Diseño experimental	56
3.5.2. <i>Cinnamomum zeylanicum</i> Breyn “canela”	56
3.5.2.1. Recolección	56
3.5.2.2. Extracción y rendimiento del aceite esencial	57
3.5.3. Cepas	61

3.5.3.1. Recolección	61
3.5.4. Evaluación de la actividad del aceite esencial de <i>Cinnamomum zeylanicum</i> Breyn	
a) Preparación de la dilución	61
b) Preparación de los discos	65
c) Preparación del inóculo micótico	67
d) Preparación del medio para la prueba de sensibilidad	67
e) Inoculación de las placas	68
f) Dispensación de los discos	68
g) Incubación	69
h) Lectura de los halos de inhibición	69
3.5.5. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria	70
a) Preparación del inóculo micótico	70
b) Preparación de la solución madre	70
c) Preparación de la CMI	72
d) Incubación	75
e) Lectura	75
3.5.6. Determinación de la Concentración mínima fungicida	75
3.5.7. Procesamiento y análisis estadístico	76
<b>CAPÍTULO IV: RESULTADOS</b>	<b>77</b>
<b>CAPÍTULO V: DISCUSIÓN</b>	<b>89</b>

<b>CONCLUSIONES</b>	<b>100</b>
<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>102</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	
<b>ANEXOS</b>	

## RESUMEN

**Objetivo:** Determinar la actividad antimicótica "in vitro" del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn "canela" frente a *Cándida albicans* ATCC 6538. **Metodología:** 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. **Resultados:** Se demostró que *Cándida albicans* presenta alta sensibilidad al aceite esencial. La CMI para *Cándida albicans* fue de 0,01895 mg/ml y la CMF fue de 0,020529166 mg/ml. **Conclusión:** El aceite esencial de *Cinnamomun zeylanicum* Breyn presenta actividad antimicótica frente a *Cándida albicans*.

**Palabras claves:** *Cinnamomun zeylanicum* Breyn, aceite esencial, *Cándida albicans*, halo de inhibición, CMI, CMF.

## ABSTRACT

**Objective:** Determine the "in vitro" antifungal activity of the essential oil of *Cinnamomum zeylanicum* Breyn "cinnamon" against *Candida albicans* ATCC 6538. **Methodology:** The essential oil of the barks of *Cinnamomum zeylanicum* Breyn "cinnamon" was obtained by Steam Distillation. Using the following methods: a) Kirby Bauer, the degrees of sensitivity was gotten according to the size of the inhibition zones, b) By dilution in liquid medium minimum inhibitory concentration (MIC) was determined and c) Por agar diffusion minimum Fungicidal concentration (MFC) of the essential oil. **Results:** It was demonstrated that *Candida albicans* has a high sensitivity to essential oil. MIC for *Candida albicans* was 0.01895 mg / ml and MFC was 0.020529166 mg / ml. **Conclusion:** *Cinnamomum zeylanicum* Breyn essential oil has antifungal activity against *Candida albicans*.

**Keywords:** *Cinnamomum zeylanicum* Breyn, essential oil, *Candida albicans*, inhibition zone, MIC, MFC.

## INTRODUCCIÓN

La medicina tradicional a base de plantas medicinales es un campo interesante y se convierte en una alternativa terapéutica para patologías específicas por su bajo costo y fácil acceso a la población de bajos recursos económicos. (25)

Desde la antigüedad las plantas son consideradas un alto potencial terapéutico para el tratamiento de diversas enfermedades infecciosas. (32)

Perú país pluricultural y multiétnico, con una gran variedad geográfica y ecológica que permite un amplio abanico de posibilidades dentro de las prácticas curativas tradicionales: la costa norte, desde el departamento de Piura hasta el norte de Lima; la del sur andino o aymara, con base en Puno; la quechua o andina, con la base en el Cuzco; y la vasta región amazónica con sus distintas variantes étnicas, son en general, las de mayor importancia. (40)

La Organización Mundial de la Salud (OMS, 2002) hizo un llamado para que los países incrementen sus esfuerzos para controlar la resistencia antimicrobiana; promoviendo el uso racional de los mismos; desarrollando sistemas de comunicación para recabar y compartir datos sobre resistencia a patógenos específicos promoviendo la investigación y desarrollo de nuevos agentes antibacterianos. (36)

En los últimos años se ha presentado un incremento en la incidencia de enfermedades fúngicas en los seres humanos (19); debido al aumento considerable de pacientes inmunocomprometidos, quimioterapia, nutrición parenteral, cirugía de trasplante y el 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, siendo las dermatomicosis un problema serio para niños de las naciones de tercer mundo como una consecuencia del deficiente cuidado sanitario (21). Los fármacos disponibles actualmente, tienen una toxicidad importante, producen recurrencia o causan resistencia, razón por la cual se está procurando descubrir nuevos agentes antifúngicos más potentes pero sobre todo seguros (19). Desafortunadamente, las células fúngicas y humanas no son muy diferentes. Comparten gran parte de las vías del metabolismo intermediario, utilizan enzimas muy similares y no es fácil encontrar blancos que ofrezcan la selectividad requerida para obtener un antifúngico seguro. 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 (16), 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.

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 (25); y considerando que la presencia del compuesto de cinamaldehído en el aceite natural en estudio a la cual se le atribuye efectos antifúngicos es que se desarrolla el presente trabajo de investigación a fin de determinar la actividad antimicótica “*in vitro*” del aceite esencial de *Cinnamomun zeylanicum* Breyn “Canela” frente a *Cándida albicans* ATCC 6538; la cual servirá de base para futuros estudios.

## **CAPÍTULO I: EL PROBLEMA**

### **1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La frecuencia de infecciones invasoras causadas por *Cándida* 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 incorporación de nuevas modalidades terapéuticas. Algunas de ellas, como tratamientos antimicrobianos de amplio espectro, uso de nutrición 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 (37).

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 de que han aumentado las investigaciones científicas en este fascinante campo, todavía no se conocen todo los principios activos responsables de las propiedades de muchas plantas. (39)

En el Perú, la gran biodiversidad botánica por un lado y los conocimientos incipientes en sus propiedades fitoquímicas por otro, marcan una brecha considerable que requiere esfuerzos coordinados de diferentes sectores de la sociedad científica, con fines tanto académicos como prácticos de aprovechar el potencial natural. Además las plantas medicinales han sido consideradas a través de los años como el origen o punto de partida del desarrollo de medicamentos, ya que han contribuido enormemente al descubrimiento de nuevas sustancias con actividad biológica y a la producción de fitofármacos, que constituyen la fuente de medicamentos más económica y de mayor disponibilidad para la mayoría de los países (17).

Considerando que la incidencia por infección de *Cándida* 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 de la canela para infecciones micóticas por parte de nuestros

pobladores de bajos recursos económicos formulamos la siguiente interrogante 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 de éstos.

## 1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Será efectivo el uso del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn “canela” como antimicótico frente a *Cándida albicans* ATCC 6538?

## 1.3. JUSTIFICACIÓN

Las constantes apariciones de cepas resistentes no solamente a los antifúngicos convencionales es preocupante y es por ello que se recurre a la búsqueda de nuevas alternativas eficaces y seguras provenientes de productos naturales, donde sus principios activos se encuentran equilibrados y sus efectos indeseables son limitados en comparación con los fármacos sintéticos.

La investigación en el uso de plantas medicinales forma parte de la etnobotánica. En tal sentido cabe mencionar que alrededor del 80% de la población mundial utiliza las plantas como medio curativo, siendo varias las

razones por las que socialmente el uso de las plantas medicinales está tomando un auge en estos tiempos, ya sea como respuesta a una medicina alopática, muchas veces iatrogénica; en otros casos por la reducida o inexistente accesibilidad económica de la población a los medicamentos de síntesis, aunado al hecho incontrovertible que los países en vías de desarrollo, como es el caso de Perú, existe un uso indiscriminado de productos farmacéuticos de dudosa efectividad.

Por otro lado la candidiasis mayormente causada por *Cándida albicans*, es una patología que en la actualidad está experimentando un incremento en la frecuencia de su aparición no sólo en pacientes inmunosuprimidos y hospitalizados sino que también en aquellos en los que las circunstancias medio ambientales los exponen.

Por ello, y considerando lo dicho en la pag.3, existe el interés en el desarrollo del presente trabajo; de determinar si este *Cinnamomun zeylanicum* Breyn “canela” presenta actividad antimicótica frente al agente *Cándida albicans*; de esta manera se contribuirá con nuevas alternativas naturales para combatir las diversas afecciones de este microorganismo.

## 1.4. OBJETIVOS

### 1.4.1. OBJETIVO GENERAL

- Determinar la actividad antimicótica “in vitro” del aceite esencial obtenido de la corteza de ***Cinnamomum zeylanicum* Breyn** “canela” frente a ***Cándida albicans* ATCC 6538**

### 1.4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extraer el aceite esencial de la corteza de ***Cinnamomum zeylanicum* Breyn** por arrastre a vapor.
- Determinar la composición fitoquímica del aceite esencial de ***Cinnamomum zeylanicum* Breyn** en un análisis cualitativo como cuantitativo mediante cromatografía de gases con detección de masa.
- Determinar el grado de sensibilidad que presenta ***Cándida albicans*** al aceite esencial de ***Cinnamomum zeylanicum* Breyn** (Canela), mediante la técnica de difusión en disco.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de ***Cinnamomum zeylanicum* Breyn** frente a ***Cándida albicans* ATCC 6538**.
- Determinar la concentración mínima fungicida (CMF) del aceite esencial de ***Cinnamomum zeylanicum* Breyn** frente a ***Cándida albicans* ATCC 6538**.

## 1.5. HIPÓTESIS

Dado que la creencia popular le atribuye a *Cinnamomum zeylanicum* Breyn “canela” efecto antimicótico, es probable que su aceite esencial sea eficaz para eliminar a *Cándida albicans* cuando se hacen pruebas in vitro a nivel de laboratorio.

## 1.6. DETERMINACIÓN DE VARIABLES

### 1.6.1. TIPOS DE VARIABLES

#### a) Variable independiente

Actividad antimicótica del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn (Canela).

#### b) Variable dependiente

Agente micótico patógeno (*Cándida albicans* ATCC 6538).

## 1.7. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES E INDICADORES

VARIABLE	DEFINICIÓN	DIMENSIÓN	INDICADOR	ESCALA
<b>VARIABLE INDEPENDIENTE</b>  <b>Actividad antimicótica del aceite esencial de <i>Cinnamomum zeylanicum</i> Breyn (Canela)</b>	Capacidad del aceite esencial de <i>Cinnamomum zeylanicum</i> Breyn (Canela) de inhibir el crecimiento micótico que se desarrolla en un medio dado.	Cuantitativa	Diámetro de halo de inhibición	Medido en mm.
		Cualitativa	Diámetro de halo de inhibición (Según las pautas de Duraffourd)	Nula (-) Sensible (+) Muy Sensible (++) Sumamente sensible (+++)
<b>VARIABLE DEPENDIENTE</b>  <b><i>Cándida albicans</i></b>	Especie micótica que desempeña un papel preponderante en el desarrollo de diversas micosis.	Cepa ATCC 6538  <i>Cándida albicans</i>	Crecimiento micótico de la cepa.	Turbidez  UFC

## CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

### 2.1. ANTECEDENTES

En diversas investigaciones a nivel mundial se han establecido que muchas plantas aromáticas poseen actividad antibacteriana, antimicótica, antiparasitaria, antiviral e inclusive con efectos insecticidas sobre ciertos mosquitos así también se emplean los aceites esenciales para la conservación de alimentos procesados. (25)

En Brasil, Juliana Moura Mendes y colaboradores (2011) investigaron la “Actividad antifúngica del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* sobre cepas de *Cándida tropicalis* de aislados clínicos”, En este estudio se investigó la actividad del aceite esencial contra las cepas de ***C. tropicalis***, utilizando el método de difusión en disco, la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración fungicida mínima (CFM). La CIM y CFM del aceite esencial de ***Eugenia caryophyllata*** fueron 512 y 1024 µg/ml, mientras que los de la anfotericina B fueron idénticos, 2 µg/ml. Por lo tanto, se pudo concluir que el aceite esencial de ***E. caryophyllata*** tiene potente actividad antifúngica y puede ser objeto de nuevos estudios sobre esta actividad. (28)

En México, Beatríz Padrón Márquez (2010) realizó investigaciones en 4 plantas pertenecientes a la familia Lauraceae y Myrtaceae de las cuales se obtuvieron extractos a partir de ***Cinnamomum zeylanicum* Nees** (canela), ***Syzygium aromaticum*** (clavo), ***Eucalyptus camaldulensis*** (eucalipto) y ***Psidium guajava*** (guayabo); los extractos se prepararon con solventes de diferente polaridad con agitación a temperatura ambiente y mediante soxhlet. Posteriormente, se evaluó su acción antimicrobiana por el método de difusión en placa. Se separaron las fracciones de los extractos con mayor actividad por medio de cromatografía en capa fina, se localizó la fracción responsable de dicha actividad por ensayos de bioautografía, se identificaron sus grupos funcionales y estructura química utilizando pruebas químicas y espectroscopía de masas. Adicionalmente se analizó su actividad citotóxica sobre células OK, LLCPK-1 y MCF-7. En cuanto a la actividad antimicrobiana se obtuvieron 24 extractos, de éstos, tres extractos hexánicos presentaron mayor actividad: el extracto 4 correspondiente a clavo fue activo contra ***Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Cryptococcus neoformans*, *Cándida albicans*, *C. parapsilosis*, *Trichophyton tonsurans* y *Sporothrix schenckii***; el extracto 10 de eucalipto fue activo contra ***T. tonsurans*** y el extracto 13 de canela presentó una gran actividad contra ***S. aureus*, *E. coli*, *B. cereus*, *C. neoformans*, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *T. tonsurans* y *S. Schenckii***. Por medio de cromatografía en capa fina se

separaron las fracciones de estos extractos y mediante bioautografía se identificaron las siguientes fracciones activas: del clavo se obtuvo la fracción Df (Rf 0,68), del eucalipto, la J (Rf 0,80) y de la canela se separó la fracción I (Rf 0,78). La fracción Df resultó positiva para insaturaciones y oxhidrilos fenólicos, después de purificarla se identificó como eugenol mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas (CG-EM). La fracción J resultó positiva para la presencia de insaturaciones, alcaloides y cumarinas, mientras en la fracción I se determinaron insaturaciones y alcaloides. Cuando se analizaron por CG/EM esta fracción presentó un pico de mayor intensidad que fue identificado como cinamaldehído. Las fracciones (Df, I, J) no fueron citotóxicas contra las líneas celulares LLCPK-1, OK y CHANG sin embargo la fracción Df resultó citotóxica contra la línea celular de cáncer de mama MCF-7 a una concentración de 100 µg/mL. De acuerdo a los resultados obtenidos todos los extractos evaluados presentan actividad, al menos sobre uno de los microorganismos probados. Los extractos más activos fueron los no polares del clavo; mediante ensayos biodirigidos de estos se obtuvo la fracción Df (eugenol), la cual tuvo actividad sobre bacterias Gram (+), Gram (-) y relevante actividad sobre *C. albicans* (CMI 12,5 µg/ml) y *C. neoformans* (3,1µg/ml) en comparación con el control positivo que presentó una CMI de 125,0 y 15,6 µg/ml respectivamente, además de presentar toxicidad selectiva sobre las células tumorales MCF-7 y no sobre las normales. Con este trabajo

se pretendió contribuir en la investigación para el desarrollo de compuestos antimicrobianos y antitumorales derivados de productos naturales que sean tanto eficaces como seguros. (29)

En Perú, Carlos A. Cano Pérez (2008), evaluó la Actividad antimicótica in vitro y elucidación estructural del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* “muña”. El aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* se ha obtenido por el método de destilación por arrastre de vapor de agua. Este fue sometido a análisis físico-químico y determinación de la composición química (elucidación) mediante cromatografía de gases (CG), determinándose los siguientes monoterpenos: Pulegona, Limoneno, Mentona y Mirceno, como responsables de la actividad fungicida-fungistática. Mediante el método de agar en difusión, se determinó la actividad antimicótica, frente a las cepas de: *Candida albicans* y por el método de dilución en tubo la inhibición del crecimiento fúngico de: *Trichophytun tonsurans*, *Trichophytun mentagophytus*, *Microsporun canis*. Los diámetros de la prueba de difusión en agar de *Candida albicans*, fueron de: 35 mm al 100 % del aceite esencial de muña y 30 mm al 50% del aceite esencial y los dermatofitos (*Trichophytun tonsurans*, *Trichophytun mentagophytus*, *Microsporun canis*.), su crecimiento fue inhibido por el aceite esencial. Se demostró la actividad antimicótica del aceite esencial de muña, probablemente por la acción de los monoterpenos encontrados. (22)

