

UNIVERSIDAD PRIVADA DE TACNA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE ODONTOLOGÍA



**“EFECTO ANTIMICROBIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE
Cinnamomum zeylanicum Breyn Y *Origanum vulgare* L.
FRENTE A *Enterococcus faecalis* Y *Candida albicans*.
ESTUDIO IN VITRO. 2019”**

TESIS:

Presentada por:

Bach. Milder Raquel Layme Huanca

Asesor: Mag.C.D. Esp. Marco Sánchez Tito

Para Optar el Título Profesional de:

Cirujano Dentista

TACNA – PERÚ

2019

AGRADECIMIENTOS

A Dios por su protección y fortaleza para poder superar cada prueba.

A mis padres por ser el pilar más importante en mi vida y por darme la oportunidad de lograr mis objetivos, porque a pesar de la distancia siempre están apoyándome en cada momento.

A mi Asesor Marco Sánchez Pinto valiosa asesoría y consejos brindados en la realización del presente trabajo.

A mi coasesora Rina alvarez Becerra por su tiempo brindado en la preparación y realización del presente trabajo,

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

DEDICATORIA

A mi madre por su infinito amor y protección, compañera incondicional durante todo este camino, por su constante apoyo, por haberme ayudado durante estos años,

A mi Padre por su apoyo y consejos, aprendí a tener esa fortaleza de las innumerables charlas que me diste de que los retos se podían superar con esfuerzo y dedicación.

Con mucho cariño a mi familia quienes con sus consejos y apoyo incondicional me han enseñado a nunca rendirme en las metas propuestas.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	ii
DEDICATORIA	iii
ABSTRACT	xii
INTRODUCCIÓN	13
CAPÍTULO I: EL PROBLEMA	16
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	17
1.2.1. Interrogante principal	17
1.2.2. Interrogantes secundarias	18
1.3. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	19
1.4 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	20
1.4.1 Objetivo general	20
1.4.2 Objetivos específicos	20
CAPÍTULO II	22
MARCO TEÓRICO	22
2.1 ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN	22
2.2 BASES TEÓRICAS	29
3.1 HIPÓTESIS	36
3.1.1 Hipótesis general	36
3.2 VARIABLES	36
3.2.1 Identificación de la Variable Independiente	36
3.2.2 Identificación de las variables dependientes	36

Operacionalización de las variables	37
3.3. DISEÑO Y TIPO DE INVESTIGACIÓN	37
3.4. ÁMBITO Y TIEMPO SOCIAL DE LA INVESTIGACIÓN	38
3.5. POBLACIÓN Y MUESTRA	38
3.6. PROCEDIMIENTO, TÉCNICAS E INSTRUMENTOS	40
3.6.1 Procedimiento	40
CAPITULO IV	69
RESULTADOS	69
4.1 DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO DE CAMPO	69
4.2 DISEÑO DE LA PRESENTACIÓN DE LOS RESULTADOS	70
4.3 RESULTADOS	70
4.3.1. Analisis físico químico del aceite esencial de canela y orégano	71
4.3.2. Halos de inhibición	73
4.3.2. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	91
4.3.3. Concentración Mínima Bactericida y Concentración Mínima Fungicida (CMF)	97
4.5 DISCUSIÓN	109
CAPÍTULO V	114
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	114
5.1 CONCLUSIONES	114
5.2 RECOMENDACIONES	116
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117
ANEXOS	127

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentraciones del aceite esencial <i>Cinnamomum zeylanicum</i> Breyn en los discos para las cepas de <i>Enterococcus Faecalis</i> ATCC29212	49
Tabla 2. Concentraciones del aceite esencial <i>Cinnamomum zeylanicum</i> Breyn en los discos para las cepas de <i>Cándida albicans</i> ATCC10231	49
Tabla 3. Concentraciones del aceite esencial <i>Origanum vulgare</i> en los discos para las cepas de <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212.....	51
Tabla 4. Concentraciones del aceite esencial <i>Origanum vulgare</i> en los discos para las cepas de <i>Cándida albicans</i> ATCC10231	51
Tabla 5. Concentraciones de la asociación (<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Breyn + <i>Origanum vulgare</i>) en los discos para las cepas de <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212	53
Tabla 6. Concentraciones Asociación (<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Breyn + <i>Origanum vulgare</i>) en los discos para las cepas de <i>Cándida albicans</i> ATCC10231	53
Tabla 7. Concentración final de los tratamientos de <i>Cinnamomum zeylanicum</i> Breyn para la prueba de Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) para <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212	61
Tabla 8. Concentración final de los tratamientos de <i>Cinnamomum zeylanicum</i> Breyn para la prueba de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para <i>Candida albicans</i> ATCC10231	62
Tabla 9. Concentración final de los tratamientos de <i>Origanum vulgare</i> para la prueba de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212	62
Tabla 10. <i>Concentración final de los tratamientos de Origanum vulgare para la prueba de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para Candida albicans ATCC10231</i>	63
Tabla 11. Concentración final de la asociación <i>Origanum vulgare</i> + <i>Cinnamomum zeylanicum</i> Breyn para la prueba de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212	63

Tabla 12. Concentración final de la asociación <i>Origanum vulgare</i> + <i>Cinnamomum zeylanicum</i> Breyn para la prueba de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para <i>Candida albicans</i> ATCC10231	66
Tabla 13. Análisis físico químico del aceite esencial de canela: determinación cuantitativa de metabolitos secundarios	71
Tabla 15. Halos de inhibición (mm) por acción del aceite esencial de <i>Cinnamomum zeylanicum</i> Breyn, <i>Origanum vulgare</i> y Asociación <i>Cinnamomum zeylanicum</i> Breyn+ <i>Origanum vulgare</i> sobre <i>Candida albicans</i> ATCC10231	73
Tabla 16. Halos de inhibición (mm) por acción del aceite esencial de <i>Cinnamomum zeylanicum</i> Breyn, <i>Origanum vulgare</i> y Asociación <i>Cinnamomum zeylanicum</i> Breyn+ <i>Origanum vulgare</i> sobre <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212	74
Tabla 17. Halos de inhibición (mm) por acción del aceite esencial de <i>Cinnamomum zeylanicum</i> Breyn, <i>Origanum vulgare</i> y Asociación <i>Cinnamomum zeylanicum</i> Breyn+ <i>Origanum vulgare</i> sobre a la <i>Candida albicans</i> ATCC10231	76
Tabla 18. Resultados de la medición de los halos de inhibición (eficacia antibacteriana) del aceite del aceite esencial de <i>Cinnamomum zeylanicum</i> Breyn frente al <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212 por el método de difusión del disco (Kirby Bauer).....	78
Tabla 19. Prueba de la actividad antimicótica del aceite esencial de <i>Cinnamomum zeylanicum</i> Breyn frente <i>Candida albicans</i> ATCC10231 por el método de difusión del disco (Kirby Bauer).....	81
Tabla 20. Prueba de la actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> frente a <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212 por el método de difusión del disco (Kirby Bauer)	83
Tabla 21. Prueba de la actividad antimicótica del aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> frente <i>Candida albicans</i> ATCC10231 por el método de difusión del disco (Kirby Bauer).....	85
Tabla 22. Prueba de la actividad antibacteriana de la asociación (<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Breyn + <i>Origanum vulgare</i>) frente <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212 por el método de difusión del disco (Kirby Bauer)	87

Tabla 23. Prueba de la actividad antimicótica del Asociación de aceite esencial de Cinnamomum zeylanicum Breyn + Origanum vulgare frente Candida albicans ATCC10231 por el método de difusión del disco (Kirby Bauer).....	89
Tabla 24. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial de Cinnamomum zeylanicum Breyn (canela) para Enterococcus faecalis (mg/ml)	91
Tabla 25. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial de Cinnamomum zeylanicum Breyn (canela) para Candida albicans según concentración de aceite esencial (mg/ml)	92
Tabla 26. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial de Origanum vulgare (orégano) para Enterococcus faecalis ATCC29212 (mg/ml).....	93
Tabla 27. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial de Origanum vulgare (orégano) para Candida albicans ATCC10231 (mg/ml).....	94
Tabla 28. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de la asociación del aceite esencial de Cinnamomum zeylanicum Breyn (canela) + aceite esencial de Origanum vulgare (orégano) para Enterococcus faecalis ATCC29212 (mg/ml)	95
Tabla 29. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del Asociación aceite esencial de Cinnamomum zeylanicum Breyn (canela) + aceite esencial de Origanum vulgare (orégano) frente a Candida albicans ATCC10231 (mg/ml)	96
Tabla 30. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) del aceite esencial de Cinnamomum zeylanicum Breyn frente a Enterococcus faecalis ATCC29212	97
Tabla 31. Determinación de la Concentración mínima bactericida (CMF) del aceite esencial de Cinnamomum zeylanicum Breyn frente a Candida albicans ATCC10231	98
Tabla 32. Determinación de la Concentración mínima bactericida (CMB) del aceite esencial de Origanum vulgare (orégano) frente a Enterococcus faecalis ATCC29212	98
Tabla 33. Determinación de la Concentración mínima antifúngica (MAC) del aceite esencial de orégano a Candida albicans ATCC10231	99

Tabla 34.Determinación de la Concentración mínima bactericida (CMB) de la asociación de aceite esencial Cinnamomum zeylanicum Breyn +Origanum vulgare frente a Enterococcus faecalis ATCC29212.....	100
Tabla 35.Determinación de la Concentración mínima fungicida (CMF) de la asociación de aceite esencial Cinnamomum zeylanicum Breyn +Origanum vulgare frente a Candida albicans ATCC10231	100
Tabla 36.Prueba estadística de KS.....	102
Tabla 37.Prueba estadística de Levene para los valores del halo para Enterococcus faecalis ATCC29212.....	102
Tabla 38.ANOVA halo Enterococcus faecalis ATCC29212	103
Tabla 39.Pruebas poshoc Tukey halo Enterococcus faecalis ATCC29212	103
Tabla 40.Prueba estadística de KS Halo Candida albicans ATCC10231	105
Tabla 41.Prueba estadística de Levene para los valores del halo para Candida albicans ATCC10231	106
Tabla 42.ANOVA.....	106

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tabla de comparación para escala de Mc Farland	56
Figura 3. Media de Halos de inhibición (mm) por acción del aceite esencial de Cinnamomum zeylanicum Breyn, Origanum vulgare y Asociación Cinnamomum zeylanicum Breyn+ Origanum vulgare sobre a la Candida albicans ATCC10231	76
Figura 4. Resultados de la medición de los halos de inhibición (eficacia antibacteriana) del aceite esencial de Cinnamomum zeylanicum Breyn frente al Enterococcus faecalis ATCC29212 por el método de difusión del disco (Kirby Bauer).....	79
Figura 5. Prueba de la actividad antimicótica del aceite esencial de Cinnamomum zeylanicum Breyn frente Candida albicans ATCC10231 por el método de difusión del disco (Kirby Bauer).....	82
Figura 6. Prueba de la actividad antibacteriana del aceite esencial de Origanum vulgare frente a Enterococcus faecalis ATCC29212 por el método de difusión del disco (Kirby Bauer)	84
Figura 7. Prueba de la actividad antimicótica del aceite esencial de Origanum vulgare frente Candida albicans ATCC10231 por el método de difusión del disco (Kirby Bauer).....	86
Figura 8. Prueba de la actividad antibacteriana de la asociación (Cinnamomum zeylanicum Breyn + Origanum vulgare) frente Enterococcus faecalis ATCC29212 por el método de difusión del disco (Kirby Bauer)	88
Figura 9. Prueba de la actividad antimicótica del Asociación (Cinnamomum zeylanicum Breyn + Origanum vulgare) frente Candida albicans ATCC10231 por el método de difusión del disco (Kirby Bauer)	90
Figura 10. Media de los valores del halo de Enterococcus faecalis	104
Figura 11. Media de los valores del halo de Candida albicans ATCC10231	107

RESUMEN

Objetivo: Determinar el efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum Breyn* y *Origanum vulgare L.* frente a *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*, mediante un estudio *in vitro*, en 2019. Material y Método: El diseño fue experimental en el que se aplicó aceite esencial *Cinnamomum zeylanicum Breyn*, *Origanum vulgare* y la asociación *Cinnamomum zeylanicum Breyn + Origanum vulgare* frente a *Enterococcus faecalis ATCC29212* y *Candida albicans ATCC10231*. Resultados: la sensibilidad del *Enterococcus Faecalis ATCC29212*, frente a la aplicación del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* es sensible a una concentración 14,0587511 mg/ml; de *Origanum vulgare* (orégano) es muy sensible a una concentración de 15,17 mg/ml y de la asociación *Cinnamomum zeylanicum + Origanum vulgare* es muy sensible a una concentración de 16,61 mg/ml. Y para *Candida albicans ATCC10231*, es muy sensible con la aplicación de *Cinnamomum zeylanicum* es muy sensible (concentración 19,98125 mg/ml), con aceite esencial de *Origanum vulgare* (concentración de 26,71 mg/ml) y con la asociación de *Cinnamomum zeylanicum + Origanum vulgare* (concentración de 17,44 mg/ml). Conclusión: se demostró la eficacia antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano), del *Cinnamomum zeylanicum Breyn* (canela) y de la asociación *Origanum vulgare + Cinnamomum zeylanicum Breyn* ($p < 0,05$), aunque las comparaciones múltiples de Tukey del halo evidencian que la asociación *Cinnamomum zeylanicum Breyn + Origanum vulgare* no es diferente del *Origanum vulgare*, ni tampoco del *Cinnamomum zeylanicum Breyn* ($p = 0,458$) *Cinnamomum zeylanicum Breyn* ($p = 0,095$).

Palabras clave: efecto antimicrobiano, *Cinnamomum zeylanicum Breyn*, *Origanum vulgare*, Asociación, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*

ABSTRACT

Objective: To determine the antimicrobial effect of the essential oil of *Cinnamomum zeylanicum Breyn* and *Origanum vulgare L.* against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*, through an in vitro study, in 2019. Material and Method: The design was experimental in which essential oil was applied *Cinnamomum zeylanicum Breyn*, *Origanum vulgare* and the *Cinnamomum zeylanicum Breyn* + *Origanum vulgare* association against *Enterococcus faecalis* ATCC29212 and *Candida albicans* ATCC10231. Results: the sensitivity of *Enterococcus Faecalis* ATCC29212, against the application of the essential oil of *Cinnamomum zeylanicum* is sensitive to a concentration 14,0587511 mg / ml; *Origanum vulgare* (oregano) is very sensitive to a concentration of 15.17 mg / ml and the consortium *Cinnamomum zeylanicum* + *Origanum vulgare* is very sensitive to a concentration of 16.61 mg / ml. And for *Candida albicans* ATCC10231, it is very sensitive with the application of *Cinnamomum zeylanicum* is very sensitive (concentration 19.98125 mg / ml), with essential oil of *Origanum vulgare* (concentration of 26.71 mg / ml) and with the association of *Cinnamomum zeylanicum* + *Origanum vulgare* (concentration of 17.44 mg / ml). Conclusion: the antibacterial efficacy of the essential oil of *Origanum vulgare* (oregano), *Cinnamomum zeylanicum Breyn* (cinnamon) and the association *Origanum vulgare* + *Cinnamomum zeylanicum Breyn* ($p < 0.05$) was demonstrated, although multiple comparisons of Halkey Tukey show that the association *Cinnamomum zeylanicum Breyn* + *Origanum vulgare* is not different from *Origanum vulgare*, nor is it from *Cinnamomum zeylanicum Breyn* ($p = 0.458$) *Cinnamomum zeylanicum Breyn* $p = 0.095$).

Keywords: antimicrobial effect, *Cinnamomum zeylanicum Breyn*, *Origanum vulgare*, Consortium, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*.

INTRODUCCIÓN

En el Perú la caries sigue siendo un problema de salud pública y el control de esta una prioridad fundamental. La cavidad oral alberga una diversidad de microorganismos, estos son parte importante en la salud y enfermedad oral.

La dinámica de la infección de los conductos radiculares iniciada por caries, ha sido estudiada con anterioridad y cuyos resultados indican que el conducto radicular constituye un ambiente especial en el cual, los mecanismos selectivos ocurren y ciertas bacterias sobreviven y se multiplican con más facilidad. Las diferentes condiciones fisicoquímicas, nutricionales y ambientales de la cavidad bucal favorecen a la aparición de microsistemas bacterianos.

En la actualidad existe una gran cantidad de productos orales expuestos en el mercado que presentan una variedad de beneficios para la salud bucal; pero al mismo tiempo, efectos colaterales. La medicina tradicional a base de plantas medicinales ha tomado un lugar importante convirtiéndose en una alternativa terapéutica; a ello se le añade las investigaciones clínicas que confirman la cantidad de efectos benéficos que poseen siendo un gran aporte para la odontología. El aumento constante de la resistencia a los antibióticos y los efectos secundarios causados por los irrigantes sintéticos cambiaron la investigación hacia el desarrollo de alternativas a base de hierbas. (1)

Los agentes microbiológicos están directamente relacionados con la progresión y perpetuación de patologías inflamatorias perirradiculares. En una pulpa dental necrótica, existe una invasión de microorganismos que se adhieren a los tejidos y se multiplican en cantidad suficiente, siendo allí de gran importancia la interacción entre el hospedador y la dosis de infección, una vez que la capacidad infecciosa de las bacterias a rebasado respuesta defensiva del hospedador se produce la colonización microbiana. Los tipos de infección endodóntica (primaria,

secundaria y persistente) se asocian con diferentes condiciones clínicas. Las infecciones intrarradiculares y extrarradiculares están cobrando importancia, por la resistencia que presentan al tratamiento, debido a la persistencia de biofilms en la porción apical de conductos, inclusive en dientes con buen tratamiento endodóntico. (2)

Enterococcus faecalis es un anaerobio facultativo, cocos grampositivos considerado como uno de los microorganismos más resistentes que sobreviven después de los tratamientos del conducto radicular y desempeña un papel importante en las lesiones perirradiculares persistentes. Presenta la capacidad de adherirse a la dentina, invadir túbulos dentinarios para luego formar una biopelícula capaz de soportar soluciones de irrigación, medicamentos intracanal y provocar una afección post endodóntica. (3)

Candida albicans se clasifica como un hongo oportunista, es el patógeno más común entre las especies de *Candida*. Las lesiones causadas por este microorganismo aparecen como manchas blancas en la piel o en la membrana mucosa, de ahí el nombre de *Candida albicans* (4). Este microorganismo eucarionte presenta la capacidad de colonizar la cavidad oral, pero también se han encontrado con mayor frecuencia en las muestras de conductos radiculares infectados.

La *Cinnamomum zeylanicum* Breyn presenta propiedades analgésicas, antisépticas, anticancerígenas, antiespasmódicas, gastroprotectoras, antibacterianas, varios estudios presentan evidencia de su potencial antimicrobiano contra hongos, bacterias gram positivas y gram negativas. (5)

El *Origanum vulgare*, presenta un potencial antibacteriano contra bacterias Gram negativas como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica* y *Enterobacter cloacae*; y las Gram positivas como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus subtilis*. Tiene además capacidad antifúngica contra *Cándida albicans*,

C. tropicalis, *Torulopsis glabrata*, *Aspergillus niger*, *Geotrichumy rhodotorula*; pero no contra *Pseudomona aeruginosa*. (6)

Por esta razón, el presente trabajo de investigación pretende determinar el efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn (canela) y *Origanum vulgare* (orégano) frente al *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*.

La investigación se estructuró por capítulos, como sigue: el primer capítulo aborda el *Planteamiento del problema*, el cual explica la problemática en función de la variable dependiente, además de la formulación del problema, la justificación y los objetivos: general y específicos. El segundo capítulo corresponde a la fundamentación teórica del estudio, denominado *Marco Teórico*, por lo que se comprende los referentes empíricos y doctrinarios, así como la definición conceptual.

El tercer capítulo alude al *Marco metodológico*, marco bajo el cual se formulan las hipótesis, variables, tipo y diseño del estudio, el ámbito y tiempo social de la investigación, la población y muestra, al igual que los métodos y técnicas seleccionadas para ejecutar el estudio.

El cuarto capítulo expone en forma lógica y ordenada los *Resultados*, conjuntamente con la descripción del trabajo de campo, el diseño de la presentación de resultados, la prueba estadística y la corroboración de la hipótesis de trabajo.

El cuerpo de la investigación, se cierra a modo de colofón con las *Conclusiones* y *Recomendaciones*. De igual modo, se referencia y se adjuntan los anexos pertinentes a continuación de aquellas.

CAPÍTULO I: EL PROBLEMA

EL PROBLEMA

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La presencia de microorganismos en regiones intrarradiculares también son considerados como agentes etiológicos para el fracaso en los tratamientos en donde predominan cocos Gram positivos, varillas y filamentos. El propósito fundamental de los medicamentos intraconductos es minimizar el número de microorganismos en términos de asepsia controlada en las zonas de los conductos radiculares con infección, mientras que su actuación es secundaria a la limpieza y configuración del conducto radicular.

Los extractos naturales, así como los aceites esenciales de los vegetales, son el resultado de la combinación de diversas sustancias químicas biosintetizadas por los vegetales, y que justamente, le otorgan la fragancia característica de algunos tipos de flores, árboles e incluso semillas. Químicamente, constituyen mezclas complejas compuestas por monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanos, además se han demostrado que presentan potentes efectos terapéuticos que incluyen propiedades antibacterianas, antifúngicas, analgésicas y antiinflamatorias, especies como *Cinnamomum zeylanicum* Breyn (canela) y *Origanum vulgare* (orégano) han sido ampliamente utilizados para varios propósitos medicinales. (7)

Varios resultados empíricos, han evidenciado que la microbiota en piezas dentarias con fallas en el tratamiento endodóntico difiere de la microbiota hallada normalmente en los conductos de dientes no tratados. La causa principal del fracaso del tratamiento dental y la exacerbación de la infección se debe a la supervivencia de algunos patógenos etiológicos, en particular *E. faecalis* y algunas levaduras tales como *C. albicans*, en el canal de la raíz después de la manipulación con instrumentos mecánicos y el uso de soluciones de irrigación. (8,9)

Por tal motivo, es importante conocer el efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn (canela) y *Origanum vulgare* (orégano) a diferentes concentraciones frente a los principales microorganismos causantes del fracaso endodóntico, *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*.

1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

1.2.1. Interrogante principal

¿Cuál es el efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn (canela) *Origanum vulgare* L. (orégano) y de la asociación de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn (canela) + *Origanum vulgare* L. (orégano) a diferentes concentraciones frente a *Enterococcus Faecalis* y *Candida albicans*?

1.2.2. Interrogantes secundarias

- a) ¿Cuál es la sensibilidad según la escala de Duraffourd y Lapraz, que presenta el *Enterococcus faecalis* frente al aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn (canela), *Origanum vulgare* L. (orégano) y de la asociación de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn (canela) + y *Origanum vulgare* L. (orégano), mediante la técnica de difusión de disco?
- b) ¿Cuál es la sensibilidad según la escala de Duraffourd y Lapraz, que presenta *Candida Albicans* frente al aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn (canela), *Origanum vulgare* L. (orégano) y de la asociación de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn (canela) + y *Origanum vulgare* L. (orégano), mediante la técnica de difusión de disco?
- c) ¿Cuál es la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn (canela), *Origanum vulgare* L. (orégano) y de la asociación *Cinnamomum zeylanicum* Breyn (canela) + *Origanum vulgare* L. frente a las cepas de *Enterococcus faecalis* y *Candida Albicans*?
- d) ¿Cuál es la concentración mínima bactericida (CMB) y la concentración mínima fungicida (CMF) del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn (canela), *Origanum vulgare* L. (orégano) y de la asociación del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn (canela) + *Origanum vulgare* L. (orégano) frente a las cepas de *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*?

1.3. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Es indudable que, en la cavidad oral, se encuentren diversos microorganismos, lo que determina un ecosistema complejo y diverso, que son parte de la flora oral del hombre y que tienen implicancias en la su salud oral, pero también en las situaciones anómalas o de enfermedad de la cavidad oral. En este sentido, es fundamental indagar sobre nuevas sustancias que permitan coadyuvar al control de la proliferación anómala de esta flora, ya que podría, intervenir como un factor de fracaso en los diferentes tratamientos.

El estudio de investigación intenta encontrar propiedades antimicrobianas *in vitro* de la planta natural como *Cinnamomum zeylanicum Breyn* y *Origanum vulgare L.*, que pueden ser utilizadas contra microorganismos causantes del fracaso endodóntico. No hay duda de que la ciencia y la tecnología pueden ayudar a descubrir y utilizar las propiedades terapéuticas de las plantas medicinales de forma mucho más efectiva.

La ejecución de la presente investigación permite determinar la composición fitoquímica y efecto antimicrobiano de los aceites esenciales de *Cinnamomum zeylanicum Breyn* y *Origanum vulgare*. De igual modo, aplicar los hallazgos para fines de optimizar la terapéutica de piezas dentarias que presentan necrosis de la pulpa, lo que podría minizar la probabilidad de fracaso del tratamiento endodóntico, como consecuencia de las infecciones de la cavidad oral, y que evitará la exposición local y sistémica a elementos tóxicos como terapéutica, ya que estas soluciones posibilitarían el uso de tratamientos de origen natural para fines de régimen terapéutico intraconducto.

1.4 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.4.1 Objetivo general

Determinar el efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum Breyn* (canela), *Origanum vulgare L.* (orégano) y de la asociación de *Cinnamomum zeylanicum Breyn* (canela) + *Origanum vulgare L.* (orégano) a diferentes concentraciones frente a *Enterococcus Faecalis* y *Candida albicans*.

1.4.2 Objetivos específicos

- a) Establecer la sensibilidad según la escala de Duraffourd y Lapraz, que presenta el *Enterococcus faecalis* frente al aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum Breyn* (canela), *Origanum vulgare L.* (orégano) y de la asociación de *Cinnamomum zeylanicum Breyn* (canela) + y *Origanum vulgare L.* (orégano), mediante la técnica de difusión de disco.
- b) Establecer la sensibilidad según la escala de Duraffourd y Lapraz, que presenta *Candida Albicans* frente al aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum Breyn* (canela), *Origanum vulgare L.* (orégano) y de la asociación de *Cinnamomum zeylanicum Breyn* (canela) + y *Origanum vulgare L.* (orégano), mediante la técnica de difusión de disco.
- c) Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum Breyn* (canela), *Origanum vulgare L.* (orégano) y de la asociación *Cinnamomum zeylanicum Breyn* (canela) + *Origanum vulgare L.* frente a las cepas de *Enterococcus faecalis* y *Candida Albicans*.

- d) Determinar la concentración mínima bactericida (CMB) y la concentración mínima fungicida (CMF) del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn (canela), *Origanum vulgare* L. (orégano) y de la asociación del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn (canela) + *Origanum vulgare* L. (orégano) frente a las cepas de *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

Se ha revisado la evidencia empírica y se consignan estudios periféricos, vinculados con las variables de estudio.

A nivel internacional

Lucena, García, Muniz, Castellano Dias de Castro (10) realizaron el estudio *In Vitro Effect of Cinnamomum zeylanicum Blume Essential Oil on Candida spp. Involved in Oral Infections*. El objetivo del estudio in vitro fue evaluar el potencial antifúngico del aceite esencial (EO) químicamente caracterizado de *Cinnamomum zeylanicum Blume en Candida spp. biofilm* y establece su modo de acción, efecto sobre la cinética del crecimiento de hongos y citotoxicidad para las células humanas. Los valores de concentración inhibitoria mínima (MIC) y concentración fungicida mínima (MFC) variaron de 62.5 a 1,000 µg / mL, y el efecto parece deberse a la interferencia con la biosíntesis de la pared celular. El ensayo cinético mostró que EO a MICx2 (500 µg / ml) indujo una reducción significativa ($p < 0.05$) del crecimiento fúngico después de la exposición durante 8 h. A esta concentración, el EO también pudo obstaculizar la formación de biopelículas y reducir *Candida spp.* monoespecies y multiespecies en biofilm maduro a las 24 h y 48 h ($p < 0.05$).

