



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

CARRERA DE ODONTOLOGÍA

Proyecto de Investigación para obtener el título de Odontóloga

TRABAJO DE TITULACIÓN

**“ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA “*IN VITRO*” DEL ACEITE ESENCIAL
Y EXTRACTO ALCOHÓLICO DEL
Syzygium aromaticum “CLAVO DE OLOR” SOBRE
Candida albicans CEPA ATCC 10231”**

Autora: Br. Johana Alexandra Cueva Borja

Tutora: Ms.C. Silvia Reinoso

RIOBAMBA – ECUADOR

2017

PÁGINA DE REVISIÓN DEL TRIBUNAL

Los miembros del tribunal de graduación del proyecto de investigación de título:
**“ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA “*IN VITRO*” ACEITE ESENCIAL Y DEL
EXTRACTO ALCOHÓLICO DEL *Syzygium aromaticum* “CLAVO DE OLOR”
SOBRE *Candida albicans* CEPA ATCC 10231.**

Presentado por Br. JOHANA ALEXANDRA CUEVA BORJA, y dirigido por: Ms.C. Silvia
Alexandra Reinoso Ortiz.

Una vez revisado el informe final del proyecto de investigación con fines de graduación
escrito en el cual se ha constado el cumplimiento de las observaciones realizadas, el proyecto
de investigación está apto para la defensa pública por lo que remite al coordinador de la
Unidad de Titulación Especial de la Carrera de Odontología para que el presente estudiante
pueda continuar con su proceso de Titulación.

Para constancia de lo expuesto firman:

Dra. Sandra Cruz

Presidente del Tribunal



.....

Dr. David Guerrero

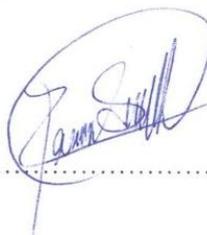
Miembro del Tribunal



.....

Dr. Xavier Salazar

Miembro del Tribunal



.....



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO FACULTAD DE
CIENCIAS DE LA SALUD
CARRERA DE ODONTOLOGIA**

El suscrito Docente y Tutor de la Carrera de Odontología, de la Facultad de Ciencias de la Salud, de la Universidad Nacional de Chimborazo, MsC. Silvia Reinoso certifico que la Srta. Johana Alexandra Cueva Borja, con C.I.060356283-6, se encuentra apta para la presentación del proyecto de investigación; **“ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA “IN VITRO” DEL ACEITE ESENCIAL Y EXTRACTO ALCOHÓLICO DEL *Syzygium aromaticum* “CLAVO DE OLOR” SOBRE *Candida albicans* CEPA ATCC 10231”**.

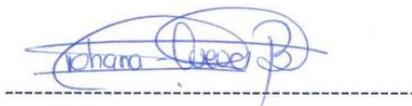
Atentamente

Ms.C. Silvia Reinoso

DOCENTE- TUTOR DE LA CARRERA DE ODONTOLOGIA

DERECHO DE AUTORÍA:

Yo, Johana Alexandra Cueva Borja soy responsable de todo el contenido de este trabajo de investigación, los derechos de autoría pertenecen a la Universidad Nacional de Chimborazo.



Johana Alexandra Cueva Borja

0603562836

AGRADECIMIENTO

A Dios por regalarme el don valioso de la vida y por brindarme bendiciones, sabiduría para poder seguir adelante en mi vida cotidiana y profesional.

Un especial agradecimiento a la Ms.C. Silvia Reinoso por ser mi tutora y guía para lograr culminar el presente proyecto investigativo y también al Ing. Félix Falconi, Ing. Édison Bonifaz por ser parte integral de la realización de esta investigación. Como también a todos los profesionales y personas que han sido parte importante en mi formación académica.

DEDICATORIA

Mi estudio de especialización académica lo dedicare siempre a mi Madre Bertha Borja, a mi tía Miryam y a mi hijo Mattius quienes han sido siempre las personas que en el transcurso de toda una vida me han apoyado e incentivado para luchar y alcanzar las metas que me proponga.

De manera especial a mi hijo por que él ha sido mi compañero de vida en este camino de triunfos y adversidades y el más grato reconocimiento a mí amado ángel del cielo mí querido Gonzalito que fue más que un padre quien desde niña forjo en mí grandes valores y bendiciones, que incentivo en mí ese gran sueño que tu tenías para alcanzar esta meta reto este gran logro va dedicado con todo mi amor para ti mi abuelito Gonzalito

Resumen

El propósito de este estudio investigativo fue verificar la actividad antifúngica “*in vitro*” que tiene el aceite esencial y extracto alcohólico de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor) sobre una cepa de *Candida albicans*. Tanto el aceite esencial como el extracto alcohólico de clavo de olor se obtuvieron por diferentes métodos utilizados en el laboratorio de Biología Molecular –Genética e Investigación de la Unach, para poder realizar el siguiente estudio microbiológico utilizamos la técnica de dilución en caldo, las cuales se tomaron en cuenta concentraciones desde 50.000ppm, hasta la mínima concentración de 1.500 ppm , estas concentraciones están diluidas en una mezcla con denominación de “mix” que consta de: Caldo Sabouraud Broth Dextrosa+DMSO+ *Candida albicans*, que luego serán inoculadas en cajas Petri. Utilizando el método de difusión en discos se realizaron concentraciones desde 1.500 ppm hasta 25 ppm diluidas con el solvente dimetilsulfóxido. Se comparó el aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor) con el antimicótico utilizado que fue el fluconazol con presentación farmacéutica de 150mg para el control positivo y para el control negativo se usó H₂O destilada. Para la obtención del extracto alcohólico de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor) se realizó mediante un Rotavapor de Buchi, luego se hicieron concentraciones desde 50.000ppm hasta la mínima concentración que fue de 5.000 ppm. Según los métodos realizados tanto en el aceite esencial como en el extracto alcohólico de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor) se comprobó que su aceite esencial presenta un mayor efecto antifúngico sobre *Candida albicans* cepa ATCC 10231, en el extracto alcohólico se verifico que este no tuvo ningún tipo de efecto antifúngica sobre *Candida albicans* cepa ATCC 10231.

Palabras Claves: *Cándida albicans*, Caldo Sabouraud Broth Dextrosa, *Syzygium aromaticum*,

ABSTRACT

The purpose of this research study was to verify the antifungal activity "in vitro" that the essential oil and alcoholic extract of *Syzygium aromaticum* (clove) have on a strain of *Candida albicans*. Both the essential oil and the alcoholic extract of cloves were obtained by different methods used in the laboratory of Molecular Biology - Genetics and Research of the Unach, the technique of broth dilution was used to perform the following microbiological study, concentrations from 50,000ppm were taken into account, up to the minimum concentration of 1,500ppm, these concentrations are diluted in a mixture with a "mix" denomination consisting of: Sabothraud broth Dextrose + DMSO + *Candida albicans*, which will then be inoculated in Petri dishes.

Using the disk diffusion method, concentrations from 1,500 ppm to 25 ppm diluted with the solvent dimethyl sulfoxide were made. The essential oil of *Syzygium aromaticum* (clove) was compared with the antifungal used, which was fluconazole with a pharmaceutical presentation of 150 mg for the positive and the negative control, distilled H₂O was used. To obtain the alcoholic extract of *Syzygium aromaticum* (clove), it was made using a Rotavapor from Buchi, then concentrations were obtained from 50,000ppm to the minimum concentration that was 5,000 ppm.

According to the methods which were carried out both in the essential oil and in the alcoholic extract of *Syzygium aromaticum* (clove) it was found that its essential oil has a greater antifungal effect on *Candida albicans* strain ATCC 10231, in the alcoholic extract it was verified that it had no kind of antifungal effect on *Candida albicans* strain ATCC 10231.

Key Words: *Candida albicans*, Sabothraud Broth Dextrose Broth, *Syzygium aromaticum*.

Reviewed by: Solís, Lorena
Language Center Teacher



ÍNDICE DE CONTENIDO

PORTADA	I
REVISIÓN DEL TRIBUNAL.....	II
CERTIFICADO DEL TUTOR.....	III
AUTORÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....	IV
AGRADECIMIENTO	V
DEDICATORIA	VI
RESUMEN	VII
ABSTRACT	VIII
ÍNDICE DE CONTENIDOS	IX
ÍNDICE DE TABLAS	XII
ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS	XIII
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	XIV
1.INTRODUCCIÓN	1
2.PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
3.JUSTIFICACIÓN	5
4.OBJETIVOS	6
4.1. Objetivo General	6
4.2. Objetivos Específicos	6
5.0 MARCO TEÓRICO	7
5.1. Antifúngico.....	7
5.2. Herbolaria.....	7
5.3. Clavo de olor	8
5.3.1 Generalidades de clavo de olor (<i>sysygium aromaticum</i>).....	8
5.3.2 Clasificación Taxonomica de <i>Sysygium aromaticum</i>	9

5.3.3 Composicion química	9
5.3.4 Aceite esencial y extracto alcoholico de <i>Syzygium aromaticum</i>	10
5.3.4.1 Aceite esencial de <i>Syzygium aromaticum</i>	10
5.3.4.2 Extracto alcohólico de <i>Syzygium aromaticum</i>	10
5.4 Género Sacaromicetos.....	10
5.4.1 <i>Candida Albicans</i>	11
5.4.1.1Taxonomia.....	11
5.4.1.2 Candidiasis Bucal	12
5.4.1.3 Tratamiento	13
6. 0 METODOLOGIA.....	14
6.1 Materiales y Métods	14
6.2 Tipo de Investigación.....	14
6.3 Unidades de Estudio	14
6.4 Contexto Temporal y Geográfico.....	14
6.5 Universo.....	14
6.6 Tipo de Muestreo.....	14
6.7 Variables.....	15
6.7.1 Operacionalización de Variables.....	15
6.8 Procedimientos y Técnica.....	17
6.8.1 Obtención del extracto alcohólico del <i>Syzygium aromaticum</i> (clavo de olor).....	17
6.8.2 Recolección de Muestreo.....	17
6.9 Obtención del aceite esencial del <i>Syzygium aromaticum</i> (clavo de olor).....	20
6.10 Procesado de la muestra.....	21
6.11 Obtención de la muestra de <i>Cándida albicans</i>	22
6.12 Evaluación de la actividad del aceite esencial de <i>Syzygium aromaticum</i> (clavo de olor).....	23
6.13 Cultivo y Método de Kirby Bauer (difusión en disco).....	23
8.0 RESULTADOS.....	28
8.1 Concentraciones utilizadas en la técnica de dilución en caldo.....	28

8.2 Resultados obtenidos mediante la técnica de dilución en caldo	29
8.3 Concentraciones utilizadas en la Técnica de Kirby Bauer	30
8.4 Resultados obtenidos mediante la Técnica de Kirby Bauer-Medición de halos inhibitorios.....	31
8.5 Resultados obtenidos utilizando como literatura a Duraffourd y Lapraz.....	32
8.6 Resultados obtenidos mediante la técnica de Kirby Bauer.....	33
9.0 ANALISIS ESTADÍSTICO MEDIANTE EL SISTEMA SPSS.....	35
9.1 Resultados obtenidos mediante la técnica difusión en disco con sus 3 repeticiones.....	38
9.2 Resultados obtenidos extracto alcoholico del Clavo de Olor.....	39
9.3 Resultados de Halos obtenidos mediante de la técnica de difusión en disco en el aceite esencial de Clavo de Olor.....	40
9.4 Resultados obtenidos mediante la técnica de difusión en disco en su repetición 1.....	41
9.5 Resultados obtenidos mediante la técnica de difusión en disco en su repetición 2.....	42
9.6 Resultados obtenidos mediante la técnica de difusión en disco en su repetición 3.....	43
9.7 Resultados Obtenidos mediante analisis Anova.....	44
10.0 DISCUSIÓN.....	47
11.0 CONCLUSIONES.....	50
12.0 RECOMENDACIONES.....	51
13.0 BIBLIOGRAFÍA.....	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de <i>Syzygium aromaticum</i>	9
Tabla 2. Taxonomia <i>Cándida albicans</i>	11
Tabla 3. Actividad antifungica “in vitro” del aceite esencial y extracto alcoholico del <i>syzygium aromaticum</i> (clavo de olor).....	15
Tabla 4. <i>Cándida albicans</i>	15
Tabla 5. Criterios de Inclusión y Exclusión	16
Tabla 6. Materiales Generales	16
Tabla 7.Materiales para la activacion del Hongo y antibiograma	17
Tabla 8. Caracteristicas del aceite extraido	22
Tabla 9.Concentraciones realizadas extracto alcoholico.....	25
Tabla 10. Concentraciones aceite esencial “clavo de olor”	27
Tabla 11.Concentraciones aceite esencial a partir de 1.500 ppm.....	27
Tabla 12.Actividad de los aceites esenciales según Duraffourd y Lapraz	30
Tabla 13.Concentraciones del aceite esencial en caldo sabaroud broth.....	30
Tabla 14.Determinacion del grado de sensibilidad frente a diferentes concentraciones.	31
Tabla 15. Concentraciones del aceite esencial Técnica Kirby Bauer.....	32