También en Perú, Huamaní Achata, María Elena y Ruiz Quiroz, Julio Reynaldo (2005), mediante el trabajo “Determinación de la actividad antifúngica contra *Cándida albicans* y *Aspergillus Níger* de 10 plantas medicinales de 3 departamentos del Perú”; investigaron la actividad antifúngica in vitro de doce extractos etanólicos correspondientes a diez plantas medicinales peruanas; ***Annona cherimolia Mill, Annona muricata L., Bidens pilosa L., Hypericum lacrifolium L. Juglans neotropica DDiels, Piper spp. , Plantago major L., Psidium guajava L.Schinus molle L. y Spartium junceum L.*** La actividad antifúngica se evaluó mediante los métodos de difusión en agar y dilución en agar para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI). Los microorganismos de prueba utilizados fueron las levaduras ***Cándida albicans ATCC 10231*** y ***Cándida albicans cepa clínica***, así como ***Aspergillus niger ATCC 16404***. De doce extractos investigados, seis presentaron actividad antifúngica consistente con un diámetro de halos de inhibición #18mm (Prueba de Difusión en agar) frente a ***Cándida albicans*** y ***Aspergillus niger ATCC 16404***. Ningún extracto mostró actividad consistente frente a la cepa clínica de *Cándida albicans* y *Aspergillus niger ATCC 16404*. La CMI de los extractos que presentaron actividad consistente frente a ***Cándida albicans ATCC 10231***, fue de 250 ug/ml para ***Hypericum laricifolium L., Juglans neotropica Diels, Psidium guajava L. y Schinus molle*** y de 500 ug/ml para ***Piper spp.*** No se determinó la CMI de los extractos (*Juglans neotropica Diels* y *Psidium guajava*

L.) que presentaron halos frente al *Aspergillus niger* ATCC 16404 por considerarlos sin actividad significativa (<18mm). Los antifúngicos Nistatina y Fluconazol fueron incluidos en el estudio como controles positivos. (26)

De acuerdo a los antecedentes antes mencionados existe una gama de microorganismos patógenos que son los causantes de múltiples infecciones intra-extrahospitalarias que se encuentran a nivel mundial y que nuestro país no es ajeno a esta realidad. Las infecciones fúngicas han ido ganando terreno por la morbilidad de pacientes hospitalizados. Aproximadamente 90% de infecciones fúngicas humanas son causadas por ***Cándida***, ***Aspergillus***, ***Cladosporium***, ***Epidermophyton***, ***Trichophyton spp*** y ***Microsporum***. Los casos que requieren mayor atención son las causantes de micosis sistémicas debidos a: ***Aspergillus fumigatus***, ***Cándida albicans***, ***Cryptococcus neoformans***, ***Fusarium sp.***, ***Histoplasma capsolatum*** y ***Pneumocystis carinii***. Las cuales se han incrementado en los últimos años. ***Aspergillosis*** pulmonar invasiva es la principal causa de muerte atribuible en receptores de trasplante de médula ósea. (31)

## **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. Oficialmente, se denominan aceites esenciales los productos que se pueden obtener por arrastre con corriente de vapor de agua o por expresión del pericarpio de ciertos frutos. 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. Poseen índices de refracción elevados y presentan actividad óptica (desvían el plano de la luz polarizada, tienen poder rotatorio). (13)

#### **2.2.1.2. Propiedades (13)**

**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 la 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 de 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.
- f) Solubilidad:** Los aceites esenciales suelen ser insolubles en agua (aunque hay ciertas esencias que son parcialmente solubles porque alguno 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.(13)

### **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 ó Umbelíferas: Anís, hinojo.

Labiadas o Lamiáceas: menta, melisa, lavanda.

Lauráceas: Canela.

Asteráceas ó Compuestas: Manzanilla.

Mirtáceas. Eucalipto, Clavo.

Rutáceas: Cítricos.

Los aceites esenciales se acumulan en cavidades secretoras, en células, en pelos secretores, canales secretores, etc. (13)

Localización de los aceites esenciales	
<i>Raíz, rizoma:</i> cúrcuma, jengibre	<i>Sumidades floridas:</i> menta, lavanda, romero
<i>Fruto:</i> anís, enebro	<i>Flores:</i> manzanilla
<i>Corteza:</i> Canela	<i>Hojas:</i> eucalipto, laurel, boldo
<i>Leño:</i> Alcanfor	

#### 2.2.1.4.- Función de los aceites esenciales en el vegetal:

Su función en la planta sigue en estudio, pero se le atribuyen algunos de los siguientes beneficios: para regular su temperatura, liberándolos como vapores; como atractivo para los insectos colaboradores de la polinización, ó como repelente para los insectos dañinos. (13, 27)

#### 2.2.1.5. Composición química

Existe una gran cantidad de terpenos (principales componentes de la resina y del aguarrás). El nombre terpeno deriva de la palabra *turpentine*, "aguarrás" en inglés. Químicamente, forman una amplísima y muy diversa familia de sustancias naturales. Son producidos principalmente por una gran variedad de plantas, particularmente las coníferas, aunque algunas otras especies también las producen. No sólo son de poco valor los terpenos y sesquiterpenos, para la fuerza y carácter de los aceites, sino

que también se oxidan y polimerizan rápidamente en reposo para formar compuestos de un sabor fuerte y semejante a la trementina. Además, los terpenos son insolubles con la baja intensidad del alcohol empleado como disolvente, por lo que forman soluciones oscuras que se aclaran con dificultad. De aquí que sea deseable eliminar los terpenos y sesquiterpenos de muchos aceites. El aceite esencial sin terpenos tiene poca tendencia a enranciarse, aunque no tiene la frescura original. Cada aceite tiene una composición diferente por ello la desterpenación requiere de un proceso especial. Se pueden aplicar dos métodos, ya sea la eliminación de terpenos, sesquiterpenos y parafinas por destilación fraccionada a presión reducida, o la extracción de los compuestos oxigenados más solubles, con alcohol diluido u otros disolventes. (5)

#### **2.2.1.6. 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 flúidos 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 las 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. (24)

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 de muchos solventes orgánicos volátiles. (23,24)

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 otros medios físico-químicos. 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. (24, 26)

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 dióxido 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.

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. (24)

### **2.2.1.7. Usos**

#### **a) Industria Alimentaria**

Se emplean para condimentar carnes preparadas, embutidos, sopas, helados, queso, etc. Los aceites más empleados por esta industria son el cilantro, naranja y menta, entre otros. También son utilizados en la preparación de bebidas alcohólicas y no alcohólicas, especialmente refrescos, producción de caramelos, chocolates y otras golosinas.

#### **b) Industria Farmacéutica**

Se usan en cremas dentales (aceite de menta e hinojo), analgésicos e inhalantes. El eucaliptol es muy empleado en odontología. Son utilizados en la fabricación de neutralizantes de sabor desagradable de muchos medicamentos (naranjas y menta, entre otros).

#### **c) Industria de Cosméticos**

Esta industria emplea los aceites esenciales en la producción de cosméticos, jabones, colonias, perfumes y maquillaje. En este campo se pueden citar los aceites de geranio, lavanda, rosas y pachouli.

**d) Industria de productos de uso veterinario**

Esta industria emplea el aceite esencial de *Chenopodium ambrosoides* muy apreciado por su contenido de ascaridol, vermífugo. También requiere limoneno y mentol como insecticidas.

**e) Desodorantes Industriales**

Actualmente se ha desarrollado el uso de esencias para disimular el olor desagradable de algunos productos industriales como el caucho, los plásticos y las pinturas. La industria de las pinturas emplea limoneno como disolvente biodegradable. También se imparte olor a juguetes. En textiles, como enmascaradores de olores en tratamientos con mordientes antes y después del teñido. En papelería, para impregnar de fragancias cuadernos, tarjetas, papel higiénico, toallas faciales.

**f) Industria tabacalera**

Demanda mentol para los cigarrillos mentolados.

**g) Biocidas e insecticidas**

Existen esencias con propiedades bactericidas, como el tomillo, clavo, salvia, mentas, orégano, pino, etc. Otras son insecticidas:

- Contra hormigas: *Mentha spicata* (spearmint), *Tanacetum* y poleo.
- Contra áfidos: Ajo, otros *Allium*, coriandro, anís, albahaca.
- Contra pulgas: Lavanda, mentas, lemongrass, etc.
- Contra moscas: Ruda, citronela, menta, etc.
- Contra piojos: *Mentha spicata*, albahaca, ruda, etc.
- Contra polilla: Mentas, Hisopo, romero, eneldo, etc.
- Contra coleópteros: *Tanacetum*, comino, ajenjo y tomillo, etc.
- Contra cucarachas: Menta, ajenjo, eucalipto, laurel, etc.
- Contra nemátodos: *Tagetes*, salvia, caléndula, *Aspáragus*, etc. (9,12)

## **2.2.2. *Cinnamomum zeylanicum* Breyn (CANELA)**

### **2.2.2.1. Hábitat y distribución geográfica**

Esta planta es originaria de Ceilán y suroeste de la India. Está presente en climas cálidos, semicálidos, semisecos y templados, entre los 100 y 200 msnm. Cultivado en huertos familiares, solares o presente en terrenos de cultivo abandonados, asociada a vegetación secundaria derivada de bosques tropicales caducifolio, subcaducifolio, subperennifolio y perenifolio, además del bosque mesófilo de montaña y bosque de pino.

(28)

#### 2.2.2.2. Descripción general

***Cinnamomum zeylanicum* Breyn** “Canela” pertenece a la familia Lauraceae es un pequeño árbol que alcanza entre 3 y 10 m. de altura; su tronco suele llegar a los 50cm de diámetro. Sus ramas no son redondas, sino que presentan cuatro aristas romas, sólo erectas en su parte superior; están recubiertas por dos cortezas: una de color blanco amarillento y otra más esponjosa e intensamente aromática. Sus hojas, de colores verde amarillento, brillantes, ovaladas u oblongas, miden 15 a 20 cm de largo; presentan punta algo coriácea y una fina retícula por el envés, sobre todo cuando son jóvenes. Las flores son terminales, blancas o purpúreas, pequeñas y sedosas. Las hojas también presentan aroma y sabor típicos de la canela, mientras que el olor de sus flores resulta desagradable. El fruto es una baya de tamaño de un guisante, de color azul o negro y sabor picante cuando está verde; en su interior contiene usualmente dos semillas.

(2)

#### 2.2.2.3. Clasificación taxonómica (20)

**Reino** : Vegetal  
**Clase** : Magnoliopsida  
**Subclase** : Dicotiledoneae  
**Orden** : Laurales

**Suborden** : Magnoliineae

**Familia** : Lauraceae

**Género** : Cinnamomum

**Especie** : *Cinnamomum zeylanicum* Breyn

**Nombre Popular:** Canela de Ceilán, cinamomo. Canyella, Kanelondo, Caneleiro, Canelle, Zimt, Cinnamon, Cannella.

#### **2.2.2.4. Composición química**

Los principales componentes del aceite esencial (0,5-2%) de la corteza son: Aldehído cinámico (50-80%), eugenol (9- 10%), safrol (0-11%), linalol (10-15%), contiene otros fenilpropanoides (aldehído hidroxicinámico, aldehído o-metoxicinámico, alcohol cinámico y su acetato) y terpenos (limoneno y  $\alpha$ -terpineol).

Mientras que en las hojas el eugenol está presente en un 80%. (13,41)

#### **2.2.2.5. Propiedades medicinales**

Según la medicina tradicional *Cinnamomum zeylanicum* Breyn “canela” es usado como estimulante, aromático, aperitivo, emenagogo, astringente, carminativo, digestivo, para ayudar a la secreción de jugo gástrico, en el tratamiento de náuseas, vómito, reumatismo, gripe, hipertensión y

malestares femeninos. También se le atribuyen propiedades afrodisiacas y acción contra las hemorragias, antirreumática, antiséptica, antidiarreica.

Asimismo propiedades como espasmolítico, antibacteriano, antihelmíntico, dispepsia, flatulencia, anorexia, cólico intestinal, fungicida, antioxidante, antiulcerogénico, inflamaciones de la boca y la faringe, diarreas infantiles, influenza, debilidad, convalecencia y externamente para tratar heridas. (10,14)

Las inhalaciones del vapor de agua hirviendo con 5 gotas de aceite de canela se utilizan para combatir la tos y la irritación respiratoria. La dilución de 10 ml de aceite de canela en 25 ml de aceite de almendras o de girasol aplicada en forma de masaje se emplea contra cólicos abdominales, enfriamiento estomacal y diarrea. Las compresas con decocción o tintura de canela se usan para aliviar los dolores artríticos y reumáticos. (8)

### **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 sólo 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 (la candidiasis y la pitiriasis versicolor), todas las infecciones por hongos tienen su origen en una fuente exógena, sea por inhalación o por implantación traumática. (6,18)

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. 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 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).

(17)

#### **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). (14)

Rodeando el citosol complejo se encuentra otra membrana, el plasmalema, formada por glucoproteínas, fosfolípidos y ergosterol. 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. (14,18)

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, un homopolímero de residuos N-acetilglucosamina con enlaces  $\beta$ -(1,4). Por encima de la quitina se encuentran capas de glucanos (que son manoproteínas), así como otros polisacáridos complejos en asociación con polipéptidos. En los hongos filamentosos, la biosíntesis de quitina ocurre en el extremo de crecimiento. La síntesis de quitina está controlada por la actividad de tres quitina-sintasas. Estas enzimas están localizadas en el citosol formando unas estructuras aisladas y ligadas a la membrana que se denominan quitosomas. La forma activa de la quitina-sintasa se encuentra en el plasmalema; asimismo, la polimerización de las microfibrillas de quitina ocurre en la parte exterior de esta membrana. (14)

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 (p. 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 presentan una respiración aerobia, algunos poseen una capacidad limitada para la anaerobiosis (fermentación) y otros son anaerobios estrictos. Desde el punto de vista metabólico, son heterótrofos y químicamente versátiles, produciendo metabolitos tanto primarios (p. ej., ácido cítrico, etanol, glicerol) como secundarios (p. ej., penicilina, amanitinas, aflatoxinas). En comparación con el tiempo de división de las bacterias (minutos), el de estos microorganismos es largo (horas). (14,18)

Los hongos son gram positivos; además, sus células vegetativas no son acidorresistentes. Debido a los glucanos y otros polisacáridos complejos que componen su pared celular (que se tiñen con los métodos de metenamina-plata o con la tinción del ácido peryódico de Schiff), en las secciones histopatológicas los hongos pueden teñirse mediante procedimientos especiales.

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 que colonizan las capas cutáneas de la epidermis o que invaden el pelo y las uñas metabolizan la queratina (resistente proteína fibrosa e insoluble que constituye la materia principal de estos tejidos). Otros hongos (p. ej., *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis* y *Coccidioides immitis*) han desarrollado una capacidad para vencer a diversos mecanismos de defensa celular del huésped, pueden proliferar a temperaturas superiores a las del huésped (37 °C), así como a las que se encuentran en los ambientes naturales (aproximadamente 25 °C) y, asimismo, pueden sobrevivir en caso de disminución del estado de oxidación-reducción (una situación que aparece en los tejidos lesionados). Los hongos pueden dividirse en dos formas morfológicas básicas: levaduras e hifas. Además, sus etapas de desarrollo pasan por fases tanto vegetativa como reproductiva. Estas fases se observan a menudo de manera simultánea en los cultivos y, en ocasiones, no es posible separar una de otra con facilidad. (18)

Las levaduras son unicelulares y se reproducen asexualmente mediante unos procesos denominados formación de blastoconidios (gemación) o fisión. (14)

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». Estas estructuras filamentosas pueden ser cenocíticas (huecas y multinucleadas) o bien tabicadas (divididas por particiones). El término colectivo para un conjunto de hifas es micelio (sinónimo de «moho»). Las hifas que crecen sumergidas o sobre la superficie de un medio de cultivo son llamadas hifas vegetativas (puesto que son responsables de la absorción de los nutrientes). En cambio, las hifas que se proyectan por encima de la superficie del medio son denominadas hifas aéreas. Las hifas aéreas producen a menudo unas estructuras especializadas llamadas «conidios» (que son unos elementos de reproducción asexual conocidos también como «propágulas») que se transmiten fácilmente por el aire y se diseminan en el ambiente. La forma, el tamaño y ciertas características del desarrollo de los conidios sirven al micólogo para identificar una especie concreta. (18)

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 puede adoptar una morfología de pseudohifa en la que las células se alargan y unen lo mismo que salchichas. 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. La morfología de los hongos no es fija, puesto que algunos son dimórficos (p. ej., *H. capsulatum*, *B. dermatidis*, *C. immitis*, *P. brasiliensis*); 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). (14,18)

### **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, por ejemplo, los oídios. Basándose en la formación de esporas sexuales, algunas levaduras son ascomicetos, otras probablemente son basidiomicetos (las levaduras balistoesporángicas) y otras no se ha comprobado que tengan una etapa sexual y se agrupan con los hongos imperfectos. Así, pues, el término "levadura" tiene significado algo incierto; como se utiliza de ordinario, se refiere a aquellos microorganismos que suelen presentarse siempre o predominantemente en forma de levadura.(3)

Quizá las levaduras más frecuentemente encontradas como contaminantes de cultivos bacterianos, y que se descubren creciendo en los alimentos, sean los asporógenos *Rhodotorulae*; las formas de color rosado o coral, muchas veces observadas, son *Rhodotorula, flava* o *R. glutinis*. Dada la distribución ubicua de las levaduras, no sólo 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. Al respecto, se han descrito gran número de especies, la mayor parte de veces en forma inadecuada. En muchos casos la levadura probablemente no guardaba relación causal con la enfermedad; en otros se ha descrito repetidamente una misma levadura como especie diferente, dando así origen a diversos nombres

sinónimos, y se ha acumulado una lista muy grande de levaduras "patógenas". (18)

El examen crítico ha permitido aclarar que sólo unas pocas especies de levaduras son realmente patógenas para el hombre y los animales. (18)

#### **2.2.4. *Cándida albicans***

##### **2.2.4.1. Descripción micológica:**

Hongo dimorfo que forma largas pseudohifas, hifas y blastoconidios (células gemantes subesféricas de 3-8 x 2-7  $\mu\text{m}$ ). Asimilan y fermentan azúcares. Numerosas clamidosporas unicelulares, redondas u ovaladas, con gruesa pared refringente (8-16  $\mu\text{m}$  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, con olor a levadura. (33)

##### **2.2.4.2. Descripción taxonómica: (38)**

Su descripción taxonómica es la siguiente:

**Reino** : Fungi

**División** : Deuteromycota

**Clase** : Blastomycetes

**Orden** : Pseudosaccharomycetales

**Familia** : Cryptococcaceae

**Género** : Cándida

**Especie** : albicans

**Sinónimos:** Monilia albicans, Cándida stellatoidea

#### **2.2.4.3. Composición química:**

La composición química de *Cándida 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.