Mahdi, Al Huwaiziy Abbas (11) realizaron el estudio denominado *A comparative evaluation of antimicrobial activity of the ethanolic extract of Cinnamomum zeylanicum Breyn and NaOCl against oral pathogens and against*

swabs taken from nonvital teeth-An in vitro study, en Bagdag. El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de canela (CEE) contra aislamientos clínicos de patógenos orales (*Enterococcus Faecalis*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Streptococcus mutans*), y contra hisopos extraídos de dientes no vitales, con comparación de NaOCl. Material y método: se preparó extracto etanólico de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn utilizando un aparato Soxhlet. Se utilizó el método de difusión en disco de agar para determinar la zona de inhibición de 25% de CEE y 5,25% de NaOCl. La concentración inhibitoria mínima (MIC) y la concentración bactericida mínima (MBC) se midieron utilizando el método de dilución de caldo. Resultados: La CEE al 25% fue efectiva contra todos los microorganismos con valores de CMI de 390 µg / ml contra *estafilococos aureus*, 781 µg / ml contra cada uno de *E. faecalis*, *C. albicans* y *Strep. mutans* y 1562 µg / ml contra *P. aeruginosa*, mientras que los valores de MBC fueron 781 µg / ml contra *Staph. aureus*, 1562 µg / ml contra cada uno de *E. faecalis*, *C. albicans* y *Strep. mutans*, y 1562 µg / ml contra *P. aeruginosa*. CEE produjo zonas de inhibición más amplias que NaOCl contra *C. albicans* y hisopos anaeróbicos, mientras que NaOCl produjo zonas más amplias contra los otros microorganismos. Conclusión: La actividad antimicrobiana del 25% de ECO es comparable al 5.25% de NaOCl contra los patógenos orales y endodónticos.

Condò, Anacarso, Sabia, Iseppi, Anfelli, Forti, Niederhäusern, Bondi, y Messi (12) investigaron sobre *Antimicrobial activity of spices essential oils and its effectiveness on mature biofilms of human pathogens*. La actividad antibacteriana de los aceites esenciales *Pimpinella anisum* L., *Cinnamomum zeylanicum* Breyn, *Syzygium aromaticum* y *Cuminum cyminum* L. (EOs) contra algunos microorganismos patógenos comunes (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990, *Enterococcus* ATCC15, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, *Proteus mirabilis* ATCC 10005, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 y

Candida albicans ATCC 10231) y se estudiaron sus biopelículas. Los efectos inhibitorios de EO se evaluaron mediante el ensayo de difusión de pozos de agar y la determinación de concentración mínima inhibitoria (MIC). Las EO más activas, la canela y el clavo, también se analizaron en biofilms maduros de 18, 24, 48 y 72 horas. La canela y el clavo exhibieron los mejores resultados mostrando una actividad significativa contra todas las bacterias probadas. Con respecto a la biopelícula, los resultados sugieren que el aceite de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn puede ser un enfoque útil para dañar la biopelícula producida por las bacterias Gram-negativas probadas.

Terán (13) realizó la investigación denominada *Comparación de la efectividad antimicrobiana entre aceite esencial de canela y clorhexidina frente a Enterococcus Faecalis. Estudio in vitro, 2016*. Determinó la efectividad antimicrobiana de inhibición de dos diferentes soluciones: Aceite Esencial de Canela (*Cinnamomum*) al 100% y Clorhexidina al 2% frente a cepas de *Enterococcus faecalis*. Utilizó 20 placas de *Enterococcus faecalis* sembradas en Agar sangre, donde 10 placas para Aceite esencial de canela al 100% y 10 placas de clorhexidina al 2% contuvieron 3 discos estériles impregnadas con 20ul de cada sustancia para su incubación a 37° por 24 horas. Finalmente se evidenció a las 24 horas que si existe una efectividad antimicrobiana de ambas soluciones comparando así su potencial antimicrobiano con la medición de sus halos de inhibición, obteniendo con variación de sus halos entre 9mm a 15mm una media de efectividad de 12,20 mm para el aceite esencial de canela al 100%, a diferencia del efecto obtenido por la clorhexidina al 2% con una media de sensibilidad de 16,60 mm con halos que variaban de 15mm a 19mm, demostrando que la acción antibacteriana del Aceite esencial de canela es 36% menor que el de la clorhexidina.

Benbelaid, Khadir, Benfahou, Ben, Muselli y Costa (14) indagaron sobre la *Eradication of Enterococcus faecalis and Candida albicans Biofilms by Cinnamomum cassia Essential Oil Solution as a Root Canal Irrigant*. Entre los principales resultados se halló que la composición química del aceite esencial de C.

cassia comprende especialmente compuestos como el cis-cinamaldehído en una proporción de 75,85%, mientras que los demás componentes se presentan en cantidades ínfimas en el aceite respecto a aquellas, como el acetato de cinamilo (3,31%), 1,8-cineol (2,52%), al-pha-pineno (1,69%), alcanfor (1,37%), alfa-terpineol (1,17%) y trazas de otros.

De otro lado, Ozkan, Guney, Gur, Pattabanoglu, Babat y Khalifa (15) realizaron la investigación *Essential oil of oregano and savory; chemical composition and antimicrobial activity*. Resultados: hallaron que la composición química del aceite esencial del *Origanum vulgare* ssp. *Hirtum*, se caracterizó por una composición química que comprendió el carvacrol (63,97%), linalool (3.67%) y p-cimeno (12.63%) como elementos principales, así como también como o-cimeno (17.98%), carvacrol (42.7%), linalol (9,65%), óxido de cariofileno (5,25%) y γ -terpinene (4,22%) en aceite esencial salado como componentes principales.

A nivel nacional

Marca (16) investigó sobre la *Actividad antimicótica "in vitro" del aceite esencial Cinnamomum zeylanicum Breyn "canela" frente a Cándida Albicans ATCC 6538, Tacna, 2012*. Determinó el grado de sensibilidad de la *Cándida albicans* al aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum Breyn* (Canela), mediante la técnica de difusión en disco. A su vez determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima fungicida (CMF) del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum Breyn* frente a *Cándida Albicans*. La obtención del aceite esencial de la corteza se realizó por el método de destilación por arrastre de vapor de agua. Se usaron volúmenes de aceite esencial puro (2,5 μ l - 20 μ l) para la determinación de los halos de inhibición por el método de difusión en disco (Kirby Bauer). Se impregnaron discos de papel filtro de 6 mm de diámetro (previamente esterilizados) con una cantidad determinada de aceite esencial y fueron incubadas a 37 °C durante 18 - 24 horas para ver los halos de inhibición. Los resultados obtenidos indicaron un promedio más elevado del halo a la concentración de 0,1658125 mg/ml con 48,09

mm de diámetro en función de las diferentes concentraciones. Asimismo, la menor concentración de 0,0236875 mg/ml se obtuvo un halo de inhibición 21,95 mm. Se determinó que el grado de sensibilidad de acuerdo a los promedios de los halos de inhibición (Escala de Duraffourd y Lapraz); generó en todas las concentraciones del aceite esencial inhibiciones mayores a 20,0 mm; además la concentración es 0,01895 mg/ml es el CMI, ya que fue el 1er tratamiento donde no hubo crecimiento micótico y la CMF fue de 0,020529166 mg/ml.

Sánchez y Luján (17) evaluaron el Efecto *antimicrobiano del aceite esencial y del extracto acuoso de canela (Cinnamomum zeylanicum Breyn) sobre Candida albicans y Streptococcus mutans*, en el 2013. Se utilizaron 288 placas Petri con las cepas de *C. albicans* ATCC 10231 y *S. mutans* ATCC 25175. Cada cepa se diluyó en solución de caldo glucosado estéril, en orden a obtener una turbidez semejante al tubo # 1 del Nefelómetro de Mc Farland, el cual contuvo 3x10⁸ UFC/ml. El aceite esencial de canela, se obtuvo mediante la técnica de destilación por arrastre de vapor. Los resultados fueron: se obtuvo un valor de 1 mg/ml para el CMI del aceite esencial y de extracto acuoso de canela y un crecimiento promedio de 107,75 UFC/ml para *C. albicans*, con un $p < 0,05$ y de 0,17 UFC/ml para *C. albicans*, con un $p < 0,05$; además la concentración mínima antimicrobiana del aceite esencial sobre el crecimiento de *C. albicans* fue de 0,6 mg/ml con el que se obtuvo un halo de 2mm, con un $p=0,00$ sin embargo el extracto acuoso, no tuvo efecto antimicrobiano. Conclusiones: A mayor concentración de aceite esencial y del extracto acuoso de canela, se tiene un efecto antimicrobiano mayor sobre el crecimiento de la *C. albicans*. La CMI del aceite esencial de la canela sobre el crecimiento de *C. albicans* fue de 1 mg/ml ($p < 0,001$); CMF del aceite esencial de la canela sobre el crecimiento de *C. albicans* es de 0,6 mg/ml ($p < 0,001$).

Mamani (18) investigaron sobre la *Evaluación antimicótica "in vitro" del aceite esencial Origanum vulgare "Orégano" frente a Candida albicans ATCC 6538, 2016*. Se determinó el grado de sensibilidad que presenta *Candida albicans*, la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Fungicida (CMF)

del aceite esencial de *Origanum vulgare* “Orégano” sobre el crecimiento de *Candida albicans*. El aceite esencial de *Origanum vulgare* “Orégano” fue extraído mediante destilación por arrastre de vapor. Resultados: se evidenció un aumento gradual del promedio de halo, siendo más elevado el halo de inhibición para una concentración de 1,75 mg/ml con un valor para el diámetro de 56,08 mm entre las distintas concentraciones del aceite esencial (2,0 µl). Empero, el promedio menor del halo de inhibición se presenta para una concentración de 0,5 mg/ml con 24,65 mm de diámetro (0,6 µl), así mismo se observó que en todas las concentraciones del aceite esencial provocan halos de inhibición mayores a 20,0 mm, lo que denotaría que *Candida albicans* es altamente sensible frente a las diferentes concentraciones del aceite esencial *Origanum vulgare*. Finalmente, la CMI fue 0,805358 mg/ml y la CMF de 0,8754 mg/m.

Villavicencio, Moromi, Salcedo, Pineda, Ramos y Zambrano (19) investigaron sobre el Efecto *Antimicótico in vitro de Origanum vulgare sobre cepas de Candida albicans, 2016*. Evaluaron el efecto antimicótico de cuatro tipos de aceite de orégano sobre las cepas de *Candida albicans*, Se recolectaron de distintos lugares del Perú, las especies: *Origanum vulgare* L (Jauja y Tacna), *Origanum x intercedensy* *Origanum x majoricum* (Arequipa). La extracción de aceites esenciales de orégano, se realizó utilizando la técnica de destilación por arrastre con vapor de agua, a partir de las hojas y flores de plantas frescas y semideshidratadas. Se analizaron los cultivos de la cepa ATCC de *Candida*, en Agar Sabouraud Glucosado y sometidas a la acción de los cuatro aceites esenciales de orégano por el método de difusión mediante discos de papel Whatman n°1 de 6 mm de diámetros, embebidos en concentraciones de 12,5 %, 25 %, 50 % y 100 %, utilizándose como control positivo Miconazol (Daktarin® gel oral 20 mg/g), como control Dimetilsulfóxido (DMSO). Analizaron los resultados considerando los valores de sensibilidad según el método de aromagrama de Duraffourd: 1S. Nula: < 8mm, 2S. Límite 9-14 mm, 3S. Media 15-19 mm y 4S. Sumamente sensible > 20 mm. Los resultados fueron que a la concentración de 12,5 %, *Origanum x majoricum* (Are-quipa), presentó mayor

actividad antimicótica sobre *Candida albicans* ATCC, además la concentración mínima inhibitoria (HCMI) fue de 12,5 % y sumamente sensible al 100 % con 24,86 mm de diámetro; y finalmente los aceites esenciales del *Origanum vulgare* L de los diversos geotipos evidencian discordancias en sus efectos antimicóticos siendo el de *Origanum vulgare* L (Tacna) el más efectivo.

Aizaga (20) investigaron el *Efecto antifúngico del Aceite Esencial de Canela (Cinnamomum zeylanicum Breyn) al 25%,50%,75% y 100% sobre Candida albicans ATCC. 10231,2017*. Determinó el mayor efecto antifúngico del aceite esencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum Breyn*) al 25%,50%,75% y 100% sobre *Candida albicans* mediante el método difusión en disco. Identificó también la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Antifúngica (CMF) del aceite esencial de canela por el método de Macrodilución en caldo, a partir de la concentración de mayor efectividad antifúngica sobre *Candida albicans*. Realizó la extracción del aceite esencial por el método de destilación por arrastre de vapor; a partir del aceite concentrado (100%), se calculó su volumen para determinar las respectivas diluciones al 25%,50%, 75%. Se reactivó la cepa del hongo y se inocularon colonias de la caja Petri respectivamente en cuatro tubos de ensayo previamente esterilizados con caldo BHI (Medio Infusión Cerebro y Corazón o Bacto-Brain Heart Infusion) y se incubó por 24 horas a temperatura ambiente 37° C. Así mismo se colocó el medio Mueller-Hinton en 64 cajas Petri que corresponden a los tratamientos experimentales y se realizó la siembra de *Candida albicans* para su incubación por 24 horas a 37 °C. Los respectivos discos de sensibilidad (un disco por placa) fueron embebidos cada uno con 2 mL del aceite esencial de canela a las diferentes concentraciones por cada concentración se hicieron 16 repeticiones, además de un control negativo con suero fisiológico y un control positivo con nistatina por triplicado. Los resultados fueron según el análisis estadístico de la Prueba Kruskal Wallis, el aceite esencial de canela al 100% tuvo el mayor efecto antifúngico en relación a las otras concentraciones sobre la cepa *Candida albicans* a las 24 horas. La CMI del aceite esencial de canela al 100% fue de 850 ug/ml, y la CMF fue de 900 ug/mL, demostrado a partir de la ausencia de crecimiento de *Candida albicans*.

2.2 BASES TEÓRICAS

2.2.1 *Cinnamomum zeylanicum* Breyn (canela)

Las plantas consideradas en el presente estudio, fueron del género *Cinnamomum*, que abarca una diversidad de especies originarias y dispersas en las regiones de Asia y Australia. Entre éstas, destaca por sus aceites, la especie comúnmente denominada canela o *C. zeylanicum*, *C. cassia* y *C. camphora*. El *Cinnamomum zeylanicum* Breyn (7), también se le conoce con la denominación del vocablo latino *C. verum*, el cual es originario de Sri Lanka (8), cuyo aceite es extraído de sus hojas y de la corteza, y para el cual se le da diversos usos y aplicaciones, no solo en la industria de la gastronomía, perfumería, (8,9) sino farmacéutica, siendo justamente, este último el interés de la presente investigación.

Cabe mencionar, que el aceite esencial de canela, comprende componentes denominados E)-cinnamaldehyde (68,95%) y benzaldehyde (9,94%), al igual que (E)-cinnamylacetate (7,44%), los que han exhibido características en cuanto propiedad antimicrobiana, incluso anticarcinogénica, lo que plantea la posibilidad de utilizarlas para combatir o coadyuvar el tratamiento antiinfeccioso y antineoplásico.

2.2.1.1. *Efecto antimicrobiano de la canela*

Una de las propiedades mejor establecidas de los extractos de canela, los aceites esenciales y sus componentes es la actividad antibacteriana contra las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas responsables de las enfermedades infecciosas humanas y la degradación de los alimentos o cosméticos (21). En el año 2011, las actividades antibacterianas de varios extractos de corteza de *C. zeylanicum*, obtenidos con diferentes solventes orgánicos, como acetato de etilo, acetona y metanol, se probaron *in*

in vitro contra la neumonía *Klebsiella* 13883, *Bacillus megaterium* NRS, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27859, *Staphylococcus aureus* 6538 P, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, *Corynebacterium xerosis* UC 9165, *Streptococcus faecalis* DC 74, por el método de difusión en disco. Los hallazgos mostraron que la actividad antibacteriana, expresada como zona de inhibición, varía de 7 a 18 mm para la aplicación de 30 μ L, lo que sugiere una elevada actividad antibacteriana (22). También en 2011, Mandal, Deb Mandal y Saha (23) demostraron que el extracto etanólico de la corteza del tallo *C. zeylanicum* ejerció actividad antibacteriana contra aislados clínicos de *S. aureus* resistente a la *meticilina* (MRSA), de Kolkata, en la India. La actividad antibacteriana se expresó tanto en diámetros de inhibición como en valores de concentración inhibitoria mínima (MIC) en diferentes momentos de incubación. El extracto de canela, que mostró un diámetro de zona de inhibición de 22 a 27 mm, resultó ser bactericida después de 6 h de incubación. En este sentido, se afirma que *C. zeylanicum* podría considerarse un valioso apoyo en el tratamiento de la infección y puede contribuir al desarrollo de posibles agentes antimicrobianos contra la bacteria MRSA (23). De otro lado, de los resultados de estudios sobre la actividad antibacteriana de la canela, la sensibilidad de dos cepas clínicas de *Moraxella catarrhalis* (una causa importante de infección del tracto respiratorio inferior, resistente a los agentes antimicrobianos convencionales) al extracto *hidroetanólico de la corteza* y el clavo de *C. zeylanicum* polvo, se probó utilizando métodos de difusión en disco y dilución de caldo, y se demostró que el extracto de canela es activo contra ambas cepas y, en consecuencia, representa una fuente alternativa de sustancias antimicrobianas naturales para su uso en la práctica clínica para el tratamiento de casos de *M. catarrhalis* (24).

2.2.1.2. Composición química de la canela

Los principales compuestos aislados e identificados en la canela (*C. zeylanicum*) pertenecen a dos clases químicas: polifenoles y fenoles volátiles. Entre

los polifenoles, la canela contiene principalmente ácidos vanílico, cafeico, gálico, protocatechuico, *p*-cumarico y ferúlico (25) En relación a los componentes volátiles, la composición química de los aceites esenciales de canela depende de la parte de la planta de la que se extraen. Es así, que el aceite esencial de corteza, el cinamaldehído es la sustancia más representada, con un contenido que varía del 90% al 62% –73%, dependiendo del tipo de extracción, (26). Los demás compuestos volátiles menores son hidrocarburos y compuestos oxigenados (es decir, β - cariofileno, benzoato de bencilo, linalol, acetato de eugenilo y acetato de cinamilo). En el aceite esencial de hoja de canela, el componente principal es el eugenol, que alcanza una concentración de más del 80%. En el aceite esencial obtenido de la fruta y las flores de canela, el acetato de (E) -cinnamilo y el cariofileno son los componentes principales. (25)

2.2.2 *Origanum vulgare* (orégano)

El *Origanum vulgare* (Labiata) cuyo nombre vulgar es orégano, se cultiva en la región sur del Perú, especialmente en Tacna (Tarata) (27) en gran escala, cosechado, desecado y distribuido a los mercados nacionales y al exterior. Se le utiliza ampliamente en la industria de la gastronomía o uso culinario. Las sumidades floridas, así como sus hojas, se utilizan en la industria farmacéutica en razón a sus propiedades diuréticas, contra los espasmos, tónica y antiséptica. (28)

El género *Origanum*, pertenece a la familia Lamiaceae. Es una sufruticosa o herbácea, rizomatosa, perenne. Sus tallos presentan una posición erecta, con una dimensión aproximada de 90 cm o más, con frecuencia ramificados en la parte superior, vellosos, hirsutos y pubescentes, más bien escasamente glabros. Las hojas presentan dimensiones aproximadas de 10-40 x 4-25 mm, de forma oval, enteras y con discreción de forma crenacio-serradas, pilosos, pecioladas y punteado glandulosas. Sus flores, presentan una disposición en forma de espiga de

verticilastros de tamaño aproximado de 5-30 mm, de forma oblonga, ovoide, las que en conjunto forman una inflorescencia corimbosa densa (29). Las hojas de orégano se usan para fines culinarios, en la cosmética, en la industria de la farmacia y para elaborar licorería, siendo un producto cotizado para fines de exportación. De acuerdo a sus características morfológicas, el género *Origanum*, se ha clasificado en tres grupos, diez secciones, treinta y ocho especies, seis subespecies y diecisiete híbridos. (30)

Todos los aceites esenciales de plantas pertenecientes a las familias de las Labiadas, contienen un compuesto o principio activo propio pero varios compuestos son comunes a varias especies. (31) Las plantas de uso tradicional plantean nuevos horizontes dentro del campo de la etnomedicina, para la búsqueda de principios bioactivos frente a la utilización de antisépticos estándar (32,33). Incluye muchas especies que comúnmente se encontraron como plantas comunes en el Mediterráneo norte de las zonas euro-siberianas e irano-siberiano. (33)

2.2.2.1. Taxonomía del *Origanum vulgare* (33)

Reino: Plantae

División: Magnoliophy

Clase: Magnoliopsida

Orden: Lamiales

Familia: Lamiaceae

Subfamilia: Nepetoideae

Género: *Origanum*

Especie: *O. vulgare*

2.2.2.2. Efecto antimicrobiano del *Origanum vulgare*

La química del aceite esencial de *O. vulgare* y su actividad antimicrobiana ha sido estudiada, siendo sus compuestos fenólicos, ácidos fenólicos y flavonoides, los que han demostrado una muy buena actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de *O. vulgare subsp. glandulosum* rico en carvacrol (34,35). En este sentido, se han realizado varios estudios sobre la actividad antimicrobiana de los extractos de diferentes tipos de orégano. Se ha encontrado que los diferentes extractos y aceites esenciales de las especies del género *Origanum*, tienen actividad contra bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella typhimurium* y *Enterobacter cloacae*; y las llamadas gram positivas como *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*. Sobresale también, sus propiedades antifúngicas contra especies de *Torulopsis glabrata*, *C. tropicalis*, *Rhodotorula*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans* y *Geotrichum*, mas no contra las denominadas *Pseudomonas aeruginosa*. Se ha estudiado su capacidad antimicrobiana del aceite esencial y de los componentes aislados. Los fenoles carvacrol y timol tienen los niveles más elevados de actividad contra microorganismos Gram negativos, excepto para *Pseudomonas aeruginosa*, siendo el timol el más activo. (36)

2.2.3. Microbiota endodóntica

Aunque los hongos, las arqueas y los virus contribuyen a la diversidad microbiana en las infecciones endodónticas, las bacterias son los microorganismos más comunes que ocurren en estas infecciones. Conjuntos de datos de cultivos y estudios moleculares, mostraron que más de 460 taxones bacterianos únicos pertenecientes a 100 géneros y 9 filos se han identificado en diferentes tipos de infecciones endodónticas. Los filos con la mayor riqueza de especies fueron Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria y Proteobacteria. La diversidad varía significativamente según el tipo de infección. En general, se han revelado más taxones por estudios moleculares que por cultivo. Muchos filotipos cultivables y

aún no cultivados han surgido como patógenos candidatos según la detección en varios estudios y / o alta prevalencia. (37)

En una infección endodóntica primarias se destacan principalmente las bacterias gram negativas como: *Dialister*, *Treponema*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella* y *Tanerella*. Y las gram positivas *Pseudoramibacter*, *Filifactor*, *Micromonas*, *Peptoestreptococcus*, *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Olsenella* y *Propionibacterium*.

Candida albicans es un hongo que se encuentra de manera esporádica en esta infección, mientras que en infecciones secundarias o persistentes se encuentran en porcentaje de 3-18%. En infecciones secundarias la mayoría de las piezas dentarias tratadas presentan periodontitis periapical, esto debido a que los microorganismos que sobrevivieron a la desinfección intrarradicular y obturación, tienen la capacidad de adaptarse a las nuevas modificaciones ambientales y nutricionales, para luego demostrar su virulencia y causar la inflamación periradicular, expresándose como una infección extraradicular con presencia de fistula. El *Enterococcus Faecalis* se encuentra en un 30 a 90% en dientes tratados endodónticamente, tanto *E. faecalis* como *C. albicans* tienen una serie de atributos que les permiten sobrevivir en los conductos tratados, como la resistencia a los fármacos intraconducto (Hidróxido de Calcio), y la capacidad para formar biopelículas, invadir los túbulos dentinarios y soportar largos periodos de privación de nutrientes. (38)

2.2.3.1. *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*)

Dentro de los cocos Gram positivo no esporulado, facultativo anaerobio, se encuentra el *Enterococcus faecalis*, cuyo hábitat es el tracto gastrointestinal. Sin embargo, también se le encuentra en la vagina, en el tracto hepatobiliar y heridas de tejidos blandos. Se ha evidenciado que *E. faecalis* puede penetrar los túbulos dentinales, sobreviviendo a la instrumentación químico-mecánica, colonizarlos a

una profundidad de 300 μm y además reinfectar los conductos, aún incluso después de haber sido obturados (39). Algunos estudios han vinculado estas propiedades proteolíticas y la elevada aparición de especies de *Enterococcus* en cuadros de endocarditis, bacteremias, infecciones del tracto urinario e infecciones intrarradiculares (40,41). Según Sedgley, Nagel, Shelburne, Clewell, Appelbe y Molander (42) el *E. faecalis* es capaz de sobrevivir y multiplicarse en condiciones tóxicas para otras bacterias y los factores de virulencia tendrían relación con las etapas de la infección endodóntica e inflamación periapical, lo que, sin duda, contribuiría al fracaso del tratamiento endodóntico.

2.2.3.2. *Candida albicans*

Constituyen microorganismo llamados comensales versátiles que colonizan hasta el 70% de los usuarios de prótesis dentales, y debido a que provoca alteraciones locales o sistémicas, puede ocasionar un desequilibrio en el huésped, produciendo en éste un estado de vulnerabilidad para la enfermedad, que puede oscilar de un compromiso superficial hasta una afección seria (43), siendo trascendente en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida, en quienes las manifestaciones orales de presencia de cándida es un indicativo de desequilibrio de la respuesta inmune del sujeto. (44)

Para el tratamiento de infecciones por *Candida*, se utiliza preferentemente agentes polienicos, azoles, equinocandinas y antimetabolitos, y en caso de infecciones de menor gravedad o superficiales, se opta por antifúngicos tópicos, como nistatina y miconazol (45,46). En el caso de *Candida*, su capacidad para formar biofilm en superficies bióticas y abióticas es un factor de virulencia relevante. (47)

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

3.1 HIPÓTESIS

3.1.1 Hipótesis general

La asociación aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn + *Origanum vulgare* tienen un mayor efecto antimicrobiano frente al *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* que cuando se utilizan individualmente.

3.2 VARIABLES

3.2.1 Identificación de la Variable Independiente

V. I: *Cinnamomum zeylanicum* Breyn

V.I. : *Origanum vulgare*

3.2.2 Identificación de las variables dependientes

V.D: *Enterococcus Faecalis*

V.D. *Candida albicans*

Operacionalización de las variables

VARIABLES INDEPENDIENTES	INDICADOR	TIPO	ESCALA/VALOR FINAL
Aceite esencial de Cinnamomum zeylanicum Breyn (canela)	Diámetro del halo de inhibición diferentes concentraciones ^a	Cuantitativa	Razón/ mm
	Diámetro de halo de inhibición (según la escala de Duraffourd y Lapraz)	Categoría	Razón /Ordinal - Nula(-): ≤ 8mm - Sensible limite(+)= 9-14mm - Muy sensible(++)= 15-19mm - Sumamente sensible(+++)= ≥20mm
Aceite esencial de Origanum vulgare L. (orégano)	Diámetro del halo de inhibición diferentes concentraciones ^a	Cuantitativa	Razón/ mm
	Diámetro de halo de inhibición (según la escala de Duraffourd y Lapraz)	Categoría	Razón / Ordinal - Nula(-): ≤ 8mm - Sensible (+)= 9-14mm - Muy sensible(++)= 15-19mm - Sumamente sensible(+++)= ≥20mm
VARIABLES DEPENDIENTES	INDICADOR	TIPO	ESCALA/VALOR FINAL
<i>Enterococcus Faecalis</i>	Crecimiento bacteriano de la cepa	Cuantitativa	Razón / UFC
<i>Candida albicans</i>	Crecimiento micótico de la cepa	Cuantitativa	Razón / UFC

3.3. DISEÑO Y TIPO DE INVESTIGACIÓN

El presente estudio se trató de un diseño experimental porque se utilizaron técnicas de cultivo en inoculados con cepas de *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*, a los que se les aplicó discos embebidos a diferentes concentraciones de aceites esenciales para medir el efecto antimicrobiano.