Tabla 16. Prueba de actividad del aceite esencial por el Método de Kirby Bauer	33
Tabla 17. Resultados sensibilidad según Duraffourd y Lapraz	34
Tabla 18. Resultados obtenidos del extracto alcoholico	35
Tabla 19. Control positivo y negativo del extracto alcoholico.....	35
Tabla 20. Valor de medias en 3 repeticiones Técnica dilucion en caldo	36
Tabla 21. Valor de medias en Repeticiones de Tratamiento 2	38
Tabla 22. Valor de las medias en Repetición de Tratamiento 3	40
Tabla 23. Medición del Halo inhibitorio Técnica difusión en disco.....	41
Tabla 24. Nivel de Crecimiento del Halo T2R1.....	42
tabla 25. Nivel de crecimiento del Halo T2R2.....	43
Tabla 26. Nivel de Crecimiento del Halo T2R3.....	44
Tabla 27. Analisis descriptivo Anova.....	
Tabla 28	

ÍNDICE DE FOTOGRAFIAS

Foto 1. <i>Syzygium aromaticum</i>	19
Foto 2. Rotavapor de Buchi	20
Foto 3. Filtrado papel Whatmann	20
Foto 4. Trampa de Clevenguer	22
Foto 5 Colonias de <i>Candida albicans</i>	23
Foto 6 Método de Kirby Bauer	24
Foto 7 Colocación de soluciones en discos blank	26
Foto 8 Concentraciones aceite esencial	28
Foto 9 Técnica de Kirby Bauer aceite esencial	29

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Valor de medias en 3 repeticiones –Técnica dilucion en caldo 37

Gráfico 2. Valor de las medias en repeticiones de Tratamiento 2..... 39

INTRODUCCIÓN

La medicina alternativa y natural a base de diversas plantas medicinales es un estudio interesante e importante que se ha convertido en alternativas terapéuticas para diferentes y específicas enfermedades y patologías debido al bajo costo y fácil adquisición de las mismas que ayudan a la población. Desde la antigüedad las plantas medicinales son consideradas con un excelente potencial curativo para el tratamiento y erradicación de múltiples enfermedades. Nuestro País está formado por varias etnias y culturas que mantienen sus tradiciones, rasgos culturales e incluso ancestrales sobre la medicina natural. ^(1,2)

La Organización Mundial de la Salud en el año 2002, hizo un llamado de atención a nivel mundial para que se promueva el uso adecuado y racional de antimicrobianos utilizados en diferentes enfermedades por parte de las poblaciones, el uso indebido de estos medicamentos ha promovido la existencia de una resistencia antimicrobiana es por esto que los diferentes microorganismos cada vez se hacen más resistentes a los diferentes medicamentos. ⁽³⁾

Hay que tomar en cuenta que en los últimos años ha incrementado la incidencia de enfermedades patológicas y fúngicas en los seres humanos debido al aumento de pacientes con diferentes enfermedades entre ellos los más destacados tenemos a pacientes con SIDA, inmunodeprimidos, quienes son altamente susceptibles a infecciones oportunistas. Infecciones Fúngicas tanto sistémicas como dérmicas son causantes de gran morbi-mortalidad en estos pacientes, es por esta razón que se está tratando de descubrir nuevos tratamientos antifúngicos más potentes y seguros. ⁽⁴⁾

Las células humanas y fúngicas son muy similares ya que las dos comparten gran parte de las vías principales del metabolismo, en su composición poseen enzimas muy semejantes y es por esto que resulta difícil encontrar medicamentos que ofrezcan la selectividad requerida para lograr obtener un antifúngico más seguro. Los diferentes compuestos derivados de plantas medicinales son de gran aportación porque abarcan alternativas más seguras y eficaces que los medicamentos antimicrobianos producidos sintéticamente, es por esto que las plantas naturales nos motivan hacer usadas como nuevos agentes antifúngicos que sean más eficaces que los agentes sintéticos. ⁽⁵⁾

A nivel mundial se han establecido que varias plantas poseen actividad antibacteriana, antimicótica, antiparasitaria, inclusive con efectos insecticidas y considerando que la

presencia del compuesto de eugenol en el aceite natural y extracto alcoholico en estudio a la cual se le atribuye efectos antifúngicos en el que se desarrolla el presente trabajo de investigación es de verificar el efecto Antifúngico de su aceite y extracto del *Syzygium aromaticum* de “Clavo de Olor” frente a *Candida albicans* cepa ATCC 10231; la cual realizaremos con una investigación observacional y a la vez experimental en un analisis in vitro que servirá de base para futuros estudios.⁽⁶⁾

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La mayoría de las principales patologías bucales en la actualidad están dadas por diferentes factores, entre los más importantes es la presencia de diversos microorganismos, es por esto que en nuestra cavidad oral encontramos a la más común y de mayor importancia como es *Candida albicans* que se presenta en etapas inflamatorias de la mucosa oral en los seres humanos encontrados con mayor índice en países en desarrollo y subdesarrollo y en poblaciones con alto índice de pobreza debido a la falta de higiene y cuidado en su cavidad bucal.⁽⁷⁾

Para *Arendorf, Menditi y Valentini*, citados por *Ceballos*: *Candida albicans* se encuentra presente en la cavidad bucal y oral en el 40 % de la población, mientras que para este último autor *Cándida albicans* está presente en el 7 % de la población normal. Por otra parte, *Burket* plantea que en la boca de un paciente sano, este microorganismo es escaso y que su frecuencia va a variar según la población.⁽⁸⁾

Kurnatowski y Kurnatowska: en su investigación encontraron infección fúngica en 2/3 de los pacientes estudiados, el microorganismo *Candida albicans* fue la especie más común encontrada en (86 casos de 167) seleccionados de los pacientes atendidos en la sección de micología del Hospital General Dr. Manuel Gea González de la Ciudad de México.^(8,9)

Las diferentes infecciones por especies del género *Candida albicans* van incrementado su incidencia en las últimas décadas debido a varios factores del huésped como, consultas y prácticas médicas, tratamientos convencionales es por esto que actualmente constituyen una de las causas importantes de morbi-mortalidad en las infecciones del torrente circulatorio.⁽⁹⁾

Un estudio realizado por Nucci y colaboradores en América Latina durante el mes de noviembre del 2008 a octubre del 2010 encontraron que la incidencia de candidiasis bucal en el Ecuador es de 0.016% por cada 1000 pacientes al día, se reporta morbilidad y mortalidad de aproximadamente el 35% en pacientes que presentan candidiasis invasiva (World Health Organization, 2014), generando así un gran impacto económico para las diferentes casas asistenciales de salud, de tal manera se ha ido adquiriendo gran importancia en estos últimos años a nivel mundial debido a la resistencia antifúngica que presentan algunas especies de *Candida albicans* y al cambio de epidemiología de las mismas.⁽¹⁰⁾

En este estudio investigativo se verificara si el aceite esencial, como el extracto alcohólico del *Syzygium aromaticum*, cuál de sus dos diluciones tiene mayor efecto antifúngico sobre *Candida albicans*.

3. JUSTIFICACIÓN

La variabilidad de diferentes microorganismos consistentes a los diferentes medicamentos entre ellos los antifúngicos más utilizados es un tema de alto interés es por ello que se recurre a la investigación de nuevos avances y alternativas seguras y sobre todo efectivas que son adquiridas a base de técnicas de plantas naturales donde sus diferentes principios estén equánimes y sus secuelas sean más tolerables que varios medicamentos artificiales.⁽¹⁰⁾

El proyecto investigativo tiene una aportación importante a nivel social, económico y académicamente, ayudando adquirir diversos conocimientos sobre la importancia del uso de diferentes y diversas plantas medicinales con sus múltiples utilidades que nos van ayudar a la realización de la investigación. Las cuales pueden aportar como tratamientos facilitadores para la prevención de las patologías más frecuentes de la cavidad oral. Alcanzando así de una manera más efectiva la elaboración de productos naturales como colutorios, pastas y otros placebos a base de aceites esenciales y extractos alcohólicos.⁽¹¹⁾

La candidiasis en su mayoría causada por *Candida albicans*, es una de las patologías que en su actualidad ha experimentado un incremento de la aparición no solo en pacientes inmunodeprimidos y hospitalizados, también en aquellos pacientes en los que las circunstancias del medio ambiente los exponen.⁽¹²⁾

Por ello, existe el interés en el desarrollo del presente trabajo; de determinar si el *Syzygium Aromaticum* “Clavo de Olor” presenta actividad antifúngica frente al agente

Cándida albicans; de esta manera se contribuirá con nuevas alternativas naturales para combatir las diversas afecciones de este microorganismo.⁽¹³⁾

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

- Evaluar la actividad anti-fúngica in vitro del extracto y aceite esencial del *Syzygium aromaticum* “clavo de olor” sobre la *Candida albicans* cepa ATCC 10231.

4.2 Objetivos Específicos

- Determinar la actividad anti-fúngica del aceite esencial del clavo de olor sobre la *Candida albicans* cepa ATCC 10231.
- Evaluar el efecto antifúngico del extracto alcohólico de *Syzygium aromaticum* “clavo de olor” a las diferentes concentraciones (50.000, 40.000, 30.000, 20.000, 10.000, 5.000 ppm), sobre *Candida albicans* cepa ATCC 10231.
- Comparar la efectividad del extracto alcohólico y el aceite esencial de *Syzygium aromaticum* “clavo de olor” con el Fluconazol de 150 mg sobre *Candida albicans* cepa ATCC 10231.

5. MARCO TEÓRICO

Para poder curar determinadas y diferentes enfermedades y patologías que afectan a nuestra salud, se basa en ciertos procedimientos que tienen finalidad terapéutica que se apartan mucho de la medicina sintética o convencional. De tal manera las alternativas médicas experimentan una aceptación cada vez más satisfactoria, utilizando procedimientos y técnicas usadas tradicionalmente, es por esto que desde la antigüedad los seres humanos han utilizados diversas plantas ya sean estas como remedios para distintas enfermedades o como alimentos.⁽¹³⁾

En la actualidad especialistas en la cavidad oral como son los odontólogos se enfrentan día a día con pacientes con procesos infecciosos e inflamatorios tanto agudos como crónicos en la cavidad oral en especial encías y mucosas que requieren y demandan la aplicación de medicina tradicional y natural.⁽¹⁴⁾

5.1 Antifúngico

Llamado también antimicótico conocido a todo tipo de sustancia que tiene la capacidad de impedir el crecimiento de algunos hongos e incluso provocar su muerte. Los hongos además de tener usos de gran importancia para el ser humano forman parte de los seres vivos que llegan a originar enfermedades, el uso de los antimicóticos es de gran importancia para tratar distintas enfermedades provocadas por este tipo de microorganismos.⁽¹⁴⁾

Los antimicóticos son utilizados en infecciones de mucosas las cuales 1 de 4 están

íntimamente relacionados con hongos patógenos. El mecanismo de acción de los fármacos que impiden el crecimiento de hongos, depende del lugar en el que actúen, lo cual está íntimamente relacionado con la estructura química del anti fúngico. ⁽¹⁵⁾

5.2 Herbolaria

Las plantas medicinales son partes o extractos de plantas que se utilizan para el tratamiento de diferentes afecciones y que pueden suministrarse como cápsulas, comprimidos, infusiones, cremas, elixires, jarabes, ungüentos o muchas formas más. Se utilizan desde la época prehistórica y es una de las formas de medicina más extendidas.

Las casas comerciales e industrias farmacéuticas se han basado en varias ocasiones en este tipo de medicina natural para poder elaborar sus fármacos. ⁽¹⁶⁾

Por la estructura química que estos poseen sus principios activos pueden servir de modelo y ayuda para la elaboración de drogas sintéticas que pueden quedar como marcadores taxonómicos en la investigación de nuevos medicamentos. ⁽¹⁷⁾

5.3 Clavo de Olor

Syzygium aromaticum es un árbol de la familia de las que tarda unos 20 años en desarrollarse, su nombre procede del latín clavus, ya que el capullo seco sin abrir recuerda esta forma, sus hojas se parecen bastantes a las del laurel. *Syzygium aromaticum* es una planta de fácil localización, tiene una comercialización extensa debido a sus propiedades antifúngicas, antisépticas, antivirales, anestésicas analgésicas, bactericidas. El compuesto de mayor relevancia es el eugenol en un 60-90% y se cree que es el responsable de las propiedades de la planta. ⁽¹⁸⁾

5.3.1 Generalidades del clavo de olor (*Syzygium aromaticum*)

Los indígenas mesoamericanos tuvieron gran interés por el uso de las plantas medicinales que han aportado para el avance de nuevas y modernas terapias, antiguamente las enfermedades bucales eran tratadas con hierbas o plantas siendo utilizadas como especie de placebos para el tratamiento de padecimientos de encías, dientes y para la higiene bucal. ⁽¹⁹⁾

A partir de la década de los 60 se empezó a utilizar plantas medicinales entre ellas el *Syzygium aromaticum* utilizado en zonas de bajos recursos económicos para tratar

dolores de muelas y molestias de encías, es por esto que el uso de estas plantas han ayudado notablemente en la cultura humana lográndose descubrir que el uso de su aceite o del propio claco de olor ha servido como analgésico y anestésico local principalmente en problemas bucodentales. ⁽²⁰⁾

5.3.2 Clasificación Taxonómica

Tabla N.1: Taxonomía de *Syzygium aromaticum*

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Rosidae
Orden	Myrtales
Familia	Myrtaceae
Subfamilia	Myrtoideae
Tribu	Syzygieae
Genero	Syzygium
Especie	Syzygium Aromaticum

Fuente: Tropicos.org. Missouri Botanical Garden.