(18)

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

El polisacárido manán representa aproximadamente entre 15,2% y 22,9% del peso seco y poco más de 40% de los polisacáridos de la pared celular del hongo. El D-Glucán  $\beta$ -1,3 y el D-Glucán  $\beta$ -1,6 constituyen entre 47% y 60% del peso seco de la pared celular. Otros componentes han sido reportados, tales como proteínas en cantidades que oscilan entre 6% y 25%, lípidos entre 1% y 7% y quitina entre 0,6% y 9% del peso de la pared celular.

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. La mayoría de los investigadores han descrito cinco capas dentro de la pared celular, las cuales son (de adentro hacia afuera): manoproteínas,  $\beta$ -glucán-quitina,  $\beta$ -glucán, manoproteínas y una capa de fibrillas.

#### **2.2.4.4. Ecología:**

*Cándida 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 sí solo la presencia de infección. *Cándida 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.

(33)

#### **2.2.5.5. Anatomía patológica y patogenia:**

*Cándida albicans* presenta una serie de factores de patogenicidad que facilitan la colonización y la infección del hospedador. 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) Tigmotropismo:** Que permite encontrar discontinuidades entre las células y penetrar en los tejidos.

**d) 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 *Cándida* y es aumentada por la existencia de una lesión epitelial por los carbohidratos y por la disminución de la flora bacteriana saprofita.

Estos factores de patogenicidad están controlados por diferentes genes que se expresan en un número determinado y momento concreto y que determinan el fenotipo y patogenicidad de cada aislamiento, entre los genes asociados a éstos se encuentra el gen de la hexosaminidasa (HEX1), también se encuentran genes de proteínas aspárticas (SAP1,

SAP2, SAP3, SAP4) y un gen que confiere capacidad de producir tubos germinales y aumentar la adhesión. (24)

#### **2.2.4.6. Epidemiología:**

En los Estados Unidos, las especies de *Cándida* representan la cuarta causa de septicemia intrahospitalaria (SIH): 8% al 10% del total de estas complicaciones. Un grupo de investigadores reveló que la incidencia de infecciones intrahospitalarias en cualquier localización anatómica es del 2.5% al 10%, que las SIH representan alrededor del 10% de todas las infecciones intrahospitalarias y que el 8% de estas últimas es causado por especies de *Cándida* (alrededor de la mitad ocurre en pacientes internados en UCI).

Por su parte, los datos del *National Hospital Discharge Survey* (NHDS) revelan que desde 1996 hasta 2002, la frecuencia de candidiasis invasiva se mantuvo relativamente estable, en aproximadamente 22 a 24 episodios por 100 000 enfermos/año. El número de elevó a 29 por 100 000 pacientes en 2003.

Según los datos del *ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program*, entre 1997 y 2003, la lista de especies aisladas de distintas muestras siguió en aumento cada año; a pesar de que *C. albicans* fue la causa más

frecuente de candidiasis invasiva en todo el mundo, la frecuencia se redujo con el paso del tiempo (del 73.3% al 62.3%). La incidencia de infecciones por *C. glabrata* y *C. krusei* se mantuvo relativamente estable, mientras que las infecciones por *C. tropicalis* y por *C. parapsilosis* aumentaron (del 4.6% al 7.5% y del 4.2% al 7.3%, respectivamente).

En Estados Unidos, *C. glabrata* es la segunda especie más común en los casos de SIH, después de *C. albicans*; en cambio, en otros países, las especies más frecuentes son *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*. (34)

Los factores predisponentes para esta frecuencia elevada de infecciones por levaduras son:

- Aumento de la utilización de quimioterapia y de trasplantes de médula ósea y de otros órganos, con inmunosupresión intensa acompañante.
- Internaciones prolongadas en hospitales.
- Cateterismo vascular.
- Administración prolongada de antimicrobianos de amplio espectro.
- Uso profiláctico extenso de antimicóticos.

La candidemia, definida como la infección del torrente sanguíneo, puede derivar en la diseminación de la infección a múltiples órganos determinando la formación de microabscesos, lesiones cutáneas

embólicas, abscesos renales y hepatoesplénicos, endocarditis, meningitis, artritis, osteomielitis y endoftalmitis. (24,37)

La incidencia de infecciones invasoras causadas por *Cándida* ha aumentado en forma importante en las últimas décadas como consecuencia del aumento de poblaciones de mayor riesgo, ya sea por su condición de inmunosupresión, o por la utilización de procedimientos diagnósticos y/o terapéuticos invasores. Sin embargo, el compromiso osteoarticular por *Cándida*, secundario a la invasión del torrente sanguíneo por el hongo, es una localización infrecuente. (24)

## **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 de mortalidad.

Las distintas especies de *Cándida*, ampliamente distribuidas, son los hongos más comunes causantes de micosis; integran la flora microbiológica normal pero sólo 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. (34)

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 *Cándida*, el más frecuente de todos es la *Cándida albicans*, que causa alrededor del 90% de las infecciones por hongos. (12)

Otros miembros de la familia, que pueden ocasionar la infección, son la *Cándida tropicalis*, *krusei*, *glabrata* y *parapsilosis*.

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, los receptores de unión al complemento y los cambios fenotípicos.

Las principales manifestaciones clínicas de *Cándida 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, 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 casi en el 100% de éstos pacientes. Aunque clásicamente está causada por *Cándida albicans*, la especie estrechamente relacionada, *Cándida dubliniensis*, ha surgido hace

poco como el agente más problemático en muchos casos, lo que expresa la resistencia inducida a ciertos agentes antimicóticos derivados de los azoles, en especial el fluconazol. Por consiguiente, puede estar indicada la identificación por el laboratorio de *C. dubliniensis* para los casos de muguet bucal antes de administrar el tratamiento empírico con un antimicótico azólico. (12)

Las mucosas de la tráquea, los bronquios y casi cualquier parte del tubo digestivo, pueden sufrir infecciones por *Cándida*. 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. Las candidiasis esofágicas también puede suceder como una propagación orofaríngea, sobre todo en los recién nacidos. (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 onicomicosis, ó 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. (12)

### **c) Candidiasis Diseminada:**

La candidiasis sistémica es una enfermedad relativamente rara, que suele suceder como un episodio terminal de los pacientes con neoplasias debilitantes (crisis blásticas de leucemias y linfomas por ejemplo), enfermedades inmunosupresoras y luego del trasplante de órganos, en especial durante el síndrome de rechazo agudo. A continuación se describen los órganos en los cuales puede producirse la siembra tras la diseminación de las especies de *Cándida* a partir de los sitios primarios de infección mucocutánea.

#### **- *Candidiasis del aparato urinario***

Esta presentación es relativamente rara y se manifiesta como cistitis, causada con mayor frecuencia por *Torulopsis* (*Cándida*) *glabrata* y pielonefritis, ya sea por vía ascendente a partir de la infección vesical o por diseminación hemática desde un sitio primario distante de infección. Pueden verse agregados de

pseudohifas y blastoconidios en la histología de los glomérulos, probablemente en un microambiente que favorece el crecimiento debido a la disminución de pH por el intercambio de iones de Na<sup>+</sup> e H<sup>+</sup>. En la actualidad, *Cándida* (Toruplosis) *glabrata* es el segundo o tercer agente causal de infecciones superficiales (bucal, esofágica, vaginal o urinaria) ó sistémicas candidiásicas. La emergencia de *C. glabrata* como patógeno intrahospitalario puede relacionarse con su resistencia a los azoles que se han usado de manera eficaz en el tratamiento de otras infecciones por levaduras. (12)

- ***Endocarditis:***

Esta infección se ve más a menudo en personas con valvulopatías preexistentes, en especial tras episodios de septicemia asociados con el uso de catéteres permanentes, infusiones intravenosas. Hogevik y Alestigt presentaron siete casos de endocarditis en el oeste de Suecia. En cuatro casos las infecciones se asociaron con la colocación de prótesis valvulares; en tres casos estaban afectadas las válvulas propias. Debido a la alta mortalidad, los autores hacen hincapié en la necesidad del diagnóstico temprano, el tratamiento antimicótico inmediato y la

cirugía de urgencia si la ecografía revela una falta de respuesta, la septicemia por *Cándida* también puede observarse en los pacientes que reciben antibióticos y corticosteroides por periodos muy prolongados. Aunque la mayoría de las cepas de *C. albicans* pueden aislarse en los cultivos de sangre realizados en los frascos para hemocultivos comerciales, Marcelis y Cols. Informaron que los medios de cultivo que contienen resina (específicamente, en sus estudios utilizaron BACTEC PLUS que tiene un alto contenido en resina) puede reforzar la recuperación, en especial en pacientes que reciben antibióticos. (12)

- ***Meningitis por Cándida:***

Esta enfermedad rara es secundaria a la diseminación a partir de los sitios de infección en los aparatos gastrointestinal o respiratorio, émbolos sépticos liberados de las válvulas cardíacas infectadas, traumatismo ó como complicación de una neurocirugía. en una revisión retrospectiva de 21 casos de especies de *Cándida* aisladas en el líquido cefalorraquídeo luego de una neurocirugía, Geers y Gordon encontraron que el 86% de éstos pacientes tenían válvulas cerebroespinales permanentes (desviaciones). Gelfand y cols. Informaron casos de

sobreinfección tras meningitis bacteriana aguda en adultos que sufrieron traumatismo del sistema nervioso central ó intervención quirúrgica. Estos autores aconsejan que en todo paciente con meningitis bacteriana que no mejora con tratamiento antimicrobiano debe investigarse la sobreinfección por Cándida, en especial en los casos en que hay colocados catéteres permanentes. (12)

## **CAPÍTULO III: MATERIAL Y MÉTODOS**

### **3.1. LUGAR DE ESTUDIO**

Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Facultad de Ciencias de la Salud- Escuela Académico Profesional de Farmacia y Bioquímica- Laboratorio de Microbiología. Desarrollado entre los meses de agosto-noviembre 2012.

### **3.2. TIPO DE ESTUDIO**

Cuasi-Experimental y Prospectivo.

### **3.3. UNIDADES DE ESTUDIO**

#### **3.3.1. Biológico**

Aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn (Canela)

#### **3.3.2. Microbiano**

*Cándida albicans* ATCC 6538

### **3.4. MATERIAL DE LABORATORIO**

#### **3.4.1. Equipos:**

- Autoclave.
- Estufa.

- Incubadora.
- Balanza analítica.
- Equipo de destilación.
- Papel filtro Whatman N° 40.
- Nefelómetro de Mc Farland.
- Equipo de vórtex.

#### **3.4.2. Materiales de vidrio:**

- Tubos de ensayo con tapa rosca de 15 x 125 mm
- Tubos de ensayo de 13 x100 mm y 40 de 15 x 125 mm
- Placas Petri de 10 x100 mm
- Matraces de 500 ml
- Matraces de 250 ml
- Matraces de 100 ml.
- Pipetas de 1 ml
- Pipetas de 5 ml
- Pipetas de 10 ml.
- Vasos precipitados de 200 ml.
- Frasco de vidrio color ámbar de 100 ml capacidad.
- Frascos de vidrio de 500 ml capacidad.
- Probeta de 100 ml

- Mortero de porcelana

#### **3.4.3. Medios de cultivo y reactivos:**

- Agar Sabouraud 2%
- Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI).
- Dimetil Sulfoxido 10% (DMSO).
- Alcohol de 70°C
- Ron de quemar

#### **3.4.4. Otros:**

- Asa de Kholle
- Asa de drigalski
- Gradillas
- Espátulas
- Pinzas
- Papel Kraft
- Mascarilla
- Guantes quirúrgicos
- Guardapolvo
- Jeringa de tuberculina
- Algodón
- Pabilo
- Papel aluminio

- Reglas milimetradas
- Marcadores
- Calculadora

### **3.5. METODOLOGÍA**

#### **3.5.1. Diseño experimental utilizado:**

##### ***Aceite esencial de Cinnamomun zeylanicum Breyn (Canela)***

Diseño experimental con 7 tratamientos y 10 repeticiones teniendo así 70 unidades experimentales a concentraciones de 0,0236875 mg/ml; 0,047375 mg/ml; 0,0710625 mg/ml; 0,09475 mg/ml; 0,1184375 mg/ml; 0,142125 mg/ml y 0,1658125 mg/ml.

#### **3.5.2. *Cinnamomum zeylanicum Breyn***

##### **3.5.1.1. Recolección**

La corteza de canela en estudio fue obtenida del centro comercial “Polvos rosados”, comprando 1000 gramos de la muestra para los fines de estudio.

La corteza fue recolectada verificando que no presenten signos de enfermedades que interfieran en el desarrollo de la tesis, y fueron almacenadas en bolsas de papel Kraft para su

traslado y conservación hasta su posterior identificación y procesamiento.

#### **3.5.1.2. Extracción y rendimiento del aceite esencial (15)**

**a) Extracción del aceite esencial:** Las cortezas de canela fueron trozadas en tamaños más pequeños para facilitar la extracción, agrupándose luego en muestras de 250 g las cuales fueron embolsadas en papel kraft. La obtención del aceite esencial de la corteza 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 (700 ml) y fue sometido a calor directo; mientras que en el segundo (Capacidad 1000 ml) contuvo 250 gramos de la corteza de canela, 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 líquido (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 proteger de la luz del ambiente. Los aceites esenciales fueron almacenados a temperatura ambiente y en oscuridad hasta su utilización.

**Características organolépticas:**

Especie Vegetal	<i>Cinnamomun zeylanicum</i> Breyn
<b>Aspecto</b>	Líquido translúcido
<b>Color</b>	Marrón
<b>Olor</b>	Característico
<b>Sabor</b>	Picante

*Fuente: Elaboración propia*

**b) 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= 0,4ml.

W1= 16,1980 g.

W2= 16,5770 g.

$$d = m/v$$

$$d = \frac{W2 - W1}{0,4 \text{ ml}}$$

0,4 ml

$$d = \frac{(16,5770 \text{ g.} - 16,1980 \text{ g.})}{0,4 \text{ ml}}$$

0,4 ml

$$d = 0,9475 \text{ g/ml} = 947,5 \text{ mg/ml}$$

### **c) Rendimiento de aceite esencial (RAE):**

Se determinó el % RAE por el método de gravimetría-volumétrico, mediante el método de arrastre por vapor de agua. A partir de 250g de las cortezas de *Cinamomun*

*Zeylanicum* Breyn (canela) obteniendo un determinado volumen (con cuatro destilaciones de un total de 1000g de muestra), lográndose obtener un rendimiento de 0,7 %, aplicando la siguiente fórmula:

$$\%RAE = \frac{\text{Vol. A.E. (ml)}}{W_{\text{muestra}} \text{ (g)}} \times 100$$

Donde:

%RAE= Porcentaje de rendimiento del aceite esencial

Vol. A.E.= Volumen del aceite esencial obtenido

$W_{\text{muestra}}$  = Peso de la muestra a destilar

$$\%RAE = \frac{7 \text{ ml}}{1000 \text{ (g)}} \times 100$$

$$\%RAE = 0,7 \%$$

### **3.5.3. Cepas**

#### **3.5.3.1. Recolección**

Se utilizó un microorganismo patógeno de importancia clínica, proporcionada por el Ministerio de Salud-Tacna (Minsa): *Cándida albicans* ATCC 6538.