El tipo de investigación fue:

- Experimental porque valora el efecto de las variables independientes sobre las dependientes y existe la intervención del investigador sobre las condiciones de investigación.
- Transversal debido a que las variables de estudio serán observadas en un solo tiempo determinado.
- Prospectivo ya que los datos recogidos por el investigador son de primera fuente.
- Analítico porque permitirá conocer el efecto antibacteriano y a su vez la MIC, CMB, CMF de los aceites esenciales frente a cepas bacterianas.

3.4. ÁMBITO Y TIEMPO SOCIAL DE LA INVESTIGACIÓN

Ámbito de estudio: estudio laboratorial en la ciudad de Tacna.

Tiempo social: 2019

3.5. POBLACIÓN Y MUESTRA

Para la ejecución del diseño experimental, se utilizó concentraciones diferentes de aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn, de *Origanum vulgare* L. y de la asociación de ambas.

– **Población**

Enterococcus Faecalis ATCC29212 y *Candida albicans* ATCC10231

– **Muestra**

Tamaño de la muestra

Se utilizó la ecuación basada en la potencia (β) y confianza (α):

$$n = \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 \sigma_{\delta}^2}{\delta^2}$$

Donde:

$Z_{\alpha/2}$ = Confianza al 95% (1,96)

Z_{β} = Potencia de la prueba al 80% (0,84)

σ^2

$\sigma^2_{\delta/\delta^2} = 1$ = Variación relativa de los halos 1

n= Mínimo 8 repeticiones para cada concentración

Tamaño de muestra asumido en el presente estudio: 13, 12,11, 10 y 8 repeticiones (por encima del número mínimo de repeticiones).

- **Unidad de análisis:** placa Petri con cepas de *Enterococcus Faecalis* y *Candida albicans* a las que se les aplicó diferentes concentraciones de aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn y *Origanum vulgare*.

- **Unidades de muestreo**

Microbiano: Colonia de cada cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC29212 y *Candida albicans* ATCC10231.

Biológico: extracto de aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn y *Origanum vulgare* en diferentes concentraciones.

3.6. PROCEDIMIENTO, TÉCNICAS E INSTRUMENTOS

3.6.1 Procedimiento

3.6.1.1. Material de laboratorio

Para la ejecución del experimento se requirió del siguiente material de laboratorio:

- Autoclave
- Balanza analítica
- Estufa
- Refrigeradora
- Microscopio
- Mechero de Bunsen
- Micro pipetas
- Balones de vidrio de diferente gradación (250 y 500 ml)
- Matraces de 500 ml
- Fiolas de 100 ml
- Placas Petri de 100 x 15 mm
- Embudos de material de vidrio
- Tubos de ensayo
- Vasos de precipitación de 500 ml
- Peras de decantación
- Baguetas
- Medios de cultivo Agar Papa dextrosa

- Medio de cultivo Agar Mueller Hinton
- Caldo Mueller Hinton
- Reactivo químico alcohol etílico 70°
- Reactivo químico de alcohol yodado
- Agua destilada
- Compuesto químico de dimetilsulfóxico al 10%
- Ron industrial
- Asa de Kholle
- Gradillas
- Espátulas
- Malla de asbesto
- Pinzas
- Papel kraft y filtro
- Mascarillas desechables
- Guantes quirúrgicos desechables
- Algodón pabilo
- Papel de aluminio comercial
- Marcadores
- Vernier

3.7.1.2. De acopio de las especies vegetales

– **Obtención de especie de *Cinnamomum zeylanicum Breyn:***

Se obtuvo de una empresa comercializadora de especias de la ciudad de Tacna, y transportado en bolsas de papel para resguardar su integridad y pureza.

– **Obtención de especie de *Origanum vulgare :***

Se obtuvo de una empresa comercializadora de especias de la ciudad de Tacna, y transportando las hojas en bolsas de papel kraft, elaboradas para tal fin, seleccionando las hojas enteras.

– **Obtención de especie aceite esencial de las especies vegetales seleccionadas:**

Obtención de especie de *Cinnamomum zeylanicum Breyn:*

Se obtuvo 2000 gramos en una empresa comercializadora de especias y condimentos ubicado en un mercado de la localidad (Mercado Grau) de la ciudad de Tacna, y transportado en bolsas de papel kraft para resguardar su integridad y pureza conservándola hasta su posterior identificación y procesamiento.

Obtención de especie de *Origanum vulgare:*

Se obtuvo 2000 gramos de la especie de la provincia de Tarata de la ciudad de Tacna, y transportando las hojas en bolsas de papel kraft, elaboradas para tal fin, seleccionando las hojas enteras (libres de enfermedad) y separando algunos componentes como restos pequeños de madera u otros contaminantes que puedan alterar su composición.

– **Identificación de las especies**

Se solicitó la identificación de las especies botánicas a la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, adjuntando dichas especies en un sobre manila. (ANEXO1)

3.7.1.3. Procesamiento de los aceites esenciales de las especies vegetales seleccionadas

a. Obtención del aceite esencial *Cinnamomum zeylanicum* Breyn

Para la extracción del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn, se trozaron en pequeños fragmentos las cortezas de canela para una mejor extracción.

La obtención del aceite esencial de la corteza se realizó por el método de destilación por arrastre de vapor de agua.

Basándose en un equipo de destilación compuesto por un sistema de doble balón, uno de los cuales contuvo agua destilada (1000 ml) y fue sometido a calor directo mediante una cocina eléctrica; mientras que en el segundo (Capacidad 1000 ml) contuvo 150 gramos de la corteza de canela, el cual recibió los vapores de agua, para que después el vapor producido arrastre los aceites esenciales hasta el refrigerante. Este cambio de temperatura produjo la condensación del vapor y lo volvió nuevamente líquido (agua-aceite). El producto destilado se recibió en un tubo de ensayo estéril adaptado con un orificio en la parte inferior de su base con el fin de contener la solución bifásica entre agua y aceite esencial, la cual, por diferencia de densidades, el agua fluyo por dicho orificio y el aceite quedo en el recipiente. Para su recolección se utilizó pipetas Pasteur, posteriormente se almaceno en un tubo de vidrio con tapa rosca cerrado

herméticamente y envuelto en papel aluminio para proteger de la luz del ambiente.

La concentración del aceite esencial se obtuvo mediante:

Determinación de la densidad

Donde:

d = densidad (g/ml)

m = masa (g)

v = volumen (ml)

W_1 = peso probeta (g)

W_2 = peso probeta con aceite (g)

Vol. Aceite = volumen del aceite (ml)

Entonces:

$W_1 = 16,3323$ g

$W_2 = 17,3122$ g

Vol. Aceite = 1ml

$$d = \frac{m}{v}$$

$$d = \frac{W_2 - W_1}{v}$$

$$d = \frac{(17,3122 \text{ g} - 16,3323 \text{ g})}{1 \text{ ml}}$$

$$d = 0,9799 \frac{\text{g}}{\text{ml}} = 979,9 \text{ mg/ml}$$

b. Obtención del aceite esencial *Origanum vulgare*

Para la extracción del aceite esencial de *Origanum vulgare*, de igual forma se realizó por el método de destilación por arrastre de vapor de agua.

Colocándose en el equipo de destilación de doble balón, el primero con agua destilada (1000 ml) sometido a calor directo; y el segundo (Capacidad 1000 ml) con 200 gramos de hojas de orégano, el cual recibió los vapores de agua, para que después el vapor producido arrastre los aceites esenciales hasta el refrigerante. El producto destilado se recibió en un tubo de ensayo estéril adaptado contenido en un vaso *beaker*. Posteriormente se almaceno en un tubo de vidrio con tapa rosca cerrado herméticamente y envuelto en papel aluminio para proteger de la luz y a temperatura ambiente.

La concentración del aceite esencial se obtuvo mediante:

Determinación de la densidad

Donde:

d = densidad (g/ml)

m = masa (g)

v = volumen (ml)

$W1$ = peso probeta (g)

$W2$ = peso probeta con aceite (g)

Vol. Aceite = volumen del aceite (ml)

Entonces:

$W1 = 16,2276$ g

$W2 = 17,132$ g

Vol. Aceite = 1ml

$$d = \frac{m}{v}$$

$$d = \frac{W2 - W1}{v}$$

$$d = \frac{(17,132 \text{ g} - 16,2276 \text{ g})}{1 \text{ ml}}$$

$$d = 0,9044 \frac{\text{g}}{\text{ml}} = 904,4 \text{ mg/ml}$$

Determinación de la concentración de la asociación (*Cinnamomum zeylanicum* Breyn + *Origanum vulgare*)

Donde:

d = densidad (g/ml)

m = masa (g)

v = volumen (ml)

W1= peso probeta (g)

W2= peso probeta con aceite (g)

Vol. Aceite= volumen del aceite (ml)

Entonces:

W1= 16,3323 g

W2=18,1934 g

Vol. Aceite= 1ml

$$d = \frac{m}{v}$$

$$d = \frac{W2 - W1}{v}$$

$$d = \frac{(18,1934 \text{ g} - 16,3323 \text{ g})}{2 \text{ ml}}$$

$$d = 1,8611 \frac{\text{g}}{2 \text{ ml}} = 0,93065 \frac{\text{g}}{\text{ml}} = 930,65 \text{ mg/ml}$$

– **Obtención de las cepas microbianas**

Las cepas microbianas *Enterococcus faecalis* ATCC29212 y *Candida albicans* ATCC10231 fueron proporcionadas por el laboratorio del Área de Microbiología de la Facultad de Ciencias en la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, obtenidas de un distribuidor de cepas bacterianas (GemLab), material biológico, pruebas morfológicas, bioquímicas y moleculares correspondientes ATCC: American Type Culture Collection.

3.7.1.4. Evaluación de la actividad de los aceites esenciales de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn, *Origanum vulgare* y Asociación

La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales se evaluó por el método de Kirby Bauer (difusión en disco).

a. Preparación de las soluciones de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn, *Origanum vulgare* y Asociación

Para *Cinnamomum zeylanicum* Breyn

- En los primeros ensayos se usaron volúmenes de (2,5µl - 30µl) para la determinación de los halos de inhibición por el método de difusión en disco (Kirby Bauer) contra las cepas de *Enterococcus Faecalis* y *Candida albicans*. Sin embargo luego de la incubación a 37°C por 24 h se observó en la lectura de las placas que hubo crecimiento bacteriano, pero no crecimiento micótico; por lo que se dedujo que la actividad del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn era potente frente a *Candida albicans* con dichas concentraciones. Por lo cual se propuso

trabajar con diluciones para obtener los datos de los halos de inhibición con respecto a las concentraciones del aceite esencial.

- La dilución se hizo en una proporción 1/2; es decir volúmenes iguales de aceite esencial y dimetilsulfóxido 10% (DMSO), tomamos 5 μl de aceite esencial y 5 μl de DMSO haciendo un volumen total de 10 μl , para una mejor homogenización de esta dilución se usó el equipo de vórtex. La tabla N°1 y 2, muestra los volúmenes y concentraciones empleadas en este trabajo. Las concentraciones se establecieron mediante el siguiente cálculo:

$$\begin{aligned}
 d &= 979,9 \text{ mg/ml} \\
 (1\text{ml})1000 \mu\text{l} &\rightarrow 979,9 \text{ mg} \\
 2,5 \mu\text{l} &\rightarrow x \\
 x &= 2,44975 \text{ mg}/\mu\text{l}
 \end{aligned}$$

Para el segundo ensayo se usaron volúmenes inferiores a los primeros (0,1 μl – 0,8 μl) de aceite esencial puro, paralelamente se trabajó con un control positivo para ambas cepas; es decir a esta placa no se adicionó el aceite esencial para verificar el crecimiento microbiano en el medio de cultivo. En este caso como la dilución fue 5 μl de aceite y 5 μl de DMSO la dilución fue $\frac{1}{2}$ es decir la mitad de su concentración (489.95 mg) a partir de aquí las concentraciones de acuerdo a los volúmenes requeridos cambiaron de esta manera:

$$\begin{aligned}
 d &= 489,95 \text{ mg/ml} \\
 (1\text{ml})1000 \mu\text{l} &\rightarrow 489,95 \text{ mg} \\
 0,1 \mu\text{l} &\rightarrow x \\
 x &= 0,048995 \text{ mg}/\mu\text{l}
 \end{aligned}$$

Tabla 1. Concentraciones del aceite esencial *Cinnamomum zeylanicum* Breyn en los discos para las cepas de *Enterococcus Faecalis* ATCC29212

N° de tratamiento	Volumen (µl)	Concentración [] (mg/µl)
1	2.5	2,44975
2	5.0	4,8995
3	7.5	7,34925
4	10.0	9,799
5	12.5	12,24875
6	15.0	14,6985
7	17.5	17,14825
8	20.0	19,598
9	22.5	22,04775
10	25.0	24,4975
11	27.5	26,94725
12	30.0	29,397

Fuente: elaboración propia

Tabla 2. Concentraciones del aceite esencial *Cinnamomum zeylanicum* Breyn en los discos para las cepas de *Cándida albicans* ATCC10231

N° de tratamiento	Volumen (µl)	Concentración [] (mg/µl)
1	0.1	0.048995
2	0.2	0.09799
3	0.3	0.146985
4	0.4	0.19598
5	0.5	0.48995
6	0.6	0.58794
7	0.7	0.68593
8	0.8	0.78392

Fuente: elaboración propia

– **Para *Origanum vulgare***

Para esta prueba de igual forma se usaron volúmenes de (2,5µl - 30µl) para la determinación de los halos de inhibición por el método de difusión en disco (Kirby Bauer) contra las cepas de *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*. Luego de la incubación a 37°C por 24 h se observó en la lectura de las placas que hubo crecimiento bacteriano, mas no micótico; por lo que se determinó que la actividad del aceite esencial de orégano es potente frente a *Cándida albicans*. Por lo cual se propuso trabajar con diluciones de igual forma que en el caso de la canela, se realizó la dilución con el mismo disolvente orgánico (DMSO) con una proporción 1/2.

Las concentraciones se establecieron mediante el siguiente cálculo para *Enterococcus faecalis* (Tabla N° 3):

$$\begin{aligned}
 d &= 904.4 \text{ mg/ml} \\
 (1\text{ml})1000 \mu\text{l} &\rightarrow 904.4 \text{ mg} \\
 2.5 \mu\text{l} &\rightarrow x \\
 x &= 2.261\text{mg}/\mu\text{l}
 \end{aligned}$$

Para el ensayo con *Cándida albicans* se usaron volúmenes inferiores a los primeros (0.1µl – 0.8µl), con una concentración de dilución de 452.2 mg/ml , determinándose los volúmenes requeridos de la siguiente manera:

$$\begin{aligned}
 d &= 452,2 \text{ mg/ml} \\
 (1\text{ml})1000 \mu\text{l} &\rightarrow 452,2\text{mg} \\
 0,1 \mu\text{l} &\rightarrow x \\
 x &= 0,04522\text{mg}/\mu\text{l}
 \end{aligned}$$

Tabla 3. Concentraciones del aceite esencial *Origanum vulgare* en los discos para las cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC29212

N° de tratamiento	Volumen (µl)	Concentración [] (mg/µl)
1	2.5	2.261
2	5.0	4.522
3	7.5	6.783
4	10.0	9.044
5	12.5	11.305
6	15.0	13.566
7	17.5	15.827
8	20.0	18.088
9	22.5	20.349
10	25.0	22.61
11	27.5	24.871
12	30.0	27.132

Fuente: elaboración propia

Tabla 4. Concentraciones del aceite esencial *Origanum vulgare* en los discos para las cepas de *Cándida albicans* ATCC10231

N° de tratamiento	Volumen (µl)	Concentración [] (mg/µl)
1	0.1	0.04522
2	0.2	0.09044
3	0.3	0.13566
4	0.4	0.18088
5	0.5	0.4522
6	0.6	0.54264
7	0.7	0.63308
8	0.8	0.72352

Fuente: elaboración propia

Para la asociación (*Cinnamomum zeylanicum* Breyn + *Origanum vulgare*)

Igualmente se usaron volúmenes de (2,5µl - 30µl) para la determinación de los halos de inhibición por el método de difusión en disco (Kirby Bauer) contra las cepas bacterianas de *Enterococcus faecalis*. Se propuso trabajar con diluciones para la prueba con *Candida albicans* de igual forma que en el caso de la canela y el orégano, se realizó la dilución de la misma forma con dimetilsulfóxido 10% (DMSO) con una proporción 1/2. Las concentraciones se establecieron mediante el siguiente cálculo:

$$\begin{aligned}
 d &= 930,65 \text{ mg/ml} \\
 (1\text{ml})1000 \mu\text{l} &\rightarrow 930,65\text{mg} \\
 2,5 \mu\text{l} &\rightarrow x \\
 x &= 2,326625 \text{ mg}/\mu\text{l}
 \end{aligned}$$

Para el ensayo con *Cándida albicans* se usaron volúmenes inferiores (0,1µl – 0,8µl), con una concentración de dilución de 465,325mg/ml, debido a su proporción 1/2, determinándose los volúmenes requeridos de la siguiente manera:

$$\begin{aligned}
 d &= 465,325\text{mg/ml} \\
 (1\text{ml})1000 \mu\text{l} &\rightarrow 465,325\text{mg} \\
 0,1 \mu\text{l} &\rightarrow x \\
 x &= 0,0465325\text{mg}/\mu\text{l}
 \end{aligned}$$

Tabla 5. *Concentraciones de la asociación (Cinnamomum zeylanicum Breyn + Origanum vulgare) en los discos para las cepas de Enterococcus faecalis ATCC29212*

N° de tratamiento	Volumen (µl)	Concentración [] (mg/µl)
1	2.5	2.326625
2	5.0	4.65325
3	7.5	6.979875
4	10.0	9.3065
5	12.5	11.633125
6	15.0	13.95975
7	17.5	16.286375
8	20.0	18.613
9	22.5	20.939625
10	25.0	23.26625
11	27.5	25.592875
12	30.0	27.9195

Fuente: elaboración propia

Tabla 6. *Concentraciones Asociación (Cinnamomum zeylanicum Breyn + Origanum vulgare) en los discos para las cepas de Cándida albicans ATCC10231*

N° de tratamiento	Volumen (µl)	Concentración [] (mg/µl)
1	0.1	0.0465325
2	0.2	0.093065
3	0.3	0.1395975
4	0.4	0.18613
5	0.5	0.465325
6	0.6	0.55839
7	0.7	0.651455
8	0.8	0.74452

Fuente: elaboración propia

3.7.1.5. *Determinación de sensibilidad antibacteriana por el método de disco difusión*

Según la NCCLS (49). Se determina el grado sensibilidad bacteriana por difusión del disco (Kirby-Bauer).

a. **Preparación de discos de difusión**

Los discos de papel filtro de 6 mm de diámetro fueron preparados para contener una cantidad determinada de Aceite esencial de canela y orégano. Para esto se utilizaron 12 tratamientos con 8 repeticiones por cada tratamiento frente a las cepas de *Enterococcus faecalis*; y 8 tratamientos con 8 repeticiones por cada tratamiento para *Candida albicans*, haciendo un total de 480 discos. La preparación consistió en la esterilización mediante desnaturalización de los discos con antibióticos, estos fueron colocados en un vaso de precipitado (Capacidad de 400 ml) con agua destilada aproximadamente 250 ml y llevados a la autoclave a una presión de 15 libras (120° C) por 15 minutos. Luego el agua destilada fue desechada, los discos de difusión fueron separados individualmente en las paredes del vaso para ser a calor seco a una temperatura de 170°C por 1 hora en la estufa de laboratorio.

Control negativo: fue registrado por un disco de sensibilidad de antibiótico desnaturalizado el cual fue impregnado con agua destilada para descartar la actividad antimicrobiana del mismo. Con el fin de saber entre cuales de estas concentraciones presenta mayor formación de halo de inhibición; incubándolo a 37°C por un espacio de 24 horas.

b. **Preparación de los medios**

El principal medio de cultivo Agar Mueller Hinton fue preparado según las instrucciones del fabricante (34g por cada 1000ml) repartiéndose luego el medio en 216 placas Petri (100 mm x 15 mm) a razón de un

volumen de 15ml por placa ,12 placas para el control negativo y positivo (agua destilada estéril).

Se prepararon también según las instrucciones del fabricante los siguientes medios Agar Nutritivo (AN) 28g por cada 1000ml, Agar Papa Dextrosa (PDA) 39g por cada 1000ml y caldo de BHI (infusión cerebro corazón) 37g por cada 1000ml, utilizados para la activación de las cepas microbianas *Enterococcus Faecalis* y *Candida albicans* . Haciendo un total de 12 tubos de BHI con 50 ml cada uno; 6 viales de AN con 30ml cada uno y 6 viales de PDA de 30ml por cada uno.

Se dejaron solidificar tanto las placas Petri como los viales a temperatura ambiente por 15 minutos, se rotularon las placas en la parte posterior con el nombre de cada concentración y sustancia a investigar. Se realizó la esterilización de todos los medios de cultivo utilizados, sometidos a calor húmedo en autoclave a una presión de 15 libras (120 ° C) por 15 minutos.

c. Activación de las cepas microbianas

Con un asa bacteriológica se tomó una asada microbiana de *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* para sembrarlas en los viales de AN y PDA mediante siembra por aislamiento por un espacio de 24 horas a 37°C para su posterior resembrado, de aquí en adelante las cepas bacterianas se encontraban en actividad metabólica (cultivos jóvenes).

d. Preparación del inóculo microbiano

Luego de ser cultivados para su mantención en viales de AN para *Enterococcus faecalis* y PDA para *Candida albicans* (cepas microbianas joven con principios metabólicos activos); fueron activadas en Caldo BHI, mediante la técnica de siembra por suspensión se homogenizó las colonias

y se incubaron a 37 °C por el lapso de 6 a 8 horas. Luego se homogenizaron nuevamente las colonias con ayuda del vórtex; para asegurar su total dispersión en el caldo BHI y seguidamente se estandarizó por comparación de turbidez del tubo 0,5 de la escala de Mc Farland cuya población micótica y bacteriana fueron de 1,5 X10⁸ UFC/ml.

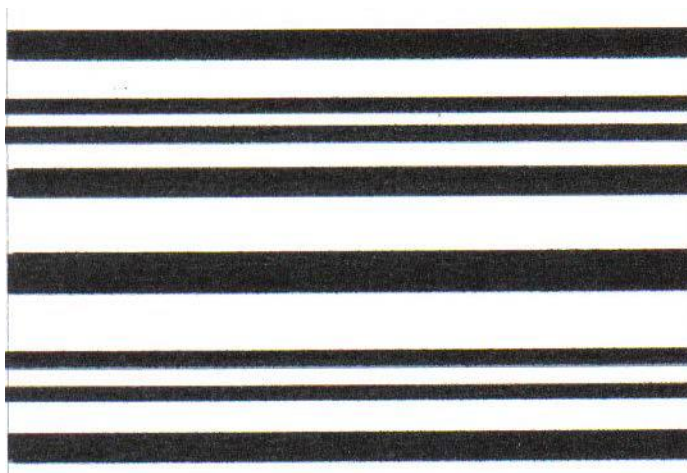


Figura 1. Tabla de comparación para escala de Mc Farland

e. Inoculación de la placa

Se inoculó la placa de agar Müeller Hinton utilizando la suspensión estandarizada de *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* a una concentración de 1,5 x 10⁸ UFC/ml. Se depositó 100µl del inóculo sobre la superficie del agar de cada placa correspondientemente, mediante la técnica de diseminación hasta que el inóculo quede distribuido de modo homogéneo. Se dejó secar durante 15 a 20 minutos a temperatura ambiente.

f. Dispensación de discos a placas inoculadas

Se procedió a utilizar las micropipetas a diferentes volúmenes para los aceites esenciales de canela y de orégano, luego se incorporó un disco 6 mm

de diámetro previamente esterilizados (“Discos de sensibilidad sin antibióticos”), los discos fueron embebidos con:

- Aceite esencial de canela vs *Enterococcus Faecalis*: 2.5µl; 5.0 µl; 7.5µl; 10µl; 12.5µl; 15 µl ;17.5µl; 20µl; 22,5 µl;25 µl; 25 µl;27,5 µl y 30 µl.
- Aceite Esencial de canela vs *Candida albicans* :0.1 0.2 µl ;0.3 µl ,0.4 µl;0.5µl 0.6 µl;0.7 µl; y 0.8 µl
- Aceite esencial de orégano vs *Enterococcus Faecalis*: 2.5µl; 5.0 µl; 7.5µl; 10µl; 12.5µl; 15 µl ;17.5µl; 20µl; 22,5 µl;25 µl; 25 µl;27,5 µl y 30 µl.
- Aceite Esencial de Orégano vs *Candida albicans* :0.1 0.2 µl ;0.3 µl ,0.4 µl;0.5µl 0.6 µl;0.7 µl; y 0.8 µl
- Aceite esencial de la asociación vs *Enterococcus Faecalis*: 2.5µl; 5.0 µl; 7.5µl; 10µl; 12.5µl; 15 µl ;17.5µl; 20µl; 22,5 µl;25 µl; 25 µl;27,5 µl y 30 µl.
- Aceite Esencial de la asociación vs *Candida albicans*: 0.1 0.2 µl; 0.3 µl ,0.4 µl; 0.5µl 0.6 µl; 0.7 µl; y 0.8 µl.

g. Incubación

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

h. Lectura

Para la lectura se usó un calibrador digital (vernier) para obtener mediciones más exactas de los halos de inhibición sobre el crecimiento del microorganismo alrededor del disco. El diámetro de la zona de inhibición es directamente proporcional a la actividad antimicrobiana de cada aceite esencial sobre las cepas *Enterococcus Faecalis* y *Candida albicans*. Para la interpretación de los resultados se tomaron como referencias las pautas por Duraffourd y Lapraz (49) que considera la actividad de los aceites esenciales como:

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

- Sensibilidad limite (sensible = +) de 9 a 14 mm.
- Sensibilidad media (muy sensible = ++) de 15 a 19 mm.
- Sumamente sensible (S.S. = +++) si fue igual o superior a 20 mm.

3.7.1.6. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

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

a) Preparación del inóculo bacteriano *Enterococcus Faecalis ATCC29212* y micótico *Candida albicans ATCC10231*

Los microorganismos cultivados en los viales de AN y PDA para su mantención; fueron reactivados y enriquecidos en caldo BHI, se homogenizó las colonias y se incubaron a 37 °C por el lapso de 6 horas hasta llegar a una concentración de 1.5 X10⁸ UFC/ml y comparada con el tubo 0,5 de la escala de Mc Farland.

b) Preparación de la solución madre

Se preparó una solución madre (SM) de 20 000 µl totales, que contenían:

Aceite esencial = 1000 µl +

Dimetilsulfóxido 10% (DMSO) = 1000 µl

Caldo de infusión de cerebro corazón(BHI) = 18000 µl

TOTAL SM = 20000 µl

La concentración se calculó de la siguiente manera:

- Para el aceite de *Cinnamomum zeylanicum Breyn*

Donde:

$$[\] = 979,9 \text{ mg/ml}$$

Sabiendo que:

En 20000 μl de SM existe 1000 μl de aceite esencial

$$20000 \mu\text{l} = (1\text{ml})1000 \mu\text{l} \rightarrow 979,9\text{mg}$$

Para el caso de *Enterococcus Faecalis* y *Candida albicans* se establecieron las concentraciones de SM de la siguiente manera:

$$20000 \mu\text{l} \rightarrow 979,9\text{mg}$$

$$120 \mu\text{l} \rightarrow x$$

$$x = 5,8794 \text{ mg}/\mu\text{l}$$

$$20000 \mu\text{l} \rightarrow 979,9\text{mg}$$

$$0,3 \mu\text{l} \rightarrow x$$

$$x = 0,0146985 \text{ mg}/\mu\text{l}$$

Entonces la solución madre para *Enterococcus Faecalis* está concentrada con 5,8794 mg/ μl de aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum Breyn.* Y para *Candida albicans* está concentrada con 0,0146985 mg/ μl .