5.3.3 Composición Química

El responsable de la mayor parte del aroma característico del clavo de olor es el eugenol este comprende entre el 72-90% del aceite esencial extraído principalmente de los clavos y es el compuesto responsable de su peculiar aroma. Entre otros importantes componentes del aceite esencial de clavo de olor son : acetil eugenol, beta-cariofileno y vainillina, ácido cratególico, taninos como : bicornin, el ácido galotánico, salicilato de metilo (analgésico), el flavonoide eugenina, kaempferol, ramnetina y eugenitin, tri terpenoides tales como el ácido oleanólico, estigmasterol y campesterol y varios sesquiterpenos⁽²⁰⁾

5.3.4 Aceite esencial y extracto alcohólico de *Syzygium aromaticum*

5.3.4.1 Aceite esencial de *Syzygium aromaticum*

Son fragmentos de estados líquidos ligeros, obtenidos por el método arrastre de vapor de agua, que tiene las sustancias que son encargadas de la fragancia propia de cada planta. De acuerdo a su origen los aceites esenciales se clasifican como naturales, artificiales y sintéticas. Los naturales se obtienen directamente de la planta y no sufren modificaciones físicas ni químicas posteriores, debido a su rendimiento tan bajo son muy costosas. Como aceite esencial de clavo de olor este posee varios beneficios y propiedades para la salud entre ellos tenemos⁽²¹⁾:

- ✓ **Infecciones:** por sus propiedades antisépticas , el aceite esencial de clavo de olor es utilizado para heridas, pie de atleta ,moretones y varios tipos de lesiones
- ✓ **Cuidado dental:** por su propiedad germicida es utilizado para aliviar dolor de muela y úlceras bucales.
- ✓ **Sistema inmunológico:** ayudan a estimular el sistema inmunológico por sus propiedad antivirales y capacidad de purificación de sangre ayudan aumentar la resistencia a un sin número de enfermedades.

Syzygium aromaticum presenta en su composición química de aceite esencial al eugenol (83.6%), acetato de eugenilo (11.6%) y cariofileno (4.2%).

5.3.4.2 Extracto alcoholico de *Syzygium aromaticum*

Syzygium aromaticum presenta en su composición química de extracto alcoholico al eugenol (52%) los extractos pueden actuar como insecticidas, fungicidas, o repelentes, dependiendo del disolvente que uno utiliza para su elaboración. La principal función del alcohol es de extraer las sustancias, o las propiedades, de las plantas. ⁽²¹⁾

5.4 Género Sacaromicetos

Los hongos tienen una forma a manera de globo que pueden vivir sobre líquidos y sustancias azucaradas, estos se duplican muy rápidamente por gemación y llegan a producir esporas en ciertas condiciones cada célula puede originar alrededor de 4 esporas entre la más principal de este grupo tenemos a *Candida albicans* responsable de infecciones e inflamaciones de la cavidad oral, esta suele presentarse como una célula de forma oval en forma de levadura de 2 a 4 micras, con paredes finas en tejidos infectados se ha identificado de forma filamentosa de una longitud variable, con extremos redondos de 3 a 5 micras de diámetro y con pseudohifas que son células alargadas de levaduras que permanecen unidas entre sí. Es el factor principal asociado a candidiasis bucal debido al incremento de infecciones por *albicans*, actualmente se describe un número importante de manifestaciones clínicas, debido a la extensa manifestación sistémica que presenta este especie. ⁽²²⁾

5.4.1 *Candida albicans*

Es un hongo di mórfico es decir que se desarrolla de forma distinta y variable en función de la temperatura de crecimiento, normalmente a una temperatura de 37°C se presenta como levadura y en temperaturas de 25°C se muestra como un hongo de aspecto filamentoso en la naturaleza este hongo se reproduce por forma asexual por gemación. ⁽²³⁾

En forma de levadura se presenta con células redondas u ovaladas, agrupadas en pequeños grupos, en forma de hongo a manera de filamentos sus células se alargan. Es el principal causante etiológico de candidiasis bucal. ⁽²⁴⁾

5.4.1.1 Taxonomía

Tabla Nro.2 Taxonomía *Cándida albicans*

Reino	Fungi
Phylum	Ascomycota
Subphylum	Ascomycotina
Clase	Ascomicetes
Orden	Saccharomycetales
Familia	Saccharomycetaceae
Género	<i>Cándida</i>

Fuente: Congreso Internacional de Microbiología en Nueva York en 1939⁽¹⁵⁾

Autor: Johana Alexandra Cueva Borja

5.4.1.2 Candidiasis Bucal

Causada principalmente por *Candida albicans*, es de muy importante estomatológicamente por su variedad y frecuencia clínica, las afecciones podemos encontrar frecuentemente en personas con distintos tipos de factores predisponentes. Las afecciones clínicas de candidiasis bucal son muy variables. ⁽²⁵⁾

La patogenia de candidiasis bucal es muy compleja implicando varios mecanismos, factores tanto del hongo como del hospedero. *Candida albicans* tiene la posibilidad de colonizar superficies bucales dependiendo de la efectividad de los mecanismos de defensa que presente el hospedero, como la capacidad de adhesión del hongo y su poder de crecimiento. ⁽²⁶⁾

Las condiciones ambientales modifican el microambiente en la cavidad oral favoreciendo de tal manera la infección y colonización por *Candida albicans* tales como el uso de prótesis dentales removibles, uso inadecuado de antifúngicos y antimicrobianos y hábitos de fumar, existe una nueva clasificación donde la candidiasis bucal se divide en 2 amplias categorías: primaria y secundaria. ⁽²⁷⁾

- ✓ Candidiasis primaria: asociada a tejidos orales y peri orales, esta se subdivide en:

C. pseudomembranosa (aguda y crónica), C. eritematosa (aguda y crónica), C. hiperplásica (leucoplásica). Asociadas a Estomatitis subprotésica, Queilitis angular, y Glositis rómbica.

- ✓ La Candidiasis secundaria: La candidiasis bucal se muestra como una manifestación de infección sistémica o generalizada. C. Mucocutánea (crónica). También llamada Síndrome Crónico de Candidiasis Mucocutánea, y se incluyen: CMC familiar, CMC difusa, CMC por endocrinopatía. ⁽²⁸⁾

Cándida albicans probablemente puede estar implicado en el eritema gingival lineal, periodontitis necrótica y queilitis exfoliativa. ⁽²⁸⁾

5.4.1.3 Tratamiento

El tratamiento de la Candidiasis bucal se basa en cuatro pilares: Realización de un diagnóstico precoz y certero de la infección, corrección de los factores facilitadores o de las enfermedades subyacentes, determinación del tipo de infección candidiásica y es uso de fármacos empleados. ⁽³⁰⁾

Uno de los antimicóticos más utilizados es el fluconazol este es un fármaco con acción antifúngica, pertenece a la familia de los triazólicos, utilizado para el tratamiento de infecciones fúngicas, especialmente causadas por especies del hongo *Candida albicans*, tales como candidiasis vaginal o candidiasis bucal. ⁽³¹⁾

6. METODOLOGÍA

6.1. Materiales y Métodos

6.2. Tipo de Investigación

- **Observacional-Experimental:** Porque se trata de un análisis “in vitro”, en el cual podemos demostrar cual es la actividad anti fúngica del *Syzygium aromaticum* (clavo de olor) sobre *Candida albicans* cepa ATCC 10231 donde el investigador emplea las condiciones de la investigación.

6.3 Unidades de Estudio

- **Químico:** Aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor)
- **Microbiano:** *Candida albicans* cepa ATCC 10231

6.4 Contexto Temporal y Geográfico

El presente proyecto investigativo fue realizado en el Laboratorio de Biología Molecular - Genética e Investigación de la Universidad Nacional De Chimborazo, en la ciudad de Riobamba, bajo la supervisión del Ing. Félix Falconi supervisor del laboratorio y asesoramiento de la tutora.

6.5 Universo

Candida albicans cepa ATCC 10231

6.6 Tipo de Muestreo

Una Cepa *Candida albicans*

6.7. Variables

6.7.1 Operacionalización de variables

Tabla Nro.3 Actividad antifúngica “*in vitro*” del aceite esencial y extracto alcohólico del *Syzygium aromaticum* (clavo de olor)

Conceptualización	Categoría-Dimensión	Indicador	Técnica	Instrumento
-------------------	---------------------	-----------	---------	-------------

La actividad anti fúngica se refiere a la sustancia que inhibe el crecimiento del hongo.	Actividad anti fúngica “ <i>in vitro</i> ” Aceite Extracto alcohólico	Medición de halos inhibitorios Nada Poco Medio Alto Diluciones	Observación Experimentación	Bitácora de laboratorio SISTEMA SPS
--	---	---	-----------------------------	--

Fuente: Johana Alexandra Cueva Borja
Elaborado por: Johana Alexandra Cueva Borja

Tabla Nro.4 *Candida albicans*

Conceptualización	Categoría-Dimensión	Indicador	Técnica	Instrumento
Es un hongo dimorfo, asexual	Hongo diploide asexual Responsable de Candidiasis	Tendencia Factores Ambientales	Observación Experimentación	Bitácora de laboratorio

Fuente: Johana Alexandra Cueva Borja
Elaborado por: Johana Alexandra Cueva Borja

Tabla Nro.5 Criterios de inclusión y exclusión

Inclusión

Exclusión

Fuente: Johana Alexandra Cueva Borja
Elaborado por: Johana Alexandra Cueva Borja

*Cepas puras de <i>Candida albicans</i> sin contacto con contaminantes ni fármacos.	*Cepas de hongos no pertenecientes a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231
*Aceite esencial y extracto alcohólico de <i>Syzygium aromaticum</i> (clavo de olor)	* Otro derivado del aceite esencial y extracto alcohólico de <i>Syzygium aromaticum</i> (clavo de olor).

Tabla Nro 6 .Materiales Generales

Materiales para preparación de medios de cultivo	Materiales para extraer el aceite esencial de <i>Syzygium aromaticum</i>	Materiales para extraer el extracto alcohólico de <i>Syzygium aromaticum</i>
Medio de cultivo Agar Sabouraud con cloranfenicol.	Olla de presión	Rotavapor Buchi
Gradillas	Tallos (clavo de olor)	Clavo de olor (molido)
Balanza	Balanza	Balanza
Mascarilla, guantes	Frascos ámbar	Frascos ámbar
Caja Petri	Refrigerante	Alcohol industrial 96%
Esterilizador	Refrigeradora	Equipo de vortex
Pipetas y Probetas	Cocina eléctrica	Papel filtro
Autoclave		Pipetas y probetas

Fuente: Johana Alexandra Cueva Borja
 Elaborado por: Johana Alexandra Cueva Borja

Tabla Nro.7 Materiales para la activación del hongo y antibiograma

Hongo	Antibiograma
Cajas petris estériles	35 cajas petris

Agar Sabouraud con cloranfenicol.	100 discos blank
Caldo de cultivo broth	150 tubos de ensayo
<i>Cándida albicans</i> cepa ATCC 10231	150 hisopos estériles de laboratorio
Mecheros	Aceite esencial de <i>Syzygium aromaticum</i>
Asa Estériles	Extracto alcohólico de <i>Syzygium aromaticum</i>
	DMSO, H ₂ O Destilada

Fuente: Johana Alexandra Cueva Borja
 Elaborado por: Johana Alexandra Cueva Borja

6.8 PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS

6.8.1 Obtención del extracto alcohólico de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor)

6.8.2 Recolección de muestras

Obtención de la planta

La planta en estudio, *Syzygium aromaticum* “clavo de olor” se compró en un mercado en la provincia de Chimborazo, en la ciudad de Riobamba – Ecuador. Luego se trasladó a las instalaciones del laboratorio de Biología Molecular y Genética en la Universidad Nacional de Chimborazo, la obtención del extracto estuvo bajo la supervisión del Ing. Félix Falconi.

