

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO DE PUNO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**EFFECTO ANTIMICÓTICO *IN VITRO* DEL ACEITE ESENCIAL DE  
*cinnamomum zeylanicum* “CANELA” SOBRE *candida albicans***

**TESIS**

**PRESENTADA POR:**

**Br. OLINDA HUARACHA YUCRA**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**

**LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**PUNO – PERÚ**

**2019**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO DE PUNO**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**

**EFFECTO ANTIMICÓTICO *IN VITRO* DEL ACEITE ESENCIAL DE *Cinnamomum zeylanicum* "CANELA" SOBRE *Candida albicans***

**TESIS PRESENTADA POR:**

**Br. OLINDA HUARACHA YUCRA**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**

**LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**APROBADO POR JURADO REVISOR CONFORMADO POR:**



**PRESIDENTE**

:

\_\_\_\_\_  
D.Sc. DANTE JONI CHOQUEHUANCA PANCLAS

**PRIMER MIEMBRO**

:

\_\_\_\_\_  
Mg. MARTHA ELIZABETH APARICIO SAAVEDRA

**SEGUNDO MIEMBRO**

:

\_\_\_\_\_  
Mg. JESUS MIRANDA MAMANI

**DIRECTOR / ASESOR**

:

\_\_\_\_\_  
D.Sc. JUAN JOSÉ PAURO ROQUE

**Fecha de sustentación: 02 de septiembre del 2019**

**Área** : Ciencias Biomédicas

**Tema** : Biotecnología Vegetal

## **DEDICATORIA**

A Dios Todopoderoso por darme el ser y la sabiduría; siempre me ha ayudado a salir adelante, en todo momento. En especial en los más difíciles.

Le dedico este trabajo a mis queridos padres, Angel Flavio Huaracha Quispe y Fidela Simona Yucra Cutipa por su ayuda incondicional, su apoyo motivación para seguir adelante y cumplir con mis objetivos.

A toda mi familia quienes me apoyaron y confiaron siempre en mí, con sus palabras de aliento y sonrisas me motivaban a seguir adelante.

## AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional del Altiplano de Puno, por haberme brindado la oportunidad de forjarme mi futuro, en especial a la carrera profesional de Biología y cuerpo docente por sus conocimientos impartidos durante mi formación profesional.

Expreso mi especial agradecimiento a todo el personal del departamento de patología y laboratorio clínico del Hospital Manuel Núñez Butrón - Puno por haberme permitido realizar mi trabajo de investigación en esta Institución, ya que con su ayuda y aporte me ayudaron a incrementar más conocimientos en la ejecución de mi tesis.

## ÍNDICE GENERAL

<b>ÍNDICE GENERAL</b> .....	5
<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	7
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	10
<b>ÍNDICE DE ACRÓNIMOS</b> .....	11
<b>RESUMEN</b> .....	12
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	14
1.1. Objetivo general.....	16
1.2. Objetivos específicos.....	16
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	17
2.1. ANTECEDENTES.....	17
2.2. MARCO TEÓRICO.....	20
2.2.1. Las plantas medicinales.....	20
2.2.2. Aceites esenciales.....	21
2.2.3. Utilización de los Aceites.....	21
2.2.4. Técnicas de extracción de aceites esenciales.....	22
2.2.5. Canela <i>Cinnamomum zeylanicum</i> .....	24
2.2.6. Micosis oportunista.....	28
2.2.7. <i>Candida albicans</i> .....	29
2.2.8. Manifestaciones clínicas.....	34
2.2.9. Diagnóstico de laboratorio.....	35
2.2.10. Tratamiento.....	36
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	37
3.1. Área de estudio.....	37
3.2. Tipo de estudio.....	38
3.3. Población y muestra.....	38
3.4. Diseño de investigación.....	38

3.5. Metodología .....	40
a. Análisis estadístico .....	45
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>48</b>
<b>V. CONCLUSIONES .....</b>	<b>56</b>
<b>VI. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>57</b>
<b>VII. REFERENCIAS.....</b>	<b>58</b>
<b>VIII. ANEXOS.....</b>	<b>66</b>

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Destilación con agua o hidrodestilacion (SENA, 2012).....	23
Figura 2. Destilación agua-vapor o vapor húmedo (Vidal, 2015) .....	24
Figura 3. Pared celular de hongo de levadura, se muestra la superposición de elementos de mananos, glucanos, quitina y elementos proteínicos. Fuente: Microbiología (Ryan, 2012).....	31
Figura 4. Etapas de la infección por <i>Candida albicans</i> y los mecanismos de virulencia que intervienen en cada etapa (De la Calle et al, 2012). .....	33
Figura 5. Patogenia de las infecciones por <i>Candida albicans</i> . Se muestran los mecanismos propuestos para la unión e invasión por <i>Candida albicans</i> . Fuente: (Ryan, 2012).....	34
Figura 6. Zona de extracción del aceite esencial de canela y ejecución de la investigación (Hospital Manuel Núñez Butrón) Puno, durante los meses de noviembre 2018 a febrero 2019. ....	37
Figura 7. Comparación de los tratamientos a diferentes concentraciones del aceite esencial de canela, durante el mes de febrero, 2019 .....	50
Figura 8. Corteza de <i>Cinnamomum zeilanicum</i> (canela) adquirido en la ciudad de Juliaca, noviembre 2018.....	66
Figura 9. Pesado de corteza de canela. Laboratorio de Taller de Frutas y Hortalizas, noviembre 2018.....	66
Figura 10. Molido de corteza de canela en el Lab. de Taller Frutas y Hortalizas, noviembre 2018.....	66
Figura 11. Extracción del aceite esencial de canela por el método de arrastre de vapor de agua. En el Lab. De Talles de Frutas y Hortalizas, noviembre 2018 .....	66
Figura 12. Decantación del aceite de canela en el laboratorio de Taller de Frutas y Hortalizas, noviembre, 2018 .....	67
Figura 13. Obtención del aceite esencial de canela en el laboratorio de Taller de Frutas y Hortalizas, noviembre, 2018 .....	67
Figura 14. Concentración de aceite esencial de canela al 100%, 75%, 50%, 25%, control positivo (fluconazol) y control negativo (alcohol), Servicio de Patología Clínica del Hospital Regional Manuel Núñez Butrón, área de microbiología, noviembre 2018 a febrero, 2019 .....	67

Figura 15. Aislamiento de cepas de <i>Candida albicans</i> , Servicio de Patología Clínica del Hospital Regional Manuel Núñez Butrón, área de Microbiología, noviembre 2018 a febrero, 2019. ....	67
Figura 16. Preparación de la Escala de Mc Farland. Servicio de Patología Clínica del Hospital Regional Manuel Núñez Butrón, área de Microbiología, durante los meses de noviembre 2018 a febrero, 2019. ....	68
Figura 17. Observación de <i>Candida albicans</i> a 40x, Servicio de Patología Clínica del Hospital Regional Manuel Núñez Butrón, área de Microbiología, durante los meses de noviembre 2018 a febrero, 2019. ....	68
Figura 18. Procesamiento de muestra para el método de tubo germinativo, Servicio de Patología Clínica del Hospital Regional Manuel Núñez Butrón, área de Microbiología, durante los meses de noviembre 2018 a febrero, 2019. ....	69
Figura 19. Observación al microscopio a 40 x para <i>Candida albicans</i> , Servicio de Patología Clínica del Hospital Regional Manuel Núñez Butrón, área de Microbiología, durante los meses de noviembre 2018 a febrero, 2019. ....	69
Figura 20. Halo de inhibición a una concentración de 50%. Servicio de Patología Clínica del Hospital Regional Manuel Núñez Butrón, área de Microbiología, durante los meses de noviembre 2018 a febrero, 2019. ....	70
Figura 21. Halo de inhibición a una concentración de 75%. Servicio de Patología Clínica del Hospital Regional Manuel Núñez Butrón, área de Microbiología, durante los meses de noviembre 2018 a febrero, 2019. ....	70
Figura 22. Halo de inhibición a una concentración del 100%. Servicio de Patología Clínica del Hospital Regional Manuel Núñez Butrón, área de Microbiología, durante los meses de noviembre 2018 a febrero, 2019. ....	71
Figura 23. Inoculación de cepas de <i>Candida albicans</i> en Agar Saboraud Dextrosa. Servicio de Patología Clínica del Hospital Regional Manuel Núñez Butrón, área de Microbiología, durante los meses de noviembre 2018 a febrero, 2019. ....	71
Figura 24. Halo de inhibición a una concentración de 25%. Servicio de Patología Clínica del Hospital Regional Manuel Núñez Butrón, área de Microbiología, durante los meses de noviembre 2018 a febrero, 2019. ....	72
Figura 25. Control negativo (alcohol). Servicio de Patología Clínica del Hospital Regional Manuel Núñez Butrón, área de Microbiología, durante los meses de noviembre 2018 a febrero, 2019. ....	72

Figura 26. Control positivo (fluconazol). Servicio de Patología Clínica del Hospital Regional Manuel Núñez Butrón, área de Microbiología, durante los meses de noviembre 2018 a febrero, 2019.....72

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Componentes de la canela .....	26
Tabla 2. Diseño de investigación para Comparar el efecto inhibitorio <i>in vitro</i> de la mejor concentración inhibitoria del aceite esencial de <i>Cinnamomum zeylanicum</i> y el antibiótico fluconazol sobre <i>Candida albicans</i> . Servicio de Patología Clínica del Hospital Regional Manuel Núñez Butrón, área de Microbiología, durante los meses de noviembre 2018 a febrero del 2019.....	39
Tabla 3. Diseño del experimento, concentraciones y número de repeticiones para hallar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).....	39
Tabla 4. Preparaciones de concentraciones o tratamientos de aceite esencial de <i>Cinnamomum zeylanicum</i> “canela”. Servicio de Patología Clínica del Hospital Regional Manuel Núñez Butrón, durante los meses de noviembre 2018 a febrero 2019.....	43
Tabla 5. Tabla de estandarización de los halos de inhibición (mm).....	45
Tabla 6. Inhibición antifúngico <i>in vitro</i> del aceite esencial de <i>Cinnamomum zeylanicum</i> sobre <i>Candida albicans</i> . Servicio de Patología Clínica del Hospital Regional Manuel Núñez Butrón, área de Microbiología, durante los meses de noviembre 2018 a febrero del 2019.....	48
Tabla 7. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial <i>Cinnamomum zeylanicum</i> “canela” a diferentes concentraciones. Servicio de Patología Clínica del Hospital Regional Manuel Núñez Butrón, durante el mes de enero a febrero 2019.....	54

**ÍNDICE DE ACRÓNIMOS**

HMNB	Hospital Manuel Núñez Butrón
OMS	Organización Mundial de la Salud
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
$\mu$ l	Microlitros
mm	Milímetros
CMF	Concentración Mínima Fúngica
$\mu$ g	Microgramos
ml	Mililitros
cm	Centímetros
$\mu$ m	Micrómetros
$^{\circ}$ C	Grados celcius
ECM	Elementos de la Matriz Extracelular
KOH	Hidróxido de Potasio
ASD	Agar Sabouraud Dextrosa
kg	Kilogramo
UFC	Unidades Formadoras de Colonias

## RESUMEN

El trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio del Hospital Manuel Núñez Butrón de la Ciudad de Puno (noviembre 2018- febrero 2019). Las infecciones fúngicas constituyen uno de los principales problemas que afectan a la población disminuyendo su bienestar y generando una demanda importante a nivel de los servicios de salud. El objetivo de la investigación fue determinar la actividad antimicótica *in vitro* del aceite esencial *Cinnamomum zeylanicum* “canela” sobre *Candida albicans*. La metodología consistió: El aceite esencial se obtuvo por el método de destilación por arrastre de vapor de agua, a partir de la corteza de “canela” en concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100%, esta se realizó en el Laboratorio de Taller Frutas y Hortalizas de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional del Altiplano, las cepas micóticas se obtuvieron del Servicio de Patología Clínica del Hospital Regional Manuel Núñez Butrón, área de microbiología y fueron sembradas en agar Müller - Hinton a través del método de difusión en agar. Para evaluar la actividad antimicótica de la “canela” se prepararon discos de papel filtro embebido en concentraciones de canela, los cuales se contrastaron con la prueba control positivo (Fluconazol) y un grupo control negativo (alcohol), se llevaron a incubar a los hongos a 37 °C durante 24 horas. Se realizó 5 repeticiones de cada concentración, obteniendo 30 tratamientos expresados en (%), del grupo experimental todo ello se llevó a cabo en el Hospital Manuel Núñez Butrón (HMNB) del servicio de Patología Clínica en el área de microbiología. Se aplicó estadística descriptiva, análisis de varianza y prueba de rango múltiple de Tukey, para la concentración inhibitoria adecuada y la evaluación de los halos de inhibición. Los resultados fueron al T1 (25%) fue 20.15mm; T2 (50%) fue 21.35mm; T3 (75%) fue 23.78mm y T4 (100%) fue 25.17mm; y del grupo de Fluconazol 26.08mm. No se observó halos de inhibición en el grupo control negativo. Se encontró diferencia significativa entre el T1 – T4 y el grupo de Fluconazol a ( $p < .0001$ ), a un  $\alpha = 0.05$ . En conclusión el tratamiento al 100% demostró una concentración inhibitoria adecuada de 25.17mm (T4), resultando ser superior con un diámetro de halo de inhibición mayor, en comparación a los demás tratamiento, demostrándose que el aceite de *Cinnamomum zeylanicum* “canela” tiene efecto antimicótico sobre cepas de *Candida albicans*.

Palabras clave: Aceite esencial, antimicótico, *in vitro*, canela, *Candida albicans*, *Cinnamomum zeylanicum*, fluconazol.

## ABSTRACT

The research work was carried out in the Laboratory of the Manuel Núñez Butrón Hospital in the City of Puno (November 2018 - February 2019). Fungal infections are one of the main problems that affect the population, reducing their well-being and generating an important demand at the level of health services. The objective of the research was to determine the *in vitro* antifungal activity of *Cinnamomum zeylanicum* "cinnamon" essential oil on *Candida albicans*. The methodology consisted of: The essential oil was obtained by the steam distillation method, from the "cinnamon bark" in concentrations of 25%, 50%, 75% and 100%, this was done in the Laboratory of Fruits and Vegetables Workshop of the Professional School of Agroindustrial Engineering of the National University of the Altiplano, the fungal strains were obtained from the Clinical Pathology Service of the Manuel Núñez Butrón Regional Hospital, microbiology area and were seeded in Müller - Hinton agar through of the agar diffusion method. To evaluate the antifungal activity of the "cinnamon", paper discs embedded in cinnamon concentrations were prepared, which were contrasted with the positive control test (Fluconazole) and a negative control group (alcohol), and the fungi were incubated at 37 ° C for 24 hours. Five repetitions of each concentration were performed, obtaining 30 treatments expressed in (%), from the experimental group all this was carried out in the Manuel Núñez Butrón Hospital (HMNB) of the Clinical Pathology service in the area of microbiology. Descriptive statistics, variance analysis and Tukey's multiple range test were applied for adequate inhibitory concentration and evaluation of inhibition halos. The results were at T1 (25%) was 20.15mm; T2 (50%) was 21.35mm; T3 (75%) was 23.78mm and T4 (100%) was 25.17mm; and from the group of Fluconazole 26.08mm. No inhibition halos were observed in the negative control group. A significant difference was found between T1 - T4 and the Fluconazole group a ( $p < .0001$ ), at an  $\alpha = 0.05$ . In conclusion, the 100% treatment showed an adequate inhibitory concentration of 25.17mm (T4), resulting in a higher inhibition halo diameter, compared to the other treatment, demonstrating that *Cinnamomum zeylanicum* "cinnamon" oil has an effect antifungal on strains of *Candida albicans*.

Keywords: Essential oil, antifungal, *in vitro*, cinnamon, *Candida albicans*, *Cinnamomum zeylanicum*, fluconazole.

## I. INTRODUCCIÓN

La candidiasis es una infección micótica producida por *Candida albicans*, con manifestaciones clínicas considerablemente variables de progreso agudo, subagudo, crónica o episódico, por lo tanto, el hongo de la candidiasis puede causar lesiones cutáneas, muco cutáneas, profundas o diseminadas. El problema principal de la candidiasis es fácil de adquirirla porque podemos encontrarla en cualquier parte del cuerpo humano, esto puede ser afectado y a su vez referida en diferentes cuadros clínicos, siendo las más frecuentes por infecciones superficiales ya que no es fácil de tratar en la población femenina, en especial en madres gestantes ya que esto presentaría alteraciones o complicaciones al nacer un niño y ser contagiada por su madre además la otra parte de la población femenina es propensa a la infección ya sea por un mal uso de higiene, probarse ropa de otra persona, utilizar jabones inadecuados para la higiene entre otros. Ahora en nuestra actualidad aún sigue siendo un problema común y está asociado a altos niveles de morbilidad, manifestándose de diferentes maneras ya que presenta una distribución universal.

La candidiasis vaginal se presenta en mayor porcentaje en madres gestantes que es causada por un síndrome de flujo vaginal esta es ocasionada por un cambio del pH vaginal, seguida de la agrupación de hormonas sexuales como el estrógeno ya que esta es referente al aumento del glicógeno del tejido vaginal, construyendo una zona rica en carbono para el desarrollo de *Candida albicans* como también la candidiasis oral es una de las más frecuentes en niños y personas adultas esta podemos encontrarla en niños con los dientes careados y adultos con dentadura postiza, ya que nuestro país en Latinoamérica es uno de los países más afectados también por las enfermedades bucales.

El manejo de los aceites esenciales como sustancias medicinales es una alternativa fitoterapéutica que actualmente se encuentra en constante desarrollo, según la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que el 80% de toda la población mundial acude a la medicina tradicionales para atender sus necesidades primordiales y asistencia médica (Mendoza, 2016), y además la mayor parte de las plantas medicinales son provenientes de países desarrolladas donde se realizan estudios más avanzados para saber qué tipo de componentes activos presentan las plantas, y estos podrían utilizarse en

forma de esencias, aceites y extractos, también podrían disminuir o eliminar el uso de productos químicos artificiales.