- Para el aceite de *Origanum vulgare L.*

Donde:

$$[\] = 904,4 \text{ mg/ml}$$

Sabiendo que:

En 20000 μl de SM existe 1000 μl de aceite esencial

$$20000 \mu\text{l} = (1\text{ml})1000 \mu\text{l} \rightarrow 904,4 \text{ mg}$$

Para el caso de *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* se establecieron las concentraciones de SM de la siguiente manera:

$$20000 \mu\text{l} \rightarrow 904,4\text{mg}$$

$$900 \mu\text{l} \rightarrow x$$

$$x = 40,698 \text{ mg}/\mu\text{l}$$

$$20000 \mu\text{l} \rightarrow 904,4\text{mg}$$

$$0,6 \mu\text{l} \rightarrow x$$

$$x = 0,027132 \text{ mg}/\mu\text{l}$$

Por consiguiente la solución madre para *Enterococcus Faecalis* está concentrada con 40,698 mg/μl de aceite esencial de *Origanum vulgare L.* Y para *Candida albicans* está concentrada con 0,027132 mg/μl.

- Para la asociación *Cinnamomum zeylanicum Breyn + Origanum vulgare L.*

Donde:

$$[] = 930,65 \text{ mg/ml}$$

Sabiendo que:

En 20000 μl de SM existe 1000 μl de aceite esencial

$$20000 \mu\text{l} = (1\text{ml})1000 \mu\text{l} \rightarrow 930,65 \text{ mg}$$

Para el caso de *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* se establecieron las concentraciones de SM de la siguiente manera:

$$20000 \mu\text{l} \rightarrow 930,65\text{mg}$$

$$750 \mu\text{l} \rightarrow x$$

$$x = 34,899375 \text{ mg}/\mu\text{l}$$

$$20000 \mu\text{l} \rightarrow 930,65 \text{ mg}$$

$$3,0 \mu\text{l} \rightarrow x$$

$$x = 0,1395975\text{mg}/\mu\text{l}$$

Por consiguiente la solución madre para *Enterococcus Faecalis* esta concentrada con de aceite esencial (*Cinnamomum zeylanicum Breyn + Origanum vulgare L.*) en 34,899375 mg/ul .Y para *Candida albicans* está concentrada con 0,1395975mg/μl.

c) Preparación de la Concentración mínima inhibitoria (CMI) para *Enterococcus faecalis* ATCC29212 y *Candida albicans* ATCC10231

Se realizaron distintos tratamientos para cada prueba a los cuales se les agregó caldo de BHI, solución madre y cepas de *Enterococcus faecalis* y/o *Candida albicans*.

Para hallar la concentración final de la solución se tomó en cuenta que la concentración inicial de la solución madre que fue diluida en 3000 µl de volumen final, obteniendo el cálculo de la siguiente manera:

$$[]_{INICIAL} = 5,8794 \text{ mg}/\mu\text{l}$$

$$[] = 5,8794 \text{ mg}/3\text{ml}$$

$$[]_{FINAL} = 1,9598 \text{ mg}/\text{ml}$$

Tabla 7. Concentración final de los tratamientos de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn para la prueba de Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) para *Enterococcus faecalis* ATCC29212

TUBO	[] INICIAL mg	VOLUMEN SM	BHI ul	VOL. CEPA	VOL FINAL	[] FINAL mg/ml
T ₁	5,8794	120.0	2780	100	3000	1,9598
T ₂	6,0018875	122.5	2777,5	100	3000	2,000629167
T ₃	6,124375	125.0	2775	100	3000	2,041458333
T ₄	6,2468625	127.5	2772,5	100	3000	2,0822875
T ₅	6,36935	130.0	2770	100	3000	2,123116667
T ₆	6,4918375	132.5	2767,5	100	3000	2,163945833
T ₇	6,614325	135.0	2765	100	3000	2,204775
T ₈	6,7368125	137.5	2762,5	100	3000	2,245604167
T ₉	6,8593	140.0	2760	100	3000	2,286433333
T ₁₀	6,9817875	142.5	2757,5	100	3000	2,3272625
T ₁₁	7,104275	145.0	2755	100	3000	2,368091667
T ₁₂	7,2267625	147.5	2752,5	100	3000	2,408920833
T ₁₃	7,34925	150.0	2750	100	3000	2,44975

Fuente: elaboración propia

De igual forma para hallar la concentración final en los posteriores tratamientos se tomó en cuenta la dilución en 3000 μ l (3ml) de solución final.

Tabla 8. Concentración final de los tratamientos de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn para la prueba de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para *Candida albicans* ATCC10231

TUBO	[\square]INICIAL mg	VOLUMEN SM	BHI ul	VOL.CEPA	VOL FINAL	[\square]FINAL mg/ml
T ₁	0,0146985	0.3	2899,7	100	3000	0,0048995
T ₂	0,029397	0.6	2899,4	100	3000	0,009799
T ₃	0,0440955	0.9	2899,1	100	3000	0,0146985
T ₄	0,058794	1.2	2898,8	100	3000	0,019598
T ₅	0,0734925	1.5	2898,5	100	3000	0,0244975
T ₆	0,088191	1.8	2898,2	100	3000	0,029397
T ₇	0,1028895	2.1	2897,9	100	3000	0,0342965
T ₈	0,117588	2.4	2897,6	100	3000	0,039196
T ₉	0,1322865	2.7	2897,3	100	3000	0,0440955
T ₁₀	0,146985	3.0	2897,0	100	3000	0,048995

Fuente: elaboración propia

Tabla 9. Concentración final de los tratamientos de *Origanum vulgare* para la prueba de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para *Enterococcus faecalis* ATCC29212

TUBO	[\square]INICIAL mg	VOLUMEN SM	BHI ul	VOL.CEPA	VOL FINAL	[\square]FINAL mg/ml
T ₁	40,698	900.0	2000	100	3000	13,566
T ₂	41,3763	915.0	1985	100	3000	13,7921
T ₃	42,0546	930.0	1970	100	3000	14,0182
T ₄	42,7329	945.0	1955	100	3000	14,2443
T ₅	43,4112	960.0	1940	100	3000	14,4704
T ₆	44,0895	975.0	1925	100	3000	14,6965
T ₇	44,7678	990.0	1910	100	3000	14,9226
T ₈	45,4461	1005.0	1895	100	3000	15,1487
T ₉	46,1244	1020.0	1880	100	3000	15,3748
T ₁₀	46,8027	1035.0	1865	100	3000	15,6009
T ₁₁	47,481	1050.0	1850	100	3000	15,827

Fuente: elaboración propia

Tabla 10. Concentración final de los tratamientos de *Origanum vulgare* para la prueba de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para *Candida albicans* ATCC10231

TUBO	[] INICIAL mg	VOLUMEN SM	BHI ul	VOL. CEPA	VOL FINAL	[] FINAL mg/ml
T ₁	0,027132	0.6	2899,4	100	3000	0,009044
T ₂	0,036176	0.8	2899,2	100	3000	0,01205867
T ₃	0,04522	1.0	2899	100	3000	0,01507333
T ₄	0,054264	1.2	2898,8	100	3000	0,018088
T ₅	0,063308	1.4	2898,6	100	3000	0,02110267
T ₆	0,072352	1.6	2898,4	100	3000	0,02411733
T ₇	0,081396	1.8	2898,2	100	3000	0,027132
T ₈	0,09044	2.0	2898	100	3000	0,03014667
T ₉	0,099484	2.2	2897,8	100	3000	0,03316133
T ₁₀	0,108528	2.4	2897,6	100	3000	0,036176
T ₁₁	0,117572	2.6	2897,4	100	3000	0,03919067
T ₁₂	0,126616	2.8	2897,2	100	3000	0,04220533

Fuente: elaboración propia

Tabla 11. Concentración final de la asociación *Origanum vulgare* + *Cinnamomum zeylanicum* Breyn para la prueba de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para *Enterococcus faecalis* ATCC29212

TUBO	[] INICIAL mg	VOLUMEN SM	BHI ul	VOL. CEPA	VOL FINAL	[] FINAL mg/ml
T1	34,899375	750.0	2150	100	3000	11,633125
T2	35,5973625	765.0	2135	100	3000	11,8657875
T3	36,29535	780.0	2120	100	3000	12,09845
T4	36,9933375	795.0	2105	100	3000	12,3311125
T5	37,691325	810.0	2090	100	3000	12,563775
T6	38,3893125	825.0	2075	100	3000	12,7964375
T7	39,0873	840.0	2060	100	3000	13,0291
T8	39,7852875	855.0	2045	100	3000	13,2617625
T9	40,483275	870.0	2030	100	3000	13,494425
T10	41,1812625	885.0	2015	100	3000	13,7270875
T11	41,87925	900.0	2000	100	3000	13,95975

Fuente: elaboración propia

Tabla 12. Concentración final de la asociación *Origanum vulgare* + *Cinnamomum zeylanicum* Breyn para la prueba de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para *Candida albicans* ATCC10231

TUBO	[] INICIAL mg	VOLUMEN SM	BHI ul	VOL. CEPA	VOL FINAL	[] FINAL mg/ml
T ₁	0,1395975	3.0	2897	100	3000	0,0465325
T ₂	0,15355725	3.3	2896,7	100	3000	0,05118575
T ₃	0,167517	3.6	2896,4	100	3000	0,055839
T ₄	0,18147675	3.9	2896,1	100	3000	0,06049225
T ₅	0,1954365	4.2	2895,8	100	3000	0,0651455
T ₆	0,20939625	4.5	2895,5	100	3000	0,06979875
T ₇	0,223356	4.8	2895,2	100	3000	0,074452
T ₈	0,23731575	5.1	2894,9	100	3000	0,07910525
T ₉	0,2512755	5.4	2894,6	100	3000	0,0837585
T ₁₀	0,26523525	5.7	2894,3	100	3000	0,08841175
T ₁₁	0,279195	6.0	2894	100	3000	0,093065

Fuente: elaboración propia

d) Incubación

Se llevó a incubación en un tiempo de 24 horas a 37°C. Los diferentes tratamientos se compararon con los siguientes controles: Control positivo (100 µl DMSO + 2000 µl BHI + 100 µl Solución microbiana) y Control negativo (100 µl DMSO + 2000 µl caldo BHI)

e) Lectura

Al cabo de las 24 horas se observó la turbidez de los tratamientos lo cual indicó la presencia de microorganismos. El tubo que no presente turbidez indica la ausencia del crecimiento microbiano (igualando al control negativo), que se designa como la Concentración mínima inhibitoria (CMI).

3.7.1.7. Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB)

Se tomaron los tubos que no presentan turbidez; de cada uno de ellos se sembró 100 µl de solución por diseminación en placas de Agar Mueller

Hinton. Las placas fueron incubadas a 37 °C por 24 horas, transcurrido este tiempo se contó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) presentes para cada concentración del aceite esencial.

3.7.1.8. Determinación de la concentración mínima fungicida (CMF)

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

3.7.1.2 De coordinación

Se coordinó la realización del análisis físico-químico de los aceites esenciales de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn y *Origanum vulgare* con el laboratorio de la Universidad Católica de Santa María de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas “Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad, con sede en la ciudad de Arequipa en el Perú:

- Se entregó la muestra de aceite esencial de orégano obteniéndose el informe ANA16D19.003922A, en el que se reporta la determinación cualitativa de metabolitos secundarios, cromatografía gaseosa con detección de masas (denominación NIST); determinación cuantitativa de metabolitos secundarios (%) cromatografía gaseosa con detección de masas, método de cuantificación, por normalización interna (ÁREA). (Anexo)
- -De igual manera se solicitó al laboratorio certificado, la realización del ensayo con el aceite esencial de canela con emisión de informe número ANA16D19.003922B, iniciándose el ensayo el 22 de mayo 2019. (Anexo)

3.7.1.3 Del desarrollo del experimento

– Técnicas

Para la obtención de los datos, se emplearon las siguientes técnicas:

Observación sistemática

Pruebas de evaluación

– Instrumentos

Bitácora de trabajo de campo, para establecer los resultados de la prueba de concentración mínima inhibitoria (CMI).

CAPITULO IV

RESULTADOS

4.1 DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO DE CAMPO

El trabajo de campo comprendió la entrega de las muestras de las especies vegetales en el laboratorio de Biología y Microbiología de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, a fin de obtener la extracción de los aceites esenciales de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn y *Origanum vulgare* L, en enero de 2019.

En un tercer momento, para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se procedió a la aplicación del método de macrodilución en medio líquido, para la preparación de la solución madre, la preparación del inóculo de *Candida albicans* ATCC10231 y *Enterococcus faecalis* ATCC29212 en una macrodilución en medio líquido. La ejecución de las pruebas en laboratorio de Biología y Microbiología de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann (Tacna) se realizó en los meses de febrero hasta abril de 2019.

Posteriormente, se entregaron las muestras de los aceites esenciales en el Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas de la Universidad Católica de Santa María “de Arequipa. Los datos recolectados se procesaron con el uso del software estadístico (SPSS) versión 20. Se aplicó un análisis univariado y para la prueba de hipótesis (fase inferencial) se utilizó la prueba ANOVA.

4.2 DISEÑO DE LA PRESENTACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados se presentaron siguiendo un orden lógico y metodológico

- Resultados descriptivos.
- Comprobación de las hipótesis.

4.3 RESULTADOS

Se presentan los resultados de los halos de inhibición, Concentración Mínima Inhibitoria, la Concentración Mínima Bactericida (CMB) y Concentración Mínima Fungicida (CMF).

4.3.1. Análisis físico químico del aceite esencial de canela y orégano

Tabla 13. Análisis físico químico del aceite esencial de canela: determinación cuantitativa de metabolitos secundarios

Tabla 13. Análisis físico químico del aceite esencial de canela: determinación cuantitativa de metabolitos secundarios

Nombre	%
1,3-Cyclohexadiene,1-methyl-4-(1-m	0,92
Benzene,1-methyl-2- (1-methylethyl)	1,11
Bicyclo(3,1.0)hexane,4-methylene-1	3,75
1,6-Octadien-3-ol,3,7-dimethyl	2,7
Benzenepropanal	0,39
3-Cyclohexen-1-ol,4-methyl-1-(1-me	0,89
3-Cyclohexen-1-methanol,alpha..	0,81
Cinnamaldehyde,(E)-	71
Phenol,2-methoxy-3-(2-propenyl)-	2,78
Copaene	0,49
Bicyclo(7.2.0)undec-4-ene,4,11,11-tr	4,26
2-Propen-1-ol,3-phenyl-,acetate,(E	7,54
-alpha.-Caryophyllene	0,96
2-Propenal,3-(2-methoxyphenyl)-	0,69
2-Methyl-Z,Z-3,13-octadecadienol	0,52
2,6,10,14,18,22-Tetracosahexaene,2,	1,18

Fuente: Laboratorio

La composición química del aceite esencial de canela está compuesta de 16 componentes químicos, los que son de utilidad farmacéutica. (Tabla 15)

Tabla 14***Análisis físico químico del aceite esencial de orégano: determinación cuantitativa de metabolitos secundarios***

Nombre	Área%
.beta._Myrcene	5,53
(+)-4-Carene	10,6
Benzene,1-methyl-4-(1-methyl	6,21
1S-.alpha.-Pinene	1,78
.alpha.-Pinene	24,44
Cis-.beta.-Terpineol	4,82
Bicyclo[4.1.0]hept-2-ene,3,7,7	3,83
1,6-Octadien-3-ol,3,7-dimethy	1,6
Cis-.beta.-Terpineol	13,37
2-Cyclohexen-1-ol,1-methyl-4	1,63
Terpineol,cis.-beta.-	0,58
Benzene,2-methoxy-4-methyl-	1,26
1,6-Ocatien-3-ol,3,7dimethy	12,52
Thymol	5,34
Benzenemethanol,4-(1-methyl	0,58
1,3,6-Heptatriene,2,5,6.trimet	0,49
2,6-Ocatiend-1-ol,3,7-dimethy	0,2
Caryophyllene	3,68
.alpha.-Caryophyllene	0,39
1,3,6-Heptatriene,2,5,6-trimet	1,14

Fuente: Laboratorio

La composición química del aceite esencial de orégano fue diversa, encontrándose veinte elementos químicos que son de utilidad farmacéutica. Cabe enfatizar que el porcentaje de alpha.-Pinene fue de 24,44%, Cis-.beta.-Terpineol con 13,37%, 1,6-Ocatien-3-ol, 3,7dimethy con 12,52% y (+)-4-Carene con 10,6 % destacó frente a los demás componentes, que presentaron una presencia con menor peso porcentual. (Tabla 14)

4.3.2. Halos de inhibición

Tabla 14. Halos de inhibición (mm) por acción del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn, *Origanum vulgare* y Asociación *Cinnamomum zeylanicum* Breyn+ *Origanum vulgare* sobre *Candida albicans* ATCC10231

Halo <i>Candida albicans</i>	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Breyn	8	34,5003	9,08029	3,21037	26,9090	42,0916	19,98	47,37
<i>Origanum vulgare</i>	8	38,0983	7,29093	2,57773	32,0029	44,1936	26,71	45,79
Asociación	8	32,1684	13,26210	4,68886	21,0810	43,2558	11,43	44,30
Total	24	34,9223	10,05039	2,05153	30,6784	39,1663	11,43	47,37

Fuente: elaboración propia

De acuerdo con los puntos de corte de Duraffourd y Lapraz (49):

Nula sensibilidad (-)	Inferior o igual a 8mm
Sensible (+)	De 9 a 14 mm
Muy sensible (++)	De 15 a 19 mm
Sumamente sensible (+++)	Igual o superior a 20 mm

De las repeticiones de cada grupo se obtuvo un valor promedio de los halos de inhibición para aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn (media=34,50), *Origanum vulgare* (media=38,09) y la asociación *Cinnamomum zeylanicum* Breyn + *Origanum vulgare* (media=32,16) frente a *Candida albicans*, siendo estas sustancias sumamente sensible, inclusive la asociación (+++). (Tabla 15)

Tabla 15. Halos de inhibición (mm) por acción del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn, *Origanum vulgare* y Asociación *Cinnamomum zeylanicum* Breyn+ *Origanum vulgare* sobre *Enterococcus faecalis* ATCC29212

Halo <i>Enterococcus</i> <i>faecalis</i>	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
<i>Cinnamomum</i> <i>zeylanicum</i> Breyn	12	24,951771	8,1722603	2,3591283	19,759364	30,144177	14,0588	35,3725
<i>Origanum</i> <i>vulgare</i>	12	14,558854	3,9571916	1,1423428	12,044575	17,073134	7,9563	21,6113
Asociación	12	18,289167	9,4757720	2,7354197	12,268548	24,309785	6,9363	30,6750

Fuente: elaboración propia

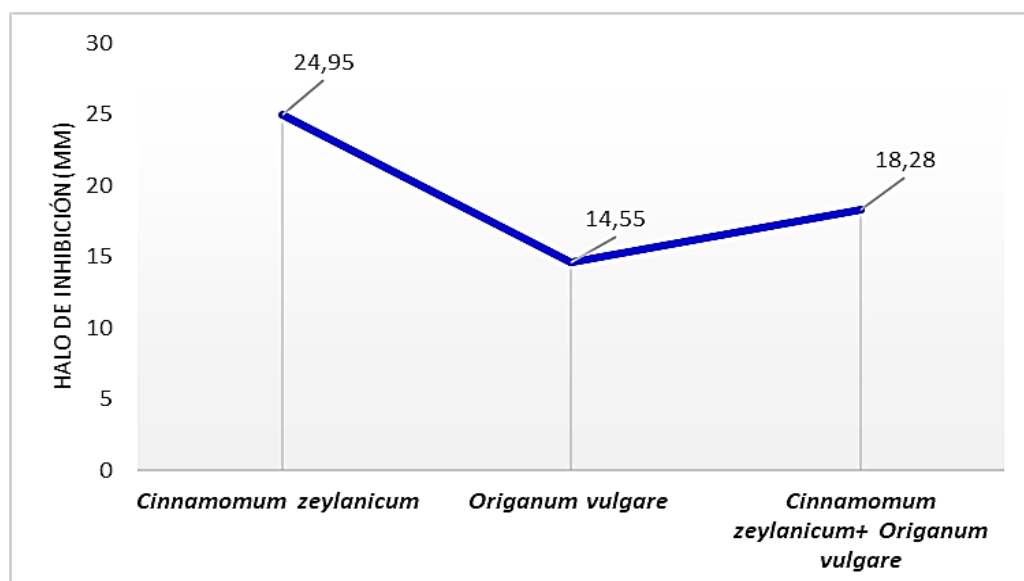


Figura 2. Media de los halos de inhibición por acción del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn, *Origanum vulgare* y Asociación *Cinnamomum zeylanicum* Breyn+ *Origanum vulgare* sobre *Enterococcus faecalis* ATCC29212

Interpretación

De acuerdo con los puntos de corte de Duraffourd y Lapraz (49):

Nula sensibilidad (-)	Inferior o igual a 8mm
Sensible (+)	De 9 a 14 mm
Muy sensible (+ +)	De 15 a 19 mm
Sumamente sensible (+ + +)	Igual o superior a 20 mm

De las repeticiones de cada grupo se obtuvo un valor promedio de los halos de inhibición para aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn (media=24,95) siendo esta sustancia sumamente sensible (+ + +) frente al *Enterococcus faecalis*. A diferencia del *Origanum vulgare* (media=14,55) y la asociación *Cinnamomum zeylanicum* Breyn + *Origanum vulgare* (media=18,28) frente al *Enterococcus faecalis*, que se corresponden con la categoría sensible (+ +). (Tabla 16 y Figura 2)

Tabla 16. Halos de inhibición (mm) por acción del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn, *Origanum vulgare* y Asociación *Cinnamomum zeylanicum* Breyn+ *Origanum vulgare* sobre a la *Candida albicans* ATCC10231

Halo <i>Candida albicans</i> ATCC10231		Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
N	Límite inferior				Límite superior			
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	12	34,5003	9,08029	3,21037	26,9090	42,0916	19,98	47,37
<i>Origanum vulgare</i>	12	38,0983	7,29093	2,57773	32,0029	44,1936	26,71	45,79
Asociación	12	32,1684	13,26210	4,68886	21,0810	43,2558	11,43	44,30

Fuente: elaboración propia

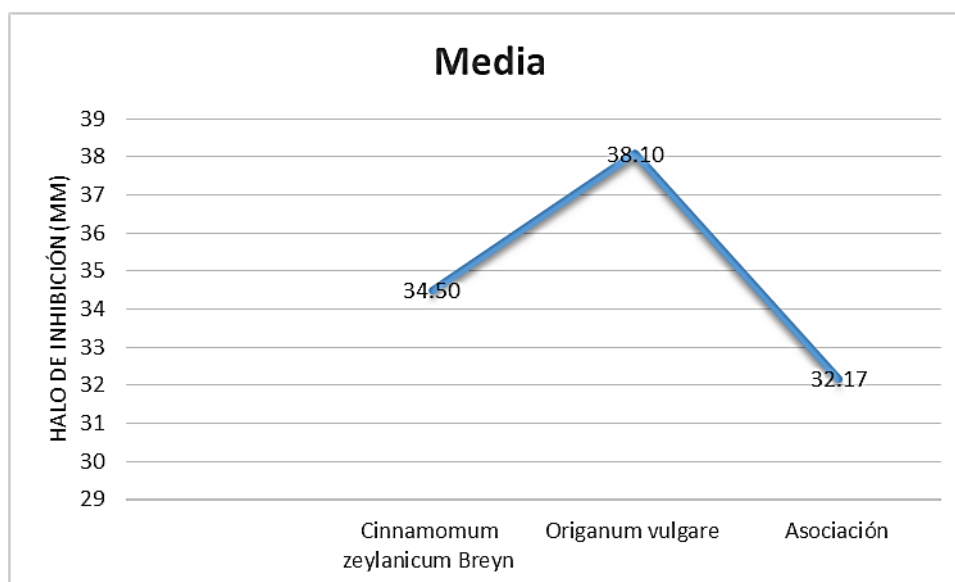


Figura 2. Media de Halos de inhibición (mm) por acción del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn, *Origanum vulgare* y Asociación *Cinnamomum zeylanicum* Breyn+ *Origanum vulgare* sobre a la *Candida albicans* ATCC10231

Interpretación

De acuerdo con los puntos de corte de Duraffourd y Lapraz (49):

Nula sensibilidad (-)	Inferior o igual a 8mm
Sensible (+)	De 9 a 14 mm
Muy sensible (+ +)	De 15 a 19 mm
Sumamente sensible (+ + +)	Igual o superior a 20 mm

De las repeticiones de cada grupo se obtuvo un valor promedio de los halos de inhibición para aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn (media=34,5003) frente a *Candida albicans* ATCC10231. Igualmente, el *Origanum vulgare* presenta una media=38,0983 y la asociación *Cinnamomum zeylanicum* Breyn + *Origanum vulgare* con una media=32,1684 frente a *Candida albicans* ATCC10231, que se corresponden con la categoría en las tres condiciones como muy sensible (+ + +). (Tabla 17 y Figura 3)

Tabla 17. Resultados de la medición de los halos de inhibición (eficacia antibacteriana) del aceite del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn frente al *Enterococcus faecalis* ATCC29212 por el método de difusión del disco (Kirby Bauer)

Aceite esencial de <i>Cinnamomum zeylanicum</i> <i>Breyn</i>			DISCOS DE INHIBICIÓN								PROMEDIO FINAL
Nº de tratamiento	Volumen (µl)	Concentración [] (mg/µl)	HALO 1 (mm)	HALO 2 (mm)	HALO 3 (mm)	HALO 4 (mm)	HALO 5 (mm)	HALO 6 (mm)	HALO 7 (mm)	HALO 8 (mm)	
1	2.5	2.44975	13.96	14.20	13.32	13.53	13.75	13.69	15.66	14.36	14.05875
2	5.0	4.8995	15.24	16.44	15.23	13.78	14.54	14.47	17.85	17.05	15.575
3	7.5	7.34925	17.35	17.09	17.33	17.48	18.04	17.27	18.52	17.68	17.595
4	10.0	9.799	18.30	18.08	17.27	17.62	17.03	16.70	17.18	17.83	17.50125
5	12.5	12.24875	21.97	22.24	18.73	18.28	17.74	19.09	19.21	19.48	19.5925
6	15.0	14.6985	22.16	22.27	21.04	19.28	17.45	17.95	19.98	20.49	20.0775
7	17.5	17.14825	30.72	28.25	27.23	28.47	29.81	30.97	31.15	31.38	29.7475
8	20.0	19.598	33.06	31.81	35.82	30.45	28.75	28.86	30.41	29.28	31.055
9	22.5	22.04775	33.62	30.92	31.46	28.90	29.31	29.64	36.17	35.54	31.945
10	25.0	24.4975	33.97	34.94	33.45	32.60	29.84	30.55	29.86	31.45	32.0825
11	27.5	26.94725	26.05	26.99	26.24	49.31	56.39	35.15	30.38	28.04	34.81875
12	30.0	29.397	37.45	35.62	36.01	38.50	39.00	32.45	32.45	31.5	35.3725
13	Control	Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fuente: elaboración propia

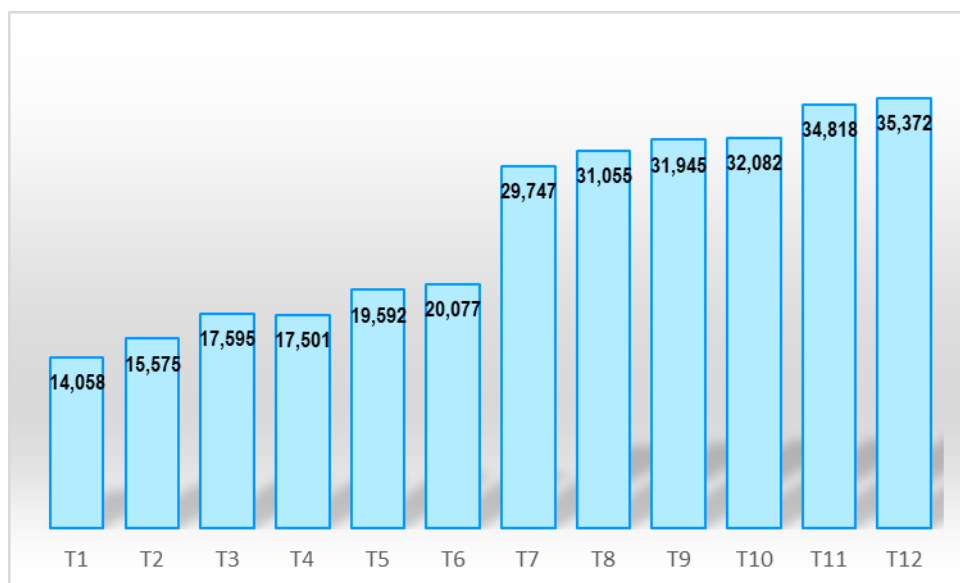


Figura 3. Resultados de la medición de los halos de inhibición (eficacia antibacteriana) del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum Breyn* frente al *Enterococcus faecalis* ATCC29212 por el método de difusión del disco (Kirby Bauer)