Foto N° 1. *Syzygium aromaticum*



Fuente: Johana Alexandra Cueva Borja
 Elaborado por: Johana Alexandra Cueva Borja

Procesamiento de la muestra

Secado y corte de la planta

Se cortaron los tallos de *Syzygium aromaticum* “clavo de olor” en pedazos pequeños, para luego dejar secar durante siete días, expuesto a condiciones naturales.

Molido de la planta

Con los tallos obtenidos secos de la planta, se realizó el molido de la misma, con ayuda de un molino de mano. Obteniendo *Syzygium aromaticum* (clavo de olor) pulverizado, para así colocar el solvente orgánico, colocándolo en un frasco de vidrio ámbar para su posterior utilización.

Colocación de solvente orgánico

Se colocó el solvente orgánico agregando 1 litro de alcohol al 96% dejando macerar durante 20 días, agitándolo en los 20 días de maceración, se colocó el frasco en un ambiente fresco y oscuro.

Filtrado de Muestras

Se filtró 3 veces, con papel filtro Whatmann N° 41, utilizando una bomba de vacío para agitar el filtrado, obteniéndose un extracto purificado sin ningún tipo de contaminación

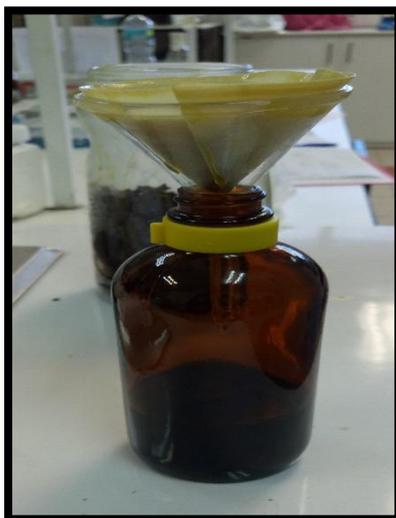
Luego se colocó en un recipiente de vidrio de boca ancha colocándose en el Rotavapor de Buchi a 60°C durante 2 horas, obteniéndose los principios activos totales del extracto puro. Se obtuvo un peso de 20 ml de extracto alcohólico de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor) colocándose en un frasco ámbar colocándolo en refrigeración para su posterior utilización.

Foto N° 2. Rotavapor de Buchi



Fuente: Johana Alexandra Cueva Borja
Elaborado por: Johana Alexandra Cueva Borja

Foto N° 3. Filtrado papel Whatmann N°41



Fuente: Johana Alexandra Cueva Borja
Elaborado por: Johana Alexandra Cueva Borja

6.9 Obtención del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor)

Obtención de la planta

La planta en estudio, *Syzygium aromaticum* “clavo de olor” se compró en un mercado en la provincia de Chimborazo, Ciudad Riobamba – Ecuador, en una proporción de 20 kg. Luego se trasladó a las instalaciones del laboratorio de Biología Molecular y Genética en la Universidad Nacional de Chimborazo, la obtención del aceite esencial estuvo bajo la supervisión del Ing. Félix Falconi.

6.10 Procesamiento de la muestra

Corte de la planta

Se cortaron los tallos de *Syzygium aromaticum* “clavo de olor” en pedazos pequeños, para luego colocarlos en la olla de presión con agua.

Técnica

El *Syzygium aromaticum* “clavo de olor” se coloca en un recipiente de gran capacidad, utilizamos el método de destilación por arrastre de vapor, este método va ayudar a la separación de sustancias poco solubles en agua para que así pase por una corriente de vapor así ambos componentes se destilan juntos, el aceite es arrastrado por el vapor de agua a través del refrigerante que al enfriarse con el agua a temperatura adecuada, permite su colecta en una trampa de vidrio donde se deposita el aceite extraído, y se recolectara en un frasco ámbar.

Foto Nro.4 Trampa de Clevenger



Fuente: Johana Alexandra Cueva Borja
Elaborado por: Johana Alexandra Cueva Borja

Extracción del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* “clavo de olor” del refrigerante.

Se retiró el aceite esencial obtenido por medio de la técnica de evaporación de gotas del refrigerante con ayuda de una pipeta.

Se realizó la extracción del aceite esencial en el periodo de 2 semanas, obteniéndose una cantidad de 10ml, se colocó en un frasco de color ámbar este fue colocado en una cámara de flujo laminar y posterior fue llevado a refrigeración para luego ser utilizado.

Tabla Nro.8 Características aceite extraído

ESPECIE VEGETAL	<i>Syzygium aromaticum</i> “clavo de olor”
Aspecto	Líquido translúcido
Color	Marrón Claro

Olor	Característico a la planta
Sabor	Dulce

Fuente: Johana Alexandra Cueva Borja

Elaborado por: Johana Alexandra Cueva Borja

6.11 Obtención de Muestra de *Candida albicans*

Recolección

Se trabajó con un microorganismo patógeno donado por la Universidad Nacional del Chimborazo por el Laboratorio de Biología molecular – genética e investigación siendo esta *Candida albicans* cepa ATCC 10231.

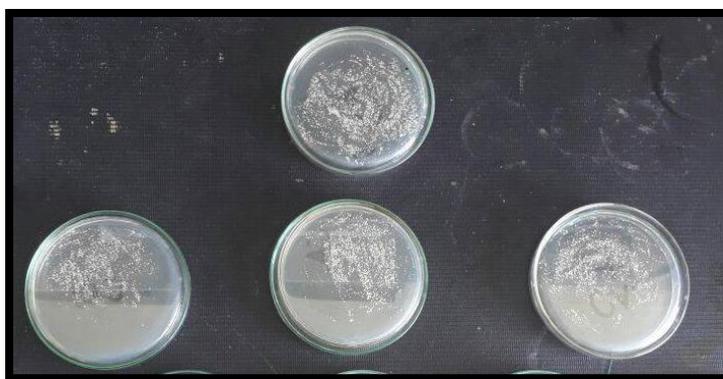
Preparación

Se preparó agar Sabouraud colocándose en 12 en cajas Petri, se retiró la muestra de *Candida albicans* cepa ATCC 10231, la cual se encontraba en refrigeración.

Luego se realizó la descongelación de la muestra de *Candida albicans*, para posteriormente inocularla con un asa previamente esterilizada, colocando las muestras de *Candida albicans* en las 6 cajas Petri previamente preparadas con agar Sabouraud con cloranfenicol.

Las cajas Petri sembradas fueron colocadas en la incubadora a 37°C en un lapso de 24 horas, logrando de esta manera obtener colonias de *Candida albicans*, para su posterior utilización.

Foto Nro.5 Colonias de *Candida albicans*



Fuente: Johana Alexandra Cueva Borja

Elaborado por: Johana Alexandra Cueva Borja

6.12 Evaluación de la actividad del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* “clavo de olor “

La actividad anti fúngica del aceite esencial y extracto alcohólico de *Syzygium aromaticum* “clavo de olor “ fue evaluada mediante el método de Kirby Bauer o conocido también como antibiograma (difusión en disco).

Foto Nro.6 Método de Kirby Bauer



Fuente: Molecular Biology, Pathogenicity and Ecology of Bacterial Plasmids
Elaborado por: Thornsberry C. Hawkins. T.M

6.13 Cultivo y Método de Kirby Bauer (difusión en disco)

Se esterilizó todos los materiales necesarios en autoclave y se usó una cámara de flujo laminar para asegurar que los materiales no se contaminen. Usando agar Sabouraud con cloranfenicol plaqueamos 10 cajas Petri.

Se retiró de refrigeración el extracto alcohólico de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor) en las concentraciones realizadas: 50.000ppm, 40.000ppm, 30.000ppm, 20.000ppm, 10.000ppm y 5.000ppm, las cuales fueron colocadas en discos blank con absorción estándar por disco, también se preparó discos blank con la dilución del aceite esencial de clavo de olor con el solvente DMSO (Dimetilsulfóxido).

Con las concentraciones realizadas 12.500ppm, 10.500ppm, 8.500ppm, 6.500ppm, 4.500ppm y 2.500ppm y se colocaron en las cajas Petri (inoculadas previamente con 0.1ml).

Tabla Nro. 9 Concentraciones realizadas: extracto alcohólico

1 disco al 50 µl extracto+950 µl DMSO = 50.000ppm
1 disco al 40 µl extracto+960 µl DMSO = 40.000ppm
1 disco al 30 µl extracto+970 µl DMSO = 30.000ppm
1 disco al 20 µl extracto+980 µl DMSO = 20.000ppm
1 disco al 10 µl extracto+990 µl DMSO = 10.000ppm
1 disco al 5 µl extracto+995 µl DMSO = 5.000ppm

Fuente: Datos recopilados de la bitácora del laboratorio.

Elaborado por: Johana Alexandra Cueva Borja

Estos discos fueron colocados con las soluciones realizadas para luego ser colocados con una pinza previamente esterilizada en 3 cajas petri inoculadas con *Candida albicans*.

Se realizó al igual la preparación de un disco blank con el antimicótico Fluconazole 150mg el cual nos ayudara para el control positivo de la experimentación.

- ✓ 1 disco de 150mg fluconazol+850 µl H₂O destilada.

Después de haber colocado los discos con las soluciones se incubó a una temperatura de 37°C para su posterior lectura.

Foto Nro.7 Colocación de soluciones en discos Blank



Fuente: Johana Alexandra Cueva Borja

Elaborado por: Johana Alexandra Cueva Borja

Luego de haber realizado la técnica de Kirby Bauer en el extracto alcohólico de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor) se realizó la misma técnica en el aceite esencial, se retiró de refrigeración el aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor) en las proporciones diferentes proporciones realizadas:

Tabla Nro. 10 Concentraciones aceite esencial *Syzygium aromaticum* (clavo de olor)

12.500 ppm aceite esencial de Clavo de olor.
10.500 ppm aceite esencial de Clavo de olor
8.500 ppm aceite esencial de Clavo de olor
6.500 ppm aceite esencial de Clavo de olor
4.500 ppm aceite esencial de Clavo de olor
2.500 ppm aceite esencial de Clavo de olor

Fuente: Datos recopilados de la bitácora del laboratorio.

Elaborado por: Johana Alexandra Cueva Borja

Luego preparamos a partir de la solución número 6 del aceite esencial 2.500 ppm 7 concentraciones más, debido a la falta de existencia de halos en la siembra realizada, siendo estos los siguientes:

Tabla Nro.11 Concentraciones aceite esencial a partir de 1.500ppm

1.500ppm = 60 μ l (Sm) +40 μ l DMSO
1.000ppm = 67 μ l (Sm) +33 μ l DMSO
500ppm =50 μ l (Sm) + 50 μ l DMSO
100 ppm= 20 μ l (Sm) + 80 μ l DMSO
50ppm= 50 μ l (Sm) + 50 μ l DMSO
25 ppm= 50 μ l (Sm) + 50 μ l DMSO

Fuente: Datos recopilados de la bitácora del laboratorio.

Elaborado por: Ing. Félix Falconi

Foto Nro.8 Concentraciones aceite esencial



Fuente: Johana Alexandra Cueva Borja

Elaborado por: Johana Alexandra Cueva Borja

Las concentraciones se colocaron en tubos eppendorf para su colocación en los discos blank. Se preparó el medio de cultivo agar Sabouraud con cloranfenicol lo cual antes de la inoculación de *Candida albicans*, se realizó la prueba de Macfarland, con el siguiente procedimiento: Se preparó un tubo de ensayo con 5ml de suero fisiológico, y con una asa previamente esterilizada se tomó una muestra de las colonias de *Candida albicans*, colocándola en la solución, y agitándola en el vortex.

- ✓ Se preparó un tubo de ensayo con 10 ml de H₂O destilada con 5 μ l de leche de

magnesio, para luego agitar con el vortex.

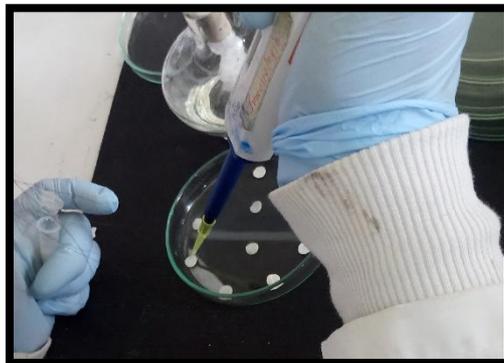
- ✓ Se compara observando que exista homogeneidad en las dos muestras.
- ✓ Inoculamos en las cajas Petri previamente preparadas.
- ✓ Luego colocamos los discos blank en las cajas Petri.
- ✓ Cada disco fue impregnado con las soluciones preparadas para ser colocados en las cajas petri inoculadas con *Candida albicans*, para realizar sus 3 repeticiones (R1, R2, R3)

Se realizó al igual la preparación de un disco blank impregnado con el antimicótico Fluconazole 150 mg el cual servirá para el control positivo de la experimentación.

1 disco de 150mg fluconazol+850µl H₂O destilada.