#### **3.5.4. Evaluación de la actividad del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn**

La actividad antimicótica del aceite esencial se evaluó por el método de Kirby Bauer (difusión en disco).

##### **a) Preparación de la dilución:**

En los primeros ensayos se usaron volúmenes de aceite esencial puro (2,5µl - 20µl) 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 24 h 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 (0,5µl – 4,0µl) de aceite esencial puro a lo cual paralelamente se trabajó con un control positivo para *Cándida albicans*; es decir a esta placa no se adicionó el aceite esencial para verificar su crecimiento en el medio de cultivo (Agar

sabouraud 2%). Los volúmenes y concentraciones del aceite esencial puro se detallan en las tablas N° 1, y 2 (pág. 64), en esta segunda oportunidad nuevamente no se observó ningún tipo de crecimiento micótico sobre las placas que contenían el aceite esencial puro; mientras que en la placa que no se colocó aceite esencial si se evidenció el crecimiento de las colonias de *Cándida albicans*, por lo que se dedujo que la actividad del aceite esencial de *Cinnamomun zeylanicum* Breyn obtenido “in vitro” era potente frente a *Cándida albicans* ATCC 6538 con dichas concentraciones. Por lo cual se propuso trabajar con diluciones para obtener los datos de los halos de inhibición con respecto a las concentraciones del aceite esencial. La dilución se hizo en una proporción 1/2; es decir volúmenes iguales de aceite esencial y dimetilsufóxido 10% (DMSO), tomamos 100 µl de aceite esencial y 100 µl de DMSO haciendo un volumen total de 200 µl, para una mayor homogenización de esta solución se usó el equipo de vórtex. La tabla N° 3 (pág. 65), muestra los volúmenes y concentraciones empleadas en este trabajo. Las concentraciones se establecieron de la siguiente manera:

$$\begin{array}{l} (1\text{ml}) 1\ 000\ \mu\text{l} \longrightarrow 947,5\ \text{mg} \\ 100\ \mu\text{l} \longrightarrow X \end{array}$$

$$X = 94,75\ \text{mg}$$

En este caso como la dilución fue 100  $\mu\text{l}$  de aceite y 100  $\mu\text{l}$  de DMSO la dilución sería  $\frac{1}{2}$  es decir la mitad de su concentración (47,375 mg) a partir de aquí las concentraciones de acuerdo a los volúmenes requeridos cambiaron de esta manera:

$$\begin{array}{l} 200\ \mu\text{l} \longrightarrow 47,375\ \text{mg} \\ 0,1\ \mu\text{l} \longrightarrow X \end{array}$$

$$X = 0,0236875\ \text{mg}$$

Como se representa en la tabla N° 3 (pág. 65)

**Ensayo 1:**

**TABLA N°1: Concentraciones del aceite esencial  
*Cinnamomum zeylanicum* Breyn “canela” en los discos.**

<i>Aceite esencial puro</i>		
<b>N° Tratamiento</b>	<b>Volumen (ul)</b>	<b>[ ] (mg/ml)</b>
T1	2,5	2,36875
T2	5,0	4,7375
T3	7,5	7,10625
T4	10,0	9,475
T5	12,5	11,84375
T6	15,0	14,2125
T7	17,5	16,58125
T8	20,0	18,95

**Ensayo 2:**

**TABLA N°2: Concentraciones del aceite esencial  
*Cinnamomum zeylanicum* Breyn “canela” en los discos.**

<i>Aceite esencial puro</i>		
<b>N° Tratamiento</b>	<b>Volumen (ul)</b>	<b>[ ] (mg/ml)</b>
T1	0,5	0,47375
T2	1,0	0,9475
T3	1,5	1,42125
T4	2,0	1,895
T5	2,5	2,36875
T6	3,0	2,8425
T7	3,5	3,31625
T8	4,0	3,79

**TABLA N°3: Concentraciones del aceite esencial  
Cinnamomum zeylanicum Breyn “canela” en los discos.**

<i>Aceite esencial dilución ½</i>		
<b>N° Tratamiento</b>	<b>Volumen (en 200 ul)</b>	<b>[ ] (mg/ml)</b>
T1	0,1	0,0236875
T2	0,2	0,047375
T3	0,3	0,0710625
T4	0,4	0,09475
T5	0,5	0,1184375
T6	0,6	0,142125
T7	0,7	0,1658125

*Fuente: Elaboración propia*

**b) Preparación de los discos**

Se impregnaron discos de papel filtro de 6 mm de diámetro (previamente esterilizados) con una cantidad determinada de aceite esencial dilución 1/2 (100ul Aceite esencial + 100ul DMSO). Para esto se utilizaron 7 tratamientos con 10 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 15 minutos. Se hace una segunda repetición para descartar cualquier resto de

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

**TABLA N°3: Concentraciones del aceite esencial**  
***Cinnamomum zeylanicum* Breyn “canela” en los discos.**

<i>Aceite esencial dilución ½</i>		
<b>N° Tratamiento</b>	<b>Volumen en 200(ul)</b>	<b>[ ] (mg/ml)</b>
T1	0,1	0,0236875
T2	0,2	0,047375
T3	0,3	0,0710625
T4	0,4	0,09475
T5	0,5	0,1184375
T6	0,6	0,142125
T7	0,7	0,1658125

*Fuente: Elaboración propia*

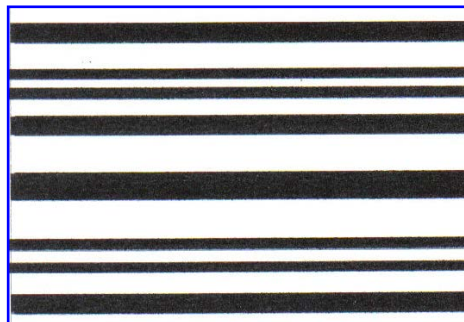
**Control negativo:** Que consiste en un disco de sensibilidad de antibiótico desnaturalizado el cual está impregnado con agua destilada para así descartar la actividad antimicrobiana del mismo.

Con el fin de saber entre cuales de estas concentraciones puede estar el CMI; incubándolo a 37°C por un espacio de 24 horas. Se anotó la presencia y el tamaño del halo zona de inhibición.

**c) Preparación del inóculo micótico de *Cándida albicans* ATCC 6538:**

El agente micótico que se utilizó en el trabajo se cultivó en viales de agar Sabouraud 2% para su mantención; para luego ser activadas en Caldo BHI, 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.

***Tabla de comparación para escala de Mc Farland:***



**d) Preparación del medio para la prueba de sensibilidad:**

Se empleó el medio agar Sabouraud 2%, Se preparó el medio como indica la casa comercial (47 g en 1000 ml).

**e) Inoculación de las placas:**

Se inoculó la placa de agar Sabouraud 2%, utilizando la suspensión estandarizada del agente micótico (*Cándida albicans*) a una concentración de  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml. Se depositó 100  $\mu$ l 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 a 20 minutos a temperatura ambiente.

**f) Dispensación de los discos a las placas inoculadas:**

Se procedió a utilizar las diluciones del aceite esencial, luego se incorporó un disco 6 mm de diámetro de papel Wathman N° 42 previamente esterilizados (“Discos de sensibilidad sin antibióticos”), los discos fueron embebidos con 0,1  $\mu$ l; 0,2  $\mu$ l; 0,3  $\mu$ l; 0,4  $\mu$ l; 0,5  $\mu$ l; 0,6  $\mu$ l y 0,7  $\mu$ l, de aceite esencial durante 10 minutos para su mejor impregnación. Cada disco impregnado con el aceite esencial, 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 2 discos con aceite esencial y un control negativo (Disco con agua destilada) en cada placa de agar sabouraud 2% con su respectiva

concentración. Se emplearon un total de 35 placas para esta prueba.

**g) Incubación:**

Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 18 - 24 horas para ver los halos de inhibición.

**h) 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 antimicótica del aceite esencial sobre los microorganismos estudiados. Para interpretar los resultados se tomó como referencias las pautas por DURAFFOURD y LAPRAZ, 1983 que considera la actividad de los aceites esenciales como:

Nula (-) si fue inferior o igual a 8 mm

Sensibilidad límite (Sensible=+) de 9 a 14 mm

Sensibilidad media (muy sensible = ++) de 15 a 19 mm

Sumamente sensible (S.S.= +++) si fue igual ó superior a 20 mm.(7)

### **3.5.5. 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 *Cándida albicans* ATCC 6538:**

El agente micótico que se utilizó en el trabajo se cultivó en viales de agar Sabouraud 2% 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 6 a 8 horas 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.

#### **b) Preparación de la solución madre:**

Se preparó una solución madre de 10 000 µl totales: 100 µl de aceite esencial con 100 µl de Dimetilsulfóxido 10% (DMSO) y 9 800 µl de caldo infusión cerebro corazón (BHI). La concentración final se obtuvo de la siguiente manera. (7)

A partir de la densidad obtenida= 0,9475 g/ml => 947,5 mg/ml

Sabiendo que:

$$1 \text{ ml} = 1\,000 \mu\text{l} \longrightarrow [\ ] = 947,5 \text{ mg}$$

$$100 \mu\text{l} \longrightarrow X$$

$$X = 94,75 \text{ mg.}$$

Trabajamos con miligramos de aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn

$$1 \text{ g} \longrightarrow 1\,000 \text{ mg}$$

$$0,9475 \text{ g} \longrightarrow X$$

$$X = 947,5 \text{ mg}$$

Se determinó que en 1 mL o en 1000  $\mu\text{l}$  existían 947,5 mg de aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn pero en la solución madre se llevó 0,1ml o 100  $\mu\text{l}$  en consecuencia se determinó lo siguiente:

$$1\,000 \mu\text{l} \longrightarrow 947,5 \text{ mg de aceite esencial}$$

$$100 \mu \longrightarrow X$$

$$X = 94,75 \text{ mg}$$

Esta concentración fue diluida en 10 000 µl de solución total por lo cual se consiguió una concentración final de:

94,75 mg → 10 000 µl

X → 1 000 µl (1ml)

$$X = 9,475 \text{ mg}$$

Esta cifra es la concentración final en la solución madre es decir que en 10 000 µl de solución madre está concentrada 9,475 mg/ml de aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn

**c) Preparación de la Concentración mínima inhibitoria (CMI) para *Cándida albicans* ATCC 6538**

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

**TABLA N°4: Preparación de volúmenes para Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).**

N° Tubo	Vol. de Sol. Madre (ul)	Vol. Caldo BHI( ul)	Vol. Total de Solución. (ul)
1	0,5	2999,5	3000
2	1,0	2999,0	3000
3	1,5	2998,5	3000
4	2,0	2998,0	3000
5	2,5	2997,5	3000
6	3,0	2997,0	3000
7	3,5	2996,5	3000
8	4,0	2996,0	3000
9	4,5	2995,5	3000
10	5,0	2995,0	3000
11	5,5	2994,5	3000
12	6,0	2994,0	3000
13	6,5	2993,5	3000
14	7,0	2993,0	3000
15	7,5	2992,5	3000

Aquí las concentraciones finales cambiaron ya que en el caso del primer tubo el cual se llevó 0,5 µl los cuales tendrían una concentración de 0,0047375 mg/ml de la siguiente manera:

$$(1 \text{ ml}) 1\ 000\ \mu\text{l} \longrightarrow 9,475\ \text{mg}$$

$$0,5\ \mu\text{l} \longrightarrow X$$

$$X = 0,0047375\ \text{mg}$$

Esta concentración se diluyó en 3 000 µl y tuvo una concentración final para el CMI de 0,001579166667 mg

Los tubos quedaron con la siguiente concentración de aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn:

**TABLA N°5: Preparación de la Concentración Mínima Inhibitoria para *Cándida albicans* ATCC 6538**

N° Tubo	Volumen de Solución Madre (ul)	[ ] (mg) en 1000 ul	Vol. Caldo BHI ( ul)	Volumen total (ul)	[ ] Final (mg/ml)
1	0,5	0,0047375	2999,5	3000	0,001579166667
2	1,0	0,009475	2999,0	3000	0,003158333333
3	1,5	0,0142125	2998,5	3000	0,0047375
4	2,0	0,01895	2998,0	3000	0,006316666667
5	2,5	0,0236875	2997,5	3000	0,007895333333
6	3,0	0,028425	2997,0	3000	0,009475
7	3,5	0,0331625	2996,5	3000	0,011054166
8	4,0	0,0379	2996,0	3000	0,012633333
9	4,5	0,0426375	2995,5	3000	0,0142125
10	5,0	0,047375	2995,0	3000	0,015791666
11	5,5	0,0521125	2994,5	3000	0,017370833
12	6,0	0,05685	2994,0	3000	0,01895
13	6,5	0,0615875	2993,5	3000	0,020529166
14	7,0	0,066325	2993,0	3000	0,022108333
15	7,5	0,0710625	2992,5	3000	0,0236875

Fuente: Elaboración propia

Luego se agregó 300 µl de solución micótica de *Cándida albicans* ATCC 6538 en cada tubo (16 tubos), incluido el control positivo. (El cual representa el 10% del volumen total de la solución).

**d) Incubación**

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

Los diferentes tratamientos se comparó con los siguientes controles: Control positivo (100 µl DMSO + 2900 µl BHI + 300 µl Solución micótica) y Control negativo (100 µl DMSO + 2900 µl caldo BHI)

**e) Lectura:**

Al cabo de las 24 horas se observa la turbidez de los tubos que indicó 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).

**3.5.6. Determinación de la Concentración mínima fungicida (CMF)**

Se tomaron los tubos que no presentan turbidez (Tubo 12, tubo 13 y tubo 14); de cada uno de ellos se resembró 100 µl de solución por diseminación en placas de Agar Sabouraud 2%. Las placas fueron incubadas a 37 °C por 24 horas, transcurrido este tiempo se contó el

número de unidades formadoras de colonias (UFC) presentes para cada concentración del aceite esencial.

### **3.5.7. Procesamiento y análisis estadístico**

El presente trabajo de investigación se basó en un estudio cuasi-experimental, todos los datos fueron procesados a través del software estadístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versión 18.0 para Windows. Para el análisis estadístico se utilizó la técnica de análisis de varianza (ANOVA), usando la prueba F a un nivel de significación de 0,05 y 0,01 y para establecer las diferencias medias entre los tratamientos se utilizó prueba de significación de Tukey al 0,05.

## CAPÍTULO IV: RESULTADOS

Se determinó la composición fitoquímica del aceite esencial extraído de la corteza de ***Cinnamomun zeylanicum* Breyn** “canela”, presente en nuestro medio; mediante cromatografía gaseosa con detección de masa. Luego se realizó un estudio “in vitro” de la actividad antimicótica del aceite esencial de ***Cinnamomun zeylanicum* Breyn** “canela” frente al agente micótico ***Cándida albicans* ATCC 6538**; para lo cual se trabajó con 7 tratamientos y 10 repeticiones. Asimismo se determinó la sensibilidad de ***Cándida albicans* ATCC 6538** frente al aceite esencial de ***Cinnamomun zeylanicum* Breyn**.

Los resultados obtenidos en las diferentes pruebas han sido agrupados en cuadros y gráficas para su mejor interpretación. Se utilizó el diseño completamente aleatorio, debido a que este es un diseño de simple distribución al azar siendo útil para métodos y técnicas de laboratorio.

### CUADRO N° 1:

Resultados obtenidos de la Universidad Católica de Santa María  
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnologías referente a la  
composición fitoquímica del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn  
“canela”

ANÁLISIS FISICOQUÍMICO	
ANÁLISIS	RESULTADO
<b>Determinación cualitativa de metabolitos secundarios</b> <i>Cromatografía Gaseosa con detección de masas</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Alpha-pinene</li><li>• Linalool, methyl ether</li><li>• Cinnamaldehyde, (E)</li><li>• Thymol</li><li>• Eugenol</li><li>• Caryophyllene</li><li>• 2-propen-1-ol, 3-phenyl-, acetate</li></ul>
<b>Determinación Cuantitativa de metabolitos secundarios (%)</b> <i>Cromatografía Gaseosa con detección de masas, método de cuantificación, por normalización interna (área)</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Alpha-pinene (1,52%)</li><li>• Linalool, methyl ether (3,18%)</li><li>• Cinnamaldehyde, (E)-(70,79%)</li><li>• Thymol (1,86%)</li><li>• Eugenol (4,87%)</li><li>• Caryophyllene (3,42%)</li><li>• 2-propen-1-ol, 3-phenyl-, acetate (14,36%)</li></ul>

Fuente: UCSM-Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad-Arequipa

En el presente cuadro se muestra la composición fitoquímica del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn obtenido por el método de cromatografía gaseosa con detección de masa en forma cualitativa y cuantitativa, se determinó que los componentes con mayor presencia son: *Cinnamaldehyde, (E)-(70,79%)*; *2-propen-1ol,3-phenyl-acetate (14,36%)* y *Eugenol (4,87%)*.