Los aceites son mezclas que se obtienen de compuestos más o menos volátiles derivados de los metabolitos secundarios de las plantas aromáticas o especias, y podemos obtenerlos de las diferentes formas o técnicas de extracción y pueden ser obtenidas de determinadas partes de las plantas como: hojas, tallos, raíces, corteza, ramas, madera, frutas, entre otros, y estos aceites se pueden utilizar en pastelería, postres y bebidas calientes, en la medicina es utilizada gracias a sus propiedades carnitivas, eupéptico, antiséptico, espasmolítico, antiúlcéricas, analgésicas, estomacales, antioxidante, antivíricas, antivomíticas, insecticida, fungicida y parasitaria. También conocidas sus propiedades contra enfermedades respiratorias como resfrió común, tos y sinusitis, al mismo tiempo de las enfermedades digestivas como la indigestión y flatulencias.

Las plantas medicinales como la canela se vienen utilizando ancestralmente, es consumida por muchos pobladores del área rural en forma de infusión para aliviar dolores estomacales, también es muy efectiva para contrarrestar la flatulencia y el mal de altura, la canela es una planta que puede medir de 3 a 10 metros de altura que presenta una corteza amarillosa y aromática de sabor dulce y picante. El árbol es oriundo de India e Indochina. En el Perú no se encuentra plantaciones de canela ya que todos son importados de otros países como el medio oriente. Por tal motivo la presente investigación podrá brindar una alternativa de tratamientos para el control de infecciones fúngicas. Sin embargo, poco se conoce y se ha explorado sobre su capacidad antimicótico y menos aún aplicado en pacientes con afecciones presentes o inmunocomprometidos. Motivo por el cual se realizó la presente investigación, que servirá como una alternativa de tratamiento terapéutico de menor costo y mayor eficacia en el restablecimiento y mejora de la salud.

### 1.1. Objetivo general

- Evaluar la actividad antimicótica *in vitro* del aceite esencial de canela *Cinnamomum zeylanicum* sobre *Candida albicans*.

### 1.2. Objetivos específicos

- Comparar el efecto inhibitorio *in vitro* de la mejor concentración inhibitoria del aceite esencial de *Cinnamomun zeylanicum* y el antibiótico fluconazol sobre *Candida albicans*.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial *Cinnamomum zeylanicum* “canela”, a concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100% sobre *Candida albicans*.

### Hipótesis

- El aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* “canela” presenta efecto inhibitorio *in vitro* sobre cepas de *Candida albicans*.
- Es factible determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de canela, a concentraciones de 25%, 50%, 75%, 100%.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. ANTECEDENTES

Aizaga (2017), estudió el efecto antifúngico del aceite esencial de canela (*Cinnamomun zeylanicum*) en cepas de *Candida albicans* a diferentes concentraciones 25%, 50%, 70% y 100% en 16 repeticiones, donde consiguió resultados positivos ya que al 100% obtuvo un mayor efecto antifúngico con un promedio de 24.06 mm con referencia a las demás concentraciones, por otra parte Aguilar (2016) nos indica que el efecto sinérgico del aceite de canela acompañado con el ketoconazol también en cepas de *Candida albicans* es sumamente sensible a todas las concentraciones, además el halo inhibitorio al 100% es igual al ketoconazol con 40.25mm; de tal forma que Salas (2017) evaluó efecto antimicótico del aceite de muña en *Candida albicans* a una concentración de 1/250 ul es la concentración inhibitoria adecuada para *Candida albicans*, de tal forma que también tiene efecto inhibitor frente a bacterias como es *Streptococcus mutans*, y Alcalá *et al.* (2011) dicen que a mayor concentración habrá mayor efectividad antifúngica en aceite de *Minthostachys mollis* (muña) frente a *Candida albicans*.

De Bedout *et al.* (2003), indican que la susceptibilidad de *Candida albicans* frente al fluconazol donde se aisló 2.139 especies de *Candida* procedentes de pacientes atendidos en consultas externas y pacientes hospitalizados y que *Candida albicans* es la más frecuente con un (62%), consecutivamente *C. parapsilosis* (11%), *C. tropicalis* (8.5%), *C. glabrata* (3.5%) y *C. krusei* (2.2%), obteniendo el 92.1 % de la especie *Candida albicans* es susceptible al fluconazol; Revelo (2017) posteriormente manifiesta que al estudiar el efecto antimicrobiano del aceite esencial de canela (*Cinnamomun zeylanicum*) en cepas de salmonella a diferentes tratamientos T1 (10%), T2 (30%), T3 (50%), T4 (70%) y T5 (90%), donde nos demuestra que la concentración mínima inhibitoria(CMI) es a partir de T3, T4, y T5, seguidamente los T1 y T2 son altamente sensibles a diferencia de las demás concentraciones. Por ultimo Sánchez (2017), al estudiar el efecto antibacteriano del aceite esencial de canela sobre *Staphylococcus aureus* metilino que es resistente a diferentes concentración, donde el aceite esencial presentó efecto antibacteriano a 50%, 70% y 100% y además presentado un mayor promedio de halo de inhibición al 100 %, observándose que a mayor concentración hubo mayor efecto antibacteriano de 42.5mm.

Marca (2013), nos indica que la actividad antimicótica del aceite de canela (*Cinnamomun zeylanicum* Breyn) frente a *Candida albicans*, es sumamente sensible al aceite de canela y que la concentración mínima inhibitoria(CMI) es efectiva para cándida al 0,01895

mg/ml y la concentración mínima fúngica (CMF) es 0.020529166 mg/ml, sin embargo Luis (2017), al estudiar el efecto antibacteriano del aceite de canela en comparación con clorhexidina al 0.12% frente a *Streptococcus mutans* donde demostró que el aceite de canela presenta actividad antibacteriana y que la clorhexidina tuvo mayor efectividad antibacteriana frente al aceite de canela a las 12 horas. Así mismo García (2016) al realizar su investigación acerca del efecto antibacteriano del aceite de canela sobre *Fusobacterium nucleatum*, nos demuestra que el aceite de canela tiene efecto antibacteriano frente a *Fusobacterium nucleatum* y a todas las concentraciones las cuales fueron 5%, 25%, 50%, 75% y 100%.

Huayta & Paco (2015), estudiaron el efecto de la ingesta de canela sobre el nivel de glucosa sérica en pacientes con Diabetes Mellitus tipo II, donde se trabajó con 31 pacientes divididos en dos grupos, de 16 personas grupo experimental y 15 personas del grupo control sin tratamiento, donde indica si hubo una diferencia significativa en grupo experimental en pacientes con Diabetes Mellitus tipo II. García (2015) por otra parte al indicar que el efecto antibacteriano del aceite de *Pelargonium hortorum* sobre *Pseudomonas auruginosa* y *Staphylococcus aureus* es altamente sensible, además afirma que a las concentraciones de 25%, 50% y 75% es efectivo en *Pseudomonas auruginosa* y para *Staphylococcus aureus* nos dice que es efectivo a todas las concentraciones 5%, 25%, 50% y 75% además afirmo que los diámetros de los halos de inhibición para *Pseudomonas auruginosa* fueron mayores en 50% y 75% y para *Staphylococcus aureus* en 75%. Terán (2016), sin embargo al comparar la efectividad antimicrobiana entre aceite esencial de canela y Clorhexidina frente a *Enterococcus faecalis* donde obtuvo mayor crecimiento del halo de inhibición con una medida de 12.20 mm para aceite de canela al 100% siendo esta una sustancia sensible (+), mientras que para la clorhexidina se obtuvo una media de 16.60 mm en los halos de inhibición, siendo esta una sustancia muy sensible a *Enterococcus faecalis*.

En tanto la investigación reportada por Charri & Huaman (2017), sobre la actividad del aceite esencial de canela frente a biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* en lentes de contacto, se observó la actividad inhibitoria del aceite a diferentes concentraciones, consiguiendo un resultado positivo a la formación de biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa*, donde se llegó a reducir en un 23.94% el crecimiento de dichas biopelículas, mientras que en las biopelículas maduras, el aceite tuvo mejor actividad en *Staphylococcus aureus* con una reducción del 24.85% mejor que la solución multipropósito; sin embargo Mendoza (2016), al evaluar el efecto

antimicrobiano del extracto oleoso de “canela” sobre cepas de *Pseudomonas aeruginosa* comparado con Ceftazidima, obteniendo resultados favorables a las diferentes concentraciones donde 23.53 mm para la concentración al 100%, 21.24 mm al 75%, 20.28 mm al 50%, 22.41 mm al 25% y 28.48mm para Ceftazidina ya que este tubo mayor inhibición por ser el control positivo; por otra parte Gigante (2015), manifiestas que al evaluar los potenciales de los aceites más comerciales de canela y laurel en el control de *Fusarium oxysporum*, donde la velocidad de crecimiento de *Fusarium* en medio PDA (control) fue de 5.75 mm/día y al agregar al medio de cultivo los aceites de *Laurus nobilis* y *Cinnamomum zeylanicum*, el crecimiento del hongo fue de 5.22 mm/día en el caso del laurel y de 2.44 mm/día en el de canela y a la dosis ensayada (300 µg/ml), se dice que el aceite esencial de laurel reduce la velocidad de crecimiento de *F. oxysporum* un 9%. Sin embargo, con el aceite esencial de canela se conseguido reducir el crecimiento hasta un 60%.

Castillo (2011), al estudiar el efecto de la inhibición de crecimiento de microorganismos lácticos mediante el empleo de camela, cilantro y oligosacáridos de quitosan a diferentes concentraciones 0.5%, 1% y 1.5%, donde nos indica que a una concentración de 1% que los microorganismos aun no pasan a la fase lag que es en dónde se adaptaría al medio antes de formar su crecimiento y al 0.5% es donde se observó que a partir de las primeras horas adaptándose rápidamente al medio; cuando la concentración fue al 1.5% las bacterias crecieron hasta las 24 horas (fase lag) pero después de este tiempo los microorganismos entraron a la fase de lisis celular, además Perez (2016), nos demostró que el efecto del agente antimicrobiano del aceite esencial de canela y limón en la cobertura comestible y el tiempo de almacenamiento sobre las características fisicoquímicas y el recuento de mohos, levaduras y aceptabilidad en rodajas de banano (*musa paradisíaca*) donde se determinó que la cobertura con aceite de canela presento menor pérdida de peso seguida de una mayor luminosidad y presento el menor recuento de mohos y levaduras.

López (2015), evaluó la concentración de aceite de canela en la cobertura comestible y el tiempo de almacenamiento sobre las características fisicoquímicas y microbiológicas en ciruelas, al 0.2% de aceite esencial de canela incorporado a la cobertura comestible a base de almidón de maíz mostraron principales diferencias fisicoquímicas y microbiológicas durante 12 días de acumulación a  $7 \pm 0.05$  °C; Por otra parte Herrera (2011), nos demostró que el aceite esencial de canela y de nuez moscada es efectiva para el recubrimiento comestible y para la conservación de frutos de mora además obtuvo

resultados positivos ya que presentan un efecto inhibitorio al lograr retardar el desarrollo de *Botrytis cinerea* en frutos de mora de castilla almacenados a temperatura ambiente reduciendo el porcentaje de infección e índice de severidad de la infección causada por *Botrytis cinerea*.

Rubio (2017), al estudiar el efecto antimicrobiano de los aceites esenciales de orégano y canela en el pan integral donde indica la aplicación en masa de estos aceites esenciales retarda el incremento de los hongos predominantes en la disminución del pan (*Penicillium* y *Aspergillus*) por más tiempo en comparación con el benzoato de sodio; siendo el aceite de canela el que presenta mejores resultados y por un periodo más prolongado, además indicando que al 67% de los encuestados les agrada y 93% consumiría pan con aceites esenciales, seguidamente Romero *et al.* (2011), manifiestan que al estudiar los antimicrobianos en películas de almidón oxidado de plátano en aceites esenciales; el aceite esencial de canela presento una mayor actividad antimicrobiana en comparación con el sorbato de potasio en las dos cepas estudiadas, y a la incorporación de aceite de canela disminuyo la permeabilidad al vapor de agua de  $18.34 \times 10^{-10}$  a  $5.07 \times 10^{-10}$ g donde el aceite esencial de canela puede ser una alternativa para elaborar películas con potencial como material de empaque. Finalmente Silva (2013), evaluó la protección antifúngica y enriquecimiento antioxidante de fresa con aceite esencial de hoja de canela, donde se observó una inhibición significativa ( $P \leq 0.05$ ) del ataque por hongos por efecto de los tratamientos con AHC, y la concentración de 0.005 g m/l fue la más efectiva además incrementó los contenidos de fenoles (78%) y de flavonoides totales (35%), y con ello elevó la capacidad antioxidante de los frutos.

## 2.2. MARCO TEÓRICO

### 2.2.1. Las plantas medicinales

Son aquellas plantas que elaboran sus propios productos llamados principios activos, que son compuestos que realizan una acción farmacológica, estos pueden ser benéficas o perjudiciales para el hombre. Su función principal, a veces es muy específica, esto puede servir muchas veces como droga o medicamento, como también aliviar la enfermedad o mejorar la salud decaída; es decir, que tiende a reducir o contrarrestar por completo la enfermedad (Lagunas, 2012), asimismo la cantidad de plantas medicinales utilizadas en el campo de la salud tradicional es muy amplio y está en constante desarrollo a medida que van siendo exploradas nuevas especies como la canela, la cual posee muchas

propiedades, y vienen siendo aprovechadas por el ser humano de diferentes maneras (Salas, 2017).

Formas de utilización de las plantas medicinales

### **2.2.2. Aceites esenciales**

Los aceites son productos volátiles que circulan a través de la epidermis de las plantas además presenta una naturaleza muy compleja que se obtiene a partir de la materia prima de las plantas aromáticas (Cárdenas, 2013). De tal forma que los aceites esenciales presentan sus principales productos aromáticos que podemos encontrar en diferentes partes de las plantas como; hojas, tallos, raíz, semillas y las flores, se evaporan por exposición al aire a temperatura ambiente, por lo que se denominan: aceites volátiles, aceites esenciales o esencias, aceites etéreos (Torrez, 2012), además los aceites son productos del metabolismo secundario de las plantas ya que en su composición intercede una proporción de hidrocarburos llamados polimetilénica del grupo de los terpenos que se expresan en la fórmula  $(C_5H_8)_n$  seguida de otros componentes que son casi continuamente oxigenados (alcoholes, ésteres, aldehídos, compuestos fenólicos y éteres) (Flores, 2010; Anaya, 2018).

### **2.2.3. Utilización de los Aceites**

#### **Industria farmacéutica**

Algunos aceites esenciales se utilizan en farmacia por presentar diversos principios activos como mezclas y aromatizantes en la elaboración de jarabes, analgésicos, inhalantes, elixires y otras representaciones farmacéuticas (Stashenko, 2009). Asimismo, podemos encontrarla en la industria de la alimentación, en las licorerías a veces se suelen utilizar con mayor frecuencia como aromatizantes. La mayor parte de los aceites esenciales generalmente son utilizados con mayor frecuencia en la medicina natural, en las industrias farmacológicas, en la cocina como saborizantes, en la cosmética y perfumería (López, 2004).

#### **Cosmética**

En la cosmética y perfumería los aceites son utilizados frecuentemente por sus principios activos que puede presentar. El uso en perfumería es muy importante debido al aroma que presentan los aceites esenciales. Esto hace que se utilice en un sinnúmero de productos: desde perfumes para aguas de colonia hasta fragancias para detergentes de ropa (Montoya, 2010). En cuanto a su empleo en cosmética es importante en las funciones

específicas que algunas esencias presentan sobre la piel, además del uso como aromatizante en incomparables preparaciones cosméticas (SENA, 2012).

### **Aromaterapias**

Es muy utilizado en la medicina tradicional ya que se emplea básicamente los aceites en sus tratamientos antiinfecciosos, antibacterianos y antifúngicos donde se obtiene resultados muy favorables (Sanchez, 2013).

### **Almacenamiento**

Los aceites esenciales por ser sustancias altamente volátiles, es muy importante que sean almacenados en frascos estériles de vidrio oscuro totalmente sellados. No se deben exponer a temperaturas altas, por lo que se recomienda mantenerlos en un lugar fresco o refrigeración para una mejor conservación (González, 2010). Si es correctamente almacenada, su duración será de 6 meses hasta 2 años ((Aizaga, 2017).

### **Agente antifúngico natural**

Los productos naturales ofrecen una variedad de sustancias con actividad biológica, por ejemplo, la obtención del aceite esencial de la corteza de canela que puede llegar a ser útil para la mejora de las terapias antifúngicas(Cava, 2013).

#### **2.2.4. Técnicas de extracción de aceites esenciales**

El método de extracción depende del tipo de material a procesar ya sea raíz, pétalos, hojas, cortezas, entre otros. Es muy importante conocer el lugar donde se ubica la sustancia aromática dentro de la estructura celular de la planta. La cual es muy importante el material vegetal que se utilice para su extracción (Flores, 2010).