Se realizó al igual la preparación de un disco blank impregnado de DMSO con H₂O destilada el cual servirá para el control negativo

Foto Nro.9 Técnica de Kirby Bauer aceite esencial



Fuente: Johana Alexandra Cueva Borja

Elaborado por: Johana Alexandra Cueva Borja

Después de haber colocado los discos impregnados con dichas soluciones se incubó durante 36 horas a una temperatura de 37°C para su posterior lectura.

En el análisis de los resultados se establecerán pruebas estadísticas con el sistema SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), Excel y se utilizarán tablas tomadas de la literatura de Duraffourd y Lapraz (1983)⁽³⁰⁾ de la clasificación de los aceites esenciales.

8.0 RESULTADOS

Se realizaron 3 tratamientos:

- ✓ El primer tratamiento (T1) el cual se realizó en base a la técnica de dilución en caldo, para esto se tomó en cuenta 6 tipos de diluciones cada una con diferentes concentraciones hasta esperar el crecimiento de *Cándida albicans*. Tabla N°12.
- ✓ Para el tratamiento 2 y 3 (T2 Y T3) utilizamos la técnica de Kirby Bauer y para el análisis de los resultados nos basamos en la clasificación de la actividad de los aceites propuesta por Duraffourd la cual se dio en el año 1983.

Tabla Nro. 12 Actividad de los aceites esenciales según Duraffourd y Lapraz

Actividad de los aceites esenciales:
Nula(-) si es inferior o es igual a 8 mm
Sensibilidad Limite (sensible igual o +) de 9 a 14 mm
Sensibilidad media (muy sensible igual ++) de 15 a 19 mm
Sumamente sensibles (S.S. igual +++) si es igual o superior a 20 mm

Fuente: Aliaga Mamani
 Autor: Duraffourd y Lapraz 1983

8.1. CONCENTRACIONES UTILIZADAS EN LA TECNICA DE DILUCION EN CALDO

Tabla Nro.13 Concentraciones del aceite esencial en caldo sabouraud broth

N° Tratamiento y concentración	Volumen (µl) aceite esencial	Solvente (DMSO) (µl)	Mix =Caldo sabouraud (µl) + (aceite+DMSO)
T1= 50.000ppm	300 µl	300 µl	900 µl +100 µl
T2= 40.000ppm	250 µl	250 µl	920 µl +80 µl
T3= 30.000ppm	200 µl	200 µl	940 µl +60 µl
T4= 20.000ppm	150 µl	150 µl	960 µl +40 µl
T5= 10.000ppm	100 µl	100 µl	980 µl +20 µl
T6= 5.000ppm	75 µl	75 µl	990 µl +10 µl

Fuente: Datos recopilados de la bitácora de laboratorio
 Elaborado por: Johana Alexandra Cueva Borja

Descripción: Cada elemento mostrado en la Tabla N°13 corresponde a las concentraciones realizadas mediante el método en dilución en caldo considerando diferentes tipos de diluciones (mix) en cada concentración,

Análisis e Interpretación: Mediante las concentraciones establecidas de 50.000ppm, 40.000ppm, 30.000ppm, 20.000ppm, 10.000ppm, 5.000ppm, 2.500ppm y 1.500ppm se obtuvieron preparaciones (mix) para luego ser inoculadas en cajas Petri.

8.2 RESULTADOS OBTENIDOS MEDIANTE LA TECNICA DE DILUCIÓN EN CALDO

Tabla Nro.14 Determinación del grado de sensibilidad frente a diferentes concentraciones

N° Tratamiento	Concentración	Crecimiento (+) positivo	Actividad anti fúngica	R ₁	R ₂	R ₃
T1	50.000ppm		Actividad	-	-	-
T2	40.000ppm		Actividad	-	-	-
T3	30.000ppm		Actividad	-	-	-
T4	20.000ppm		Actividad	+	+	+
T5	10.000ppm		Actividad	+	+	+
T6	5.000ppm		Actividad	+	+	+

Fuente: Datos recopilados de la bitácora de laboratorio
Elaborado por: Johana Alexandra Cueva Borja

Descripción: La Tabla Nro.14 muestra los 6 tratamientos realizados mediante la Técnica de dilución en caldo, se encontró que en los T1 al T3 tuvieron actividad anti fúngica debido a la falta de formación de colonias en las muestras realizadas. En el T4 al T6 se observó la presencia de unidades formadoras de colonias (UFC).

Análisis e Interpretación: Se observó que mediante las concentraciones establecidas de 50.000ppm, 40.000ppm, 30.000ppm, dio un resultado (-) a partir de 20.000ppm, 10.000ppm, 5.000ppm dio un resultado (+) en sus concentración más bajas experimentales que la Concentración mínima inhibitoria (CMI) corresponde a 5.000ppm.

8.3 CONCENTRACIONES UTILIZADAS EN LA TECNICA DE KIRBY BAUER

Tabla Nro.15 Concentraciones del aceite esencial Tecnica Kirby Bauer

N° Tratamiento y Concentración	Volumen (µl) aceite	Solvente (DMSO) (µl)
T1= 12.500ppm	75 µl	25 µl
T2= 10.500ppm	84 µl	16 µl

T3= 8.500ppm	68 µl	32 µl
T4= 6.500ppm	52 µl	48 µl
T5= 4.500ppm	36 µl	74 µl
T6= 2.500ppm	20 µl	80 µl
T7= 1.500ppm	60 µl (sm)	40 µl
T8= 1.000ppm	67 µl(sm)	33 µl
T9= 500ppm	50 µl(sm)	50 µl
T10= 100ppm	20 µl(sm)	80 µl
T11= 50ppm	50 µl (sm)	50 µl
T12= 25ppm	50 µl(sm)	50 µl

Fuente: Datos recopilados de la bitácora de laboratorio
Elaborado por: Ing. Felix Falconi

Descripción: Cada uno de los elementos mostrados en la Tabla N° 15 corresponde a las concentraciones realizadas mediante el método de Kirby Bauer⁽³⁰⁾ considerando diferentes tipos de diluciones en DMSO (Dimetilsulfóxido) en cada concentración.

Análisis e interpretación: Las concentraciones obtenidas por medio de la Técnica de Kirby Bauer.

8.4 RESULTADOS OBTENIDOS MEDIANTE LA TECNICA DE KIRBY BAUER- MEDICION DE HALOS INHIBITORIOS

Tabla Nro.16 Prueba de actividad del aceite esencial por el método de Kirby Bauer

N° Tratamiento	Volumen (µl) aceite	Solvente (DMSO) (µl)	N° de discos	Halos R1 mm	Halos R2 Mm	Halos R3 mm	Promedio final de halos mm
----------------	---------------------	----------------------	--------------	-------------	-------------	-------------	----------------------------

T1= (12.500ppm)	75 µl	25µl	3				
T2= (10.500ppm)	84 µl	16µl	3				
T3= (8.500ppm)	68 µl	32µl	3				
T4= (6.500ppm)	52 µl	48µl	3				
T5= (4.500ppm)	36 µl	74µl	3				
T6= (2.500ppm)	20 µl	80µl	3				
T7= (1.500ppm)	60µl	40µl	3	18 Mm	15 Mm	17 mm	16.66 Mm
T8= (1000ppm)	67µl	33µl	3	26 Mm	26 mm	21 mm	24.33 mm
T9= (500ppm)	50µl	50µl	3	23 Mm	22 mm	21 mm	22 mm
T10= (100ppm)	20µl	80µl	3	14 Mm	11 mm	14 mm	13 mm
T11= (50ppm)	50µl	50µl	3	16 mm	16 mm	16 mm	16 mm
T12= (25ppm)	50µl	50µl	3	19 mm	14 mm	18 mm	17 Mm
CONTROL POSITIVO:	<i>Candida albicans</i>	Fluconazol 150mg	(+)	Present o crecimi ento	Halo:	60 mm	
CONTROL NEGATIVO:	H ₂ O + DMSO	No presento crecimiento	(-)				

Fuente: Datos recopilados de la bitácora de laboratorio
Elaborado por: Johana Alexandra Cueva Borja

Descripción: En la Tabla Nro.16, podemos observar los promedios totales de los halos presentes en el método de difusión en disco a diferentes concentraciones del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* 'clavo de olor' frente a *Candida albicans* cepa ATCC 10231. Los resultados obtenidos de las lecturas realizadas, el halo observado con mayor inhibición es el halo de 12500ppm de concentración con 52mm como promedio total entre sus 3

repeticiones. Por otro lado el de menor inhibición es el halo de una concentración 100ppm con 13mm.

Análisis e Interpretación: Se observó mediante las concentraciones establecidas de: 12.500 ppm, 10.500 ppm, 8.500 ppm, 6.500 ppm, 4.500 ppm, 2.500 ppm no presento ningún tipo de crecimiento; al contrario de las concentraciones más bajas que partieron de una concentración madre 2.500ppm 1.500ppm, 1.000ppm, 500ppm, 100ppm, 50ppm, 25ppm, presentando un crecimiento medio, se tomó como resultado (+) en su concentración más baja 25ppm y en sus concentraciones más altas presento (-) ausencia de crecimiento .

8.5 RESULTADOS OBTENIDOS UTILIZANDO COMO LUTERATURA A DURAFFOURD Y LAPRAZ²⁵

Tabla Nro.17 Resultados sensibilidad según Duraffourd y Lapraz

N° Tratamiento	N° de discos	Halos R1 mm	Halos R2 mm	Halos R3 Mm
T1(ppm)	3	+++	+++	+++
T2(ppm)	3	+++	+++	+++
T3(ppm)	3	+++	+++	+++
T4(ppm)	3	+++	+++	+++
T5(ppm)	3	+++	+++	+++
T6(ppm)	3	+++	+++	+++
T7(ppm)	3	+++	+++	+++
T8(ppm)	3	+++	+++	+++
T9(ppm)	3	+++	+++	+++
T10(ppm)	3	+++	+++	+++
T11(ppm)	3	+++	+++	+++
T12(ppm)	3	+++	+++	+++

CONTROL POSITIVO:	<i>Candida albicans</i>	Fluconazol 150mg	(+)	Presento crecimiento	Halo:	60mm
		No	(-)			

CONTROL NEGATIVO:	H ₂ O + DMSO	presento crecimiento				
------------------------------	----------------------------	-------------------------	--	--	--	--

Fuente: Datos recopilados de la bitácora de laboratorio
Elaborado por: Johana Alexandra Cueva Borja.

Descripción: En la Tabla N° 17 se observa los resultados obtenidos mediante la Técnica de Kirby Bauer (difusión en disco), utilizándose como análisis la literatura de Duraffourd y Lapraz⁽²⁵⁾ los cuales clasificaron la actividad de los aceites esenciales.

Análisis e Interpretación: Se obtuvieron resultados positivos +++ según la literatura utilizada de Duraffourd y Lapraz 1983, resultando halos superiores a 20mm siendo estos según la Tabla Nro.11 N= Sumamente sensible. Evidenciando el efecto anti fúngico del *Syzygium aromaticum* frente a *Candida albicans* cepa ATCC 10231.

8.6 RESULTADOS OBTENIDOS MEDIANTE LA TECNICA DE KIRBY BAUER²⁵

Tabla Nro.18 Resultados obtenidos del extracto alcohólico

N° Tratamiento	N° de discos	Halos R1 mm	Halos R2 mm	Halos R3 mm
T1(ppm)	3	-	-	-
T2(ppm)	3	-	-	-
T3(ppm)	3	-	-	-
T4(ppm)	3	-	-	-
T5(ppm)	3	-	-	-
T6(ppm)	3	-	-	-

Fuente: Datos recopilados de la bitácora de laboratorio
Elaborado por: Johana Alexandra Cueva Borja

Tabla Nro.19 Control positivo y negativo de extracto alcohólico.

CONTROL POSITIVO:	<i>Candida albicans</i>	Fluconazol 150mg	(+)	Presento crecimiento	Halo:	60mm
CONTROL NEGATIVO:	H ₂ O + DMSO	No presento crecimiento	(-)			

Fuente: Datos recopilados de la bitácora de laboratorio
Elaborado por: Johana Alexandra Cueva Borja

Descripción: En la Tabla N°19 se observa los resultados obtenidos mediante la Técnica de Kirby Bauer⁽³⁰⁾ (difusión en disco), en las diferentes concentraciones establecidas.

Análisis e Interpretación Se obtuvieron halos menores a 8 mm, siendo un resultado negativo, por lo tanto se puede decir que el extracto alcohólico de *Syzygium aromaticum* no presenta actividad frente a *Candida albicans* cepa ATCC 10231

9. ANALISIS ESTADÍSTICO MEDIANTE SISTEMA SPSS

SPSS es un formato para un análisis completo con características únicas, se utiliza para realizar la captura y análisis de datos creando tablas y gráficas complejas. El SPSS es conocido por su capacidad de gestionar grandes volúmenes de datos y es capaz de llevar a cabo análisis de texto entre otros formatos más, incluyendo estadísticas descriptivas como tabulación y frecuencias de cruce, estadísticas de dos variables, además pruebas T, ANOVA y de correlación. Con SPSS es posible realizar recopilación de datos, crear estadísticas, análisis de decisiones de gestión y mucho más.