Fuente: elaboración propia

Interpretación

Según se aprecia en la Tabla 15, que se realizaron 12 tratamientos con aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum Breyn*, apreciándose que a partir del tratamiento 1, se produce una reacción de inhibición. La interpretación basada en el baremo de Duraffourd y Lapraz (49) que considera la eficacia antibacteriana sobre *Enterococcus faecalis* ATCC29212 en función de los halos de crecimiento son:

De acuerdo con los puntos de corte de Duraffourd y Lapraz (49):

Nula sensibilidad (-)	Inferior o igual a 8mm
Sensible (+)	De 9 a 14 mm
Muy sensible (+ +)	De 15 a 19 mm
Sumamente sensible (+ + +)	Igual o superior a 20 mm

De las repeticiones de cada grupo se obtuvo un valor promedio de los halos de inhibición para aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum Breyn* (media=24,95) siendo esta sustancia sumamente sensible (+ + +) frente al *Enterococcus faecalis*. A diferencia del *Origanum vulgare* (media=14,55) y la asociación *Cinnamomum zeylanicum Breyn* + *Origanum vulgare* (media=18,28) frente al *Enterococcus faecalis*, que se corresponden con la categoría sensible (+ +). Se observa, además, que el mayor valor se obtuvo con el tratamiento 12 con un halo de inhibición de 35,372 mm y el T1 un halo de 14,058 mm. (Tabla 18 y Figura 4)

Tabla 18. Prueba de la actividad antimicótica del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn frente *Candida albicans* ATCC10231 por el método de difusión del disco (Kirby Bauer)

ACEITE ESENCIAL DE CINNAMOMUM ZEYLANICUM BREYN			DISCOS DE INHIBICIÓN								
N° de tratamiento	Volumen (μl)	Concentración [] (mg/μl)	HALO 1 (mm)	HALO 2 (mm)	HALO 3 (mm)	HALO 4 (mm)	HALO 5 (mm)	HALO 6 (mm)	HALO 7 (mm)	HALO 8 (mm)	PROMEDIO FINAL
1	0.1	0.048995	12.79	14.15	22.98	22.01	22.95	23.19	23.07	18.71	19.98125
2	0.2	0.09799	24.79	25.50	24.57	25.42	24.75	23.71	26.14	26.61	25.18625
3	0.3	0.146985	32.00	35.98	30.88	31.20	35.00	29.43	27.91	31.88	31.785
4	0.4	0.19598	35.01	32.48	30.69	34.20	40.94	32.40	33.10	30.28	33.6375
5	0.5	0.48995	37.87	33.81	31.93	34.45	35.45	37.36	35.15	37.33	35.41875
6	0.6	0.58794	41.90	39.46	37.83	37.66	38.25	38.16	38.64	38.84	38.8425
7	0.7	0.68593	42.45	42.39	42.04	42.51	44.25	44.88	45.73	45.97	43.7775
8	0.8	0.78392	47.30	46.32	47.69	49.66	45.97	47.71	46.89	47.45	47.37375
9	Control	Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fuente: elaboración propia

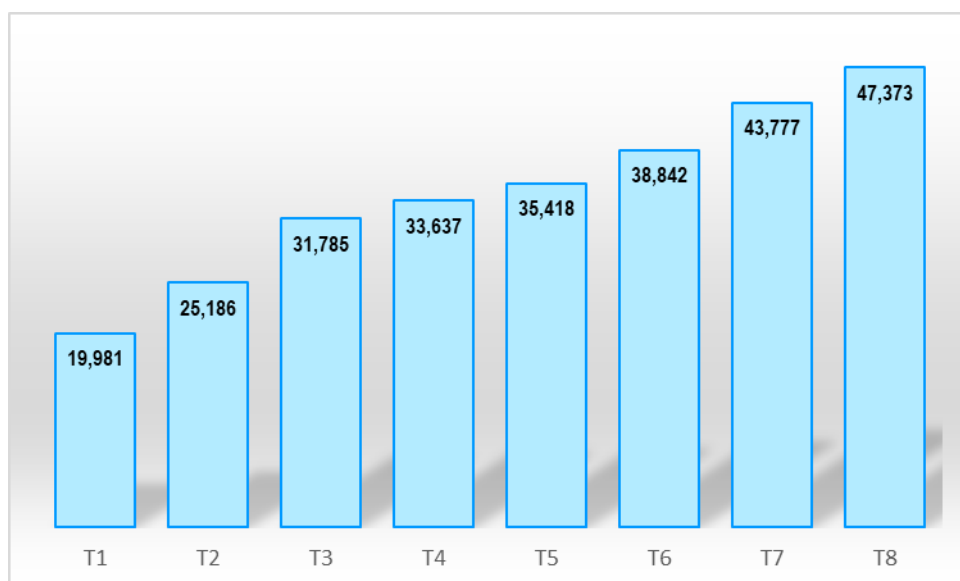


Figura 4. Prueba de la actividad antimicótica del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn frente *Candida albicans* ATCC10231 por el método de difusión del disco (Kirby Bauer)

Según se aprecia en la Tabla 19, que se realizaron 8 tratamientos con aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn, apreciándose que a partir del tratamiento 1, se produce una reacción de inhibición frente a *Candida albicans*. La interpretación basada en el baremo de Duraffour y Lapraz (49) es de muy sensible. Se observa, además, que el mayor valor se obtuvo con el tratamiento 8 con un halo de inhibición de 47,373 mm y el T1 un halo de 19,981 mm. (Tabla 19 y Figura 5)

Tabla 19. Prueba de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Origanum vulgare* frente a *Enterococcus faecalis* ATCC29212 por el método de difusión del disco (Kirby Bauer)

ACEITE ESENCIAL DE <i>Origanum vulgare</i>			DISCOS DE INHIBICIÓN								
N° de tratamiento	Volumen (µl)	Concentración [] (mg/µl)	HALO 1 (mm)	HALO 2 (mm)	HALO 3 (mm)	HALO 4 (mm)	HALO 5 (mm)	HALO 6 (mm)	HALO 7 (mm)	HALO 8 (mm)	PROMEDIO FINAL
1	2.5	2.261	10.86	8.32	7.66	7.36	7.96	7.45	6.89	7.15	7.96
2	5.0	4.522	12.17	10.42	11.16	10.91	8.57	9.36	10.47	10.74	10.48
3	7.5	6.783	10.01	11.83	12.31	12.86	11.91	12.36	10.99	10.27	11.57
4	10.0	9.044	12.38	12.44	12.46	11.63	12.49	11.88	12.19	11.21	12.09
5	12.5	11.305	13.18	13.55	12.88	12.39	13.75	12.04	11.3	11.88	12.62
6	15.0	13.566	12.58	12.24	13.66	12.65	14.75	12.96	12.37	13.53	13.09
7	17.5	15.827	15.67	15.99	15.24	14.08	15.12	14.77	15.27	15.22	15.17
8	20.0	18.088	16.80	16.02	16.86	16.05	16.93	17.07	14.3	13.59	15.95
9	22.5	20.349	18.52	18.39	16.14	15.25	16.94	20.32	17.59	17.59	17.59
10	25.0	22.61	16.65	18.61	18.02	18.35	14.61	15.64	18.25	18.42	17.32
11	27.5	24.871	19.51	20.17	18.39	18.53	19.00	19.39	17.01	22.11	19.26
12	30.0	27.132	24.48	25.60	29.02	18.06	21.29	18.42	18.88	17.14	21.61
13	Control	Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fuente: elaboración propia

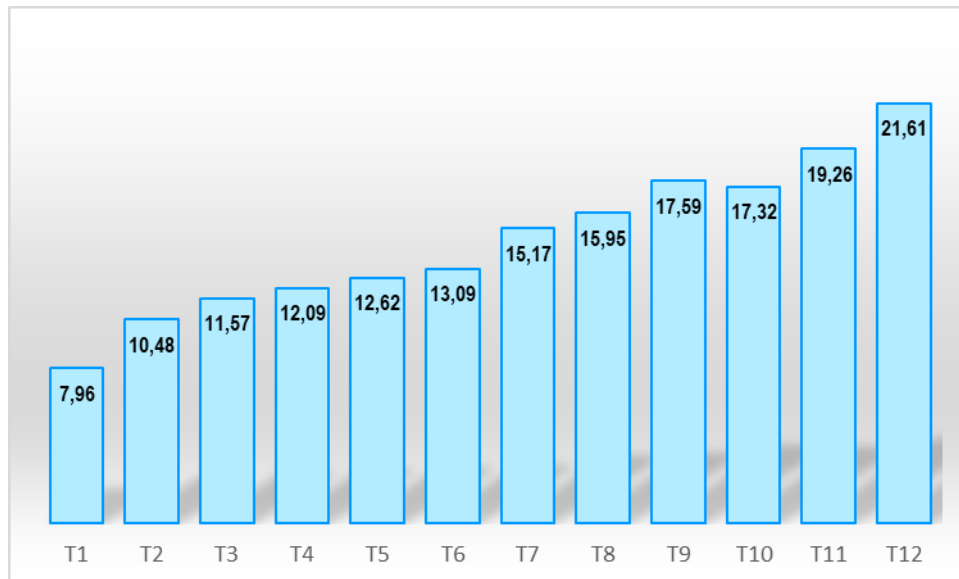


Figura 5. Prueba de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Origanum vulgare* frente a *Enterococcus faecalis* ATCC29212 por el método de difusión del disco (Kirby Bauer)

Según se aprecia en la Tabla 20, que se realizaron 12 tratamientos con aceite esencial de *Origanum vulgare*, apreciándose que a partir del tratamiento 1, se produce una reacción de inhibición frente a la *Enterococcus faecalis* ATCC29212. La interpretación basada en el baremo de Duraffourd y Lapraz (49) se considera muy sensible. Se observa además, que el mayor valor se obtuvo con el tratamiento 12 con un halo de inhibición de 21,61 mm y el T1 un halo de 7,96 mm y en el T7 un promedio de 15,17. (Tabla 20 y Figura 6)

Tabla 20. Prueba de la actividad antimicótica del aceite esencial de *Origanum vulgare* frente *Candida albicans* ATCC10231 por el método de difusión del disco (Kirby Bauer)

ACEITE ESENCIAL DE <i>Origanum vulgare</i>			DISCOS DE INHIBICIÓN								
N° de tratamiento	Volumen (µl)	Concentración [] (mg/µl)	HALO 1 (mm)	HALO 2 (mm)	HALO 3 (mm)	HALO 4 (mm)	HALO 5 (mm)	HALO 6 (mm)	HALO 7 (mm)	HALO 8 (mm)	PROMEDIO FINAL
1	0.1	0.04522	25.10	21.17	26.7	27.34	27.64	27.8	28.46	29.46	26.71
2	0.2	0.09044	30.82	31.78	32.73	32.63	30.44	29.96	29.55	29.58	30.94
3	0.3	0.13566	36.47	33.04	35.36	30.49	30.95	29.73	29.63	31.21	32.11
4	0.4	0.18088	34.62	31.84	45.45	43.33	42.38	33.81	35.56	38.11	38.14
5	0.5	0.4522	40.35	46.51	38.54	45.92	45.3	43.34	41.45	42.24	42.96
6	0.6	0.54264	40.71	41.22	43.99	44.69	46.03	42.29	44.23	43.63	43.35
7	0.7	0.63308	42.32	44.05	46.21	44.84	45.37	44.12	46.41	45.07	44.80
8	0.8	0.72352	46.71	45.73	44.78	45.57	45.79	45.23	46.18	46.33	45.79
9	Control	Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fuente: elaboración propia

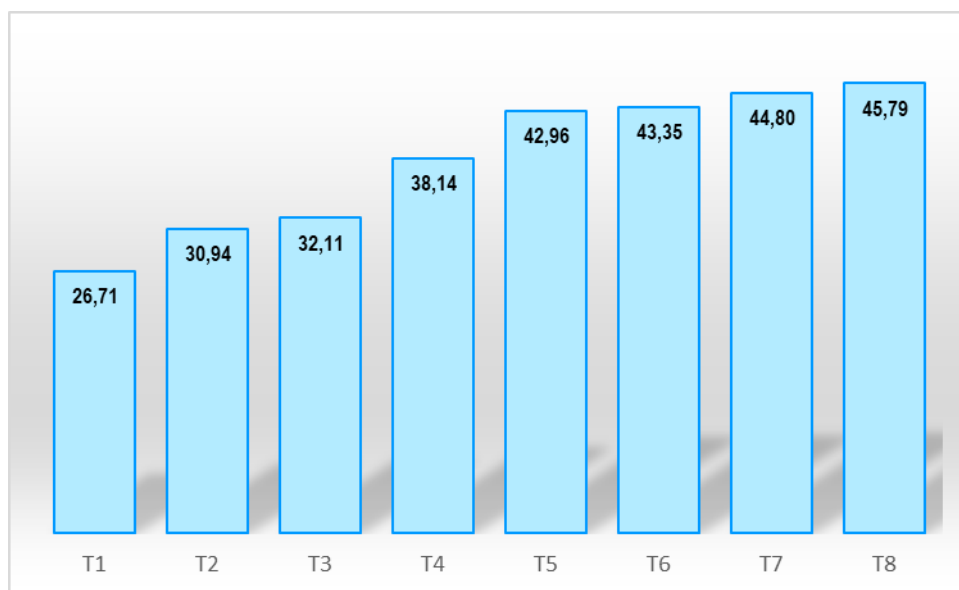


Figura 6. Prueba de la actividad antimicótica del aceite esencial de *Origanum vulgare* frente *Candida albicans* ATCC10231 por el método de difusión del disco (Kirby Bauer)

Según se observa en la Tabla 21, que se realizaron 8 tratamientos con aceite esencial de *Origanum vulgare*, apreciándose que a partir del tratamiento 1, se produce una reacción de inhibición frente a *Candida albicans*. La interpretación basada en el baremo de Duraffourd y Lapraz (49) es de muy sensible. Se aprecia, además, que el mayor valor se obtuvo con el tratamiento 8 con un halo de inhibición de 45,79 mm y el T1 un halo de 26,71 mm. (Tabla 21 y Figura 7)

Tabla 21. Prueba de la actividad antibacteriana de la asociación (*Cinnamomum zeylanicum* Breyn + *Origanum vulgare*) frente *Enterococcus faecalis* ATCC29212 por el método de difusión del disco (Kirby Bauer)

ACEITE ESENCIAL DE <i>Cinnamomum zeylanicum</i> Breyn + <i>Origanum vulgare</i>			DISCOS DE INHIBICIÓN								PROMEDIO FINAL
N° de tratamiento	Volumen (µl)	Concentración [] (mg/µl)	HALO 1 (mm)	HALO 2 (mm)	HALO 3 (mm)	HALO 4 (mm)	HALO 5 (mm)	HALO 6 (mm)	HALO 7 (mm)	HALO 8 (mm)	
1	2.5	2.326625	7.01	6.52	7.61	7.77	7.69	7.69	7.41	6.69	7.30
2	5.0	4.65325	7.66	7.61	6.85	6.27	5.76	7.37	7.04	6.93	6.94
3	7.5	6.979875	7.57	7.09	7.79	7.47	6.78	7.8	7.42	7.29	7.40
4	10.0	9.3065	8.97	8.29	8.29	9.61	9.48	9.74	10.2	9.96	9.32
5	12.5	11.633125	11.48	12.22	12.35	12.14	12.5	13.67	12.7	13.03	12.51
6	15.0	13.95975	15.23	14.47	15.21	17.18	15.98	18.78	18.15	17.85	16.61
7	17.5	16.286375	18.92	19.69	18.39	20.12	20.52	21.18	20.49	17.5	19.60
8	20.0	18.613	28.99	25.47	21.12	20.71	19.86	23.06	23.48	24.42	23.39
9	22.5	20.939625	26.54	25.00	27.12	26.30	32.74	25.77	29.96	22.07	26.94
10	25.0	23.26625	28.29	29.89	30.56	33.26	34.35	30.40	21.32	26.47	29.32
11	27.5	25.592875	24.01	24.39	24.99	39.78	36.48	33.73	29.78	22.67	29.48
12	30.0	27.9195	31.80	33.27	33.4	36.10	36.57	24.08	28.16	22.02	30.68
13	Control	Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fuente: elaboración propia

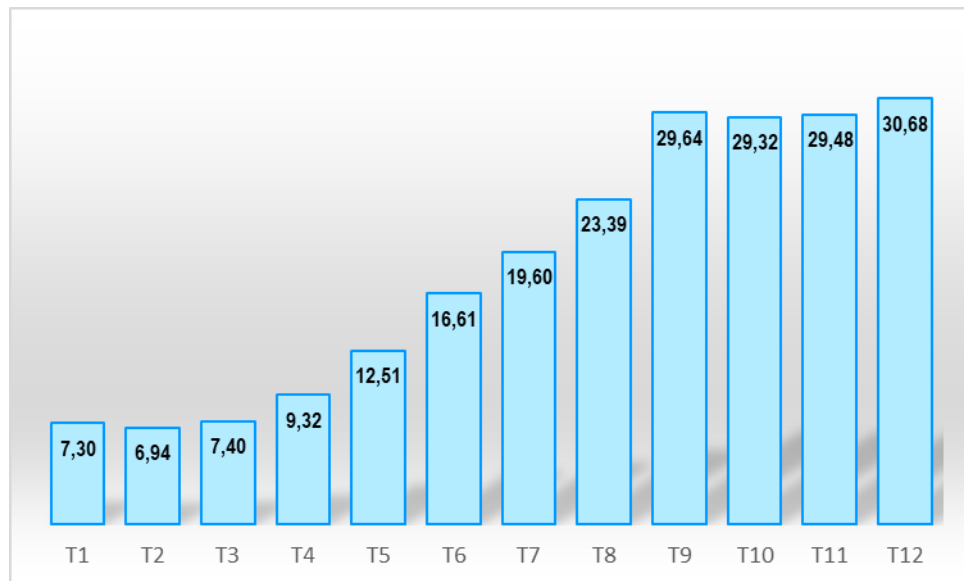


Figura 7. Prueba de la actividad antibacteriana de la asociación (*Cinnamomum zeylanicum Breyn* + *Origanum vulgare*) frente *Enterococcus faecalis* ATCC29212 por el método de difusión del disco (Kirby Bauer)

Interpretación

Según se aprecia que se realizaron 12 tratamiento con aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum Breyn* + *Origanum vulgare*, apreciándose que a partir del tratamiento 1, se produce una reacción de inhibición frente a la *Enterococcus faecalis* ATCC29212. La interpretación basada en el baremo de Duraffour y Lapraz (49) es muy sensible.

Asimismo, el mayor valor se obtuvo con el tratamiento 12 con un halo de inhibición de 30,68 mm y el T1 un halo de 7,30 mm, y en el T6 un promedio de halo de 16.61. (Tabla 22 y Figura 8)

Tabla 22. Prueba de la actividad antimicótica del Asociación de aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn + *Origanum vulgare* frente *Candida albicans* ATCC10231 por el método de difusión del disco (Kirby Bauer)

ACEITE ESENCIAL DE <i>Cinnamomum zeylanicum</i> <i>Breyn</i> + <i>Origanum vulgare</i>			DISCOS DE INHIBICIÓN								
N° de tratamiento	Volumen (μl)	Concentración [] (mg/μl)	HALO 1 (mm)	HALO 2 (mm)	HALO 3 (mm)	HALO 4 (mm)	HALO 5 (mm)	HALO 6 (mm)	HALO 7 (mm)	HALO 8 (mm)	PROMEDIO FINAL
1	0.1	0,0465325	10.00	8.25	9.70	12.16	14.00	13.79	12.09	11.42	11.43
2	0.2	0,093065	20.13	22.36	16.19	14.82	17.19	15.72	18.32	14.77	17.44
3	0.3	0,395975	19.84	17.67	21.20	23.12	25.13	25.27	24.18	24.62	22.63
4	0.4	0,18613	28.72	30.58	27.10	31.32	34.21	31.27	39.64	40.26	32.89
5	0.5	0,465325	42.59	43.46	44.05	42.06	42.37	44.18	43.50	41.80	43.00
6	0.6	0,55839	43.85	42.01	41.99	42.90	43.10	41.98	42.74	40.38	42.37
7	0.7	0,651455	43.71	44.15	43.52	41.01	42.32	42.34	44.31	45.04	43.30
8	0.8	0,74452	43.14	44.07	44.83	43.84	44.70	45.13	43.53	45.14	44.30
9	Control	Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fuente: elaboración propia

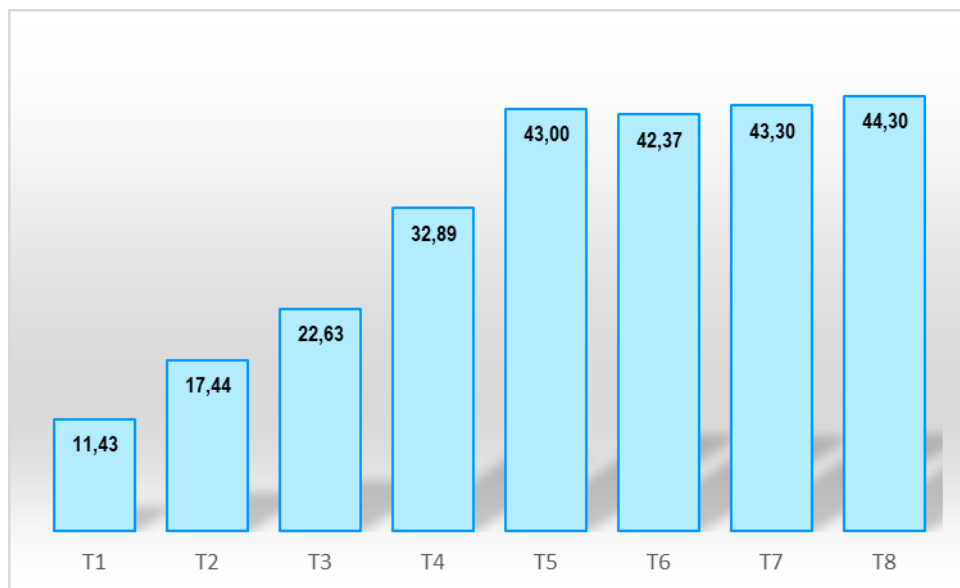


Figura 8. Prueba de la actividad antimicótica de la Asociación (*Cinnamomum zeylanicum* Breyn + *Origanum vulgare*) frente a *Candida albicans* ATCC10231 por el método de difusión del disco (Kirby Bauer)

Interpretación

Según se aprecia que se realizaron 8 tratamientos con aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn + *Origanum vulgare*, apreciándose que a partir del tratamiento 1, se produce una reacción de inhibición frente a *Candida albicans*. La interpretación basada en el baremo de Duraffourd y Lapraz (49) de muy sensible.

Se aprecia también, que el mayor valor se obtuvo con el tratamiento 8 con un halo de inhibición de 44,30 mm y el T1 un halo de 11,43 mm y especialmente se halló con el T 2 un promedio de halo de inhibición de 17.44. (Tabla 23 y Figura 9)

4.3.2. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Tabla 23. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn (canela) para *Enterococcus faecalis* (mg/ml)

TUBO	[] mg/ml	Turbidez (MIC)
1	1,9598	Positivo
2	2,000629167	Positivo
3	2,041458333	Positivo
4	2,0822875	Positivo
5	2,123116667	Positivo
6	2,163945833	Positivo
7	2,204775	Positivo
8	2,245604167	Positivo
9	2,286433333	Positivo
10	2,3272625	Positivo*
11	2,368091667	Negativo **-/a
12	2,408920833	Negativo-/b
13	2,44975	Negativo-/c

* : Indica que hubo crecimiento

** : Indica ausencia de crecimiento

-/a= 2 UFC

-/b= 1 UFC

-/c= 0 UFC

Fuente: elaboración propia

Interpretación

Teniendo en cuenta que la valoración de pruebas de sensibilidad a antibióticos cuantitativa, incluye la concentración mínima inhibitoria (CMI), se determinó la concentración de aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn mínima para inhibir el crecimiento del patógeno *Enterococcus faecalis* ATCC29212, se observa en la Tabla 7, la concentración más baja del aceite esencial se produjo con el T11 a una concentración de 2,368091667 mg/ml. (Tabla 24)

Tabla 24. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn (canela) para *Candida albicans* según concentración de aceite esencial (mg/ml)

TUBO	[]mg/ml	Turbidez MIC
1	0,0048995	Positivo
2	0,009799	Positivo
3	0,0146985	Positivo
4	0,019598	Positivo
5	0,0244975	Positivo
6	0,029397	Negativo-/a
7	0,0342965	Negativo-/b
8	0,039196	Negativo-/c
9	0,0440955	Negativo-/d
10	0,048995	Negativo-/e

Positivo: Indica que hubo crecimiento
Negativo: indica ausencia de crecimiento
 -/a= 3 UFC
 -/b= 2 UFC
 -/c= 1 UFC
 -/d= 0 UFC
 -/e= 0 UFC

Fuente: elaboración propia

Interpretación

La concentración de aceite esencial más baja de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn para inhibir el crecimiento de *Candida albicans* ATCC10231, se presentó en el T6 con una concentración de 0,029397mg/ml hasta el T10. (Tabla 25)

Tabla 25. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) para *Enterococcus faecalis* ATCC29212 (mg/ml)

TUBO	[] mg/ml	Turbidez MIC
1	13,566	Negativo -/a
2	13,7921	Negativo -/b
3	14,0182	Negativo -/c
4	14,2443	Negativo -/d
5	14,4704	Negativo -/e
6	14,6965	Negativo -/f
7	14,9226	Negativo -/g
8	15,1487	Negativo -/h
9	15,3748	Negativo -/i
10	15,6009	Negativo -/j
11	15,827	Negativo -/l

Positivo : Indica que hubo crecimiento
Negativo: indica ausencia de crecimiento
 -/a= 4 UFC
 -/b=2 UFC
 -/c al -/l = 0 UFC

Fuente: elaboración propia

Interpretación

La concentración de aceite esencial más baja de *Origanum vulgare* para inhibir el crecimiento de la *Enterococcus faecalis* ATCC29212, se presentó en el T1 con una concentración de 13,566mg/ml hasta el T11. (Tabla 26)

Tabla 26. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) para *Candida albicans* ATCC10231 (mg/ml)

TUBO	[]mg/ml	Turbidez MIC
1	0,009044	Positivo
2	0,01205867	Positivo
3	0,01507333	Positivo
4	0,018088	Negativo-/a
5	0,02110267	Negativo-/b
6	0,02411733	Negativo-/c
7	0,027132	Negativo-/d
8	0,03014667	Negativo-/e
9	0,03316133	Negativo-/f
10	0,036176	Negativo-/g
11	0,03919067	Negativo-/h
12	0,04220533	Negativo-/i

Positivo : Indica que hubo crecimiento
Negativo: indica ausencia de crecimiento
 -/a= 10 UFC
 -/b=21 UFC
 -/c al -/i = 0 UFC

Fuente: elaboración propia

Interpretación

La concentración de aceite esencial más baja de *Origanum vulgare* para inhibir el crecimiento de *Candida albicans* ATCC10231, se presentó en el T4 con una concentración de 0,018088 mg /ml hasta el T12. (Tabla 27)

Tabla 27. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de la asociación del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn (canela) + aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) para *Enterococcus faecalis* ATCC29212 (mg/ml)