**CUADRO N° 2:**

Prueba de la Actividad antimicótica del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn “canela” frente a *Cándida albicans*

ATCC 6538 por el método de difusión del disco (Kirby Bauer)

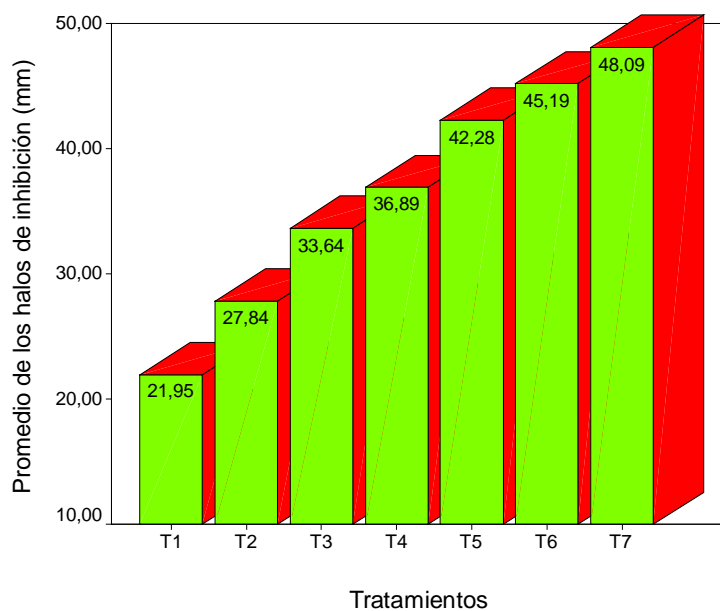
Aceite esencial de <i>Cinnamomum zeylanicum</i> Breyn “canela”								
Aceite esencial		N° Discos	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Placa 5	Promedio Final Halos (mm)
Volumen (ul)	[ ] (mg/ml)		Halos (mm)	Halos (mm)	Halos (mm)	Halos (mm)	Halos (mm)	
0,1	0,0236875	1	24,4	22,1	20,3	19,8	20,1	21,95
		2	24,6	21,3	23,7	20,2	23,0	
0,2	0,047375	1	28,3	30,3	27,2	29,0	26,1	27,84
		2	29,2	27,4	27,1	26,4	27,4	
0,3	0,0710625	1	28,6	34,3	33,8	32,4	36,2	33,64
		2	34,9	35,2	29,6	36,8	34,6	
0,4	0,09475	1	36,0	36,3	38,4	37,2	39,2	36,89
		2	33,6	33,8	38,6	35,6	40,2	
0,5	0,1184375	1	43,4	40,6	39,8	43,2	45,2	42,28
		2	43,6	41,4	39,6	43,2	42,8	
0,6	0,142125	1	43,4	44,4	45,0	46,4	46,3	45,19
		2	44,6	45,2	44,4	44,8	47,4	
0,7	0,1658125	1	51,2	48,4	40,8	52,2	48,3	48,09
		2	51,6	46,6	41,6	50,8	49,4	

Fuente: Elaboración propia

En el cuadro N° 2, se presentan los promedios de halos de inhibición producidos por las diferentes concentraciones del aceite esencial de *Cinnamomun zeylanicum* Breyn “canela” frente a *Cándida albicans* ATCC 6538, mediante el método de difusión del disco (Kirby Bauer). Los resultados obtenidos indican mayor promedio de halo de inhibición a la concentración de 0,1658125 mg/ml con 48,09 mm de diámetro entre las distintas concentraciones. Por otro lado con la menor concentración de 0,0236875 mg/ml se obtuvo un halo de inhibición 21,95 mm.

## GRÁFICO N° 1

Distribución de promedios de halos de inhibición en base al efecto del aceite esencial de *Cinnamomun zeylanicum* Breyn “canela” frente a *Cándida albicans* ATCC 6538



Fuente: Gráfico obtenido del cuadro N°2.

El Gráfico N°1, se presenta los promedios de halos de inhibición producidos por las diferentes concentraciones del aceite esencial *Cinnamomun zeylanicum* Breyn “canela”; se observa claramente que el mayor porcentaje lo obtuvo el tratamiento t7 con 48,09 mm, en el segundo lugar el t6 con 45,19 mm, los tratamientos t1 t2 obtuvieron los menores promedios con 21,95 y 27,84 mm respectivamente.

### CUADRO N° 3:

Determinación del grado de sensibilidad de *Cándida albicans* ATCC 6538 a diferentes concentraciones del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn “canela”

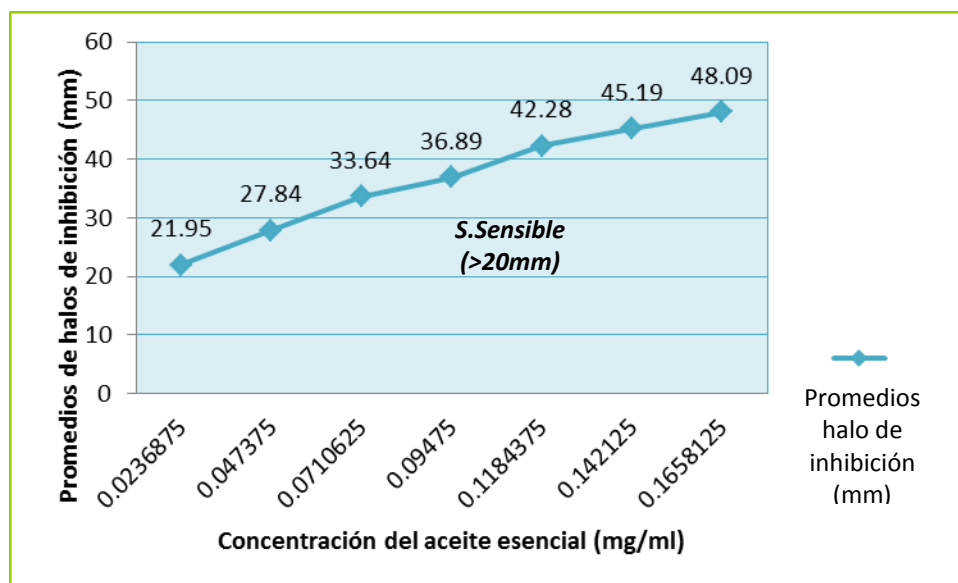
Aceite esencial		Grado de sensibilidad		
Vol (ul)	[ ](mg)	Sensibilidad límite 9-14mmm (Sensible=+)	Sensibilidad media 15-19mmm (muy sensible=++)	Sumamente sensible 20mm a más (S.S.=+++)
0,1	0,0236875	-	-	21,95
0,2	0,047375	-	-	27,84
0,3	0,0710625	-	-	33,64
0,4	0,09475	-	-	36,89
0,5	0,1184375	-	-	42,28
0,6	0,142125	-	-	45,19
0,7	0,1658125	-	-	48,09

Fuente: Elaboración propia

En el cuadro N°3, se determina el grado de sensibilidad de acuerdo a los promedios de los halos de inhibición según la escala de Duraffourd y Lapraz.; observando que en todas las concentraciones del aceite esencial dan halos de inhibición mayores a 20,0 mm; por lo cual indican que *Cándida albicans* ATCC 6538 es sumamente sensible frente a sus diferentes concentraciones del aceite esencial de *Cinnamomun zeylanicum* Breyn “canela”.

## GRÁFICO N° 2

Expresión gráfica del grado de sensibilidad de *Cándida albicans* ATCC 6538 a diferentes concentraciones del aceite esencial de *Cinnamomun zeylanicum* Breyn (Duraffourd y Lapraz)



Fuente: Gráfico obtenido del cuadro N°3.

En el Gráfico N°2, se muestra el grado de sensibilidad de los promedios de los halos de inhibición de acuerdo a la escala de Duraffourd y Lapraz. En síntesis se puede decir que todas las concentraciones del aceite esencial dieron halos de inhibición > a 20 mm, por lo cual se dice que se encuentran en la categoría de sumamente sensible.

#### CUADRO N° 4:

Análisis de varianza (ANOVA) para comparar la actividad antimicótica del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn “canela” a través de la variación de promedios de halos de inhibición sobre *Cándida albicans* ATCC 6538 entre las diferentes concentraciones empleadas.

Fuentes de variabilidad	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado Medio	F calculado	Sig./ F Tabular	
					0,05	0,01
Tratamientos	6	5382,616	897,102	163,396	2,244	3,102**
Error	63	345,892	5,490			
Total	69	5728,508				

CV. 6,410 %    \*\* Diferencias altamente significativas    ns no significativo

El cuadro N° 4, se observa los resultados del análisis de varianza (ANOVA), de los promedios de los halos de inhibición producidas a diferentes concentraciones del aceite esencial de *Cinnamomun zeylanicum* Breyn a niveles de confiabilidad al 95% y 99% con 6 y 63 grados de libertad. Siendo el F calculado 163,396 mayor a los valores del F Tabular que nos demuestra que existe diferencias estadísticas altamente significativas entre los promedios de los halos de inhibición de las concentraciones del aceite *Cinnamomun zeylanicum* Breyn frente a *Cándida albicans* ATCC 6538. Siendo el coeficiente de variabilidad de 6,410% aceptable

para las condiciones del ensayo; ya que se permite como máximo el 15% para condiciones de laboratorio.

**CUADRO N° 5:**

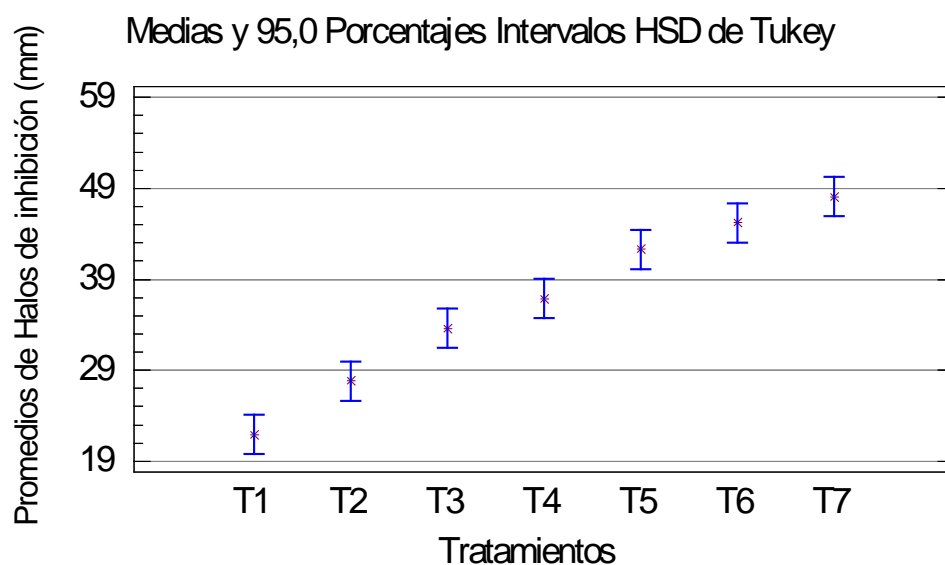
Prueba de significación de tukey para la Actividad antimicótica del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn "canela" frente a *Cándida albicans* ATCC 6538.

Orden de mérito	Concentraciones	(mm)	Significancia $\alpha$ 0,05
1	C <sub>7</sub> :	48,09	a
2	C <sub>6</sub> :	45,19	ab
3	C <sub>5</sub> :	42,28	b
4	C <sub>4</sub> :	36,89	c
5	C <sub>3</sub> :	33,64	d
6	C <sub>2</sub> :	27,84	e
7	C <sub>1</sub> :	21,95	f

La prueba de significación de Tukey al 95% de confiabilidad se observa los promedios de las concentraciones, donde difieren estadísticamente en sus promedios, destacan con el mayor la concentración C<sub>7</sub> con 48,09 mm seguido de la C<sub>6</sub> con 45,19 mm siendo estadísticamente similares en sus promedios, en el tercer lugar se ubica el C<sub>5</sub> con 42,28 mm, las concentraciones que tuvieron el menor promedio fueron C<sub>2</sub> con 27,84 mm y C<sub>1</sub> con 21,95 mm respectivamente.

#### GRÁFICA N° 4

Prueba de significación de tukey para la Actividad antimicótica del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn "canela" frente a *Cándida albicans* ATCC 6538.



En la figura muestra el gráfico de medias e intervalos de Tukey HSD al 95,0% no apreciándose diferencias estadística significativas entre los tratamientos, sin embargo destacan con los mayores promedios el T6 y T7.

### CUADRO N° 6:

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn "canela" frente a *Cándida albicans* ATCC 6538

N° Tubo	[ ] Aceite esencial (mg)	Turbidez
1	0,001579166667	+
2	0,003158333333	+
3	0,0047375	+
4	0,006316666667	+
5	0,007895333333	+
6	0,009475	+
7	0,011054166	+
8	0,012633333	+
9	0,0142125	+
10	0,015791666	+
11	0,017370833	+
12	0,01895	-
13	0,020529166	-
14	0,022108333	-
15	0,0236875	-
16	Control (+)	+
17	Control (-)	-

CMI

Fuente: Elaboración propia

En el cuadro N°6, se observa que las concentraciones de 0,001579166667 mg/ml hasta 0,017370833 mg/ml presentan turbidez (+), lo que indica la existencia del crecimiento micótico; pero a partir de las concentraciones 0,01895 mg/ml hasta 0,0236875 mg/ml no presentaron turbidez (-), lo que evidencia que no hubo

crecimiento micótico. En el tratamiento N° 12 cuya concentración es 0,01895 mg/ml es el CMI, ya que fue el primer tratamiento donde ya no hubo crecimiento micótico.

#### CUADRO N° 7:

Determinación de la Concentración mínima fungicida (CMF) del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn “canela” frente a *Cándida albicans* ATCC 6538

N° Tubo	[ ] (mg/ml)	UFC/Placa
12	0,01895	3
13	0,020529166	0
14	0,022108333	0

CMF

Fuente: Elaboración propia

En el cuadro N°7, se muestran sólo las concentraciones del aceite esencial de *Cinnamomun zeylanicum* Breyn “canela” donde no se evidenció turbidez, para determinar la concentración mínima fungicida (CMF); observándose que en la concentración de 0,020529166 mg/ml hay una inhibición absoluta del crecimiento de *Cándida albicans*, mientras que en la concentración 0,01895 mg/ml aún existe crecimiento de 3 UFC.

## **CAPÍTULO V: DISCUSIÓN**

La naturaleza es y seguirá siendo la fuente de una amplia variedad de moléculas bioactivas que podrían ser utilizadas como base para el diseño y la formulación de nuevas generaciones de medicamentos con el fin de solucionar diversos problemas de salud (11). El objetivo de esta búsqueda debe ser el descubrimiento de fármacos con mayor espectro, menos efectos adversos y menor costo que los existentes.

Un aspecto que motiva a la investigación en este campo y en especial con los antimicóticos es el desarrollo de mecanismos de resistencia por algunas especies, se explica en parte porque la mayoría de fármacos son fungistáticos y por la administración prolongada de los tratamientos, lo cual permite la aparición de clones resistentes. Por tanto ante este aumento de infecciones por hongos, se lleva a cabo una constante búsqueda de alternativas terapéuticas eficaces entre las plantas medicinales como fuente de nuevos y variados agentes antimicóticos. (11)

Se reconoce que los efectos de los aceites esenciales dependen de sus propiedades fisicoquímicas. Los terpenoides pueden servir como un ejemplo de agentes liposolubles, los cuales afectan la actividad de las enzimas catalizadoras a nivel de membrana, por ej. ciertos componentes del aceite esencial pueden

actuar como desacopladores, los cuales interfieren en la translocación de protones sobre la membrana y subsecuentemente interrumpir por la fosforilación del ADP (11).

En lo referente a la acción antimicótica de los metabolitos secundarios, interviene el carácter lipofílico e hidrofílico de sus grupos funcionales y a la polaridad que poseen, para poder tener propiedades antisépticas, antimicrobianas y antimicóticas, siendo esta actividad biológica de mayor a menor en fenoles, aldehídos, cetonas, alcoholes y éteres. Los esfuerzos para encontrar una correlación entre la composición y bioactividad de los aceites esenciales no han sido totalmente dilucidados. Se presume que la actividad biológica de estos aceites esenciales no está determinada por la cantidad de monoterpenos, sino más bien por su tasa de proporcionalidad (1,11).