Tabla Nro.20 :Valor de medias en 3 repeticiones técnica dilución en caldo

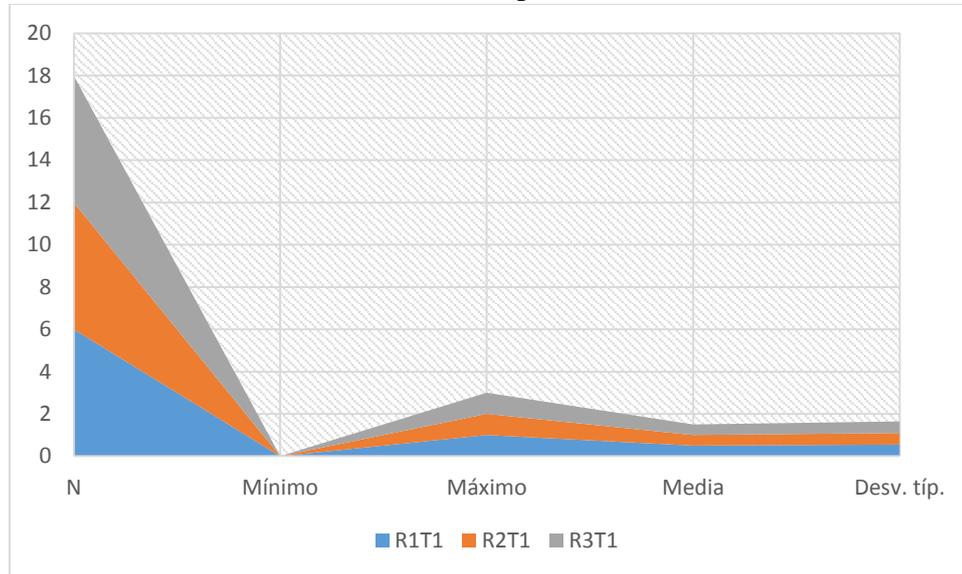
Tratamiento	N	Mínimo	máximo	Media	Desviación/Tip
R1T1	6	00	1.00	.500	.54772
R2T2	6	00	1.00	.500	.54772
R3T3	6	00	1.00	.500	.54.772

Fuente: Datos de Repeticiones en laboratorio procesado en SPSS
Elaborado por: Johana Cueva

Descripción: Se muestra el análisis estadístico de los resultados obtenidos de las 3 repeticiones realizadas mediante la técnica dilución en caldo, en sus diferentes concentraciones: 50.000ppm, 40.000ppm, 30.000ppm, 20.000ppm, 10.000ppm y 5.000ppm donde se muestran valores similares.

Análisis e Interpretación La actividad anti fúngica de las sustancias experimentales frente a la cepa *Candida albicans* ATCC 10231 se presentó de la siguiente manera; el aceite esencial de Clavo de olor en sus diferentes concentraciones realizadas mediante la técnica de dilución en caldo 50.000ppm, 40.000ppm, 30.000ppm, 20.000ppm, 10.000ppm y 5.000ppm presentó una media de $0,5000 \pm 0,54772$ mm., resultando un mínimo de 0 que significa crecimiento nulo en las concentraciones 50.000ppm, 40.000ppm, 30.000ppm en sus 3 repeticiones y un máximo de 1 que significa crecimiento medio en las concentraciones 20.000ppm, 10.000ppm y 5.000ppm.

Gráfico Nro. 1: Valor de medias en 3 Repeticiones Técnica Dilución en Caldo



Fuente: Datos de Repeticiones en laboratorio procesado en SPSS
Elaborado por: Johana Cueva

Descripción: En el Gráfico N° 1, se muestra el análisis estadístico de los resultados obtenidos de las 3 repeticiones realizadas mediante la técnica dilución en caldo, en sus diferentes concentraciones: 50.000ppm, 40.000ppm, 30.000ppm, 20.000ppm, 10.000ppm y 5.000ppm.

Análisis e Interpretación: Mediante el análisis estadístico realizado de la técnica de dilución en caldo en sus concentraciones 50.000ppm, 40.000ppm, 30.000ppm, 20.000ppm, 10.000ppm y 5.000ppm se describió gráficamente la estadística obtenida dando como resultado un crecimiento mínimo de 0 en las concentraciones de 50.000ppm, 40.000ppm, 30.000ppm, demostrándose estadísticamente que los resultados obtenidos mediante la técnica aplicada en estas concentraciones hay actividad antifúngica por presentar ausencia en el crecimiento de *Candida albicans* cepa ATCC 10231 .

Tabla Nro.21: Valor de medias en Repeticiones de Tratamiento 2

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desvi/tip
R1T2	12	0.00	1.00	.5000	.52223
R2T2	12	0.00	1.00	.5000	.52223
R3T2	12	0.00	1.00	.5000	.52223
N valido	12				
(según lista)					

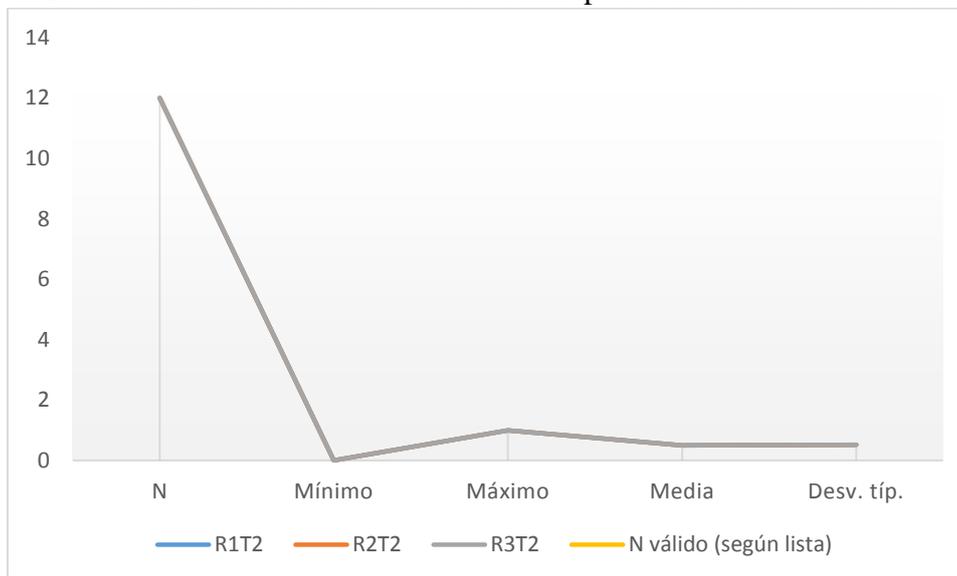
Fuente: Datos de Repeticiones en laboratorio procesado en SPSS
Elaborado por: Johana Cueva

Descripción: La Tabla Nro.21, muestra el análisis estadístico de los resultados obtenidos de las 3 repeticiones realizadas mediante la técnica difusión en disco, en sus diferentes concentraciones: 12.500 ppm, 10.500 ppm, 8.500 ppm, 6.500 ppm, 4.500 ppm, 2.500 ppm, 1.500 ppm, 1.000 ppm, 500 ppm, 100 ppm, 50 ppm y 25 ppm

Análisis e Interpretación La actividad anti fúngica de las sustancias experimentales frente a la cepa *Candida albicans* ATCC 10231 se presentó de la siguiente manera; el aceite esencial de Clavo de olor en sus diferentes concentraciones realizadas mediante la técnica de difusión en disco 12.500 ppm, 10.500 ppm, 8.500 ppm, 6.500 ppm, 4.500 ppm, 2.500 ppm, 1.500 ppm, 1.000 ppm, 500 ppm, 100 ppm, 50 ppm y 25 ppm presento una media de $0,5000 \pm 0,52223$ mm., resultando un mínimo de 0 que significa crecimiento nulo en las concentraciones : 12.500 ppm, 10.500 ppm, 8.500 ppm, 6.500 ppm, 4.500 ppm, 2.500 ppm en sus 3 repeticiones y un máximo de 1 que significa crecimiento medio en las concentraciones 1.500 ppm, 1.000 ppm, 500 ppm, 100 ppm, 50 ppm y 25 ppm.

9.1 RESULTADOS OBTENIDOS MEDIANTE LA TECNICA DIFUSION EN DISCO CON SUS 3 REPETICIONES

Gráfico Nro.2: Valor de las medias en Repeticiones de Tratamiento 2



Fuente: Datos de Repeticiones en laboratorio procesado en SPSS
Elaborado por: Johana Cueva

Descripción: En el Gráfico N° 2, se muestra el análisis estadístico de los resultados obtenidos de las 3 repeticiones realizadas mediante la técnica difusión en disco, en sus diferentes concentraciones: 12.500 ppm, 10.500 ppm, 8.500 ppm, 6.500 ppm, 4.500 ppm, 2.500 ppm, 1.500 ppm, 1.000 ppm, 500 ppm, 100 ppm, 50 ppm y 25 ppm.

Análisis e Interpretación: Mediante el análisis estadístico realizado de la técnica de dilución en caldo en sus concentraciones 12.500 ppm, 10.500 ppm, 8.500 ppm, 6.500 ppm, 4.500 ppm, 2.500 ppm, 1.500 ppm, 1.000 ppm, 500 ppm, 100 ppm, 50 ppm y 25 ppm. Se describió gráficamente la estadística obtenida dando como resultado un crecimiento mínimo de 0 en las concentraciones de : 12.500 ppm, 10.500 ppm, 8.500 ppm, 6.500 ppm, 4.500 ppm, 2.500 ppm, demostrándose estadísticamente que los resultados obtenidos mediante la técnica aplicada en estas concentraciones hay actividad anti fúngica por presentar ausencia en el crecimiento de *Candida albicans* cepa ATCC 10231 .

9.2 RESULTADOS OBTENIDOS EXTRACTO ALCOHÓLICO DEL (CLAVO DE OLOR)

Tabla Nro. 22: Valor de las medias en Repeticiones de Tratamiento 3

Estadísticos descriptivos				
Tratamientos	N	Mínimo	Máximo	Media
R1T3	6	,20	1,50	,7833
R2T3	6	,20	1,50	,7667
R3T3	6	,20	1,40	,7500
N válido (según lista)	6			

Fuente: Datos de Repeticiones en laboratorio procesado en SPSS
Elaborado por: Johana Cueva

Descripción: La Tabla Nro.22, muestra el análisis estadístico de los resultados obtenidos de las 3 repeticiones realizadas en el extracto alcohólico mediante la técnica difusión en disco, en sus diferentes concentraciones: 50.000ppm, 40.000ppm, 30.000ppm, 20.000ppm, 10.000ppm y 5.000ppm.

Análisis e Interpretación La actividad anti fúngica de las sustancias experimentales frente a la cepa *Candida albicans* ATCC 10231 se presentó de la siguiente manera; el extracto alcohólico de Clavo de olor en sus diferentes concentraciones realizadas mediante la técnica de difusión en disco 50.000ppm, 40.000ppm, 30.000ppm, 20.000ppm, 10.000ppm y 5.000ppm. Presento una media en su repetición 1 de $0,7833\pm$, en su repetición 2 $0,7667\pm$, y en su repetición 3 $0,7500\pm$, resultando un mínimo de 0,20 que significa crecimiento nulo en todas sus concentraciones, dando un promedio de 1,50mm de diámetro en los halos encontrados.

9.3 RESULTADOS DE HALOS OBTENIDOS MEDIANTE LA TECNICA DE DIFUSION EN DISCO EN EL ACEITE ESENCIAL DEL (CLAVO DE OLOR)

Tabla Nro.23: Medición del halo inhibitorio Tecnica difusion en disco

Estadísticos descriptivos					
	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
MedidaHaloR1T2	12	14,00	100,00	59,66 67	42,23384
MedidaHaloR2T2	12	13,00	100,00	59,33 33	42,58966
MedidaHaloR3T2	12	14,00	100,00	59,25 00	42,64467

Fuente: Datos de Repeticiones en laboratorio procesado en SPSS
Elaborado por: Johana Cueva

Descripción: En la Tabla Nro.23 del presente estudio se basó en la evaluación de la actividad anti fúngica del aceite esencial de clavo de olor mediante la Técnica de difusión en disco en concentraciones de 12.500 ppm, 10.500 ppm, 8.500 ppm, 6.500 ppm, 4.500 ppm, 2.500 ppm, 1.500 ppm, 1.000 ppm, 500 ppm, 100 ppm, 50 ppm y 25 ppm, tomando en cuenta las medidas tomadas de los halos inhibitorios en la experimentación dando como resultado un promedio de ;media de 59,6667mm , un mínimo de 14,00 y un máximo de 100,00 halo inhibitorio.

Análisis e Interpretación: El análisis demostró que el halo inhibitorio es mucho más extenso en tamaño con respecto al micotico utilizado el cual tiene un precedente estandarizado.