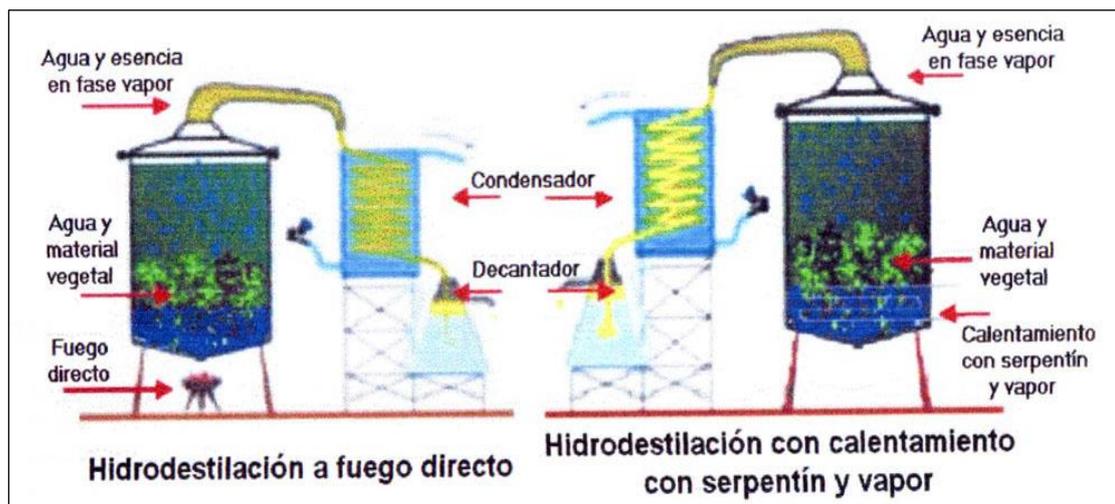
#### **Destilación por arrastre con vapor de agua**

Es el proceso más común que se puede utilizar para la extracción de aceites esenciales, de tal forma que en este proceso se aprovecha la todas las propiedad que tienen las elementos de agua en estado de vapor de asociarse con moléculas de aceite (Albarracín & Gallo, 2003).

Se trata de destilar dos mezclas de líquidos inmiscibles, en una vaporización donde las temperaturas serán inferiores a las de la ebullición de los componentes volátiles esto ocurre por el efecto de una corriente directa de vapor de agua (Flores, 2010), donde se realiza la doble función de calentar la mezcla hasta llegar a un punto de ebullición. El vapor de agua y el aceite esencial que sale, se enfrían hasta volver a la fase líquida, y se separan en un decantador ((SENA, 2012).

### Destilación con agua o hidrodestilación

La destilación con agua consiste en hervir agua y el material vegetal, esto se realiza para evitar el sobrecalentamiento y la carbonización del material vegetal, ya que puede realizarse a fuego directo. Debe estar en constante movimiento para evitar que se junte o precipite al pegarse a las paredes del recipiente, ya que esto puede provocar también su degradación térmica formando olores desagradables al obtener el aceite (Contreras ,2010; (SENA, 2012)



**Figura 1.** Destilación con agua o hidrodestilación (SENA, 2012)

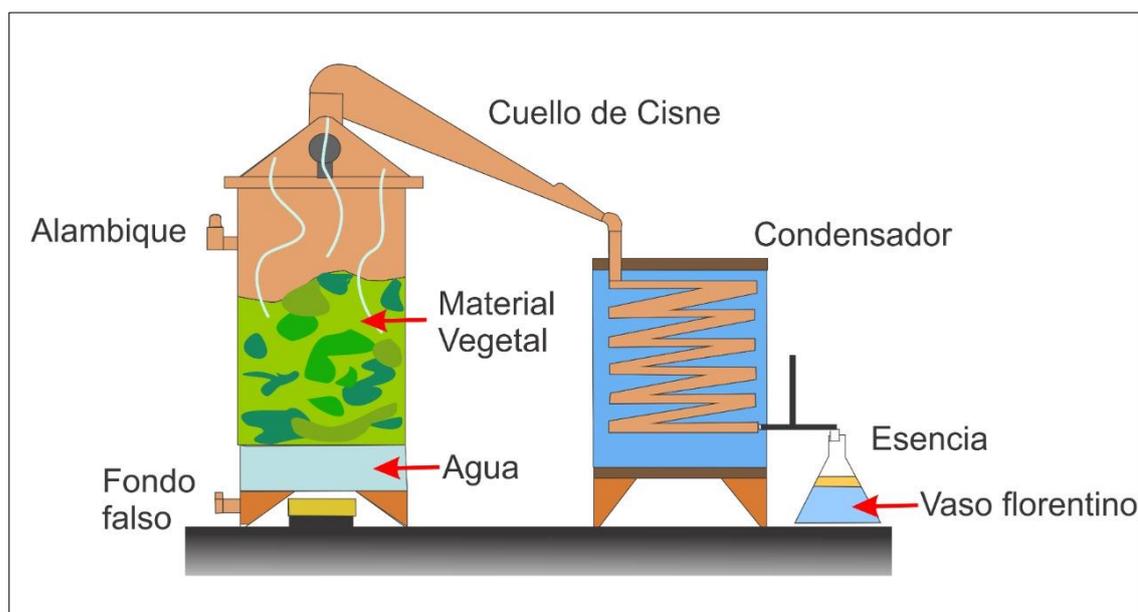
En cuanto al tiempo de la destilación de los aceites, es muy importante si el aceite presenta compuestos de alto punto de ebullición, el tiempo de destilación deberá ser mayor, los aceites esenciales obtenidos por el método de destilación en agua generalmente muestran olores más fuertes y un color más oscuro a comparación a otros métodos (Albarracín & Gallo, 2003).

### Destilación agua- vapor o vapor húmedo

En este método el vapor puede ser formado por una fuente externa o dentro de la propia cámara extractora, seguidamente el material se coloca sobre una parrilla, entre el fondo y la parrilla se pone el agua aunque separado del material vegetal (Aguilar, 2018), el agua que sale con el aceite en la primera extracción, se recircula al extractor para sostener el proceso de destilación (cohobación). La diferencia entre los demás métodos es que el material vegetal es suspendido en un fondo falso que evita el contacto con el material vegetal y el medio líquido en ebullición, este sistema reduce la capacidad neta de carga de materia prima dentro del extractor pero mejora la calidad del aceite obtenido Vidal (2015).

### Destilación previa maceración

Este método se utiliza para extraer el aceite de bulbos de cebolla, semilla de almendras, bulbos de ajo y hojas de abedul. Por otra parte las plantas aromáticas necesitan ser sometidas a un proceso de maceración con agua caliente para ayudar la separación del aceite ya que sus compuestos volátiles están asociados a componentes glicosilados (Albarracín & Gallo, 2003).



**Figura 2.** Destilación agua-vapor o vapor húmedo (Vidal, 2015)

#### 2.2.5. Canela *Cinnamomum zeylanicum*

La canela pertenece a la familia Lauraceae, del género *Cinnamomum* que tiene aproximadamente 250 especies, las tres variedades más importantes de donde se extrae aceite de canela son *C. zeylanicum*, *C. cassia Blume* y *C. camphora L* (Sanchez, 2013). La canela posee efectos biológicos como la analgesia, es antiséptico, antiespasmódico, afrodisiaco, astringente, carminativo, hemostático, insecticida y parasiticida (González, 2010).

#### Sinonimia

Nombre común: canela de Ceilán, canelo, canelón (Aizaga, 2017).

Alemán	: zimt
Inglés	: cinnamon
Italiano	: cannella
Catalán	: canyella
Vasco	: kanelondo
Galo	: caneleiro

Francés : canelle (Luis, 2017)

### **Descripción morfológica**

La canela es una planta que corresponde a la familia Lauraceae, es un árbol que puede medir entre 3 y 10 m de altura; se observa bien ramificado, de hojas opuestas, lanceoladas, de colores verde amarillento, brillantes, ovaladas u oblongas, que miden de 15 a 20 cm de largo (Jácome, 2019). Las flores pueden ser blancas o purpúreas, pequeñas y sedosas. Las hojas presentan aroma y sabor característico a la canela, en cuanto al olor de sus flores resulta ser desagradable. Presenta frutos de color morado en bayas del tamaño de un guisante y presenta un sabor agrio cuando esta verde además en su interior presenta dos semillas (Cava, 2013)

Presenta una corteza rugosa y gruesa de un color característico marrón rojizo, donde se desprende de la planta en forma rollos o tiras, con un tamaño de 50 cm de largo, para después ser desecados, por lo tanto posee el uno por ciento de aceite volátil (Charri & Huamán, 2017). Las plantaciones de canela necesitan un clima tropical húmedo con una temperatura no menor a 25°C y con una precipitación pluvial de uno a dos metros anuales; puede prosperar bien cerca del nivel del mar hasta unos 500 metros en terrenos de aluvión, bajos arenosos- húmidos (Sanchez, 2013).

### **Características de la corteza de la canela**

La canela está caracterizada por:

Forma tubular doble

Color marrón – terroso.

Superficie bastante lisa con líneas onduladas

Olor característico

Sabor astringente (Luis, 2017)

### **Distribución geográfica**

La planta de la canela es una especie nativa de Sri Lanka y suroeste de la India se puede observar en zonas cálidas, semicálidas, semisecas y lugares templados entre los 100 y 200 msnm (Marca, 2013). En la actualidad se produce en los Estados Unidos, Austria e islas del Pacífico. Seguidamente podemos mencionar la variedad de especies de canela que hay como: *Cinnamomum verum* o *zeylanicum*, también conocida por la canela original o la canela de Ceilán, que es plantada en Sri Lanka, el sur de India, seguidamente tenemos la *Cinnamomum aromaticum*, también conocida como Cassia, que se cultiva en China, Indonesia y Vietnam (Hurtado, 2019). La canela presenta un color marrón amarillento y producir un polvo más fino que la Cassia que tiene un color pardo grisáceo.

La canela de Sri Lanka, es la favorita por los europeos ya que es más suave, tiene un sabor dulce y es más cara (Revelo, 2017).

### Clasificación taxonómica

Reino	: Plantae
División	: Magnoliophyta
Clase	: Magnoliopsida
Orden	: Laurales
Familia	: Lauraceae
Género	: Cinnamomum
Especie	: <i>Cinnamomum. zeylanicum</i>
Nombre común	: Canela

Fuente: (Aizaga, 2017)

### Composición química del aceite de canela

Al mencionar la composición química del aceite de canela, nos referimos a los componentes que la corteza que la canela presenta (Aizaga, 2017), donde las cantidades de sustancias químicas en su mayoría corresponden a aldehído cinámico, eugenol, felandreno, linalool, benzaldehído, cariofileno, ácido benzoico y cinamato de bencilo ((Luis, 2017), también podemos mencionar sustancias que presentan en menor cantidad como: taninos, cumarina, azúcares y resina, encontrando también fécula, mucílago, ácido tánico, materias minerales y flavonoides, siendo una de estas sustancias la que corresponde a brindar un efecto antifúngico (Padrón, 2010).

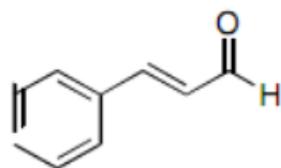
**Tabla 1.** Componentes de la canela

Componentes	%
Aldehído cinámico	70%
eugenol	10%
Safrol	11%
linolol	15%
cineol	1.80%
limoneno	0.09%
Benzil benzoato	1.00%
hidrocinalmaldehído	0.10%

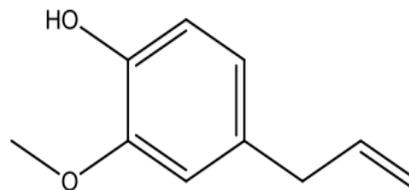
Fuente: (Sanchez, 2013; (Marca, 2013)

### Estructura química

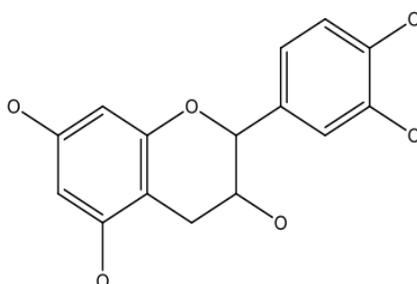
Estructura de algunos componentes de la canela (Cava, 2013)



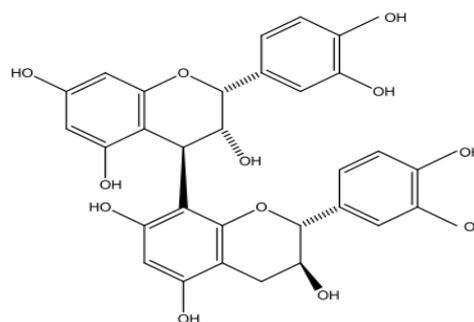
Cinamaldehido



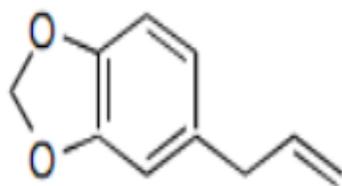
Eugenol



Catequina



Pocianidina



Safrol

### Mecanismo de acción

En la forma que actúa el aceite de canela es en la inducción de la apoptosis ocasionando una muerte celular, por lo tanto, esto genera la necrosis mediante un proceso por el cual se interfiere la función mitocondrial de las células de la levadura, Para lo cual esto va a producir un aumento de la permeabilidad y la eliminación de iones la membrana de la célula del hongo sensible esto se realiza gracias a sus componentes. Incluso, se ha demostrado que la canela, en diversas células cancerosas presenta actividad citotóxica ((Aizaga, 2017). El efecto de la inducción puede durar hasta las 24 horas después de la exposición. Éste afecta mayor en las levaduras que sobre bacterias; sin embargo, si contrastamos sus efectos con los de otros aceites, la canela presenta una mayor actividad antifúngica (Sanchez & Luján, 2013).

## **Indicaciones**

La canela no debe ser hervida, debido a que pierde sus propiedades curativas (Aizaga , 2017). Se ha manifestado que el aceite esencial de canela posee una toxicidad asociada con una dosis superior a 3 g/kg. La dosis recomendada para uso interno es de 1 a 2g por 2 a 3 veces al día (Luis, 2017). También está indicado como agente antiplaca, para el tratamiento de gingivitis y periodontitis, como desinfectante en estomatitis por dentaduras (candidiasis sub placa), como tratamiento de ulceraciones aftosas y como coadyuvante en halitosis. Su uso por lo general se recomienda dos veces al día, y también puede utilizarse como enjuague oral que debe ser usado por lo menos 30 segundos. No se debe ingerir y debe expectorarse después de enjuagarse.

### **2.2.6. Micosis oportunista**

Un microorganismo oportunista en su medio ambiente o habitat natural por lo general es inofensivo, pero se vuelve perjudicial en un huésped con el sistema inmune comprometido. Un huésped comprometido está sumamente débil ya que presenta las defensas muy bajas esto hace que fácilmente adquiera una infección presente (Vásquez & Arena, 2008). Los hospedadores con bajas defensas inmunitarias son susceptibles a muchos hongos de amplia distribución, siendo expuestas también personas sanas. Por otra parte, se puede identificar el tipo de hongo mediante el cuadro predisponente y primario del hospedador. Cándida y levaduras similares, son de la flora bacteriana normal, pero pueden cambiar a ser oportunistas endógenos. Las micosis son hongos oportunistas son ocasionados por hongos exógenos que en forma natural vive en la tierra, el agua y el aire. Desde hace más de 30 años se utiliza el termino micosis oportunistas para nombrar a un grupo de afecciones por hongos que viven normalmente en ambientes o cavidades naturales de las personas, y posee la capacidad de presentar cambios bioquímicos y morfológicos de acuerdo a los mecanismos de defensa que presenta el huésped. De acuerdo a lo mencionado las infecciones muestra un índice elevado de casos, en inmunodeprimidos por deficiencia de la inmunidad, sea celular (caquexia, SIDA) o humoral (leucemia, mieloma, etc.) por cambios de la fagocitosis (lupus, diabetes); granulocitopenia (citotóxicos, radioterapia) o en inmunodepresión consecuente, o administración de glucocorticoides y quimioterapia, principalmente en personas trasplantados, así como en pacientes con hiper alimentación parenteral y con catéteres intravasculares. Los microorganismos que producen micosis oportunistas por levaduras son *Candida albicans* (Salas, 2017).

### **Candidiasis**

Es una infección que puede ser primaria o secundaria, presentada por levaduras del género *Cándida*, presentando diferentes patologías clínicas considerablemente variables de evolución aguda, subaguda, crónica o episódica, de tal forma que el hongo puede causar lesiones cutáneas, muco cutáneo, profundo o diseminado (Biasoli, 2014).

### **Clasificación taxonómica**

La clasificación taxonómica de *Candida* se muestra de la siguiente manera:

Reino	: Fungi
División	: Ascomycota
Subdivisión	: Saccharomycotina
Clase	: Saccharomycetes
Orden	: Saccharomycetales
Familia	: Saccharomycetaceae
Género	: <i>Candida</i>
Especie	: <i>Candida albicans</i>

Fuente: (Garza, 2012)

### **Agente etiológico**

El principal agente es *Candida albicans*, pero pueden estar implicadas otras especies de *Candida*, como, *Candida dubliniensis*, *Candida glabrata*, *Candida famata*, *Candida krusei*; *C. lusitaniae*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, etc(Laforet, 2010).

#### **2.2.7. *Candida albicans***

##### **Características generales**

Los hongos del género *Candida* se reproducen por gemación, en forma de levaduras ovaladas, redondeadas o esféricas que miden aproximadamente de 3 a 6  $\mu\text{m}$  de diámetro, gran positivas y presenta un metabolismo aerobio. Asimismo, tiene la capacidad de formar pseudo-hifas o pseudo-micelio cuando las yemas siguen creciendo, además estos no se despegan y así forman cadenas de células largas que muestran muescas o constricciones en los tabiques entre célula y célula (Aizaga , 2017). A comparación de otros géneros de *Candida*, *Candida albicans* es dimórfica; al mismo tiempo de las formas de levadura y pseudohifas también pueden llegar a presentar hifas verdaderas, y pueden

llegar a desarrollarse en medios de cultivo artificiales y habituales como glucosado de Sabouraud dextrosa, gelosa sangre, Mueller-Hinton, infusión cerebro corazón y extracto de levadura agar. A las 24 horas se puede observar el crecimiento de colonias blanquecinas, lisas o consistencia pastosa o cremosa y muy brillante, siendo su temperatura óptima de crecimiento entre 25 y 37 °C (Aguilar, 2016). Existe dos técnicas fáciles que permiten diferenciar *Candida albicans*, que es el patógeno más frecuente, de otras especies de *Candida*: seguida de una incubación en suero durante unos 90 minutos a 37 °C, las levaduras de *Candida albicans* empiezan a formar hifas verdaderas o también llamados tubos germinativos (Salas, 2017; Olea, 1995).