Se han reportado que algunos aceites esenciales pueden ser más efectivos que los agentes sintéticos (antimicóticos) (1,3). Un motivo más para el desarrollo del presente trabajo de investigación toda vez que a la canela entre muchas propiedades se le atribuye efecto o actividad fungicida, por ello se determinó su actividad antimicótica in vitro frente a *Cándida albicans* ATCC 6538. La actividad biológica del aceite esencial de canela está relacionada con sus principales componentes, denominados cinamaldehído y eugenol. El primero se cree tiene la más alta actividad antimicótica entre los aldehídos alifáticos; mientras que al eugenol se le atribuyen propiedades antisépticas y anestésicas. (8)

El hongo evaluado fue seleccionado por ser un agente patógeno muy común en infecciones oportunistas en el ser humano. Las pruebas preliminares proporcionaron datos sobre el efecto del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn (canela), observándose sensibilidad para *Cándida albicans*.

El aceite esencial de canela se obtuvo por destilación por arrastre con vapor de agua, técnica muy utilizada tanto a pequeña escala y a escala industrial debido a su alto rendimiento, pureza del producto obtenido y porque no se requiere tecnología sofisticada dejando de lado otros métodos como la extracción con solventes volátiles, el método de enflorado o enfleurage y la extracción con fluidos supercríticos.

El aceite esencial de las cortezas de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn “canela” obtenido por el método de arrastre de vapor tuvo un rendimiento de 0,7%. Este aceite esencial se envasó y almacenó protegido de la luz y calor.

Posteriormente nos vimos en la necesidad de confirmar la presencia de ciertas sustancias específicas relacionadas con las propiedades que se le atribuyen a este aceite, para lo cual se utilizó la técnica de Cromatografía gaseosa.

De acuerdo al informe de ensayo N° ANA12J12.000614A que se realizó en la Universidad Católica de Santa María del Laboratorio de ensayo y Control de Calidad-Arequipa (Anexo 12); por el método de cromatografía gaseosa con detección de masa se observó en forma cualitativa y cuantitativa la presencia de los

siguientes compuestos: Alpha pinene (1,52%); Linalool,methyl ether (3,18%); *Cinnamaldehyde, (E)*-(70,79%); Thymol (1,86%); *Eugenol* (4,87%); Caryophyllene (3,42%) y 2-propen-1ol,3-phenyl-acetate (14,36%). En este contexto, se puede hipotetizar que la actividad antimicótica observada en este trabajo podría ser atribuida a una interacción o efecto sinérgico de los principios activos. (4)

Demostrándose así que el compuesto con mayor porcentaje es el cinamaldehído en un 70,79%. Se cree que su mecanismo de acción es generar alteraciones irreversibles en la membrana del hongo, especialmente bloqueando la síntesis de esteroides y la actividad de la ATPasa, condicionando sobremanera su futura supervivencia. Esta actividad sobre la ATPasa produce acidificación intracelular y muerte del hongo. (21)

El componente cinamaldehído presente en el aceite esencial de canela posiblemente tiene la más alta actividad antimicótica entre los aldehídos alifáticos ya que actúa inhibiendo la producción de enzimas intracelulares, tales como, amilasas y proteasas, lo que provoca el deterioro de la pared y un alto grado de lisis celular; por lo que impide el crecimiento micótico. (21)

El paso siguiente una vez confirmada la presencia de éstas sustancias fue observar su efectividad frente al patógeno aludido en párrafos anteriores (pág. 90); para lo cual se utilizó el método de difusión en Disco (Kirby Bauer) basado en el grado de sensibilidad en función al tamaño del halo de inhibición, también se utilizó

el método de dilución en medio líquido para hallar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y por último el método de difusión en agar para encontrar la concentración mínima fungicida (CMF). Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto, la actividad antimicótica presentada por el aceite esencial de *Cinnamomun zeylanicum* Breyn, frente a *Cándida albicans*.

En todas las pruebas de sensibilidad se trabajó con el dimetilsulfóxido 10% (DMSO) como diluyente del aceite en estudio debido a su gran viscosidad, lo cual podría reducir la capacidad de la dilución o podría causar distribución desigual del aceite a través del medio. Este disolvente aprótico de baja toxicidad es recomendado por la NCCLS (National Comite for Clinical Laboratory Standars) por no presentar ninguna actividad antibacteriana ni antimicótica, no interfiriendo en los resultados. (26)

Para la técnica se empleó el inóculo estandarizado de  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml, que asegura un mejor desarrollo de las colonias de las especies.

Las observaciones preliminares nos incentivó a seguir adelante con el estudio de esta especie botánica. Se determinó la efectividad del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn “canela” versus el hongo: *Cándida albicans* ATCC 6538, aplicando siete distintas concentraciones de aceite esencial, cada una con diez repeticiones y un control negativo, teniendo así 70 unidades experimentales. Los datos fueron procesados mediante el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba

de Tukey con un nivel de significancia de 0,05% y 0,01%, que permitió establecer mínimas diferencias entre los tratamientos.

En la primera prueba para la determinación de la actividad antimicótica del aceite esencial de *Cinnamomun zeylanicum* Breyn frente a *Cándida albicans* ATCC 6538, se prepararon discos de sensibilidad con determinados volúmenes (2,5 µl-20,0 µl) de aceite esencial puro, las cuales tenían concentraciones que inician de 2,36875 mg/ml hasta 18,95mg/ml, en este primer ensayo al realizar la lectura se observó que no hubo crecimiento micótico en toda la dimensión de la placa. Posteriormente se volvió a trabajar pero con volúmenes inferiores a los primeros (0,5 µl-4,0 µl) de aceite esencial puro con concentraciones correspondientes a 0,47375mg/ml hasta 3,79mg/ml a lo cual paralelamente se trabajó con un control positivo para *Cándida albicans*; es decir a esta placa no se adicionó el aceite esencial para verificar su crecimiento en el medio de cultivo (Agar sabouraud 2%); transcurrido el periodo de incubación de 37°C por 24h se procedió hacer las lecturas de las placas, verificándose que éstas nuevamente estaban exentas de hongos; mientras que en la placa que no se colocó aceite esencial si se evidenció el crecimiento de las colonias de *Cándida albicans*. Con lo que se pudo determinar que el aceite esencial de *Cinnamomun zeylanicum* Breyn puro poseía una alta actividad antimicótica frente a *Cándida albicans* ATCC 6538; por lo que se procedió hacer diluciones con DMSO a proporciones de 1/2 (100 µl aceite esencial+100 µl DMSO), con el fin de encontrar el grado de sensibilidad del agente micótico con el aceite esencial y posteriormente

hallar su CMI y CMF. Partiendo de esta dilución se procedió con toda la parte experimental, se tomaron volúmenes de dilución de 0,1 µl - 0,7 µl con concentraciones de 0,0236875mg/ml hasta 0,1658125mg/ml, todos los halos de inhibición obtenidos de éstas concentraciones presentaron un grado de sensibilidad señalados según la escala de Duraffourd y Lapraz como sumamente sensible (> 20 mm) porque su promedio mínimo fue de 21,95mm y promedio máximo de 48,09mm. (7)

En el cuadro N°2 y gráfico N°1 (pág. 79, 81), se puede apreciar la evaluación de la actividad antimicótica del aceite esencial *Cinnamomun zeylanicum* Breyn frente a *Cándida albicans* ATCC 6538, por el método de difusión en disco (Kirby Bauer). La sensibilidad de la cepa micótica empieza con el T1 (0,0236875mg/ml) con un halo promedio de inhibición de 21,95mm pero alcanzó un mayor diámetro de halo en el T7 (0,1658125mg/ml) con un halo promedio de 48,09mm; lo que indica que es directamente proporcional a la concentración utilizada; a mayor concentración mayor será el diámetro del halo de inhibición.

En el cuadro N° 3 y gráfico N°2 (pág. 82, 83), según la escala de aromatógroma de Duraffourd y Lapraz se muestra el grado de sensibilidad micótica en función al halo de inhibición del crecimiento del microorganismo (HICM), a la concentración de 0,0236875mg/ml del aceite esencial de *Cinnamomun zeylanicum* Breyn se aprecia un halo de inhibición de 21,95mm y a la concentración final de

0,1658125mg/ml el halo de inhibición es de 48,09mm lo que demuestra que todos los promedios de halos son sumamente sensibles.

Comparando estadísticamente mediante ANOVA, según el cuadro N°4 (pág. 84) con niveles de confiabilidad al 95 % y 99% se demuestra que existe diferencias altamente significativas entre los promedios de los halos de inhibición para las concentraciones utilizadas del aceite esencial de *Cinnamomun zeylanicum* Breyn frente a *Cándida albicans* ATCC 6538; con un coeficiente de variabilidad 6,410% siendo aceptable como un máximo de 15% para condiciones de laboratorio. Por lo que al realizar la prueba de significación de Tukey según cuadro N°5 y gráfica N°4 (pág. 85, 86) se confirmó que el T7 (0,1658125mg/ml) tuvo mayor actividad antimicótica y de mayor significancia para *Cándida albicans* ATCC 6538 con un halo de inhibición de 48,09mm.

Según el cuadro N°6 y N°7 (pág. 87, 88). La concentración mínima inhibitoria (CMI) se observa en el tratamiento 12 del aceite esencial de *Cinnamomun zeylanicum* Breyn con 0,01895mg/ml, esto debido a la ausencia de la turbidez y la concentración mínima fungicida (CMF) en el tratamiento 13 con una concentración de 0,020529166mg/ml, donde se aprecia la inhibición absoluta del crecimiento de *Cándida albicans* ATCC 6538.

Trabajos similares se han realizado en distintos países:

En Brasil, Juliana Moura Mendes y colaboradores (2011) investigaron la "Actividad antifúngica del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* sobre cepas de *Cándida tropicalis* de aislados clínicos", La CIM y CFM del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* fueron 0,512 y 1,024 mg/mL; Al comparar los resultados obtenidos con los nuestros para *Cándida albicans* ATCC 6538 con un CMI 0,01895 mg/ml y CMF de 0,020529166mg/ml, esta diferencia de actividad antimicótica podría deberse a la diferencia en la composición fitoquímica donde el eugenol representa 74% en *Eugenia caryophyllata* y 4,87% en *Cinnamomum zeylanicum* Breyn , y además el cinamaldehído representa un 70,79% lo que daría aparentemente un mayor efecto antimicótico al *Cinnamomum zeylanicum* Breyn sin considerar que el tipo de *Cándida* es distinto.

En Perú, Carlos A. Cano Pérez (2008), desarrolló el trabajo evaluación de la Actividad antimicótica in vitro y elucidación estructural del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* "muña". Mediante el método de agar en difusión, determinó la actividad antimicótica, frente a las cepas de: *Cándida albicans* y por el método de dilución en tubo también determinó la inhibición del crecimiento fúngico de: *Trichophytun tonsurans*, *Trichophytun mentagophytus*, *Microsporun canis*. El aceite esencial de muña inhibió completamente el desarrollo de *T. tonsurasn*, *T. mentagrophytes* y *M. canis* con ambos métodos de evaluación y dosis, para *C. albicans* se logró un halo de inhibición de 35 mm para el aceite esencial al 100% y de 30mm al 50%. En nuestro estudio frente a *Cándida albicans* no se pudo

determinar el halo de inhibición del aceite esencial de canela pura (100%), debido a que no se apreciaba crecimiento micótico en la total dimensión de la placa; sin embargo a la dilución de 50% su promedio de halo inhibitorio fue 48,09mm; mayor al obtenido con el aceite de muña hecho justificado probablemente a la diferente composición fitoquímica de las especies botánicas comparadas, en la muña el componente pulegona se encuentra en 36,68% mientras que en la canela el responsable es el cinamaldehído en un 70,79% lo que nos hace pensar que el mejor agente antimicótico para la *Cándida* es el cinamaldehído, pero esto estará sujeto a un estudio posterior comparativo de ambos aceites.

También en Perú, Huamaní Achata, María Elena y Ruiz Quiroz, Julio Reynaldo (2005), mediante el trabajo "Determinación de la actividad antifúngica contra *Cándida albicans* y *Aspergillus Níger* de 10 plantas medicinales de 3 departamentos del Perú"; La CMI de los extractos que presentaron actividad consistente frente a *Cándida albicans* ATCC 10231, fue de 0,25 mg/ml para *Hypericum laricifolium* L., *Juglans neotropica* Diels, *Psidium guajava* L. y *Schinus molle* y de 0,5 mg/ml para *Piper spp.* Al comparar los resultados obtenidos con los nuestros para *Cándida albicans* ATCC 6538 con un CMI de 0,01895 mg/ml con respecto al aceite esencial de *Cinnamomun zeylanicum* Breyn "canela" observamos diferencia a favor de nuestra planta probablemente por presentar diferente composición fitoquímica y métodos extractivos.

Por último para culminar tenemos que reafirmar el hecho que en una planta existen diferentes principios activos y que muchos de ellos actúan sinérgicamente por lo que su actividad terapéutica no depende solamente de uno, sino de la proporcionalidad de los mismos como se mencionó en la página 90; y el aceite esencial de la canela 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

- Primera: Se determinó que el aceite esencial obtenido de la corteza de ***Cinnamomun zeylanicum* Breyn** “canela” posee una fuerte actividad antimicótica in vitro frente a ***Cándida albicans* ATCC 6538**.
- Segunda: El aceite esencial extraído de las cortezas de ***Cinnamomun zeylanicum* Breyn** “canela” por el método de arrastre de vapor, tuvo un rendimiento de 0,7% y una densidad de 0,9475g/ml. Su aspecto fue translúcido, de color marrón, olor característico y sabor picante.
- Tercera: Mediante el estudio fitoquímico de cromatografía de gases con detección de masas realizado al aceite esencial de ***Cinnamomun zeylanicum* Breyn** “canela” se verificó que el compuesto de cinamaldehído está presente en un 70,79%, siendo este el más prevalente de entre los demás compuestos.
- Cuarta: El grado de sensibilidad de ***Cándida albicans* ATCC 6538** frente al aceite esencial de ***Cinnamomun zeylanicum* Breyn** “canela” es

sumamente sensible a concentraciones de 0,0236875mg/ml-0,1658125 mg/ml.

Quinta: La concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de ***Cinnamomun zeylanicum* Breyn** para ***Cándida albicans* ATCC 6538** fue de 0,01895mg/ml.

Sexta: La concentración mínima fungicida (CMF) del aceite esencial ***Cinnamomun zeylanicum* Breyn** para ***Cándida albicans* ATCC 6538** fue de 0,020529166mg/ml.

## RECOMENDACIONES

1. Se debe valorar la actividad antimicótica del aceite esencial de *Cinnamomun zeylanicum* Breyn (canela) frente a otros hongos causantes de dermatofitosis.
2. Realizar pruebas in vivo para valorar la efectividad y la toxicidad que pueden proporcionar los componentes activos de *Cinnamomun zeylanicum* Breyn como también poder determinar sus dosis terapéuticas.
3. Elaborar diferentes formas farmacéuticas de acuerdo a la vía de administración utilizando aceite esencial de *Cinnamomun zeylanicum* Breyn (canela) para realizar ensayos clínicos en pacientes con dermatosis por *Cándida albicans*.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

### LIBROS

1. ALI-SHTAYEH MS, ABU GHDEIB SI. (1999). Antifungal activity of plant extracts against dermatophytes. *Mycoses.*; 42(11-12): 665-72
2. ARANGO MEJÍA, MARÍA CRISTINA (2007), "Plantas Medicinales"- Botánica de interés Médico. Editorial Forja, Colombia, Bogotá.
3. BURROYS, WILLIAM (1969). "Tratado de microbiología"- 19ava edición, Editorial Interamericana S.A.
4. BRUNETON, J. (2001). Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales. 2ª Ed. Zaragoza: Acribia S. A.
5. CAMAQUI A. (2009). Plantas medicinales: La experiencia de Tinguipaya. 2da Edición, Editorial Gente Común. La Paz, Bolivia.
6. DIXON DM, RHODES JC, FROMTLING R.A. (1999): Taxonomy, classification, and morphology of fungi. In Murray PR et al, ed 7, editors: *Manual of clinical microbiology*, , Washington, DC, American Society for Microbiology
7. DURAFFOURD, C y J., LAPRAZ (1983). Cuaderno de fitoterapia clínica. Editorial Masson. Francia.