TUBO	[]mg/ml	Turbidez MIC
1	11,633125	Positivo
2	11,8657875	Positivo
3	12,09845	Positivo
4	12,3311125	Positivo
5	12,563775	Positivo
6	12,7964375	Positivo
7	13,0291	Positivo
8	13,2617625	Positivo
9	13,494425	Negativo-/a
10	13,7270875	Negativo-/b
11	13,95975	Negativo-/c

Positivo : Indica que hubo crecimiento
Negativo: indica ausencia de crecimiento
 -/a=3 UFC
 -/b= 1 UFC
 -/c= 0 UFC

Fuente: elaboración propia

Interpretación

La concentración de aceite esencial más baja de la asociación *Origanum vulgare* + *Cinnamomum zeylanicum* Breyn para inhibir el crecimiento del *Enterococcus faecalis* ATCC29212, se presentó en el T9 con una concentración de 13,494425 mg/ml hasta el T11. (Tabla 28)

Tabla 28. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del Asociación aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn (canela) + aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) frente a *Candida albicans* ATCC10231 (mg/ml)

TUBO	[]mg/ml	Turbidez MIC
1	0,0465325	Positivo
2	0,05118575	Positivo
3	0,055839	Positivo
4	0,06049225	Positivo
5	0,0651455	Negativo-/a
6	0,06979875	Negativo-/b
7	0,074452	Negativo-/c
8	0,07910525	Negativo-/d
9	0,0837585	Negativo-/e
10	0,08841175	Negativo-/f
11	0,093065	Negativo-/g

Positivo : Indica que hubo crecimiento
Negativo: indica ausencia de crecimiento
 -/a=3 UFC
 -/b= 2 UFC
 -/c al -/g = 0 UFC

Fuente: elaboración propia

Interpretación

La concentración de aceite esencial más baja de la asociación *Origanum vulgare* + *Cinnamomum zeylanicum* Breyn para inhibir el crecimiento de *Candida albicans* ATCC10231, se presentó en el T5 con una concentración de 0,0651455mg/ml hasta el T11. (Tabla 29)

4.3.3. Concentración Mínima Bactericida y Concentración Mínima Fungicida (CMF)

Tabla 29. *Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) del aceite esencial de Cinnamomum zeylanicum Breyn frente a Enterococcus faecalis ATCC29212*

Tratamiento	[]mg/ml	UFC
11	2,368091667	2
12	2,408920833	1 CMB
13	2,44975	0

Fuente: elaboración propia

Interpretación

El aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum Breyn* presentó la concentración mínima bactericida frente al *Enterococcus faecalis* ATCC29212 con el Tratamiento 11 para una concentración de 2.408920833 mg/ml (eliminación al 99%) ya que solo queda una 1 UFC. (Tabla 30)

Tabla 30. Determinación de la Concentración mínima bactericida (CMF) del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn frente a *Candida albicans* ATCC10231

Tratamiento	[]mg/ml	UFC	
6	0,029397	3	
7	0,0342965	2	
8	0,039196	1	CMF

Fuente: elaboración propia

Interpretación

El aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn presentó la concentración mínima fungicida frente a *Candida albicans* ATCC10231 con el Tratamiento 8 para una concentración de 0,039196 mg/ml (eliminación al 99%) ya que solo queda una 1 UFC. (Tabla 31)

Tabla 31. Determinación de la Concentración mínima bactericida (CMB) del aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) frente a *Enterococcus faecalis* ATCC29212

Tratamiento	[]mg/ml	UFC	
1	13,566	4	
2	13,7921	2	
3	14,0182	0	CMB

Fuente: elaboración propia

Interpretación

El aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) presentó la concentración mínima bactericida frente a *Enterococcus faecalis* ATCC29212 con el Tratamiento 3 para una concentración de 14,0182 mg/ml, con 0 UFC (Tabla 32)

Tabla 32. Determinación de la Concentración mínima antifúngica (MAC) del aceite esencial de orégano a *Candida albicans* ATCC10231

Tratamiento	[]mg/ml	UFC	
4	0,018088	10	
5	0,02110267	1	CMF
6	0,02411733	0	

Fuente: elaboración propia

Interpretación

El aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) presentó la concentración mínima fungicida frente a *Candida albicans* ATCC10231 con el Tratamiento 5 para una concentración de 0,02110267 mg/ml, con 1 UFC. (Tabla 33)

Tabla 33. Determinación de la Concentración mínima bactericida (CMB) Concentración mínima bactericida (CMB) de la asociación de aceite esencial *Cinnamomum zeylanicum* Breyn + *Origanum vulgare* frente a *Enterococcus faecalis* ATCC29212

Tratamiento	[]mg/ml	UFC	
9	13,494425	3	
10	13,7270875	1	CMB
11	13,95975	0	

Fuente: elaboración propia

Interpretación

La asociación de aceite esencial *Cinnamomum zeylanicum* Breyn + *Origanum vulgare* (orégano) presentó la concentración mínima bactericida frente a *Enterococcus faecalis* ATCC29212 con el Tratamiento 10 para una concentración de 13.7270875 mg/ml, con 1 UFC. (Tabla 34)

Tabla 34. Determinación de la Concentración mínima fungicida (CMF) de la asociación de aceite esencial *Cinnamomum zeylanicum* Breyn + *Origanum vulgare* frente a *Candida albicans* ATCC10231

Tratamiento	[]mg/ml	UFC	
5	0,0651455	3	
6	0,06979875	2	
7	0,074452	0	CMF

Fuente: elaboración propia

Interpretación

La asociación de aceite esencial *Cinnamomum zeylanicum* Breyn (canela) + *Origanum vulgare* (orégano) presentó la concentración mínima fungicida frente a *Candida albicans* ATCC10231 con el Tratamiento 7 para una concentración de 0.074452 mg/ml con 0 UFC. (Tabla 35)

4.4 PRUEBA DE HIPÓTESIS

Hipótesis de investigación 1

La asociación aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum Breyn* y *Origanum vulgare* tienen un mayor efecto antimicrobiano frente al *Enterococcus Faecalis* ATCC29212 que cuando se utilizan individualmente.

Si μ_i , $i = 1, \dots, 3$ designa la media de la población i , lo primero que debemos hacer es contrastar que dichas medias no son iguales, $H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$, frente a H_1 : las medias son distintas. En tal sentido, se necesita comparar simultáneamente todas las medias, siendo la prueba estadística de elección el test de ANOVA (*Analysis of variance*).

Sin embargo, se debe verificar que se cumplan los siguientes requisitos:

a) Independencia: las k muestras son independientes.

Las tres muestras provienen son independientes, provienen de repeticiones que corresponden a la *Cinnamomum zeylanicum Breyn*, *Origanum vulgare* y al Asociación *Cinnamomum zeylanicum Breyn* + *Origanum vulgare*.

b) Normalidad: $X_i \sim N(\mu_i, \sigma^2_i)$, $i = 1, \dots, k$,

Tal vez el método más recomendable para el caso en que $F(x)$ es una distribución continua es el método para una muestra de Kolmogorov-Smirnov o (K-S), que consisten en una prueba de hipótesis en el que la hipótesis nula afirma que los datos sí se ajustan a la distribución $F(x)$ y la hipótesis alterna establece que no se ajustan.

Tabla 35. Prueba estadística de KS

	Kolmogorov-Smirnov ^a		Sig.
	Estadístico	gl	
Cinnamomum zeylanicum Breyn	0,225	12	0,096
Origanum vulgare	0,145	12	0,200*
Cinnamomum zeylanicum Breyn + Origanum vulgare	0,161	12	0,200*

Fuente: elaboración propia

Se verifica que la significancia es mayor a 0,05, por lo que no se rechaza la hipótesis nula de que los datos se ajustan a una distribución normal. (Tabla 36)

c) Homocedasticidad: $\sigma^2_1 = \sigma^2_2 = \dots = \sigma^2_k = \sigma^2$.

Prueba de homogeneidad de varianzas

Tabla 36. Prueba estadística de Levene para los valores del halo para *Enterococcus faecalis* ATCC29212

Estadístico			
de Levene	gl1	gl2	Sig.
11,177	2	33	0,000

Fuente: elaboración propia

Teniendo en cuenta que la prueba de Levene revela que los datos no presentan homocedasticidad ($p < 0,05$), sin embargo, el ANOVA es un método robusto porque sus “resultados se alteran muy poco si se producen transgresiones de los supuestos en los que se basa”. En tal sentido, siendo que cumple con dos de

las tres condiciones, se optó por el análisis de varianza para contrastar la hipótesis general (Tabla 37).

– Hipótesis estadística

H0: μ_1 Cinnamomum zeylanicum Breyn = μ_2 Origanum vulgare = μ_3 Asociación

H1: Al menos una de las medias es distinta

Tabla 37. ANOVA halo Enterococcus faecalis ATCC29212

<i>Halo Enterococcus faecalis</i>					
	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	665,273	2	332,636	5,794	0,007
Dentro de grupos	1894,590	33	57,412		
Total	2559,863	35			

Fuente: elaboración propia

Tabla 38. Pruebas poshoc Tukey halo Enterococcus faecalis ATCC29212

		Subconjunto para alfa = 0.05		
	grupo	N	1	2
HSD Tukey ^a	Orégano	12	14,558854	
	Asociación	12	18,289167	18,289167
	Canela	12		24,951771
	Sig.		,458	,095

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 12,000.

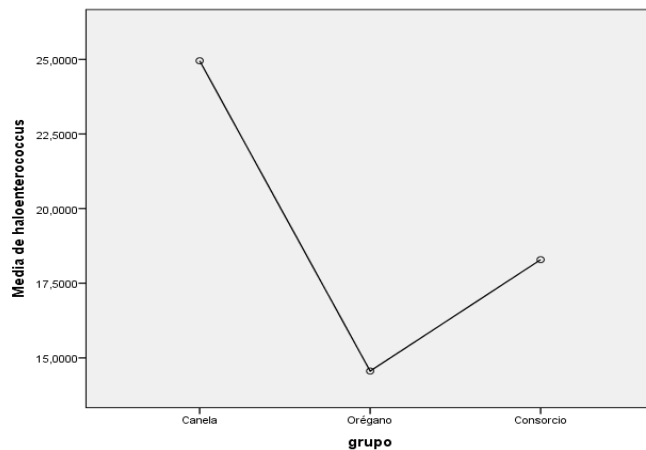


Figura 9. Media de los valores del halo de *Enterococcus faecalis*

Fuente: elaboración propia

Decisión

Decisión. Se rechaza la hipótesis nula, por lo que se afirma que existe diferencia entre el efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn, *Origanum vulgare* y la asociación *Cinnamomum zeylanicum* Breyn + *Origanum vulgare* frente al *Enterococcus faecalis* (Tabla 38,39 y Figura 10).

Hipótesis de investigación 2

La asociación del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn + *Origanum vulgare* tienen un mayor efecto antimicrobiano frente a *Candida albicans* ATCC10231 que cuando se utilizan individualmente.

Verificación de los supuestos para la prueba de anova siguientes requisitos:

d) Independencia: las k muestras son independientes.

Las tres muestras provienen son independientes, provienen de repeticiones que corresponden a la *Cinnamomum zeylanicum* Breyn, *Origanum vulgare* y al Asociación *Cinnamomum zeylanicum* Breyn + *Origanum vulgare* frente a *Candida albicans*

e) Normalidad: $X_i \sim N(\mu_i, \sigma^2_i)$, $i=1, \dots, k$,

Se optó por el método más recomendable para el caso en que $F(x)$ es una distribución continua es el método para una muestra de Kolmogorov-Smirnov o (K-S), siendo que la hipótesis nula afirma que los datos sí se ajustan a la distribución $F(x)$ y la hipótesis alterna establece que no se ajustan.

Tabla 40 .Prueba estadística de KS Halo *Candida albicans* ATCC10231

Tabla 39.Prueba estadística de KS Halo *Candida albicans* ATCC10231

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
canela_Cand	0,132	8	0,200*	,981	8	0,966
orégano_Cand	0,247	8	0,162	,887	8	0,221
Asociación_Cand	0,279	8	0,066	,841	8	0,077

*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

Se verifica que la significancia es mayor a 0,05, por lo que no se rechaza la hipótesis nula de que los datos se ajustan a una distribución normal (Tabla 40)

f) Homocedasticidad: $\sigma^2_1 = \sigma^2_2 = \dots = \sigma^2_k = \sigma^2$.

Tabla 41. Prueba estadística de Levene para los valores del halo para *Candida albicans* ATCC10231

Tabla 40. Prueba estadística de Levene para los valores del halo para *Candida albicans* ATCC10231

Estadístico				
de Levene	gl1	gl2	Sig.	
2,630	2	21	0,096	

Fuente: elaboración propia

Teniendo en cuenta que la prueba de Levene revela que los datos también presentan homocedasticidad ($p > 0,05$), por lo que se aplica el análisis de varianza (Tabla 40)

Hipótesis estadística

H0: μ_1 Cinnamomum zeylanicum Breyn = μ_2 Origanum vulgare = μ_3 Asociación

H1: Al menos una de las medias es distinta

Tabla 41. ANOVA

<i>Halo Candida albicans</i>					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	142,790	2	71,395	,688	,514
Dentro de grupos	2180,449	21	103,831		
Total	2323,238	23			

Fuente: elaboración propia

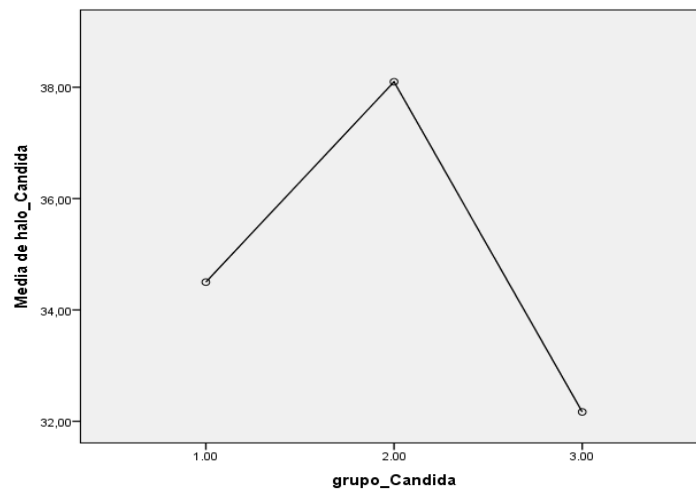


Figura 10. *Media de los valores del halo de Candida albicans ATCC10231*

Fuente: elaboración propia

Decisión: No se rechaza la hipótesis nula, por lo que se afirma que no existe diferencia entre el efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn, *Origanum vulgare* y la asociación *Cinnamomum zeylanicum* Breyn + *Origanum vulgare* frente a *Candida albicans* ATCC10231 (Tabla 42 y Figura 11).

Hipótesis general

La asociación aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn + *Origanum vulgare* tienen un mayor efecto antimicrobiano frente al *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* que cuando se utilizan individualmente.

La comprobación empírica de la hipótesis general es parcialmente verdadera, ya que se verificó que la asociación aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn + *Origanum vulgare* tiene un efecto antimicrobiano significativo frente al *Enterococcus faecalis* ATCC29212 ($p < 0,05$), aunque las comparaciones múltiples de Tukey del halo evidencian que la asociación ***Cinnamomum zeylanicum* Breyn** + *Origanum vulgare* no es diferente del *Origanum vulgare*, ni tampoco del *Cinnamomum zeylanicum* Breyn ($p = 0,458$) *Cinnamomum zeylanicum* Breyn ($p = 0,095$), sin embargo, no existe diferencia significativa del efecto antifúngico del *Cinnamomum zeylanicum*, *Origanum vulgare* y la asociación *Cinnamomum zeylanicum* Breyn + *Origanum vulgare* contra *Candida albicans* ATCC10231.

4.5 DISCUSIÓN

En los últimos años, los estudios han revelado las crecientes limitaciones de los agentes antimicrobianos disponibles en el mercado dental, irrigantes endodónticos como la clorhexidina y el hipoclorito de sodio (NaOCl) a pesar de presentar excelentes propiedades antimicrobianas resulta difícil no mencionar sus efectos secundarios, por consiguiente los productos herbales han llamado la atención como alternativas terapéuticas más seguras. Los estudios se han centrado en los beneficios de los aceites esenciales obtenidos de las hierbas debido a sus efectos antibacterianos (48).

El objetivo de este estudio fue evaluar y comparar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de *Cinnamomum zeylanicum Breyn* y *Origanum vulgare L.*, además de la asociación *Cinnamomum zeylanicum Breyn* + *Origanum vulgare L.* contra *Enterococcus faecalis ATCC29212* y *Candida albicans ATCC10231*. Sin embargo, resulta necesario resaltar que del análisis físico químico de los aceites esenciales del *Origanum vulgare* se encontraron precursores biológicos del carvacrol y el timol como son el Cis-.beta.-Terpineol (4,82%), Cis-.beta.-Terpineol (13,37%), Terpineol, cis-beta (0,58%) y thymol (5,34%) que en conjunto representan el 24,11% del total del aceite esencial, en este sentido, resultados similares en cuanto a la presencia de los elementos en mención, reportan Belitz et al y Burt citados por Gómez, Sánchez y López (50) y que en conjunto representan entre el 80 y 90% de la composición total del aceite de orégano, aunque la proporción que se halló en el presente estudio es de 24,11%, menor al estudio de Belitz et al y Burt citados por Gómez et al. (50), diferencias que pueden deberse al origen de la planta de donde proviene el aceite (51). El aporte de Cleff et al, revelaron la presencia de 4-terpineol, γ -terpinene, timol y carvacrol entre sus componentes principales a los que se atribuye su actividad antifúngica (52). En lo que toca a los elementos que componen el aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum Breyn* se encontró predominancia de Cinnamaldehyde, (E)- 71%

resultados congruentes con los de Belitz et al y Burt citados por Gómez et al, quienes reportan también una concentración de cinamaldehído de 50-80% (50). No obstante Lucena et al, mencionan en su análisis químico como elemento principal al eugenol (68,96%), sus hallazgos podrían atribuirse al género y especie (*Cinnamomum zeylanicum Blume*) recogida de diferentes áreas topográficas de Brasil (10).

Un primer aspecto a discutir o comparar es el resultado de la composición química de los aceites esenciales estudiados, observándose resultados similares con los de Benbelaid et al (14) en cuanto a los compuestos químicos comunes del aceite esencial de canela como el copaene con un porcentaje de 0,11 menor al que hallamos en este estudio que es de 0,49%, igualmente con el compuesto químico hallado de Cinnamaldehyde,(E)- (71%) y el valor porcentual que reporta Benbelaid et al (14) que es más elevado con un 75,85%). En lo que respecta a los compuestos químicos del aceite esencial de orégano, se halló compuestos similares a los de Okan et al. (15) como el terpineol (2,54%), aunque en menor proporción a los hallazgos en la presente investigación para Cis-. beta. -Terpineol (4,82%) de área relativa.

Respecto al objetivo sobre el grado de sensibilidad según la escala de Duraffourd y Lapraz (49), que presenta el *Enterococcus faecalis ATCC29212* y *Candida albicans ATCC10231* cuando se utiliza el aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum Breyn* (canela) y *Origanum vulgare* (orégano), mediante la técnica de difusión de disco, se halló que el valor promedio general del halo de inhibición de *Candida albicans*, cuando se aplica aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum Breyn* es de 34,50 mm, mientras que la aplicación del aceite esencial de *Origanum vulgare* determinó un promedio del halo de 38,09 mm, siendo el diámetro menor cuando se utiliza la asociación *Cinnamomum zeylanicum Breyn* + *Origanum vulgare* con un 32,16 mm de promedio de los halos de inhibición. En todos los casos, dentro de los parámetros de Duraffourd y Lapraz (49) los diámetros superiores a 20 mm se les considera sumamente sensibles. De la misma manera

Marca (16) determino la sensibilidad de la *C. albicans* frente al aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn obteniendo promedios de halo mayores a 20 mm de diámetro en función a sus diferentes concentraciones. Igualmente los resultados son similares a los de Mamani (18) con su evaluación antimicótica del *Origanum vulgare* frente a *C. albicans* y Villavicencio et al, (19) quien reportó actividad antimicótica el aceite esencial de *Origanum vulgare* de especies de Jauja, Arequipa y Tacna sobre *Candida albicans*, siendo incluso más efectiva la especie de Tacna. Igualmente, Aizaga (20) también halló un efecto antifúngico significativo del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum*.

Asimismo, la efectividad antimicrobiana frente a *Enterococcus faecalis* de los aceites esenciales de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn, con el que se halló un halo de inhibición promedio de 24,95 mm, mientras que la aplicación del aceite esencial de *Origanum vulgare* el promedio del halo fue de 14,55 mm, siendo el diámetro discretamente mayor cuando se utiliza la asociación *Cinnamomum zeylanicum* Breyn + *Origanum vulgare* con un promedio de halo de 18,28 mm. Según la regla de los parámetros establecidos por Duraffourd y Lapraz (49) en el caso del aceite esencial *Cinnamomum zeylanicum* Breyn el parámetro del diámetro de inhibición de crecimiento bacteriano supera los de a 20 mm por lo que se le considera sumamente sensible (+++), sensible (+) para los diámetros del halo de inhibición del *Origanum vulgare* y muy sensible (++) para la asociación, ya que se encuentran en el rango de 15 a 19 mm. De modo similar, también se encontró coincidencia con los hallazgos de Terán (13) respecto a la actividad antimicrobiana del aceite esencial de canela frente a *Enterococcus faecalis*, pero discordante en lo que atañe a la variación del diámetro de los halos que fueron entre 9 mm a 15 mm con una media de 12,20 mm considerándose según la escala como sensible, inferior al diámetro que obtuvimos en el presente estudio que fue de 24,95 mm como sumamente sensible. Resultados similares hallaron Mahdi, Al Huwaiziy Abbas (11) en Bagdad, cuando evaluaron la actividad antimicrobiana de la canela contra aislamientos clínicos del patógeno oral *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* y

otros. Igualmente, los resultados son coincidentes con los de Condò, Anacarso, Sabia, Iseppi, Anfelli, Forti, Niederhäusern, Bondi, y Messi (12) quienes también probaron la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn comparativamente frente a otros aceites esenciales, contra patógenos orales, como *Enterococcus* además de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, siendo más útil el aceite de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn para dañar la biopelícula producida por las bacterias mencionadas que los otros aceites esenciales.

En lo que atañe a la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn frente al *Enterococcus faecalis* ATCC29212 se reportó en los resultados la ausencia de crecimiento bacteriano a una concentración de 2,368091667 mg/ml con diferencia significativa a lo descrito por Mahdi et al (11) con un CMI menor, de 781 ug/ml contra *E. faecalis*, *C. albicans* y *Strep. Mutans*, hallazgos podrían darse debido a que se trata de un extracto etanólico de canela. En cuanto al CMI frente a *Candida albicans* ATCC10231 se presentó una turbidez negativa a partir de una concentración de 0,029397 mg/ml. En este punto, los hallazgos son similares a los de Marca (16), quien evaluó la actividad antimicótica in vitro del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn frente a la *Cándida albicans*, hallando un CMI de 0,01895 mg/ml, valor que es similar al hallado en el presente estudio de 0,0293797 mg/ml. Sin embargo Sánchez y Luján (17) presentan un CMI mayor de 1mg/ml. Indistintamente Lucena et al, (10) encontró valores de concentración de 62,5 ug/ml efecto parece deberse a la interferencia con la biosíntesis de la pared celular según el autor. Referente a la concentración mínima inhibitoria de *C. albicans* frente al aceite esencial de *Origanum vulgare* en el presente estudio se obtuvo una concentración de 0,018088 mg/ml datos desemejantes a los determinados por Mamani (18) con un CMI de 0,805358 mg/ml.

En el presente estudio, también se halló que la concentración mínima bactericida (CMB) del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum Breyn* (canela) y *Origanum vulgare* (orégano) y de la asociación , a diferentes concentraciones frente a las cepas de *Enterococcus Faecalis ATCC29212.*, fueron las siguientes : con *Cinnamomum zeylanicum Breyn* con el CMB de 2,4089920833 mg/ml se elimina el 99% de patógenos; mientras que con el *Origanum vulgare* la CMB fue de 14,0182mg/ml con lo que se elimina el 100% de patógenos y con la asociación el CMB 13,7270875mg/ml se erradican el 99% de patógenos. Datos semejantes pero con denotación inferior presentó Mahdí Al Huwayiziy abbas (11) con un CMB de 1562 ug/ml (1,562mg/ml) de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de canela.

Respecto a la concentración mínima fúngica (CMF), con el aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum Breyn* fue 0,039196 mg/ml con lo que se elimina el 99% de *Candida albicans ATCC10231*, con el *Origanum vulgare* se halló un CMF de 0,02110267 con lo que se eliminó el 99% y con la asociación el CMF de 0,074452 mg/ml se eliminó el 100% de *Candida albicans*. Al respecto, Marca (16) halló un CMF de 0,020529166 mg/ml más bajo que el valor que hemos encontrado en el presente estudio de 0,039196 mg/ml. Mientras que Mamani (18), Sánchez (17) y Aizaga (20) presentan valores superiores significativos de CMF.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

1. La asociación de aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* + *Origanum vulgare* tiene un efecto antimicrobiano significativo frente al *Enterococcus faecalis* ATCC29212 ($p < 0,05$), aunque las comparaciones múltiples de Tukey del halo evidencian que la asociación *Cinnamomum zeylanicum* + *Origanum vulgare* no es diferente del *Origanum vulgare*, ni tampoco del *Cinnamomum zeylanicum* ($p = 0,458$) *Cinnamomum zeylanicum* $p = 0,095$), sin embargo, no existe diferencias significativas del efecto antifúngico del *Cinnamomum zeylanicum*, *Origanum vulgare* y la asociación *Cinnamomum zeylanicum* + *Origanum vulgare* contra *Candida albicans* ATCC10231.
2. La sensibilidad según la escala de Duraffourd y Lapraz del *Enterococcus Faecalis* ATCC29212, frente a la aplicación del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* (canela) presenta un valor promedio general de halo de inhibición de 24,95 mm considerado como sumamente sensible (+++); con *Origanum vulgare* (orégano) es sensible (+) a una concentración de 14,55 mm y con la asociación *Cinnamomum zeylanicum* + *Origanum vulgare* se presenta como muy sensible (++) con un promedio de 18,28 mm.
3. En relación al *Candida albicans* ATCC10231, la aplicación del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* (canela) según la escala de Duraffourd y Lapraz presento un media de halo de inhibición de 34,50 mm; con *Origanum vulgare* (orégano) un promedio de 38,09 mm de diámetro y con la asociación de *Cinnamomum zeylanicum* + *Origanum vulgare* una

media de 32,16 mm, posicionándose en todos los casos según la escala como sumamente sensible (+++).

4. La concentración mínima inhibitoria (CMI) o concentración más baja del aceite esencial de los aceites esenciales para inhibir el crecimiento de *Enterococcus Faecalis* ATCC29212 con *Cinnamomum zeylanicum* (canela) fue a una concentración de 2,36809166 mg/ml (T11), con *Origanum vulgare* a una concentración de 13,566 mg/ml (T1) y de la asociación *Cinnamomum zeylanicum* + *Origanum vulgare* a una concentración de 13,494425 mg/ml (T9); mientras que para inhibir el crecimiento de *Candida Albicans* ATCC10231, con *Cinnamomum zeylanicum* (canela) fue a una concentración de 0,029397 mg/ml (T10), con *Origanum vulgare* a una concentración de 0,018088 (T12) y de la asociación *Cinnamomum zeylanicum* + *Origanum vulgare* a una concentración de 0,0651455 mg/ml (T11).

5. La concentración mínima bactericida (CMB) de los aceites esenciales para *Enterococcus Faecalis* ATCC29212 con *Cinnamomum zeylanicum* (canela) fue a una concentración de 2,4089920833 mg/ml (T12), con *Origanum vulgare* a una concentración de 14,0182 mg/ml (T3) y de la asociación *Cinnamomum zeylanicum* + *Origanum vulgare* a una concentración de 13,47270875 mg/ml (T10); mientras que para inhibir el crecimiento de *Candida Albicans* ATCC10231, la concentración mínima fungicida (CMF) fue con *Cinnamomum zeylanicum* (canela) a una concentración de 0,039196 mg/ml (T8), con *Origanum vulgare* a una concentración de 0,02110267 mg/ml (T5) y de la asociación *Cinnamomum zeylanicum* + *Origanum vulgare* a una concentración de 0,074452 mg/ml (T7).