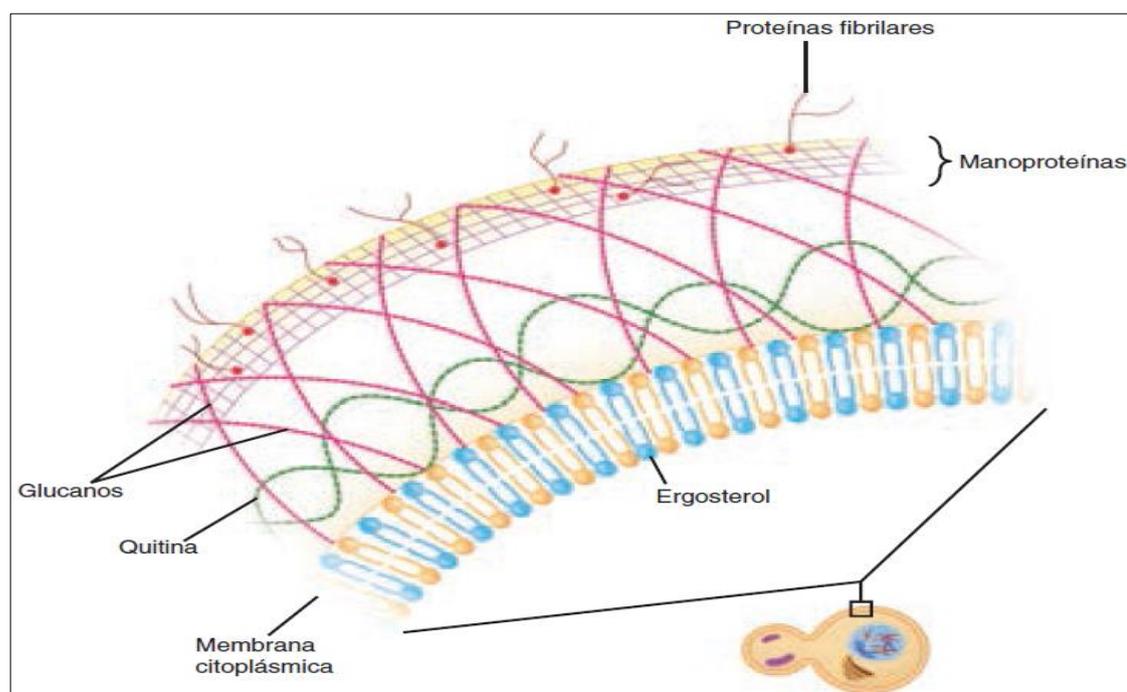
(Aizaga, 2017), indica que los hongos son células eucariotas, que están recubiertas por paredes celulares las cuales están formadas por polisacáridos como quitina y glucanos, además presenta una membrana plasmática que contiene esteroides como lo es el ergosterol, el cual se identifica por ser un biorregulador que le da a la membrana fúngica cierta rigidez y estabilidad, siendo este también un punto fijo para la acción de los antifúngicos.

### **Estructura molecular**

Está compuesto químicamente por polisacáridos (30% - 50%), seguida de proteínas en (20% - 40%) y en menor cantidad la concentración lipídica, esto depende de otros tipos de cepas como: edad de la cepa, el ambiente y de la fuente de carbono (Aguilar, 2016), *Candida albicans* es un organismo que presenta una pared celular la cual está compuesta especialmente por manano conocidas también como manoproteínas que presenta (15.2% a 22.9%) que se encuentran en la superficie de la matriz estructural de la pared celular, del mismo modo los Glucanos son polímeros de glucosilo que se encuentran en dos subtipos Dglucano  $\beta$ -1-3 y el D-glucano  $\beta$ -1-6 y constituye el 47 % y 60 % de la pared celular, además algunos de estos forman fibrillas que aumentan la fuerza de la pared de las células micóticas, con la asociación de la quitina (Salas, 2017), y por último la quitina 0.6 % a 9 % del peso seco de la pared celular; estos son polisacáridos y su síntesis está condicionada al crecimiento y a los estadios metabólicos. En las levaduras, la quitina presenta la mayor importancia en la formación de tabiques cruzados y conductos a través de los cuales pasa el núcleo de la célula madre a la célula hija durante la división celular. Presenta membranas nucleares la cual están conformados por cromosoma quienes lo limitan, un nucléolo rico en ARN y organelos citoplasmáticos como mitocondrias, vacuolas, retículo endoplasmático, aparato de Golgi y ribosomas 80S. La membrana del

citoplasma posee invaginaciones como surcos de 200 a 300 nm de espesor donde presenta 2 compartimientos que tienen esteroides y proteínas, además se controla la permeabilidad celular y la síntesis de la pared celular, es muy importante ya que los fármacos (antibióticos y antifúngicos) usados para contrarrestarla actúan a ese nivel. También contiene enzimas que son encargadas de sintetizar la pared celular, es por eso que al actuar el medicamento en la membrana citoplasmática, automáticamente disminuye la síntesis de la pared celular (Aguilar, 2016).

Pared celular de un hongo. Se muestra la superposición de elementos de manano, glucanos, quitina y elementos proteínicos. Las proteínas que forman complejos con el manano (manoproteínas) se extienden más allá de la pared celular.



**Figura 3.** Pared celular de hongo de levadura, se muestra la superposición de elementos de mananos, glucanos, quitina y elementos proteínicos. Fuente: Microbiología (Ryan, 2012).

### **Epidemiología de *Candida albicans***

*Candida albicans* tiene la capacidad de colonizar al ser humano, se encuentra en el tubo digestivo desde la cavidad bucal hasta el recto, como también puede llegar a desarrollarse en la vagina, la uretra, la piel, y bajo las uñas del pie y la mano. Se dice que entre un 25% y un 50% de las personas sanas presentan alguna especie de *Candida* en la microflora normal de la cavidad bucal; *Candida albicans* representaría entre un 70% y un 80% de las cepas. Las tasas más altas se puede apreciar en la población diabética, sujetos infectados con VIH (Garza, 2012; Marca, 2013).

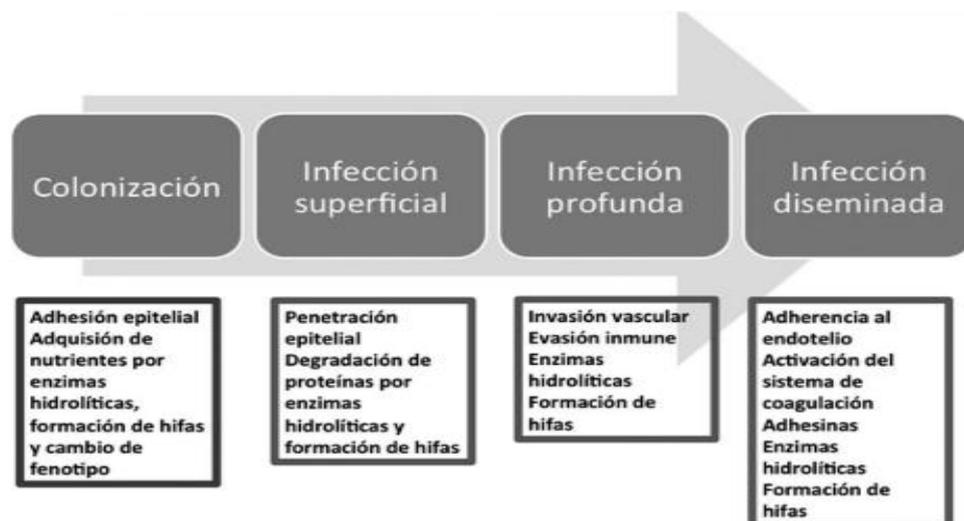
Por lo mencionado anteriormente, la mayor parte de las infecciones son de origen endógeno a partir de los reservorios muco cutáneos o cutáneos (introducidos a partir de catéteres u otros dispositivos de uso médico, que dificultan la barrera cutánea), aunque también pueden ser exógenas, por ejemplo en los hospitales, donde las levaduras pueden ser transmitidas a lactantes a partir de mamaderas mal esterilizadas, o a pacientes trasplantados o inmunosuprimidos a partir de materiales quirúrgicos, equipos de diálisis o endoscopios mal descontaminados o por transmisión horizontal a partir de la existencia de infecciones por levaduras en manos o uñas del personal que trabaja en unidades de cuidados intensivos (UCI), sin la debida protección (Biasoli, 2014).

### **Patogenia**

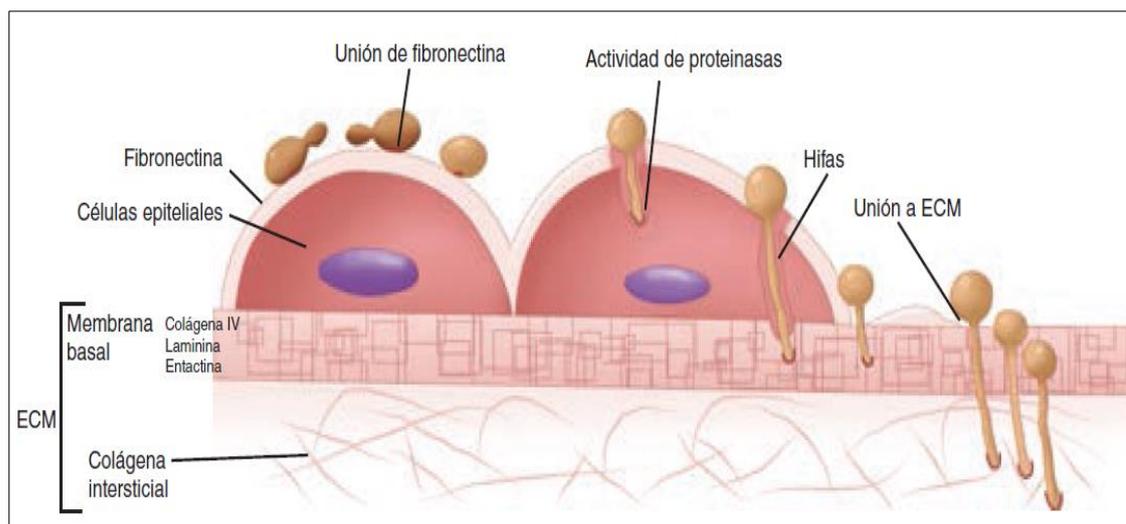
El delicado balance o equilibrio que hay entre comensal (levaduras) y hospedero podría quebrarse y dar lugar al parasitismo o desarrollo de una infección oportunista (Vallejos, 2017), al convertirse en agente patógeno todo esto depende primordialmente de la alteración del equilibrio entre la microbiota y el sistema inmunitario del hospedador (Laforet, 2010). Originándose de forma endógena en la mayoría de los casos y relacionándose a una inestabilidad de la flora microbiana, que atribuye al crecimiento de *Candida*, por la alteración del pH, aumento de glucógeno o por el uso de antibióticos; o debido a procesos que se interponen en la respuesta inmune provocando una reducción de esta flora (Aizaga, 2017). Estos factores de virulencia juegan un papel en cada etapa de la infección por *Candida albicans* la infección puede dividirse en cuatro etapas (Castillo & Valverde, 2018):

1. Colonización: en esta participan la adhesión epitelial y adquisición de nutrientes por medio de la acción de adhesinas, enzimas hidrolíticas, formación de hifas y cambio de fenotipo.

2. Infección superficial: en esta etapa es importante la penetración epitelial por medio de degradación de proteínas del hospedero por enzimas hidrolíticas y formación de hifas.
3. Infección profunda: participan la penetración tisular, invasión vascular y evasión inmune por medio de enzimas hidrolíticas y también la formación de hifas.
4. Infección diseminada: *Candida albicans* la realiza a través de la adherencia al endotelio, infección de tejidos del hospedero, activación del sistema de coagulación por intervención de adhesinas, enzimas hidrolíticas, formación de hifas nuevamente y cambio de fenotipo. Estudios *in vitro*, en animales y humanos, han implicado a las proteasas como (De la Calle *et al*, 2012):



**Figura 4.** Etapas de la infección por *Candida albicans* y los mecanismos de virulencia que intervienen en cada etapa (De la Calle *et al*, 2012).



**Figura 5.** Patogenicidad de las infecciones por *Candida albicans*. Se muestran los mecanismos propuestos para la unión e invasión por *Candida albicans*. Fuente: (Ryan, 2012)

**Patogenicidad de las infecciones por *Candida albicans*:** Se muestran los mecanismos propuestos para la unión e invasión por *Candida albicans*. Los receptores de superficie de glucomanano en la levadura pueden unirse a la fibronectina que cubre las células epiteliales o a los elementos de la matriz extracelular (ECM) cuando se pierde la superficie epitelial o cuando *Cándida* ha invadido más allá de ésta. La invasión se asocia con formación de hifas y producción de proteinasas, las cuales pueden digerir elementos histicos (Aguilar, 2016).

### 2.2.8. Manifestaciones clínicas

#### Candidiasis mucocutánea

La candidiasis de las mucosas afecta sobre todo la cavidad bucal y el conducto vaginal. La candidiasis bucal, es una enfermedad conocida como muguet, es la manifestación clínica más habitual de candidiasis en las personas (Biasoli, 2014). Esta infección se muestra por la presencia de 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 (Marca, 2013).

La candidiasis vaginal se aprecia en la mayoría de mujer con diabetes, mujer embarazada o en pacientes tratadas con ATB o anticonceptivos orales (MINSA, 2014). La infección se caracteriza por la presencia de secreción espesa y grumosa, de aspecto lechoso, blanco-amarillento y placas pseudomembranosas de aspecto blanco grisáceo, que se encuentran

en la mucosa vaginal. Toda la parte genitourinario está muy enrojecida y por lo tanto el prurito es muy intenso. Entre el 5 y el 10% de mujeres sufren sucesos recurrentes de vulvovaginitis. Esto se define como Candidiasis vulvovaginal (CVV) recurrente, cuando se provocan 3 o más episodios de CVV en un año (Biasoli, 2014).

### **Candidiasis cutánea**

Ocasiona una dermatitis crónica en la que el hongo se desarrolla hasta el estrato corneo del epitelio (Cabanillas, 2016). Las infecciones de la piel suelen afectar las partes húmedas e intertriginosas, como por ejemplo las axilas, los interdigitales de las manos y los pies, debajo de los pechos y los pliegues de la ingle. La infección de las uñas se conoce como onicomicosis, o paroniquia si están afectados los pliegues de la piel que encierran las uñas. Estos cambios genéticos afectan la función de los leucocitos o del sistema endocrino (Marca, 2013).

### **Candidiasis diseminada o sistémica**

La candidiasis sistémica es causada por una enfermedad relativamente rara, que suele pasar como un episodio terminal de los pacientes con neoplasias debilitantes, pacientes inmunosupresoras y después de un trasplante de órganos, exceso de drogas intravenosas, broncoaspiración (aspiración accidental de alimentos por las vías respiratorias) o daño de la piel. A continuación se describen los órganos en los cuales puede producirse la siembra tras la propagación de las especies de *Candida* en sitios primarios de infección mucocutánea como: riñones, piel (lesiones macronodulares), ojos, corazón y meninges (Salas, 2017). La candidiasis nace más a menudo con la administración a largo plazo de corticoesteroides y otros inmunodepresores; por ejemplo, las enfermedades hematológicas y en enfermedad granulomatosa crónica. La endocarditis por *Candida* suele presentarse al depósito y la proliferación de las levaduras y las pseudo-hifas en prótesis valvulares del corazón o vegetaciones. Las infecciones renales suelen ser una manifestación de índole general, además las de vías urinarias pueden aparecer con factores como sondas de foley, diabetes, embarazo y antibióticos antibacterianos (Marca, 2013).

#### **2.2.9. Diagnóstico de laboratorio**

Para el análisis de laboratorio de la candidiasis es muy importante la obtención de una buena toma de muestra y adecuada para su estudio mediante microscopia directa y cultivo. Las muestras tomadas del raspado de las lesiones mucosas o cutáneas deben ser

examinar directamente después de ser tratadas con hidróxido de potasio (KOH) al 10%. Las levaduras y las pseudo-hifas se muestran con facilidad por medio de la microscopia de fluorescencia. Los cultivos en medios micológicos enriquecidos se utilizan con la finalidad de aislar el microorganismo para su posterior identificación de la especie. Estas muestras se inoculan directamente en un medio selectivo llamando agar cromógeno (CHRO – M agar), donde se hace observa la presencia de varias especies de *Candida* como: *Candida albicans* que se observa colonias de verde), *C. tropicalis* (colonias de azules), *C krusei* (color rosa).

El diagnostico de los demás tipos de infección se realiza en otros medios de cultivo, a diferencia de la obtención de muestras tisulares. En todos los casos en que sea posible, se deben realizar una biopsia a las lesiones cutáneas y después teñir los cortes histológicos con GMS o cualquier otra tinción que sea específica para hongos. La observación de las levaduras por gemación y las pseudo-hifas son características suficientes para realizar el diagnóstico de la candidiasis. La identificación de cepas de *Candida* a nivel de especie tiene una gran importancia como resultado de las diferentes respuestas a los distintos tipos de tratamientos antifúngicos que se han observado en las especies de este género.

#### **2.2.10. Tratamiento**

*Candida albicans* por lo general es susceptible a la anfotericina B, nistatina, flucitosina, caspofungina y compuestos azonolicos, además el ketoconazol fue uno de los primeros medicamento de la familia de imidazoles que se podría administrar por vía oral para el tratamiento de infecciones sistémicas por hongos (Aguilar, 2016). Las infecciones superficiales por lo general se tratan con compuestos azonolicos o nistatina tópica(Gubelin, 2011). El fluconazol es uno de los tratamiento más fuerte para la candidiasis mucocutánea crónica(Ryan K, 2012).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Área de estudio

Las muestras de corteza de canela se adquirieron en el Jr. Lima N°231 Cerca al mercado Santa Bárbara de la Ciudad de Juliaca en horas de la mañana en la sección de especerías. La obtención del aceite esencia de canela *Cinnamomum zeylanicum*, se realizó en el Laboratorio de taller de frutas y hortalizas de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional del Altiplano. La cepa de *Candida albicans* se obtuvo del Hospital Regional “Manuel Núñez Butrón – Puno”. El efecto antimicótico del aceite esencial de canela *Cinnamomum zeylanicum* sobre las cepas de *Candida albicans*, se realizó en el Servicio de Patología Clínica del Hospital Regional Manuel Núñez Butrón, área de Microbiología de la Ciudad de Puno (Figura 6).