8. FONNEGRA G., RAMIRO Y JIMÉNEZ R. SILVIA (2006) "Plantas Medicinales aprobadas en Colombia" -2da Edición , Editorial Universidad de Antioquia.
9. FUNDACIÓN ALFONSO MARTÍN ESCUDERO (1999)-Las Plantas de Extractos. Bases para un Plan de Desarrollo del Sector. Madrid.
10. GARCÍA-BARRIGA H., (1974), "Flora Medicinal de Colombia". Tomo I. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional, Bogotá.
11. KALEMBA D, KUNICKA A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr Med Chem.* 10(10): 813-29.
12. KONEMAN. ALLEN. JANDA. (1987) "Diagnostico Microbiológico"-Texto y Atlas en color-6ta Edición. Editorial médica Panamericana
13. KUKLINSKI CLAUDIA (2003), Farmacognosia "Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural"-Ediciones Omega.
14. LEHMAN (1998). PF: Fungal structure and morphology. In Ajello L, Hay RJ, vol 4, editors: Topley and Wilsons Microbiology and microbial diseases, Medical mycology. London.
15. LOCK DE UGAS, O. (1994). Investigación fitoquímica. Método en el estudio de productos naturales. 2da Edición. PUCP. Lima – Perú.
16. MAOZ, M. y NEEMAN, I. (1998). Antimicrobial effects of aqueous plant extracts on the fungi *Microsporum canis* and *Trichophyton rubrum* and on three bacterial species *Letters in Applied Microbiology*; 26: 61-63.

17. MOSCOSO CASTILLA M. (2002). Secretos Medicinales de la flora peruana y guía de maternidad, 4ta edición: Editorial Mundi-Prensa. España: Madrid.
18. MURRAY PATRICIA R, ROSENTHAL KEN S. (2012). "Microbiología médica" 4ta Edición- Elsevier science impr. Mosby
19. 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. 87 (1): 85-89
20. SÁNCHEZ O. S. (1980) Flora del valle de México. Tomo I. Cuarta edición. Editorial Herrera.
21. SHEIKH S., RIMPLE B. Et Al. (2011). Spice oil cinamaldehyde exhibits potent anticandidal activity against fluconazol resistant clinical isolates. Fitoterapia 82 (7): 1012-2. Disponible en: Fuente: <http://www.plantasmedicinales.org/index.php?895>

## **TESIS**

22. CANO PÉREZ, CARLOS A. (2008), "Actividad Antimicótica in vitro y elucidación estructural del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña)" Universidad Nacional Mayor de San Marcos-Facultad de Farmacia y Bioquímica Unidad de Post Grado. Lima-Perú.

23. CHAMORRO AW.; MORALES E, SEQUEIRA W. y GUSTAVO, A (2006). Identificación de los componentes del aceite esencial de hojas de *Eugenia caryophyllata*. Grupo de Investigación en Química Orgánica y Biológica QUIMOB. UT. Facultad Regional Resistencia. French 414. Resistencia, Chaco-Argentina.
24. 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
25. CORNEJO, A,V. (1986). "Estudio morfológico-estructural de plantas medicinales de uso más frecuente en Ayacucho"-Tesis Universidad San Cristóbal de Huamanga-Perú.
26. 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.
27. LIMA, S. (2005). Análisis de los rendimientos obtenidos de dos especies de eucalipto trabajados en seco a nivel laboratorio y a nivel planta piloto en la extracción de su aceite esencial. Universidad de San Carlos de

Guatemala. Facultad de Ingeniería. Escuela de Ingeniería Química.  
Guatemala.

28. MOURA MENDES, JULIANA y COL. (2011), "Actividad antifungica del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* sobre cepas de *Cándida tropicalis* de aislados clínicos". Universidad Federal de Paraiba. Brasil.
29. PADRÓN MÁRQUEZ, BEATRÍZ (2010), "Componentes Químicos con Actividad Bactericida, Fungicida y Citotóxica de Plantas de la Familia Myrtaceae y Lauraceae" Universidad Autónoma de Nuevo León Facultad de Ciencias Biológicas. México.

## REVISTAS

30. CATALÁN M, MONTEJO J.C. (2006). Antifúngicos sistémicos: Farmacodinamia y Farmacocinética. Revista Iberoamericana Micol. Disponible en: <http://www.reviberoammicol.com/2006-23/039049.pdf>
31. GUNDIDZA M. (1993). La Actividad de Antimicrobial de Aceite Esencial de *Eugenia caryophyllata* Linn. Revista médica Africian.. 39 (11): 231-234. Brasil.
32. MESA-ARANGO, A.C., BUENO SANCHEZ, J.G. AND BETANCUR GALVIS, L.A. (2004). Natural products with antimycotic activity. Rev Esp Quimioter 17: 325-331

33. PONTÓN J, MORAGUES MD, GENÉ J, GUARRO J, QUINDÓS G. (2002). Revista iberoamericana de micología: Hongos y actinomicetos alergénicos, 1era Edición. España: Bilbao.
34. SOCIEDAD IBEROAMERICANA DE INFORMACIÓN CIENTÍFICA (SIIC) 2002. Disponible en:  
<http://www.bago.com/BagoArg/Biblio/infectoweb534.htm>
35. VILA R, CAÑIGUERAL S. (2006). El aceite esencial de Melaleuca alternifolia en el tratamiento de vulvovaginitis. Revista de Fitoterapia. España: Disponible en: [http://www.fitoterapia.net/revista/pdf/RDF6-2\\_melaleuca.pdf](http://www.fitoterapia.net/revista/pdf/RDF6-2_melaleuca.pdf)
36. WORLD HEALTH ORGANIZATION-ANTIMICROBIAL RESISTANCE (2002). Fact sheet N°194. Disponible en:  
[www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/print.html](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/print.html)

#### **ENLACES DE INTERNET**

37. <http://candidalbicans.blogspot.com/>
38. <http://hongos-alergenicos.reviberoammicol.com/files/025.PDF>
39. <http://lunavital.com/index.php/articulos/terapias/74-la-fitoterapia>
40. <http://medicinaunp2008.blogspot.com/2008/09/fuentes-de-cultura-popular-y-medicina.html>
41. <http://www.briconatur.com/briconaturblog/category/briconatur-2/>

**ANEXOS**

**ANEXO Nº 01:** Cortezas de *Cinnamomun zeylanicum* Breyn “canela”



**ANEXO N° 02:** Extracción del aceite esencial de la corteza de *Cinnamomun zeylanicum* Breyn “canela” por el método de destilación por arrastre de vapor.





**ANEXO Nº 03:** Cepa micótica en estudio *Cándida albicans* ATCC 6538, proporcionada por el MINSA-TACNA.



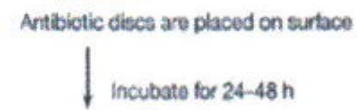
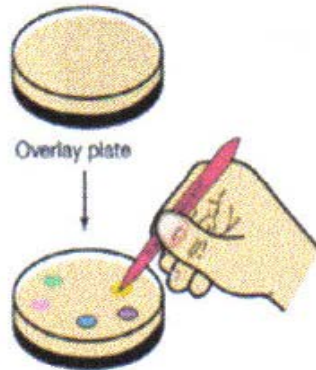
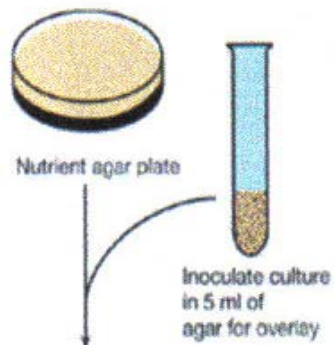
**ANEXO Nº 04:** Activación de *Cándida albicans* ATCC 6538; en medio agar Sabouraud 2%.



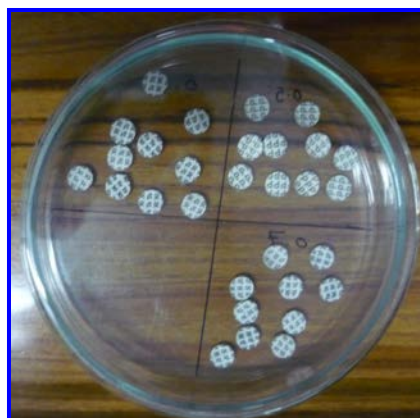
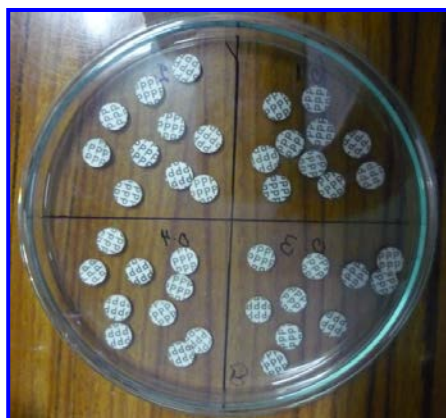


ANEXO Nº 5:

## *Técnica de Kirby-Bauer*

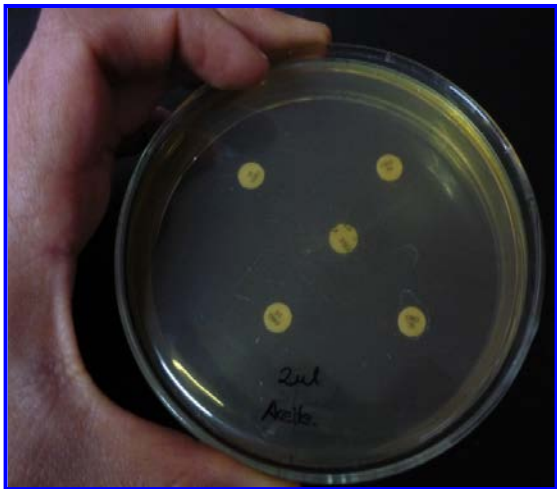


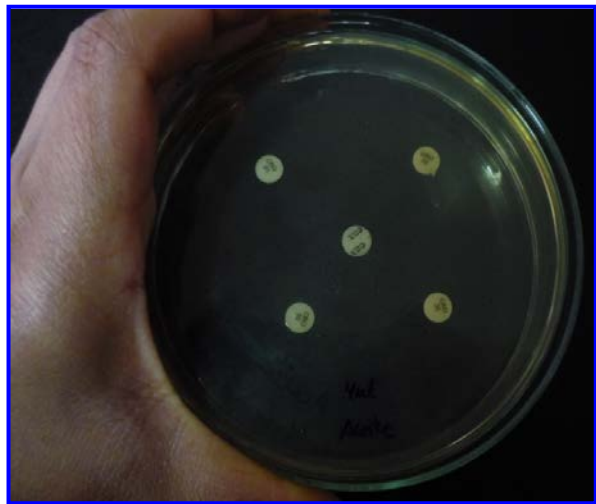
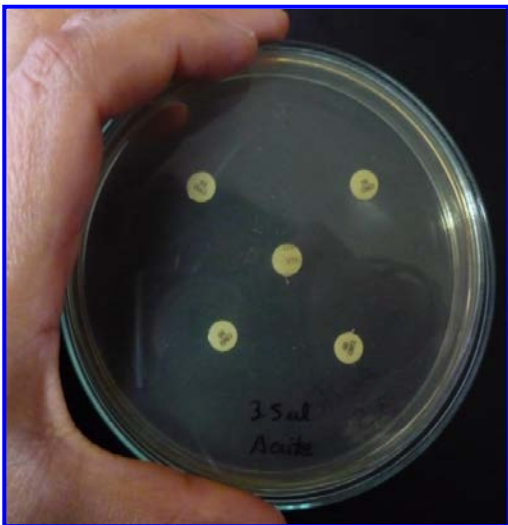
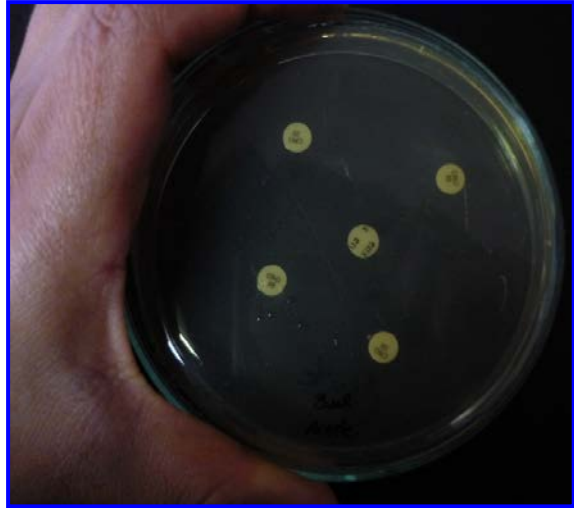
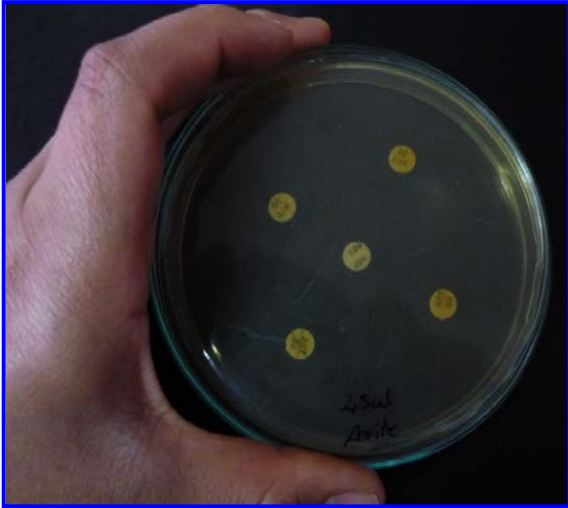
Test organism shows sensitivity to some antibiotics, indicated by inhibition of bacterial growth around discs (zones of inhibition) after incubation.



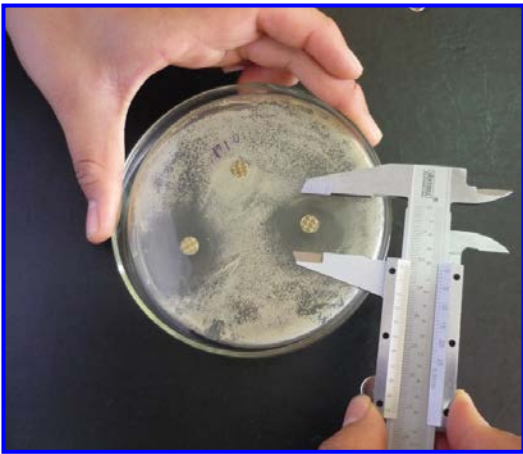


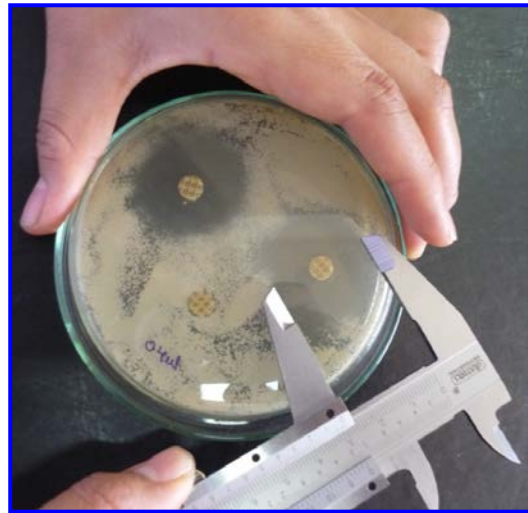
**ANEXO Nº 6:** Sensibilidad de *Cándida albicans* ATCC 6538 frente al aceite esencial puro de *Cinnamomun zeylanicum* Breyn "canela"

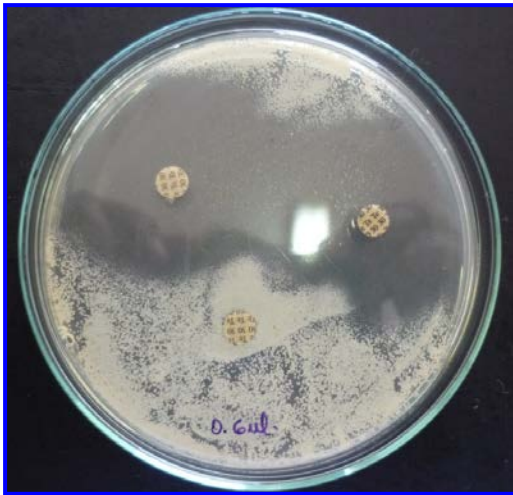
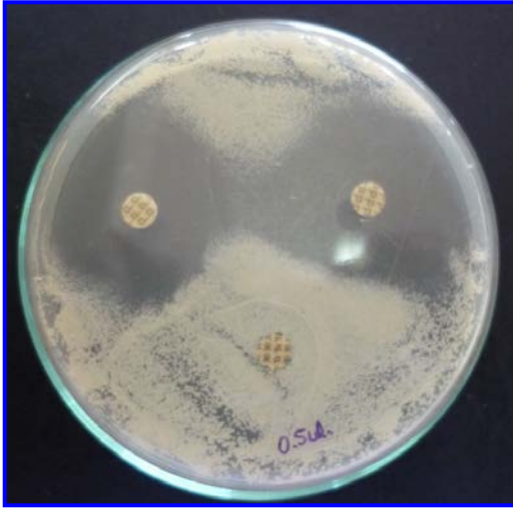