9.4 RESULTADOS OBTENIDOS MEDIANTE LA TECNICA DE DIFUSIÓN EN DISCO EN SU REPETICION 1

Tabla Nro. 24. Nivel de Crecimiento del halo T2R1

		MedidaHaloR1T2			
		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	14,00	1	7,7	8,3	8,3
	16,00	1	7,7	8,3	16,7
	18,00	1	7,7	8,3	25,0
	19,00	1	7,7	8,3	33,3
	23,00	1	7,7	8,3	41,7
	26,00	1	7,7	8,3	50,0
	100,00	6	46,2	50,0	100,0
	Total	12	100,0	100,0	
Total		12	100,0		

Fuente: Datos de Repeticiones en laboratorio procesado en SPSS
Elaborado por: Johana Cueva

Descripción: En la Tabla Nro.24 se observó en el tratamiento 2 repetición 1 una frecuencia de 1 en sus 12 tratamientos en las concentraciones de 12.500 ppm, 10.500 ppm, 8.500 ppm, 6.500 ppm, 4.500 ppm, 2.500 ppm con un 100% de crecimiento en cada una de sus concentraciones; y en las 6 concentraciones de 1.500 ppm, 1.000 ppm, 500 ppm, 100 ppm, 50 ppm y 25 ppm presento un porcentaje de 8,3% de crecimiento con respecto al 100%.

Análisis e Interpretación: El análisis demostró eficacia de un 100% de crecimiento en sus 6 concentraciones realizadas: 12.500 ppm, 10.500 ppm, 8.500 ppm, 6.500 ppm, 4.500 ppm, 2.500 ppm; debido a sus concentraciones mayores, y un porcentaje acumulado de 8,3% en las siguientes 6 concentraciones realizadas 1.500 ppm, 1.000 ppm, 500 ppm, 100 ppm, 50 ppm y 25 ppm; obteniendo un resultado de un 50% acumulado de sus 6 tratamientos, obteniendo porcentajes altos en cada uno de sus 12 tratamientos.

9.5 RESULTADOS OBTENIDOS MEDIANTE LA TECNICA DIFUSION EN DISCO EN SU REPETICION 2

Tabla Nro.25 Nivel de Crecimiento del halo T2R2
MedidaHaloR2T2

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	13,00	1	7,7	8,3
	16,00	1	7,7	16,7
	17,00	1	7,7	25,0
	18,00	1	7,7	33,3
	22,00	1	7,7	41,7
	26,00	1	7,7	50,0
	100,00	6	46,2	100,0
	Total	12	100,0	100,0
Total		12	100,0	

Fuente: Datos de Repeticiones en laboratorio procesado en SPSS
Elaborado por: Johana Cueva

Descripción: En la Tabla Nro.25 se observó en el tratamiento 2 repetición 2 una frecuencia de 1 en sus 12 tratamientos en las concentraciones de 12.500 ppm, 10.500 ppm, 8.500 ppm, 6.500 ppm, 4.500 ppm, 2.500 ppm con un 100% de crecimiento en cada una de sus concentraciones; y en las 6 concentraciones de 1.500 ppm, 1.000 ppm, 500 ppm, 100 ppm, 50 ppm y 25 ppm presento un porcentaje de 8,3% de crecimiento con respecto al 100%.

Análisis e Interpretación: El análisis demostró eficacia de un 100% de crecimiento en sus 6 concentraciones realizadas: 12.500 ppm, 10.500 ppm, 8.500 ppm, 6.500 ppm, 4.500 ppm, 2.500 ppm; debido a sus concentraciones mayores, y un porcentaje acumulado de 8,3% en las siguientes 6 concentraciones realizadas 1.500 ppm, 1.000 ppm, 500 ppm, 100 ppm, 50

ppm y 25 ppm; obteniendo un resultado de un 50% acumulado de sus 6 tratamientos, obteniendo porcentajes altos en cada uno de sus 12 tratamientos.

9.6 RESULTADOS OBTENIDOS MEDIANTE LA TECNICA DIFUSION EN DISCO EN SU REPETICION 3

Tabla Nro.26: Nivel de Crecimiento del halo T2R3

MedidaHaloR3T2

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	14,00	1	7,7	8,3
	16,00	1	7,7	16,7
	17,00	1	7,7	25,0
	18,00	1	7,7	33,3
	21,00	1	7,7	41,7
	25,00	1	7,7	50,0
	100,00	6	46,2	100,0
	Total	12	100,0	
Total		12	100,0	

Fuente: Datos de Repeticiones en laboratorio procesado en SPSS
Elaborado por: Johana Cueva

Descripción: En la Tabla Nro.26 se observó en el tratamiento 2 repetición 3 una frecuencia de 1 en sus 12 tratamientos en las concentraciones de 12.500 ppm, 10.500 ppm, 8.500 ppm, 6.500 ppm, 4.500 ppm, 2.500 ppm con un 100% de crecimiento en cada una de sus concentraciones; y en las 6 concentraciones de 1.500 ppm, 1.000 ppm, 500 ppm, 100 ppm, 50 ppm y 25 ppm presento un porcentaje de 8,3% de crecimiento con respecto al 100%.

Análisis e Interpretación: El análisis demostró eficacia de un 100% de crecimiento en sus 6 concentraciones realizadas: 12.500 ppm, 10.500 ppm, 8.500 ppm, 6.500 ppm, 4.500 ppm,

2.500 ppm; debido a sus concentraciones mayores, y un porcentaje acumulado de 8,3% en las siguientes 6 concentraciones realizadas 1.500 ppm, 1.000 ppm, 500 ppm, 100 ppm, 50 ppm y 25 ppm; obteniendo un resultado de un 50% acumulado de sus 6 tratamientos, obteniendo porcentajes altos en cada uno de sus 12 tratamientos.

9.7 RESULTADOS OBTENIDOS MEDIANTE ANALISIS ANOVA

El estudio requiere comparar la actividad anti fúngica “In vitro”, de aceite esencial y extracto alcohólico de *Syzygium aromaticum* (Clavo de olor), mediante un estudio microbiológico sobre cepas de *Candida albicans* ATCC 10231.

En base al objetivo planteado en la investigación se analizará si los valores de crecimiento del halo de inhibición tanto del aceite esencial como del extracto alcohólico es significativo respecto a la actividad antifúngica .mediante la escala de crecimiento.

Variable 1 (Cuantitativa) Dependiente: Valores de Crecimiento del Halo de Inhibición (CrecRepmm)

Variable 2 (Cualitativa) Factor: Escala de Crecimiento

Consideraciones:

- **Significación:** si es menor de 0,05 es que las dos variables están relacionadas y por tanto que hay diferencias significativas entre los grupos
- **Valor de F:** cuanto más alto sea F, más están relacionadas las variables, lo que significa que las medias de la variable dependiente difieren o varían mucho entre los grupos de la variable independiente.

Hipótesis 1.

H0: No existe una relación entre los valores del halo de inhibición del aceite esencial del *Syzygium aromaticum* (Clavo de olor), y la escala de crecimiento.

Hi: Existe una relación entre los valores del halo de inhibición del aceite esencial del *Syzygium aromaticum* (Clavo de olor), y la escala de crecimiento.

Criterio de Decisión:

Si $p < 0,05$ existe una relación entre los valores del halo de inhibición y la escala de crecimiento; por lo que se rechaza H0.

Tabla N.-27: Análisis descriptivo

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
CreciRep1mm								
Bajo	3	8,3333	,57735	,33333	6,8991	9,7676	8,00	9,00
Medio	3	12,6667	2,08167	1,20185	7,4955	17,8378	11,00	15,00
Total	6	10,5000	2,73861	1,11803	7,6260	13,3740	8,00	15,00
CreciRep2mm								
					Límite inferior	Límite superior		
Bajo	3	9,0000	1,00000	,57735	6,5159	11,4841	8,00	10,00
Medio	3	12,3333	2,08167	1,20185	7,1622	17,5045	10,00	14,00
Total	6	10,6667	2,33809	,95452	8,2130	13,1203	8,00	14,00
CreciRep3mm								
					Límite inferior	Límite superior		
Bajo	3	9,0000	1,00000	,57735	6,5159	11,4841	8,00	10,00
Medio	3	12,0000	2,00000	1,15470	7,0317	16,9683	10,00	14,00
Total	6	10,5000	2,16795	,88506	8,2249	12,7751	8,00	14,00

Fuente: Datos de Repeticiones en laboratorio procesado en Anova

Elaborado por: Johana Cueva

En los valores del cálculo de los valores de la medias se nota entre los grupos valores de las medias que no coinciden entre la diferentes tomas; con valores entre 12,77 y 13,37.

En los valores de la significancia (p valor) podemos ver que en la prueba de la Crecimiento de repetición 1 (CreciRep1mm) el valor es menor que 0,05 mientras que en la revisión de crecimiento de repetición 2 y 3 (CreciRep2mm y CreciRep3mm) este valor es mayor por lo que se puede indicar que existe una relación entre los valores del halo de inhibición y la escala de crecimiento; por lo que se rechaza H0 en el caso de los factores que se determinaron en la repetición 1. mientras que en la repetición 2 y 3 no se puede generar una relación entre las variables. Se puede apreciar que el valor de F es amplio respecto a las otras tomas, esto indica la fuerte relación entre valores de Crecimiento del Halo de Inhibición y Escala de Crecimiento del aceite esencial del *Syzygium aromaticum* (Clavo de olor

Hipótesis 2.

H0: No existe una relación entre los valores del halo de inhibición del extracto alcohólico del *Syzygium aromaticum* (Clavo de olor) y la escala de crecimiento.

Hi: Existe una relación entre los valores del halo de inhibición del extracto alcohólico del *Syzygium aromaticum* (Clavo de olor) y la escala de crecimiento.

Criterio de Decisión:

Si $p < 0,05$ existe una relación entre los valores del halo de inhibición y la escala de crecimiento; por lo que se rechaza H0.

En el caso de la generación de análisis de elementos descriptivos de los datos no se calcularon en razón de que existen menos de dos grupos por variable dependiente, es decir no existe varianza para determinar el valor de relación; esto se refleja en la escala de crecimiento de nivel medio para todas la tomas de la variable cualitativa. Por lo que el extracto alcohólico no muestra una varianza que pueda ser significativa como inhibidor de la actividad anti fúngica.

10. DISCUSIÓN

Según estudios realizados por (Pilco y otros, 2009)⁽³¹⁾, en el aceite esencial de clavo de olor contiene 85 - 95% de eugenol y acetileugenol; adicionalmente, α y β cariofilenos y pequeñas cantidades de ésteres, cetonas y alcoholes, de esta manera se conoce su composición química, tomando en cuenta la importancia de aceites esenciales donde se encuentran agentes antifúngicos, bactericidas y antimicrobianos.⁽³¹⁾

Duke en 1998 dice que en la antigüedad estaba muy relacionado la palabra dolor de muela a clavo de olor, a pesar que varias hierbas eran utilizadas para este mismo mal, el clavo de olor fue el principal sin saber de su acción de una forma científica o investigativa sino como una forma casera, ahí surge la curiosidad si en verdad actúa como un antimicrobiano o solo era un mito.⁽³²⁾

A esto en el 2009, Peredo, Palou y López explican que no es un mito y que si posee efectos anti fúngicos, antivirales y antimicrobianos, además que la acción está en el aceite esencial de clavo de olor que resulta ser una sustancia aromática y no precisamente en el clavo de olor como botón que es comercializado.⁽³³⁾

Por lo tanto, existe la necesidad de nuevos tratamientos altamente eficaces y de baja toxicidad, debido a este problema la OMS considera a la fitoterapia dentro de sus programas de salud y sugiere la aplicación procedimientos básicos para la validación de fármacos a partir de plantas (OMS, 1991)⁽³⁴⁾

Mediante un estudio realizado por Roudha y Hema, se demostraron que la actividad anti fúngica presente en el *Syzygium aromaticum* se debe a su principal componente el Eugenol el cual está presente en un 70-90%, actualmente la mayoría de infecciones micóticas prevalecen por el uso de varios antimicóticos como la nistatina y el flucozanol, pudiendo estos llegar a la resistencia debido a su amplio uso, es por esto que se sugiere la validación de fármacos a partir de plantas naturales de bajo costo económico y de fácil acceso, en este proyecto de investigación se utilizó el clavo de olor el cual sirvió como un excelente anti

fúngico dando resultados positivos en las concentraciones del aceite esencial y resultados negativos en su extracto alcohólico.⁽³⁵⁾

Otro estudio publicado por Quiroga, Navarro García; Carpinell, realizado en extractos hidroalcohólicos, se comprobó resultados positivo a la actividad antifúngica en extractos hidroalcohólicos, por lo cual se demuestra que es necesaria la dilución del alcohol al 96% con ayuda de solventes.⁽³⁶⁾

Según un estudio publicado por Zea mays L. y Pilco S. El eugenol el principal componente del clavo de olor en un 70-90%, el cual puede considerarse el principal causante de la actividad antifúngica presente en la planta, siendo este uno de los principales componentes fitoquímicos, con estos datos demostrada se observó la sensibilidad del aceite esencial de clavo de olor el crecimiento de la *Candida albicans* cepa ATCC 10231, se determina por la presencia del halo presente alrededor de los discos en sus diferentes tipos de concentraciones, cada halo observado nos indica que no existe el crecimiento del hongo, es por esto que mientras más grande se presente el halo de inhibición mayor será la sensibilidad de la planta sobre el hongo. En cambio con el extracto alcohólico presentó resistencia permitiendo el crecimiento de la *Candida Albicans* aún con la presencia de, *Syzygium aromaticum*.^(36,37)

Para la determinación de la actividad anti fúngica del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* frente a *Candida albicans* ATCC 10231, se prepararon discos de sensibilidad de aceite esencial puro, las cuales tenían concentraciones que inician de 12.500ppm hasta 2.500ppm en esta primera prueba al realizar la lectura se pudo observar que no existió crecimiento de *Candida Albicans* en toda la dimensión de la placa.