**Figura 6.** Zona de extracción del aceite esencial de canela y ejecución de la investigación (Hospital Manuel Núñez Butrón) Puno, durante los meses de noviembre 2018 a febrero 2019.

### 3.2. Tipo de estudio

Se realizó un estudio de tipo experimental, *in vitro*, descriptivo.

**Experimental:** Porque se utilizó técnicas de cultivo en Agar inoculados con cepas de *Candida albicans* a los cuales se les aplicó discos con las diferentes soluciones para medir el grado de efectividad antifúngico de cada una de ellas que se realizaron en el Servicio de Patología Clínica del Hospital Regional Manuel Núñez Butrón, área de Microbiología.

**In vitro:** Se realizó en un ambiente completamente controlado y estandarizado dentro del laboratorio clínico en el área de microbiología del hospital Manuel Núñez Butrón - Puno. Se utilizó varias placas de cepas de *Candida albicans*, en las cuales se colocó el aceite esencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) al 25 %, 50 %, 75 % y 100 % y se determinó el efecto antifúngico a partir de los resultados de la medición de los halos de inhibición.

**Descriptivo:** Ya que se utiliza procedimientos de laboratorio para el estudio y métodos y técnicas estadísticas para la recolección de datos para su análisis final.

### 3.3. Población y muestra

#### Constituida por:

- Cepas de *Candida albicans*
- Aceite esencial de canela *Cinnamomum zeylanicum*

#### Variables a estudiar:

**Variable independiente:** Aceite esencial de canela *Cinnamomun zeylanicum* al 25%, 50%, 75%, 100%.

**Variable dependiente:** Efecto antifúngico *in vitro* sobre *Candida albicans*.

### 3.4. Diseño de investigación

La distribución de las unidades experimentales para el estudio del efecto del aceite esencial de canela *Cinnamomun zeylanicum* sobre *Candida albicans*. Correspondió a un diseño completamente al azar (D.C.A.), la disposición de unidades experimentales fue de la siguiente manera (Tabla 1 y 2):

**Tabla 2.** Diseño de investigación para comparar el efecto inhibitorio *in vitro* de la mejor concentración inhibitoria del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* y el antibiótico fluconazol sobre *Candida albicans*. Servicio de Patología Clínica del Hospital Regional Manuel Núñez Butrón, área de microbiología, durante los meses de noviembre 2018 a febrero del 2019.

repeticiones	Control negativo	control positivo	Aceite esencial de <i>Cinnamomum zeylanicum</i> “canela”				total
	alcohol	fluconazol	25% aceite de canela	50% aceite de canela	75% aceite de canela	100% aceite de canela	
1	1	1	1	1	1	1	6
2	1	1	1	1	1	1	6
3	1	1	1	1	1	1	6
4	1	1	1	1	1	1	6
5	1	1	1	1	1	1	6
<b>total</b>	5	5	5	5	5	5	30

Para determinar la actividad antifúngica se trabajó con 30 unidades experimentales conformado por 5 repeticiones por cada dosis utilizada, además se utilizó un control positivo el antibiótico comercial fluconazol y control negativo alcohol para *Candida albicans*. De tal forma que sirvieron para contrastar el efecto inhibitorio, en vista que ya se conoce que dichos microorganismos son sensibles a estos antibióticos.

**Tabla 3.** Diseño del experimento, concentraciones y número de repeticiones para hallar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).

repeticiones	Aceite esencial de <i>Cinnamomum zeylanicum</i> “canela”					total
	placa control (sin tratamiento)	25% aceite de canela	50% aceite de canela	75% aceite de canela	100% aceite de canela	
1	1	1	1	1	1	5
2	1	1	1	1	1	5
3	1	1	1	1	1	5
4	1	1	1	1	1	5
<b>total</b>	4	4	4	4	4	20

Para determinar la actividad antifúngica se trabajó con 20 unidades experimentales conformado por 4 repeticiones por cada dosis utilizada, paralelamente se colocó una placa control sin ninguna concentración de aceite sin tratamiento (control de crecimiento) para *Candida albicans*, de tal forma que sirvieron para hallar la concentración mínima inhibitoria.

### **3.5. Metodología**

#### **3.5.1 Comparar el efecto inhibitorio in vitro de la mejor concentración inhibitoria del aceite esencial de *Cinnamomun zeylanicum* y el antibiótico fluconazol sobre *Candida albicans*.**

##### **Obtención del material vegetal**

Se adquirió 4 kg de corteza de la canela, las cortezas están en un buen estado sin señales de infección o apariencia de ciertos tipos de parásitos, las cuales fueron adquiridas del Jr. Lima N° 231 cerca al mercado Santa Bárbara de la ciudad de Juliaca (Figura 8).

##### **Extracción del aceite esencial**

**Método:** destilación por arrastre de vapor de agua.

**Fundamento:** consiste en calentar la planta, hasta que sus componentes más volátiles pasen a la fase de vapor y a continuación se enfría el vapor para recuperar dichos componentes (SENA, 2012), cuyos puntos de ebullición son esencialmente mayores al del agua, que comienza con la evaporización por burbujeo de vapor de agua y por consiguiente se condensan por enfriamiento junto con el agua (Zuni, 2017).

##### **Procedimiento**

Para la obtención de aceite de canela se realizó con el molido de la corteza de canela y macerarla por 24 horas. Después se cargó en un hidrodestilador, de manera que forme un lecho fijo compacto colocándose en total 4kg, se esperó el tiempo requerido para que el vapor del agua por presión suba y entre en contacto con la corteza de la canela, rompiendo y liberando la esencia contenida en dicha corteza, atrapándola en las gotitas de agua del vapor; este vapor se condensa y vuelve a ser líquido por medio de la entrada de agua fría, este líquido pasa a la pera de decantación donde se separa el aceite esencial del agua (Figura 11). El aceite esencial de canela presenta sus principios activos que está compuesto por las sustancias químicas que tiene actividad antifúngica que se probó en

esta investigación. El aceite por diferencia de densidades flota en la superficie del balón, el proceso termino cuando el volumen del aceite esencial acumulado en la bureta no varía con el tiempo, a continuación, el aceite fue retirado de la bureta y fue almacenado en un frasco limpio y envuelto en papel aluminio para proteger de la luz del ambiente, todo el proceso de extracción se ejecutó en un tiempo de 2 horas y 30 minutos. Se obtuvo 4ml de aceite esencial de canela de 4kg de corteza de canela, seguidamente se almacenó en un ambiente fresco hasta su posterior utilización en los análisis.

### **Aislamiento e identificación de *Candida albicans***

Aislamiento en medio selectivo Agar Saboraud Dextrosa (ASD) al 2%, con antibiótico.

Fundamento: El medio de cultivo que funciona como un medio de enriquecimiento para hongos, al añadirle cloranfenicol se convierte en un medio selectivo, inhibiendo el crecimiento bacteriano, que a su vez contiene peptonas y en mayor porcentaje de glucosa que beneficia el crecimiento de los hongos sobre bacterias (MINSA, 2007;(Cañedo & Ames, 2004).

### **Procedimiento**

Con un asa de Kollé de punta redonda bien esterilizada, se sembró las muestras de secreción vaginal en Agar Saboraud Dextrosa al 2%. Se incubó a 37° C durante 24 horas, una vez desarrollado las colonias, se procedió a la prueba de identificación.

### **Coloración Gram**

Fundamento: esta tinción separa las bacterias y hongos en dos grandes grupos, las Gram positivas que retienen el primer colorante que es usado (cristal violeta) de igual forma para las Gram negativas que se tiñen con el segundo colorante (safranina). Todas estas diferencias también se pueden observar en la estructura y composición química de la pared celular. Las Gram positivas presentan una pared gruesa de péptidoglicano y además, varias de estas especies muestran ácidos teicoicos en la pared. Las Gram negativas presentan menos péptidoglicano y la capa que tiene es mucho más delgada, pero está rodeada de una bicapa más externa de lípidos, llamada membrana externa(Olivas, 2012).

Para realizar la tinción Gram, primeramente se tomó un pequeño inóculo del cultivo puro de *Candida albicans* con la ayuda de un asa de siembra para extenderlo en una lámina portaobjeto y se fijó con la flama de un mechero. Después, se vertió sobre el frotis cristal

violeta dejándolo actuar por 1 minuto. Pasado el tiempo, se lavó con abundante agua destilada con mucho cuidado. Luego, se cubrió el frotis con lugol, y se dejó actuar por 1 minuto. Transcurrido el tiempo, se lavó con abundante agua destilada, teniendo mucho cuidado. Inmediatamente, se cubrió con solución decolorante (alcohol-acetona), por 30 segundos. Transcurrido el tiempo, se lavó con abundante agua destilada, teniendo mucho cuidado. Por último, se cubrió con colorante de contraste (safranina), y se dejó actuar por 1 minuto. Transcurrido el tiempo, se lavó con agua de la llave y teniendo mucho cuidado se escurrió con un papel secante por la parte inferior de la lámina portaobjeto. La preparación teñida se secó al aire, dejando la lámina en posición inclinada.

### **Prueba de tubo germinativo**

Las levaduras de *Candida albicans* en contacto con suero sanguíneo humano o plasma de conejo hace reacción en la producción de una pequeña prolongación filamentosa que es característica específica de *Candida albicans* durante el tiempo de dos horas, lo cual es específico para la identificación en clínica (Duarte *et al*, 2009).

### **Procedimiento**

Se suspende un inóculo de la cepa pura de *Candida albicans* con 24 horas de desarrollo en 0.5 ml de suero humano en un tubo de ensayo, se incubo a una temperatura de 35 °C por 2h y 30 min (Figura18), seguidamente se colocó 2 a 3 gotas de la suspensión en una lámina portaobjeto y cubrir con lámina cubreobjeto, se observo al microscopio con un objetivo de 40X una vez confirmada la prueba es positiva al visualizar una estructura elongada parecido a un espejo de mano proveniente de la celula levaruriforme que se origina apartir de la levadura ( Figura 19), una ves confirmada se guarda las cepas en Agar Saboraud Dextrosa.

### **Preparación de las concentraciones y controles**

- Se utilizó micropipetas automáticas de 50µl y 1000µl y se procedió a la preparación de concentraciones de canela el cual estará conformado de la siguiente manera:

**Tabla 4.** Preparaciones de concentraciones o tratamientos de aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* “canela”. Servicio de Patología Clínica del Hospital Regional Manuel Núñez Butrón, durante los meses de noviembre 2018 a febrero 2019.

Volumen de aceite esencial de canela	Volumen de etanol 96°	Volumen final	Concentración (%)
25ul	75ul	1ml	25%
50ul	50ul	1ml	50%
75ul	25ul	1ml	75%
100ul	0.0ul	1ml	100%

A su vez cada una de estas concentraciones se les considera como tratamientos, (T1, T2, T3 y T4), respectivamente. Finalmente se preparó los controles siendo estos los siguientes:

- Fluconazol de 150 mg en 10 ml de agua destilada estéril.
- 100 ml de etanol al 96%.

Las preparaciones de los controles serán consideradas como control positivo (C+) y control negativo (C-) respectivamente.

#### **Preparación de medios de cultivo**

El medio de cultivo Agar Saboraud Dextrosa (ASD) al 2%, fue preparado según las instrucciones del fabricante repartiéndose 16 g de agar y aguas destilada a un pH de 7, seguidamente se pasó a autoclavar a una temperatura de 121°C por 2 horas luego se vertió el medio en placas Petri (100 mm x 15 mm) a razón de un espesor de 4 mm por placa. Se dejaron solidificar a temperatura ambiente por 15 minutos, se rotularon las placas en la parte posterior. Se realizó el control de calidad incubando el medio de cultivo a 37°C por 24 horas.

#### **Preparación de discos**

Se impregnaron discos de papel filtro de 6 mm de diámetro (previamente esterilizados) con una cantidad determinada para después ser embebidos con aceite de camela en las

diferentes concentraciones, también el control positivo(C+) y control negativo(C-) por un tiempo de 15 minutos.

### **Preparación del estándar Mc Farland**

Para estandarizar la densidad adecuada del inóculo fue manejado por una suspensión de sulfato de bario como estándar de turbidez (0.5 de la escala de Mc Farland). Para realizarlo se procedió de la siguiente manera: se añadió 0.5 ml de  $BaCl_2$  a 99.5 ml de  $H_2SO_4$ . Luego se observó la densidad correcta del estándar usando un espectrofotómetro; la absorbancia a 625 nm debe ser 0.03 a 0.10 para el estándar de Mc Farland. Fue distribuido de 2 – 4 ml de solución en tubos similares a los que se usan para preparar inóculos y fue guardado a temperatura ambiente al abrigo de la luz. Antes de su uso y para lograr una turbidez homogénea, se agitará vigorosamente cada estándar ((INS, 2002).

Se tomaron colonias aisladas de Agar Saboraud Dextrosa (ASD) al 2% (cultivado 24 horas antes) y se procedió a ajustar el inóculo en agua destilada, por comparación visual hasta la turbidez ( $1.5 \times 10^8$  UFC/ml) equivalente al tubo N° 0.5 en la escala de Mac Farland. El tubo conteniendo las cepas fue girado entre las manos durante 30 segundos, antes de proceder al sembrado (Figura 16).

### **Método:** difusión con discos

Fundamento: el antibiograma disco-placa consta en poner en la superficie de Agar de una placa de Petri anteriormente inoculada con el microorganismo, de tal forma que los discos de papel secante ya embebidos con los diferentes antibióticos. Seguidamente el disco impregnado de antibiótico se coloca en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde al agar. El antibiótico difunde todo a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración. Pasadas las 18-24 horas de incubación los discos estarán rodeados por una zona de inhibición (Picazo, 2000).

### **Procedimiento**

Se sumergió un hisopo estéril en la suspensión de  $1.5 \times 10^8$  UFC/ml (turbidez estándar de 0.5 de Mc Farlan), se inoculó la superficie en cada placa de Agar Saboraud Dextrosa, se dispersó en la superficie del medio con el hisopo en diferentes direcciones para asegurar

una distribución uniforme del inóculo, luego con la ayuda de una pinza estéril se colocaron los discos de papel filtro sobre la superficie del Agar con cada una de las concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100% respectivamente del aceite esencial de canela, como control positivo se utilizaron discos de fluconazol (150 mg) y como control negativo se utilizó alcohol al 96% (Figura 14). Posteriormente se incubó las placas en posición invertida a 37 °C durante 24 horas.

La interpretación de los resultados, se llevó a cabo después de las 24 horas, mediante la inspección visual de cada placa. Se midió con un vernier tomando el registro en milímetro de los halos de inhibición del crecimiento de *Candida albicans*. Para interpretar los resultados se realizó del siguiente cuadro estandarizado recomendado por el Instituto estandarizado de laboratorios clínicos (Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI) ((Cantón, 2007).

**Tabla 5.** Tabla de estandarización de los halos de inhibición (mm).

ANTIFUNGICO	CONCENTRACION	MEDIDAS DE LOS HALOS (mm)		
		R*	S- DD*	S*
Fluconazol	25ug	≤14	15-18	≥19

Se muestra las medidas establecidas de halos de inhibición en (mm), con la concentración adecuada y en comparación del antibiótico de uso comercial. Susceptible: S\*; Susceptible dependiente de dosis: S - DD\*; Resistente: R\*

#### a. Análisis estadístico

Para la comparación del efecto inhibitorio *in vitro* del aceite esencial de canela *Cinnamomum zeylanicum*, y el antibiótico Fluconazol sobre *Candida albicans*, al obtener los resultados de la investigación, se evaluó las diferencias estadísticas entre las concentraciones de aceite esencial de la canela, un control positivo (fluconazol) y el alcohol, por lo tanto, se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) de un diseño completamente al azar (DCA). Los valores se procesaron en el Software Estadístico InfoStat - Versión libre 2018 para Windows.

Para determinar las diferencias entre las concentraciones respecto a la inhibición producida en *Candida albicans*, por el efecto del aceite esencial, asimismo se realizó la

prueba de rango múltiple de Tukey para realizar esta prueba de comparación de medias entre los diferentes tratamientos, el análisis de varianza se realizó utilizando el siguiente modelo lineal aditivo:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

$Y_{ij}$  = Variable de respuesta (halo de inhibición en mm)

$\mu$  = Promedio general

$\tau_i$  = Efecto de la  $i$  – ésima concentración de aceite esencial de canela

$\varepsilon_{ij}$  = Efecto del error experimental.

Las pruebas estadísticas se evaluarán:

Si el resultado es  $p < 0.05$  las pruebas son significativas

Si el resultado es  $p > 0.05$  las pruebas no son significativas.

### **3.5.2 Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial *Cinnamomum zeylanicum* “canela”, a concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100% sobre *Candida albicans*.**

Método: dilución en placa

Fundamento. - la técnica de dilución en agar según Kirby-Bauer, se utilizó para medir cuantitativamente la actividad *in vitro* de un antimicrobiano frente a un cultivo bacteriano, estos métodos se basan en la preparación de una serie de placas con caldos o agar, respectivamente, a los cuales se les agrega el antibiótico o aceite esencial en distintas concentraciones. Seguidamente se pasa a inocular cada uno de las placas con una suspensión estandarizada del microorganismo en estudio. Las pruebas se examinan después de incubar 18 a 24 horas a 37 °C y se determina la concentración mínima inhibitoria (CMI) del antimicrobiano frente al microorganismo ensayado.