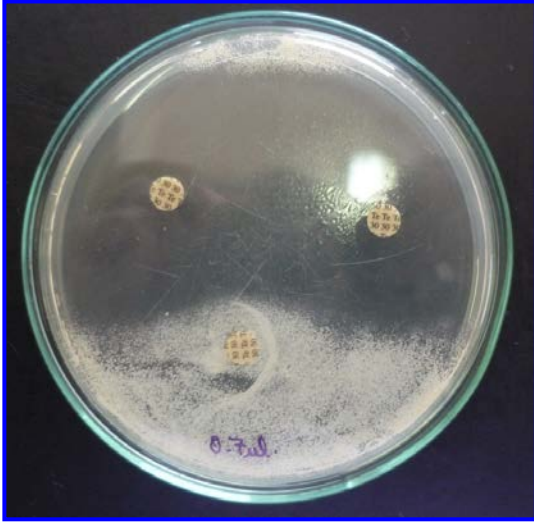


**ANEXO Nº 7:** Sensibilidad de *Cándida albicans* ATCC 6538 frente al aceite esencial (1/2) de *Cinnamomun zeylanicum* Breyn “canela”

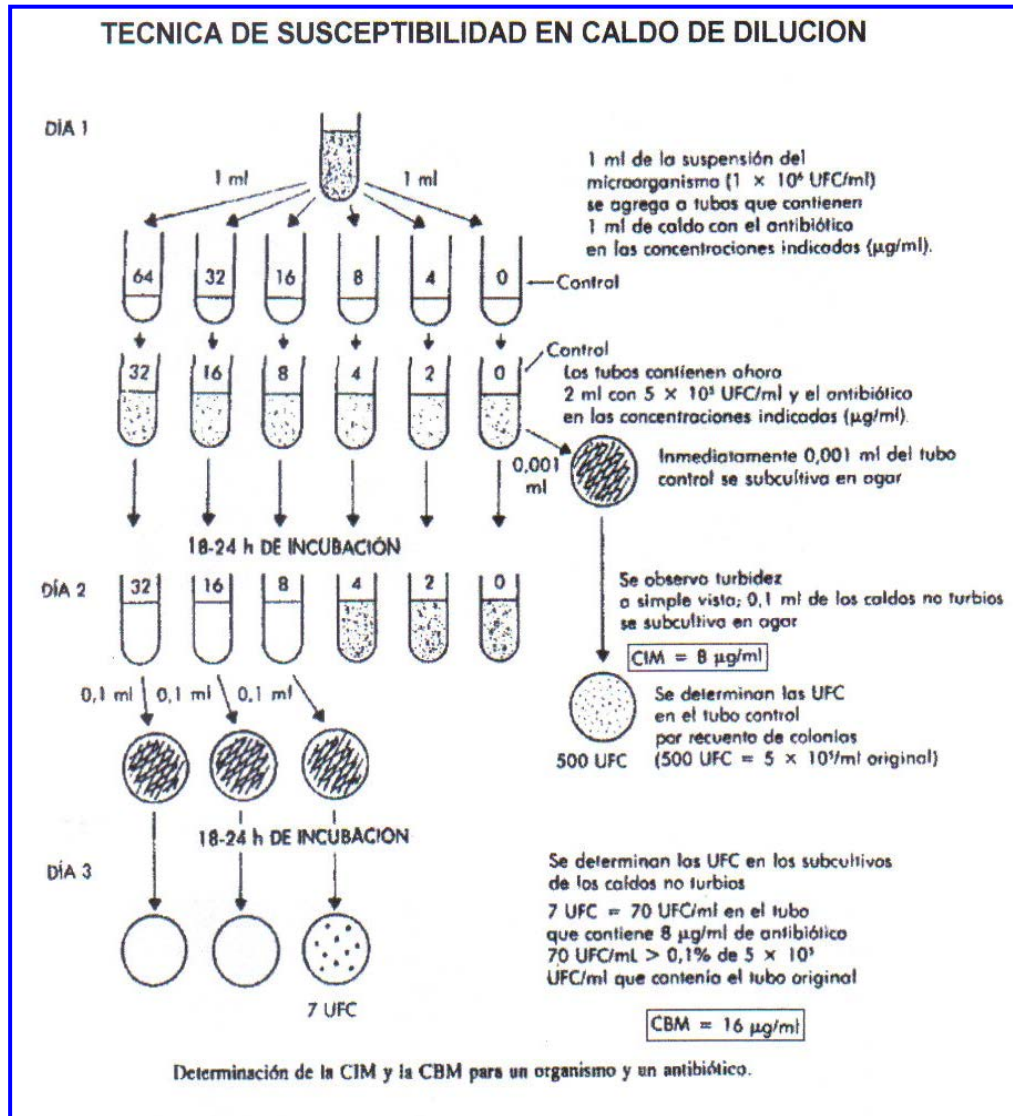








ANEXO Nº 8:



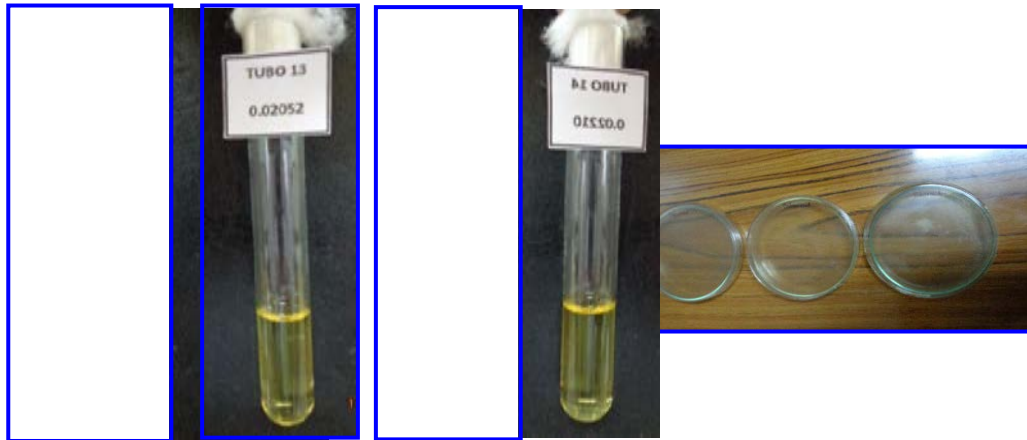
**ANEXO Nº 9:** Concentración Mínima Inhibitoria de *Cándida albicans* ATCC 6538 frente al aceite esencial de *Cinnamomun zeylanicum* Breyn “canela”

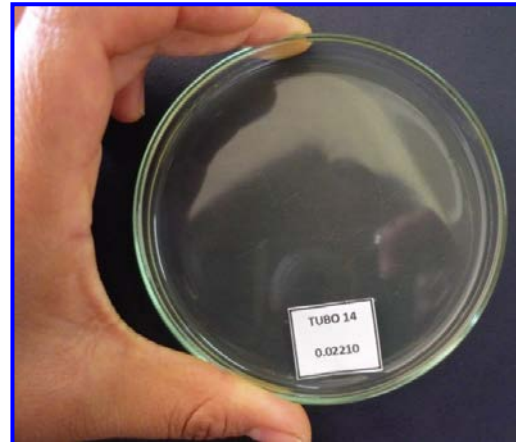
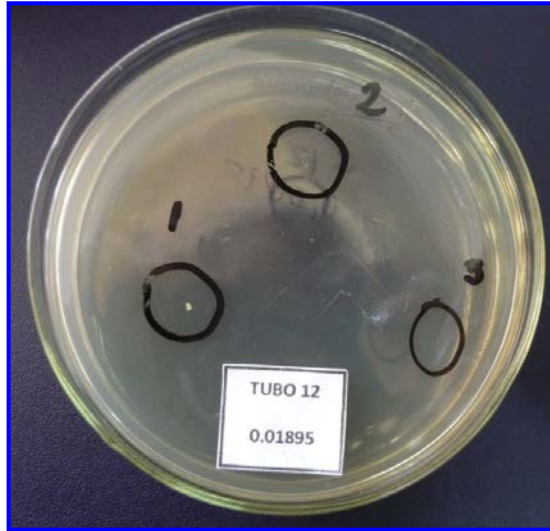




CMI= 0,01895 mg/ml

**ANEXO Nº 10:** Concentración Mínima fungicida de de *Cándida albicans* ATCC 6538 frente al aceite esencial de *Cinnamomun zeylanicum* Breyn "canela"





CMF= 0,02052 mg/ml

**ANEXO N° 11: Identificación de especie botánica**

Tacna, 29 de agosto del 2012

Señor:

DR. QUITERIO VALENCIA MECOLA

Decano de la Facultad de Ciencias Agropecuarias


Presente.-


De mi consideración:

Tengo el agrado de dirigirme a Ud., para manifestarle con relación a la solicitud de la Srta Milagros Rosalía Marca Cuello, sobre la identificación de una especie botánica, informo que se ha procedido a identificar la muestra entregada y debo señalar que se trata de **Cinnamomum zeylanicum Breyn. "Canela"**.

Sin más que informar al respecto, le saludo cordialmente.

Atentamente;

  
Dra. Rosario Zegarra Zegarra  
Profesora Principal DE- FCAG

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
RECIBIDO  
03 SEP 2012  
Registro N° \_\_\_\_\_  
Hora: 8:40 Firma: 

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS UNJBG  
PROV N°: 2702 FECHA: \_\_\_\_\_  
A : INTERESAD  
PARA : De conocimiento y fines  
DECANO TACNA  
DECANO

**ANEXO N° 12:** Estudio fitoquímico del aceite esencial de *Cinnamomun zeylanicum*  
Breyn “canela”



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEÚTICAS, BIOQUÍMICAS Y BIOTECNOLÓGICAS  
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD



Urb. San José S/N Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ +51 54 251210 ANEXO 1166  
✉ laboratorioensayoucsm@gmail.com 🌐 http://www.ucsm.edu.pe 📍 Apíto. 1350  
AREQUIPA - PERÚ



**INFORME DE ENSAYO**

**N° DE INFORME: ANA12J12.000614A**

<b>Nombre del Cliente</b>	: MILAGROS ROSALÍA MARCA CUELLO
<b>Dirección del Cliente</b>	: CIUDAD NUEVA COMITÉ 38 MZNA 162 LOTE 2 - TACNA
<b>Condición del Muestreado</b>	: POR EL CLIENTE
<b>Descripción</b>	: ACEITE ESENCIAL DE CANELA
<b>Envase</b>	: Tubo de ensayo vidrio con tapa rosca
<b>Peso de Muestra</b>	: 4,5 mL
<b>Fecha de Recepción</b>	: 12/10/2012
<b>Fecha de Emisión de informe</b>	: 19/10/2012
<b>Paginas</b>	: Pagina 1 de 3

**I. ANALISIS FISICO QUIMICO**

ANALISIS	RESULTADO
<b>Determinación cualitativa de metabolitos secundarios</b> Cromatografía Gaseosa con detección de masas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• .Alpha. – pinene</li> <li>• Linalool, methyl ether</li> <li>• Cinnamaldehyde, (E)-</li> <li>• Thymol</li> <li>• Eugenol</li> <li>• Caryophyllene</li> <li>• 2-propen-1-ol, 3-phenyl-, acetate</li> </ul>

<b>Determinación Cuantitativa de metabolitos secundarios (%)</b> Cromatografía Gaseosa con detección de masas, método de cuantificación, por normalización interna (área)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• .Alpha. – pinene (1,52%)</li> <li>• Linalool, methyl ether (3,18%)</li> <li>• Cinnamaldehyde, (E)- (70,79%)</li> <li>• Thymol (1,86%)</li> <li>• Eugenol (4,87%)</li> <li>• Caryophyllene (3,42%)</li> <li>• 2-propen-1-ol, 3-phenyl-, acetate (14,36%)</li> </ul>
--	---





UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS Y BIOTECNOLÓGICAS  
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD

Urb. San José S/N Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ +51 54 251210 ANEXO 1166  
✉ laboratorioensayoucsm@gmail.com 🌐 http://www.ucsm.edu.pe 📍 Aptdo. 1350  
AREQUIPA - PERU



INFORME DE ENSAYO

Nº DE INFORME: ANA12J12.000614A

<b>Nombre del Cliente</b>	: MILAGROS ROSALÍA MARCA CUELLO
<b>Dirección del Cliente</b>	: CIUDAD NUEVA COMITÉ 38 MZNA 162 LOTE 2 - TACNA
<b>Condición del Muestreo</b>	: POR EL CLIENTE
<b>Descripción</b>	: ACEITE ESENCIAL DE CANELA
<b>Envase</b>	: Tubo de ensayo vidrio con tapa rosca
<b>Peso de Muestra</b>	: 4,5 mL
<b>Fecha de Recepción</b>	: 12/10/2012
<b>Fecha de Emisión de informe</b>	: 19/10/2012
<b>Páginas</b>	: Pagina 2 de 3

I. ANEXO

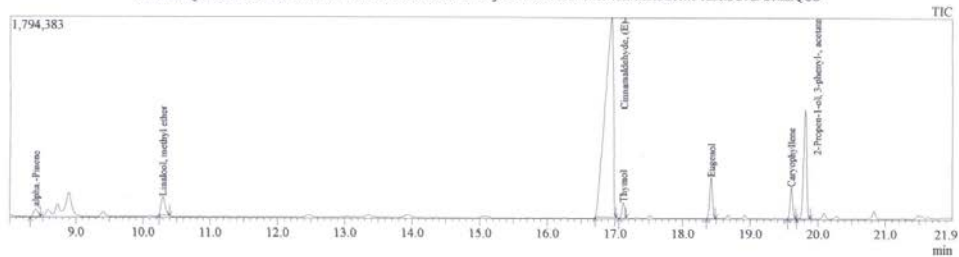
CROMATOGRAMA

Sample Information

Analyzed by	: Admin
Analyzed	: 16/10/2012 10:22:58 a.m.
Sample Type	: Standard
Level #	: 1
Sample Name	: aceite canela 20ul-20ml
Sample ID	: aceite canela 20ul-20ml
IS Amount	: [1]=1
Sample Amount	: 1
Dilution Factor	: 1
Vial #	: 1
Injection Volume	: 1.00
Data File	: C:\GCMSolution\Data\Project 1\metodos\aceites esenciales\aceite canela 20ul-20ml.QGD
Org Data File	: C:\GCMSolution\Data\Project 1\metodos\aceites esenciales\aceite canela 20ul-20ml.QGD
Method File	: C:\GCMSolution\Data\Project 1\metodos\aceites esenciales\cato scan ok.qgm
Org Method File	: C:\GCMSolution\Data\Project 1\metodos\aceites esenciales\cato scan ok.qgm
Report File	:
Tuning File	: C:\GCMSolution\System\Tune\30092011_28-09-2012.qgr
[Comment]	:
16/10/12	:
Modified by	: Admin
Modified	: 18/10/2012 10:44:09 a.m.



Chromatogram aceite canela 20ul-20ml C:\GCMSolution\Data\Project 1\metodos\aceites esenciales\aceite canela 20ul-20ml.QGD



Los resultados emitidos en el presente informe se relacionan únicamente a las muestras ensayadas. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS Y BIOTECNOLÓGICAS  
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD

Urb. San José S/N Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ +51 54 251210 ANEXO 1166  
✉ laboratorioensayocsm@gmail.com 🌐 http://www.ucsm.edu.pe 📄 Aptdo. 1350  
AREQUIPA - PERU



INFORME DE ENSAYO

Nº DE INFORME: ANA12J12.000614A

**Nombre del Cliente** : MILAGROS ROSALÍA MARCA CUELLO  
**Dirección del Cliente** : CIUDAD NUEVA COMITÉ 38 MZNA 162 LOTE 2 - TACNA  
**Condición del Muestreado** : POR EL CLIENTE  
**Descripción** : ACEITE ESENCIAL DE CANELA  
**Envase** : Tubo de ensayo vidrio con tapa rosca  
**Peso de Muestra** : 4,5 mL  
**Fecha de Recepción** : 12/10/2012  
**Fecha de Emisión de informe** : 19/10/2012  
**Paginas** : Pagina 3 de 3

Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Peak Report TIC						
				Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	8.393	8.310	8.465	328131	1.52	68266	1.82	4.81	MI	alpha-Pinene
2	10.301	10.240	10.400	687406	3.18	159931	4.25	4.30		Linalool, methyl ether
3	16.958	16.705	17.015	15288644	70.79	1779127	47.31	8.59		Cinnamaldehyde, (E)-
4	17.126	17.055	17.165	400993	1.86	136751	3.64	2.93	MI	Thymol
5	18.426	18.355	18.490	1050785	4.87	364544	9.69	2.88		Eugenol
6	19.610	19.550	19.675	739602	3.42	276743	7.36	2.67		Caryophyllene
7	19.816	19.685	19.890	3102560	14.36	975057	25.93	3.18		2-Propen-1-ol, 3-phenyl-, acetate

Q.F. Juan Ramirez Orellana  
COFA 052  
DIRECTOR TÉCNICO LECC