Se realizó nuevas soluciones con volúmenes inferiores a los primeros tomando como base madre la concentración de 2.500 ppm y realizando nuevas concentraciones: 1.500ppm, 1.000ppm, 500ppm, 100ppm, 50ppm, 25ppm, de aceite esencial lo cual también se realizó un control positivo para *Candida albicans*; en esta placa no se adicionó el aceite esencial para verificar su crecimiento en el medio de cultivo (Agar sabouraud); 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 del control positivo se verifico el crecimiento de las colonias de *Cándida albicans*. Con lo que se pudo determinar que el aceite esencial de *Syzygium aromaticum* poseía una alta actividad antifúngica frente a *Candida albicans* ATCC 10231; por lo que se realizó diluciones con DMSO a proporciones de 1/2 con el fin de encontrar el grado de sensibilidad del agente micótico con el aceite esencial y posteriormente hallar su CMI.⁽³⁸⁾

A partir de la dilución 12.500ppm se tomó en cuenta la parte experimental, se tomaron volúmenes de dilución de 0,1 µl con concentraciones de 12,500ppm hasta 2,500ppm 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 (> 20mm) .Comparando estadísticamente mediante SPSS, 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 *Syzygium aromaticum* a *Cándida albicans* ATCC 10231; con un coeficiente de variabilidad 18,08867 d.t siendo aceptable entre sus 3 repeticiones. La concentración mínima inhibitoria (CMI) se observa en el tratamiento 12 del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* con 25ppm esto debido al crecimiento medio obtenido donde se aprecia la inhibición absoluta del crecimiento de *Cándida albicans* ATCC 10231.⁽³⁹⁾

Para terminar tenemos que asegurar el hecho que en una planta existen diferentes principios activos y que muchos de ellos actúan de una o varias maneras por lo que su actividad terapéutica con plantas naturales no depende solamente de uno, sino de la proporcionalidad y componentes de los mismos, y el aceite esencial de clavo de olor no está excluido de este tratamiento y constituye una alternativa terapéutica eficaz.

11. CONCLUSIONES

- Se comprobó el efecto antifúngico del aceite esencial del *Syzygium aromaticum* “Clavo de olor” sobre *Cándida albicans* con el antimicótico utilizado fluconazol de 150mg , resultando el aceite esencial efectivo en su actividad antifúngica en comparación con el antimicótico fluconazol , tomándose en cuenta que en los 12 tratamientos se obtuvo un resultado favorable inhibiendo el crecimiento de *Cándida albicans* cepa ATCC 10231. Con respecto al extracto alcoholico el antimicótico utilizado presento mayor efectividad antifúngica, se presentaron halos menores de 8mm teniendo como resultado una actividad nula.
- Se verifico la actividad antifúngica “*in vitro*” del extracto alcohólico del *Syzygium aromaticum* “Clavo de olor” sobre *Cándida albicans* cepa ATCC 10231, resultando nula su efectividad en su actividad antifúngica.
- En comparación con el aceite esencial y el extracto alcohólico de *Syzygium aromaticum* “Clavo de olor” el que presento mayor efectividad es su aceite esencial ya que sus halos eran mayor de 20mm, por el contrario el efecto de extracto alcohólico resulto nulo debido a la mezcla que se realizó con su solvente de alcohol al 96%.
- Se consideró los resultados obtenidos en el aceite esencial y extracto alcohólico del *Syzygium aromaticum* “Clavo de olor” mediante el sistema de codificación SPSS con un promedio de halos de 35 mm+/- en sus 3 repeticiones, según la técnica de Kirby Bauer en su aceite esencial, en su extracto alcohólico de *Syzygium aromaticum* “Clavo de olor”.

12.RECOMENDACIONES

- Se aconseja tomar en cuenta la actividad antifúngica que tuvo *Syzygium aromaticum* “Clavo de olor” sobre la cepa de *Candida albicans* para que se realicen nuevos estudios y tratamientos contra los diversos hongos patógenos que se presentan en la cavidad oral.
- Realizar diferentes pruebas in vitro para valorar las ventajas y desventajas que pueden proporcionar los componentes principales de *Syzygium aromaticum* “Clavo de olor”.
- Crear diferentes dosis farmacéuticas para la administración de diferentes vías utilizando el aceite esencial de *Syzygium aromaticum* “Clavo de olor” para realizar tratamientos adecuados en pacientes que han adquirido *Cándida albicans*.

13. BIBLIOGRAFIA

1. Costa R, Amaral M, Martins P, Paula J, Fiuza T, Tresvenzol L, Paula J, y Bara M. Acao do oleo esencial de *Syzygium aromaticum* sobre hifas de algunos hongos- Fito patogénicos. Revista Brasileira de Especies Medicinalis 2011; 240-245.
2. Balleste R, Arteta Z, Fernández N. Evaluación del medio cromógeno CHROMagar Candida™ para la identificación de levaduras de interés médico. Rev. Med Uruguay 2007; 21:186- 93.
3. Guilarte C, Pardi G, De Stéfano A, Pacheco A, Dinatale E. Casuística de las micosis de la cavidad bucal, reportadas en el laboratorio de la cátedra de microbiología, Facultad de odontología ,2017; 43(1):1-2-3.
4. Castellanos F .Extracción De Aceites Esenciales. Bogotá, Colombia. 2006 Oct.19(2): pp.23-27
5. García Jorge. Efecto del dimetilsulfóxido en la respuesta quimio luminiscente y el consumo de oxígeno de neutrófilos humanos activados. Rev. costarric. cienc. méd [Internet]. 2001, Jun. [citado el 16 de Sep. de 2012]; 22(1-2): 17-32.
6. Nonsee K, Supitchaya C, Thawien W. Antimicrobial activity and the properties of edible hydroxypropyl methylcellulose based films incorporated with encapsulated clove. Department of Food Technology, Faculty of Agro-Industry.2008 July; 9(4):2-3-4.
7. Celis L. Usos medicinales del clavo de olor *Syzygium aromaticum* .México:2010. Agost.

8. Artigas J. Las hierbas naturales como medicina alternativa. Caracas, Venezuela: Ediciones McGraw-Hill Interamericana. 2010; 7(2):2-9
9. Cosme I. El Uso de las Plantas Medicinales. Revista Intercultural. 2008 enero; 1(1): p. 23-26.
10. Gutiérrez Infecciones congénitas poco habituales de transmisión vertical. Bol Med Hosp Infant México. 2011; 68(1)7-20.
11. Rindum JL, Stenderup A, Holmstrup P. Identification of *Candida albicans* types related to healthy and pathological oral mucosa. Oral Pathol Med 2005; 23(9):406.
12. Rodríguez Pérez M, Martínez JM, Rivero L, Álvarez H, Valdez A, Rodríguez D. Evaluación de la actividad antialérgica de algunas plantas utilizadas en la medicina tradicional cubana. Rev. Cienc Farm Básica Apl. 2006; 27(3):197-205.
13. Jayes P, Pérez F, León J, Farfán L, C. Aceites esenciales de nueve plantas nativas de Guatemala, familias Verbenaceae y Lauraceae. Resúmenes de Investigaciones Área Técnica, Dirección General de Investigación DIGI. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. 2009; 36(2):114-121.
14. Bruneton, J. Farmacognosia/Fitoquímica- Plantas Medicinales. 2ª Ed. Zaragoza: 2006. 115 p.
15. Odabasi Z, Paetznick V, Goldstein B, Rex J. Disk diffusion-based methods for determining *Candida parapsilosis* susceptibility to anidulafungin. Antimicrob. Agents Chemother. 47:3018-3020.
16. Pfaller M, Diekema D, Messer S, Boyken L, Hollis R. Activities of fluconazole and voriconazole against recent clinical isolates of *Candida* species determined by broth microdilution, disk diffusion, and Etest methods: report from the ARTEMIS Global Antifungal Susceptibility Program, 2001, 41:1440- 1446.
17. Patton L, Phelan J, Ramos J. Prevalence and Classification of HIV associated oral lesions. Oral Disease 2002; 8(2):98-109.
18. . Tovar V, Guerra M, Bravo I. Manifestaciones Bucales e Infecciones Oportunistas más Frecuentes en 208 Pacientes con Infección por VIH/SIDA. Acta Odontol Venez 2002; 40(3):260-264.
19. Tyagi A, Malik A. Liquid and vapour-phase antifungal activities of selected essential oils against *Candida albicans*: microscopic observations and chemical

- characterization of *Cymbopogon citratus*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2010 noviembre; 10(65): p. 1-11.
20. Ceballos S, Guitan L, Ruesga M, Ceballos L. Prevalencia de lesiones orales por *Candida* en una población con sida sometida a terapia antirretroviral altamente activa. *Rev Iberoam Micol* 2008, 15:141-45.
 21. Tampieri M, Galuppi R, Carelle M, Falcioni L, Cioni P, Morelli I. The inhibition of *Candida albicans* by selected essential oils and their major components. *Mycopathologia*. 2005 april; 159(3): p. 339-345.
 22. García López E, Roche Martínez A, Blanco Ruiz A, Rodríguez García L. La ozonoterapia en el tratamiento de la estomatitis subprótesis. *Rev Cubana Estomatol*. 2009 [citado 27 Nov 2013]; 40(2)
 23. Espinoza I, Rojas R, Aranda W, Gamonal J. Prevalence of oral mucosal lesions in elderly in Santiago, Chile. *J Pat Hot Med*. 2009; 32(10): 511.
 24. Gendreau L, Loewy Z. Review epidemiology and etiology of denture stomatitis. 2011 [citado 12 Ene 2013]; 20.
 25. González J, Díaz M, Puig E, Casanova Y. Prevalencia de la estomatitis subprótesis. *Arch Méd Camagüey*. 2009.
 26. Neu N, Malik M, Lunding A, Whittier S, Alba L, Kubin C. Epidemiology of candidemia at childrens hospital, *Pediatric Infect Dis* . 2009; 28: 806-9.
 27. Manzoni P, Arisio R, Mostert M, Leonessa M, Farina D, Latino M,. Prophylactic fluconazole is effective in preventing fungal colonization and fungal systemic infections in preterm neonates: a single-center, 6-year, retrospective cohort study. *Pediatrics* 2006; 117 (1): e22-32
 28. Rabiei M, Kasemnezhad E, Masoudi H, Shakiba M, Pourkay H. Prevalence of oral and dental disorders in institutionalised elderly people in Rasht, Iran. *Gerodontology* 2010 Sep;3:174-7
 29. Husein A, Butterworth J, Ranka M, Kwasnicki A, Rogers N. A survey of general dental practitioners in the North West of England concerning the dental care of patients following head and neck radiotherapy. *Prim Dent Care* 2011;18:59-65
 30. Montero R, Torrent J. Estomatitis protésica: Puesta al día. *RCOE* 2004;9:657-62

31. . Lemus M, Triana K, Del Valle O, Fuertes L, Sáez R. Rehabilitaciones protésicas y su calidad como factor de riesgo en la aparición de lesiones en la mucosa bucal. Rev Cubana Estomatol [internet]. 2009 ene.-mar. [citado 22 mayo 2014];46(1).
32. Castillo Y, Noriega O, Montero F. Árnica montana como tratamiento homeopático en pacientes con estomatitis subprótesis de grados I y II. Medisan [internet]. 2014 jun.
33. Espasandín S, Martínez G, Reyes O, Díaz R. Estomatitis subprótesis en pacientes con prótesis de más de dos años de uso. Rev Cienc Méd La Habana [internet]. 2013 [citado 21 nov. 2014]; 19(2)
34. Mesa C, Bueno G, Betancur A. Productos naturales con actividad antimicótica. Rev. Esp Quimioterap. 2004; 17(4): 325-31.
35. Kalembe D, Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Curr Med Chem. 2003; 10(10): 813-29.