Procedimiento: Para determinar la concentración mínima inhibitoria se utilizó el método Kirby-Bauer, con un asa se recogió colonias aisladas de *Candida albicans* cultivadas anteriormente en Agar Saboraud Dextrosa. Se inoculó las cepas a una suspensión de  $1.5 \times 10^8$  UFC de la cepa de *Candida albicans* en estudio de acuerdo al estándar de Mc

Farland (Figura 16), el inóculo preparado se sembró por medio de un hisopo por estriado en las placas contenidas con Agar Saboraud Dextrosa mas aceite esencial de canela, preparados en diferentes concentraciones o dosis de aceite de canela 100%, 75%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25% y 3.125% respectivamente, paralelamente se colocó una placa control sin ninguna concentración de aceite sin tratamiento (control de crecimiento). Se procedió a la incubación por 24 horas, después de la incubación las placas se examinaron en busca del desarrollo para demostrar a que concentración mínima inhibitoria (CMI) las *Candida albicans* mostraba sensibilidad. No se utilizó pruebas estadísticas.

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

##### 4.1 Efecto inhibitorio *in vitro* de la mejor concentración inhibitoria del aceite esencial de *Cinnamomun zeylanicum* y el antibiótico fluconazol sobre *Candida albicans*.

La inhibición porcentual del aceite esencial de *Cinnamomun zeylanicum* sobre *Candida albicans*, para el control positivo (fluconazol) se tiene un valor mínimo de 25.68mm y máximo de 25.68mm, con media de 26.08 mm; para la primera concentración de aceite esencial de 25% se obtuvo un mínimo de 19.78mm y máximo de 20.72mm con media de 20.15mm; con 50% de aceite se presentó un mínimo de 20.87mm y máximo de 21.72mm con media de 21.35mm; para 75% de aceite se tiene mínimo de 23.07mm y máximo 24.35mm con media de 23.78mm; con 100% se obtuvo un mínimo de 24.6mm y máximo de 25.98mm con media de 25.17mm; la desviación estándar fue mínima de hasta 0.66 de desviación, en tanto para el control negativo (alcohol 96%) no se observó ningún tipo de crecimiento en vista que es un control negativo que no se espera que funcione o que muestra datos (Tabla 6).

**Tabla 6.** Inhibición antifúngico *in vitro* del aceite esencial de *Cinnamomun zeylanicum* sobre *Candida albicans*. Servicio de Patología Clínica del Hospital Regional Manuel Núñez Butrón, área de Microbiología, durante los meses de noviembre 2018 a febrero del 2019.

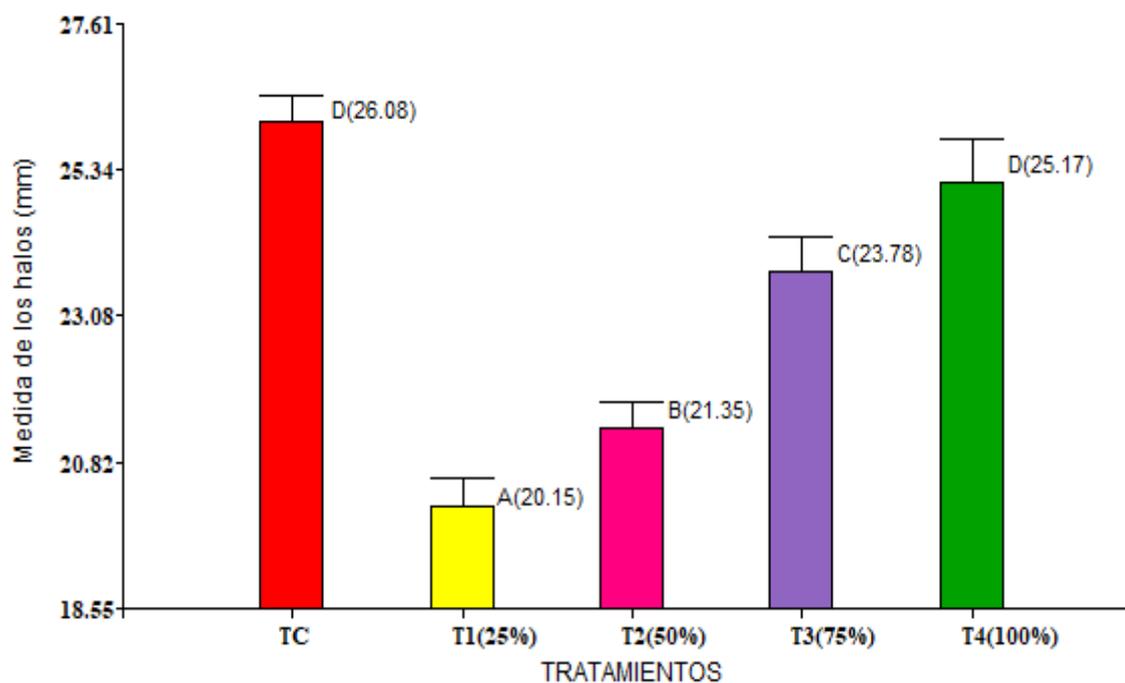
Concentración de aceite esencial (%)	Numero de repeticiones	Medida de Halos de inhibición (mm)			
		N= 5			
		Mínimo	máximo	media	D.E
25 T1	5	19.78	20.72	20.15	0.43
50 T2	5	20.87	21.72	21.35	0.4
75 T3	5	23.07	24.35	23.78	0.53
100 T4	5	24.6	25.98	25.17	0.66
<b>Control positivo (fluconazol)</b>	5	25.68	25.68	26.08	0.4
<b>Control negativo (Alcohol al 90%)</b>	5	0	0	0	0

En la (figura 7) se observa para los valores de las medias de los halos de inhibición por aplicación del aceite esencial de *Cinnamomun zeylanicum* sobre *Candida albicans*, se evidencia que el control positivo (Fluconazol) presentó una medida superior de efecto

inhibitorio (26.08mm), mientras que en la parte baja se observa el menor valor de inhibición del diámetro halos T1 (20.15mm) y una mayor inhibición T4 (25.17mm) esto ocurre al incrementar las concentraciones de aceite esencial de canela.

Para determinar la concentración inhibitoria adecuada en comparación al Fluconazol se realizó primero, la prueba estadística de análisis de varianza para poder determinar la significancia de la prueba y si al menos una de las concentraciones es diferente a los demás; que posteriormente se corroboró con la prueba de contraste de Tukey, de un total de 4 tratamientos un control positivo (fluconazol) y 5 repeticiones el valor de ( $p < 0.0001$ ) a un  $\alpha = 0.05$ , el cual estadísticamente es altamente significativo. Se demuestra que al menos uno de los tratamientos es diferente y posee efecto antimicótico del aceite esencial de *Cinnamomun zeylanicum* en las cepas de *Candida albicans*.

Teniendo en cuenta la alta significancia de la prueba de análisis de varianza, se procedió a realizar la prueba de contraste de Tukey para determinar la concentración inhibitoria adecuada en comparación al Fluconazol. La prueba de comparación de medias de Tukey a un nivel de significancia del 0.05, muestra que el tratamiento T1 (20.15mm) presenta diferencia estadística significativa respecto a los tratamientos T2 con (21.35mm); T3 con (23.78mm), T4 con (25.17mm) y el TC (26.08mm), de igual manera los tratamientos T2 y T3 muestran diferencia estadística frente a todos los demás tratamientos, mientras que tratamiento T4 y TC no presentan diferencia estadística significativa entre ambas. De otro lado, se sabe que el fluconazol inhibe de forma selectiva la enzima  $14\alpha$  esterol demetilasa en la síntesis del ergosterol, que es dependiente del citocromo p450. La depleción del ergosterol, en conjunto con la acumulación de compuestos intermedios en la síntesis del mismo, conlleva a una pérdida de la funcionalidad de la membrana plasmática Vaca (2017).



**Figura 7.** Comparación de los tratamientos a diferentes concentraciones del aceite esencial de canela, durante el mes de febrero, 2019

La bibliografía refiere que, si existe efecto antimicótico del aceite esencial de *Cinnamomun zeylanicum* en las cepas de *Cándida*, además la concentración inhibitoria adecuada varía de acuerdo a las concentraciones, mas no deja de mostrar su actividad tal como lo manifiestan y confirman las siguientes investigaciones.

Aizaga (2017) en su trabajo de investigación nos indica que el aceite esencial de canela sobre *Candida albicans* al 100% presenta una mayor inhibición en comparación con las otras tres concentraciones con un halo de inhibición promedio de 24.06 mm. Donde también se puede corroborar esta información en el trabajo de Aguilar (2016), ya que realizó su trabajo similar, encontrando resultados muy favorables donde nos indica que el aceite de canela es sumamente sensible a todas las concentraciones que trabajo como 25%, 50%, 75% y 100% además, de tal forma que a mayor concentración habrá mayor efecto inhibitorio sobre *Candida albicans*, además 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, en tanto Marca (2013) afirma que a mayor concentración de aceite esencial de canela habrá mayor efecto inhibitorio frente a las cepas de *Candida albicans*, por ultimo Herrera (2019), manifiesta de la misma forma que a una concentración de aceite esencial de canela al 100% presenta mayor efecto inhibitorio con un promedio de 31.5 mm además que el halo de inhibición va directamente

proporcional con la cantidad de concentración de aceite esencial de canela. De tal forma que estos resultados son similares a las que se obtuvo en nuestro trabajo de investigación demostrando que al 100% existe mayor efecto antifúngico con una medida de halo de inhibición 25.17mm. estos resultados nos permiten asumir que gracias a los compuestos químicos del aceite esencial, como son el aldehído cinámico, euglenol, safrol linalol, todos estos compuestos pasan a través de la pared celular y la membrana citoplasmática, desordenan las diferentes capas de polisacáridos, ácidos grasos y fosfolípidos, aumentando la permeabilidad de los hongos por la pérdida de iones y reducción del potencial de membrana y así colapsando la bomba de protones y reduciendo la cantidad de adenosintrifosfato, dando como resultado el estrés oxidativo y fallas bioenergéticas, de tal forma que la permeabilización fuera y dentro de la membrana de la mitocondria pueda causar muerte por apoptosis y por necrosis. Además Aguilar (2018) nos dice que hay otros factores que pueden actuar frente a lisis de un hongo, estas diferencias se puede atribuir a la época de recolección, lugar de procedencia, contenido de humedad y otros cambios genéticos que presenta la canela.

Vaca (2017) en su trabajo de investigación nos demuestra que obtuvo mayor medida de los halos de inhibición a diferentes concentraciones 100%, 75% 50% y 25% las cuales fueron para el 100% (48.4mm), 75% (48.6mm), 50% (46.4mm), y por ultimo 25% (47.1mm). A diferencia de las concentraciones de aceite de canela que se obtuvo en la investigación que se realizó las cuales fueron para el 100% (25.17mm), 75% (23.78 mm), 50% (21.35 mm) y para el 25% (20.15mm) En tanto Hurtado (2019) obtuvo resultados similares a las que se presenta en la investigación donde sus medidas de sus halos de inhibición a las 24 horas fueron de 100% (22.1mm), 75% (20.0), 50% (19 mm) y al 25% (17mm) mas no a las 48 horas ya que tuvo mayor medida de halo de inhibición las cuales fueron 100% (31mm), 75% (27mm), 50% (27mm) y 25% (22mm), finalmente Cribillero, (2019) obtuvo las medidas de su halos de inhibición menores a las que se presenta en esta investigación donde las concentraciones que utilizó fue de la siguiente manera, concentración (0.02g/ml) para cada tratamiento donde las medidas de los halos fueron 11mm, 9mm, 10mm, 10 mm, y 9 mm ya que utilizo crema elaborada a base de aceite esencial de canela agregado diferentes componentes lo que hace que el efecto sea menor la inhibición. Por lo tanto Marca (2013) nos dice que el efecto inhibitorio se debe al mecanismo de acción que tiene el aceite esencial gracias a los compuestos, lo que hace generar cambios irreversibles en la membrana del hongo, principalmente bloqueando la

síntesis de esteroides y la actividad de la ATPasa, condicionando de sobremanera su futura supervivencia. Esta actividad sobre la ATPasa produce acidificación intracelular y muerte del hongo.

Por otra parte Luis (2017) en su investigación realizó trabajos similares en bacterias como *Streptococcus mutans* frente al aceite esencial de canela donde la actividad antibacteriana de la canela (*Cinnamomum zeylanicum*) al 100% sobre cepas de *Streptococcus mutans*, a las 72 y 120 horas fueron de  $36.22 \pm 5.6$  mm para ambas mediciones, donde la actividad antibacteriana sobre bacterias Gram positivas es efectiva. De tal manera que García (2016) determinó el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* "Canela" frente a *Fusobacterium nucleatum*, donde nos demuestra que el aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* en todas las concentraciones evaluadas es efectiva, observa que a mayor concentración hubo mayor efecto antibacteriano. Además Terán (2016) también nos indica en su trabajo de investigación que al 100% de aceite esencial de canela es sensible sobre bacterias *Enterococcus faecalis* con una medida del halo de inhibición de 12.20mm. Por último Sánchez (2017), en su trabajo de investigación determinó la sensibilidad de *Staphylococcus aureus* frente al aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* en todas las concentraciones evaluadas 50%, 75% y 100% siendo el de mayor promedio de halo de inhibición a la concentración, observándose que a mayor concentración hubo mayor efecto antibacteriano.

Por otro lado, la aplicación de aceites esenciales de diferentes especies de plantas como *Mintostachys mollis* muña, tienen un efecto inhibitorio sobre el desarrollo de microorganismos. En su estudio Salas (2017) nos demuestra que a una mayor concentración de aceite de muña habrá mayor efecto antifúngico, demostrando que la concentración inhibitoria adecuada es de 1ml/250 $\mu$ l (T6) donde la media fue más alta que los demás, haciendo que esta concentración (tratamiento), sea la adecuada con una medida de halo 29.2mm, señalando su alta eficacia antifúngica sobre las cepas de *Candida albicans*. De igual forma Alcalá (2011) también nos indica que el aceite esencial de las hojas de *Mintostachys mollis* muña al 100% tuvo mayor efecto antifúngico contra *Candida albicans* comparado con el fluconazol. Por último Zuni (2017) nos demuestra que en su trabajo de investigación que al utilizar aceite de menta también tiene efecto antibacteriano ya que a mayor concentración de aceite habrá mayor efecto inhibitorio.

#### **4.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial *Cinnamomum zeylanicum* “canela”, a concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100% sobre *Candida albicans*.**

Para determinar los rangos de concentración de la actividad antifúngica del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* canela. Las concentraciones empleadas fueron: 25 %, 50 % 75% y 100% determinándose que la concentración mínima inhibitoria se encontraba por debajo de las concentraciones referidos de tal forma que se establecieron nuevas concentraciones de evaluación a rangos de 12.5%, 6.25% y 3.125% de aceite esencial. Al obtener los resultados del desarrollo de *Candida albicans* frente a las diferentes concentraciones de aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* canela. Nos indica que la concentración mínima inhibitoria en todos los bioensayos fue de 25 % de tal manera evidenciando la ausencia de crecimiento fúngico. Los resultados de las repeticiones se observan que en el rango de concentración del aceite de 12.5 hasta 3.125% presentó crecimiento de *Candida albicans* (+), mientras que en las demás diluciones de 25 % hasta 100 % se observa la inhibición del crecimiento de *Candida albicans* (Tabla 7).

El aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* canela a mayor concentración es una sustancia inhibitoria frente a *Candida albicans*, donde se ha demostrado en la presente investigación, estableciendo que a una dilución de 100 % es más efectiva, en tanto que en la concentración de 3.125% es insuficiente, debido a que prácticamente no ejerció ningún efecto inhibitorio sobre *Candida albicans*.

**Tabla 7.** Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial *Cinnamomum zeylanicum* “canela” a diferentes concentraciones. Servicio de Patología Clínica del Hospital Regional Manuel Núñez Butrón, durante el mes de enero a febrero 2019.

Concentración del aceite esencial (%)	Crecimiento de <i>Candida albicans</i>				Concentración mínima inhibitoria (CMI)
	Repeticiones				
	R1	R2	R3	R4	
3.125	+	+	+	+	
6.25	+	+	+	+	
12.5	+	+	+	+	
25	-	-	-	-	25%
50	-	-	-	-	
75	-	-	-	-	
100	-	-	-	-	

Dónde: (+) con crecimiento, (-) sin crecimiento.

Vaca (2017) en su trabajo de investigación nos indica que las concentraciones mínimas inhibitorias según UFC para *Candida albicans*, no se observó crecimiento alguno a las concentraciones de 25%, 50%, 75%, 100%, de tal forma que en muestra investigación también se observó resultados similares, donde se obtuvo la concentración mínima inhibitoria al 25% ya que a esta concentración no hay crecimiento fúngico, este resultado se debe a que se trabajó con el mismo método de destilación por arrastre de vapor de agua para la extracción del aceite esencial de canela. Por otra parte Marca (2013) utilizó 15 tratamientos de las cuales encontró la CMI en el tratamiento N°12, donde la concentración fue de 0.01895mg, además nos afirmó que no hay crecimiento fúngico, esta diferencia fúngica podría deberse a la diferencia de concentración fotoquímica así como el aldehído cinámico, euglenol, safrol, linalol que presenta el aceite de canela y también el método de extracción ya que utilizó concentraciones menores a comparación del trabajo de investigación que se está presentando. Por otra parte Sanches & Luján (2013) en su trabajo de investigación nos indica que para hallar la concentración mínima inhibitorio (CMI) del aceite esencial y extracto acuoso de canela en *Candida albicans*, donde utilizó 1mg/ml obteniendo una media de 0.17UFC/ml, lo que indica que estas diferencias entre los resultados podría deberse a que el extracto de aceite fue preparado a

partir de hojas de la canela mas no de la corteza, lo que indicaría que en la corteza de canela se encuentra mayor cantidad de compuestos fitoquímicos.