5.2 RECOMENDACIONES

1. Habiéndose demostrado la eficacia antimicrobiana de los aceites esenciales *Cinnamomum zeylanicum Breyn* (canela) y *Origanum vulgare* (orégano) y la asociación *Cinnamomum zeylanicum Breyn* + *Origanum vulgare L.*, se recomienda su promoción y uso por constituir especies vegetales de fácil acceso, sobre todo el *Origanum vulgare*.
2. Se recomienda la elaboración de formulaciones farmacéuticas de carácter odontológico que incorporen componentes naturales como el *Cinnamomum zeylanicum Breyn* (canela) y *Origanum vulgare* (orégano), en razón a sus propiedades antimicrobianas.
3. Se recomienda una la utilización de medios tecnológicos para el fraccionamiento de los aceites esenciales de *Cinnamomum zeylanicum Breyn* (canela) y *Origanum vulgare* (orégano), que realicen la extracción de los principios activos, para la conservación de sus propiedades y uso para tratamientos endodónticos.
4. Se sugiere realizar pruebas *in vivo* para valorar la toxicidad que pueden proporcionar los componentes activos de *Cinnamomum zeylanicum Breyn* (canela) y del *Origanum vulgare* (orégano).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Prabhakar J, Senthilkumar M, Priya MS, Mahalakshmi K, Sehgal PK, Sukumaran VG. Evaluation of antimicrobial efficacy of herbal alternatives (Triphala and green tea polyphenols), MTAD, and 5% sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis* biofilm formed on tooth substrate: an in vitro study. *J Endod.* enero de 2010;36(1):83-6.
2. Alfayate R., García V., Pablo O. de, Luaña R., Cabello R., Pinilla J. Actualización en microbiología endodóntica. *Científica Dent Rev Científica Form Contin.* 2013;10(1):27-39.
3. Guerrero R, Enrique M. Estudio comparativo in vitro del efecto antibacteriano entre tres sustancias utilizadas como medicamento intraconducto contra cepas de *enterococcus faecalis*. 2018 [citado 7 de diciembre de 2018]; Disponible en: <http://dspace.unl.edu.ec/handle/123456789/20688>
4. Dowd F. *Candida albicans Infections*☆. En: *Reference Module in Biomedical Sciences* [Internet]. Elsevier; 2014. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128012383048972>
5. Cuello M, Rosalía M. Actividad antimicótica “in vitro” del aceite esencial *Cinnamomum zeylanicum* Breyn “canela” frente a *Cándida albicans* ATCC 6538, Tacna, 2012. Univ Nac Jorge Basadre Grohmann [Internet]. 2013 [citado

7 de diciembre de 2018]; Disponible en:
<http://repositorio.unjbg.edu.pe/handle/UNJBG/2338>

6. Escobar Rivera M., Torres A. Evaluación de la eficacia antibacteriana in vitro de un colutorio de aceite esencial de *Origanum vulgare* L. (Oregano) sobre *Sterptococcus mutans* [Internet] [bachelor]. Universidad de El Salvador; 2016 [citado 7 de diciembre de 2018]. Disponible en:
<http://ri.ues.edu.sv/id/eprint/11223/>
7. Mathew J, Pathrose S, Kottoor J, Karaththodiyil R, Alani M, Mathew J. Evaluation of an Indigenously Prepared Herbal Extract (EndoPam) as an Antimicrobial Endodontic Irrigant: An Ex Vivo Study. *J Int Oral Health JIOH*. junio de 2015;7(6):88-91
8. Malca, M. *Efecto sinergico in vitro del origanum vulgare y la penicilina sobre la resistencia del enterococcus faecalis atcc 29212* (Tesis) Universidad Privada Antenor Orrego [En línea] Recuperado de
<http://repositorio.upao.edu.pe/handle/upaorep/2742>
9. Benbelaid F, Khadir A, Bendahou M, Ben-Yelles I, Muselli A, Costa J. Eradication of *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* Biofilms by *Cinnamomum cassia* Essential Oil Solution as a Root Canal Irrigant. *Nat Prod J*. 1 de marzo de 2018;8(1):54-60
10. Lucena M., García S., Muniz J., Castellano L. y Dias de Castro, R. In Vitro Effect of *Cinnamomum zeylanicum* Blume Essential Oil on *Candida* spp. Involved in Oral Infections. *Evidence-Based Complementary and Alternative*

Medicine Volume 2018, Article ID 4045013, 13 pages [En línea] Recuperado de <https://doi.org/10.1155/2018/4045013>

11. Mahdi, A. y Al Huwaizi, H. y Abbas, I. A comparative evaluation of antimicrobial activity of the ethanolic extract of *Cinnamomum zeylanicum* and NaOCl against oral pathogens and against swabs taken from nonvital teeth-An in vitro study. *International Journal of ChemTech Research*, 2018. Article Vol.10 , 39-47 pages [En línea] Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/329155848_A_comparative_evaluation_of_antimicrobial_activity_of_the_ethanolic_extract_of_Cinnamomum_zeylanicum_and_NaOCl_against_oral_pathogens_and_against_swabs_taken_from_nonvital_teeth-An_in_vitro_study

12. Condò, C., Anacarso, I., Sabia, C., Iseppi, R., Anfelli, I., Forti, L., Niederhäusern, S., Bondi, M. y Messi, P. Antimicrobial activity of spices essential oils and its effectiveness on mature biofilms of human pathogens. 2018 [En línea] Recuperado de DOI: 10.1080/14786419.2018.1490904 To link to this article: <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1490904>

13. Terán, E. Comparación de la efectividad antimicrobiana entre aceite esencial de canela y clorhexidina frente a *Enterococcus faecalis*. estudio in vitro. enero de 2016 [citado 4 de abril de 2019]; Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/5790>

14. Benbelaid F., Khadir A., Benfahou M., Ben I., Muselli A. y Costa J. *Erradication of Enterococcus faecalis and Candida albicans Biofilms by Cinnamomum cassia Essential Oil Solution as a Root Canal Irrigant . The Natural Products Journal*. [En línea] 2018. Disponible en:

- https://www.researchgate.net/publication/318376455_Eradication_of_Enterococcus_faecalis_and_Candida_albicans_biofilms_by_Cinnamomum_cassia_essential_oil_solution_as_a_root_canal_irrigant
15. Ozkan O., Guney K., Gur M., Pattabanoglu E., Babat E. y Khalifa M. *Essential oil of oregano and savory; chemical composition and antimicrobial activity*. [En línea] 2019. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/318717317_Essential_Oil_of_Oregano_and_Savory_Chemical_Composition_and_Antimicrobial_Activity

 16. Marca M. *Actividad antimicótica “in vitro” del aceite esencial Cinnamomum zeylanicum Breyn “canela” frente a Cándida Albicans ATCC 6538, Tacna, 2012* [En línea] Recuperada de <http://repositorio.unjbg.edu.pe/handle/UNJBG/2338>

 17. Sánchez C. y Luján M. Efecto antimicrobiano del aceite esencial y del extracto acuoso de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) sobre *Candida albicans* y *Streptococcus mutans*. 2013. *SCIENDO* 16(1):68-78, 2013 [En línea] Recuperado de http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/SCIENDO/article/viewFile/630/pdf_6

 18. Mamani N. Evaluación antimicótico in vitro del aceite esencial *Origanum vulgare* “orégano” frente a *Candida albicans* ATCC 6538. (Tesis) Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann [En línea]. Tacna, 2016.

 19. Villavicencio J., Moromi H., Salcedo D., Pineda M., Ramos D. y Zambrano L. Efecto Antimicótico in vitro de *Origanum vulgare* sobre cepas de *Candida albicans*. *Odontol Sanmarquina*. *Odontol. Sanmarquina* 2016; 19(2): 5 [En línea] 2016. Recuperado de

<https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/odont/article/view/12907/11528>

20. Aizaga, S. Efecto antifúngico del Aceite Esencial de Canela (*Cinnamomum zeylanicum*) al 25%,50%,75% y 100% sobre *Candida albicans* ATCC® 10231TM. (Tesis) Universidad Central del Ecuador [En línea] 2017 Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/11016>
21. Fazel S. ,Di Lorenzo A. , Izadi M., Sobarzo E., Daglia M. y Mohammad S. Antibacterial Effects of Cinnamon: From Farm to Food, Cosmetic and Pharmaceutical Industries. *Nutrients* 2015, 7, 7729-7748; 95359 [En línea] Recuperado de doi:10.3390/nu70
22. Keskin D., Toroglu S. Studies on antimicrobial activities of solvent extracts of different spices. *J Environ Biol.* 2011 Mar;32(2):251-6.[En línea] Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21882663>
23. Mandal S., DebMandal M., Saha K. In vitro antibacterial activity of three Indian spices against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal ListOman Med Jv.*26(5); 2011 SepPMC3215437 [En línea] Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3215437/>
24. Rasheed MU, Thajuddin N. Effect of medicinal plants on *Moraxella catarhalis* [En línea] Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1995764511600539>
25. Muchuweti M., Kativu E., Mupure C., Chidewe C., Ndhala A., Benhura M. Phenolic composition and antioxidant properties of some spices. *A.m. J.*

- Food Technol. 2007; 2 : 414–420 [En línea] Recuperado de <http://www.docsdrive.com/pdfs/academicjournals/ajft/2007/414-420.pdf>
26. Wong Y., Ahmad-Mudzaqqirand M., Wan-Nurdiyana W. Extraction of Essential Oil from (Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*)). *Oriental J. Chem.* 2014; 30 : 37–47 [En línea] Recuperado de <https://naturalingredient.org/wp/wp-content/uploads/Cinnamon-extraction.pdf>
27. Cooperación Peruano Alemana. Secado Solar. Universidad Nacional de Ingeniería, Lima, 1983
28. Guerrero L. y Núñez M. Obtención de Aceites Esenciales de Eucalipto y Orégano. *Industria Farmacéutica* 1991; Julio/Agosto :73-79
29. Garay, H. Efecto antibacteriano del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. “orégano” sobre cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, in vitro. Cajamarca-2015. (Tesis de Maestría) Universidad Nacional de Cajamarca, 2015.
30. Skuola M, Gotsiou P, Naxakis G, Johnson C. A chemosystematic investigation on the mono- and sesquiterpenoids in the genus *Origanum* (Labiatae). *Phytochem.* 1999; 52: 649-657 [En línea] Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S003194229900268X>
31. Albado E., Saez G. y Grabiell S. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano). *Rev Med Hered* 2001; 12: 16-19 [En línea] Recuperado de <http://www.scielo.org.pe/pdf/rmh/v12n1/v12n1ao3>
32. Arcila C., Loarca G., Lecona S. y Gonzáles E. El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. [En línea]

2004. Recuperado de http://soregano.com/wp-content/uploads/2017/02/El-organo_-propiedade.pdf
33. Filoche S, Soma K., Sissons C. Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate. *Microbiol Oral. Immunol* 2005; 20 : 221–225. [En línea] Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15943766>
34. Assadi M., Mahkam M. Isolation of carvacol from *Origanum vulgare*, synthesis of some organosili con derivatives, and investigating of its antioxidant, antibacterial activities [En línea] 2014. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/274570324_Isolation_of_carvacol_from_Origanum_vulgare_synthesis_of_some_organosilicon_derivatives_and_investigating_of_its_antioxidant_antibacterial_activities/link/55238e2a0cf29dcabb0f03a2/download
35. X. Zhang, Y. Guo, C. Wang, G. Li, J. Xu, H. Chung, W. Ye, Y. Li, C. Wang, Phenolic compounds from *Origanum vulgare* and their antioxidant and antiviral activities, *Food Chemistry*, 152 (2014) 300- 306
36. Bastos M, et al. Actividad antimicrobiana de aceite esencial de *Origanum vulgare* L. ante bacterias aisladas en leche de bovino. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 16(3):260-266. [En línea] Recuperado de <http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v16n3/pla06311.pdf>
37. Siqueira, J. , Rocas I. Diversity of endodontic microbiota revisited. *J Dent Res*. 2009 Nov;88(11):969-81. [En línea] Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19828883>

38. Torabinejad M, Walton RE. Endodoncia. Principios y práctica + DVD-ROM, 4a ed. [Internet]. Elsevier; 2010. Disponible en: <https://books.google.com.pe/books?id=DkRbwmFrfsC>
39. Carrero C., González M., Martínez M., Serna F., Díez H., Rodríguez A. Baja frecuencia de enterococcus faecalis en mucosa oral de sujetos que acuden a consulta odontológica. Rev Fac Odontol Univ Antioq . 2015 June ; 26(2): 261-270. [En línea] Recuperado de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-246X2015000100003&lng=en.
40. Zoletti G., Pereira E., Schuenck R., Teixeira L., Siqueira J. , dos Santos K. Characterization of virulence factors and clonal diversity of *Enterococcus faecalis* isolates from treated dental root canals. Res Microbiol 2011; 162(2): 151-158.
41. Guerreiro J., de Faria N., Duarte M., Ordinola R., Graeff M., Tanomaru M. Comparative analysis of *Enterococcus faecalis* biofilm formation on different substrates. J Endod 2013; 39(3): 346-350. Zoletti GO, Pereira EM, Schuenck RP, Teixeira LM, Siqueira JF Jr, dos Santos KR. Characterization of virulence factors and clonal diversity of *Enterococcus faecalis* isolates from treated dental root canals. Res Microbiol 2011; 162(2): 151-158.
42. Sedgley C., Nagel A., Shelburne C., Clewell D., Appelbe O., Molander A. Quantitative real-time PCR detection of oral *Enterococcus faecalis* in humans. Arch Oral Biol 2005; 50(6): 575-583.
43. Singh A., Verma, R. Murari, A. y Agrawal, A. Oral candidiasis: An overview, Journal of Oral and Maxillofacial Pathology, vol. 18, no. 5, pp. 81–85, 2014.

44. Vidya K. Rao U., Nittayananta W. Liu ,H. Owotade F. Oral mycoses and other opportunistic infections in HIV: Therapy and emerging problems - a workshop report, *Oral Diseases*, vol. 22, pp. 158–165, 2016
45. Pianalto, K. y Alspaugh, J. New Horizons in Antifungal Therapy, *Journal of Fungi*, vol. 2, no. 4, p. 26, 2016.
46. Nunes E., Nunes N. , MonteiroJ, Paes,A.Perfl de sensibilidade do genero Candida a antifungicos em um hospital de referencia da Regiao Norte do Brasil, *Revista Pan-Amazonica de Saude* , vol. 2, no. 4, pp. 23–30, 2011.
47. Morace, G., Perdoni, F. y Borghi,E. Antifungal drug resistance in Candida species, *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, vol. 2, no. 4, pp. 254–259, 2014
48. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi. Proposed standard document M38-A. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, Pa.2002
49. Duraffourd C. y Lapraz J.Cuaderno de fitoterapia clínica. Editorial Masson. Francia,1983.
50. Gomez A., López A. Potencial antimicrobiano de los aceites esenciaes de orégano (*Origanum vulgare*) y canela (*Cinnamomum zeylanicum*). *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos* 3-1 (2009):33-45

51. Faleiro M., Miguel Am., Ladeiro F, Venancio F., Tavares R., Brito C., Figueiredo A. Barroso J. y Pedro G. Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species . *Thymus Letters in Applied Microbiology*.36:35-40.2002
52. Cleff Marlete Brum et al. Actividad in vitro del aceite esencial *Origanum vulgare* contra especies de *Candida*. *Braz. J. Microbiol.* [Internet]. 2010 Mar [consultado el 12 de diciembre del 2019]; 41 (1): 116-123. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822010000100018&lng=en. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822010000100018>

ANEXOS

ANEXOS


Anexo 1. MATRIZ DE CONSISTENCIA

PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	VARIABLES E INDICADORES	METODOLOGÍA
<p>1.INTERROGANTE PRINCIPAL ¿Cuál es el efecto antimicrobiano del aceite esencial de Cinnamomum zeylanicum Breyn (canela) Origanum vulgare L. (orégano) y de la asociación de Cinnamomum zeylanicum Breyn (canela) + Origanum vulgare L. (orégano) a diferentes concentraciones frente a Enterococcus Faecalis y Candida albicans?</p> <p>2.INTERROGANTES ESPECÍFICAS a) ¿Cuál es la sensibilidad según la escala de Duraffourd y Lapraz, que presenta el <i>Enterococcus faecalis</i> frente al aceite esencial de <i>Cinnamomum</i></p>	<p>1.OBJETIVO GENERAL Determinar el efecto antimicrobiano del aceite esencial de Cinnamomum zeylanicum Breyn (canela), Origanum vulgare L. (orégano) y de la asociación de Cinnamomum zeylanicum Breyn (canela) + Origanum vulgare L. (orégano) a diferentes concentraciones frente a Enterococcus faecalis y Candida albicans.</p> <p>2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS a) Establecer la sensibilidad según la escala de Duraffourd y Lapraz, que presenta el <i>Enterococcus faecalis</i> frente al aceite esencial de</p>	<p>1.HIPÓTESIS GENERAL La asociación aceite esencial de Cinnamomum zeylanicum Breyn + Origanum vulgare tienen un mayor efecto antimicrobiano frente al Enterococcus faecalis y Candida albicans que cuando se utilizan individualmente.</p>	<p>Variable Independiente:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Cinnamomum zeylanicum Breyn (canela) - Origanum vulgare - Asociación Cinnamomum zeylanicum Breyn (canela) + Origanum vulgare <p>Variable Dependiente</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Enterococcus faecalis</i> - <i>Candida albicans</i> <p>-Tipo de Investigación Explicativo, relación causa efecto</p> <p>-Diseño de la Investigación Experimental prospectivo.</p> <p>-Ámbito de Estudio Tacna</p> <p>-Población</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Enterococcus faecalis</i> - <i>Candida albicans</i> 	<p>-Muestra $Z_{\alpha/2}$ = Confianza al 95% (1,96) Z_{β} = Potencia de la prueba al 80% (0,84) σ^2 $\sigma^2 / \delta^2 = 1$ = Variación relativa de los halos 1 n= Mínimo 8 repeticiones para cada concentración</p> <p>Tamaño de muestra asumido en el presente estudio: Tamaño de muestra asumido en el presente estudio: 12,11,10 y 8 repeticiones (por encima del número mínimo de repeticiones)</p> <p>-Unidad de análisis □ Unidad de análisis: placa Petri con cepas de Enterococcus Faecalis y Candida albicans a las que se les aplicó diferentes concentraciones de aceite</p>

<p><i>zeylanicum Breyn</i> (canela), <i>Origanum vulgare</i> L. (orégano) y de la asociación de <i>Cinnamomum zeylanicum Breyn</i> (canela) + y <i>Origanum vulgare</i> L. (orégano), mediante la técnica de difusión de disco?</p> <p>b) ¿Cuál es la sensibilidad según la escala de Duraffourd y Lapraz, que presenta <i>Candida Albicans</i> frente al aceite esencial de <i>Cinnamomum zeylanicum Breyn</i> (canela), <i>Origanum vulgare</i> L. (orégano) y de la asociación de <i>Cinnamomum zeylanicum Breyn</i> (canela) + y <i>Origanum vulgare</i> L. (orégano), mediante la técnica de difusión de disco?</p> <p>c) ¿Cuál es la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de <i>Cinnamomum zeylanicum Breyn</i> (canela), <i>Origanum vulgare</i> L. (orégano) y de la asociación <i>Cinnamomum</i></p>	<p><i>Cinnamomum zeylanicum Breyn</i> (canela), <i>Origanum vulgare</i> L. (orégano) y de la asociación de <i>Cinnamomum zeylanicum Breyn</i> (canela) + y <i>Origanum vulgare</i> L. (orégano), mediante la técnica de difusión de disco.</p> <p>b) Establecer la sensibilidad según la escala de Duraffourd y Lapraz, que presenta <i>Candida Albicans</i> frente al aceite esencial de <i>Cinnamomum zeylanicum Breyn</i> (canela), <i>Origanum vulgare</i> L. (orégano) y de la asociación de <i>Cinnamomum zeylanicum Breyn</i> (canela) + y <i>Origanum vulgare</i> L. (orégano), mediante la técnica de difusión de disco.</p> <p>c) Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de <i>Cinnamomum zeylanicum Breyn</i> (canela), <i>Origanum vulgare</i> L. (orégano) y de la</p>			<p>esencial de <i>Cinnamomum zeylanicum Breyn</i> y <i>Origanum vulgare</i>. <input type="checkbox"/> Unidades de muestreo</p> <p>Microbiano: Colonia de cada cepa de <i>Enterococcus Faecalis</i> y <i>Candida albicans</i></p> <p>Biológico: extracto de aceite esencial de <i>Cinnamomum zeylanicum Breyn</i> y <i>Origanum vulgare</i> en diferentes concentraciones</p>
---	---	--	--	---


<p><i>zeylanicum Breyn</i> (canela) + <i>Origanum vulgare L.</i> frente a las cepas de <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Candida Albicans</i>?</p> <p>d) ¿Cuál es la concentración mínima bactericida (CMB) y la concentración mínima antifúngica (CMF) del aceite esencial de <i>Cinnamomum zeylanicum Breyn</i> (canela) y <i>Origanum vulgare L.</i> (orégano) frente a las cepas de <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Candida albicans</i>?</p> <p>e) ¿Cuál es la concentración mínima bactericida (CMB) y la concentración mínima fungicida (CMF) de la asociación del aceite esencial de <i>Cinnamomum zeylanicum Breyn</i> (canela) + <i>Origanum vulgare L.</i> (Orégano) frente a las cepas de <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Candida albicans</i>?</p>	<p>asociación <i>Cinnamomum zeylanicum Breyn</i> (canela) + <i>Origanum vulgare L.</i> frente a las cepas de <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Candida Albicans</i>.</p> <p>d) Determinar la concentración mínima bactericida (CMB) y la concentración mínima antifúngica (CMF) del aceite esencial de <i>Cinnamomum zeylanicum Breyn</i> (canela) y <i>Origanum vulgare L.</i> (orégano) frente a las cepas de <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Candida albicans</i>.</p> <p>e) Determinar la concentración mínima bactericida (CMB) y la concentración mínima fungicida (CMF) de la asociación del aceite esencial de <i>Cinnamomum zeylanicum Breyn</i> (canela) + <i>Origanum vulgare L.</i> (Orégano) frente a las cepas de <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Candida albicans</i>.</p>			
---	---	--	--	--

Anexo2: Resultados de laboratorio



UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD

Urb. San José S/N Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ + 51 54 382038 ANEXO 1166
 ✉ laboratoriodeensayo@ucsm.edu.pe 🌐 http://www.ucsm.edu.pe 📄 Aptdo. 1350
 AREQUIPA - PERU




INFORME DE ENSAYO
Nº DE INFORME: ANA16D19.003922B

Nombre del Cliente : Milder Raquel Layme Huanca
Dirección del Cliente : Alfonso Ugarte 2da etapa Mz C4 Lote 19
RUC : No corresponde
Condición del Muestreado : Por el cliente
Descripción : Aceite esencial de canela
Tamaño de muestra : 5 mL
Fecha de Recepción : 16/04/2019
Fecha de Inicio del Ensayo : 16/04/2019
Fecha de Emisión de Informe : 22/05/2019
Página : 1 de 2

I. ANALISIS FISICO – QUIMICO:

ANÁLISIS	RESULTADO																																		
DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE METABOLITOS SECUNDARIOS CROMATOGRAFÍA GASEOSA CON DETECCIÓN DE MASAS (DENOMINACION NIST)	Name 1,3-Cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-m Benzene, 1-methyl-2-(1-methylethyl) Bicyclo[3.1.0]hexane, 4-methylene-1 1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl- Benzenepropanal 3-Cyclohexen-1-ol, 4-methyl-1-(1-me 3-Cyclohexene-1-methanol, .alpha.. Cinnamaldehyde, (E)- Phenol, 2-methoxy-3-(2-propenyl)- Copaene Bicyclo[7.2.0]undec-4-ene, 4,11,11-tr 2-Propen-1-ol, 3-phenyl-, acetate, (E .alpha.-Caryophyllene 2-Propenal, 3-(2-methoxyphenyl)- 2-Methyl-Z,Z-3,13-octadecadienol 2,6,10,14,18,22-Tetracosahexaene, 2,																																		
DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE METABOLITOS SECUNDARIOS (%) CROMATOGRAFÍA GASEOSA CON DETECCIÓN DE MASAS, MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN, POR NORMALIZACIÓN INTERNA (ÁREA)	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 80%;">Name</th> <th style="width: 20%;">%</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1,3-Cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-m</td><td>0,92</td></tr> <tr><td>Benzene, 1-methyl-2-(1-methylethyl)</td><td>1,11</td></tr> <tr><td>Bicyclo[3.1.0]hexane, 4-methylene-1</td><td>3,75</td></tr> <tr><td>1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-</td><td>2,7</td></tr> <tr><td>Benzenepropanal</td><td>0,39</td></tr> <tr><td>3-Cyclohexen-1-ol, 4-methyl-1-(1-me</td><td>0,89</td></tr> <tr><td>3-Cyclohexene-1-methanol, .alpha,..</td><td>0,81</td></tr> <tr><td>Cinnamaldehyde, (E)-</td><td>71</td></tr> <tr><td>Phenol, 2-methoxy-3-(2-propenyl)-</td><td>2,78</td></tr> <tr><td>Copaene</td><td>0,49</td></tr> <tr><td>Bicyclo[7.2.0]undec-4-ene, 4,11,11-tr</td><td>4,26</td></tr> <tr><td>2-Propen-1-ol, 3-phenyl-, acetate, (E</td><td>7,54</td></tr> <tr><td>.alpha.-Caryophyllene</td><td>0,96</td></tr> <tr><td>2-Propenal, 3-(2-methoxyphenyl)-</td><td>0,69</td></tr> <tr><td>2-Methyl-Z,Z-3,13-octadecadienol</td><td>0,52</td></tr> <tr><td>2,6,10,14,18,22-Tetracosahexaene, 2,</td><td>1,18</td></tr> </tbody> </table>	Name	%	1,3-Cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-m	0,92	Benzene, 1-methyl-2-(1-methylethyl)	1,11	Bicyclo[3.1.0]hexane, 4-methylene-1	3,75	1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-	2,7	Benzenepropanal	0,39	3-Cyclohexen-1-ol, 4-methyl-1-(1-me	0,89	3-Cyclohexene-1-methanol, .alpha,..	0,81	Cinnamaldehyde, (E)-	71	Phenol, 2-methoxy-3-(2-propenyl)-	2,78	Copaene	0,49	Bicyclo[7.2.0]undec-4-ene, 4,11,11-tr	4,26	2-Propen-1-ol, 3-phenyl-, acetate, (E	7,54	.alpha.-Caryophyllene	0,96	2-Propenal, 3-(2-methoxyphenyl)-	0,69	2-Methyl-Z,Z-3,13-octadecadienol	0,52	2,6,10,14,18,22-Tetracosahexaene, 2,	1,18
Name	%																																		
1,3-Cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-m	0,92																																		
Benzene, 1-methyl-2-(1-methylethyl)	1,11																																		
Bicyclo[3.1.0]hexane, 4-methylene-1	3,75																																		
1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-	2,7																																		
Benzenepropanal	0,39																																		
3-Cyclohexen-1-ol, 4-methyl-1-(1-me	0,89																																		
3-Cyclohexene-1-methanol, .alpha,..	0,81																																		
Cinnamaldehyde, (E)-	71																																		
Phenol, 2-methoxy-3-(2-propenyl)-	2,78																																		
Copaene	0,49																																		
Bicyclo[7.2.0]undec-4-ene, 4,11,11-tr	4,26																																		
2-Propen-1-ol, 3-phenyl-, acetate, (E	7,54																																		
.alpha.-Caryophyllene	0,96																																		
2-Propenal, 3-(2-methoxyphenyl)-	0,69																																		
2-Methyl-Z,Z-3,13-octadecadienol	0,52																																		
2,6,10,14,18,22-Tetracosahexaene, 2,	1,18																																		