Estudios realizados por Aizaga (2017) nos indica que en su trabajo de investigación para hallar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de aceite esencial de canela frente a *Candida albicans* utilizó nueve concentraciones del 100% donde las concentraciones fueron de 0.50mg/ml; 0.55 mg/ml; 0.60 mg/ml; 0.65 mg/ml; 0.70 mg/ml; 0.75 mg/ml; 0.80 mg/ml; 0.85mg/ml y 90mg/ml donde afirma que a la concentración de 0.85 mg/ml hay ausencia de crecimiento de colonias de *Candida albicans* que corresponde a la (CMI). Por otra parte Marca (2013) nos dice que utilizó diferentes concentraciones al anterior trabajo mencionado, donde sus concentraciones fueron de 0.001579166667 mg/ml hasta 0.0236875 mg/ml donde se observa que hasta la concentración 0.017370830 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 y por lo tanto en la concentración es 0.01895 mg/ml es el CMI, ya que fue el primer tratamiento donde ya no hubo crecimiento micótico. Por último Zuni (2017) nos indica que para hallar la concentración mínima inhibitoria (CMI) utilizó aceite esencial de menta (*Menta piperita L.*) en *Candida albicans* donde obtuvo resultados positivos ya que al utilizar concentraciones de 0.01%, 0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.4%, 0.5%, 1%, 2.5%, 5%, 10%, 20% y 30%, encontró la (CMI) a partir del 2.5% donde se observó que no había crecimiento micótico.

## V. CONCLUSIONES

El mejor efecto inhibitorio *in vitro* del aceite esencial de canela *Cinnamomun zeylanicum* se obtuvo a una concentración del 100% (Tratamiento T4) con un halo de inhibición de 25.17 mm, el cual presenta diferencia estadística significativa frente a los demás tratamientos con menores concentraciones. Asimismo, no presenta diferencia estadística significativa frente al control con antimicótico “fluconazol”, el cual obtuvo un halo de inhibición de 26.08 mm.

Para la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* “canela”, a concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100% sobre *Candida albicans*. Es del 25% de aceite esencial de canela, que sería la menor concentración con la que ya se produce el efecto inhibitorio ya que no se observa crecimiento fúngico.

## VI. RECOMENDACIONES

Realizar investigaciones comprobando la actividad antimicótica del aceite esencial de *Cinnamomun zeylanicum* canela frente a diferentes fármacos de interés terapéutico, en el tratamiento de afecciones por causa de Candidiasis.

Continuar con el estudio del aceite esencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) debido a su actividad antifúngico frente al crecimiento de *Candida albicans*, con ensayos en pacientes; en estudio “*in vivo*”.

Continuar con las investigaciones de productos antifúngicos presentes en aceites esenciales de diversas plantas, con el propósito de promover la investigación de tratamientos a partir de productos naturales.

Elaborar diferentes formas farmacéuticas de acuerdo a la vía de administración utilizando aceite esencial de *Cinnamomun zeylanicum* (canela) para realizar ensayos clínicos en pacientes con dermatosis por *Candida albicans*.

Realizar más estudios del aceite esencial de canela para poderlo utilizar en un futuro en una actividad clínica como posible tratamiento.

## VII. REFERENCIAS

- Aguilar, K. (2016). Efecto sinérgico antifúngico del aceite esencial de la canela *Cinnamomum verum* solo y acompañado con ketoconazol en cepas de *Candida albicans*. estudio *in vitro*. Tesis para optar el Título Profesional de Médico Cirujano de la Facultad de Ciencias Médicas. UCV, 52pp.
- Aguilar, M. (2018). Análisis de rendimiento de las hojas de *Cinnamomum zeylanicum* canela en la extracción de aceite esencial por arrastre con vapor, provenientes de dos zonas de Ucayali. Tesis para optar el Título Profesional de Ingeniero Forestal de la Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales. UNU, 70pp.
- Aizaga, S. (2017). Efecto antifúngico del aceite esencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) al 25%, 50%, 75% y 100% sobre *Candida albicans* ATCC® 10231<sup>tm</sup>. Tesis para optar el Título de Odontología de la Facultad de Odontología, UCE-Ecuador. 123pp:  
<http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/11016/1/T-UCE-0015-688.pdf>
- Albarracín, G., & Gallo, S. (2003). Comparación de dos métodos de extracción de aceite esencial utilizando *Piper aduncum* (cordoncillo) procedente de la zona cafetera. Tesis para optar el Título de Ingeniero Químico de la Facultad de Ingeniería Química, Colombia. 115pp.
- Alcala, K., Alvarado, A., Alejandro, L., & Huayané, E (2011). Actividad antimicótica del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña) comparado con el fluconazol en cultivo de *Candida albicans*. *CIMEL Ciencia e Investigación Médica Estudiantil Latinoamericana*, 16(2), 83–86:  
<http://www.redalyc.org/html/717/71723601004/>
- Anaya, R. (2018). Efecto antibacteriano del aceite esencial de *Aloysia triphylla* “cedrón” sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 comparado con oxacilina. Tesis para optar el Título Profesional de Médico Cirujano de la Facultad de Ciencias Médicas. UCV. Tujillo- Perú, 53pp.
- Biasoli, M. (2014). Candidiasis. *Centro de Referencia de Micología*, 2(1), 1–31.
- Cabanillas, D. (2016). Eficacia antimicótica del extracto acuoso de *Cymbopogon citratus* “Hierba luisa” comparada con Clotrimazol, sobre *Candida albicans*. Estudio *in vitro*. Tesis para optar el Título Profesional de Médico Cirujano de La Facultad de

- Ciencias Médicas.UCV,Truillo- Perú, 45pp.
- Cañedo, V., & Ames, T. (2004). Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos. Centro Internacional del Papa (CIP). Lima, Perú, 62pp
- Cantón, E., Martín, E., & Espinel, A., (2007). Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A). Revista Iberoamericana de Micología.
- Cardenas, J. (2013). Evaluación del contenido de l-mentol, l-mentona y l-acetato de mentilo en el aceite esencial de *Mentha piperita l*. Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Farmacéuticas.UCVM, Arequipa- Perú, 143pp.
- Castillo, A & Valverde, F. (2018). Diferenciación de *Candida albicans* de *Candida dubliniensis* en agar tabaco, preparado con el tabaco de tres marcas de cigarrillos. Tesis para optar el Título Profesional de Tecnología médica de la Facultad de Ciencias de la Salud.UNW.Lima - Perú,76pp.
- Castillo, K (2011). Efecto de la inhibición de crecimiento de microorganismos lácticos mediante el empleo de canela, cilantro y oligosacáridos de quitosán. Tesis para optar el Título Profesional de Ingeniero Agrónomo Zootecnista,UAAAN-México, 65pp.
- Cava, R. (2013). Efecto Antimicrobiano de Vainilla y de Aceites Esenciales de Canela y Clavo en Leche de Vaca Pasteurizada. Tesis para optar el Título Profesional de Doctor en Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología. UMU, 226pp.
- Charri, K., & Huamán, C. (2017). Actividad del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* “ Canela ” frente a biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* inducidas *in vitro* sobre lentes de contacto blandos. Tesis para optar Título Profesional de Químico Farmacéutico de la Facultad de Farmacia y Bioquímica.UNMSM. Lima,104 pp.
- Contreras, V. (2010). Implementación a nivel laboratorio de una unidad de extracción de volátiles por radiación de microondas. Departamento de Ingenierías Químicas y Bioquímica.
- Cribillero, R. (2019). Actividad antimicótica *in vitro* de una crema elaborada a base del aceite esencial *Cinnamomum zeylanicum* “canela” frente a *Candida albicans*. Tesis

- para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico de la Facultad de Ciencias de la Salud. ULADECH,Chimbote- Perú, 45 pp.
- De la Calle, N., Santa, C., & Cardona, N. (2012). Factores de virulencia para la infección de tejidos queratinizados por *Candida albicans* y hongos dermatofitos. Revista CES Medicina Vol 26, N°1.43–55. Medellín - Colombia  
<https://doi.org/10.7818/ECOS.2014.23-2.11>.
- De Bedout *et al.* (2003). Evaluación de la susceptibilidad de especies de *Candida* al fluconazol por el método de difusión de disco. Biomedica Vol 23,N°1.31-37. Bogotá- Colombia.
- Duarte, A., Máquez, A., Arauju, C., & Pérez, C. (2009). Comunicación corta Modalidades de la Prueba del Tubo Germinal. Revista de la sociedad Venezolana de Microbiología Vol 29,N° 1.66-68.Caracas-Venezuela.
- Flores, M. (2010). Investigación de los Aceites Esenciales, sus Características y Finalidad de Uso. Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmaceuticas.Universidad de Chile. Santiago de Chile, 88 pp.
- García, K. (2016). Efecto antibacteriano *in vitro* del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* (canela) sobre el *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586. Tesis para Optar el grado de Magíster en Estomatología de la Facultad de posgrado Maestría en Estomatología. UNT. Trujillo, 79pp.
- García, S. (2015). Efecto antibacteriano *in vitro* del aceite esencial de *Pelargonium hortorum* sobre la cepas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Staphylococcus aureus* ATCC25923. Tesis para optar el Título Profesional de Médico Cirujano de la Facultad de Medicina Humana. UPAO.Trujillo,45pp.
- Garza, E. (2012). Caracterización taxonómica y molecular de *Candida spp.* en aislados clínicos de origen bucal en pacientes sanos y diabéticos de nuevo león. Tesis para optar el grado de Magíster en Ciencias con acentuacion en Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas. UANL. México,116pp.
- Gigante, A. (2015). Potencial de los aceites comerciales de Canela *Cinnamomum zeylanicum* y Laurel *Laurus nobilis* en el control de *Fusarium oxysporum*.Tesis para optar el Título Profecional de Ingeniería Agroalimentaria y del Medio Rural de la

- escuela técnica de superiores de Ingeniería Agronómica del Medio Natural. UPV. Valencia, 50pp.
- González, M. (2010). Conservación de mora, uvilla y frutilla mediante la utilización del aceite esencial de canela *Cinnamomum zeylanicum*. Tesis para optar el Título Profesional de Bioquímico Farmacéutico de la Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba-Ecuador, 165pp.
- Gubelin, W. De la parra, R. & Giesen, L. (2011). Micosis superficiales, Revista Médica Clínica las Condes. 22(6), 804–812.
- Herrera, N. (2011). Evaluación de aceites esenciales de canela y de nuez moscada en un recubrimiento comestible para la conservación de frutos de mora de castilla *Rubus glaucus benth.* Tesis para optar el Título Profesional de Ingeniería de Alimentos de la Facultad de Ingeniería. La Salle. Bogotá, 99pp.
- Herrera, C. (2019). Efecto antifúngico del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* sobre *Candida albicans ATCC 10231*, comparado con fluconazol, 25 ug, estudio *in vitro*. Tesis para optar el Título Profesional de Médico Cirujano de la Facultad de Ciencias Biomédicas. UCV. Trujillo- Perú, 63pp.
- Huayta, D., & Paco, D. (2015). Efecto de la ingesta de canela *Cinnamomum zeylanicum* sobre el nivel de glucosa sérica en pacientes con Diabetes Mellitus tipo II del Hospital José Agurto Tello, Chosica. Tesis para optar el Título Profesional en Nutrición Humana de la Facultad de Ciencias de la Salud. UPU. Lima, 86pp.
- Hurtado, R. (2019). Efectividad antifúngica *in vitro* del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* (canela) versus nistatina sobre cepa de *Candida albicans ATCC*. Tesis para optar Título Profesional de Cirujano Dentista de la Facultad de Odontología. UNFV, Lima - Perú, 60pp.
- INS. (2002). Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Serie de Normas Técnicas N° 30 (Vol. 32). <https://doi.org/1-56238-525-5>.
- Jácome, J. (2019). Evaluación del efecto bactericida de aceites esenciales de canela *Cinnamomum verum*, jengibre *Zingiber officinale* y clavo de olor *Syzygium aromaticum* para aplicaciones agroindustriales. Tesis para optar el Título Profesional de Ingeniero Agroindustrial de Alimentos de la Facultad de Ingeniería y Ciencias

Aplicadas.

- Laforet, L. (2010). Estudio de pga 26, una proteína implicada en la arquitectura de la pared celular de *Candida albicans*. Tesis para optar del grado de Doctor de la Facultad de Farmacia. UV. Valencia, 200pp.
- Lagunas, R. (2012). Las plantas medicinales y aromáticas del huerto biointensivo, facultad de agronomía. Tesis para optar el Título de ingeniera Agronoma Fitotecnista de la Facultad de Agronomía. UASLP. San Luis de Potosí-México, 47pp.
- López, J. (2015). Efecto de la concentración de aceite esencial de canela *Cinnamomum zeylanicum blume* en la cobertura comestible y el tiempo de almacenamiento sobre las características fisicoquímicas y microbiológicas en ciruelas *Spondias purpurea*. Tesis para optar el Título Profesional de Ingeniero Agroindustrial de la Facultad de Ingeniería. UCV. Trujillo, 71pp.
- López, M. (2004). Los aceites esenciales. Ambito Farmaceutico Fitoterapia. N°7 (Vol 23) 88-91.
- Luis, A. (2017). Actividad antibacteriana del aceite esencial de canela *Cinnamomum zeylanicum* en comparación a la clorhexidina al 0.12% sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Tesis para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista de la Facultad de Ciencias de la Salud. UNW. Lima, 89pp.
- Marca, M. (2013). Actividad antimicótica *in vitro* del aceite esencial *Cinnamomum zeylanicum breyn* canela frente a *Candida albicans* ATCC 6538. Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico de la Facultad de Ciencias de la Salud. UNJNB, Tacna, 142pp.
- Mendoza, S. (2016). Efecto antimicrobiano del extracto oleoso de *Cinnamomum zeylanicum* canela sobre cepas de *Pseudomonas aeruginosa* comparado con Ceftazidima, estudio *in vitro*. Tesis para optar el Título Profesional de Médico Cirujano de la Facultad de Ciencias Médicas. UCV. Trujillo, 42pp.
- MINSA. (2007). Manual de procedimientos y Técnicas de Laboratorio para la Identificación de los Principales Hongos Oportunistas Causantes de Micosis Humana. Ministerio de Asistencia Pública de Salud y Asistencia Social.
- MINSA. (2014). Diagnóstico y tratamiento de la infección vaginal en obstetricia. Guía de

Practica Clinica (GPC).

- Montoya, G. (2010). Aceites senciales una alternativa de diversificación para el eje cafetero. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UNAL. 117pp.
- Olea, D. (1995). Presencia de *Candida albicans* y su relación con los valores de CD4+ en pacientes con infección por VIH. Tesis Doctoral de la facultad de Medicina. Universidad de Granada, 122pp.
- Olivas, E. (2012). Manual de Practicas. Laborarotio de Morena, programa de biología. Universidad Autónoma de Ciudad de Juárez, 64pp.
- Padrón, B. (2010). Componentes químicos con actividad bactericida, fungicida y citotóxica de plantas de la familia myrtaceae y lauraceae. Tesis para optar el grado de Doctor en Ciencias con Acentuación en Química de Productos Naturales de la Facultad de Biología. UANL. México, 98pp.
- Pérez, J. (2016). Efecto del agente antimicrobiano del aceite esencial de canela y aceite esencial de limón en la cobertura comestible y el tiempo de almacenamiento sobre las características fisicoquímicas, recuento de mohos y levaduras y aceptabilidad general en rodajas de banano *Musa paradisiáca*. Tesis para optar el Título Profesional de Ingeniería de Industrias Alimentarias de la Facultad de Ciencias Agrarias. UPAO, Trujillo, 129pp.
- Picazo, J. (2000). Procedimientos en Microbiología Clínica. Metodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicribianos. Procedimientos en Microbiología. 54 pp.
- Revelo, J. (2017). Evaluación del efecto antimicrobiano del aceite de canela *Cinnamomun zeylanicum* sobre cepas de salmonella. Tesis para optar el Título Profesional de Médico Veterinario Zootecnista de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, UTA-Ecuador, 63pp.
- Romero, C., Zamudio, P., & Bello, L. (2011). Antimicrobianos en películas de almidón oxidado de plátano: efecto sobre la actividad antibacteriana, microestructura, propiedades mecánicas y de barrera, Revista Mexicana de Ingeniería Química. Vol 10. N° 3. 445–453. Cuauhtémoc-Chihuahua-México.
- Rubio, M. (2017). Evaluación del efecto antimicrobiano de los aceites esenciales de orégano y canela en el pan integral. Tesis para optar el Título Profesional de

- Ingeniero Agroindustrial y de Alimentos de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agropecuarias. UDLA-Ecuador. 72 pp.
- Ryan K., George, C . (2012). Microbiología Médica Sherris. 2da Edición. Editorial McGrawHill.Mexico.783pp.
- Salas, A. (2017). Efecto antimicótico del aceite esencial de *Minthostachys mollis* muña en cepas de *Candida albicans*. Tesis para optar el Título Profesional Licenciado en Biología de la facultad de Ciencias Biológicas. UNA, Puno, 62pp.
- Sánchez, C., & Luján, M. (2013). Efecto antimicrobiano del aceite esencial y del extracto acuoso de canela *Cinnamomum zeylanicum* sobre *Candida albicans* y *Streptococcus mutans*. *Sciendo*, 16(1), 68–78.
- Sánchez, C. (2017). Efecto antibacteriano *in vitro* del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente. Tesis para optar el Título Profesional de Médico Cirujano de la Facultad de Medicina Humana. UPAO-Trujillo. 75 pp.
- Sánchez, L. (2013). Determinación de compuestos funcionales en Canela *Cinnamomum zeylanicum*. Tesis para optar el Título Profesional de Ingeniero Bioquímico. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. IPN, México, 59pp.
- SENA. (2012). Introducción a la Industria de los Aceites Esenciales extraídos de Plantas Medicinales y Aromáticas. Servicio Nacional de Aprendizaje, 33pp.
- Silva, B., Ortega, L., Gonzales, A., Olivas, I., & Ayala, J. (2013). Protección antifúngica y enriquecimiento antioxidante de fresa con aceite esencial de hoja de canela Vol 36.Nº3. 217–224. México.
- Stashenko, E. (2009). *Aceites Esenciales*. Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales - CENIVAM. 180pp.
- Teran, G. (2016). Comparación de la efectividad antimicrobiana entre aceite esencial de canela y clorhexidina frente a *Enterococcus faecalis*. estudio *in vitro*. Tesis para optar el Título Profesional de Odontología de la Facultad de Odontología. UCE-Ecuador. (2016). <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/5790/1/T-UCE-0015-274.pdf>

- Torrez, J. (2012). Caracterización fisicoquímica de los aceites esenciales, obtenidos a nivel laboratorio y piloto para el control de áfidos. Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en Química Industrial de la Facultad de Tecnología. UMSA, La Paz-Bolivia, 161pp.
- Uso Industrial de Plantas Aromáticas y Medicinales. (1998), 66–75.
- Vaca, B. (2017). Efecto antimicótico de la asociación de *Cinnamomum zeylanicum* y Fluconazol sobre *Candida albicans*. Tesis para optar el Título Profesional de Medicina de la Facultad de Medicina. UNT, Trujillo- Perú, 63pp.
- Vallejos, E. (2017). Efecto antifúngico *in vitro* del extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis* “romero” contra *Candida albicans*. Tesis para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista de la Facultad de Ciencias de la Salud. USS, Pimentel, 65pp.
- Vásquez, E., & Arena, R. (2008). Micosis oportunistas en pacientes inmunocomprometidos, Gac Mec. Vol 144, N°2, 131–133. México.
- Vidal, N. (2015). Diseño de una caldera híbrida (energía solar y leña) para la obtención de aceite esencial de hierba luisa utilizando un concentrador scheffler de 8m<sup>2</sup>. Tesis para optar el Título Profesional de Ingeniero Mecánico de la Facultad de Ciencias e Ingeniería. PUCP. Lima-Perú, 100pp.
- Zuni, J. (2017). Actividad antibacteriana “*in vitro*” del aceite esencial de menta *Mentha piperita* frente a *Escherichia coli* enteropatógena EPEC. Tesis para optar el Título Profesional de licenciado en Biología de la Facultad de Ciencias Biológicas. UNA, Puno, 72pp.

## VIII. ANEXOS

## ANEXO A



**Figura 8.** Corteza de *Cinnamomum zeylanicum* (canela) adquirido en la ciudad de Juliaca, noviembre 2018.



**Figura 9.** Pesado de corteza de canela. Laboratorio de Taller de Frutas y Hortalizas, noviembre 2018.



**Figura 11.** Molido de corteza de canela en el Lab. de Taller Frutas y Hortalizas, noviembre 2018.



**Figura 10.** Extracción del aceite esencial de canela por el método de arrastre de vapor de agua. En el Lab. De Talles de Frutas y Hortalizas, noviembre 2018



**Figura 12.** Decantación del aceite de canela en el laboratorio de Taller de Frutas y Hortalizas, noviembre, 2018



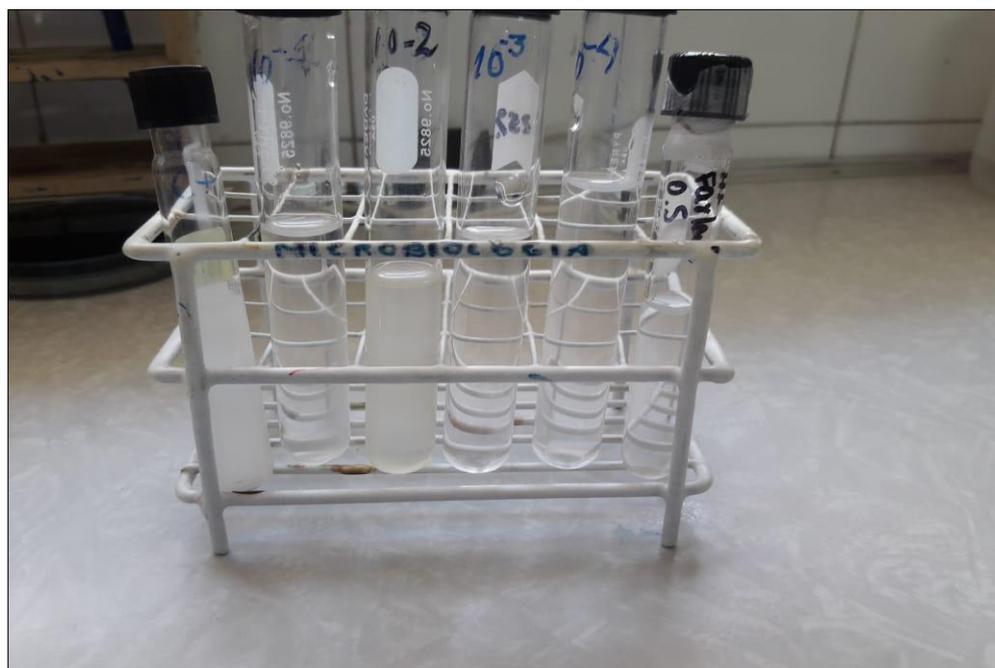
**Figura 13.** Obtención del aceite esencial de canela en el laboratorio de Taller de Frutas y Hortalizas, noviembre, 2018



**Figura 14.** Concentración de aceite esencial de canela al 100%, 75%, 50%, 25%, control positivo (fluconazol) y control negativo (alcohol), Servicio de Patología Clínica del Hospital Regional Manuel Núñez Butrón, área de microbiología, noviembre 2018 a febrero, 2019



**Figura 15.** Aislamiento de cepas de *Candida albicans*, Servicio de Patología Clínica del Hospital Regional Manuel Núñez Butrón, área de Microbiología, noviembre 2018 a febrero, 2019.



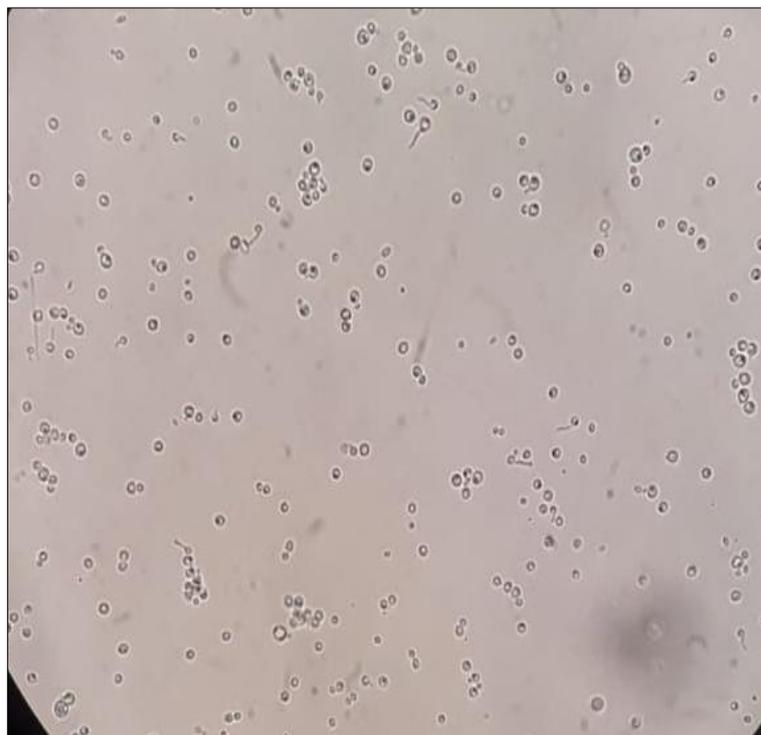
**Figura 16.** Preparación de la Escala de Mc Farland. Servicio de Patología Clínica del Hospital Regional Manuel Núñez Butrón, área de Microbiología, durante los meses de noviembre 2018 a febrero, 2019.



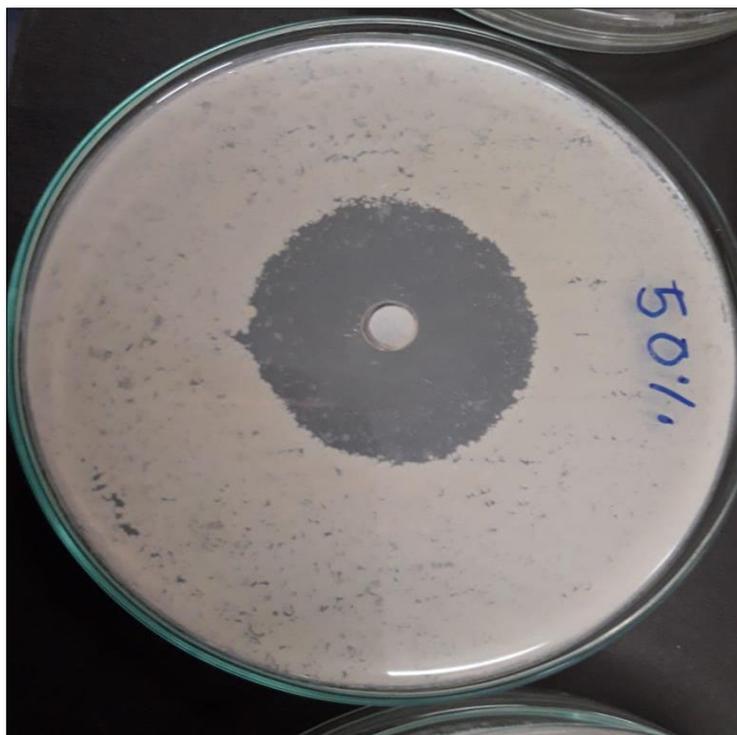
**Figura 17.** Observación de *Candida albicans* a 40x, Servicio de Patología Clínica del Hospital Regional Manuel Núñez Butrón, área de Microbiología, durante los meses de noviembre 2018 a febrero, 2019.



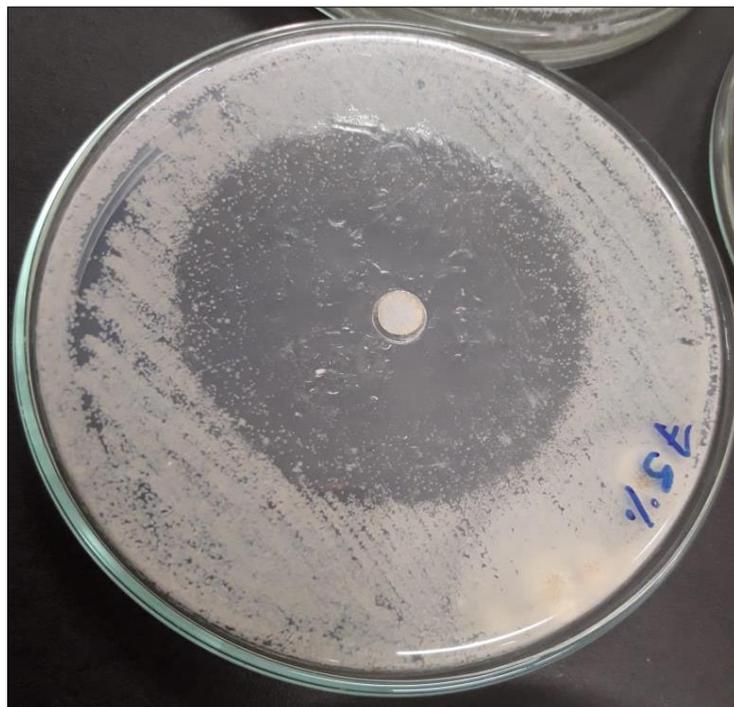
**Figura 18.** Procesamiento de muestra para el método de tubo germinativo, Servicio de Patología Clínica del Hospital Regional Manuel Núñez Butrón, área de Microbiología, durante los meses de noviembre 2018 a febrero, 2019



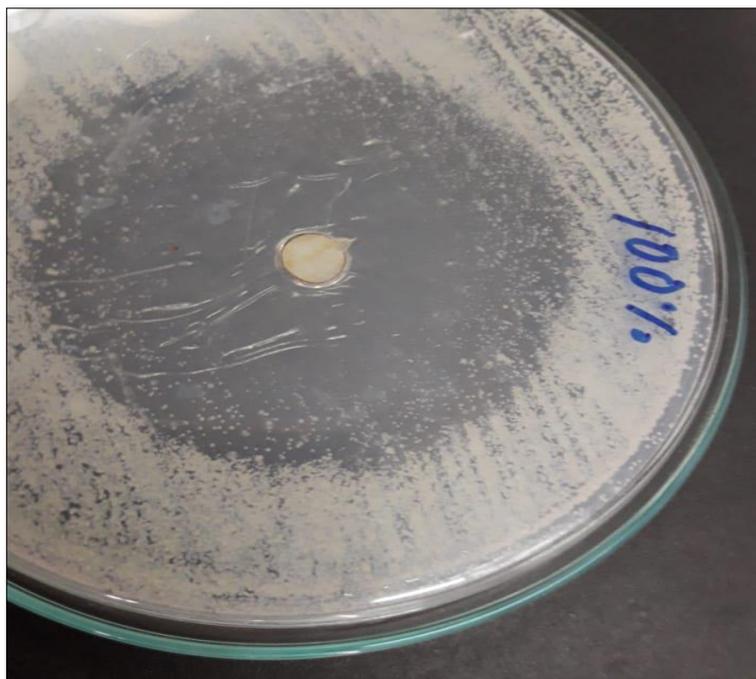
**Figura 19.** Observación al microscopio 40 x para *Candida albicans*, Servicio de Patología Clínica del Hospital Regional Manuel Núñez Butrón, área de Microbiología, durante los meses de noviembre 2018 a febrero, 2019.



**Figura 20.** Halo de inhibición a una concentración de 50%. Servicio de Patología Clínica del Hospital Regional Manuel Núñez Butrón, área de Microbiología, durante los meses de noviembre 2018 a febrero, 2019.



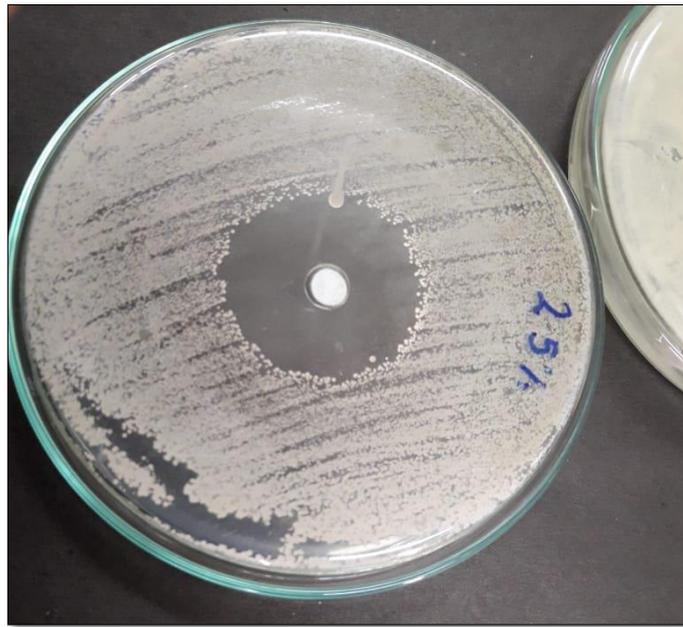
**Figura 21.** Halo de inhibición a una concentración de 75%. Servicio de Patología Clínica del Hospital Regional Manuel Núñez Butrón, área de Microbiología, durante los meses de noviembre 2018 a febrero, 2019.



**Figura 22.** Halo de inhibición a una concentración del 100%. Servicio de Patología Clínica del Hospital Regional Manuel Núñez Butrón, área de Microbiología, durante los meses de noviembre 2018 a febrero, 2019



**Figura 23.** Inoculación de cepas de *Candida albicans* en Agar Saboraud Dextrosa. Servicio de Patología Clínica del Hospital Regional Manuel Núñez Butrón, área de Microbiología, durante los meses de noviembre 2018 a febrero, 2019.



**Figura 24.** Halo de inhibición a una concentración de 25%. Servicio de Patología Clínica del Hospital Regional Manuel Núñez Butrón, área de Microbiología, durante los meses de noviembre 2018 a febrero, 2019



**Figura 25.** Control negativo (alcohol). Servicio de Patología Clínica del Hospital Regional Manuel Núñez Butrón, área de Microbiología, durante los meses de noviembre 2018 a febrero, 2019.



**Figura 26.** Control positivo (fluconazol). Servicio de Patología Clínica del Hospital Regional Manuel Núñez Butrón, área de Microbiología, durante los meses de noviembre 2018 a febrero, 2019.



PERÚ

Ministerio  
de SaludHOSPITAL REGIONAL MANUEL NUÑEZ BUTRON  
AV. EL SOL N°1022

DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA CLÍNICA Y ANATOMÍA PATOLÓGICA

**"Año de la lucha contra la corrupción e impunidad"****CONSTANCIA****El Jefe del Departamento de Patología Clínica y Anatomía Patológica del Hospital Regional "Manuel Núñez Butrón" de Puno.****HACE CONSTAR:**

Que la Srta. Olinda HUARACHA YUCRA, bachiller la Facultad en Ciencias Biológicas de la UNA Puno ha realizado su trabajo de Investigación en el Servicio de Patología Clínica del Hospital Regional "MNB" de Puno: "Efecto Antimicótico In Vitro Del Aceite Esencial De Cinnamomum Zeylanicum Canela. Desde el 05 de Noviembre 2018 al 12 de Febrero del 2019. En el área de microbiología.

Se expide el presente a solicitud personal para fines administrativos que crea por conveniente.

Puno, 19 de Junio del 2019

Atentamente

  
Dr. Francisco A. Lajo Solo  
Patólogo Clínico y Anatomía Patólogo  
JEFE DE DEPARTAMENTO  
CMP. 19965 RNE. 13738