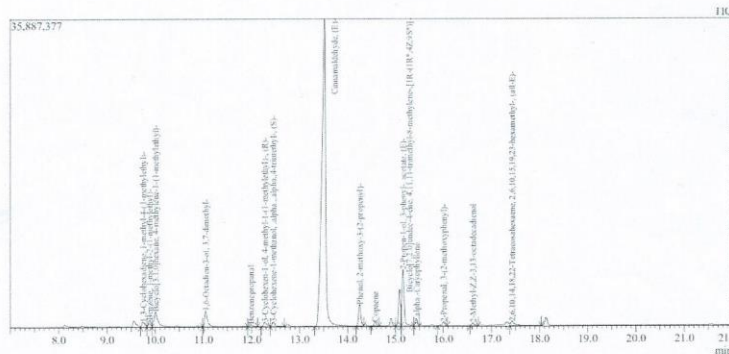
**UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD**

Urb. San José S/N Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ + 51 54 382038 ANEXO 1166
✉ laboratorioensayo@ucsm.edu.pe 🌐 http://www.ucsm.edu.pe 📄 Apto. 1350
AREQUIPA - PERÚ



**INFORME DE ENSAYO
N° DE INFORME: ANA16D19.003922B**

Nombre del Cliente	: Milder Raquel Layme Huanca
Dirección del Cliente	: Alfonso Ugarte 2da etapa Mz C4 Lote 19
RUC	: No corresponde
Condición del Muestreo	: Por el cliente
Descripción	: Aceite esencial de canela
Tamaño de muestra	: 5 mL
Fecha de Recepción	: 16/04/2019
Fecha de Inicio del Ensayo	: 16/04/2019
Fecha de Emisión de Informe	: 22/05/2019
Página	: 2 de 2



Peak#	R. Time	I. Time	F. Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	9.744	9.690	9.825	2672733	0.92	596721	1.03	4.48	V	1,3-Cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-methyl-2-(1-methyl-2-phenylethan-1-yl)ethyl)benzene
2	9.877	9.825	9.930	3231465	1.11	793492	1.30	4.07	V	Benzene, 1-methyl-2-(1-methyl-2-phenylethan-1-yl)ethyl-
3	10.007	9.930	10.980	10877271	3.75	1739901	2.99	6.25	SV	Bicyclo[3.1.0]hexane, 4-methylene-
4	11.045	10.980	11.915	7817935	2.70	1837963	3.16	4.25	SV	1,6-Octadiene-3-ol, 3,7-dimethyl-
5	11.985	11.915	12.125	1138698	0.39	261210	0.45	4.30	V	Benzenepropanal
6	12.271	12.200	12.390	2571945	0.89	555402	0.96	4.63	V	3-Cyclohexene-1-ol, 4-methyl-1-(1-methyl-2-phenylethan-1-yl)ethyl-
7	12.449	12.390	12.680	2349880	0.81	540881	0.94	4.30	SV	3-Cyclohexene-1-methanol, alpha-methyl-
8	13.523	13.315	15.065	205873896	71.00	35834396	61.62	5.75	S	Cinnamaldehyde (E)
9	14.252	14.180	14.335	8073102	2.78	2490989	4.28	3.24	TV	Phenol, 2-methoxy-3-(2-propenyl)-
10	14.576	14.490	14.660	1429229	0.49	465913	0.80	3.07	TV	Copaene
11	15.084	15.005	15.115	12351834	4.26	4232350	7.28	2.92	V	Bicyclo[7.2.0]undec-4-ene, 4,11,11,4-tetramethyl-
12	15.155	15.115	15.380	21879043	7.54	6922088	11.34	3.32	SV	2-Propen-1-ol, 3-phenyl-, acetate (E)
13	15.436	15.380	15.495	2780246	0.96	871038	1.50	3.19	V	alpha-Caryophyllene
14	16.005	15.875	16.080	2001541	0.69	467750	0.80	4.28	V	2-Propenal, 3-(2-methoxyphenyl)-
15	16.013	16.555	16.725	1505659	0.52	329315	0.57	4.57	V	2-Methyl-ZZ-3,13-octalacdieneol
16	17.430	17.380	18.035	3407388	1.18	539927	0.93	6.31	SV	2,6,10,14,18,22-Tetracosahexane, 2,6,10,14,18,22-tetracosahexane,
				289952985	100.00	58155330	100.00			

OBSERVACIONES:

- Este documento al ser emitido sin el símbolo de acreditación, no se encuentra dentro del marco de la acreditación otorgada por INACAL -DA.
- Los resultados emitidos en el presente informe se relacionan únicamente a las muestras ensayadas y no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad

Ricardo A. Abril Ramírez
Q.F. Ricardo A. Abril Ramírez
CQFDA 00824
ESPECIALISTA EN CONTROL DE CALIDAD LECC





UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD

Urb. San José S/N Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ + 51 54 382038 ANEXO 1166
 ✉ laboratoriodensayo@ucsm.edu.pe 🌐 http://www.ucsm.edu.pe 📄 Aptdo. 1350
 AREQUIPA - PERU



INFORME DE ENSAYO
Nº DE INFORME: ANA16D19.003922A

Nombre del Cliente	: Milder Raquel Layme Huanca
Dirección del Cliente	: Alfonso Ugarte 2da etapa Mz C4 Lote 19
RUC	: No corresponde
Condición del Muestreo	: Por el cliente
Descripción	: Aceite esencial de oregano
Tamaño de muestra	: 5 mL
Fecha de Recepción	: 16/04/2019
Fecha de Inicio del Ensayo	: 16/04/2019
Fecha de Emisión de Informe	: 22/05/2019
Página	: 1 de 2

I. ANALISIS FISICO – QUIMICO:

ANÁLISIS	RESULTADO																																										
DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE METABOLITOS SECUNDARIOS CROMATOGRAFÍA GASEOSA CON DETECCIÓN DE MASAS (DENOMINACION NIST)	Name .beta.-Myrcene (+)-4-Carene Benzene, 1-methyl-4-(1-methyl 1S-.alpha.-Pinene .alpha.-Pinene cis-.beta.-Terpineol Bicyclo[4.1.0]hept-2-ene, 3,7,7 1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethy cis-.beta.-Terpineol 2-Cyclohexen-1-ol, 1-methyl-4 Terpeneol, cis-.beta.- Benzene, 2-methoxy-4-methyl- 1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethy Thymol Benzenemethanol, 4-(1-methyl 1,3,6-Heptatriene, 2,5,6-trimet 2,6-Octadien-1-ol, 3,7-dimethy Caryophyllene .alpha.-Caryophyllene 1,3,6-Heptatriene, 2,5,6-trimet																																										
DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE METABOLITOS SECUNDARIOS (%) CROMATOGRAFÍA GASEOSA CON DETECCIÓN DE MASAS, MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN, POR NORMALIZACIÓN INTERNA (ÁREA)	<table border="0"> <thead> <tr> <th>Name</th> <th>Area%</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>.beta.-Myrcene</td><td>5,53</td></tr> <tr><td>(+)-4-Carene</td><td>10,6</td></tr> <tr><td>Benzene, 1-methyl-4-(1-methyl</td><td>6,21</td></tr> <tr><td>1S-.alpha.-Pinene</td><td>1,78</td></tr> <tr><td>.alpha.-Pinene</td><td>24,44</td></tr> <tr><td>cis-.beta.-Terpineol</td><td>4,82</td></tr> <tr><td>Bicyclo[4.1.0]hept-2-ene, 3,7,7</td><td>3,83</td></tr> <tr><td>1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethy</td><td>1,6</td></tr> <tr><td>cis-.beta.-Terpineol</td><td>13,37</td></tr> <tr><td>2-Cyclohexen-1-ol, 1-methyl-4</td><td>1,63</td></tr> <tr><td>Terpeneol, cis-.beta.-</td><td>0,58</td></tr> <tr><td>Benzene, 2-methoxy-4-methyl-</td><td>1,26</td></tr> <tr><td>1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethy</td><td>12,52</td></tr> <tr><td>Thymol</td><td>5,34</td></tr> <tr><td>Benzenemethanol, 4-(1-methyl</td><td>0,58</td></tr> <tr><td>1,3,6-Heptatriene, 2,5,6-trimet</td><td>0,49</td></tr> <tr><td>2,6-Octadien-1-ol, 3,7-dimethy</td><td>0,2</td></tr> <tr><td>Caryophyllene</td><td>3,68</td></tr> <tr><td>.alpha.-Caryophyllene</td><td>0,39</td></tr> <tr><td>1,3,6-Heptatriene, 2,5,6-trimet</td><td>1,14</td></tr> </tbody> </table>	Name	Area%	.beta.-Myrcene	5,53	(+)-4-Carene	10,6	Benzene, 1-methyl-4-(1-methyl	6,21	1S-.alpha.-Pinene	1,78	.alpha.-Pinene	24,44	cis-.beta.-Terpineol	4,82	Bicyclo[4.1.0]hept-2-ene, 3,7,7	3,83	1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethy	1,6	cis-.beta.-Terpineol	13,37	2-Cyclohexen-1-ol, 1-methyl-4	1,63	Terpeneol, cis-.beta.-	0,58	Benzene, 2-methoxy-4-methyl-	1,26	1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethy	12,52	Thymol	5,34	Benzenemethanol, 4-(1-methyl	0,58	1,3,6-Heptatriene, 2,5,6-trimet	0,49	2,6-Octadien-1-ol, 3,7-dimethy	0,2	Caryophyllene	3,68	.alpha.-Caryophyllene	0,39	1,3,6-Heptatriene, 2,5,6-trimet	1,14
Name	Area%																																										
.beta.-Myrcene	5,53																																										
(+)-4-Carene	10,6																																										
Benzene, 1-methyl-4-(1-methyl	6,21																																										
1S-.alpha.-Pinene	1,78																																										
.alpha.-Pinene	24,44																																										
cis-.beta.-Terpineol	4,82																																										
Bicyclo[4.1.0]hept-2-ene, 3,7,7	3,83																																										
1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethy	1,6																																										
cis-.beta.-Terpineol	13,37																																										
2-Cyclohexen-1-ol, 1-methyl-4	1,63																																										
Terpeneol, cis-.beta.-	0,58																																										
Benzene, 2-methoxy-4-methyl-	1,26																																										
1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethy	12,52																																										
Thymol	5,34																																										
Benzenemethanol, 4-(1-methyl	0,58																																										
1,3,6-Heptatriene, 2,5,6-trimet	0,49																																										
2,6-Octadien-1-ol, 3,7-dimethy	0,2																																										
Caryophyllene	3,68																																										
.alpha.-Caryophyllene	0,39																																										
1,3,6-Heptatriene, 2,5,6-trimet	1,14																																										





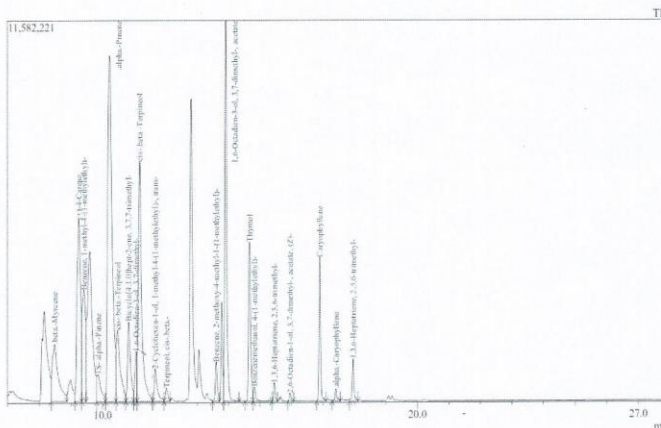
UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD

Urb. San José S/N Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ + 51 54 382038 ANEXO 1166
 ✉ laboratorioensayo@ucsm.edu.pe http://www.ucsm.edu.pe 🌐 Apdo. 1350
 AREQUIPA - PERU



INFORME DE ENSAYO
Nº DE INFORME: ANA16D19.003922A

Nombre del Cliente : Milder Raquel Layme Huanca
Dirección del Cliente : Alfonso Ugarte 2da etapa Mz C4 Lote 19
RUC : No corresponde
Condición del Muestreado : Por el cliente
Descripción : Aceite esencial de oregano
Tamaño de muestra : 5 mL
Fecha de Recepción : 16/04/2019
Fecha de Inicio del Ensayo : 16/04/2019
Fecha de Emisión de Informe : 22/05/2019
Página : 2 de 2



Peak#	R.Time	L.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	NH	Mark	Name
1	8.847	8.280	8.870	2244879	5.55	1736073	2.82	12.91	V	beta-Myxene
2	9.250	9.125	9.340	43093874	10.60	5569192	8.96	7.82	V	(+)-4-Carene
3	9.414	9.340	9.480	25229544	6.21	3379874	5.49	7.46	V	Benzene, 1-methyl-4-(1-methyl
4	9.861	9.810	10.090	7262977	1.78	807410	1.31	8.87	V	1S-alpha-Pinene
5	10.221	10.090	10.420	99339424	24.44	10456901	17.00	9.50	V	alpha-Pinene
6	10.478	10.420	10.740	18663381	4.82	2166574	3.52	9.05	V	cis-beta-Terpinol
7	10.820	10.740	10.860	15823075	3.83	2428418	3.95	6.42	V	Bicyclic 4-1,10-diene, 3,7,7
8	11.067	10.980	11.090	6554384	1.60	1518719	2.47	4.28	V	1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl
9	11.178	11.090	11.585	84323392	13.37	7281563	11.84	7.46	V	cis-beta-Terpinol
10	11.667	11.585	11.845	9629418	1.82	983714	1.60	6.74	V	2-Cyclohexen-1-ol, 1-methyl-4
11	12.025	11.945	12.135	2247975	0.58	407503	0.66	5.76	V	Terpinol, cis-beta-
12	12.061	12.480	13.705	5128412	1.26	1193113	1.94	4.29	V	Benzene, 2-methoxy-4-methyl-
13	12.904	12.835	14.130	5080657	12.52	1750168	18.77	4.41	SV	1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl
14	14.661	14.510	14.770	21793788	5.34	4841757	7.87	4.48	V	Thymol
15	14.809	14.770	15.375	2351490	0.58	436981	0.71	5.39	SV	Benzenesulfonol, 4-(1-methyl)
16	15.451	15.275	15.555	1965974	0.49	561327	0.91	3.54	V	1,2,8-Heptatriene, 2,5,6-trimethyl
17	15.946	15.875	16.065	794711	0.20	237770	0.39	3.34	V	2,6-Octadien-1-ol, 3,7-dimethyl
18	16.893	16.795	17.085	14969395	3.68	4372977	7.11	3.42	V	Caryophyllene
19	17.499	17.280	17.550	1399770	0.39	366222	0.66	4.34	V	alpha-Caryophyllene
20	17.955	17.840	18.110	4635250	1.14	1277568	2.08	3.63	V	1,3,8-Heptatriene, 2,5,6-trimethyl
				406399057	100.00	61510244	100.00			

OBSERVACIONES:

- Este documento al ser emitido sin el simbolo de acreditación, no se encuentra dentro del marco de la acreditación otorgada por INACAL-DA.
- Los resultados emitidos en el presente informe se relacionan únicamente a las muestras ensayadas y no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad

Ricardo A. Abril Ramfre.
Q.F. Ricardo A. Abril Ramfre.
 CQFDA 00824
 ESPECIALISTA EN CONTROL DE CALIDAD LECC



Anexo 3. Solicitud dirigida al Decano de la Facultad de Ciencias Agropecuarias

Tacna, 28 de diciembre del 2018



Señor:

MSC. MAGNO ROBLES TELLO

Decano de la Facultad de Ciencias Agropecuarias

Presente.-

De mi consideración:

Tengo el agrado de dirigirme a Ud., para manifestarle con relación a la solicitud de la Srta Milder Raquel Layme Huanca, estudiante de Odontología, sobre la identificación de dos muestras vegetales que empleará en su Proyecto de Tesis, debo informarle a Ud. que se ha procedido a identificar las muestras entregadas y la identificación, que se trata de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn "Canela" y *Origanum vulgare* L. "Orégano".

Sin más que informar al respecto, le saludo cordialmente.

Atentamente,

Rosario Z. de Chávez
Dra. Rosario Zegarra de Chávez

Profesora Principal FCAG

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS UNMSM
PROV. N°: 3238 UNMSM
FECHA: 28 DIC. 2018
A : Interesada
PARA : Su conocimiento y fines.



Anexo 4. Constancia de elaboración de tesis en las instalaciones del laboratorio del Área de Microbiología de la Facultad de Ciencias en la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann



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

Escuela Académico Profesional de: Biología-Microbiología y Física Aplicada



CONSTANCIA

Se hace constar que el Bachiller de la Escuela de Odontología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Privada de Tacna Señorita **Milder Raquel Layme Huanca** con código de matrícula N° 2014-048519 y con documento de identidad N° 72556009 realizó la parte experimental de su tesis titulada "EFECTO ANTIMICROBIANO DEL ACEITE DE *Cinnamomun zeylanicum* Breyn Y *Origanum vulgare* L. FRENTE A *Enterococcus faecalis* Y *Candida albicans*. ESTUDIO *IN VITRO*. 2019" Con fecha de enero a abril del 2019.

La presente se extiende a petición del interesado para los fines que el estime a los quince días del mes de noviembre de 2019.

Atentamente



Biólogo - Microbiólogo
Especialista del laboratorio de Microbiología

Edwin Denis Obando Velarde
Edwin Denis Obando Velarde
BIÓLOGO - MICROBIÓLOGO

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

Anexo 5. Galería de fotografías



Figura 11. Muestras vegetales de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn y *Origanum vulgare* L.



Figura 12. Método de destilación por arrastre de vapor para *Cinnamomum zeylanicum* Breyn y *Origanum vulgare* L.



Figura 13. Aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn y *Origanum vulgare* L.

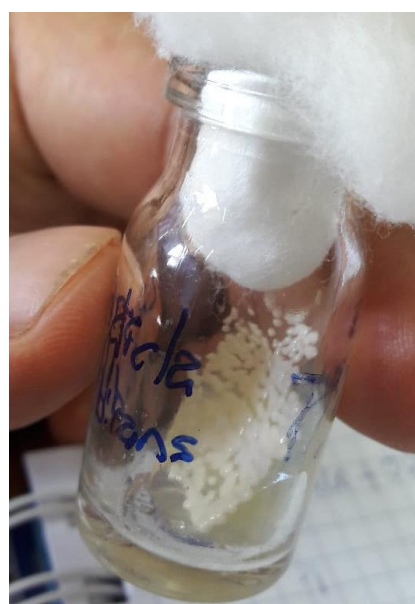
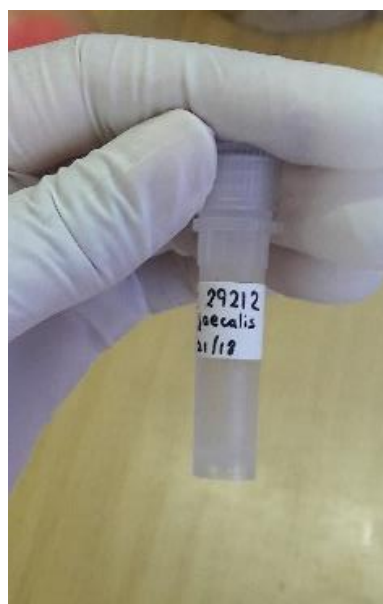


Figura 14. Cepas microbianas de *Enterococcus Faecalis* ATCC29212 y *Candida albicans* ATCC10231



Figura 15. Activación de las cepas microbianas de *Enterococcus Faecalis* ATCC29212 y *Candida albicans* ATCC10231

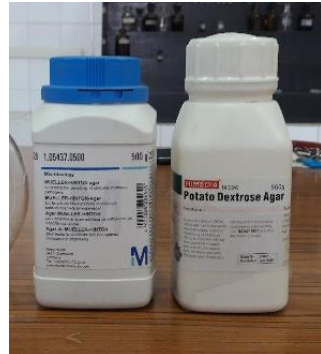


Figura 16. Preparación de los medios de cultivo.

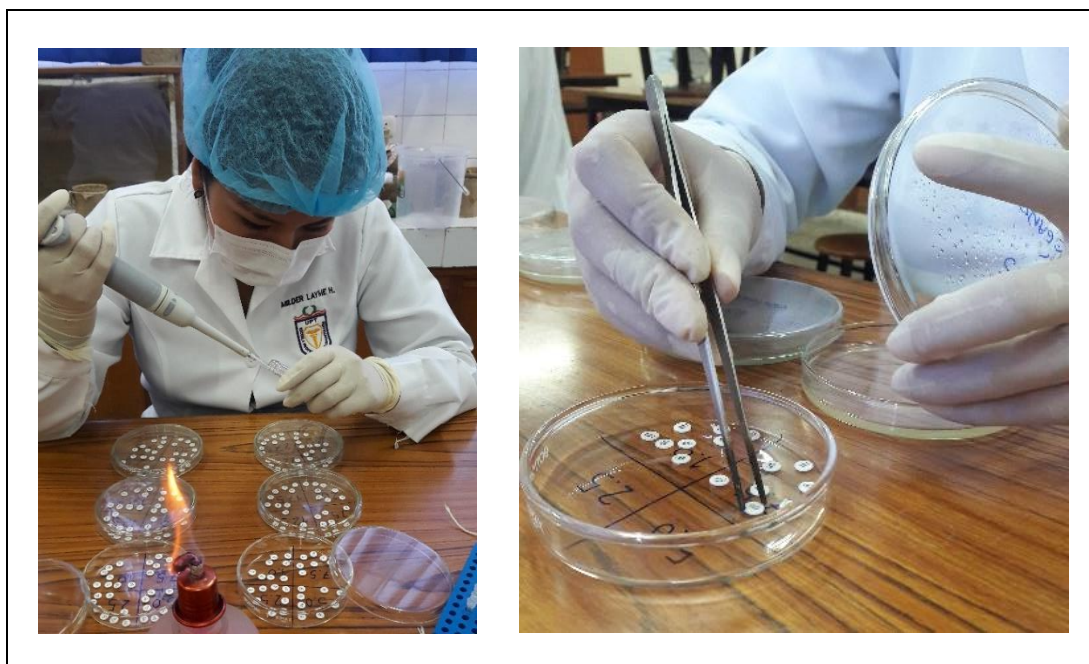


Figura 17. Dispensación de los discos de inhibición (embebidos con aceite esencial) sobre las placas inoculadas.



Figura 18. Halos representativos de la sensibilidad del *Enterococcus Faecalis* frente al aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn y *Origanum vulgare* L.

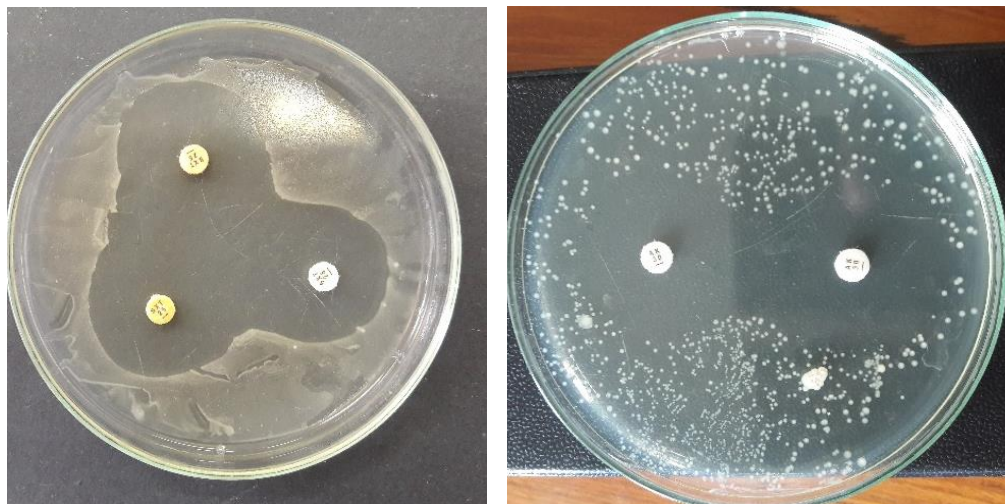


Figura 19. Halos representativos de la sensibilidad de *Candida albicans* frente al aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn y *Origanum vulgare* L

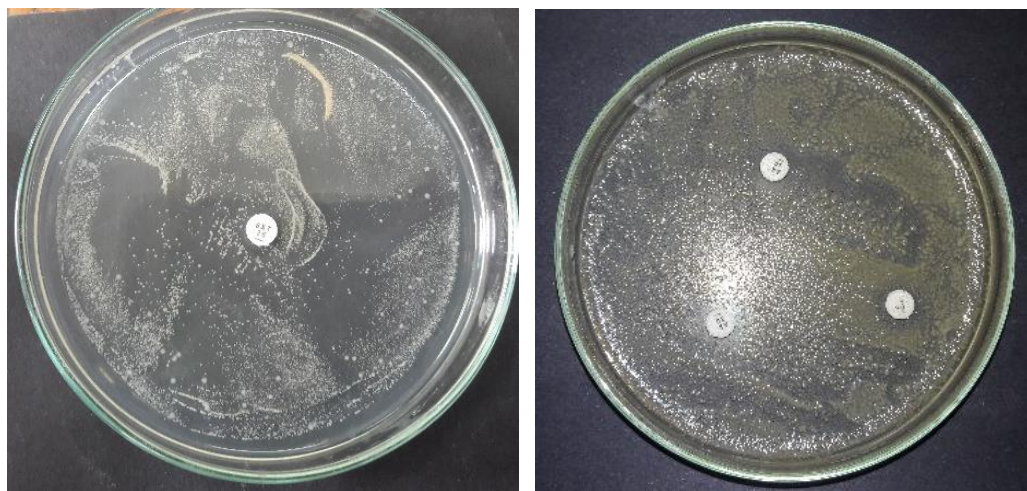


Figura 20. Controles negativos frente a cepas microbianas de *Enterococcus Faecalis* ATCC29212 y *Candida albicans* ATCC10231



Figura 21. Concentración mínima inhibitoria (CMI) del *Cinnamomum zeylanicum* Breyn frente a cepas microbianas de *Enterococcus Faecalis* ATCC29212 y *Candida albicans* ATCC10231



Figura 22. Concentración mínima inhibitoria (CMI) del *Origanum vulgare L* frente a cepas microbianas de *Enterococcus Faecalis ATCC29212* y *Candida albicans ATCC10231*



Figura 23. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de la asociación *Cinnamomum zeylanicum* Breyn + *Origanum vulgare* L frente a cepas microbianas de *Enterococcus Faecalis* ATCC29212 y *Candida albicans* ATCC10231



Figura 24. Controles positivos y negativos de *Enterococcus Faecalis* ATCC29212 y *Candida albicans* ATCC10231 para en CMI.

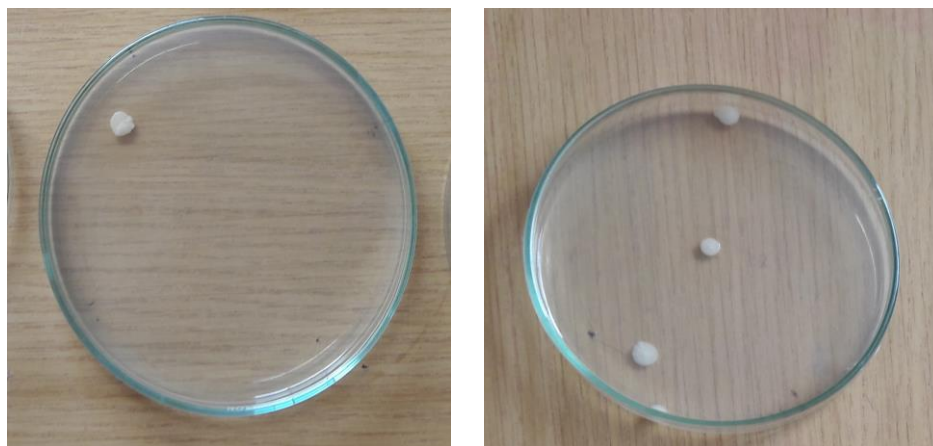


Figura 25. Unidades Formadoras de Colonias representativas de la prueba de CMF y CMB

